



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA Y SISTÉMICA

**COMPARACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HELMINTOS
COMPARTIDOS ENTRE TRES ESPECIES DE MARSUPIALES
DISTRIBUIDOS EN MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JORGE DAMIÁN LÓPEZ CABALLERO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2016.



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
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA Y SISTÉMICA

**COMPARACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HELMINTOS
COMPARTIDOS ENTRE TRES ESPECIES DE MARSUPIALES
DISTRIBUIDOS EN MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JORGE DAMIÁN LÓPEZ CABALLERO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2016.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de septiembre de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **LÓPEZ CABALLERO JORGE DAMIÁN** con número de cuenta **98066083** con la tesis titulada: "**Comparación morfológica y molecular de helmintos compartidos entre tres especies de marsupiales distribuidos en México**", realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN**:

| | |
|-------------|------------------------------------|
| Presidente: | DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA |
| Vocal: | DR. JORGE FALCÓN ORDÁZ |
| Secretario: | DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ |
| Suplente: | DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR |
| Suplente | DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS |

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 2 de diciembre de 2015.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

Unidad de Posgrado • Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas Edificio D, 1er. Piso, Circuito de Posgrados Cd. Universitaria
Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel. 5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx>

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme todo el apoyo indispensable para la realización de este proyecto y así, poder continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada para realizar mis estudios de doctorado (CVU 215908), y por la beca de complemento para la estancia de investigación que realice en *The Southern Illinois University*, Carbondale, E.U.A.

Al proyecto de investigación PAPIIT-UNAM (IN204514) a cargo del Dr. Gerardo Pérez Ponce de León, del cual se obtuvo el financiamiento para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al proyecto de investigación PAPIIT-UNAM (IN220113) a cargo de la Dra. Rosario Mata López, el cual financió la parte del trabajo de campo para la obtención del material biológico de la presente tesis doctoral.

Al Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por los siguientes apoyos económicos otorgados:

- Beca *PAEP-2013*, para Estancia Internacional; *The Southern Illinois University*, Carbondale, E.U.A., Octubre de 2013.
- Beca *PAEP-2015*, para Congreso Internacional; *90th Annual Meeting American Society of Parasitologist*, Omaha, Nebraska, E.U.A., Junio de 2015.

Al PCB por concederme el apoyo económico por medio de la Convocatoria de Mejoras de la tasa de graduación de Doctorado en Ciencias 2015, con el cual se financió gran parte de las secuencias analizadas en el presente proyecto, procesadas en el centro de secuenciación *High-Throughput Genomics Unit* de la Universidad de Washington, E.U.A. (<http://www.htseq.org./index.html>).

A los miembros de mi comité tutor: Dr. Gerardo Pérez Ponce de León (tutor principal), Dra. Ella Vázquez Domínguez y Dra. Livia León Paniagua, por aceptar la dirección de esta tesis y por aportar sugerencias y críticas certeras para mejorar el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi tutor, el Dr. Gerardo Pérez Ponce de León, por compartirme de su conocimiento y experiencia para alcanzar esta meta. Asimismo, le agradezco infinitamente por el tiempo y paciencia que me brindo y porque en todo momento confío en mis ideas.

A los miembros de mi jurado que sin objeción alguna aceptaron revisar mi tesis, señalando diversos puntos que me permitieron mejorar el escrito y me dieron consejos muy valiosos para enriquecer mi conocimiento: Dr. Matín García Varela, Dr. Jorge Falcón Ordaz, Dra. Ella Vázquez Domínguez, Dr. Rogelio Aguilar Aguilar y Dra. Blanca Estela Hernández Baños.

Mi más reconocido agradecimiento al personal del PCB, en especial a Rocío González, Lilia Espinosa, Lilia Jiménez y Armando Rodríguez, por brindarme su inigualable atención para la realización de trámites y por ser sumamente amables conmigo en todo momento.

A Silvia Espinosa Matías y Berenit Mendoza Garfías por su valioso apoyo en el procesamiento y toma de fotografías de MEB, y a Laura Marquéz Valdelamar por apoyarme y atender en todo momento mis apuros en la obtención de secuencias.

A todos los profesores que afortunadamente me impartieron cátedras durante mi formación doctoral, en especial a Helga Ochoterena, Susana Magañon, Ella Vázquez y Juan José Morrone.

A los admirables helmintólogos que desinteresadamente me apoyaron y brindaron consejos durante la realización de este proyecto (y desde siempre), en especial a Rosario Mata López, Luis García Prieto, David Osorio Sarabia, Virginia León Régagnon, Alejandro Ocegüera Figueroa, Matín García Varela, Agustín Jiménez Ruíz y Sergio Guillén Hernández.

A Virginia León Régagnon, Luis Jorge García Marquéz, Agustín Jiménez Ruíz y Sergio Guillén Hernández, por las facilidades y atenciones que me brindaron durante la obtención de material biológico del presente proyecto.

Con especial afecto por su disponibilidad, entrega y esfuerzo a mis compañeros y amigos que siempre estuvieron a mi lado en el trabajo de campo, por compartir tantas experiencias gratas y otras no tanto. Gracias a las alevosas y ventosas Karla Acosta (alias la karlita), Samantha Contreras (alias la sam) y Sara Ramírez. Asimismo, le agradezco infinitamente a Uriel Garduño (el uri), porque en todo momento me apoyo en las colectas, a pesar del tormentoooo! Sin ellos, no habría podido revisar tantos tlacuaches!

A mis compañeros del laboratorio de helmintos de la CNHE-IBUNAM, por hacer de éste un mejor lugar para estudiar, trabajar y aprender, durante 10 añitos nada más. Gracias a Ricardo Salas (alias el benyas), David, etc, etc, Hernández (alias el pandilla, el machin, el gurú, etc.), Brenda Solorzano (Brendita), Nallely Ruíz (alias la nay o la ruda), Gisela Flores, Jossué Jiménez, Aldo Merlo, Victor, Samara, Lupita, Lulú, Polito, Lalito, Ale, Jesús (alias el vikingo), Carlos Pinacho y Carlos Palmero. Con especial afecto a Leticia Barragan e hijas, por permitirme construir una amistad muy linda, llena de relajo, bromas, enojos y por compartirme siempre de sus alimentos cada que les decía...un pancito por el amor de Dios!

Con especial admiración a mi gran amigo Alejandro Ocegüera Figueroa, porque de manera desinteresada siempre me brindó su atención y apoyo en los avances de la presente tesis. Sus críticas, comentarios y regaños (obviamente no podían faltar), me impulsaron a esforzarme un poco más en pensar mejor las cosas y realizarlas de la misma manera.

A mis dos buenos amigos del doctorado que me brindaron su amistad, tiempo y valiosa ayuda, Jesica Arcangeli (alias la jessi) y Lázaro Guevara (alias el lázaro levántate y anda o el mondragonote).

A mis padres Martha Caballero y Jorge López, y hermanas Carolina e Iriliana, por ser quienes son, unas hermosas y grandes personas. Gracias por darme tantos momentos inolvidables, por compartir tantas sonrisas y por enseñarme que el amor, el respeto, la comprensión y el apoyo son esenciales dentro de una familia. Los quiero mucho!!

Con el más reconocido e infinito agradecimiento a mi esposa Rosario e hija Adrianita, quienes con tinta permanente de amor y felicidad, le han dado color a mi vida. Sabía que iba a llegar el momento de escribirles algunas líneas en agradecimiento a todo su apoyo, comprensión y amor que me han brindado para alcanzar este sueño, sin embargo, no encuentro las palabras precisas que describan lo que siento por ustedes, ya que el infinito y más grande amor que les tengo se me ha vuelto inexplicable. Disculpenme por no saber expresar en palabras lo que en un beso, en un abrazo y en un suspiro, mi corazón, mente y alma sienten por ustedes. Solo quiero que sepan que soy muy afortunado, ya que habiendo tantos mundos, tanto tiempo y tanto espacio, hallamos coincidido y ser parte de mis mayores y mejores aventuras...ser tu compañero de vida, mamá ayo, y ser tu ejemplo de vida, Ady. Los amo inmensamente!!

Finalmente, agradezco a Dios... por ser quién soy, por tener lo que tengo, por darme la dicha de realizar mis sueños y por esta hermosa y bienaventurada vida!!

*Un pájaro posado en un árbol
nunca tiene miedo de que la rama se rompa
porque su confianza no está en la rama
sino en sus propias alas.*

DEDICATORIA

*A mis padres y hermanas
A mi esposa Rosario
y
A mi hija Adrianita...el gran amor de mi vida.*

*Un nuevo logro comienza
con la intención de intentarlo.*

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| I. INTRODUCCIÓN GENERAL | 5 |
| Estrategias metodológicas para la delimitación de especies de helmintos | |
| Biología, sistemática y distribución geográfica de los hospederos | |
| Género <i>Didelphis</i> | |
| Género <i>Philander</i> | |
| Estudios helmintológicos de <i>Didelphis marsupialis</i> , <i>D. virginiana</i> y <i>Philander opossum</i> en México. | |
| II. HIPÓTESIS | 33 |
| III. OBJETIVOS | 34 |
| IV. RESULTADOS | 35 |
| CAPÍTULO 1 | 36 |
| Helminths of three species of opossums (Mammalia: Didelphidae) from Mexico. | |
| CAPÍTULO 2 | 59 |
| Genetic divergence of <i>Oligacanthorhynchus microcephalus</i> (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae), parasite of three species of opossums (Mammalia: Didelphidae) across central and southeastern Mexico. | |
| CAPÍTULO 3 | 72 |
| Delimitación de especies en <i>Rhopalias coronatus</i> (Digenea: Rhopalidae) y <i>Turgida turgida</i> (Nematoda: Physalopteridae) de marsupiales de México. | |
| V. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES | 111 |
| VI. LITERATURA CITADA | 122 |

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

- Figura 1.** Asociaciones históricas entre genes, organismos y áreas: (a) árbol de genes dentro de un árbol de especies, (b) filogenia recíproca entre hospedero-parásito, y (c) clado de organismos divergiendo en función de eventos vicariantes. Tomado y modificado de Page & Charleston (1998).
- Figura 2.** Filogenia en escala de tiempo de marsupiales didélfidos basada en análisis bayesianos con reloj molecular relajado. El color de las ramas indica el tipo de hábitat reconstruido mediante un análisis de máxima verosimilitud. Los cuadros al final de las ramas muestran la distribución geográfica de los taxa actuales: la parte superior sombreada indica endemismo norteamericano, la parte inferior sombreada indica endemismo sudamericano y ambas partes sombreadas indican una distribución en ambas partes del continente americano. Los círculos en los internodos indican la probabilidad de que el evento de cladogénesis ocurrió en Sudamérica (gris), o que fue resultado de la dispersión a través del Istmo de Panamá (blanco). Géneros representativos de los didélfidos se muestran a la derecha del árbol, de arriba hacia abajo: *Thylamys*, *Gracilinanus*, *Chironectes*, *Marmosa*, *Monodelphis* y *Caluromys*. Tomada y modificada de Jansa *et al.* (2013).
- Figura 3.** Parte de la hipótesis filogenética de la familia Didelphidae en la que se resaltan las relaciones filogenéticas entre *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*. Topología obtenida mediante análisis de parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, a partir de la evaluación de cinco genes concatenados (BRCA1+DMP1+IRBP+vWF+RAG1; 7320 pb). Valores de soporte indicados con un círculo en cada nodo. En gris se representan valores de bootstrap ≤ 75 % y en negro se representan valores de bootstrap y probabilidades posteriores ≥ 76 % o ≥ 0.95 . Tomada y modificada de Voss & Jansa (2009).
- Figura 4.** Distribución geográfica a nivel continental y República Mexicana de las especies *D. marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*. (Fuente: The IUCN Red List of Threatened Species, <http://www.iucnredlist.org>).
- Cuadro 1.** Procesos que operan dentro de la microevolución.

RESUMEN

La familia Didelphidae conforma un grupo monofilético que contiene 89 especies. Aproximadamente el 90% de éstas son endémicas de Sudamérica, aunque existen especies que tienen una distribución septentrional. En México, área donde convergen las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical, habitan ocho especies de didélfidos, las cuales representan a siete de los 17 géneros de marsupiales en América (*Marmosa mexicana*, *Tlacuatzin canescens*, *Metachirus nudicaudatus*, *Chironectes minimus*, *Caluromys derbianus*, *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana*, y *Philander opossum*). Estas tres últimas especies presentan una amplia distribución y son relativamente abundantes en territorio nacional ocupando diferentes hábitats, por lo que su fauna helmintológica ha sido estudiada en algunas localidades. Sin embargo, en ningún estudio se ha abordado la diversidad genética de sus helmintos. Estas tres especies de marsupiales comparten al menos doce especies de helmintos, siendo parte de su fauna helmintológica principal y elementos muy importantes para estudiar diferentes aspectos de su historia evolutiva y biogeográfica, pues se ha referido en diversas ocasiones que el contenido de información que arrojan los organismos parásitos, pueden ser utilizados como herramienta para entender diferentes aspectos de la biología de sus hospederos. El presente trabajo se inserta precisamente en la idea de aportar información desde diversos puntos de vista, por ejemplo: diversidad genética, historia evolutiva y biogeográfica de tres de las doce especies de helmintos que comparten estas tres especies de marsupiales, estas son: el acantocéfalo *Oligacanthorhynchus microcephalus*, el trematodo *Rhopalias coronatus* y el nematodo *Turgida turgida*.

Los objetivos de esta tesis se fundamentan en probar la hipótesis de que los parásitos y los hospederos tienen una historia evolutiva común y que, el estudio de la diversidad genética de los parásitos, dará información importante sobre la propia historia de los hospederos a los que están asociados y lograr un mayor entendimiento, a través de la asociación hospedero-parásito de la historia evolutiva y biogeográfica de los hospederos. Los objetivos son: 1) determinar la variación genética entre los individuos de las tres especies de helmintos; 2) establecer criterios de delimitación de especies; y 3) identificar patrones y/o procesos evolutivos a partir del análisis de secuencias de ADN de distintas poblaciones de los helmintos que pudiesen corresponder con las relaciones filogenéticas o geográficas de sus hospederos.

Entre agosto del 2011 y agosto del 2014 se recolectaron 68 tlacuaches (20 *D. marsupialis*, 33 *D. virginiana* y 15 *P. opossum*), en 18 localidades, en ambas regiones biogeográficas de México. Todos los helmintos fueron recuperados de distintos órganos de sus hospederos y procesados para su estudio morfológico. En particular, las tres especies de helmintos en las que se centra la tesis, y que son de las más frecuentes y abundantes de cada phylum, se procesaron para un estudio de diversidad genética. A continuación se mencionan brevemente los resultados obtenidos, seccionados en tres capítulos.

En el capítulo I se estableció la composición helmintológica de las especies *D. marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*, a partir del esfuerzo de muestreo mencionado anteriormente, al que se sumaron todos los registros previos para estos hospederos en México. En este estudio se obtuvieron nueve registros nuevos de helmintos y 66 registros de localidades

nuevas. Asimismo, se adicionó el registro de la especie de trematodo *Brachylaima didelphus* a la composición de la helmintofauna de estos didélfidos en México.

En el capítulo II se evaluó la variación genética del acantocéfalo *Oligacanthorhynchus microcephalus*. En total, 81 acantocéfalos fueron obtenidos de ocho localidades del centro y sureste de México. Se obtuvieron secuencias de dos marcadores moleculares: citocromo *c* oxidasa subunidad 1 y la subunidad ribosomal mayor (cox 1 y rRNA 28S, respectivamente), con los cuales se realizaron análisis filogenéticos individuales para cada gen y el combinado de ambos genes. Adicionalmente, se estimaron las distancias genéticas para cada gen. Los análisis genéticos y la evidencia morfológica, permitieron identificar dos linajes que pudieran representar especies independientes. No obstante, para reforzar estos resultados, se requiere de un muestreo que comprenda un mayor rango de distribución latitudinal (incluyendo la localidad tipo) de esta especie.

En el capítulo III se aborda el aspecto de delimitación de especies de dos helmintos (*Rhopalias coronatus* y *Turgida turgida*), asociados a tres especies de marsupiales distribuidos en México. Se obtuvieron secuencias del marcador cox 1, para ambos casos, así como la región completa de los espaciadores internos de la transcripción (ITSs) para *R. coronatus* y la subunidad ribosomal menor (rRNA 18S) para *T. turgida*, con las cuales se realizaron análisis filogenéticos moleculares, para matrices individuales y concatenadas, con el objetivo de detectar linajes dentro de lo que se consideran especies únicas. Asimismo, se estimaron las distancias genéticas para cada marcador y se construyeron redes de haplotipos a partir de las matrices mitocondriales para re-evaluar el límite entre las especies filogenéticas y proponer escenarios de especiación, los cuales pudiesen corresponder o no, con las relaciones filogenéticas de los hospederos o bien, con su distribución geográfica. Los resultados permitieron identificar dos linajes en cada una de las especies bajo estudio. Sin embargo, en ninguno de los casos se observa correspondencia con la especie de hospedero, es decir, que en este sistema hospedero-parásito, no es la filogenia de los hospederos la que influye en la filogenia de sus parásitos. Sin embargo, cada uno de los linajes identificados muestran una correspondencia de distribución geográfica con sus particularidades.

ABSTRACT

The family Didelphidae comprises a monophyletic group containing 89 species. About 90% of these are endemic to South America, though they are species with a septentrional distribution. Mexico, where the Nearctic and Neotropical biogeographic regions converge, is inhabited by eight species of didelphids, which represent seven of the 17 genera of marsupials in America (*Marmosa mexicana*, *Tlacuatzin canescens*, *Metachirus nudicaudatus*, *Chironectes minimus*, *Caluromys derbianus*, *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana*, y *Philander opossum*). These three last species present a wide distribution and are relatively abundant in Mexican territory, occupying different habitats, and their helminthologic fauna has been studied in some localities. However, no study has been made concerning the genetic diversity of their helminth parasites. These three marsupial species share at least twelve helminths species, which are part of their main helminthologic fauna and very important elements to study aspects of their evolutive and biogeographic history, being that it has been referred in diverse occasions that the information obtained from parasite organisms can be used as a tool to understand different aspects of the biology of their hosts. This work focuses precisely in the idea of presenting information from different points of view, for example: genetic diversity, evolutive and biogeographic history of three of the twelve helminth species that are shared by these three marsupial species, these are: acanthocephalan *Oligacanthorhynchus microcephalus*, trematode *Rhopalias coronatus* and nematode *Turgida turgida*.

These thesis objectives are founded in proving the hypothesis that parasites and hosts have a common evolutive history and that the study of the genetic diversity of the parasites gives important information about the history of the hosts they are associated to, thus achieving greater understanding, through the host-parasite association, of the evolutive and biogeographic history of the hosts. The objectives are: 1) determining the genetic variation between the individuals of the three species of helminths; 2) establishing criteria for species delimitation; and 3) identifying patterns and/or evolutive processes from the annalysis of DNA sequences from different populations of the helminths that may correspond to the filogenetic or geographic relationships of their hosts.

Between August 2011 and August 2014, 68 opossums (20 *D. marsupialis*, 33 *D. virginiana* y 15 *P. opossum*) were collected in 18 localities in both biogeographic regions of Mexico. All the helminths were recovered from different organs of their hosts and processed for morphological studies. Particularly, the three species of helminths in which the thesis is centered, and that are the most frequent and abundant of each phylum, were processed for a genetic diversity study. Next, the obtained results are briefly mentioned, divided in three chapters.

In chapter I, the helminthological composition of the species *D. marsupialis*, *D. virginiana* and *P. opossum* was established from the sampling effort previously mentioned, to which all the previous registers for these hosts in Mexico were added. In this study, nine new registers of helminths were obtained and 66 registers from new localities. Also, the register of the trematode species *Brachylaima didelphus* was added to the composition on the helminth fauna of these didelphids in Mexico.

In chapter II, the genetic variation of acanthocephalan *Oligacanthorhynchus microcephalus* was evaluated. A total of 81 acanthocephalans were obtained from eight localities of the center and southwest of Mexico. Sequences were obtained for two molecular markers: cytochrome *c* oxidase subunit 1 and the large ribosomal subunit (cox 1 and rRNA 28S, respectively), with which individual phylogenetic analysis were performed for each gene and the combination of both genes. Additionally, genetic distances were estimated for each gene. Genetic analysis and morphological evidence allowed the identification of two lineages that may represent independent species. To reinforce these results, sampling from a greater latitudinal distribution range (including the type locality) is required.

In chapter III, species delimitation of two helminth species associated to three marsupial species distributed in Mexico (*Rhopalias coronatus* and *Turgida turgida*) is evaluated. Sequences were obtained for the cox 1 marker for both cases, as well as the complete region of the intern translation spaces (ITSs) for *R. coronatus* and the small ribosomal subunit (rRNA 18S) for *T. turgida*, with which molecular phylogenetic analysis were performed, for individual and concatenated matrixes, with the objective of detecting lineages within what are considered to be single species. Also, genetic distances were estimated for each marker and haplotype networks were constructed from the mitochondrial matrixes to reevaluate limits between phylogenetic species and propose speciation scenarios, which may or may not correspond with the phylogenetic relationships of the hosts or with their geographic distribution. The results allowed the identification of two lineages in each of the species under study. However, in none of the cases a correspondence with the host species can be observed, meaning that, in this host-parasite system, it is not the phylogeny of the hosts that influences the phylogeny of their parasites. Nevertheless, each of the identified lineages shows a geographic distribution correspondence with their particularities.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los parásitos son organismos abundantes y diversos. Algunos autores han estimado que al menos el 50% de las especies existentes tienen esta estrategia de vida (Brooks & Hoberg, 2006; Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2011). Por ello es imprescindible incluir a este grupo de organismos en estudios de biodiversidad global. Asimismo, la interacción biológica hospedero-parásito es una de las más íntimas en la naturaleza, por lo que las alteraciones a cualquier nivel de una de las poblaciones implicadas, se refleja directamente en la otra (Brooks & McLennan, 1993). Además, se ha comprobado que los parásitos funcionan como indicadores biológicos de la biodiversidad contemporánea ya que proveen señales sobre la historia evolutiva y biogeográfica de otros organismos, de la estructura de los ecosistemas y de los procesos que subyacen a la diversificación de la vida (Brooks & Hoberg, 2000; Poulin & Morand, 2000, 2004; Brooks *et al.*, 2001; Hudson *et al.*, 2006; Hoberg & Brooks, 2008). Estas señales pueden ser inferidas considerando que la evolución de los organismos parásitos puede darse a tres niveles distintos dentro de la asociación; *i.e.* i) organismo-gen; ii) hospedero-parásito y; iii) área-organismo (Page & Charleston, 1998) (Figura 1).

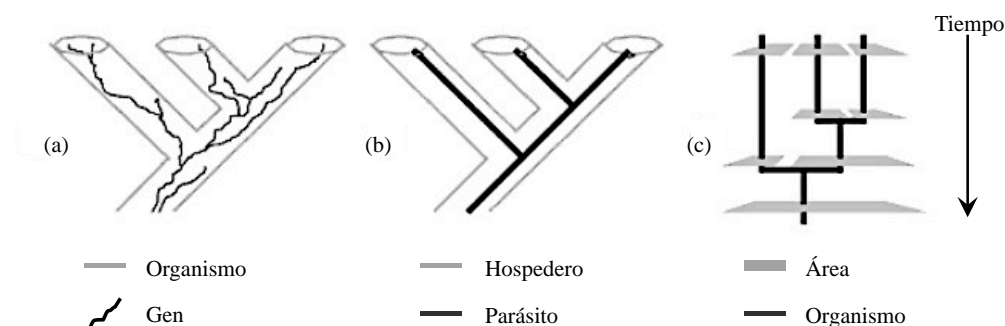


Figura 1. Asociaciones históricas entre genes, organismos y áreas: (a) árbol de genes dentro de un árbol de especies, (b) filogenia recíproca entre hospedero-parásito, y (c) clado de organismos divergiendo en función de eventos vicariantes. Tomado y modificado de Page & Charleston (1998).

De manera particular, los helmintos son organismos parásitos, metazoarios, con aspecto vermiforme, que no forman un grupo monofilético, ya que los cuatro phyla que los constituyen no están relacionados filogenéticamente, éstos son: Platyhelminthes (gusanos planos), Acanthocephala (gusanos con cabeza espinosa), Nematoda (gusanos redondos) y Annelida (Hirudinea) (gusanos segmentados). La mayoría de las especies poseen ciclos de vida complejos que involucran uno o más hospederos intermediarios, aunque existen especies con ciclo de vida directo.

De acuerdo a estimaciones (v. gr. Hugot *et al.*, 2001; Poulin & Morand, 2004), el número de especies de helmintos parásitos de vertebrados varía entre 23,670 y 52,000, con aproximadamente 13,570–40,000 especies de platelmintos, 8,400–10,500 nematodos, más de 1,200 acantocéfalos y alrededor de 400 anélidos (hirudíneos). Recientemente, con el uso masivo de secuencias de ADN y los avances metodológicos de análisis de este tipo de datos, se ha incrementado substancialmente el descubrimiento de nuevas especies de helmintos y propuesto complejos de especies crípticas (morfológicamente indistinguibles, pero genéticamente diferentes), mostrando una subestimación en la riqueza de especies de helmintos (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010; Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011).

Estrategias metodológicas para la delimitación de especies de helmintos

La especie es considerada como una entidad real en la naturaleza y es la unidad básica para medir y clasificar la diversidad biológica, la cual incluye la variedad de ecosistemas, de poblaciones y la variación genética entre y dentro de especies, tanto en poblaciones geográfica y genéticamente separadas como a nivel de individuos dentro de cada población (Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009). Por ello, la especie es la unidad conceptual en la cual se construyen teorías sobre mecanismos y procesos evolutivos (Poulin & Morand, 2004).

No obstante, diferentes grupos de organismos poseen distintas propiedades biológicas, ecológicas e históricas, lo cual ha originado que la unidad básica en cada uno de ellos, denominadas por todos “especie”, no pueda ser comparable entre sí, derivando en distintas propuestas de conceptos de especie (Mayden, 1997; Cracraft, 2000; de Queiroz, 2005; Wilkins, 2009, 2011). Asimismo, además de conceptualizar el término “especie” desde el punto de vista teórico, es de suma importancia poder reconocer y delimitar a las especies en la práctica. Por otra parte, es bien sabido que el proceso por el cual surgen nuevas especies, llamado especiación, vincula los procesos microevolutivos con los patrones macroevolutivos (Cuadro 1), por lo que para su análisis se debe hacer uso de diferentes herramientas, tales como: morfología, ecología, paleontología, genética, sistemática, entre otras. En este contexto, actualmente se explora la información genética como una nueva arista de los organismos parásitos. Este tipo de información en la interfaz entre poblaciones y especies es de gran utilidad para alcanzar el objetivo de delimitación de especies, ya que desde la más amplia perspectiva de la teoría evolutiva dicho objetivo se circunscribe en comprender los procesos y patrones evolutivos, y debe ser considerado un requisito previo para subsecuentes estudios de especiación y biodiversidad (Nadler, 2002; Sites & Marshall, 2003).

Cuadro 1. Procesos que operan dentro de la microevolución

| Proceso | Descripción | Referencia |
|-------------------|--|---------------------------|
| Mutación | Cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN de un gen determinado. | Berry & Barbadilla (2000) |
| Flujo génico | También llamado migración, es el desplazamiento de alelos desde una población a otra. | Berry & Barbadilla (2000) |
| Deriva genética | Fluctuaciones impredecibles en las frecuencias alélicas de una generación a la siguiente por eventos azarosos. Es más probable que ocurra en poblaciones pequeñas. | Campbell & Reece (2009) |
| Selección natural | Proceso en el que organismos con ciertas características heredadas tienen más probabilidad de sobrevivir y reproducirse que organismos con otras características. | Campbell & Reece (2009) |

En la necesidad de describir nuevas especies de parásitos metazoarios; los taxónomos contemporáneos han optado por la utilización de nuevas herramientas (principalmente la utilización de secuencias de ADN) que auxilien en la identificación y delimitación de especies. Por esta razón, la molécula de ADN puede brindar información taxonómica y evolutiva (Caujape-Castells *et al.*, 2003). Una de las ventajas en la utilización de secuencias de ADN es que representan otra fuente alternativa de variación de los organismos (Baptiste *et al.*, 2002), en comparación con los caracteres morfológicos, los cuales pueden ser escasos debido a la pérdida de estructuras que se presume han sufrido los helmintos como resultado de su vida parásita (Xiao *et al.*, 2005), así como variación fenotípica asociada a la distribución geográfica u hospedatoria, resultando en una errónea identificación (Eaton *et al.*, 2010).

La delimitación de especies de helmintos (incluyendo las especies crípticas), es importante para entender, interpretar e integrar diversos mecanismos y procesos evolutivos que se han dado a lo largo de su propia historia evolutiva, misma que es influenciada por las asociaciones que establecen con sus hospederos (Brooks & McLennan, 1993; Huelsenbeck *et al.*, 2001; Rosenberg & Nordborg, 2002). A continuación se señalan algunas estrategias metodológicas para el reconocimiento y delimitación de especies en helmintos.

Morfología

El reconocimiento de las especies se basa en emplear rasgos morfológicos para excluir o incluir individuos a ciertas entidades biológicas. El tipo de reconocimiento a través de cualquier característica morfológica se conoce como concepto linneano o morfológico de especie (Mayden, 1995). Generalmente, este tipo de caracteres se relacionan con el método fenético, el cual tiene como objetivo agrupar con la mayor cantidad de caracteres independientemente de su relación ancestro-descendiente. Es decir, formar agrupaciones de acuerdo con la similitud de una

gran cantidad de caracteres morfológicos (Sneath, 1976). Además, la variación morfológica de los parásitos esta asociada principalmente a tres aspectos: *i*) a la amplia distribución geográfica de sus hospederos, *ii*) a que se encuentran en diferentes hospederos y *iii*), a las condiciones ecológicas específicas en donde se desarrollan, por lo que se puede generar arbitrariedad en proponer grupos naturales (Hanzelová *et al.*, 2005). No obstante, dentro de esta herramienta se han desarrollado distintas maneras de analizar los caracteres morfológicos para la delimitación de especies de helmintos.

Morfología descriptiva

Desde sus comienzos, la morfología se centró en la descripción de la estructura observada: células, tejidos, órganos, dimensiones, formas y las relaciones entre ellas, etc. Las comparaciones entre grupos o poblaciones están basadas en el análisis de las diferencias de sus dimensiones lineales, ya que éstas permiten (frecuentemente) observar la variación intraespecífica y la distinción entre especies relacionadas.

Por otra parte, la morfometría de los organismos también incluye estudios basados en el análisis estadístico univariado de datos lineales de estructuras macroscópicas (Tatlisumak *et al.*, 2008; Wahl, 2009). En los últimos años, con los avance de la microscopía, se ha obtenido una mayor cantidad de características morfológicas que han permitido la delimitación de especies (v. gr. Bertoni-Ruiz *et al.*, 2011; López-Caballero *et al.*, 2009, 2013). Del mismo modo, con el avance estadístico y computacional, el estudio descriptivo pasó a la cuantificación y adquirió términos de mayor complejidad, donde no sólo se busca comparar parámetros entre grupos de estudio y control, sino que además se intenta hallar relaciones entre éstos, a manera de establecer asociaciones que permitan explicar todas las diferencias observadas y descubrir patrones de variación morfológicos intra e intergrupales. Como resultado, se comenzaron a utilizar los

análisis estadísticos multivariados, entre los más comunes: el análisis de componentes principales y de variables canónicas (Adams *et al.*, 2004; Hanzelova *et al.*, 2005; Havertkost & Gardner, 2008; Pinacho-Pinacho *et al.*, 2012).

Morfometría geométrica

La morfometría geométrica se ha convertido en las últimas décadas en una herramienta fundamental para el estudio de estructuras fenotípicas ya que proporciona detalles más exactos que la morfometría lineal. Su principal innovación teórica radica en un cambio rotundo en la aproximación al tamaño y la forma de las estructuras bajo estudio. En lugar de enfocarse en el análisis multivariado de un conjunto de medidas lineales entre puntos morfométricos, esta herramienta propone estudiar los cambios en el tamaño y forma a partir de un conjunto de puntos anatómicos de referencia (*landmarks*). La relación espacial en dos o tres dimensiones de estos puntos siempre se conserva a lo largo de todo el análisis, lo que permite “reconstruir” con mayor precisión el tamaño y forma del ejemplar estudiado (Van Der Molen *et al.*, 2007). Sin embargo, su principal limitante es que requiere de un gran número de individuos para su estudio, lo cual a veces no se tiene en estudios helmintológicos. Además, el estudio de la morfometría geométrica ha sido mayormente utilizado en grupos de parásitos que poseen un cuerpo o estructuras esclerosadas, como ácaros y garrapatas, a diferencia de los protozoarios y helmintos, quienes están sujetos a modificaciones morfológicas por su cuerpo blando, lo cual puede influir en las dimensiones morfológicas de los ejemplares y por lo tanto en los resultados y análisis posteriores.

Ecología

El concepto ecológico de especie, lo definió Van Valen (1976) como: linaje o un conjunto estrechamente relacionado de linajes, que ocupan una zona adaptativa mínimamente

diferente del resto de los linajes de su área de distribución. La forma de reconocer y delimitar a las especies mediante esta estrategia metodológica es correlacionando las condiciones y los recursos del ambiente con ciertas características adaptativas, generalmente morfológicas, de cada una de las poblaciones (Cerritos-Flores, 2007). Por lo tanto, la aplicación de este concepto al estudio de los helmintos, podría significar que cada especie de hospedero, al representar una zona adaptativa distinta, albergaría una especie distinta de parásito. Además, con el estudio de nuevas fuentes de información (como la genética), se ha evidenciado que esto no siempre se encuentra en la naturaleza, ya que se ha documentado que la misma especie puede adquirir formas distintas en su morfología dependiendo del hospedero que parasite (Hanzelová & Scholz, 1999), un fenómeno que podría llevar a sobreestimar el número de especies presentes en determinado ecosistema. Hoy en día, la ecología (como estrategia metodológica) es más utilizada como un argumento a favor para explicar posibles factores que estén favoreciendo en la diferenciación poblacional o en su caso, a la especiación.

Marcadores moleculares (secuencias de ADN)

En los últimos años, los caracteres moleculares de regiones codificantes y no codificantes de ADN, han contribuido en mayor medida al avance de las reconstrucciones filogenéticas y en la identificación y delimitación de especies. La aplicación de métodos para evaluar la información que proporciona la molécula del ADN en estudios de taxonomía y sistemática de helmintos se ha generalizado con el surgimiento y consolidación de la sistemática molecular (Vilas *et al.*, 2005).

Por su parte, la utilización de secuencias de ADN confiere ciertas ventajas sobre otro tipo de información, principalmente en obtener y evaluar un alto número de caracteres potencialmente informativos. No obstante, un paso previó a la evaluación de secuencias

codificantes, es el correcto alineamiento de las secuencias de ADN para cumplir con la premisa de homología requerida a cada uno de los caracteres que van a ser analizados (Catalán-Rodríguez, 2001).

Actualmente, los marcadores moleculares más utilizados para la delimitación de especies, son los mitocondriales (ADNmt), debido a que esta molécula se hereda por vía materna y no presenta recombinación por lo que se considera como un solo locus, lo que significa que todos los genes presentes en el genoma mitocondrial comparten una historia evolutiva sin importar que éstos tengan diferentes tasas de sustitución (Ballard & Whitlock, 2004). Diversos estudios moleculares han sido realizados utilizando secuencias de ADNmt para la delimitación de especies de parásitos (*v. gr.* León-Règagnon, 2010; Razo-Mendivil *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso exclusivo de ADNmt puede ser arriesgado, ya que implica un único locus, el cual puede estar sujeto a selección, puede presentar introgresión o puede que no sea posible identificar su dispersión entre poblaciones como consecuencia de diferencias entre especies, además de que el uso de un criterio de distancia genética “yardstick” puede ser arbitrario para delimitar especies, aunque sea utilizado como un enfoque prospectivo (Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011 y referencias ahí mencionadas). Por ello, cada vez con más frecuencia se aplica el uso combinado y comparativo de genealogías obtenidas de datos de ADNmt y ADN nuclear (ADNn). Este tipo de análisis permite reforzar la delimitación de poblaciones y/o especies donde se presume que no existe un único linaje, encontrando evidencia congruente entre los marcadores moleculares utilizados.

Nueva Taxonomía

Dentro de esta visión se encuentran iniciativas tales como la “Taxonomía del ADN” (*DNA Taxonomy*) (Tautz *et al.*, 2003; Blaxter, 2004) y el “Código de Barras de ADN” (*DNA*

barcoding) (Hebert *et al.*, 2003). La primera de éstas no ha sido del todo aceptada ya que propone que la identificación y clasificación de los organismos a una determinada especie ya no dependería de características morfológicas sino únicamente de las secuencias de ADN (Seberg *et al.*, 2003). En cambio, el *DNA barcoding* se propone como herramienta complementaria a la taxonomía tradicional para la identificación y delimitación de especies de helmintos de una manera rápida, precisa, automática y universal a partir de un marcador molecular estandarizado de ADNmt (≈ 648 pb) (Padial & De la Riva, 2006). Este marcador molecular corresponde a un mismo *locus* localizado en el gen de la citocromo *c* oxidasa I (COI), utilizado como un identificador único, un “código de barras”, el cual proporciona una alta resolución de distinción a nivel de especie (Hebert *et al.*, 2003; Tautz *et al.*, 2003). Asimismo, el *DNA barcoding* ha facilitado la identificación a nivel de especie de organismos en etapas larvales lo cual se dificulta mediante taxonomía tradicional, como sucede en el grupo de los helmintos (Gilmore *et al.*, 2009). Adicionalmente, mediante la utilización del Código de Barras de ADN se han logrado detectar señales de coevolución y/o de cambios de hospedero (*host switching*) en algunos sistemas hospedero-parásito (v. gr. Ricklefs *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003).

Hasta la fecha se han propuesto tres aproximaciones para determinar y delimitar especies a partir de la utilización del *DNA barcoding* (Goldstein & DeSalle, 2011), éstas son: distancia o divergencia genética (*yardstick*) de la región control (Hebert *et al.*, 2004); árboles filogenéticos (Elias *et al.*, 2007); e identificación de caracteres sinapomórficos que podrían ser utilizados para la descripción y delimitación de las nuevas especies (Sass *et al.*, 2007; Rach *et al.*, 2008; Goldstein & DeSalle, 2011).

Análisis filogenéticos

Actualmente, los análisis filogenéticos empleando caracteres moleculares, se han utilizado como estrategia para la delimitación de especies de helmintos ya que estos análisis permiten identificar la monofilia de un grupo sustentado por diversos caracteres sinapomórficos. Es decir, los fundamentos científicos del método cladístico están basados en métodos empíricos siguiendo las reglas de ancestría y descendencia agrupada por caracteres derivados compartidos. Recientemente, con el advenimiento de la incorporación de secuencias de ADN en helmintos, se han formulado hipótesis más robustas en estudios taxonómicos, ecológicos, filogenéticos, co-filogenéticos, etc. De manera paralela, se ha enriquecido el entendimiento sobre el origen, radiación y evolución de los diferentes grupos (*v. gr.* Olson *et al.*, 2001; Steinauer *et al.*, 2005). Actualmente, se combinan caracteres morfológicos y moleculares para formular hipótesis filogenéticas entre organismos, para estimar la variación dentro de las poblaciones y/o para probar hipótesis de adaptaciones ecológicas. Sin embargo, es común observar incongruencias entre los análisis morfológicos y moleculares, generando controversias sobre qué tipo de datos pueden reforzar en mayor grado las hipótesis evolutivas (Hillis & Wiens, 2000). El principal argumento a favor de la utilización de caracteres moleculares es su propiedad de universalidad; por ejemplo, cuando se requiere comparar linajes que divergieron tempranamente, es casi imposible formular hipótesis de homología mediante morfología, en cambio, existen genes presentes en todos los organismos –como los ribosomales y mitocondriales– que pueden proveer de información para las reconstrucciones filogenéticas, donde los caracteres morfológicos son inaplicables (Avice, 1994). Asimismo, se puede obtener una gran cantidad de caracteres moleculares en contraste con los estudios morfológicos.

Actualmente, la mayoría de trabajos publicados tienden (metodológicamente) a la utilización de análisis filogenéticos (parsimonia, máxima verosimilitud y/o inferencia bayesiana)

como herramienta para la delimitación de especies.

Parsimonia

La parsimonia ha sido durante mucho tiempo el principio metodológico más usado para inferir filogenias a partir de caracteres morfológicos (Lewis, 2001). En general, este principio se aplica seleccionando el árbol que minimice la longitud total (Swofford, 1998). En otras palabras, el principio de la parsimonia implica que todos los posibles caminos evolutivos que ha podido seguir un grupo natural, aquel que reconstruye su hipótesis filogenética por la vía más corta (el menor número de cambios evolutivos), es la que tiene más probabilidades de ser cierta. En este sentido, los parasitólogos han hecho uso de dicho principio con el objetivo de delimitar especies mediante el análisis de la morfología de ciertos grupos de parásitos, (v. gr. Pérez-Ponce de León & Brooks, 1995; León-Règagnon *et al.*, 1996; Near *et al.*, 1998). Sin embargo, el uso de caracteres morfológicos resulta ser poco útil debido a la mínima cantidad de información que puede ser incluida y evaluada en los análisis; además, se requiere de una basta experiencia en el grupo bajo estudio para reconocer caracteres morfológicos importantes y poder codificarlos y así obtener una hipótesis filogenética más robusta.

Por estas razones, la utilización de secuencias de ADNmt en estudios filogenéticos con parsimonia, se ha generalizado debido a que poseen una tasa de mutación elevada permitiendo distinguir especies. No obstante, este tipo de estrategia metodológica también ha sido cuestionada debido a los fenómenos de saturación y de atracción de ramas largas, detectados en los análisis filogenéticos. El fenómeno de saturación se da principalmente en las terceras posiciones de un codón de una secuencia codificante, y es responsable en gran medida de la homoplasia (caracteres compartidos que no son producto de la ancestría). Mientras que el efecto de atracción de ramas largas es la tendencia a unir taxa terminales que presentan ramas largas (un

número alto de cambios similares que han adquirido independientemente), especialmente si estos taxa están situados en clados muy próximos, conduciendo a la obtención de reconstrucciones falsas (Catalán-Rodríguez, 2001; Bergsten, 2005; Rubinoff & Holland, 2005). Estos fenómenos son resultado de que el principio de parsimonia supone que todos los linajes evolucionan a la misma tasa y que todas las mutaciones contribuyen de igual manera a la longitud de las ramas, además de que las sustituciones múltiples en sitios individuales y entre sitios tienen una tasa de heterogeneidad que el método no es capaz de corregir ya que no considera un modelo evolutivo. Por ello, algunas publicaciones en parasitología han optado por el análisis separado o combinado de otros marcadores moleculares, por ejemplo los nucleares: ITS's, 16S, 18S y 28S (v. gr. León-Règagnon & Brooks, 2003; Rosas-Valdez *et al.*, 2004; Ocegüera-Figueroa *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2008).

Máxima verosimilitud e Inferencia bayesiana

La máxima verosimilitud es un método de inferencia filogenética por medio del cual se evalúa una hipótesis evolutiva en comparación con otras, aceptando la hipótesis que maximice la probabilidad de observar los datos obtenidos (la de mayor probabilidad) (Eguiarte *et al.*, 1997). Este método considera el ajuste entre un modelo de proceso evolutivo (las probabilidades de mutación de una base en otra, la importancia de la deriva génica, etc.); los datos (secuencias de ADN) y cada uno de los árboles filogenéticos posibles. Es decir, el objetivo de la máxima verosimilitud es inferir la historia evolutiva que es más consistente con el conjunto de datos observados bajo un modelo evolutivo que se estima a partir de los datos (Posada & Crandall, 1998). Por su parte, la inferencia bayesiana determina la probabilidad posterior dada una probabilidad previa o a priori, una función de verosimilitud y ciertos datos, para lo que se utiliza el teorema de Bayes (Cummings *et al.*, 2003). Este teorema combina la probabilidad previa de un

árbol con la verosimilitud para poder producir una probabilidad posterior, es decir, cuál es la probabilidad de que los árboles obtenidos sean correctos. Estima también la probabilidad posterior de la topología, de las longitudes de rama, así como los parámetros del modelo de sustitución condicionado por los datos. Estos dos métodos generalmente se utilizan de manera simultánea con la finalidad de comparar las topologías arrojadas en los análisis y robustecer la hipótesis filogenética a considerar mediante el análisis de secuencias de ADNmt y ADNn (v. gr. Dorris *et al.*, 2002; Pinacho-Pinacho *et al.*, 2012).

Filogeografía

La filogeografía es una disciplina integrativa que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000). Es decir, en la filogeografía se analizan genealogías genéticas para determinar el impacto de los eventos históricos en la composición y estructura genética de poblaciones actuales (incluyendo cómo estos eventos pueden haber sido influenciados por los mecanismos microevolutivos) (Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009). Es por ello que la filogeografía ha sido ampliamente utilizada para describir eventos históricos (v. gr. fragmentación de hábitats, expansión de distribución geográfica, migración, extinción de linajes génicos o especiación) (Hardy *et al.*, 2002). Esta disciplina permite comparar patrones filogeográficos de especies o poblaciones co-distribuidas, formular hipótesis de eventos comunes como especiación o dispersión, así como identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieron haber influido en ellos (Arbogast & Kenagy, 2001; Zink, 2002; Lanteri & Confalonieri, 2003). Actualmente, existen varios estudios filogeográficos de especies de animales, basándose principalmente en secuencias de ADNmt, dado que presenta una alta tasa de mutación, no recombina y su herencia es matrilineal (Lanteri & Confalonieri, 2003). Cada secuencia de

ADNmt distinta entre los individuos de una población es conocida como haplotipo, los cuales son en su conjunto, los registros de la historia matrilineal de eventos mutacionales en una población bajo estudio (Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009). Este tipo de información ayuda a reforzar la delimitación de poblaciones y/o especies donde se presume que no existe un único linaje, por ejemplo en especies que tienen un rango amplio de distribución geográfica o en el caso de una especie de parásito que se encuentra en distintos hospederos. No obstante, debido al tipo de herencia del ADNmt y que corresponde a un solo locus, el cual puede estar sujeto a selección, puede implicar limitaciones al momento de hacer la reconstrucción de historias poblacionales y/o de especies (Avice, 2000, 2008; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Por ello, es importante examinar otro tipo de genes (por ejemplo de ADN nuclear), para descartar la hipótesis alternativa de que la historia filogeográfica obtenida sea de la especie y no del gen (Avice, 2000).

Coalescencia

La teoría de la coalescencia es un modelo matemático retrospectivo de recién incorporación a la genética de poblaciones. Esta teoría tiene como fundamento estudiar y describir la forma en que los eventos genéticos que ocurren dentro de las poblaciones determinan la forma de la genealogía de genes y se basa en la hipótesis de que todos los individuos de una población natural coalescen (se unen) en un ancestro común (Hudson, 1998; Nordborg, 2000). Esta teoría relaciona los patrones de ancestría común entre una muestra de genes y el tamaño y la estructura de la población total (Kuhner, 2009). Es por ello que el tiempo de coalescencia para una muestra, será el tiempo de coalescencia de toda la población. A diferencia de los procedimientos tradicionales de la genética de poblaciones, la teoría de la coalescencia se apoya en un marco matemático, estadístico y probabilístico (Avice, 2000). Los procesos de

coalescencia garantizan conexiones filogenéticas entre los genotipos de una especie. En otras palabras, un evento coalescente ocurre cuando dos linajes de moléculas de DNA se fusionan en una sola molécula en algún tiempo pasado (Templeton, 2006). En este sentido, la coalescencia ha permitido la fusión conceptual y analítica de la genética de poblaciones y la filogenia, auxiliando en la delimitación de especies partiendo de la identificación de linajes reconocidos en un árbol de genes (Nielsen & Beaumont, 2009). Hoy en día, existen algunos trabajos parasitológicos (v. gr. Ceccarelli *et al.*, 2012; Gebiola *et al.*, 2012; Hambäck *et al.*, 2013), en los que se han propuesto límites de especies y/o evidenciado complejos de especies crípticas mediante la aplicación de la coalescencia, utilizando el algoritmo matemático *Generalized Mixed Yule-Coalescent (GMYC)* (Pons *et al.*, 2006). De manera particular en el campo de la helmintología y hasta el momento, existe un solo trabajo en el que se propone la delimitación de especies de un género de trematodos parásitos de peces dulceacuícolas de México, mediante la utilización del algoritmo *GMYC* (Martínez-Aquino *et al.*, 2013). No obstante, esta estrategia metodológica esta siendo ampliamente aceptada por la comunidad científica debido a que estudios previos han identificado agrupaciones genéticas que generalmente corresponden con sistemas de clasificación existentes (Monaghan *et al.*, 2009); además de que resalta patrones de co-especiación entre parásitos y sus hospederos (Page, 2003; Hambäck *et al.*, 2013); y tiene la capacidad de reflejar las relaciones de los organismos con su ambiente (Powell, 2012).

Biología, ecología, sistemática y distribución geográfica de los hospederos

De acuerdo con Wilson & Reeder (2005), la clase Mammalia con aproximadamente 5,420 especies existentes, se clasifican en dos subclases: Prototheria y Theria. La primera incluye únicamente al orden Monotremata (monotremados o mamíferos ovíparos), mientras que la

segunda subclase esta conformada por las infraclases Metatheria (marsupiales o mamíferos vivíparos con marsupio) y Eutheria (mamíferos placentados), representando dos líneas evolutivas que divergieron durante el Jurásico inferior, hace ~199 millones de años (Ma) en lo que se conoce como Laurasia (Luo *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2011). Los fósiles más antiguos de metaterios basales fueron encontrados en Asia y corresponden al Cretácico superior, entre 99–65 Ma (Cifelli & Davis, 2003; Luo *et al.*, 2003; Kielan-Jaworowska *et al.*, 2004).

Inicialmente todos los marsupiales estaban agrupados en el orden Marsupialia (Aplin & Archer, 1987; Marshall *et al.*, 1990). Sin embargo, estudios filogenéticos morfológicos y genéticos han permitido clasificarlos en siete ordenes incluidos en dos grupos: Australidelphia o marsupiales australianos, con cuatro ordenes (Dasyuromorphia, Notoryctemorphia, Peramelemorphia, y Diprotodontia); y Ameridelphia o marsupiales americanos, con tres ordenes (Microbiotheria, Paucituberculata y Didelphimorphia) (Jansa & Voss, 2000; Amrine-Madsen *et al.*, 2003; Voss & Jansa, 2003, 2005, 2009; Voss *et al.*, 2004; Meredith *et al.*, 2008; Jansa *et al.*, 2013).

Se ha documentado que algunas familias de metaterios, junto con otros grupos de animales y plantas, se extinguieron durante los límites del Cretácico superior y el Paleógeno (Terciario inferior) (Vahugan *et al.*, 2015). Algunos otros metaterios sobrevivieron a esta extinción masiva y estuvieron presentes en Norteamérica por lo menos hasta principios del Paleógeno, donde posteriormente se extinguieron por la radiación de los euterios (hace 20 Ma, a principios del Mioceno). Con base en registros fósiles que datan del Cretácico inferior, algunos autores (*v. gr.* Patton *et al.*, 1996; Amrine-Madsen *et al.*, 2003; Horovitz & Sánchez-Villagra, 2003; Villa & Cervantes, 2003; Asher *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2004; Beck, 2008; Meredith *et al.*, 2008), consideran que los metaterios se originaron en Norteamérica dispersándose

consecutivamente hacia Sudamérica durante el Cretácico, después a Australia, vía Antártica, a finales del Cretácico superior o Cenozoico inferior (Paleoceno), cuando no existía cubierta de hielo glacial ya que hubo un aumento en la temperatura global y una disminución en el nivel del mar (Woodburne & Case, 1996; Muizon *et al.*, 1997; Case *et al.*, 2005). Las extensiones de tierra quedaron aisladas durante la mayor parte del Cenozoico por cuerpos marinos a lo que algunos autores le llaman “Splendid Isolation”, permitiendo la evolución separada de diversos metaterios (Simpson, 1980).

Actualmente, el orden Didelphimorphia está representado por la familia Didelphidae Gray, 1821, cuyos fósiles más antiguos tienen una edad estimada de 5.3 Ma y se conocen de depósitos de inicios del Plioceno de Sudamérica (Brasil) y corresponden al género *Didelphis* (McManus, 1974; Cozzuol, 2006). La familia Didelphidae incluye a la mayoría de los marsupiales del Continente Americano con 89 especies, clasificadas en 17 géneros y en dos subfamilias (Voss & Jansa 2003; Wilson & Reeder, 2005). Aproximadamente el 90% de las especies son endémicas de Sudamérica; solo la especie *Tlacuatzin canescens* es endémica de Norteamérica (Voss & Jansa, 2009). No obstante, esta familia ocupa el tercer lugar en riqueza a nivel continental, ya que existen diversas especies de marsupiales en el sur, centro y (en menor grado) al norte del continente americano (Voss & Jansa, 2003, 2009). Recientemente, Jansa y colaboradores (2013) realizaron un trabajo sobre la historia de la diversificación de los marsupiales actuales del nuevo mundo, donde apoyan que el ancestro común más reciente de este grupo data del Oligoceno inferior (26.3 Ma), y que la mayoría de las especies diversificaron en los bosques húmedos de Sudamérica hace 20 Ma hasta hace 3 Ma (inicios del Mioceno hasta el Pleistoceno) (Figura 2). La mayoría de las especies de didélfidos que actualmente se encuentran distribuidas en Centroamérica y Norteamérica lograron alcanzar estas latitudes como

resultado de la formación del Istmo de Panamá, por lo que se llevo a cabo el Gran Intercambio Biótico Americano (GABI, por sus siglas en ingles) (Woodburne, 2010; Jansa *et al.*, 2013).

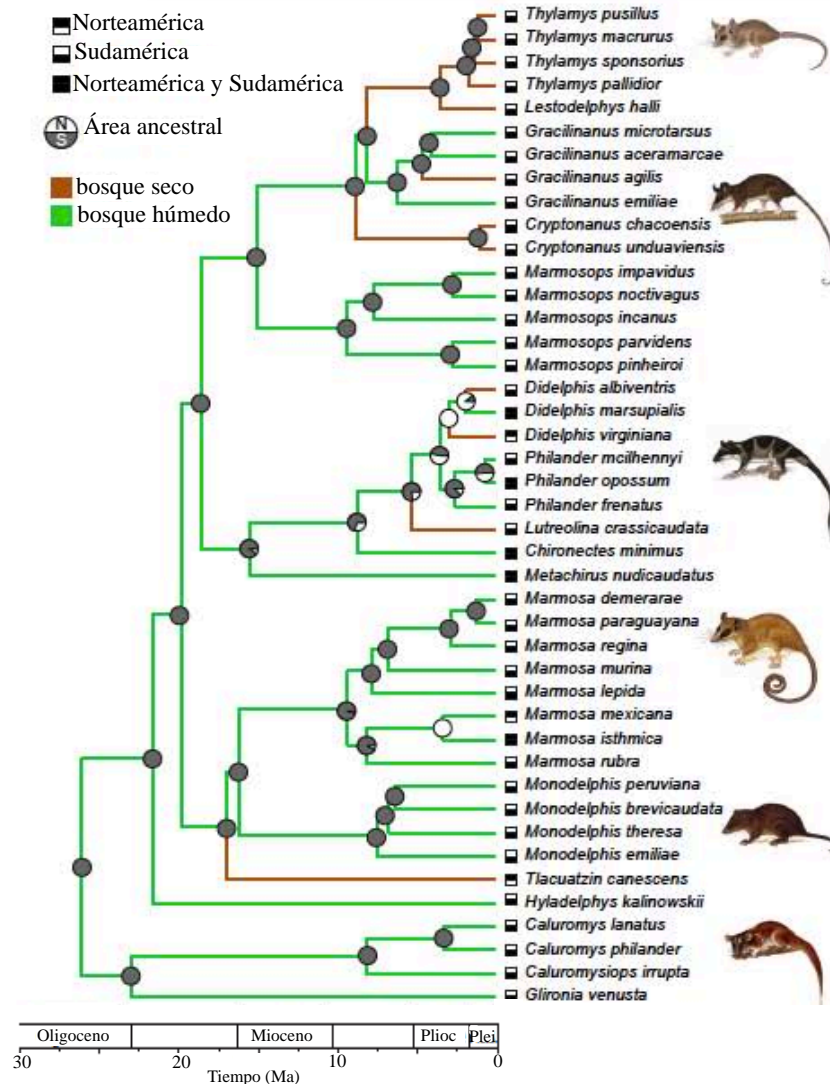


Figura 2. Filogenia en escala de tiempo de marsupiales didélfidos basada en análisis bayesianos con reloj molecular relajado. El color de las ramas indica el tipo de hábitat reconstruido mediante un análisis de máxima verosimilitud. Los cuadros al final de las ramas muestran la distribución geográfica de los taxa actuales: la parte superior sombreada indica endemismo norteamericano, la parte inferior sombreada indica endemismo sudamericano y ambas partes sombreadas indican una distribución ambas partes del continente americano. Los círculos en los internodos indican la probabilidad de que el evento de cladogénesis ocurrió en Sudamérica (gris), o que fue resultado de la dispersión a través del Istmo de Panamá (blanco). Géneros representativos de los didélfidos se muestran a la derecha del árbol, de arriba hacia abajo: *Thylamys*, *Gracilinanus*, *Chironectes*, *Marmosa*, *Monodelphis* y *Caluromys*. Tomada y modificada de Jansa *et al.* (2013).

Este evento geológico que comenzó hace ~10–7 Ma (finales del Mioceno) y que culminó con la interrupción total entre el Océano Pacífico y el Mar Caribe hace ~3–2.5 Ma (Plioceno), generó procesos de dispersión, extinción y reemplazo de especies continentales en ambos sentidos, ya que esta biota había estado aislada y evolucionando independientemente desde hace 65 Ma (Coates *et al.*, 2004; Bartoli *et al.*, 2005; Kirby & MacFadden, 2005; Carrillo *et al.*, 2014). De manera particular, marsupiales del género *Didelphis* fueron los primeros en dispersarse de Sudamérica hacia el centro y norte del continente a mediados del Pleistoceno (0.8–1.0 Ma), durante el tercer episodio de migraciones que se tienen registrados en el *GABI* (Bell *et al.*, 2004; Webb, 2006; Morgan, 2008; Woodburne, 2010). En este sentido, México fungió como corredor biológico para todas las especies que se dispersaron hacia el sur, tales como: roedores heterómidos, félidos, cánidos y otros carnívoros, tapires, pecaríes; y como receptor de especies que emigraron hacia el norte: roedores sigmodontidos, armadillos, monos y tlacuaches (Simpson, 1980; Stehli & Webb, 1985; Riddle *et al.*, 2000).

De acuerdo con Voss & Jansa (2009), los miembros de la familia Didelphidae muestran un amplio rango de hábitats, aunque presentan una mayor abundancia en zonas tropicales y subtropicales, adaptados principalmente a hábitats selváticos (donde ocupan una mayor diversidad de nichos). Su rango altitudinal va de los 0–3,400 msnm (Vaughan *et al.*, 2000). Solo la especie *Didelphis virginiana* ha logrado adaptarse al clima templado, por lo que posee la distribución geográfica más septentrional (hasta el sureste de Canadá) (Wilson & Reeder, 2005). Asimismo, muestran un amplio rango en su tamaño corporal, desde muy pequeños (<10 g), hasta de talla mayor (>5000 g). Para estos mamíferos, la masa corporal y la ingesta de agua son los parámetros biológicos de mayor relevancia ya que están directamente relacionados con su

intervalo de dispersión, debido al elevado costo que la termorregulación significa para ellos y el éxito de lactancia de las crías (Bozinovic *et al.*, 2005; McNab, 2005). Son de hábitos nocturnos y/o crepusculares, arborícolas o escansoriales. En cuanto a la alimentación, existen especies terrestres a las que se les considera omnívoras, otras arborícolas que son completamente herbívoras o frugívoras, y otras semiacuáticas predominantemente carnívoras o/e insectívoras (Vieira & Astúa de Moraes, 2003). Además, se ha documentado que la disposición de agua está directamente relacionada con el éxito de lactancia, lo cual influye en su poder de dispersión (Krockenberger, 2006). Lo anteriormente expuesto muestra una clara dependencia de los factores ambientales que tienen estos marsupiales.

De acuerdo con Ramírez-Pulido y colaboradores (2005), en México ocurren ocho especies de la familia Didelphidae, representando a siete de los 17 géneros de marsupiales americanos (*Marmosa mexicana*, *Tlacuatzin canescens*, *Metachirus nudicaudatus*, *Chironectes minimus*, *Caluromys derbianus*, *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana*, y *Philander opossum*). Cabe señalar que las especies de los géneros *Didelphis* y *Philander* son las que poseen mayor abundancia y distribución geográfica en nuestro país.

Actualmente existen diversas hipótesis filogenéticas para esta familia de marsupiales. La primera de ellas fue realizada por Gardner (1973) con base en la anatomía y análisis de cariotipos de *D. virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris*, proponiendo que las dos primeras eran especies hermanas y este clado, hermano de *D. albiventris*. Posteriormente, estudios moleculares basados en secuencias de genes mitocondriales y nucleares han demostrado, además de la monofilia de la familia Didelphidae, que *D. albiventris* y *D. marsupialis* están filogenéticamente más relacionadas entre sí y *D. virginiana* es el taxón hermano del clado conformado por las dos primeras especies (Patton *et al.*, 1996; Patton & Costa, 2003; Voss & Jansa, 2003, 2009).

Asimismo, se propone que los géneros *Didelphis* y *Philander* son clados hermanos que divergieron probablemente a inicios del Plioceno (Voss & Jansa, 2003, 2009; Jansa *et al.*, 2013) (Figura 3).

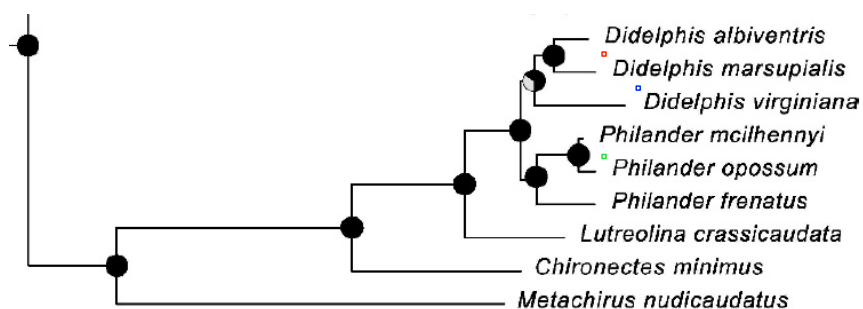


Figura 3. Parte de la hipótesis filogenética de la familia Didelphidae en la que se resaltan las relaciones filogenéticas entre *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*. Topología obtenida mediante análisis de parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, a partir de la evaluación de cinco genes concatenados (BRCA1+DMP1+IRBP+vWF+RAG1; 7320 pb). Valores de soporte indicados con un círculo en cada nodo. En gris se representan valores de bootstrap $\leq 75\%$ y en negro se representan valores de bootstrap y probabilidades posteriores $\geq 76\%$ o ≥ 0.95 . Tomada y modificada de Voss & Jansa (2009).

Género *Didelphis* Linnaeus, 1758

Las especies que conforman a este género diversificaron a finales del Plioceno, hace 2.5 Ma (Patton & Costa, 2003; Jansa *et al.*, 2013). Cabe señalar que este género incluye a los marsupiales de mayor tamaño del Continente Americano (hasta 1m de longitud y 5 kg de peso). Poseen una cola larga, bicolor, desnuda y prensil, pelaje denso, pelo de guardia largo y de color blanco (Gardner, 1973). Las hembras se caracterizan por tener un marsupio bien desarrollado con 13 pezones arreglados en círculo (Nowak, 1999). El número cromosómico es $2n = 22$ (Patton *et al.*, 1996). Este género es esencialmente euritópico por lo que se le conoce de diferentes maneras: tacuazin, comadreja, tlacuache, zarigüeya u opossum. Su distribución comprende desde el sureste de Canadá, la mayor parte de América del Sur (hasta el centro de

Argentina) (Hall, 1981; Wilson & Reeder, 2005; Flores *et al.*, 2007; Cerqueira & Tribe, 2008). Actualmente, el género *Didelphis* comprende seis especies reconocidas como válidas: *D. albiventris* que se distribuye en Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay y norte de Argentina; *D. aurita* que se encuentra en el este de Brasil, sureste de Paraguay y noreste de Argentina; *D. imperfecta* que ocurre en Venezuela (al sur del Orinoco), suroeste de Surinam, Guyana Francesa y el norte de Brasil; *D. pernigra* que se distribuye en los Andes de Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia; *D. marsupialis* cuya distribución va desde el sureste de Tamaulipas en México, todo Centroamérica hasta Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil (Figura 4); por último, *D. virginiana* que se extiende desde el sureste de Canadá, a lo largo de la mayor parte de América del norte (excepto las Montañas Rocosas, el árido sureste de Estados Unidos, el centro-norte de México y Baja California), toda Centroamérica, hasta el norte de Costa Rica (ver Figura 4).

En México, se distribuyen dos especies muy similares morfológicamente: *D. marsupialis* y *D. virginiana* (Villa & Cervantes, 2003). La primera de éstas, habita desde el sureste de Tamaulipas, extendiéndose a través de la vertiente del Golfo de México hasta el noreste de Oaxaca y todo el territorio chiapaneco así como en gran parte de la península de Yucatán; mientras que *D. virginiana* se encuentra en casi todo el territorio nacional excepto en el centro-norte del país y península de Baja California (Aranda, 2000) (Figura 4). Cabe señalar que en nuestro país, *D. marsupialis* es simpátrica en toda su distribución con *D. virginiana*. Como resultado del solapamiento geográfico y consecuentemente de nichos, ocasiona imprecisiones en la identificación específica debido a la amplia variación intraespecífica y geográfica que presentan las características morfológicas externas y diagnósticas de cada especie (Aranda, 2000). Estudios recientes mediante la utilización de marcadores moleculares (genes

mitocondriales) evidencian que estas dos especies están genéticamente bien diferenciadas, independientemente de su distribución simpátrica (Cervantes *et al.*, 2010).

Género Philander Linnaeus, 1758

Las especies del género *Philander* diversificaron casi al mismo tiempo que las del género *Didelphis*. En general estas especies son de tamaño mediano, no llegando a superar el kilogramo de peso. Se les conoce de diversas maneras (cuatro ojillos, tlacuachillo, zorro-pelón o tlacuache de cuatro ojos). Estos nombres hacen referencia al par de manchas blancas que tienen por encima de cada ojo, características de los filandros. El pelo de estos animales es áspero, pardo-grisáceo u oscuro. La región ventral es de color amarillo grisáceo o amarillo pálido. La cabeza es grande en proporción al resto del cuerpo. Las orejas son largas, lanceoladas y desnudas. La boca es grande y armada con afilados dientes puntiagudos. Las extremidades son largas, delgadas y cubiertas de pelo de color más claro que el dorso. La cola puede llegar a medir más de la mitad de la longitud patrón del animal y está cubierta de pelo los primeros cinco o seis centímetros, desnudándose después y haciéndose escamosa. En general, los miembros del género no muestran un dimorfismo sexual tan evidente como en otros didélfidos y no siempre se cumple que los machos sean de mayor envergadura que las hembras. En las hembras, el marsupio está perfectamente desarrollado, al contrario que *Metachirus nudicaudatus*. El número de mamas varía entre cinco y nueve. Estos marsupiales son más afines a habitar bosques tropicales y ocasionalmente, regiones arbustivas muy húmedas. Este género está constituido por siete especies taxonómicamente válidas: *P. andersoni* que se distribuye desde el sur de Venezuela, este de Colombia, Ecuador y Perú; *P. deltae* quien es endémica del delta del Río Orinoco en Venezuela; *P. frenatus* la cual ha sido registrada en el este de Brasil, Paraguay y norte de Argentina; *P. mcilhennyi* que habita hacia el centro de la cuenca del Amazonas de Perú y oeste de Brasil; *P.*

mondolfii que ocurre en Colombia, Venezuela y Bolivia; *P. olrogi* propia de la selva amazónica del este de Bolivia y Perú; y *P. opossum* quien posee la distribución más amplia de todas las especies del género, desde el noreste de México (estado de Veracruz), todo Centroamérica, hasta Bolivia y sureste de Brasil (Wilson & Reeder, 2005; Lew *et al.*, 2006; Gardner, 2007; Patton & da Silva, 2007; Voss & Jansa, 2009). En territorio mexicano, *P. opossum* posee zonas de solapamiento con respecto a *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana* (la mayor parte del sureste mexicano, (excepto la parte norte de la Península de Yucatán) (ver Figura 4).

Una de las consecuencias del solapamiento geográfico que tienen estas tres especies de didélfidos en México es que ocupan nichos ecológicos muy similares, derivando en hábitos alimenticios comunes. Estos didélfidos considerados omnívoros (oportunistas), se alimentan principalmente de insectos, gusanos, lombrices, invertebrados acuáticos y hasta de pequeños vertebrados como roedores, aves, anfibios y reptiles. Asimismo, muestran cierto grado de sinantropismo (menor en *P. opossum*), por lo que pueden buscar su alimento en cultivos, criaderos de aves domésticas y basura. En este sentido, la gran diversidad de recursos alimenticios que poseen estos mamíferos son potencialmente atractivos para estudios parasitológicos, filogenéticos y/o filogeográficos, con el propósito de dilucidar la existencia de patrones o procesos evolutivos entre los parásitos y sus hospederos.

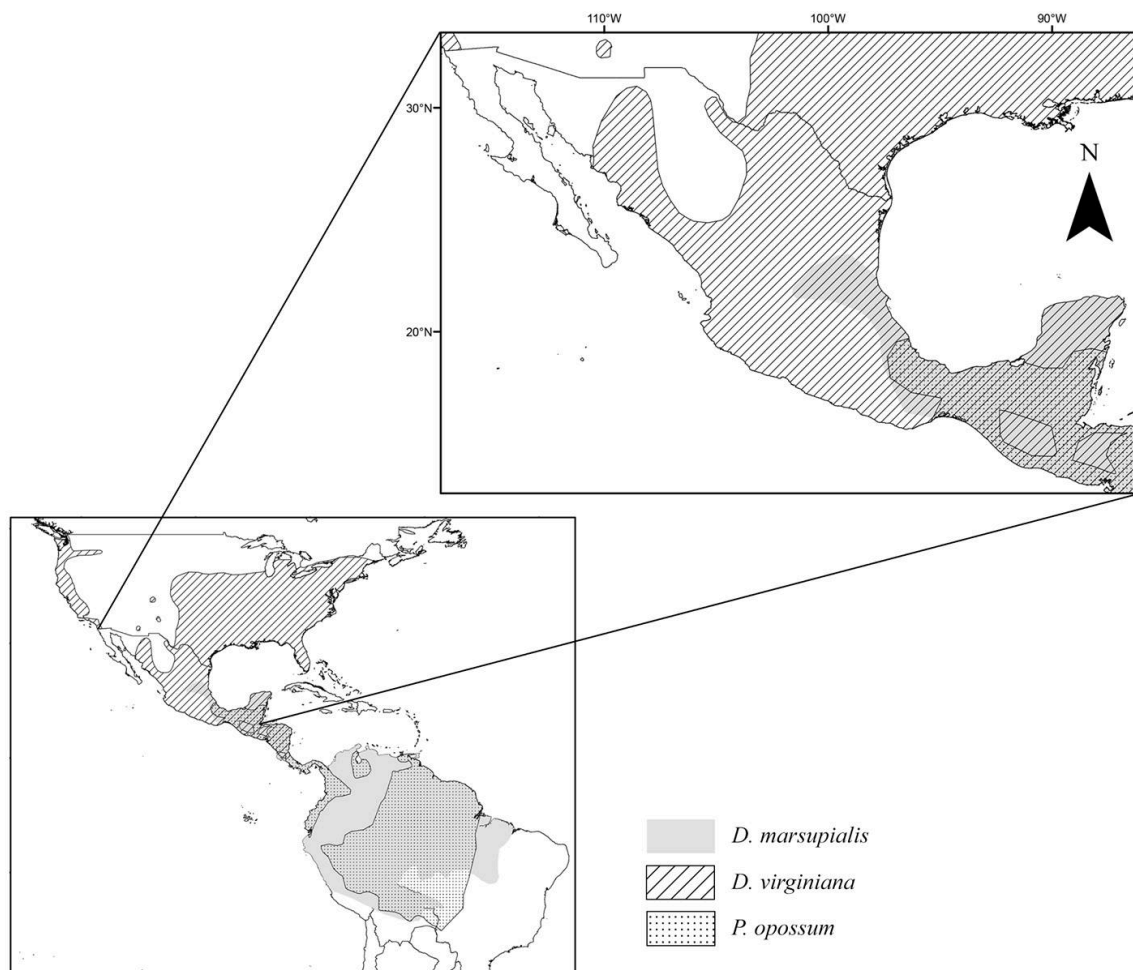


Figura 4. Distribución geográfica a nivel continental y Republica Mexicana de las especies *D. marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*. (Fuente: The IUCN Red List of Threatened Species, www.iucnredlist.org).

Estudios helmintológicos de *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana* y *Philander opossum* en México.

Hasta la fecha, de las 525 especies de mamíferos silvestres que se tienen registradas para nuestro país (Ceballos *et al.*, 2005), han sido estudiadas desde el punto de vista parasitológico únicamente 136 especies (25.9 %), en las que se han registrado 336 taxa de helmintos (53 trematodos, 46 cestodos, 225 nematodos, 11 acantocéfalos y un hirudineo (García-Prieto *et al.*, 2012; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2011). Estos registros provienen de 241 localidades muestreadas de todos los estados de la República Mexicana, excepto Aguascalientes, que aún no cuenta con trabajos helmintológicos para este grupo de vertebrados (García-Prieto *et al.*, 2012).

De manera particular, el estudio de la helmintofauna de didélfidos en México comenzó hace más de 80 años; no obstante, éste solo refería a nuevas especies (mediante taxonomía tradicional), así como registros aislados (*v. gr.* Caballero, 1937, 1951, 1958; Caballero *et al.*, 1944; Monsiváis-Aguilar, 1958; Gutiérrez-Fuster, 1966; Miyazaki & Ishii, 1968; Lamothe-Argumedo, 1978; Miyazaki *et al.*, 1980; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1985; Prado-Ancona, 1993). Posteriormente, los esfuerzos se centraron en describir la helmintofauna de distintas especies de tlacuaches en alguna región determinada (*v. gr.* Cañeda-Gúzman, 1997), o en comparar la helmintofauna de una especie de didélfido en distintos puntos geográficos de nuestro país (*v. gr.* Monet-Mendoza *et al.*, 2005). García-Prieto y cols. (2012), compilaron registros helmintológicos de vertebrados silvestres de México donde citan a los miembros de la familia Didelphidae. Para entonces, dichos autores enlistaron 63 taxa: 16 para *D. marsupialis*, 30 para *D. virginiana* y 17 para *P. opossum*, colectados en localidades de 9, 14 y 4 estados de la República Mexicana, respectivamente. Dichos registros helmintológicos son producto de determinaciones taxonómicas.

Recientemente, los avances en la obtención y métodos de análisis de datos moleculares (secuencias de ADN) han permitido realizar trabajos integrales sobre la determinación y delimitación de especies, así como la sistemática de helmintos parásitos de diversos grupos de vertebrados silvestres (v. gr. Pinacho-Pinacho *et al.*, 2012, 2014; Martínez-Aquino *et al.*, 2013). Además, han permitido formular e interpretar posibles escenarios sobre la historia evolutiva de éstos organismos con respecto a las asociaciones que guardan con sus hospederos (v. gr. Mejía-Madrid *et al.*, 2005; Martínez-Aquino *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta la fecha no se disponía con ningún trabajo sobre determinación específica de helmintos parásitos de didélfidos y aspectos evolutivos en este sistema hospedero-parásito que 1) tratara aspectos sobre la delimitación de especies mediante la utilización de marcadores moleculares y, 2) abordara aspectos biológicos, ecológicos y evolutivos dentro de este sistema hospedero-parásito distribuidos en nuestro país.

Considerando el hecho de que la información aportada por los parásitos puede ser instrumental para entender diferentes aspectos de la propia biología de los hospederos, así como de su historia evolutiva y biogeográfica, en el presente trabajo se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos con relación a las tres especies de helmintos que se abordan en este trabajo:

II. HIPÓTESIS

1. Ho. Cada especie de helminto estará representada por un complejo de especies crípticas (morfológicamente indistinguibles pero genéticamente distintas).

Ha. Cada especie de helminto representará una entidad evolutiva independiente con base en caracteres morfológicos y genéticos.

2. Ho. Las tres especies de didélfidos compartirán las mismas especies de helmintos, independientemente de sus relaciones filogenéticas y distribución geográfica.

Ha. Las tres especies de didélfidos tendrán su fauna helmintológica característica, independientemente de su distribución geográfica.

III. OBJETIVOS

General

Caracterizar genética y morfológicamente tres especies de helmintos compartidas entre tres especies de didélfidos distribuidos en México e inferir las relaciones de parentesco entre distintas poblaciones.

Particulares

- 1.** Determinar la variación genética existente entre las poblaciones de helmintos.
- 2.** Establecer criterios de delimitación de especies de helmintos.
- 3.** Identificar patrones y/o procesos evolutivos a partir del análisis de secuencias de ADN de éstos helmintos que correspondan con las relaciones filogenéticas o distribución geográfica de sus hospederos.

IV. RESULTADOS

Con base en el planteamiento del problema y los objetivos trazados, el presente estudio se encuentra seccionado en tres capítulos. El primero incluye la recopilación más reciente y completa de registros helmintológicos para las especies *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana* y *Philander opossum* distribuidos en México. El capítulo dos muestra un estudio de prospección molecular y morfológico de la especie de acantocéfalo *Oligacanthorhynchus microcephalus*, quien a partir del esfuerzo de muestreo realizado para la presente tesis, resultó la especie con el menor número de individuos recuperados por hospedero, así como la de menor representación geográfica en comparación con los otros dos taxa centrales de esta tesis. Finalmente, en el capítulo tres se presenta la identificación de linajes dentro de las especies *Rophalias coronatus* y *Turgida turgida*, quienes a diferencia de *O. microcephalus*, resultaron ser de las especies parásitas con mayor número de individuos recuperados por hospedero y con mayor representación geográfica en el presente trabajo de campo, lo cual permitió inferir procesos de diferenciación genética, relacionados con la distribución geográfica de sus hospederos.

CAPÍTULO 1

Helminths of three species of opossums (Mammalia: Didelphidae) from Mexico.

[illegible]

Karla Acosta-Virgen[□], Jorge López-Caballero^{□□},
Luis García-Prieto[□], Rosario Mata-López[□]

□Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P.04510, Mexico City, Mexico □Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, Mexico City, Mexico □Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-153, C.P. 04510, Mexico City, Mexico

bee sr o c c t t p o e Rosario Mata-López (rmatalopez@ciencias.unam.mx)

  *E. Gutiérrez* | Received 12 March 2015 | Accepted 5 June 2015 | Published 2 July 2015

<http://zoobank.org/27628F5F-E913-4E9F-B7A3-F1FE71E2BA2B>

Acosta-Virgen K, López-Caballero J, García-Prieto L, Mata-López R (2015) Helminths of three species of opossums (Mammalia, Didelphidae) from Mexico. *ZooKeys* 511: 131–152. doi: [10.3897/zookeys.511.9571](https://doi.org/10.3897/zookeys.511.9571)

□ □ e H □ □

From August 2011 to November 2013, 68 opossums (8 *Didelphis* sp., 40 *Didelphis virginiana*, 15 *Didelphis marsupialis*, and 5 *Philander opossum*) were collected in 18 localities from 12 Mexican states. A total of 12,188 helminths representing 21 taxa were identified (6 trematodes, 2 cestodes, 3 acanthocephalans and 10 nematodes). Sixty-six new locality records, 9 new host records, and one species, the trematode *Brachylaima didelphis*, is added to the composition of the helminth fauna of the opossums in Mexico. These data, in conjunction with previous records, bring the number of taxa parasitizing the Mexican terrestrial marsupials to 41. Among these species, we recognized a group of helminths typical of didelphids in other parts of the Americas. This group is constituted by the trematode *Rhopalias coronatus*, the acanthocephalan *Oligacanthorhynchus microcephalus* and the nematodes *Cruzia tentaculata*, *Gnathostoma turgidum*, and *Turgida turgida*. In general, the helminth fauna of each didelphid species showed a stable taxonomic composition with respect to previously sampled sites. This situation suggests that the rate of accumulation of helminth species in the inventory of these 3 species of terrestrial marsupials in the Neotropical portion of Mexico is decreasing; however, new samplings in the Nearctic portion of this country will probably increase the richness of the helminthological inventory of this group of mammals.

| | | | |
|--|----|--|----|
| | ti | | He |
|--|----|--|----|

Didelphidae, *Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*, parasites



Less than 25% of the 525 species of mammals distributed in Mexico have been examined for helminth parasites (García-Prieto et al. 2012). To date, 336 nominal taxa of helminths have been recorded in mammals, 26 associated with 3 species of terrestrial opossums (Virginia opossum, *Didelphis virginiana* Kerr, the common opossum *Didelphis marsupialis* Linnaeus, and the Gray four-eyed opossum *Philander opossum* Linnaeus) from this country. However, the knowledge of the helminth richness associated with this host group is incomplete due to the wide distribution of these mammals in Mexico. *Didelphis marsupialis* occurs from Tamaulipas State and west San Luis Potosí until the Yucatán peninsula. *Didelphis virginiana* inhabits almost all of Mexico, except for the central Plateau and Baja California peninsula. *Philander opossum* occurs from south Tamaulipas State along the Gulf of Mexico coast and Chiapas State (Arcangeli-Álvarez 2010, Cervantes et al. 2010). The main objective of this work is to present new records of helminth species parasitizing these 3 species of opossums in Mexico and to compare the finding to previous records.



From August 2011 to November 2013, 68 opossums (8 *Didelphis* sp., 40 *D. virginiana*, 15 *D. marsupialis*, and 5 *P. opossum*) were collected in 18 localities from 12 Mexican states (Table 1), under the collecting permit FAUT 0057 issued by the Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Mexico. Mammals were shot by local hunters or caught with Tomahawk traps and then killed with intraperitoneal sodium pentobarbital overdose. Opossums were dissected within the following 4 h. and all organs were examined under a stereomicroscope. Helminths were placed in Petri dishes with 0.85% saline solution. Platyhelminths and nematodes were fixed with hot 4% formalin and preserved in 70% ethanol; acanthocephalans were chilled in distilled water for 10–12 h. Once the proboscis was everted, they were preserved in 70% ethanol. Platyhelminths and acanthocephalans were stained with Mayer's paracarmin, cleared with methyl salicylate, and mounted in Canada balsam. Nematodes were cleared using Amman's lactophenol and temporarily mounted for morphological study (Lamothe-Argumedo 1997). Voucher specimens of all helminth species were deposited at Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.



A total of 12,188 helminths representing 21 taxa were identified in the 68 opossums collected from 18 localities within 12 states of Mexico (Figure 1). Six trematode, 2 cestode, 3 acanthocephalan, and 10 nematode species were collected. Below, we present

□□□□□ Sampling sites for opossum species analyzed in this study.

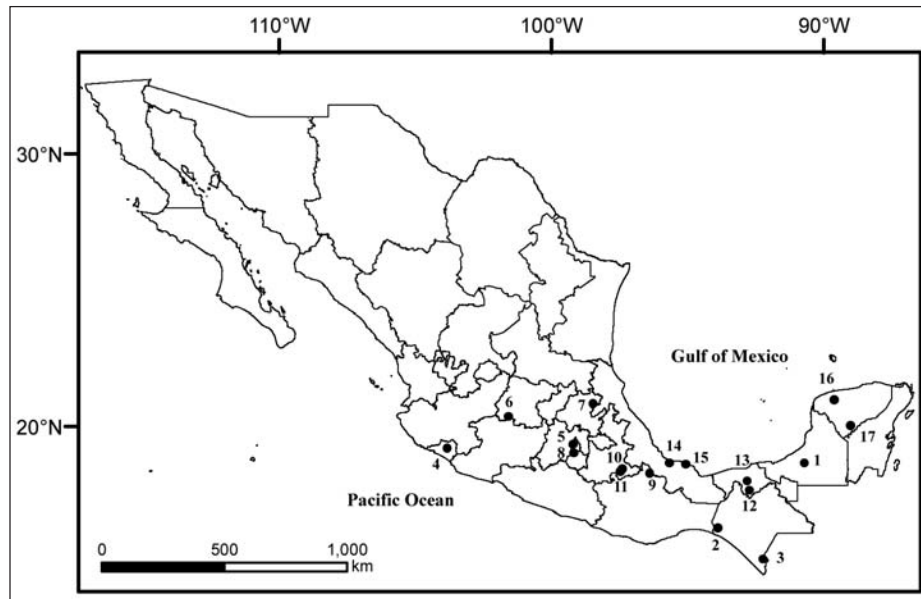
| State | Locality [†] /collection date (month/year) | Geographic coordinates | Sample size/host species | Altitude (easl) |
|------------------|---|----------------------------|--|-----------------|
| Campeche | Escárcega ¹ 07/2012 | 18°37'00"N; 90°43'13"W | 3/ <i>D. virginiana</i> ; 1/ <i>D. marsupialis</i> | 82 |
| Chiapas | Agua Fría ² 06/2012; 03/2013 | 16°15'26"N; 93°53'55"W | 5/ <i>Didelphis</i> sp.; 1/ <i>D. virginiana</i> | 60 |
| | Finca Brasil ³ 06/2012 | 15°05'41"N; 92°13'45"W | 2/ <i>Didelphis</i> sp.; 3/ <i>D. virginiana</i> ; 2/ <i>D. marsupialis</i> | 463 |
| Colima | Coquimatlán ⁴ 09/2012 | 19°10'28"N; 103°50'39"W | 6/ <i>D. virginiana</i> | 550 |
| Distrito Federal | Pedregal de San Ángel ⁵ 02/2014 | 19°19'14"N; 99°12'33"W | 2/ <i>D. virginiana</i> | 2268 |
| Guanajuato | Rincón de Martínez ⁶ 02/2013 | 20°19'44"N; 101°34'42"W | 2/ <i>D. virginiana</i> | 1730 |
| Hidalgo | Tianguistengo ⁷ 03/2014 | 19°10'50"N; 99°28'06"W | 2/ <i>D. virginiana</i> | 2620 |
| Morelos | Tepoztlán ⁸ 08/2014 | 19°00'07"N; 99°06'00"W | 1/ <i>D. virginiana</i> | 1700 |
| Oaxaca | Cerro del Tepezcuintle ⁹ 08/2013 | 18°15'28"N; 96°24'00"W | 2/ <i>D. virginiana</i> | 87 |
| Puebla | Coapan ¹⁰ 08/2014 | 18°25'42"N; 97°24'30"W | 1/ <i>Didelphis</i> sp.; 1/ <i>D. virginiana</i> | 1648 |
| | Zapotitlán Salinas ¹¹ 08/2014 | 18°19'45"N; 97°28'30"W | 1/ <i>D. virginiana</i> | 2240 |
| Tabasco | Teapa ¹² 06-07/2013 | 17°33'59"N; 92°57'00"W | 2/ <i>D. virginiana</i> 1/ <i>D. marsupialis</i> | 72 |
| | Villahermosa ¹³ 01/2012 | 17°34'17"N; 92°57'09"W | 3/ <i>D. virginiana</i> | 10 |
| Veracruz | Tlacotalpan ¹⁴ 02/2012 | 18°37'40"N; 95°40'40"W | 2/ <i>D. virginiana</i> ; 8/ <i>D. marsupialis</i> ; 3/ <i>P. opossum</i> | 10 |
| | Los Tuxtlas ¹⁴ 08/2011; 03/2012 | 18°34'21"N; 95°04'30"W | 3/ <i>D. virginiana</i> ; 3/ <i>D. marsupialis</i> 2/ <i>P. opossum</i> | 300 |
| Yucatán | Mérida ¹⁵ 11/2013 | 20°58'04"N; 89°37'18"W | 5/ <i>D. virginiana</i> | 16 |
| | Tzucacab ¹⁶ 11/2013 | 20°00'58"N; 89°01'12"W | 1/ <i>D. marsupialis</i> | 36 |

[†]The superscript numbers indicate the position of the localities in the Figure 1.

a checklist of the helminth species recorded, indicating the site of infection, current records with State and locality where the hosts were collected, host species, CNHE accession numbers, and previous records from Mexico.

Parasite-Host list

† New locality record; ‡ New record for Mexico; * New host in Mexico.



□ □□□□ Map of Mexico showing the sampled localities in the present study.

Phylum Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Class Trematoda Rudolphi, 1808

Family Opisthorchiidae Braun, 1901

Amphimerus caudalitestis Caballero, Grocott & Zerecero, 1952

Site of infection. Gall-bladder.

Present records. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis**, *Didelphis virginiana**.

Specimens deposited. CNHE 9481–2.

Previous records in Mexico. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Philander opossum* (Cañeda-Guzmán 1997).

Remarks. These specimens belong to *A. caudalitestis* due to the position of the reproductive organs and the separation of the vitelline glands in two fields lying anterior and posterior to the ovary. Furthermore, the uterus has a zig-zag shape, occupying intercecal extension and the S-shape of the excretory vesicle, sinuous between both testes (Caballero et al. 1952).

Brachylaima didelphis Premvati & Bair, 1979†

Site of infection. Intestine.

Present records. CAMPECHE: Escárcega[†]: *Didelphis virginiana**.

Specimens deposited. CNHE 9483–4.

Remarks. The specific identification of this material follows Premvati and Blair (1979) and is based on the disposition of the vitellaria which extending from pharynx to posterior end.

Family Phanerosolidae Mehra, 1935

Philandrophilus magnacirrus Thatcher, 1970

Site of infection. Gall-bladder.

Present records. Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis**, *Philander opossum*.

Specimens deposited. CNHE 9485–6.

Previous records in Mexico. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Philander opossum* (Cañeda-Guzmán 1997).

Remarks. In accordance with Thatcher (1970) this species is characterised by having body flattened and pyriform, covered with small spines. Cirrus and cirrus sac large. Parasites in gall-bladder of marsupials.

Family Rhopaliidae Looss, 1899

Rhopalias caballeroi Kifune & Uyema, 1982

Site of infection. Intestine.

Present records. VERACRUZ: Tlacotalpan[†]: *Philander opossum**.

Specimens deposited. CNHE 9487.

Previous records in Mexico. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis* sp. (Haverkost and Gardner 2008).

Remarks. *Rhopalias caballeroi* is distinguished by the absence of oral and flanking spines, and because it has between 4 and 11 spines visible within tentacle sacs (Haverkost and Gardner 2008).

Rhopalias coronatus (Rudolphi, 1819)

Site of infection. Intestine.

Present records. CHIAPAS: Agua Fría[†]: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Didelphis* sp., *Philander opossum*; Finca Brasil[†]: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*. OAXACA: Cerro del Tepezcuintle[†], San Miguel Soyaltepec[†]: *Didelphis virginiana*. TABASCO: Cunduacán[†]: *Didelphis virginiana*; Grutas de Coconá[†], Teapa[†]: *Didelphis marsupialis*. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis mar-*

supialis, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*; Tlacotalpan†: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis* sp. YUCATÁN: Mérida†: *Didelphis marsupialis*.

Specimens deposited. CNHE 9488–9504.

Previous records in Mexico. CHIAPAS: Motozintla: *Didelphis* sp. (Caballero et al. 1944). NUEVO LEÓN: Colonia Country La Silla, Huinala, Los Lirios: *Didelphis marsupialis* (Romero 1981). OAXACA: Cuicatlán: *Didelphis* sp. (Pérez-Ponce de León et al. 2007). QUINTANA ROO: Rancho La Ceiba: *Didelphis marsupialis* (Kingston and Tai 1968). VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (Cañeda-Guzmán 1997), *Didelphis* sp. (Haverkost and Gardner 2008); Alvarado: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005).

Remarks. The diagnostic traits of this species are: flanking and oral spines present. Between 3 and 11 spines visible within tentacle sacs, which extend far beyond the posterior margin of the pharynx (Haverkost and Gardner 2008).

***Rhopalias macracanthus* Chandler, 1932**

Site of infection. Intestine.

Present records. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis* sp., *Didelphis virginiana*; Tlacotalpan†: *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*.

Specimens deposited. CNHE 9505–9.

Previous records in Mexico. COLIMA: Comala: *Didelphis marsupialis* (Lamothe-Argumedo 1978); La Esperanza: *Didelphis marsupialis* (Miyazaki et al. 1980). CHIAPAS: Jaltenango: *Didelphis* sp. (Caballero 1946); Motozintla: *Didelphis* sp. (Caballero et al. 1944); Pueblo Nuevo (Pérez-Ponce de León et al. 2007). OAXACA: Carretera Temascal-Tuxtepec: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). QUINTANA ROO: Rancho La Ceiba: *Didelphis marsupialis* (Kingston and Tai 1968). VERACRUZ: Alvarado: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005); Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (Cañeda-Guzmán 1997), *Didelphis* sp. (Haverkost and Gardner 2008).

Remarks. This species was identified by having tentacle sacs that do not extend beyond the posterior margin of the pharynx and by having only flanking spines (Haverkost and Gardner 2008).

Class Eucestoda Southwell, 1930

Family Anoplocephalidae Cholodkovsky, 1902

***Mathevotaenia* sp.**

Site of infection. Intestine.

Present records. COLIMA: Colima: *Didelphis virginiana*.

Specimens deposited. CNHE 9514.

Previous records in Mexico. CHIAPAS: Lagos de Colón: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). COLIMA: Colima: *Didelphis virginiana* (García-Prieto et al. 2012).

Remarks. This material represents a new species which will be described separately.

Family Proteocephalidae La Rue, 1911

Thaumasioscolex didelphidis Cañeda-Guzmán, de Chambrier & Scholz, 2001

Site of infection. Intestine.

Present records. CHIAPAS: Finca Brasil†: *Didelphis virginiana**, *Didelphis marsupialis*.

Specimens deposited. CNHE 9528.

Previous records in Mexico. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis* (Cañeda-Guzmán et al. 2001).

Remarks. In accordance with Cañeda-Guzmán et al. (2001), *T. didelphidis* is distinguished by the morphology of the scolex that is formed by 4 well separated lobes each containing 1 noncircular sucker opening laterally inside the exterolateral cavity, a large-sized body and by the shape of gravid proglottids that are inversely craspedote, among others.

Phylum Acanthocephala (Rudolphi, 1808)

Family Oligacanthorhynchidae Southwell & Macfie, 1925

Oligacanthorhynchus microcephalus (Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972

Site of infection. Intestine.

Present records. HIDALGO: Tianguistengo†: *Didelphis virginiana*.

Specimens deposited. CNHE 9510.

Previous records in Mexico. CAMPECHE: Escárcega: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana* (López-Caballero et al. 2015). COLIMA: Tecomán: *Didelphis virginiana* (García-Prieto et al. 2010). CHIAPAS: Agua Fría: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (López-Caballero et al. 2015); Cascadas de Agua Azul: *Didelphis virginiana* (Prado-Ancona 1993); Finca Brasil: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (López-Caballero et al. 2015). MICHOACÁN: Agua Blanca: *Didelphis virginiana* (Prado-Ancona 1993). GUANAJUATO: Rincón de Martínez: *Didelphis virginiana* (López-Caballero et al. 2015). MORELOS: Progreso: *Didelphis virginiana* (García-Prieto et al. 2010). OAXACA: Soyaltepec: *Didelphis virginiana* (López-Caballero et al. 2015); Temascal: *Didelphis virginiana* (García-Varela et al. 2000). TABASCO: Cunduacán: *Didelphis virginiana* (López-Caballero et al. 2015); Ranchería el Boquerón: *Didelphis marsupialis* (García-Prieto et al. 2010); Río Oxolotán: *Philander opossum* (Prado-Ancona 1993). VERACRUZ: Los

Tuxtla: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (Prado-Ancona 1993; Cañeda-Guzmán 1997); Tlacotalpan: *Didelphis virginiana* (López-Caballero et al. 2015). YUCATÁN: Mérida: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana* (López-Caballero et al. 2015).

Remarks. With the exception of records made by López-Caballero et al. (2015) all other previous records were listed as *Oligacanthorhynchus tortuosa*, but this species is a junior synonym of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Richardson et al. 2014). The hook and cement gland number (36 and 8, respectively), as well as the eggs size (0.83-0.110 X 0.38-0.50) are considered as diagnostic traits of this species by López-Caballero et al. (2015).

***Oncicola luehei* (Travassos, 1917) Schmidt, 1972**

Site of infection. Intestine.

Present records. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis**.

Specimens deposited. CNHE 9511–12.

Previous records in Mexico. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis virginiana* (Prado-Ancona 1993; Cañeda-Guzmán 1997).

Remarks. These specimens belong to *O. luehei* because the dimensions of the proboscis, the number of hooks (36), as well as its size and arrangement fits to the morphology mentioned by Machado (1950).

Family Plagiorhynchidae Golvan, 1960

***Porrorchis nickoli* Salgado-Maldonado & Cruz-Reyes, 2002**

Site of infection. Intestine.

Present records. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis virginiana*.

Specimens deposited. CNHE 9513.

Previous records in Mexico. CHIAPAS: Cascadas de Agua Azul: *Didelphis virginiana* (Salgado-Maldonado and Cruz-Reyes 2002). TABASCO: Río Oxolotán: *Philander opossum* (Salgado-Maldonado and Cruz-Reyes 2002). VERACRUZ: Lago de Catemaco, Sontecomapan: *Didelphis virginiana* (Salgado-Maldonado and Cruz-Reyes 2002); Martínez de la Torre: *Didelphis marsupialis* (Salgado-Maldonado and Cruz-Reyes 2002); Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (Salgado-Maldonado and Cruz-Reyes 2002).

Remarks. According to Salgado-Maldonado and Cruz-Reyes (2002), three characteristics diagnosed this acanthocephalan species: (1) a smaller proboscis, (2) the armature of proboscis bearing few rows and few hooks per row compared with other species, and (3) the male reproductive system occupying only the posterior half of trunk.

Phylum Nematoda Rudolphi, 1808
Family Metastrongylidae Leiper, 1912

***Didelphostrongylus hayesi* Prestwood, 1976**

Site of infection. Lungs.

Present records. DISTRITO FEDERAL: Pedregal de San Ángel[†]: *Didelphis virginiana*; GUANAJUATO: Irapuato[†]: *Didelphis virginiana*[†]. HIDALGO: Tianguistengo[†]: *Didelphis virginiana*. MORELOS: Tepoztlán[†]: *Didelphis virginiana*.

Specimens deposited. CNHE 8969, 9024, 9554–9556, 9562.

Previous records in Mexico. COLIMA: ND: *Didelphis virginiana* (García-Márquez et al. 2012). GUERRERO: Laguna de Tres Palos, Taxco: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). OAXACA: Temascal: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005).

Remarks. Our material was identified following Prestwood (1976); this species is characterised because the oral opening is surrounded by lips, the morphology and size of the spicules and the number and arrangement of bursal rays.

Family Aspidoderidae Skrjabin & Schikhobalova, 1947

***Aspidodera raillieti* Travassos, 1913**

Site of infection. Intestine.

Present record. TABASCO: Villahermosa[†]: *Didelphis virginiana*^{*}. VERACRUZ: Los Tuxtlas[†]: *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*^{*}.

Specimens deposited. CNHE 8971–3.

Previous records in Mexico. CHIAPAS: Motozintla: *Didelphis* sp. (Caballero and Zerecero 1944).

Remarks. These specimens were identified based on Jiménez-Ruiz et al. (2006) and compared with further description of the species made by Chagas-Moutinho et al. (2014). *Aspidodera raillieti* can be distinguished because the cephalic cordons exceed the level of the oral vestibule and touch the base of cephalic cap, as well as by having a digitiform projection on the left ventrolateral oral lip.

Family Kathlanidae Lane, 1914

***Cruzia tentaculata* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1917**

Site of infection. Caecum.

Present records. CAMPECHE: Escárcega[†]: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*. CHIAPAS: Arriaga[†]: *Didelphis* sp., *Didelphis virginiana*; Tapachula[†]: *Didelphis*

sp., *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*. COLIMA: Colima†: *Didelphis virginiana*. DISTRITO FEDERAL: Pedregal de San Ángel†: *Didelphis virginiana*. GUANAJUATO: Irapuato†: *Didelphis virginiana*. HIDALGO: Tianguistengo†: *Didelphis virginiana*. MORELOS: Tepoztlán†: *Didelphis virginiana*. OAXACA: Soyaltepec†: *Didelphis virginiana*. PUEBLA: Carretera Coapan-Huajuapán de León†: *Didelphis* sp.; Coapan†: *Didelphis virginiana*; Zapotitlán Salinas†: *Didelphis virginiana*. TABASCO: Teapa†: *Didelphis marsupialis*; Villahermosa†: *Didelphis virginiana*. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*; Tlacotalpan†: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*. YUCATÁN: Mérida†: *Didelphis virginiana*; Tzucacab†: *Didelphis marsupialis*.

Specimens deposited. CNHE 8999, 9000–17, 9533–9540, 9557, 9563.

Previous records in Mexico. CHIAPAS: Motozintla: *Didelphis* sp. (Caballero and Zerecero 1944); Jaltenango: *Didelphis marsupialis* (Caballero 1958). COLIMA: Comala: *Didelphis marsupialis* (García-Prieto et al. 2012); La Esperanza: *Didelphis marsupialis* (Miyazaki et al. 1980); ND: *Didelphis virginiana* (Lamothe-Argumedo et al. 1981). DISTRITO FEDERAL: ND: *Didelphis* sp. (Caballero 1937); Chapultepec: *Didelphis marsupialis* (Gutiérrez-Fuster 1966). ESTADO DE MÉXICO: ND: *Didelphis* sp. (García-Prieto et al. 2012). HIDALGO: Tasquillo: *Didelphis* sp. (Caballero 1937). JALISCO: Chamela: *Didelphis marsupialis* (García-Prieto et al. 2012). MORELOS: Reserva Estatal Sierra de Monte Negro: *Didelphis virginiana* (Slava-Araujo 2005). NUEVO LEÓN: San Nicolás de los Garza: *Didelphis virginiana* (García-Prieto et al. 2012). VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (Cañeda-Guzmán 1997); ND: *Didelphis marsupialis* (Flores-Barroeta 1957).

Remarks. We identify these nematodes according to the re-description made by Adnet et al. (2009), who established the number of caudal papillae (ten pairs of button-like papillae, symmetrically ventro-laterally located), as well as the single median papilla at the anterior cloacal lip and four pairs of post-cloacal papillae, as diagnostic traits of this species.

Family Gnathostomatidae Railliet, 1895

Gnathostoma turgidum Stossich, 1902

Site of infection. Stomach (adult; larvae); liver (sub-adult).

Present records. CHIAPAS: Arriaga†: *Didelphis* sp. COLIMA: Colima†: *Didelphis virginiana*. OAXACA: Soyaltepec†: *Didelphis virginiana*. TABASCO: Teapa†: *Didelphis marsupialis*. VERACRUZ: Tlacotalpan: *Didelphis virginiana*.

Specimens deposited. CNHE 8979–86, 9548–9549.

Previous records in Mexico. CHIAPAS: Jaltenango: *Didelphis marsupialis* (Caballero 1958). COLIMA: Laguna de Amela: *Didelphis virginiana* (García-Márquez 2005). GUERRERO: Laguna de Tres Palos: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). JALISCO: Carretera Juntas-Palmas (Puerto Vallarta): *Didelphis*

virginiana (Monet-Mendoza et al. 2005); Chamela: *Didelphis virginiana* (see Lamothe-Argumedo et al. 1998). MORELOS: Valle de Amilcingo: *Didelphis virginiana* (Mosqueda-Cabrera 2003). OAXACA: Temascal: *Philander opossum* (Almeyda-Artigas et al. 2010), *Didelphis marsupialis* (Almeyda-Artigas et al. 2000, Ocegüera-Figueroa 2002, Mosqueda-Cabrera 2003), *Didelphis virginiana* (Lamothe-Argumedo et al. 1998, Almeyda-Artigas et al. 2000, Mosqueda-Cabrera 2003). SINALOA: Tecualilla: *Didelphis virginiana* (Nawa et al. 2009, Díaz-Camacho et al. 2009). TABASCO: Rancho Mendoza Llergo: *Didelphis marsupialis* (León-Règagnon et al. 2005); Jardín Botánico de la UJAT, Oriente Segunda Sección, Ranchería El Limón, Ranchería Emiliano Zapata, Ranchería José María Pino Suárez, Ranchería La Palma: *Didelphis marsupialis* (Gallegos-Torres 2003). VERACRUZ: Laguna Los Vila, Laguna Novillera: *Didelphis virginiana* (León-Règagnon et al. 2005); Tlacotalpan: *Didelphis virginiana* (Almeyda-Artigas et al. 2000, Pérez-Álvarez et al. 2008), *Didelphis marsupialis* (Pérez-Álvarez et al. 2008).

Remarks. The presence of numerous points on the posterior end of cuticular spines at esophagus-intestine junction level, the body size, and the lack of spines in the posterior region of body, constitutes the diagnostic traits of this species in accordance with Bertoni-Ruiz et al. (2011).

Family Gongylonematidae Hall, 1916

Gongylonema sp.

Site of infection. Stomach.

Present records. CHIAPAS: Tapachula†: *Didelphis virginiana*.

Specimens deposited. CNHE 8970.

Remarks. Two species of the genus *Gongylonema* are distributed in Mexican didelphids: *Gongylonema mexicanum* (in Chiapas and Veracruz) and *Gongylonema pulchrum* (in Chiapas) (García-Prieto et al. 2012). The specific identification of our specimen was not possible because we collected only one female.

Family Physalopteridae Railliet, 1893

Turgida turgida Rudolphi, 1819

Site of infection. Stomach.

Present records. CAMPECHE: Escárcega†: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*. CHIAPAS: Arriaga†: *Didelphis* sp.; Tapachula†: *Didelphis* sp.; *Didelphis marsupialis*. COLIMA: Colima: *Didelphis virginiana*. DISTRITO FEDERAL: Pedregal de San Ángel: *Didelphis virginiana*. GUANAJUATO: Irapuato†: *Didelphis virginiana*. HIDALGO: Tianguistengo†: *Didelphis virginiana*. OAXACA: Soyaltepec†: *Didelphis*

virginiana. PUEBLA: Coapan[†]: *Didelphis virginiana*. TABASCO: Teapa: *Didelphis marsupialis*; Villahermosa: *Didelphis virginiana*. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*; Tlacotalpan[†]: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*.

Specimens deposited. CNHE 9018–23, 9025–36, 9541–9543.

Previous records in Mexico. CHIAPAS: Motozintla: *Didelphis* sp. (Caballero and Zerecero 1944, 388); Tonalá: *Philander opossum* (García-Prieto et al. 2012). COLIMA: Colima: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005); Comala: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005), *Didelphis marsupialis* (García-Prieto et al. 2012); Dos Amates: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005); La Esperanza: *Didelphis marsupialis* (Miyazaki et al. 1980); Madrid: *Didelphis marsupialis* (Miyazaki et al. 1980), *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005); ND: *Didelphis virginiana* (Lamothe et al. 1981). DISTRITO FEDERAL: ND: *Didelphis* sp. (Caballero 1937), *Didelphis marsupialis* (Monsivais-Aguilar 1958); Pedregal de San Ángel: *Didelphis virginiana* (Pacheco-Coronel 2010); Chapultepec: *Didelphis marsupialis* (Gutiérrez-Fuster 1966). ESTADO DE MÉXICO: ND: *Didelphis* sp. (García-Prieto et al. 2012); Tequesquahuac: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). GUERRERO: Carretera Coyuquilla-Zihuatanejo, Coyuquilla: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005); Carretera Aeropuerto-Ixtapa: *Didelphis virginiana* (García-Prieto et al. 2012); Taxco El Viejo: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). HIDALGO: Tasquillo: *Didelphis* sp. (Caballero 1937). JALISCO: Chameña: *Didelphis marsupialis* (García-Prieto et al. 2012). MICHOACÁN: El Hortigal: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). MORELOS: Reserva Estatal Sierra de Monte Negro: *Didelphis virginiana* (Eslava-Araujo 2005). NAYARIT: Peñitas: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). NUEVO LEÓN: Marín, Monterrey: *Didelphis marsupialis* (García-Prieto et al. 2012). OAXACA: Dominguillo: *Didelphis marsupialis* (see Monet-Mendoza et al. 2005); Nizanda: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005). VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (Cañeda-Guzmán 1997); Medellín: *Didelphis marsupialis* (Caballero-Deloya 1969).

Remarks. These specimens were identified based on the re-description of this species (Matey et al. 2001). Its diagnostic traits are: the presence of 2 spongelike areas on the inner side of each pseudolabia, and the number of caudal papillae (22).

Family Trichuridae Railliet, 1915

Trichuris didelphis Babero, 1960

Site of infection. Caecum.

Present records. CAMPECHE: Escárcega[†]: *Didelphis virginiana*. CHIAPAS: Arriaga[†]: *Didelphis* sp. COLIMA: Colima[†]: *Didelphis virginiana*. HIDALGO: Tian-

guistengo[†]: *Didelphis virginiana*. MORELOS: Tepoztlán[†]: *Didelphis virginiana*. YUCATÁN: Mérida[†]: *Didelphis virginiana*; Tzucacab[†]: *Didelphis marsupialis*.

Specimens deposited. CNHE 8974–78, 9550–9553.

Previous records in Mexico. VERACRUZ: Los Tuxtlas: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum* (Cañeda-Guzmán 1997).

Remarks. Our material was identified based on the original description (Babero 1960). This species is characterised by the size of the spicule (0.47–0.6 mm), by having a spiny sheath, by the size of mature eggs (0.068 × 0.032 mm) and the posterior position of the vulva.

Capillariinae gen sp.

Site of infection. Lungs.

Present records. CAMPECHE: Escárcega: *Didelphis marsupialis**, *Didelphis virginiana**

Specimens deposited. CNHE 9031–2.

Remarks. Identification was not possible because only eggs were obtained.

Family Viannaiidae Neveu-Lemaire, 1944

Viannaia viannai Travassos, 1914

Site of infection. Intestine.

Present records. CAMPECHE: Escárcega[†]: *Didelphis virginiana*. CHIAPAS: Arriaga[†]: *Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis**. COLIMA: Colima[†]: *Didelphis virginiana*. OAXACA: Soyaltepec[†]: *Didelphis virginiana*. PUEBLA: Coapan[†]: *Didelphis virginiana*. TABASCO: Teapa[†]: *Didelphis marsupialis*; Villahermosa[†]: *Didelphis virginiana*. VERACRUZ: San Andrés Tuxtla[†]: *Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis*; Tlacotalpan[†]: *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum**.

Specimens deposited. CNHE 8988–98; 9025–30, 9544–9547.

Previous records in Mexico. GUERRERO: Taxco El Viejo: *Didelphis virginiana* (Monet-Mendoza et al. 2005).

Remarks. Our specimens were identified following Guerrero (1985). The synlophe of *Viannaia viannai* at mid-body has 3 ventral ridges orientated to left, short spicules (0.133–0.141 mm) and bursal ray arrangement 2-1-2 type.

Travassostrongylus sp.

Site of infection. Intestine (Adult).

Present records. CHIAPAS: Arriaga[†]: *Didelphis* sp.

Specimens deposited. CNHE 8987.

Remarks. To date, 12 species of the genus *Travassostrongylus* have been described, all parasitizing New World marsupials; *Travassostrongylus orloffi* Travassos, 1935 is the only species of this genus recorded in Mexico as parasite of *Didelphis marsupialis*; however, the finding of only 8 females make species identification difficult, because taxonomy of this group is based on male characteristics (Scheibel et al. 2014).



As a result of this study, we reported 66 new locality records, 9 new host records, and added one species to the composition of the helminth fauna of the opossums in Mexico: the trematode *B. didelphus* parasitizing *D. virginiana*, which had not been recorded in this country (see García-Prieto et al. 2012). A total of 21 helminth taxa were obtained from the 3 opossums species analyzed (6 trematodes, 2 cestodes, 10 nematodes and 3 acanthocephalans), all in adult stage, with exception of the larvae of *G. turgidum* collected during their migration through the liver of the hosts. The richest helminth fauna among the 3 host species was recorded in *D. virginiana*, (parasitized by 17 species), followed by *D. marsupialis* (11 species) and *P. opossum* (8 species). The digestive tract had the highest number of helminth species (12 intestinals, 2 in gall-bladder, 2 in caeca, and 3 in stomach); only 2 of the 21 taxa, *D. hayesi* and Capillariinae gen. sp. were found in another site of infection (lungs). The geographic distribution of the helminth species was heterogeneous. The nematode *C. tentaculata* was the only species found in all localities. Other helminth species were collected from 7 (*T. didelphis*), 8 (*R. coronatus*) and 9 (*V. viannai*) localities; however, most taxa (12) were found in only one locality.

These data bring the number of taxa parasitizing *D. virginiana*, *D. marsupialis*, and *P. opossum* to 37, 21 and 20, respectively (García-Prieto et al. 2012). In this work we sampled in 9 previously unstudied localities; nevertheless, 47.2%, 52.4% and 40% of the taxa collected were reported previously from the Virginia opossum, Black-eared opossum and Gray four-eyed opossum, respectively. These species are typical of didelphids in other parts of the Americas (see Alden 1995; Corrêa Gomes et al. 2003; Haverskot and Gardner 2008; Berton-Ruiz et al. 2011; Richardson et al. 2014), conforming a group basically represented by the trematode *R. coronatus*, the acanthocephalan *O. microcephalus* and the nematodes *C. tentaculata*, *G. turgidum*, and *T. turgida*; these species have been recorded associated to any of the three opossum species in 7, 10, 15, 9, and 17 Mexican states, respectively. In states where the 3 host species are distributed sympatrically, *O. microcephalus* and *R. coronatus* are the species more frequently shared between them. On the other hand, the most restricted geographic areas are presented by the trematodes *A. caudalitestis*, *B. didelphus*, and *P. magnacirrus*, the acanthocephalan *O. luehei*, and the nematodes *Gongylonema* sp., and *Travassostrongylus* sp., which are present exclusively in one locality. In total, the records of this group of mammals come from 20 of the 32 states of the Mexican Republic; however, the geographic information is asymmetrical,

because most of the samplings were made in the state of Veracruz (13 sites). Other states, as Campeche and Quintana Roo, have been sampled once. Moreover, most of the species that have been found parasitizing these didelphid species represent point locality records in only one study about its parasites cover states or regions, particularly Los Tuxtlas, Veracruz. However, the host's collections were made along 13 years, in different year season and with a very distinct sample size (see Cañeda-Guzmán 1997).

Considering only the 27 nominal helminth species recorded to date, the 3 host species shared 12 worm species along the sampled sites in Mexico; 8 were exclusively found in *D. virginiana*, and 2 are specialist to *P. opossum*. The cestode *T. didelphidis* and the acanthocephalan *O. luehei* are shared by the 2 species of the genus *Didelphis* but not by *P. opossum*; the Virginia opossum and the Grey four-eyed opossum shared the digenean *D. prolobo* and the nematode *A. raillieti*, whereas *D. marsupialis* and *P. opossum* shared only *P. magnacirrus*. The helminth fauna of these hosts throughout their range is composed by one group of 20 specialist species, and by *P. mexicanus*, *O. microcephalus*, *O. luehei*, *P. gethi*, *A. raillieti*, *D. longispiculata*, and *T. minuta* that act as generalist species. Accidental species have not been reported in any of the samples carried out to date in Mexico. At a local scale, both phenomena had been also observed in marsupials of French Guiana (Jiménez et al. 2011; Byles et al. 2013).

The structuring factor of the helminth fauna in the three didelphid species is the diet; most of the helminth species infect these host species through ingestion of eggs, larvae or intermediate hosts. Fifteen of the 27 named helminth species have indirect patterns of transmission (*T. didelphidis*, *B. didelphus*, *B. virginiana*, *D. prolobo*, *A. caudalitensis*, *P. mexicanus*, *O. microcephalus*, *P. gethi*, *O. luehei*, *P. nickoli*, *G. turgidum*, *T. turgida*, *G. mexicanum*, *D. longispiculata*, and *D. hayesi*), five are transmitted directly by eggs ingestion (*A. raillieti*, *C. americana*, *C. tentaculata*, *T. didelphis*, *T. minuta*) and for *P. magnacirrus*, *R. baculifer*, *R. coronatus*, *R. macracanthus*, *R. caballeroi*, *V. didelphis* and *V. viannai*, the life cycle is unknown (Table 2). This result is in agreement with the generalist lifestyles and diets of the three species of opossums (Krause and Krause 2006), that exposed them to the same parasite species; local differences in composition and abundance of helminth species could be related to local availability of parasites (or their intermediate hosts), as well as to the compatibility among host and helminth species, as has been showed by Cañeda-Guzmán (1997) and Jiménez et al. (2011).

The data obtained in this study came from 68 opossums collected from 18 localities (nine not previously sampled for helminths); however, the helminth fauna of each didelphid species showed a stable taxonomic composition with respect to previously sampled sites. Only one species of trematode not previously found in this group of hosts in the country was added to their parasitological record as results of our samples. In spite of the reduced scope of our samplings, this situation suggests that the rate of accumulation of helminth species in the inventory of the 3 species of terrestrial marsupials distributed in the Neotropical portion of Mexico included in this study is decreasing; however, new samplings in the Nearctic portion of this country will probably increase the richness of the helminthological inventory of this group of mammals.

Life cycles of the helminth species collected in the present study.

| Phylum | Taxa | Cycle/ Intermediate host | Reference |
|-----------------|--|-----------------------------------|------------------------------|
| Platyhelminthes | <i>Amphimerus</i> spp. | Heteroxenous/fish | Yamaguti (1975) [‡] |
| | <i>Brachylaima</i> spp. | Heteroxenous/snail | Yamaguti (1975) [‡] |
| Trematoda | <i>Philandrophilus magnacirrus</i> | Unknown | |
| | <i>Rhopalias</i> spp. | Unknown | |
| Cestoda | <i>Thaumasiolecolex didelphidis</i> | Heteroxenous/crustaceans | Scholz (1999) [‡] |
| Acanthocephala | <i>Oligacanthorhynchus microcephalus</i> | Heteroxenous/millipede | Richardson (2006) |
| | <i>Oncicola luehei</i> | Heteroxenous/insects, crustaceans | Kennedy (2006) |
| | <i>Porrorchis nickoli</i> | Heteroxenous/insects, crustaceans | Kennedy (2006) |
| Nematoda | <i>Aspidodera naillieti</i> | Monoxenous/eggs ingestion | Jiménez et al. (2011) |
| | <i>Cruzia</i> sp. | Monoxenous/eggs ingestion | Anderson (2000) |
| | <i>Didelphostrongylus hayesi</i> | Heteroxenous/snails | Prestwood (1976) |
| | <i>Gnathostoma</i> sp. | Heteroxenous/copepods | Kifune et al. (2004) |
| | <i>Gongylonema</i> sp. | Heteroxenous/insects | Anderson (2000) |
| | <i>Turgida turgida</i> | Heteroxenous/insects | Anderson (2000) |
| | <i>Trichuris</i> spp. | Monoxenous/eggs ingestion | Anderson (2000) |
| | <i>Viannaia</i> spp. | Unknown | |

[‡]Particular life cycle unknown; data obtained at supra-specific level.

To families Medina-Castillo in Agua Fría, Hernández in Tapachula, Chiapas and David Osorio, Samantha Contreras, Uriel Garduño, Sara Ramírez and Manuel Servín for field assistance. Virginia León, Luis J. García, Serapio López, Sergio Guillén and Rosamond Coates, for support in collection sites; to Gerardo Pérez Ponce de León who kindly facilitated permitting for specimens collection. To Lázaro Guevara for his assistance in the elaboration of map. To Elba Jaskowiak by her assistance in the English language edition; Georgina Ortega-Leite provided us important bibliographic references. We also thank Alejandro Ocegüera Figueroa for allowing us to deposit voucher specimens at the CNHE. To Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN220113 by financial support. JLC thanks to CONACyT for the scholarship received to complete his PhD studies within Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Adnet FAO, Anjos DHS, Menezes-Oliveira A, Lanfredi RM (2009) Further description of *Cruzia* tentaculata (Rudolphi, 1819) Travassos, 1917 (Nematoda: Cruzidae) by light and scanning electron microscopy. Parasitological Research 104: 1207–1211. doi: 10.1007/s00436-008-1316-6

Alden KJ (1995) Helminths of the opossum, *Didelphis virginiana*, in southern Illinois, with a compilation of all helminths reported from this host in North America. Journal of the

- Helminthological Society of Washington 62: 197–208. <http://bionames.org/bionames-archive/issn/1049-233X/62/197.pdf>
- Almeyda-Artigas RJ, Bargues MD, Mas-Coma S (2000) ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human Gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology* 83: 537–544. doi: 10.2307/3284869
- Almeyda-Artigas RJ, Mosqueda-Cabrera MA, Sánchez-Núñez E (2010) Precocity of *Gnathostoma turgidum* in naturally infected four-eyed opossum *Philander opossum pallidus* from Temascal, Oaxaca, Mexico. *Parasitology Research* 106: 439–443. doi: 10.1007/s00436-009-1682-8
- Anderson RC (2000) Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission. CABI Publishing, Wallingford, UK, 650 pp. doi: 10.1079/9780851994215.0000
- Arcangeli-Álvarez J (2010) Comparación molecular de dos especies de tlacuache: *Didelphis virginiana* y *Didelphis marsupialis* (Mammalia: Didelphimorphia). Master's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Babero BB (1960) Further studies on helminths of the opossum, *Didelphis virginiana*, with a description of a new species from this host. *Journal of Parasitology* 46: 455–463. doi: 10.2307/3275138
- Bertoni-Ruiz F, Lamothe-Argumedo R, García-Prieto L, Osorio-Sarabia D, León-Régagnon V (2011) Systematics of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in the Americas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 453–464. http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/revista_82_2/8_638.pdf
- Braun M (1901) Zur Kenntnis der Säugetiere. *Zoologische Jahrbuecher Systematik* 14: 311–348.
- Brooks DR, McLennan DA (2003) *Parascript: Parasites and the Language of Evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington, 448 pp.
- Byles B, Catzeffis F, Scheibel RP, Jiménez FA (2013) Gastrointestinal Helminths of Two Species of Mouse Opossums (*Marmosa demerarae* and *Marmosa murina*) from French Guiana. *Comparative Parasitology* 80(2): 210–216. doi: 10.1654/4621.1
- Caballero CE (1937) Nematodos de algunos vertebrados del Valle del Mezquital, Hgo. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 8: 189–200.
- Caballero CE (1946) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Trematoda II. Presencia de *Paragonimus* en reservorios naturales y descripción de un nuevo género. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 17: 137–165.
- Caballero CE (1958) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda 10a Parte. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 9: 61–76.
- Caballero CE, Zerecero C (1944) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda. 2a Parte. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 15: 389–407.
- Caballero CE, Bravo-Hollis M, Zerecero C (1944) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Trematoda I. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 15: 59–72.

- Caballero CE, Grocott RG, Zerecero C (1952) Helmintos de la República de Panamá IV. Redescrición de algunas formas de trematodos ya conocidos y descripción de una especie nueva de *Amphimerus*. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología 23: 181–201.
- Caballero-Deloya J (1960) Estudio monográfico de algunos nematodos parásitos de vertebrados de México. Bachelor's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Cañeda-Guzmán C (1997) Parásitos de tres especies de marsupiales de la Estación “Los Tuxtlas” y algunas zonas cercanas, Veracruz, México. Bachelor's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Cañeda-Guzmán C, de Chambrier A, Scholz T (2001) *Thaumasioscolex didelphidis* n. gen., n. sp., (Eucestoda: Proteocephalidae) from the black-eared opossum *Didelphis marsupialis* from Mexico, the first Proteocephalidean tapeworm from a mammal. Journal of Parasitology 87: 639–646. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0639:TDNGNS]2.0.CO;2
- Cervantes FA, Arcangeli-Álvarez J, Hortelano-Moncada Y, Borisenko AV (2010) DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. Mitochondrial DNA 21: 44–50. doi: 10.3109/19401736.2010.538051
- Chagas-Moutinho VA, Oliveira-Menezes A, Cárdenas MQ, Lanfredi RM (2007) Further description of *Aspidodera raillieti* (Nematoda: Aspidoderidae) from *Didelphis marsupialis* (Mammalia: Didelphidae) by light and scanning electron microscopy. Parasitology Research 101: 1331–1336. doi: 10.1007/s00436-007-0641-5
- Chandler AC (1932) Remarks on the helminth parasites of the opossum (*Didelphis virginiana*) in Southeast Texas, with descriptions of four new species. Proceedings of the United States National Museum 81: 1–15. doi: 10.5479/si.00963801.81-2939.1
- Cholodkovsky L (1902) Contribution a la connaissance des tenias de ruminants. Archives de Parasitologie 6: 43–148.
- Corrêa-Gomes D, Pereira da Cruz R, Julio Vicente J, Magalhaes Pinto R (2003) Nematode parasites of marsupials and small rodents from the Brazilian Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Revista Brasileira de Zoologia 20: 699–707. doi: 10.1590/S0101-81752003000400024
- Díaz-Camacho SP, Willms K, Rendón-Maldonado JG, De la Cruz-Otero MC, Delgado-Varas F, Robert L, Antuna S, León-Règagnon V, Nawa Y (2009) Discovery of an endemic area of *Gnathostoma turgidum* infection among opossums, *Didelphis virginiana*, in Mexico. Journal of Parasitology 95: 617–622. doi: 10.1645/GE-1871.1
- Eslava-Araujo AG (2005) Helmintos en la mastofauna silvestre de la Sierra de Monte Negro, Morelos, México. Bachelor's thesis, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico, Morelos, México.
- Flores-Barroeta L (1957) Nemátodos de Aves y Mamíferos. Revista Ibérica de Parasitología 17: 277–296. http://bibliotecavirtual.ranf.com/es/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1001091
- Gallegos-Torres F (2003) Estudio de algunos aspectos del ciclo de vida de *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 (Nematoda: Gnathostomatidae) en algunas localidades del estado de Tabasco. Bachelor's thesis, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México, Tabasco, México.

- García-Márquez LJ (2005) Estudio de la Gnatostomiasis en el Estado de Colima, México. Ph. D. thesis, Universidad de Colima, Mexico, Colima, México.
- García-Prieto L, Falcón-Ordaz J, Guzmán-Cornejo C (2012) Helminth parasites of wild Mexican mammals: list of species, host and geographical records. *Zootaxa* 3290: 1–92.
- García-Prieto L, García-Varela M, Mendoza-Garfias B, Pérez-Ponce de León G (2010) Checklist of the Acanthocephala in wildlife vertebrates of Mexico. *Zootaxa* 2419: 1–50.
- García-Varela M, Pérez-Ponce de León G, De la Torre P, Cummings MP, Sarma S, Lactette JP (2000) Phylogenetic relationships of Acanthocephala based on analysis of 18S Ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution* 50: 532–540. doi: 10.1007/s002390010056
- Gegenbaur C (1859) *Gundzüge der vergleichenden Anatomie*. W. Engelmann, Leipzig, Germany.
- Golvan YJ (1960) Le phylum des Acanthocephala. Troisième note. La classe des Palaeacanthocephala (Meyer, 1931) (à suivre) part 2. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 35: 138–165.
- Guerrero R (1985) Trichostrongyloidea parásitos de mamíferos silvestres de Venezuela. II Revisión del género *Viannaia* Travassos, 1914. *Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle* 124: 9–47. doi: 10.1590/S0101-81752003000400024
- Gutiérrez-Fuster I (1966) Estudio de helmintos parásitos de algunos animales del Parque Zoológico de Chapultepec, D.F., México. Bachelor's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F.
- Hall MC (1916) Nematode parasite of mammals of the orders Rodentia, Lagomorpha and Hyracoidea. *Proceedings of the United States National Museum* 50: 1–258. doi: 10.5479/si.00963801.50-2131.1
- Haverkost T, Gardner SL (2008) A review of species in the genus *Rhopalias* (Rudolphi, 1819). *Journal of Parasitology* 94: 716–726. doi: 10.1645/GE-1423.1.
- Jiménez FA, Gardner SL, Catzeffis F (2011) Structure of parasite component communities of didelphid marsupials: insight from a comparative study. *Journal of Parasitology* 97: 779–787. doi: 10.1645/GE-2711.1
- Jiménez-Ruiz FA, Gardner SL, Varela-Stokes AS (2006) Aspidoderidae from North America, with the description of a new species of *Aspidodera* (Nematoda: Heterakoidea). *Journal of Parasitology* 92: 847–854. doi: 10.1645/GE-735R.1
- Kennedy CR (2006) *Ecology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge, 249 pp. doi: 10.1017/CBO9780511541902
- Kifune T, Uyema N (1982) Report of the Fukuoka University Scientific Expedition to Peru, 1976. Part 3. Taxonomical studies on trematodes from marsupials and rodents with records of two crabs. *Medical Bulletin of Fukuoka University* 9: 241–256.
- Kingston N, Tay J (1968) *Rhopalias macracanthus* y *Rhopalias coronatus* en *Didelphis marsupialis*. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 39: 167–168.
- Krause JW, Krause AW (2006) *The opossum: Its amazing history*. University of Missouri, Columbia, Missouri, 87 pp. https://web.missouri.edu/~krausew/Histology/Home_files/opossum.pdf
- La Rue RG (1911) A revision of the cestode family Proteocephalidae. *Zoologischer Anzeiger* 38: 473–482. <http://biostor.org/reference/102550>

- Lamothe-Argumedo R (1978) Trematodos de mamíferos I. Redescrición de *Rhopalias macracanthus* Chandler, 1932 y algunas consideraciones sobre el género. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología 49: 25–34.
- Lamothe-Argumedo R (1997) Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres. A.G.T. Editor, México D.F., 43 pp.
- Lamothe-Argumedo R, Pineda-López R, Meave-Gallégo O (1981) Infección natural de *Paragonimus mexicanus* en *Didelphis virginiana* californica en Colima, México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología 52: 45–50.
- Lamothe-Argumedo R, Akahane H, Osorio-Sarabia D, García-Prieto L (1998) Hallazgo de *Gnathostoma turgidum* en *Didelphis virginiana* de Temascal, Oaxaca, México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología 69: 225–229. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=45869207>
- Lane C (1914) Suckered round-worms from India and Ceylon. Indian Journal of Medical Research 2: 655–669.
- León-Régagnon V, Osorio-Sarabia D, García-Prieto L, Lamothe-Argumedo R, Bertoni-Ruiz F, Ocegüera-Figueroa A (2005) New host records of the nematode *Gnathostoma* sp. in Mexico. Parasitology International 54: 51–53. doi: 10.1016/j.parint.2004.10.001
- Looss A (1899) Weitere Beiträge zur Kenntnis der Trematodenfauna Aegyptens, zugleich Versuch einer natürlichen Gliederung des Genus *Distomum* Retzius. Zoologische Jahrbücher 12: 521–784.
- López-Caballero J, Mata-López R, García-Varela M, Pérez-Ponce de León G (in press) Genetic variation of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Acanthocephala: Archiacanthocephala: Oligacanthorhynchidae), parasite of three species of opossums (Mammalia: Didelphidae) across central and southeastern Mexico. Comparative Parasitology 82.
- Matey VE, Kuperman BI, Kinsella JM (2001) Scanning electron microscopy of *Turgida turgida* (Nematoda: Spiruroidea), parasite of the Virginia opossum, *Didelphis virginiana*, from Southern California. Journal of Parasitology 87: 1199–1202. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[1199:SEMOTT]2.0.CO;2
- Mehra HR (1935) New trematodes of the family Lecithodendriidae Odhner, 1911, with a discussion of the classification of the family. Proceedings of the Academy of Sciences 5: 99–121.
- Mena-Romero G (1981) Trematodos de algunos mamíferos silvestres de los Estados de Nuevo León y Tamaulipas, México. Bachelor's thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.
- Miyazaki I, Kifune T, Lamothe-Argumedo R (1980) Taxonomical and biological studies on the lung flukes of Central America. Occasional Publications Fukuoka University 2: 1–28.
- Monet-Mendoza A, Osorio-Sarabia D, García-Prieto L (2005) Helminths of the Virginia Opossum *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphidae) in Mexico. Journal of Parasitology 91: 213–219. doi:10.1645/GE-273R
- Monsivais-Aguilar G (1958) Estudio sobre algunos trematodos de mamíferos. Bachelor's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Mexico D.F.
- Mosqueda-Cabrera MA (2003) Caracterización y diferenciación sistemática de especies mexicanas del género *Gnathostoma* (Nematoda: Spirurida: Gnathostomatoidea) parásitas de

- mamíferos carnívoros de la parte baja de la cuenca del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz. Master's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Mexico D.F.
- Nawa Y, Cruz-Otero MC, Zazueta-Ramos ML, Bojórquez-Contreras A, Sicairos-Felix J, Campista-León S, Torres-Montoya EH, Sánchez-González S, Guzmán-Loreto R, Delgado-Vargas F, Díaz-Camacho SP (2009) Is *Gnathostoma turgidum* an annual parasite of opossums? Drastic seasonal changes of infection in *Didelphis virginiana* in Mexico. *Journal of Parasitology* 95: 908–912. doi: 10.1645/GE-1988.1
- Neveu-Lemaire M (1934) Sur la classification des trichostrongylides. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 12: 248–252.
- Ocegüera-Figueroa A (2002) Determinación morfológica y molecular de larvas de *Gnathostoma* sp. (Nematoda: Gnathostomatidae) de peces de consumo humano de diversas localidades de México. Bachelor's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, México D.F.
- Pacheco-Coronel N (2010) Estudio piloto de la frecuencia de parásitos de mamíferos ferales y silvestres de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de la UNAM. Master's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, México D.F.
- Pérez-Álvarez Y, García-Prieto L, Osorio-Sarabia D, Lamothe-Argumedo R, León-Règagnon V (2008) Present distribution of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in Mexico. *Zootaxa* 1930: 39–55.
- Premvati G, Blair TD (1979) Trematode Parasites of the opossum, *Didelphis virginiana*, from Florida. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 46: 207–212. <http://bionames.org/bionames-archive/issn/0018-0130/46/207.pdf>
- Prestwood AK (1976) *Didelphostrongylus hayesi* gen. et sp. n. (Metastrongyloidea: Filaroididae) from the opossum, *Didelphis marsupialis*. *Journal of Parasitology* 62: 272–275. <http://www.jstor.org/stable/3279284>
- Railliet A (1893) *Traité de Zoologie médicale et agricole*, Fasc. 1. Paris, 736 pp.
- Railliet A (1895) *Traité de Zoologie médicale et agricole*, Paris, 737–1310. doi: 10.5962/bhl.title.34139
- Railliet A (1915) Dioctophymoidea (ord. nom. n.). *Recueil de Médecine Veterinaire* 92: 1–521.
- Richardson DJ, Gardner SL, Allen JW (2014) Redescription of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt 1972 (syn. *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Leidy, 1850) Schmidt 1972) (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae). *Comparative Parasitology* 81: 53–60. doi: 10.1654/4673.1
- Rudolphi CA (1808) Entozoorum sive vermium intestinalium. *Historia Naturalis* 1: 1–527.
- Rudolphi CA (1819) Entozoorum synopsis cui accedunt mantissa duplex et indices locupletissimi. Berolini, 811 pp. doi: 10.5962/bhl.title.9157
- Salgado-Maldonado G, Cruz-Reyes A (2002) *Porrorchis nickoli* n. sp. (Acanthocephala: Plagiorhynchidae) from mammals in Southeastern Mexico, first known occurrence of *Porrorchis* in the Western Hemisphere. *Journal of Parasitology* 88: 146–152. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0146:PNNSAP]2.0.CO;2
- Scheibel PR, Catzeffis F, Jiménez FA (2014) The relationships of marsupial-dwelling Vianaiidae and description of *Travassostrongylus scheibelorum* sp. n. (Trichostrongylina: Heligmosomoidea) from mouse opossums (Didelphidae) from French Guiana. *Folia Parasitologica* 61: 242–254. doi: 10.14411/fp.2014.032

- Schmidt GD (1972) Revision of the Class Archiacanthocephala Meyer, 1931 (Phylum Acanthocephala), with emphasis on Oligacanthorhynchidae Southwell et MacFie, 1925. *Journal of Parasitology* 58: 290–297. doi: 10.2307/3278091
- Scholz T (1999) Life cycles of species of *Proteocephalus*, parasites of fishes in the Palearctic Region: a review. *Journal of Helminthology* 73: 1–19. doi: 10.1017/S0022149X99000013
- Skrjabin KI, Shikhobalova NP (1947) Revision of the classification of the Family Heterakidae. *Trudy Gel'mintologicheskoi Laboratorii, Akademiya Nauk SSSR* 58: 719–721.
- Stossich M (1902) Sopra alcuni nematode della collezione elmintologica del prof. dott. Corrado Parona. *Bolletino dei Musei di Zoologia e Anatomia Comparata della R. Università di Genova* 116: 1–16.
- Thatcher VE (1970) Some Plagiorchiid Trematodes from Panama and Colombia including *Philandrophilus magnacirrus* n. g., n. sp. from a Marsupial and a Review of *Paralopharynx*. *Transactions of the American Microscopical Society* 89: 349–354. doi: 10.2307/3224354
- Travassos L (1913) Sobre as espécies brasileiras da subfamília Heterakinae Railliet & Henry, 1912. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 5: 271–318. doi: 10.1590/S0074-02761913000300005
- Travassos L (1914) Trichostrongylinae brasileiras. *Brazilian Medicine* 28: 325–327.
- Travassos L (1917) Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira, VI. Revisão dos acantocefalos brasileiros. Parte I. Fam. Gigantorhynchidae Hamann, 1892. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 9: 5–62.
- Yamaguti S (1975) A synoptical review of life history of digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku, Tokyo, 590 pp.

CAPÍTULO 2

Genetic divergence of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae), parasite of three species of opossums (Mammalia: Didelphidae) across central and southeastern Mexico.

Genetic Divergence of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Acanthocephala: Archiacanthocephala: Oligacanthorhynchidae), Parasite of Three Species of Opossum (Mammalia: Didelphidae) across Central and Southeastern Mexico

JORGE LÓPEZ-CABALLERO,^{1,3} ROSARIO MATA-LÓPEZ,² MARTÍN GARCÍA-VARELA,¹ AND GERARDO PÉREZ-PONCE DE LEÓN^{1,4}

¹ Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Distrito Federal, México (e-mail: jlclidi@yahoo.com.mx; garciav@ib.unam.mx),

² Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Distrito Federal, México (e-mail: rmatalopez@ciencias.unam.mx), and

³ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Distrito Federal, México.

ABSTRACT: *Oligacanthorhynchus* (Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972 (Oligacanthorhynchidae) is a typical parasite of opossums (Didelphidae). This species of acanthocephalan exhibits a wide distributional range that extends from Brazil to as far north as the United States, but no data on the genetic divergence of this helminth has been provided thus far along its entire geographic range. The facts that *O. microcephalus* shows a relatively wide geographic range in Mexico and that it has been recorded in 3 species of opossum allowed us to conduct a molecular prospecting study to assess the genetic divergence among individuals and populations as well as to detect potentially exclusive lineages indicative of the presence of a species complex. In total, 81 specimens identified as *O. microcephalus* were collected from the intestines of 3 species of opossum in 8 localities across central and southeastern Mexico. The DNA sequences of 2 genes were generated; cytochrome *c* oxidase subunit 1 (cox 1) of the mitochondrial DNA and the domains D2 and D3 from large subunit of the nuclear ribosomal RNA (LSU). Maximum parsimony, maximum likelihood, and Bayesian inference analyses were performed for each dataset alone and for the combined datasets (LSU + cox 1). All the phylogenetic analyses yielded 3 major clades with high bootstrap and posterior probability support values and with relatively high genetic divergence levels for both markers. However, the morphological study of specimens through both light and scanning electron microscopy, as well as the morphometric data, indicate that those specimens allocated into Clade I are smaller than those contained in Clades II and III. Lower genetic divergence values, as well as no clear-cut morphometric differences, indicate that Clades II and III are likely not independent lineages. Our results show at least 2 genetic lineages that may represent independent species, but we refrain at the moment on describing a new species in the lack of evidence gathered from a wider geographic range.

KEY WORDS: Acanthocephala, Archiacanthocephala, cox 1, LSU, Didelphidae, genetic divergence, Mexico.

Members of the class Archiacanthocephala Meyer 1931 are endoparasites that exhibit an indirect life cycle involving insects or other arthropods as intermediate hosts and terrestrial mammals or birds as definitive hosts. Species of Archiacanthocephala may involve paratenic hosts such as amphibians, snakes, and lizards in their life cycles (Nickol, 1985). The class is divided into 3 orders: Apororhynchida Thapar 1927; Gigantorhynchida Southwell and Macfie, 1925; Moniliformida Schmidt, 1972; and Oligacanthorhynchida Petrochenko, 1956, each composed of a single family (Yamaguti, 1963; Schmidt, 1972; Nickol, 1985; Amin, 2013). Currently Oligacanthorhynchidae Southwell and Macfie, 1925 contains 11 genera, with the genus *Oligacanthorhynchus* Travassos, 1915, including 34 valid species (Amin, 2013). In particular, the species *O. microcephalus*

(Rudolphi, 1819) Schmidt, 1972 has a rather controversial and unstable taxonomic history. This species is typically a parasite of opossums (Didelphidae Gray, 1821), although isolated records exist of its presence in both armadillos (Dasypodidae Gray, 1821) (Richardson et al., 2014) and raccoons (Procyonidae Gray, 1825) (García-Prieto et al., 2010). *Oligacanthorhynchus microcephalus* exhibits a wide geographic distributional range that extends from Brazil, where it was originally described by Travassos (1915), to as far north as the United States (Richardson et al., 2014). In Mexico, this acanthocephalan has been recorded as a parasite of *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758, *Didelphis virginiana* Kerr, 1792, and *Philander opossum* Linnaeus, 1758 (García-Prieto et al., 2010), although the species was recorded as *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Leidy, 1850) Schmidt, 1972. After a rigorous morphological comparison of specimens obtained from the Virginia opossum (*D. virginiana*) in the United States and the

⁴ Corresponding author (e-mail: ppdleon@ib.unam.mx).

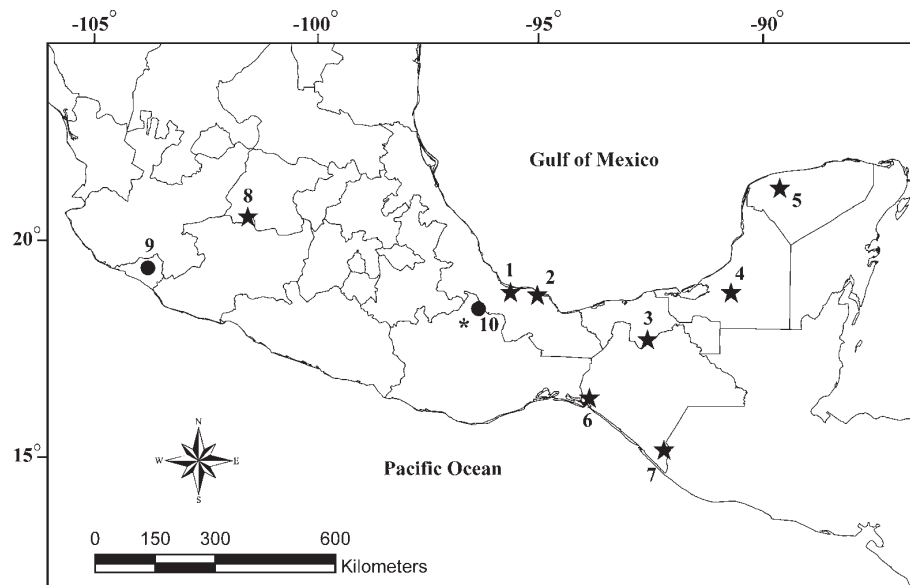


Figure 1. Collection localities of *Oligacanthorhynchus microcephalus*. 1. Tlacotalpan, Veracruz (TL). 2. Los Tuxtlas, Veracruz (LT). 3. Cunduacán, Tabasco (CU). 4. División del Norte, Escárcega, Campeche (ES). 5. Mérida, Yucatán (ME). 6. Agua Fria, Chiapas (AF). 7. Finca Brasil, Chiapas (FB). 8. Rincón de Martínez, Abasco, Guanajuato (RM). 9. Coquimatlán, Colima. 10. San Miguel Soyaltepec, Oaxaca. The circles indicate localities where opossums were studied but negative to the infection. The asterisk (*) indicates the locality reported for the sequence from GenBank used in this work. The star indicates the localities where *Oligacanthorhynchus microcephalus* was collected in this study.

type specimen of *O. microcephalus* (described from *Caluromys philander philander* Linnaeus, 1758 from Brazil), Richardson et al. (2014) determined that the species *O. tortuosa* is a junior synonym of *O. microcephalus*. The taxonomic study of Richardson et al. (2014) also included Mexican specimens from opossums in several localities. However, no data on the genetic divergence of this species of acanthocephalan have been provided thus far along its entire geographic range.

Examination of DNA sequence data represents a useful approach to establish more-precise species delimitation criteria and to recognize the potential existence of cryptic species (Pérez-Ponce de León and Nadler, 2010; Nadler and Pérez-Ponce de León, 2011) and has the potential to increase our ability to discover genetically distinct but morphologically very similar species. As such, several authors have suggested the use of a molecular prospecting approach as a first step in establishing genetic distances among populations when a parasite species occurs in multiple hosts or habitats (see Blouin, 2002; Criscione et al., 2005; Vilas et al., 2005), or when the

species exhibits a wide geographical range, prior to proceeding with species delimitation by testing the hypothesis of lineage exclusivity.

Considering the wide geographic range of *O. microcephalus* across Mexico, and the fact that it has been found in 3 species of opossum, the purpose of this study was to conduct a molecular prospecting study (sensu Blouin, 2002) to assess the genetic divergence among individuals and populations of *O. microcephalus* in order to detect the potential existence of several lineages that might correspond to independent species.

MATERIALS AND METHODS

Between August 2011 and November 2013, 81 specimens of *O. microcephalus* were collected from the intestine of 3 species of opossums, *D. marsupialis* ($n = 6$), *D. virginiana* ($n = 13$), and *P. opossum* ($n = 2$) from 8 localities in central and southeastern Mexico (Fig. 1, Table 1). Hosts were collected under the collecting permit FAUT 0057 issued to G.P.P.L. by the Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Mammals were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital, necropsied, and all organs examined under a stereomicroscope. Acanthocephalans were removed

Table 1. Localities where specimens of *Oligacanthorhynchus microcephalus* were collected in Mexico, indicating geographical coordinates, host species (n = sample size), cytochrome *b* GenBank accession numbers for hosts, and collection dates.

| Locality (abbreviation) | Geographical coordinates | Host species (n) | GenBank accession number | Collection date (month/year) |
|----------------------------|---------------------------------|--|--|------------------------------|
| Veracruz | | | | |
| Tlacotalpan (TL) | 18°37'40''N 95°40'40''W | <i>D. virginiana</i> (2) | KM659269-270 | 02/2012 |
| Los Tuxtlas (LT) | 18°34'21''N 95°04'30''W | <i>D. marsupialis</i> (2) | KM659276-277 | 08/2011 03/2012 |
| Tabasco | | | | |
| Cunduacán (CU) | 17°34'16.9''N 92°57'09''W | <i>D. virginiana</i> (1) | KM659264 | 08/2012 |
| Campeche | | | | |
| Escárcega (ES) | 18°37'00''N 90°43'13''W | <i>D. virginiana</i> (2) <i>D. marsupialis</i> (1) | KM659261 KM659268 KM659275 | 07/2012 |
| Yucatán | | | | |
| Mérida (ME) | 20°58'04''N 89°37'18''W | <i>D. virginiana</i> (1) <i>D. marsupialis</i> (1) | KM659263 KM659273 | 11/2013 |
| Chiapas | | | | |
| Agua Fria (AF) | 16°15'25.9''N 93°53'54.9''W | <i>D. marsupialis</i> (1) <i>D. virginiana</i> (1) <i>P. opossum</i> (1) | KM659274 KM659265 — | 06/2012 03/2013 |
| Finca Brasil (FB) | 15°05'40.9''N 92°13'45''W | <i>D. marsupialis</i> (1) <i>D. virginiana</i> (4) <i>P. opossum</i> (1) | KM659279 KM659266-267, KM659271 KM659278 — | 06/2012 |
| Guanajuato | | | | |
| Rincón de Martínez (RM) | 20°19'44''N 101°34'41.9''W | <i>D. virginiana</i> (2) | KM659262, KM659272 | 02/2013 |
| Colima | | | | |
| Coquimatlán | 19°10'28.1''N 103°49'38.2''W | <i>D. virginiana</i> (2) | — | 09/2012 |
| Oaxaca | | | | |
| San Miguel | 18°15'28''N | <i>D. virginiana</i> (1) | — | 07/2013 |
| Soyaltepec | 96°24'0''W | | | |
| Temascal (TE) | 18°14'22''N 96°24'11''W | <i>D. virginiana</i> (ND)* | — | ND |

* ND, not determined.

from the intestine of their hosts, placed in Petri dishes with 0.85% saline, and chilled in cold distilled water for 10–12 hr to elicit proboscis eversion. Some specimens were then preserved in 100% ethanol for DNA extraction and some in 70% ethanol for morphological study. For taxonomic identification, specimens were punctured with a fine needle and subsequently stained with Meyer's paracarmine,

dehydrated in ascending concentrations of ethanol (70%, 80%, 90% [twice], and 100%), cleared with methyl salicylate, and mounted on permanent slides using Canada balsam. For scanning electron microscopy (SEM), study specimens were fixed in 10% formalin, dehydrated through a graded series of ethyl alcohol, and critical point dried with carbon dioxide. Specimens were mounted on metal stubs

with silver paste and then gold-coated and examined at 10kV in a Hitachi Stereoscan Model SU1510 SEM (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Digital images were obtained using digital imaging software attached to a computer. For comparative purposes, vouchers of *O. microcephalus* (recorded as *O. tortuosa*) from the Colección Nacional de Helminthos (CNHE) (ex *Didelphis marsupialis* Veracruz, CNHE-611; ex *Didelphis virginiana*, Oaxaca, CNHE-4497, Michoacán, CNHE-618, Tabasco, CNHE-4779, Veracruz, CNHE-610) were studied. Voucher specimens were deposited in the CNHE, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City (Table 1).

For molecular work, 50 specimens of *O. microcephalus* from 8 localities were placed individually in tubes and digested overnight at 56°C in a solution containing 10 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 µl 20 mM NaCl, 20 µl 100 mM EDTA (pH 8.0), 10 µl 1% Sarkosyl, 1 µl proteinase K (0.1 mg/ml), and sterilized distilled water to a final volume of 100 µl. Following digestion, DNA was extracted from the supernatant using the DNeasy® reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox 1) and the domains D2 and D3 from the large subunit rRNA (LSU) were amplified using polymerase chain reaction (PCR) with the forward primer 5'-AGTTCTAATCATAA(R)GATAT(Y)GG-3' and reverse primer 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAA TCA-3' (Folmer et al., 1994) for cox 1 and the forward primer 5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC-3' and reverse primer 5'-GTCGATAGGACTCCCTTTG-3' for LSU (García-Varela and Nadler, 2006). All PCRs were performed at a final volume of 25 µl [2.5 µl of 10× PCR buffer, 2.5 µl of 10 mM of dNTPs mixture (200 µM each), 1.25 µl MgCl₂ (50 mM), 1.0 µl each primer (10 pmol), 1 µl DNA template, and 1 unit of Taq DNA polymerase 500 U (5 U/µl; Biogenica, Mexico City) in sterilized distilled water. The amplification program consisted of 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 45°C for cox 1 and 50°C for LSU, 1 min at 72°C, followed by 10 min at 72°C for final elongation. The PCR products were sequenced in both strands, using the same primers mentioned above for both markers, in the High-Throughput Genomics Unit at the University of Washington, U.S.A. (<http://www.htseq.org/index.html>). All sequences were edited and assembled manually using the platform Geneious Pro v5.1.7 (Drummond et al., 2010), and the consensus of both strands were deposited in the GenBank database (see accession numbers in Table 1). Sequences obtained in the current research from cox 1 and LSU were aligned separately using the Clustal W software (Thompson et al., 1994) with a final manual adjusting with Mesquite v2.75 software (Maddison and Maddison, 2011). The genetic divergence among populations of *O. microcephalus* was determined using the uncorrected (*p*-distance) method. Maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), and Bayesian inference (BI) analyses were performed for each dataset as well as the combined datasets (LSU + cox 1). The MP tree was inferred using the program TNT (Goloboff et al., 2008). Tree searches were performed using 1,000 random taxon addition heuristic searches with tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping for MP. The ML tree was inferred using RAxML v7.0.4 (Stamatakis, 2006). The cox 1 alignment contained no gaps and the translations of the sequences matched with the open reading frame of the cox 1 from the complete mitochondrial genome of the acanthocephalans

Pallisentis celatus Van Cleave 1928, *Oncicola luehei* Travassos 1917, and *Leptorhynchoides thecatus* Kostylev 1924 (Steinauer et al., 2005; Gazi et al., 2012; Pan and Nie, 2013). In the LSU alignment 3 gaps were added among the outgroup and ingroup. These gaps were treated as missing data in the analysis. For ML analyses, the general time reversible nucleotide substitution model was selected for each dataset as well as for the combined dataset (LSU + cox 1) using the MODELTEST software v3.0 (Posada and Crandall, 1998). Clade support was assessed by bootstrap resampling with 1,000 MP and ML bootstrap replicates. The BI was performed with MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001), and data from the 2 genes were partitioned. The settings were 2 simulation runs of the Markov chain Monte Carlo (MCMC) for 10 million generations, sampling every 200 generations, a heating parameter value of 0.2, and a "burn-in" of 10%. Trees were drawn using FigTree program v1.3.1 (Rambaut, 2006). An incongruence length difference (ILD) test (Farris et al., 1995) was performed to assess whether the nuclear and mitochondrial datasets warranted combination. This test was implemented in PAUP* 4.0b10 "partition homogeneity test" (Swofford, 2002) with 1,000 ILD replicates, 10 random addition sequences per replicate, and TBR branch swapping.

Previously reported sequences of cox 1 and LSU of *O. tortuosa* were included in the analyses for comparative purposes (García-Varela et al. 2000; García-Varela and Nadler, 2006) (see Table 1). Also, sequences of 2 species, *Moniliformis moniliformis* (Bremser, 1811) Travassos, 1915 and *Oncicola luehei* (Travassos, 1917; Schmidt, 1972), available in the GenBank database, were used as outgroups because they are sister taxa; the first one as a member of the order and *O. luehei* as the sister taxa of *Oligacanthorhynchus* (García-Varela et al., 2000). Finally, the taxonomic identity of hosts, particularly the distinction between *D. marsupialis* and *D. virginiana* in areas where they occur in sympatry, was done by amplifying a fragment (450 nucleotides) of the mitochondrial cytochrome *b* gene using PCR and comparing it with available GenBank sequences. Obtained hosts sequences were deposited in GenBank (see accession numbers in Table 1).

RESULTS

In the current study, DNA fragments of the cox 1 and LSU were amplified and sequenced for 50 individuals of *O. microcephalus* from 8 populations (Table 2). Two additional localities were sampled but no acanthocephalans were recovered at these sites (i.e., Coquimatlán, Colima and San Miguel Soyaltepec, Oaxaca; Table 1, Fig. 1). Aligned datasets included 645 and 754 nucleotides for 50 individuals for cox 1 and LSU, respectively. Phylogenetic analyses of the separate datasets were conducted with MP, ML, and BI. This battery of reconstruction methods yielded some contrasting results, particularly for the analysis of the LSU dataset. Figures 2 and 3 show the comparison of the BI of the separate datasets (LSU and cox 1). Both topologies are similar and congruent in that 3 clades are formed, and relationships are supported by high posterior probability

Table 2. Information about specimens of *Oligacanthorhynchus microcephalus* collected in this study indicating locality, host species (number of acanthocephalans collected), cox 1 and LSU GenBank accession numbers, and catalog number of the National Collection of Helminths (CNHE; Mexico City).

| Locality (abbreviation) | Host species (n) | GenBank accession number Cox 1 LSU | | CNHE catalog number | Clade* |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------|--------|
| Tlacotalpan (TL) | <i>D. virginiana</i> (1) | KM659328 | — | — | (ND)†‡ |
| | <i>D. virginiana</i> (2) | KM659329-330 | — | — | |
| Los Tuxtlas (LT) | <i>D. marsupialis</i> (2) | KM659331-332 | KM659280-281 | — | I |
| | <i>D. marsupialis</i> (1) | — | — | 9186 | |
| Cunduacán (CU) Escárcega (ES) | <i>D. virginiana</i> (1) | KM659333 | KM659282 | — | I |
| | <i>D. virginiana</i> (4) | KM659359-360 | KM659308-309 | 9187 | III |
| | <i>D. virginiana</i> (5) | KM659361-364 | KM659310-313 | 9189 | |
| | <i>D. marsupialis</i> (2) | — | — | 9190 | |
| Mérida (ME) | <i>D. virginiana</i> (17) | KM659365-374 | KM659314-323 | 9191 | III |
| | <i>D. marsupialis</i> (2) | KM659375-376 | KM659324-325 | — | |
| Agua Fria (AF) | <i>D. marsupialis</i> (8) | KM659346-351 | KM659295-300 | 9192 | III |
| | | | | 9193 | |
| | <i>D. virginiana</i> (6) | KM659352-354 | KM659301-303 | 9194 | |
| | | KM659355-358 | KM659304-307 | | |
| Finca Brasil (FB) | <i>P. opossum</i> (5) | | | | I |
| | <i>D. virginiana</i> (3) | KM659334 | KM659294 | 9195 | |
| | | — | — | 9196 | |
| | <i>P. opossum</i> (1) | KM659335 | KM659283 | — | |
| | | KM659336-338 | KM659284, | 9197 | |
| | <i>D. virginiana</i> (1) | | KM659288-289 | 9198 | |
| | <i>D. virginiana</i> (8) | KM659339-343 | KM659285-287, | — | |
| | | | KM659290-291 | | |
| | <i>D. virginiana</i> (8) | KM659344-345 | KM659292-293 | | |
| | <i>D. marsupialis</i> (2) | | | | |
| Rincón de Martínez (RM) | <i>D. virginiana</i> (1) | KM659377 | KM659326 | — | II |
| | <i>D. virginiana</i> (1) | KM659378 | KM659327 | — | |
| Temascal (TE) | <i>D. virginiana</i> (ND) | AF416999 | AY829090 | 4497 | II |

*Clades are determined with respect to phylogenetic analysis through the combined dataset.

†ND, not determined.

‡Clade not determined for specimens from Tlacotalpan, Veracruz, because no sequences of LSU were obtained.

values. However, when LSU was analyzed through MP and ML analyses (trees not shown), *O. microcephalus* was placed as the sister taxa to all the other sequences of *Oligacanthorhynchus* included in this study, with the exception of those from Tlacotalpan, Veracruz. We were unable to obtain sequences of those isolates for this molecular marker. Instead, the topologies of the 3 reconstruction methods using cox

1 dataset yielded the same topology. However, due to the fact that we obtained some differences in topologies between the 2 molecular markers, a combined analysis was conducted. The ILD test provided no indication of incongruence between nuclear and mitochondrial gene ($P = 0.08$), supporting the combined analysis of the 2 gene sequences. The combined dataset had 1,399 nucleotides and consisted

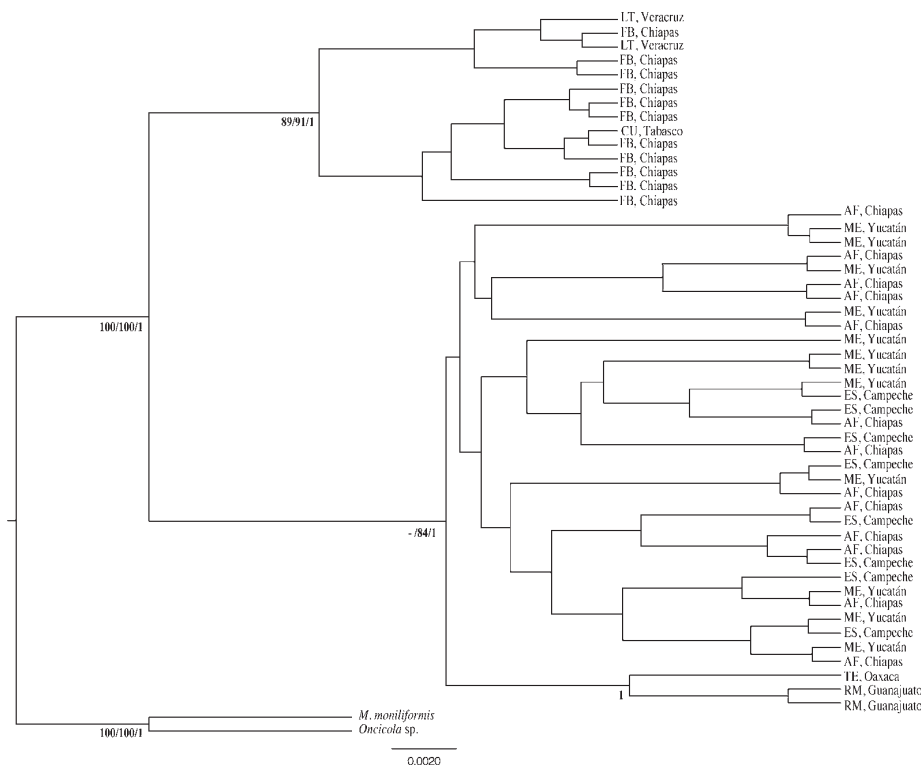


Figure 2. Tree inferred from the large subunit rDNA (LSU) dataset using a Bayesian inference (BI). Numbers near internal nodes show bootstrap support of maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) higher than 60 and posterior probability frequencies higher than 0.6. Clade terminals represent localities where the specimens were collected.

of 50 terminals. Phylogenetic analyses of the combined datasets (LSU + cox 1) were also conducted using 3 reconstruction methods and their topologies were very similar. The BI tree is shown in Figure 4. The tree yielded 3 major clades well supported by bootstrap and posterior probability values: the first one (Clade I) includes samples from the localities of Chiapas (12 specimens), Tabasco (1 specimen), and Veracruz (2 specimens). Clade II includes samples from a particular locality of central Mexico (Guanajuato, 2 specimens) and is nested with the only available sequence of *O. microcephalus* (recorded as *O. tortuosa*) from Temascal, Oaxaca, Mexico. Clade III includes isolates from Chiapas (12 specimens), Yucatán (12 specimens) and Campeche (6 specimens). Intraclade genetic divergence among isolates of *O. microcephalus* is low, with 0.0–0.3%, 0.0–0.7%, and 0.0–0.3% for LSU and 0.8–0.9%, 0.95–0.98%, and 1.1–2.6% for cox 1 for clades I, II and III, respectively. When we compared the level of genetic

divergence between the outgroups and the resulting 3 clades, we found values ranging from 12.1–15.5% for LSU and 29.1–31.8% for cox 1. However, clade I showed the highest differentiation with respect to clades II and III (0.8–1.1% and 1.2–1.5% for LSU, and 22.0–22.9% and 22.0–22.8% for cox 1, respectively) and the differentiation between Clade II and III was considerably lower (0.3–0.4% for LSU, and 12.2–14.4% for cox 1).

The tree topology in Figure 4 shows no particular correlation between Clades I, II, and III and host association or geographical distribution. Clade I is distributed in 2 species of opossum (*D. virginiana* and *D. marsupialis*) across a wide geographic range encompassing states of southeastern Mexico (Chiapas, Tabasco and Veracruz) while Clade II was found in *D. virginiana* in Guanajuato and Oaxaca. Individuals of the more-widely geographically distributed Clade III were found in all 3 species of didelphids across the states of Chiapas, Yucatán, and Campeche.

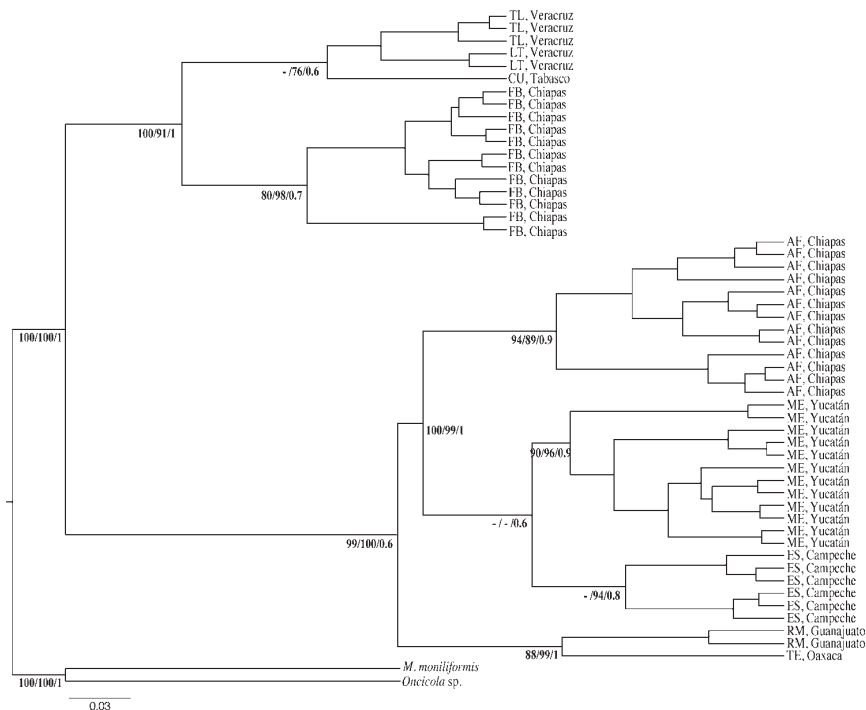


Figure 3. Tree inferred from the *cox1* dataset using a BI. Numbers near internal nodes show bootstrap support of MP and ML higher than 60 and posterior probability frequencies higher than 0.6. Clade terminals represent localities where the specimens were collected.

In order to further corroborate the potential existence of 3 independent evolutionary lineages derived from the genetic data, a morphological study of specimens from the same localities was conducted using both light microscopy and SEM. Measurements of the organisms were obtained for several morphological traits of the trunk and proboscis (Table 3), including the size of the proboscis hooks, following the standard method described by Wayland (2010). Three hooks per row for each of the 6 rows exhibited by members of this genus were measured, and the average hook length per row is presented in Table 3. Meristic data show that specimens allocated into Clade I are smaller than those contained in Clades II and III, but between the latter 2 there are no clear morphological differences. The SEM micrographs confirm this result because a clear difference in the size of the proboscis hooks (even more evident between those of the apical row) can be observed, particularly for those hooks on the apical row that are more robust (Figs. 5–10).

DISCUSSION

Our study follows the approach suggested by authors such as Blouin (2002), Vilas et al. (2005), and Criscione et al. (2005) to prospect for the potential recognition of cryptic species in a parasite such as *O. microcephalus*, which is found in several host species across a wide geographic range. These hosts are New World marsupials that have a wide geographic distribution extending from southern Canada to central Argentina (Cervantes et al., 2010). In fact, the distribution range of the acanthocephalan *O. microcephalus* extends from Brazil northwards to the United States (Richardson et al., 2014). The assumption of this investigation was that *O. microcephalus* represented a single species across its entire geographic range, and the molecular prospecting analysis considered only a rather limited geographic range of this parasite in the Neotropical areas across central and southern Mexico (see García-Prieto et al., 2010; Richardson et al., 2014).

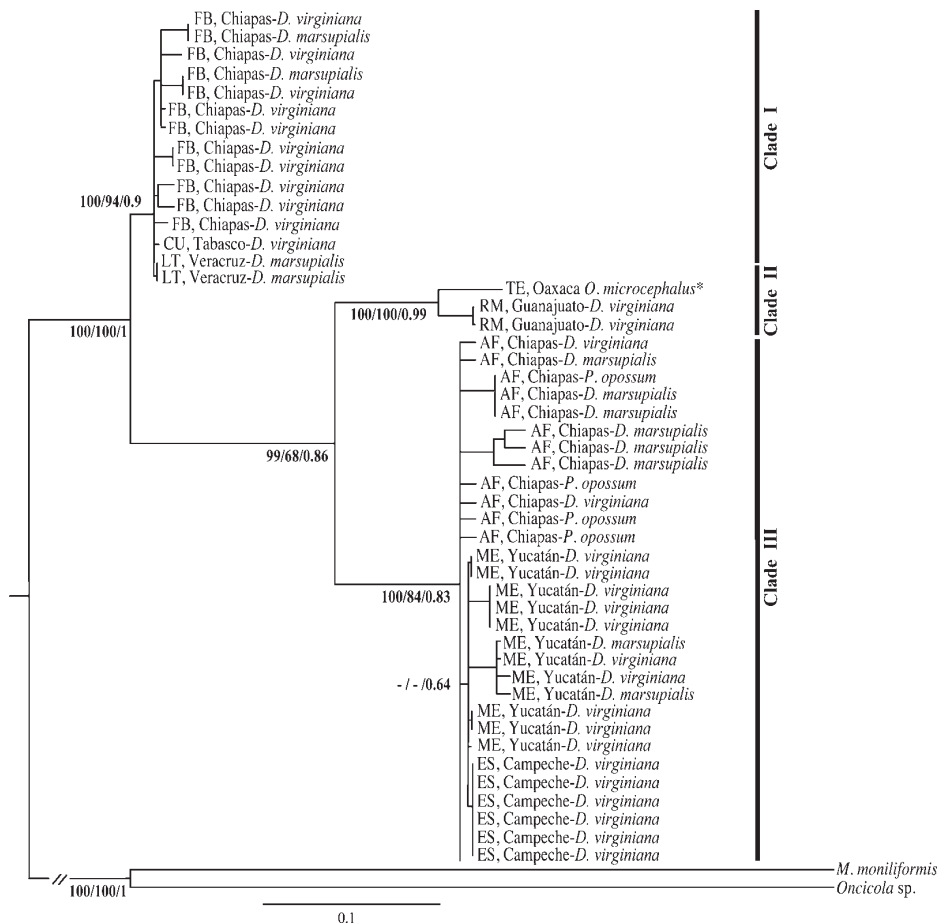


Figure 4. Trees inferred with the combined (LSU + cox 1) dataset, using MP, ML, and BI. Numbers near internal nodes show MP/ML bootstrap support values higher than 60 and posterior probability frequencies higher than 0.6. Clade terminals represent localities and hosts where the specimens were collected.

Our results using the combined phylogenetic analysis of 2 molecular markers show at least 3 potential genetic lineages herein referred to as Clades I, II, and III. This result must be taken with caution because it would be necessary to obtain specimens from across the entire geographic range of the acanthocephalan in order to determine the genetic divergence of the species and to recognize the potential presence of independent lineages or the existence of cryptic species (see Pérez-Ponce de León and Nadler, 2010). In addition, analysis of the LSU gene shows some incongruence regarding the reconstruction methods, indicating that this ribosomal

gene is not as informative as the mitochondrial cox 1 gene in uncovering the potential existence of cryptic species. Such a result is not unexpected, as Blouin (2002) demonstrated the advantages of using a mitochondrial gene for molecular prospecting. The use of another molecular marker would be necessary to further corroborate the findings we present herein. Further, the results of genetic divergence analysis are not fully congruent with the observed morphology, and our morphometric analysis of traits of taxonomic importance, such as the proboscis hooks as well as SEM observations, do not provide sufficient evidence to establish the separation of the 3 clades. Therefore,

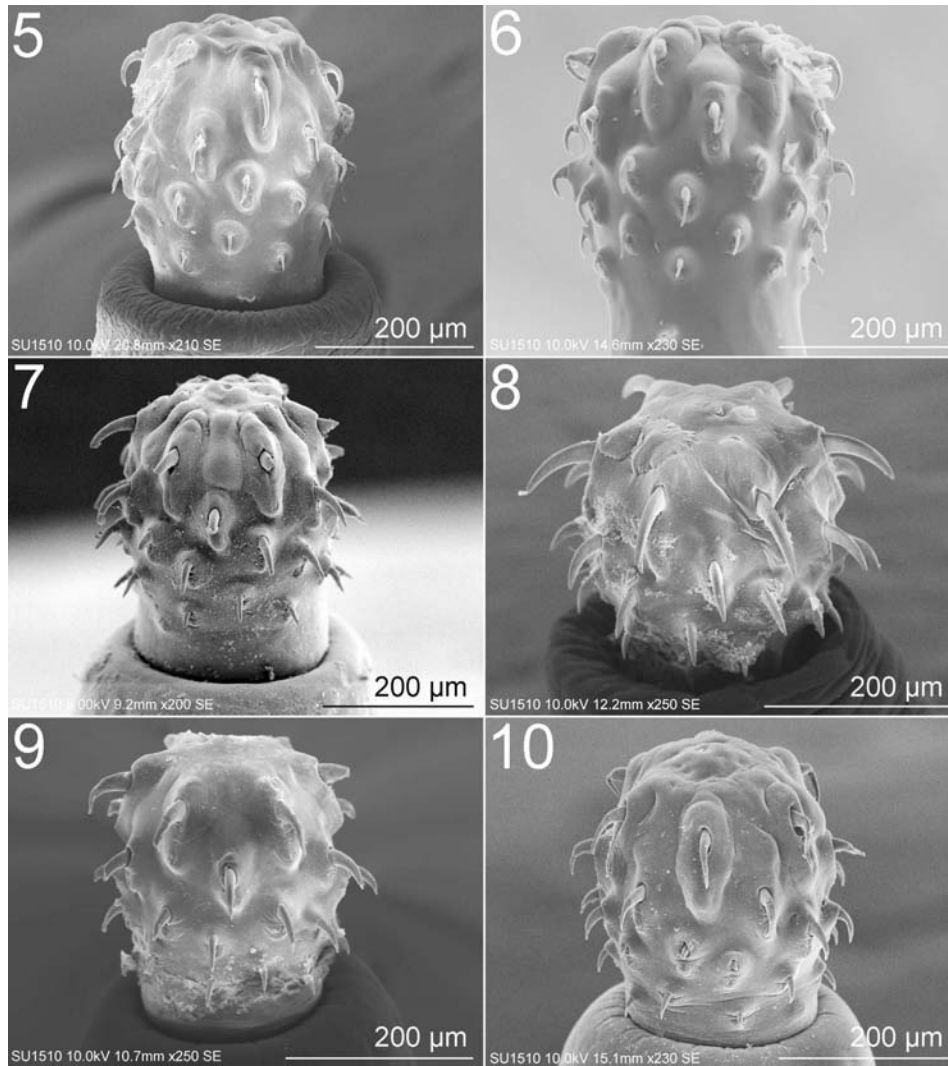
Table 3. Summary of morphometric data for specimens of *Oligacanthorhynchus microcephalus*. All measurements in micrometers (μm) unless otherwise stated.

| Character | Clade I: Veracruz, Tabasco and Chiapas (FB) | Clade II: Guanajuato and Oaxaca | Clade III: Campeche, Yucatán and Chiapas (AF) |
|-----------------------------------|---|---------------------------------------|---|
| Trunk (mm) | | | |
| Length male | 40–65 | — | 101–112 |
| Width male | 2.0–2.5 | — | 2.3–4.8 |
| Length female | 68–84 | — | 102–280 |
| Width female | 2.0–3.5 | — | 6.0–10.0 |
| Proboscis | | | |
| Length | 291–297 | 328 | 321–317 |
| Width | 278–298 | 303 | 261–302 |
| Length of hooks | | | |
| Row 1 | 65–67 | 74 | 73–92 |
| Row 2 | 46–50 | 66 | 52–64 |
| Row 3 | 39–49 | 52 | 46–51 |
| Row 4 | 38–41 | 46 | 37–45 |
| Row 5 | 25–33 | 39 | 30–33 |
| Row 6 | 22–25 | 30 | 25–30 |
| Testes length (mm) | 2.0–4.0 | — | 3.4–5.9 |
| Testes width (mm) | 1.0 | — | 1.3–2.6 |
| Seafftgen's pouch length (mm) | 2.4–3.0 | — | 2.8–4.2 |
| % Trunk occupied by male system | 30–38.2 | — | 29.0–39.9 |
| % Trunk occupied by female system | 1.0–3.0 | — | 1.2–2.5 |

we take the more conservative position and recognize 2 major clades based on the combination of data from both sources of information. The genetic divergence levels of 0.8–1.5% for LSU and 22.0–22.9% for cox 1 between Clade I and the other 2 clades, in addition to differences in the body size and the size of the proboscis hooks, indicates that Clade I might represent a separate species requiring a proper taxonomic description. We have taken as a valid species the record established by García-Varela and Nadler (2006) for *O. microcephalus* from which sequences of LSU and cox 1 were obtained. This sequence nests with that of 2 individuals from *D. virginiana* from Guanajuato in central Mexico and forms Clade II. Clades II and III are closely related and divergence levels between them are very low with respect to LSU (0.3–0.4%) but relatively high for cox 1 (12.2–14.4%). Moreover, they appear to be morphologically indistinguishable based upon our criteria (Figs. 5–10).

We refrain at the moment from formally describing Clade I as a new species until additional supporting evidence is available. An analysis of the genetic divergence of this acanthocephalan across its entire distributional range is clearly needed to test the hypothesis that it is a single species, particularly given that the specimens used by García-Varela and Nadler (2006) to conduct a phylogenetic analysis of

the Phylum Acanthocephala, originally identified as *O. tortuosa*, were taken herein as a bonafide record of *O. microcephalus*. In short, it is necessary to obtain DNA sequences of the same markers from specimens collected from the type host and type locality, as well as from specimens across the entire geographic range, before we would feel confident in designating cryptic species. Moreover, our specimens are morphologically very similar to those presented in the detailed morphological analysis by Richardson et al. (2014), and comparison of our morphometric data with those provided by Richardson et al. (2014, Table 1, p. 55) shows that measurements of morphological traits of specimens belonging to Clades I and III in this study overlap with those reported by these authors (see Table 3). Nevertheless, the genetic divergence data of *O. microcephalus* reported herein allows us to hypothesize that *O. microcephalus* likely represents a species complex consisting of morphologically indistinguishable members across its entire geographic range. Whether or not the genetic groups outlined herein can be defined as independent evolutionary lineages with nonreticulate (phylogenetic) relationships (following a phylogenetic species concept) necessarily requires further testing incorporating a species delimitation uncertainty principle (see Adams, 2002; Nadler, 2002). Clearly,



Figures 5–10. Scanning electron micrographs of the proboscis of adults of *Oligacanthorhynchus microcephalus*. **5.** Cunduacán, Tabasco (*D. virginiana*). **6.** Finca Brasil, Chiapas (*D. virginiana*). **7.** Rincón de Martínez, Guanajuato (*D. virginiana*). **8.** Agua Fría, Chiapas (*D. marsupialis*). **9.** División del Norte, Escárcega, Campeche (*D. marsupialis*). **10.** Mérida, Yucatán (*D. virginiana*).

data from specimens obtained from other geographical areas, in addition to more-detailed morphological information, are required to further corroborate the existence of separate species.

Interestingly, we found no correlation between host or geographic distribution and the clades identified

herein. Worms of each clade parasitize each of the 3 species of didelphids, and their geographic distribution does not follow a particular pattern (Fig. 2). This may be the result of several aspects of the host's natural history, including their dispersal from South to North during the Great American Biotic Interchange (Webb,

1985) about 5.3 to 2.5 million yr ago (Krause and Krause, 2006). Moreover, host feeding habits and home range may also contribute to the lack of host or geographic structure. The species of *Didelphis* studied here are considered opportunistic generalists and successfully inhabit a range of habitats, including those with high levels of anthropogenic perturbation (Sunquist et al., 1987; Adler et al., 1997; Cabello, 2006). Further, the grey four-eyed opossum (*P. opossum*) may travel nomadically, especially when food availability is low (Castro-Arellano et al., 2000). Individuals of each of the 3 species of marsupials are then able to disperse long distances in a short time, and each can change its feeding habits (Sunquist et al., 1987). Virginia opossums (*D. virginiana*) possess the largest dispersal capability and in Mexico show the largest geographical distribution (Cervantes et al., 2010). Its diet varies with the seasons and consists of small animals (insects, earthworms, slugs, snails, crustaceans, and small mammals) as well fruits and berries (Krause and Krause, 2006). Taken as a whole, the distribution patterns, feeding habits, high reproductive rates, and resistance to human impacts result in large population sizes with low genetic differentiation (Cruz-Salazar et al., 2014). The aforementioned arguments, as well as the slow evolution of these marsupials (Jansa and Voss, 2000; Steiner and Catzeflis, 2004), may have contributed to the observed lack of congruence between host, geographical distribution, or both with respect to the lineages of the acanthocephalan *O. microcephalus*. It is thus plausible to suggest that these host traits pose a phylogenetic constraint on their acanthocephalan parasites, and that they might be the reason for the lack of congruence of this host–parasite association, and also that they might be determining the limited morphological differences found in specimens across their entire range. Likewise, it is also possible that the intermediate hosts (millipedes) (Richardson, 2006) impact the morphological conservatism of *O. microcephalus* because it is possible that these arthropods are distributed across the entire geographic range of these acanthocephalans. The hypothesis of morphological conservatism imposed by such host attributes should be further tested by examining other species of helminthes in these New World marsupials.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank David Osorio Sarabia, Karla Acosta Virgen, Samantha Contreras Mirón, Uriel Garduño Montes de Oca, Virginia León Rêgagnon, Luis Jorge García Márquez, and Sergio Guillén Hernández for

their help during fieldwork; and thanks are due to Berenit Mendoza Garfias and Susana Guzmán Gómez for assistance in processing samples for SEM and light microscopy images, respectively. We also thank Alejandro Ocegüera Figueroa and Luis Gacía Prieto (CNHE, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]) for the loan of voucher specimens. Thanks are due to Jélica Arcangeli Álvarez for her assistance in the identification of hosts. J.L.C. wishes to thank to the Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) because this paper is part of the requirements to complete his Ph.D. degree, and to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship granted to accomplish his Ph.D. This project was funded by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) PAPIIT-UNAM IN204514, 220113, and 207213 to G.P.P.L., R.M.L., and M.G.V., respectively.

LITERATURE CITED

- Adams, B. J. 2002. The species delimitation uncertainty principle. *Journal of Nematology* 33:153–160.
- Adler, G. H., J. J. Arboledo, and B. L. Travi. 1997. Population dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 32:7–11.
- Amin, O. M. 2013. Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitologica* 60:273–305.
- Blouin, M. S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology* 32:527–531.
- Cabello, D. R. 2006. Reproduction of *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in the Venezuelan Andes. *Acta Theriologica* 51:427–433.
- Castro-Arellano, I., H. Zarza, and R. Medellín. 2000. *Philander opossum*. *Mammalian species* 638:1–8.
- Cervantes, F. A., J. Arcangeli, Y. Hortelano-Moncada, and A. V. Borisenko. 2010. DNA barcodes effectively identify the morphologically similar common opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. *Mitochondrial DNA* 21:44–50.
- Criscione, C. D., R. Poulin, and M. S. Blouin. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* 14:2247–2257.
- Cruz-Salazar, B., L. Ruiz-Montoya, D. Navarrete-Gutiérrez, E. E. Espinoza-Medinilla, E. Vázquez-Domínguez, and L. Bernardo-Vázquez. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85:251–261.
- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse,

- S. Markowitz, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer, A. Wilson. 2010. Geneious v5.0.4. <http://www.geneious.com/>
- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge, and C. Bult. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315–319.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for the amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294–299.
- García-Prieto, L., M. García-Varela, B. Mendoza-Garcías, and G. Pérez-Ponce de León. 2010. Checklist of the Acanthocephala in wildlife vertebrates of Mexico. *Zootaxa* 2419:1–50.
- García-Varela, M., and S. A. Nadler. 2006. Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:61–72.
- García-Varela, M., G. Pérez-Ponce de León, P. de la Torre, M. M. P. Cummings, S. Sarma, and J. P. Laclette. 2000. Phylogenetic relationships of Acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution* 50:532–540.
- Gazi, M., T. Sultana, G. S. Min, Y. C. Park, M. García-Varela, S. Nadler, and J. K. Park. 2012. The complete mitochondrial genome sequence of *Oncicola luehei* (Archiacanthocephala: Acanthocephala) and its phylogenetic information within the Syndermata. *Parasitology International*. 61:307–316.
- Goloboff, P. A., J. S. Farris, and K. C. Nixon. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774–786.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Jansa, S. A., and R. S. Voss. 2000. Phylogenetic studies on didelphid marsupials I. Introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 7:43–77.
- Krause, W. J., and W. A. Krause. 2006. The Opossum: Its Amazing Story. Missouri University Press, Columbia, Missouri. 88 pp.
- Maddison, D. R., and W. P. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis v2.75. <http://mesquiteproject.org>
- Nadler, S. A. 2002. Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. *Nematology* 4:615–625.
- Nadler, S. A., and G. Pérez Ponce de León. 2011. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology* 138:1688–1709.
- Nickol, B. B. 1985. Epizootiology. Pages 307–346 in D. W. T. Crompton and B. B. Nickol, eds. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, London.
- Pan, T. S., and P. Nie. 2013. The complete mitochondrial genome of *Pallisentis celatus* (Acanthocephala) with phylogenetic analysis of acanthocephalans and rotifers. *Folia Parasitologica* 60:181–191.
- Pérez Ponce de León, G., and S. A. Nadler. 2010. What we don't recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species. *Journal of Parasitology* 96:453–464.
- Posada, D., and K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 9:817–818.
- Rambaut, A. 2006. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, U.K.
- Richardson, D. J. 2006. Life cycle of *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Oligacanthorhynchidae), an acanthocephalan of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Comparative Parasitology* 73:1–6.
- Richardson, D. J., S. L. Gardner, and J. W. Allen Jr. 2014. Redescription of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt 1972 (syn. *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Leidy, 1850) Schmidt 1972) (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae). *Comparative Parasitology* 81:53–60.
- Schmidt, G. D. 1972. Revision of the class Archiacanthocephala Meyer, 1931 (Phylum Acanthocephala), with emphasis on Oligacanthorhynchidae Southwell and Macfie, 1925. *Journal of Parasitology* 58:290–297.
- Stamatakis, A. 2006. Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–90.
- Steinauer, M. L., B. B. Nickol, R. Broughton, and G. Orti. 2005. First sequenced mitochondrial genome from the phylum Acanthocephala (*Leptorhynchoides thecatus*) and its phylogenetic position within Metazoa. *Journal of Molecular Evolution* 60:706–715.
- Steiner, C., and F. M. Catzefflis. 2004. Genetic variation and geographical structure of five mouse-sized opossums (Marsupialia, Didelphidae) throughout the Guiana Region. *Journal of Biogeography* 31:959–973.
- Sunquist, M. E., S. N. Austad, and F. Sunquist. 1987. Movement patterns and home range in the common opossum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy* 68:173–176.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J., D. Higgins, and T. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680.
- Travassos, L. M. 1915. Revisão dos acantocéfalos Acanthocephalos Brasileiros. II. Família Echinorhynchidae Hamann, 1892. *Brazil Medico* 48:377.
- Vilas, R., C. D., Criscione, and Blouin, M. S. 2005. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of plathyhelminth parasites. *Parasitology* 131:1–8.
- Wayland, M. T. 2010. Proboscis profiler: a tool for detecting acanthocephalan morphotypes. *Systematics Parasitology* 73:159–167.
- Webb, D. S. 1985. Late Cenozoic mammal dispersals between the Americas. Pages 357–382 in F. Stehli and D. S. Webb, eds. *The Great American Interchange*. Plenum Press, New York.
- Yamaguti, S. 1963. Acanthocephala. Pages 1–423 in *Systema Helminthum*. Wiley Interscience Press, New York.

CAPÍTULO 3

Delimitación de especies en *Rhopalias coronatus* (Digenea: Rhopalidae) y *Turgida turgida*
(Nematoda: Physalopteridae) de marsupiales de México.

Manuscrito en extenso para ser sometido para su publicación en la revista *Parasitology Research*

Delimitación de especies en *Rhopalias coronatus* (Digenea: Rhopalidae) y *Turgida turgida* (Nematoda: Physalopteridae) de marsupiales de México

Resumen

En el presente estudio se analizaron secuencias de marcadores moleculares para probar la hipótesis de que el digeneo *Rhopalias coronatus* (Rudolphi, 1819) Stiles y Hassall, 1898, y el nematodo *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819), parásitos típicos de diversas especies de marsupiales (Didelphidae), representan especies únicas ampliamente distribuidas en México. Asimismo, a partir de la identificación de posibles linajes en cada una de las especies estudiadas, evaluar la existencia de correspondencia filogenética o geográfica con respecto a sus hospederos. De agosto de 2011 a agosto de 2014, ejemplares adultos de *Rhopalias coronatus* y *Turgida turgida* fueron obtenidos del intestino y estomago, respectivamente, de tres especies de tlacuaches (*Didelphis marsupialis*, *D. virginiana* y *Philander opossum*). Una muestra de cada especie de helminto fue procesada para su estudio molecular. Para el digeneo *Rhopalias coronatus* se obtuvieron 106 secuencias parciales del marcador mitocondrial *cox 1* y una submuestra de 29 individuos para la región de los ITSs (ITS1-5.8S-ITS2), de ocho localidades. Por su parte, para el nematodo *Turgida turgida* se obtuvieron 107 de *cox 1* y 22 del 18S rRNA de 14 localidades. Se realizaron análisis filogenéticos (MP, MV e IB) para genes independientes y matrices de datos conjuntas para cada una de las especies. Adicionalmente, para cada marcador molecular se calcularon distancias genéticas (no corregidas) dentro y entre las poblaciones. Finalmente, a partir de las secuencias mitocondriales, se construyeron redes de haplotipos para ambas especies. Los resultados obtenidos evidencian que cada una de estas especies (*R. coronatus* y *T. turgida*), están conformadas por dos linajes genéticamente bien diferenciados y

que ninguno de los linajes identificados en ambas especies se asocian con una especie en particular de hospedero. Sin embargo, cada uno de los linajes identificados muestran una correspondencia de distribución geográfica con sus particularidades.

Palabras clave: Análisis filogenéticos, cox 1, ITS, Didelphidae, divergencia genética, prospección molecular, red de haplotipos.

Introducción

El trematodo *Rhopalias coronatus* y el nematodo *Turgida turgida* son helmintos parásitos típicos de intestino y estómago, respectivamente, de diversas especies de marsupiales de la familia Didelphidae. Ambas especies se encuentran distribuidas en la mayor parte del Continente Americano, desde la región Neotropical (Navone y Suriano 1992; Rodríguez-Ortíz et al. 2004; Monet-Mendoza et al. 2005; Haverkost y Gardner 2008; Humberg et al. 2011; García-Prieto et al. 2012; Acosta-Virgen et al. 2015), hasta la región Neártica (Gray y Anderson 1982; Matey et al. 2001; Nichelason et al. 2008; García-Prieto et al. 2012), por lo que ambas especies podrían ser consideradas parte de la helmintofauna principal (*core fauna*) (*sensu* Pérez-Ponce de León y Choudhuri 2005) de esta familia de mamíferos.

Estas dos especies han sido registrados en tres de las siete especies de marsupiales que ocurren en México (*D. marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*), las cuales se encuentran ampliamente distribuidas, mostrando áreas de simpatría, por lo que comparten una gran cantidad de hábitats y recursos alimenticios (Ceballos y Oliva 2005). La determinación taxonómica de estas especies se ha basado exclusivamente en la observación de caracteres morfológicos (Caballero 1937, 1951, 1958; Caballero et al. 1944; Monsiváis-Aguilar 1958; Gutiérrez-Fuster 1966; Miyazaki y Ishii 1968; Lamothe-Argumedo 1978; Miyazaki et al. 1980; Lamothe-Argumedo et al. 1985; Prado-Ancona 1993; Cañeda-Guzman 1997; Monet-Mendoza et al. 2005).

A pesar del gran número de registros que existen para estas dos especies de helmintos en México, hasta la fecha no se cuenta con estudios que evidencien que estas entidades biológicas - consideradas tradicionalmente como una misma especie-, con rangos amplios de distribución geográfico y de hospederos, estén conformadas por dos o más linajes, o bien, que se traten de especies crípticas (Blouin 2002; Miura et al. 2005; Blasco-Costa et al. 2010). En este sentido, en las últimas dos décadas, la aplicación de herramientas moleculares en el campo de la Sistemática ha permitido evaluar los arreglos taxonómicos previos de los organismos parásitos. Asimismo, con el análisis de datos moleculares se han logrado realizar trabajos con un enfoque de prospección molecular en especies de helmintos que parasitan diversos grupos de hospederos a través de un rango geográfico amplio, resultando en el descubrimiento de complejos de especies y/o de especies crípticas (Blouin 2002; Criscione et al. 2005; Vilas et al. 2005). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el presente trabajo pretende, mediante el análisis de información genética de dos especies de helmintos que parasitan a tres especies de tlacuaches en México: *i*) evidenciar posibles linajes de lo que se considera una sola especie tanto de *R. coronatus* como de *T. turgida* y, *ii*) a partir de la potencial existencia de linajes, identificar si existe o no, correspondencia filogenética o geográfica de éstos con respecto a sus hospederos.

Materiales y métodos

Colecta de mamíferos

De agosto de 2011 a agosto de 2014, un total de 68 marsupiales fueron capturados y examinados (20 *D. marsupialis*, 33 *D. virginiana* y 15 *P. opossum*), en diferentes localidades de México (Fig. 1; Tabla 1). El método de captura fue mediante la utilización de trampas tipo Tomahawk, bajo el número de permiso de colecta científica FAUT 0057 expedido por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) a GPPL. Los tlacuaches fueron sacrificados

mediante sobredosis de anestésico. Posteriormente se disectaron y todos los órganos fueron revisados bajo un microscopio estereoscópico mediante procedimientos estandarizados (Lamothe-Argumedo 1997).

Revisión parasitológica

Los gusanos fueron removidos de su microhábitat y colocados en cajas de Petri con solución salina al 0.85% durante 3–5 min.. Una muestra de cada taxón fue procesada para estudios morfológicos con el objetivo de identificarlos taxonómicamente. Para ello, ejemplares adultos de *R. coronatus* y *T. turgida* fueron fijados por inmersión en formol al 4% caliente y preservados en viales con alcohol al 70%. Para el estudio molecular, algunos ejemplares fueron lavados con la misma solución salina, preservados en alcohol absoluto y almacenados a -20 °C. Para la identificación taxonómica, ejemplares de *R. coronatus* fueron teñidos con Paracarmín de Meyer o tricromica de Gomori, deshidratados con concentraciones ascendentes de alcohol (70%, 80%, 90% [dos veces], 100%), aclarados con salicilato de metilo, y montados en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá (Lamothe-Argumedo 1997). Por otra parte, los nematodos fueron aclarados con lactofenol de Amman, y montados en preparaciones temporales. Las determinaciones taxonómicas de *Rhopalias coronatus* y *Turgida turgida* se realizaron con la ayuda de literatura especializada (Harverkost y Gardner 2008 y Gibbons 2010), respectivamente. Todo el material destinado al estudio morfológico fue depositado en la Colección Nacional de Helminths (CNHE), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (ver números de acceso en Tabla 1).

Extracción, amplificación y secuenciación de DNA

Para el trabajo de biología molecular, 106 ejemplares de *Rhopalias coronatus* y 107 de *Turgida turgida* de ocho y 14 localidades, respectivamente, fueron colocados de manera individual en

tubos para su digestión durante 12 hr a 56 °C con solución de digestión, conteniendo 10 µl de 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 µl de 20 mM NaCl, 20 µl de 100 mM Na₂ EDTA (pH 8.0), 10 µl de Sarkosyl al 1%, 1 µl de proteinasa K (0.1 mg/ml), y el resto de volumen de agua destilada. Todas las soluciones de digestión fueron llevadas a un volumen final de 100 µl. Posteriormente, se extrajo el DNA mediante la utilización del reactivo DNAzol (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Secuencias nucleotídicas mitocondriales de la citocromo *c* subunidad 1 (cox 1) y de la región nuclear de los ITSs (ITS1–5.8S–ITS2) fueron amplificadas para *R. coronatus*, así como secuencias de la cox 1 y de la subunidad ribosomal menor (18S) se amplificaron para *T. turgida*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores mencionados en la Tabla 2. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl [2.5 µl de buffer para PCR a 10x, 2.5 µl de dNTPs a 10 mM, 1.25 µl de MgCl₂ (50 mM), 1.0 µl de cada iniciador (10 pmol), 1 µl DNA molde, y 1 U de Taq DNA polimerasa 500 U (5 U/µl) Biogenica, México; y el resto del volumen de agua destilada estéril. Los programas de amplificación para la cox 1 consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida por 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, una temperatura de alineamiento a 50 °C durante 1 min para *R. coronatus*, y 47 °C durante 45 s para *T. turgida*, y una extensión a 72 °C durante 1 min, seguida por una elongación final a 72 °C durante 10 min. El programa de PCR para la región de los ITSs consistió de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida por 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, una temperatura de alineamiento a 53 °C durante 1 min, y una extensión a 72 °C durante 1 min, seguida por una elongación final a 72 °C durante 10 min. Finalmente, los parámetros de PCR para el marcador 18S incluye una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguida por 40 ciclos a 94 °C durante 30 s, una temperatura de alineamiento a 60 °C durante 30 s, y una

extensión a 72 °C durante 80 s, seguida por una elongación final a 72 °C durante 6 min. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambos sentidos utilizando los iniciadores mencionados en la Tabla 2, en el centro de secuenciación High-Throughput Genomics Unit de la Universidad de Washington, EUA (<http://www.htseq.org./index.html>). Las secuencias sentido y anti sentido fueron editadas y ensambladas manualmente usando la plataforma Geneious Pro v5.1.7 (Drummond et al. 2010). Todas las secuencias consenso fueron depositadas en Genbank (ver números de acceso en Tabla 1).

Alineamiento de secuencias, análisis filogenéticos y distancias genéticas

Para cada una de las especies de helmintos analizadas en el presente trabajo se obtuvieron secuencias parciales de los siguientes marcadores: *cox 1* e ITSs (ITS1-5.8S-ITS2) (*Rhopalias coronatus*) de siete localidades, y *cox 1* y 18S (*Turgida turgida*) de 14 localidades (Figura 1). Los alineamientos de cada uno de los marcadores moleculares consistieron de 666 pares de bases (pb) para *cox 1* con 117 terminales (106 para *R. coronatus* y siete representando el GE, dentro de las que se encuentran cuatro secuencias de otra especie del género *Rhopalias*); y de 1093 pb para los ITSs con 32 terminales (29 para *R. coronatus* y tres taxones representando el GE). En el caso de *T. turgida*, el alineamiento de *cox 1* con 393 pb incluyó 108 terminales (107 de *T. turgida* y una del GE), y el del gen 18S contó con 1591 pb para 22 terminales (21 de *T. turgida*, más una del GE). Un tercer alineamiento fue construido para cada especie de helminto, combinando ambas matrices, la cuales estuvieron constituidas de la siguiente manera: ITSs + *cox 1*, con 32 terminales y 1759 pb, para el caso *R. coronatus*, y 18S + *cox 1*, con 23 terminales por 1984 pb, para *T. turgida*.

Las secuencias obtenidas de cada uno de los marcadores fueron alineadas por separado utilizando el programa Clustal W2 (Thompson et al. 1994), con un ajuste final de manera manual

en el programa Mesquite v2.75 (Maddison y Maddison 2011). Para descartar la presencia de pseudogenes en el ADN mitocondrial, las matrices del marcador *cox 1* tanto de *R. coronatus* como de *T. turgida* fueron traducidas a aminoácidos utilizando el código genético mitocondrial para trematodos e invertebrados, respectivamente en el programa MEGA v6.06 (Tamura et al. 2013). Se utilizaron tres métodos de inferencia para resolver las relaciones filogenéticas: análisis de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) e inferencia Bayesiana (IB), para cada una de las matrices de datos, así como para matrices concatenadas (ITSs + *cox 1* y 18S + *cox 1*), para *R. coronatus* y *T. turgida*, respectivamente. Los análisis de MP se realizaron en el programa TNT (Goloboff et al. 2008). Para cada matriz, el análisis de MP se realizó a través de una búsqueda heurística (1,000 réplicas con adición de taxa al azar y permutación de ramas por TBR). Los gaps fueron tratados como datos faltantes. Los análisis de MV se llevaron a cabo en el programa RAxML v7.0.4 (Stamatakis 2006). Previó a estos análisis, se evaluó el mejor modelo de evolución molecular a utilizar en la reconstrucción filogenética. Dichas evaluaciones se realizaron con el programa jModelTest v3.07 (Posada y Crandall 2008), eligiendo el criterio de información de Akaike (AIC; Huelsenbeck y Crandall 1997). Los modelos seleccionados para las matrices de *R. coronatus* fueron el TVM + I + G y TPMuf + G, para *cox 1* e ITSs, respectivamente. Por su parte, para las matrices de *T. turgida*, los modelos evolutivos resultantes fueron TIM2 + I + G para *cox 1* y GTR para el 18S. El apoyo de clados para MP y MV fueron evaluados mediante el remuestreo de 1,000 replicas de bootstrap. Los análisis de IB se realizaron con el programa MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001). Las cadenas de Markov se corrieron por 10,000,000 de generaciones y muestreando los árboles cada 200 generaciones. La fase estacionaria se determinó de forma visual y posteriormente se descartó el porcentaje de “burn-in” (25%). Los árboles fueron dibujados utilizando el programa FigTree v1.3.1 (Rambaut

2006). Se obtuvieron secuencias de la base de datos GeneBank de miembros de la superfamilia Echinostomatoidea, así como de la especie de nematodo *Loa loa*, para ser utilizadas como grupos externos (GE) en los análisis filogenéticos de *Rhopalias coronatus* y *Turgida turgida*, respectivamente. Finalmente, para cada uno de los marcadores moleculares se calcularon las distancias genéticas no corregidas (distancias-*p*) con el programa MEGA v6.06 (Tamura et al. 2013).

Construcción de redes de haplotipos

A partir de las matrices moleculares del gen *cox 1*, tanto de *R. coronatus* como de *T. turgida*, se construyeron redes de haplotipos con base en el límite del >95% de parsimonia con la finalidad de ilustrar todas las conexiones entre los haplotipos (Templeton et al. 1992). Dichas redes se construyeron mediante la utilización del programa TCS v1.21 (Clement et al. 2000).

Resultados

Análisis filogenéticos y distancias genéticas

Rhopalias coronatus

Los análisis filogenéticos realizados mediante MP, MV e IB, del gen mitocondrial arrojaron topologías congruentes (árboles no mostrados). Las topologías muestran dos grandes clados (Clado I y Clado II) los cuales se encuentran conformados por seis localidades (LT, Los Tuxtlas, Veracruz; TL, Tlacotalpan, Veracruz; CU, Cunduacán, Tabasco; TE, Teapa, Tabasco; AF, Agua Fría, Chiapas y SO, Soyaltepec, Oaxaca) y una (TZ, Tzucacab, Yucatán), respectivamente. Una octava localidad (FB, Finca Brasil, Chiapas) fue positiva a este trematodo, sin embargo, mediante la determinación morfológica y posteriormente genética, resultó ser la especie *Rhopalias macracanthus*, la cual se incluyó en los presentes análisis filogenéticos. Por su parte, el análisis de la región de los ITSs, muestran una politomía. En cuanto al análisis concatenado

(ITSs + cox 1) también fue analizado mediante los tres métodos de inferencia filogenética y sus topologías fueron muy similares entre sí y obtienen las mismas relaciones a las obtenidas mediante el marcador cox 1. El árbol consenso construido mediante IB se muestra en la figura 2. Dentro de la especie *Rhopalias coronatus*, el árbol muestra dos grandes clados bien apoyados por valores de bootstrap y probabilidades posteriores. Ambos clados están conformados por las mismas localidades mostradas por el marcador cox 1.

Por su parte, las distancias genéticas intraclado fueron bajas. El Clado I con 0.0–1.0% y 0.0% para cox 1 e ITSs, respectivamente. Por su parte, para el Clado II no existió divergencia para ambos marcadores. Las distancias genéticas interclados son altas para cox 1, con 7.0–8.0%; sin embargo, para los ITSs la distancia genética observada es nula. Al comparar los porcentajes de distancias genéticas de los Clados I y II con respecto a la especie *Rhopalias macracanthus*, éstos son muy similares para cox 1 (17–18% y 16–17%), respectivamente, y del 7.0% para la región de los ITSs, en ambos clados. Las distancias genéticas observadas de los Clados I y II con respecto al GE también son muy similares (20.0–21.0% y 22.0% para cox 1), respectivamente, y 14.0% para los ITSs en ambos clados (Tabla 3).

El análisis de red de haplotipos de cox 1 para *Rhopalias coronatus* estuvo conformada con 106 secuencias y 666 pb cada una. En total, se detectaron 29 haplotipos separados en dos grupos: el grupo I con 28 haplotipos/98 secuencias de cinco localidades (4/26 de LT, Los Tuxtlas, Veracruz; 8/16 de TL, Tlacotalpan, Veracruz; 1/2 de CU, Cunduacán, Tabasco; 1/1 de TE, Teapa, Tabasco; 9/36 de AF, Agua Fría, Chiapas y 5/17 de SO, Soyaltepec, Oaxaca). El grupo II contiene un haplotipo único de una sola localidad (1/8 de TZ, Tzucacab, Yucatán), el cual se separa del grupo I por 49 sustituciones, correspondiendo al 7.3% del total del alineamiento (6, 1 y 42 en primeras, segundas y terceras posiciones), respectivamente (Fig. 3).

Turgida turgida

De igual forma, las matrices de datos de la cox 1 y 18S de la especie *T. turgida* fueron evaluados mediante los tres métodos de inferencia filogenética. Para el primer marcador, las topologías fueron congruentes en los tres casos (árboles no mostrados). La topología recuperó tres clados, el primero de éstos se encuentra integrado por nueve de las 14 localidades positivas a este nematodo (LT, Los Tuxtlas, Veracruz; TL, Tlacotalpan, Veracruz; SO, Soyaltepec, Oaxaca; FB, Finca Brasil, Chiapas; AF, Agua Fría, Chiapas; CO, Colima, Colima; COA, Coapan, Puebla; TEP, Tepoztlán, Morelos; y RM, Rincón de Martínez, Guanajuato). El segundo grupo estuvo constituido por dos localidades de la Península de Yucatán (TZ, Tzucabab, Yucatán y ME, Mérida, Yucatán). En el tercer clado se anidaron las muestras de tres localidades (CU, Cunduacán, Tabasco; TE, Teapa, Tabasco y ES, Escárcega, Campeche). Estos dos últimos clados más relacionados filogenéticamente entre sí, que con respecto al primer clado. En cuanto a los análisis del 18S, los tres métodos de inferencia mostraron muy baja resolución. No obstante, en los análisis probabilísticos se obtuvieron longitudes de rama más largas para las muestras TE, Teapa, Tabasco y ES, Escárcega, Campeche. El análisis conjunto de las matrices (18S + cox 1) arrojaron la misma topología en los tres métodos. El árbol obtenido mediante IB se muestra en la figura 4, con valores de bootstrap y probabilidades posteriores y muestra las topologías obtenidas por los tres métodos. El árbol arrojó cuatro grandes clados, la mayoría de ellos bien soportados: el Clado I incluye muestras de tres localidades (CO, Colima, Colima; RM, Rincón de Martínez, Guanajuato y TEP, Tepoztlán, Morelos). El Clado II está conformado por cuatro localidades (TL, Tlacotalpan, Veracruz; SO, Soyaltepec, Oaxaca; FB, Finca Brasil, Chiapas y AF, Agua Fría, Chiapas). El Clado III está constituido por una sola localidad (ME, Mérida, Yucatán).

Mientras que en el cuarto clado (Clado IV) se encuentran muestras de Tabasco (TE, Teapa, Tabasco) y Campeche (ES, Escárcega, Campeche).

Las distancias genéticas intraclado para *cox 1* fueron bajas, con 0.0–1.0%, 0.0–2.0% y 0.0–1.0% para los Clados I, II y III, respectivamente. El Clado IV fue el que mostró mayor variación para este marcador (0.0–4.0%). Con respecto al marcador 18S, los cuatro clados no mostraron variación genética. Las distancias genéticas interclados para el marcador *cox 1*, resultaron ser bajas entre los Clados I, II y III, con 1.0–3.0%. En cambio, el Clado IV fue el que mostró mayor divergencia genética para este marcador con respecto a los Clados I, II y III (7.0–10.0%). Por su parte, el marcador molecular 18S no presentó variación genética entre los cuatro clados. Al comparar los porcentajes de distancias genéticas observadas del GI con respecto al GE (*Loa loa*) los porcentajes fueron del 17–18% y 3.0% para *cox 1* y 18S, respectivamente (Tabla 4).

La red de haplotipos de *cox 1* para *Turgida turgida* estuvo conformada con 97 secuencias por 393 pb cada una. En total, se detectaron 44 haplotipos, separados en dos grupos. El grupo I con 32 haplotipos/77 secuencias distribuidos en diez localidades (1/3 de TL, Tlacotalpan, Veracruz; 1/2 de LT, Los Tuxtlas, Veracruz; 1/9 de FB, Finca Brasil, Chiapas; 1/3 de COA, Coapan, Puebla; 2/5 de SO, Soyaltepec, Oaxaca; 2/6 de TEP, Tepoztlán, Morelos; 4/9 de RM, Rincón de Martínez, Guanajuato; 4/6 de ME, Mérida, Yucatán; 7/21 de AF, Agua Fría, Chiapas y 9/13 de CO, Coquimatlán, Colima. El grupo II esta conformado por tres localidades (4/6 de CU, Cunduacán, Tabasco; 1/2 de TE, Teapa, Tabasco y por último, 7/10 de ES, Escárcega, Campeche). Este segundo grupo se encuentra separado del primero por 21 sustituciones nucleotídicas, correspondiendo al 5.3% del total del alineamiento (una sustitución en la primera posición y el resto en terceras posiciones) (Fig. 4).

Discusión

Delimitación de especies mediante el uso de caracteres moleculares

Actualmente, el uso masivo de herramientas moleculares ha permitido la exploración de información genética de los organismos de manera general y de los parásitos particularmente, así como el desarrollo de estrategias metodológicas hacia la delimitación de especies (Carstens et al. 2013). La evaluación de caracteres moleculares inicialmente determina la variación genética existente entre individuos y poblaciones, la cual es analizada mediante métodos más objetivos basados en secuencias de ADN, lo cual deriva en el establecimiento de criterios más robustos en la delimitación de especies y consecuentemente, proporciona las bases para entender la influencia de los hospederos por una parte, y por otra la influencia de la distribución geográfica sobre los mecanismos de especiación de los parásitos (Morrison 2006; Poulin et al. 2011a, 2011b).

En este trabajo se realizó una prospección molecular en especies de helmintos que parasitan a diversas especies de hospederos a través de un rango geográfico amplio, con el objetivo de descubrir potenciales especies (Blouin 2002; Criscione et al. 2005; Vilas et al. 2005). En este sentido, los resultados de la inferencia filogenética del digeneo *R. coronatus* obtenidos mediante el análisis conjunto de ITSs + cox 1 muestran consistentemente dos linajes (referidos como Clado I y Clado II), los cuales tienen valores de apoyo de ramas altos (Fig. 2). El gen ribosomal mostró una baja resolución, en comparación con lo que se obtuvo del gen mitocondrial. Esto puede ser explicado por la baja tasa de evolución en este gen (p. ej. sustituciones nucleotídicas) y concuerda con lo mencionado por varios autores (Blouin 2002; Vilas et al. 2005), quienes mencionan las ventajas de utilizar genes mitocondriales en estudios de prospección molecular. Por otra parte, los valores de divergencia genética del gen cox 1,

calculados para estos dos clados fueron relativamente altos (7–8%), lo que sustenta la existencia de dos linajes. Las divergencias genéticas entre los dos clados son comparables con las referidas en trabajos previos de taxa que están dentro de la Superfamilia Echinostomatoidea, donde se encuentra la Familia Rhopalidae; por ejemplo, entre *Echinostoma malayanum* y *E. revolutum* con una diferencia del 8–16% (Saijuntha et al. 2011). En este contexto, diversos autores mencionan que la variación en genes mitocondriales mayor al 5.0% entre individuos de una especie de platelminto podría indicar la existencia de dos o más entidades biológicas debido a que es poco probable que altos niveles de divergencia se observen entre individuos de una población (Blouin 2002; Vilas et al. 2005). Sin embargo, también existen críticas sobre la utilización de este valor “genetic yardstick” para discriminar entre especies (Nadler y Pérez-Ponce de León 2011). No obstante, los valores de las distancias genéticas calculadas para estos dos clados están sustentados por análisis filogenéticos que ponen a prueba la hipótesis nula de que se trata de una sola especie, como lo recomiendan ciertos autores, habiendo encontrado que esos dos clados son monofíleticamente recíprocos (Adams 2002; Nadler 2002; Sites y Marshall 2003). Asimismo, la red de haplotipos permitió identificar dos grandes grupos separados por 49 sustituciones nucleotídicas, correspondiendo con las evidencias filogenéticas y divergencias genéticas mencionadas anteriormente. Recientemente, Razo-Mendivil et al. (2015) utilizaron este método como herramienta para explorar la existencia de un complejo de especies crípticas en un trematodo parásito de peces dulceacuícolas, identificando tres grandes grupos. El grupo 1 separado del grupo 2 y 3 por 73 sustituciones nucleotídicas, mientras que estos dos últimos grupos se encontraron separados por 50 sustituciones. Estos valores de cambios nucleotídicos son similares a los obtenidos entre los grupos de *R. coronatus*, lo cual apoya la evidencia de que esta especie esta conformada por dos linajes genéticamente bien diferenciados.

Por su parte, los resultados obtenidos de la inferencia filogenética del nematodo *T. turgida* mediante la evaluación conjunta de 18S + cox 1, mostraron cuatro grupos referidos como Clado I – Clado IV. Sin embargo, al considerar los valores de distancias genéticas de cox 1, se evidenció que los Clados I, II y III distan tan solo entre 1–3%, mientras que el Clado IV con respecto a los anteriores, es el que muestra mayor variación genética (7–10%). De acuerdo con diversos autores (p. ej. Blouin et al. 1998; Blouin 2002), se han citado valores de variación genética en este marcador del 2–6% entre nematodos de la misma especie y valores superiores al 10% para individuos de distintas especies estrechamente relacionadas filogenéticamente. Con base en lo anterior, se consideró que los Clados I, II y III realmente conforman una sola entidad biológica, diferente al cuarto linaje (Clado IV), el cual representa otra posible especie. Ambos grupos son monofíleticamente recíprocos. Asimismo, la red de haplotipos mostró la formación de dos grandes grupos. Dentro del primero, las poblaciones se encuentran separadas entre sí por una, dos o tres sustituciones nucleotídicas. Por su parte, el grupo dos que corresponde al Clado IV se encuentra separado del primer grupo por 21 cambios nucleotídicos. Los valores de variación genética del gen mitocondrial y los grupos formados en la red de haplotipos, refuerzan la evidencia de que la especie *T. turgida* esta conformada por dos linajes genéticamente bien diferenciados.

Asociación hospedero-parásito y biogeografía

A partir de los linajes genéticos identificados tanto para *Rhopalias coronatus* como para *Turgida turgida*, se propuso poner a prueba las hipótesis de que éstos linajes corresponderían con la especie de hospedero a la que parasitan o bien, que los eventos de especiación estén determinados por la distribución geográfica de los hospederos.

En este sentido, el hecho de que ninguno de los linajes detectados tanto de *R. coronatus* como de *T. turgida* correspondieron con la filogenia de sus hospederos (ver Figs. 2 y 4) sugieren fuertemente que no es la filogenia de estos últimos la que ha influido en la historia evolutiva de sus parásitos sino que obedecen a factores ecológicos, determinados principalmente por la distribución geográfica donde se encuentran. Estos resultados refuerzan el hecho de que estas tres especies de marsupiales son consideradas generalistas en su alimentación (*D. marsupialis* y *D. virginiana*, en mayor grado) (Cabello 2006), mientras que para *P. opossum* su fuente de alimento esta asociada principalmente a cuerpos de agua (riachuelos, ríos, lagos, etc.) en busca de artrópodos acuáticos (Cañeda-Guzmán 1997), debido a la poca tolerancia a actividades antropogénicas; no obstante, se ha visto que puede cambiar su dieta hacia pequeños artrópodos terrestres como miriápodos, ortópteros y coleópteros (Salas-Pérez 2011), mismos que son consumidos por las especies del género *Didelphis* (Cañeda-Gúzman 1997). Por lo tanto, debido a que estas tres especies de marsupiales consumen los mismos recursos de alimento, tienen las mismas posibilidades de infectarse por estos parásitos, ya que al menos se sabe que *T. turgida* utiliza como hospederos intermediarios a ortópteros y coleópteros (Hamilton 1951; Stieglitz y Klimstra 1962; Alden 1995). Por otra parte, aunque no se conoce el ciclo de vida de *R. coronatus*, podría suponerse que utiliza un molusco como hospedero intermediario (Olsen 1986; Shoop 1988), esto debido a que la familia a la que pertenece esta especie (Rhopalidae) esta incluida en la Superfamilia Echinostomatidae, en la cual, los miembros de este grupo utilizan manera general, gasterópodos como hospederos intermediarios (Yamaguti 1975). Los tlacuaches se infectan de este digeneo al alimentarse de caracoles infectados. Esto concuerda con la dependencia a cuerpos de agua que tienen estos mamíferos, factor que está directamente

relacionado con su éxito de lactancia, lo cual influye en su rango de dispersión (Krockenberger 2006).

Por su parte, la correspondencia geográfica observada a partir de los análisis presentados (análisis filogenéticos y redes de haplotipos) indican que los linajes identificados tanto en *R. coronatus* como en *T. turgida*, tienen asociaciones geográficas distintas a pesar de que estos helmintos parasitan a los mismos hospederos a lo largo de su distribución geográfica por territorio mexicano. Es decir, de los dos linajes identificados de *R. coronatus*, el primero de éstos (Clado I) esta conformado por localidades que presentan un clima tropical húmedo, caracterizado por tener temporadas de secas muy cortas o ausentes y una cubierta de selvas medianas a altas (Toledo y Ordoñez 1998), brindando a estos hospederos mayor variedad de alimento y disponibilidad de agua, que como se mencionó anteriormente, es un factor que esta ligado con su poder de dispersión. Contrario a esto, el segundo linaje (Clado II) pertenece a una única localidad, la cual se encuentra en la Península de Yucatán, caracterizada por presentar un clima tropical subhúmedo, con temporadas largas de sequía y una marcada estacionalidad de precipitación (Toledo y Ordoñez 1998). Lo anteriormente expuesto muestra una clara dependencia de factores ecológicos y biológicos (como lo son la disposición de agua y la lactancia) que tienen estos marsupiales, por lo que probablemente la separación de linajes en esta especie se haya dado por interrupción de flujo genético debido a dos factores. El primero esta determinado por la movilidad y rango de dispersión de los tlacuaches que se encuentran en la Península de Yucatán, ya que debido a las características ecológicas y climáticas que presenta esta zona, resulta en la poca disposición de agua por lo que las poblaciones de tlacuaches probablemente tienen un rango de dispersión local, resultando en la interrupción de flujo genético entre las poblaciones de este digeneo, el cual se presume necesite de cuerpos de agua

para llevar a cabo su ciclo de vida, del cual deriva el segundo factor que probablemente haya influido en la separación de linajes. Este segundo factor está relacionado con los elementos (hospedero u hospederos intermediarios) que el digeneo *R. coronatus* está utilizando para completar su ciclo biológico. A pesar de que hasta la fecha se desconoce el ciclo de vida de la familia Rhopalidae, como se mencionó anteriormente, es probable que por estar incluida en la Superfamilia Echinostomatidae, *R. coronatus* está utilizando (al menos) un molusco como hospedero intermediario en su ciclo vital (Olsen 1986; Shoop 1988), el cual tendría una dispersión local ya que ésta depende de cuerpos de agua. De acuerdo a lo anterior, es probable que tanto los tlacuaches como los hospederos intermediarios de esta región de la Península de Yucatán, al tener un rango de dispersión reducido, se estén parasitando de manera local, teniendo probablemente poblaciones genéticamente estructuradas en dicha región geográfica. A una escala espacial local, los cambios en tamaño y distribución de las poblaciones influyen en los niveles de diversidad genética (Vázquez-Domínguez et al. 2012), así como los patrones de distribución están determinados por factores locales como la disponibilidad de alimento, refugios y competencia, mientras que a escala regional influye la migración, dispersión y extinción (Steiner y Catzefflies 2004; Stropp et al. 2009). No obstante, sería interesante abordar en trabajos futuros datos genéticos de las poblaciones de los hospederos de las mismas localidades de donde se obtuvieron ejemplares de este helminto, con el objetivo de estudiar la estructura genética de los hospederos y evidenciar si existe cierta correspondencia con los linajes identificados en *R. coronatus*, y poder confirmar la hipótesis de diferenciación genética por aislamiento geográfico determinada por éstos mamíferos.

En cuanto a los resultados obtenidos para *T. turgida*, donde de igual manera, se identificaron dos linajes genéticos bien diferenciados, la correspondencia geográfica es distinta a

la obtenida para *R. coronatus*. Los principales factores que probablemente están determinando dicha diferencia son el ciclo biológico de este nematodo y el rango de dispersión de los hospederos. En cuanto al primer factor, se sabe que *T. turgida* utiliza como hospederos intermediarios insectos de los órdenes Orthoptera y Coleoptera, particularmente de la subfamilia Escarabainae. Estos insectos son muy importantes en los ecosistemas ya que cumplen la función de herbívoros, depredadores y saprófagos, alimentándose de heces de diversos vertebrados terrestres (Aedes et al. 2013), por lo que intervienen en el ciclo biológico de diversos nematodos gastrointestinales (Nichols et al. 2008, y referencias ahí citadas). Dichos insectos se infectan al ingerir los huevos que son expulsados al medio junto con las heces. Dentro de los insectos se desarrollan tres estadios larvales (L1, L2 y L3), siendo este último la etapa infectiva para los marsupiales, quienes al alimentarse de estos insectos se infectan de este parásito. La larva se aloja en el estómago donde madura hasta alcanzar su estadio adulto para reproducirse, completando así su ciclo (Anderson 2000). En este sentido, *T. turgida* es considerado un geohelminto, ya que su ciclo biológico se desarrolla completamente en el suelo. Sin embargo, hasta la fecha no se cuenta con trabajos donde se conozca a detalle la o las especies de estos insectos que estén actuando como hospederos intermediarios de *T. turgida* en México (Cañeda-Guzman 1997). Considerando que en México existen alrededor de 650 especies descritas de ortópteros (Aedes et al. 2013), y 228 especies de la subfamilia Escarabainae (Nichols et al. 2008), las cuales presentan una distribución cosmopolita, el número de especies que potencialmente pudiesen estar involucrados en el ciclo biológico de *T. turgida* es muy alto. En este contexto, el segundo factor que pudiese estar influyendo en la genética de este parásito es la amplia distribución de estos insectos. Sin embargo, hasta la fecha no cuenta con estudios helmintológicos que evalúen la genética de este parásito en poblaciones de posibles hospederos intermediarios. No obstante, se

sabe que al menos las especies del género *Didelphis* son generalistas (Cabello 2006), oportunistas y exitosas, capaces de habitar distintos ambientes, incluso zonas con actividad humana (Sunquist et al. 1987; Adler et al. 1997). Los individuos de ambas especies (aunque en mayor grado *D. virginiana*) pueden cambiar fácilmente de hábitos alimenticios, por lo que son capaces de desplazarse a grandes distancias, resultando en la amplia distribución geográfica que muestran. En este sentido, es probable que la especie *D. virginiana* ha jugado un papel fundamental en la existencia de flujo génico entre las poblaciones muestreadas de este nematodo en la mayor parte de su distribución, conformando un solo linaje ampliamente distribuido (Fig. 4, Clados I, II y III), por lo que estas poblaciones muestran una baja diferenciación genética (1–3%), y un reducido número de cambios nucleotídicos en el marcador *cox 1* (de 1 a 3), identificados en la red de haplotipos (Fig. 5). Sin embargo, de manera particular se identificó un segundo linaje genéticamente bien diferenciado del primero (con 7–10% de divergencia genética y 21 cambios nucleotídicos en el marcador *cox 1*). Este segundo linaje está conformado por tres localidades (Cunduacán y Teapa en Tabasco y Escárcega en Campeche). Es probable que la diferenciación genética de este linaje se deba a diversas causas, por ejemplo, factores ecológicos particulares de esta región, factores orográficos como barreras geográficas para los hospederos intermediarios que mantiene aisladas genéticamente a las poblaciones de *T. turgida*, o bien, a factores intrínsecos de los mismos hospederos. De acuerdo a este último posible factor, Cervantes et al. (2010) analizaron mediante caracteres moleculares, poblaciones de *D. marsupialis* y *D. virginiana* que tienen distribución simpátrica en México. En su estudio, identifican claramente dos grupos que corresponden a cada una de estas especies; sin embargo, dentro de cada uno de éstos, se observan sub-grupos conformados por poblaciones de Tabasco y Campeche, separados de otras poblaciones muestreadas. Estas topologías son similares en

correspondencia geográfica a las obtenidas en los análisis filogenéticos de *Turgida turgida*, ya que independientemente del hospedero al que parasitan, se identificó un clado que corresponde a Tabasco y Campeche, separado del resto de las poblaciones muestreadas (Fig. 4). La comparación entre estos dos trabajos proponen las bases para realizar investigaciones futuras a nivel local para evidenciar mediante información genética el o los factores que están determinando dicha diferenciación genética poblacional tanto en los didélfidos como en este nematodo.

Agradecimientos

Agradecemos a Karla Acosta Virgen, Uriel Garduño Montes de Oca, Samantha Contreras Mirón, Jair Velasco Peña, Sara Ramírez Cañas, David Osorio Sarabia, Rosamond Coates, Virginia León Règagnon, Sergio Guillén Hernández y Luis Jorge García Márquez por su ayuda durante el trabajo de campo. Agradecemos a Lázaro Martínez y Dimas Hernández de Finca Brasil, así como a la familia Medina-Castillo de Agua Fría, por su ayuda en la obtención de material biológico de estas localidades. De igual forma agradecemos a Alejandro Ocegüera Figueroa y Luis García Prieto de la CNHE, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México por permitirnos depositar el material helmintológico obtenido en el presente proyecto. J.L.C desea agradecer al Programa del Posgrado en Ciencias Biológicas porque este trabajo es parte de su trabajo doctoral en dicho Programa, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para su manutención. Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) PAPIIT-UNAM IN204514, y PAPIIT-UNAM IN220113 de G.P.P.L. y R.M.L., respectivamente.

Referencias

Acosta-Virgen K, López-Caballero J, García-Prieto L, Mata-López R (2015) Helminths of three species of opossums (Mammalia, Didelphidae) from Mexico. *ZooKeys* 511:131–152

- Adams BJ (2002) The species delimitation uncertainty principle. *J Nematol* 33:153–160
- Adler GH, Arboledo JJ, Travi BL (1997) Population dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern Colombia. *Stud Neotrop Fauna Environ* 32:7–11
- Alden KJ (1995) Helminths of the opossum *Didelphis virginiana*, in Southern Illinois, with a compilation of all helminths reported from this host in North America. *J Helminthol Soc Wash* 62:197–208
- Anderson RC (2000) Nematode parasites of vertebrates; their development and transmission. CABI Publishing, Oxon, Wallingford, UK, p 650
- Blasco-Costa I, Balbuena JA, Raga JA, Kostadinova A, Olson PD (2009) Molecules and morphology reveal cryptic variation among digeneans infecting sympatric mullets in the Mediterranean. *Parasitology* 137:287–302
- Blouin MS (2002) Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitol* 32:527–531
- Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, Dame JB (1998) Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol Biol Evol* 15:1719–1727
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1995) A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Mol Phylogenet Evol* 4:103–109
- Bowles J, McManus DP (1993) Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a PCR-based method. *Mol Biochem Parasitol* 57:231–239
- Caballero CE (1937) Nematodos de algunos vertebrados del Valle del Mezquital, Hidalgo. *An Inst Biol Univ Nal Autón Méx* 8:189–193
- Caballero CE (1951) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda 2a parte. *An Inst Biol Univ Nac Autón Méx* 15:389–407
- Caballero CE (1958) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda 10a parte. *An Esc Nac Cienc Biol IPN* 9:61–76
- Caballero CE, Bravo-Hollis M, Zerecero C (1944) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Trematoda I. *An Inst Biol Univ Nal Autón Méx* 15:59–72
- Cabello DR (2006) Reproduction of *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in the Venezuelan Andes. *Acta Theriol* 51:427–433

- Cañeda-Guzman C (1997) Parásitos de tres especies de marsupiales de la Estación “Los Tuxtlas” y algunas zonas cercanas, Veracruz, México. Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias, UNAM. México DF, p 193
- Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, Satler JD (2013) How to fail at species delimitation? *Mol Ecol* 22:4369–4383
- Ceballos G, Oliva G (2005) Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México DF, p 986
- Cervantes FA, Arcangeli-Álvarez J, Hortelano-Moncada Y, Borisenko AV (2010) DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. *Mitochondrial DNA* 21:44–50
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9:1657–1660
- Criscione CD, Poulin R, Blouin MS (2005) Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol Ecol* 14:2247–2257
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2010) GENEIOUS v5.0.4. Available from <http://www.geneious.com/>
- García-Prieto L, Falcón-Ordaz J, Guzmán-Cornejo C (2012) Helminth parasites of wild Mexican mammals: list of species, hosts and geographical records. *Zootaxa* 3290:1–92
- Gibbons LM (2010) Keys to the nematode parasite of vertebrates supplementary volume. CABI, Wallingford, p 416
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC (2008) TNT: a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24:774–786
- Gray BJ, Anderson RC (1982) Observations on *Turgida turgida* (Rudolphi, 1819) (Nematoda: Physalopteridae) in the american opossum (*Didelphis virginiana*). *J Wildlife Dis* 18:279–285
- Green B (1997) Field energetics and water flux in marsupials. In: Saunders NR, Hinds LA (eds), *Marsupial Biology: recent research, new perspectives*. University of New South Wales Press, Sidney, p 143–162

- Gutiérrez-Fuster I (1966) Estudio de helmintos parásitos de algunos animales del Parque Zoológico de Chapultepec, DF, México. Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias, UNAM. México DF, p 79
- Hamilton WJ (1951) The food of the opossum in New York state. *J Wildlife Manage* 15:258–264
- Harverkost T, Gardner SL (2008) A review of species in the genus *Rhopalias* (Rudolphi, 1819). *J Parasitol* 94:716–726
- Haverkost TR, Gardner SL (2008) A review of species in the genus *Rhopalias* (Rudolphi, 1819). *J Parasitol* 94:716–726
- Hernández-Mena DI, García-Prieto L, García-Varela M (2014) Morphological and molecular differentiation of *Parastrigea* (Trematoda: Strigeidae) from Mexico, with the description of a new species. *Parasitol Int* 63:315–323
- Huelsenbeck JP, Crandall KA (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Ann Rev Ecol Syst* 28:437–466
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755
- Humberg RMP, Tavares LER, Paiva F, Oshiro ET, Bonamigo RA, Júnior NT (2011) *Turgida turgida* (Nematoda: Physalopteridae) parasitic in white-bellied opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae), state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesq Vet Bras* 31:78–80
- Krockenberger A (2006) Lactation. *In*: Armata P, Dickman C, Hume I (eds), *Marsupials*. Cambridge University Press, Cambridge, p 108–136
- Lamothe-Argumedo R (1978) Trematodos de mamíferos I. Redescrición de *Rhopalias macracanthus* Chandler, 1932 y algunas consideraciones sobre el género. *An Inst Biol Univ Nac Autón Méx* 49:25–34
- Lamothe-Argumedo R (1997) Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestre. AGT Editor, México DF, p 43
- Lamothe-Argumedo R, Caballero-Deloya J, Pineda-López R, Meave-Gallegos O (1985) Hallazgo de *Paragonimus mexicanus* en nuevo hospedero y una localidad en México. *Universidad y Ciencia* 2:41–45

- Maddison DR, Maddison WP (2011) MESQUITE v2.75: a modular system for evolutionary analysis Available from <http://mesquiteproject.org>
- Matey VE, Kuperman BI, Kinsella JM (2001) Scanning electron microscopy of *Turgida turgida* (Nematoda: Spiruroidea), parasite of the Virginia opossum, *Didelphis virginiana*, from Southern California. J Parasitol 87:1199–1202
- Messing J (1993) M13 cloning vehicles. Their contribution to DNA sequencing. Methods Mol Biol 23:9–22
- Miura O, Kuris AM, Torchin ME, Hechinger RF, Dunham EJ, Chiba DS (2005) Molecular genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). Int J Parasitol 35:793–801
- Miyazaki I, Ishii Y (1968) Studies on the mexican lung flukes, with special reference to a description of *Paragonimus mexicanus* sp. nov. (Trematoda: Troglotrematidae). Jap J Parasitol 17:445–453
- Miyazaki I, Kifune T, Lamothe-Argumedo R (1980) Taxonomical and biological studies on the lung flukes of Central America. Dep Parasitology, School of Medicine, Fukuoka University, Japan, p 1–28
- Monet-Mendoza A, Osorio-Sarabia D, García-Prieto L (2005) Helminths of the Virginia Opossum *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphidae) in Mexico. J Parasitol 91:213–219
- Monsiváis-Aguilar MBG (1958) Estudio sobre algunos nematodos de mamíferos. Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias, UNAM. México DF, p 89
- Morgan JAT, Blair D (1998) Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacer and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). Parasitology 116:289–297
- Moszczyńska A, Locke SA, McLaughlin JD, Marcogliese DJ, Crease TJ (2009) Development of primers for mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. Mol Ecol Resour 9:75–82
- Nadler SA (2002) Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. Nematology 4:615–625
- Nadler SA, Carreno RA, Mejía-Madrid H, Ullberg J, Pagan C, Houston R, Hugot JP (2007)

- Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology* 134:1421–1442
- Nadler SA, Pérez-Ponce de León G (2011) Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology *Parasitology* 13:1688–1709
- Navone GT, Suriano DM (1992) Species composition and seasonal dynamics of the helminth community parasiting *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) in savannas of central Argentina. *Ecol Austral* 2:95–100
- Nichelason AE, Rejmanek D, Dabritz HA, Melli AC, Miller M, Conrad PA (2008) Evaluation of *Cruzia americana*, *Turgida turgida*, *Didelphostrongylus hayesi* infection in the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) and risk factors along the California coast. *J Parasitol* 94:1166–1168
- Nichols E, Spector S, Louzada J, Larsen T, Amezcuita S, Favila ME (2008) Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biol Conserv* 141:1461–1474
- Olsen OW (1986) Animal parasites. Their life cycles and ecology. Dover Publications, Inc. New York, p 562
- Pérez-Ponce de León G, Choudhuri A (2005) Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: the research for patterns and processes. *J Biogeogr* 32:645–649
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 9:817–818
- Poulin R, Blanar CA, Thieltges DW, Marcogliese DJ (2011a) The biogeography of parasitism in sticklebacks: distance, hábitat differences and the similarity in parasite occurrence and abundance. *Ecography* 34: 540–551
- Poulin R, Krasnov BR, Mouillot D (2011b) Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends Ecol* 27:355–361
- Prado-Ancona JD (1993) Estudio taxonómico de diez especies de acantocéfalos (*Acanthocephala* Rudolphi, 1801) de vertebrados de México. Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias, UNAM, México DF, p 156
- Rambaut A (2006) FIGTREE v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology. University of Edinburgh, U.K.

- Razo-Mendivil U, Rosas-Valdez R, Rubio-Godoy M, Pérez-Ponce de León G (2015) The use of mitochondrial and nuclear sequences in prospecting for cryptic species in *Tabascotrema veri* (Digenea: Cryptogonimidae), a parasite of *Petenia splendida* (Cichlidae) in Middle America. *Parasitol Int* 64:173–181
- Rodríguez-Ortíz B, García-Prieto L, Pérez-Ponce de León G (2004) Checklist of the helminth parasites of vertebrates in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 52:313–354
- Saijuntha W, Sithithaworn P, Duengngai K, Kiatsopit N, Andrews RH, Petney TN (2011) Genetic variation and relationships of four species of medically important echinostomes (Trematoda: Echinostomatidae) in South-East Asia. *Infect Genet Evol* 11:375–381
- Salas-Pérez E (2011) Dieta y relaciones tróficas en la comunidad de didélfidos en la selva baja del noreste del Perú. Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú, Lima, p 60
- Shoop WL (1988) Trematode transmission patterns. *J Parasitol* 74:46–59
- Sites JW Jr, Marshall JC (2003) Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol Evol* 18:462–470
- Stamatakis A (2006) RAXML: maximum likelihood based phylogenetic with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690
- Steiner C, Catzefflis FM (2004) Genetic variation and geographical structure of five mouse-sized opossum (Marsupialia, Didelphidae) throughout the Guiana Region. *J Biogeogr* 31:959–973
- Stieglitz WO, Klimstra WD (1962) Dietary patterns of the Virginia opossum, *Didelphis marsupialis virginianus* [sic] Kerr, later summer-winter, southern Illinois. *Trans Ill State Acad Sci* 55:198–208
- Stropp J, Steege TH, Malhi Y, ATDN and RAINFOR networks (2009) Disentangling regional and local tree diversity in the Amazon. *Ecography* 32:46–54
- Sunquist ME, Steven NA, Sunquist F (1987) Movement patterns and home range in the Common Opossum (*Didelphis marsupialis*). *J Mammal* 68:173–176
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2013) MEGA v6.06 Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739

- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619–633
- Thompson J, Higgins D, Gibson T (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Toledo VM, Ordoñez MJ (1998) El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. *En: Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J (compiladores), Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. UNAM, México DF, p 273–757
- Vázquez-Domínguez E, Suárez-Atilano M, Booth W, González-Baca C, Cuarón AD (2012) Genetic evidence of a recent successful colonization of introduced species on islands: *Boa constrictor imperator* on Cozumel Island. *Biol Invasions* 14:2101–2116
- Vilas R, Criscione CD, Blouin MS (2005) A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* 131:1–8
- Yamaguti S (1975) A synoptical review of life history of digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku, Tokyo, p 590

Tabla 1 Helmintos secuenciados incluidos en el presente estudio

| Número de localidad | Abreviatura, nombre de la localidad, fecha de colecta (mes/año) | Coordenadas geográficas Norte Oeste | Especie de hospedero (n) | GenBank | Individuos secuenciados | GenBank | | CNHE |
|---------------------|---|---|-----------------------------|---------|-------------------------|---------|----------|--|
| | | | | Cyt b | | cox 1 | ITSs/18S | <i>R. coronatus</i> <i>T. turgida</i> |
| 1 | TL, Tlacotalpan, Veracruz (02/2012) | 18°37'40" 95°40'40" | Dm (4) Dv (5) Po (2) | | 16 + 3* 3 | | | |
| 2 | LT, Los Tuxtlas, Veracruz (08/2011) (03/2012) | 18°34'21" 95°04'30" | Dm (4) Dv (2) Po (2) | | 17 2 | | | |
| 3 | CU, Cunduacán, Tabasco (08/2012) | 17°34'17" 92°57'09" | Dv (3) | | 2 2 | | | |
| 4 | FB, Finca Brasil, Chiapas (06/2012) | 15°05'41" 92°13'45" | Dm (2) Dv (4) Po (1) | | 0 + 1* 9 | | | |
| 5 | AF, Agua Fría, Chiapas (06/2012) (03/2013) | 16°15'26" 93°53'55" | Dm (3) Dv (3) Po (10) | | 24 21 | | | |
| 6 | ES, Escárcega, Campeche (07/2012) | 18°37'00" 90°43'13" | Dm (2) Dv (2) | | 0 8 | | | |

| | | | | |
|----|---|-------------------------|------------------|---------|
| 7 | CO, Coquimatlán, Colima (09/2012) | 19°10'28" 103°49'38" | Dv (6) | 0 13 |
| 8 | RM, Rincón de Martínez, Guanajuato (02/2013) | 20°19'44" 101°34'42" | Dv (2) | 0 9 |
| 9 | TE, Teapa, Tabasco (07/2013) | 17°33'49" 92°45'40" | Dm (3) | 1 2 |
| 10 | SO, Soyaltepec, Oaxaca (07/2013) | 18°15'28" 96°24'00" | Dv (2) | 12 5 |
| 11 | TZ, Tzucacab, Yucatán (11/2013) | 20°00'58" 89 01'12" | Dm (1) | 8 1 |
| 12 | ME, Mérida, Yucatán (11/2013) | 20°58'04" 89°37'18" | Dm (1) Dv (1) | 0 6 |
| 13 | TEP, Tepoztlán, Morelos (08/2014) | 18°55'00" 99°12'13" | Dv (1) | 0 4 |
| 14 | COA, Coapan, Puebla (08/2014) | 18°25'42" 97°24'30" | Dv (2) | 0 3 |

Dm= *Didelphis marsupialis*

Dv= *Didelphis virginiana*

Po= *Philander opossum*

*= *Rhopalias macracanthus*

Tabla 2 Oligos utilizados para la amplificación y secuenciación de los fragmentos analizados en el presente estudio

| Especie | Locus | Oligo | Secuencia (5'–3') | Referencia |
|----------------------------|--------------------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------|
| <i>Rhopalias coronatus</i> | cox 1 | MplatCOX1dF | TGTAACGACGGCCAGTTTWCITTRGATCATAAG | Moszczyńska et al. 2009 |
| | | BARCOXR | ATAAACCTCAGGATGCCCAAAAAA | Razo-Mendivil (com. pers.) |
| | | M13F* | TGTAACGACGGCCAGT | Messing (1993) |
| | ITSs (ITS1-5.8S-ITS2) | BD1 | GTCGTAACAAGGTTTCGGTA | Bowles y McManus (1993) |
| | | BD2 | TATGCTTAAATTCAGCGGGT | Bowles et al. 1995 |
| | | BD3** | GAACATCGACATCTTGAACG | Hernández-Mena et al. 2014 |
| | | BD4** | ATAAGCCGACCCTCGGC | Hernández-Mena et al. 2014 |
| | | | | |
| <i>Turgida turgida</i> | cox 1 | JB3 (COIF) | TTTTTTGGGGATCCTGAGGTTTAT | Bowles et al. 1995 |
| | | JB4.5 (COIR) | TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG | Morgan y Blair (1998) |
| | 18S | G18S4 | GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC | Nadler et al. 2007 |
| | | 136 | TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC | Nadler et al. 2007 |

*M13F fue utilizado en la reacción de secuenciación en lugar del oligonucleótido MplatCOX1dF para obtener la cadena 5'–3'.

**BD3 y BD4 fueron utilizados para secuenciar regiones internas del ITSs.

Tabla 3 Distancias genéticas observadas (distancias *p*, no corregidas) para *Rhohalias coronatus*. Distancias intraclados en diagonal (a la izquierda cox 1 y a la derecha ITSs). Distancias interclados para cox 1 por debajo de la diagonal, y para la región de los ITSs por arriba de la diagonal. Distancias *p* expresadas en porcentaje

| | | Región ITSs | | | | |
|-------|------------------------|-------------|----------|------------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | | | |
| | | Clado I | Clado II | <i>R. macracanthus</i> | <i>F. hepatica</i> | <i>F. gigantea</i> |
| cox 1 | Clado I | 0-1 / 0 | 0 | 7 | 14 | 14 |
| | Clado II | 7-8 | 0 / 0 | 7 | 14 | 14 |
| | <i>R. macracanthus</i> | 17-18 | 16-17 | 0-2 / -- | 15 | 14 |
| | <i>F. hepatica</i> | 20-21 | 22 | 19 | -- / -- | 1 |
| | <i>F. gigantea</i> | 20-21 | 22 | 19-20 | 9 | -- / -- |

Tabla 4 Distancias genéticas observadas (distancias *p*, no corregidas) para *Turgida turgida*. Distancias intraclados en diagonal (a la izquierda cox 1 y a la derecha 18S). Distancias interclados para cox 1 por debajo de la diagonal, y para la región de los 18S por arriba de la diagonal. Distancias *p* expresadas en porcentaje

| | | 18S rRNA | | | | |
|-------|---------------|----------|----------|-----------|----------|---------------|
| cox 1 | | Clado I | Clado II | Clado III | Clado IV | <i>L. loa</i> |
| | Clado I | 0-1 / 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Clado II | 1-3 | 0-2 / 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Clado III | 1-2 | 1-3 | 1 / 0 | 0 | 3 |
| | Clado IV | 7-10 | 7-10 | 6-10 | 0-4 / 0 | 3 |
| | <i>L. loa</i> | 14-15 | 16-17 | 14-15 | 16-17 | -- / -- |

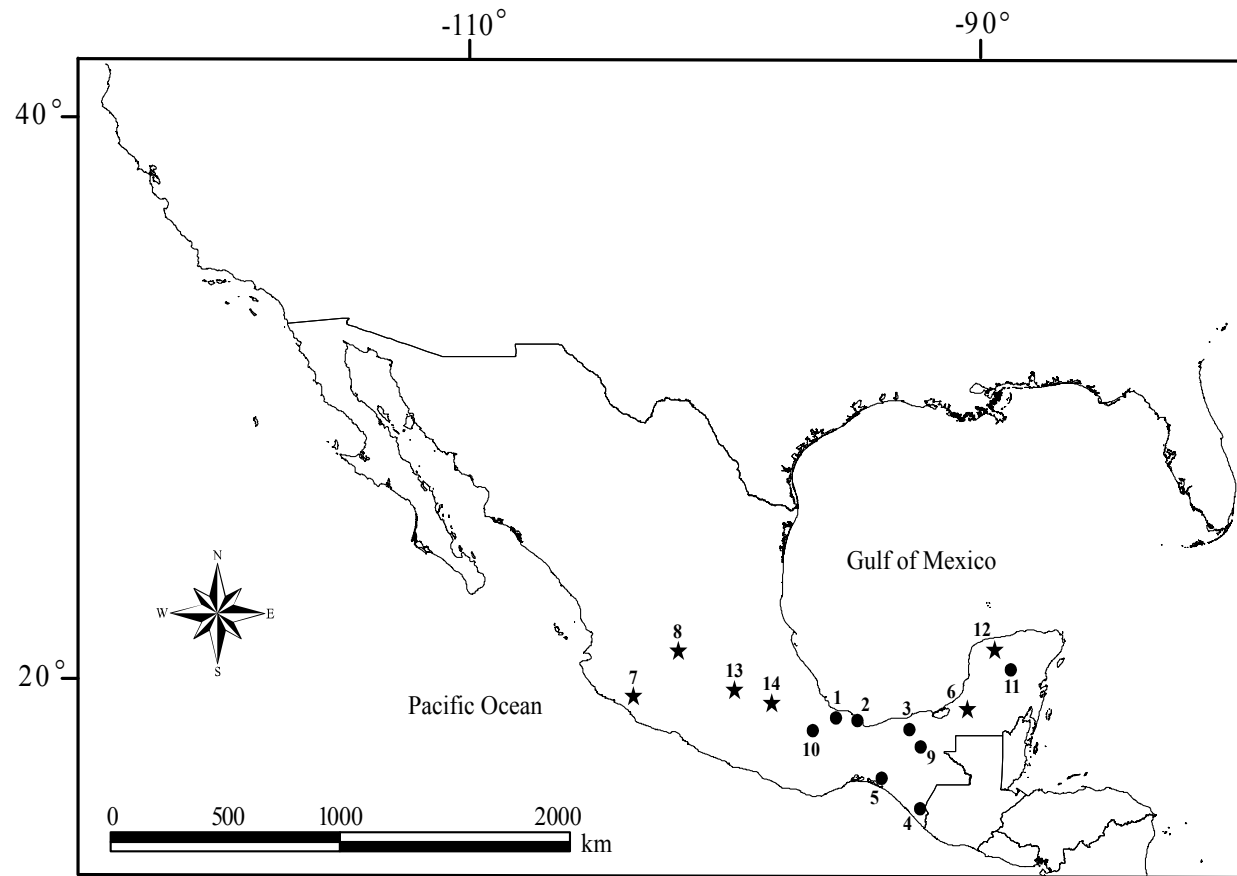


Figura 1. Sitios de colecta de las especies *Rhopalias coronatus* y *Turgida turgida* analizadas. **1.** TL, Tlacotalpan, Veracruz; **2.** LT, Los Tuxtlas, Veracruz; **3.** CU, Cunduacán, Tabasco; **4.** FB, Finca Brasil, Chiapas; **5.** AF, Agua Fría, Chiapas; **6.** ES, Escárcega, Campeche; **7.** CO, Coquimatlán, Colima; **8.** RM, Rincón de Martínez, Guanajuato; **9.** TE, Teapa, Tabasco; **10.** SO, Soyaltepec, Oaxaca; **11.** TZ, Tzucacab, Yucatán; **12.** ME, Mérida, Yucatán; **13.** TEP, Tepoztlán, Morelos; **14.** COA, Coapan, Puebla. El punto representa las localidades donde se obtuvieron ambas especies. La estrella muestra las localidades donde únicamente se encontró *T. turgida*.

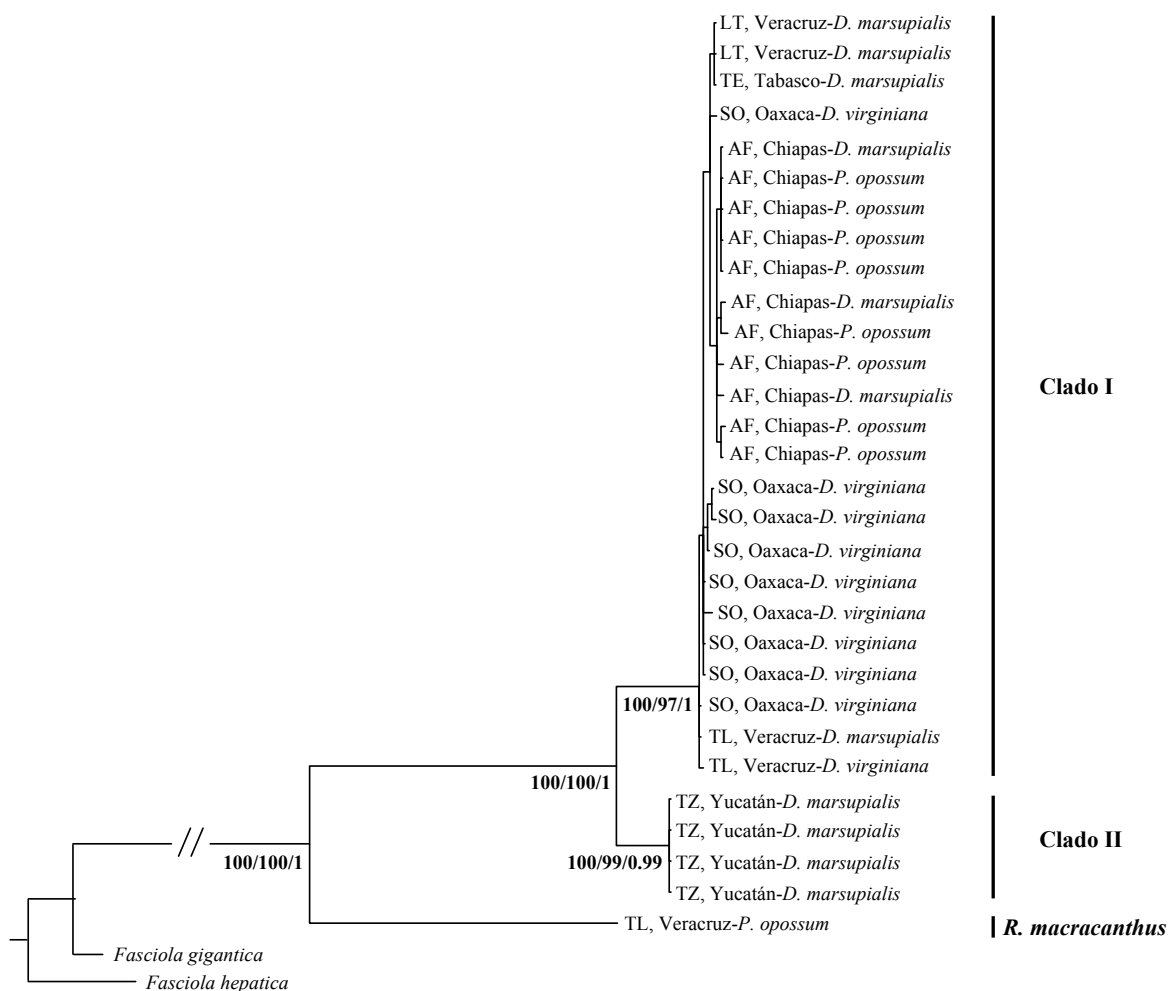


Figura 2. Árbol consenso de *R. coronatus* inferido con la combinación de matrices particionadas por genes (ITSs + cox 1), mediante MP (487 pasos), MV (-ln de verosimilitud 4605.087967) e IB. Valores de bootstrap MP/MV y probabilidades posteriores.

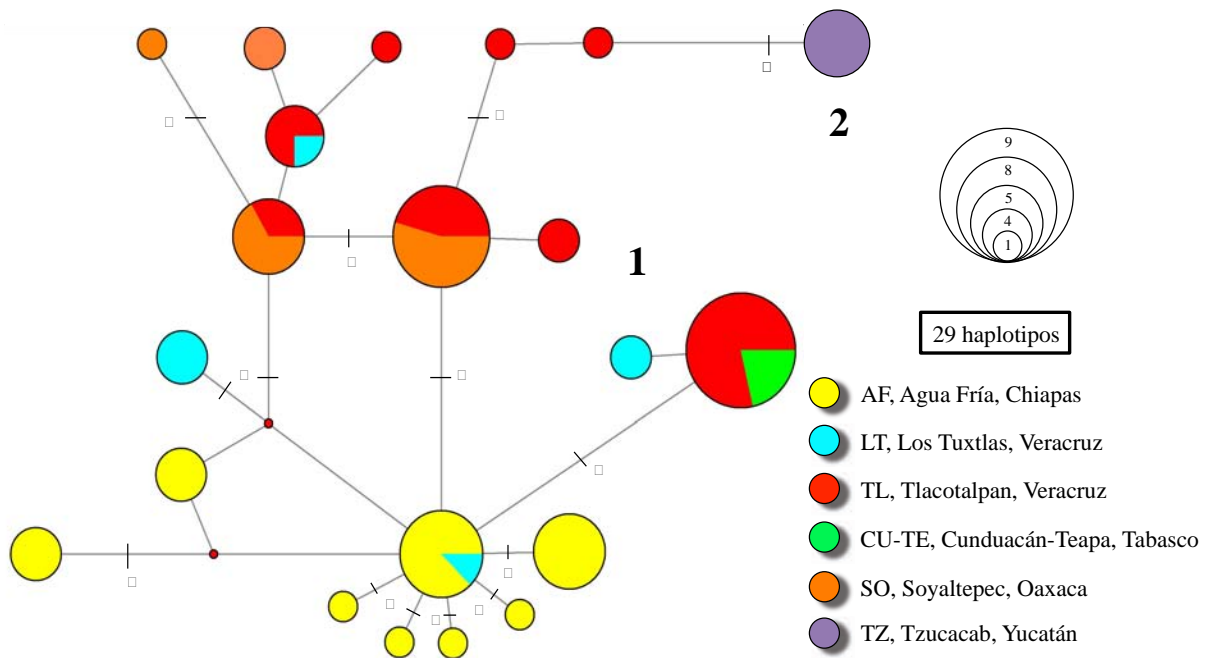


Figura 3. Red de haplotipos de *R. coronatus* construida con base en el límite de 95% (parsimonia) con el programa TCS v1.21. Los grupos son identificados con los números 1 y 2, separados por 49 cambios. El tamaño de los círculos indica la frecuencia de los haplotipos. Las líneas conectan a cada haplotipo y los números sobre éstas muestran el número de cambios. Los círculos rojos representan haplotipos no muestreados. Los colores corresponden a las localidades enlistadas a la derecha de la figura.

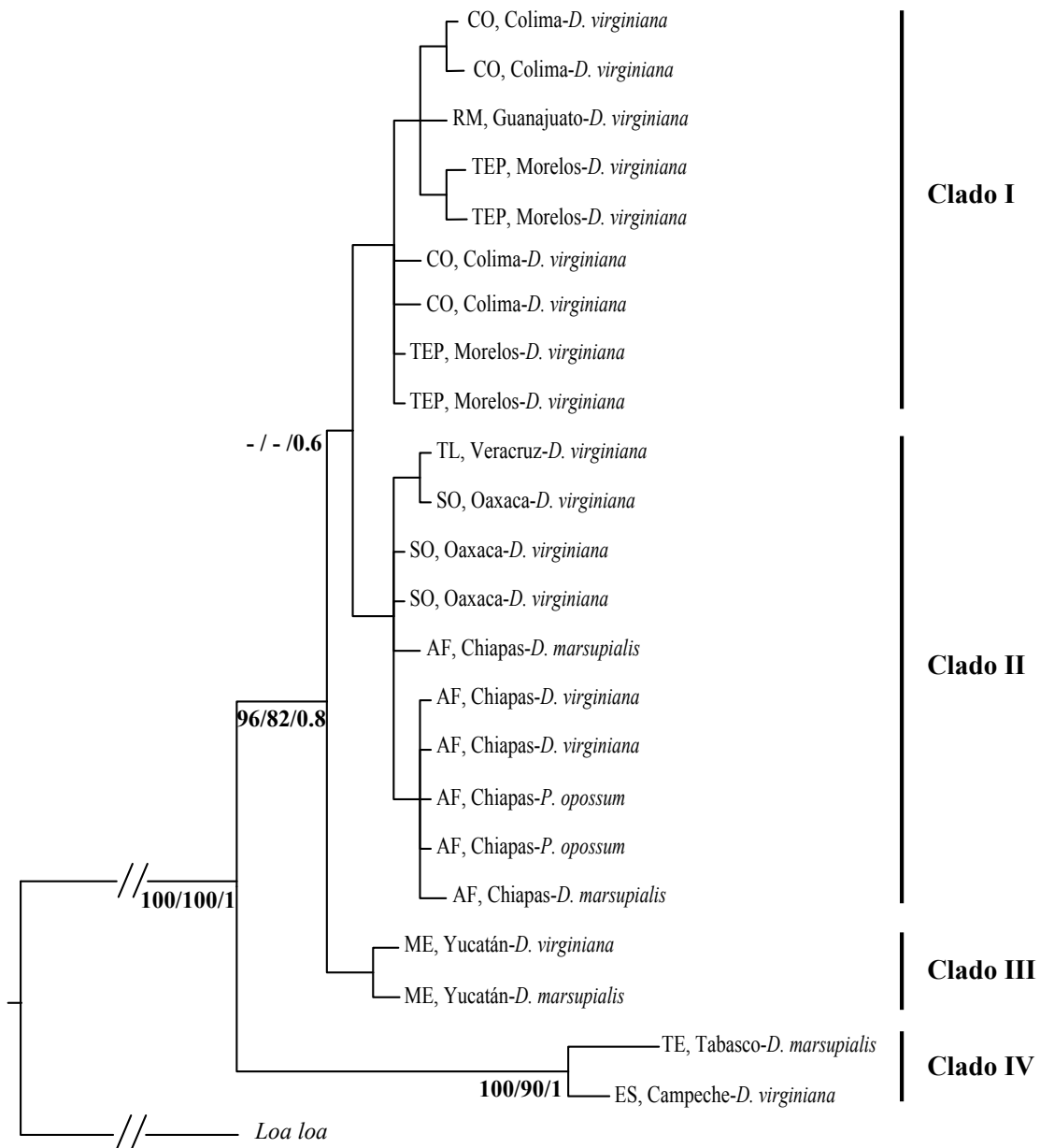


Figura 4. Árbol consenso de *T. turgida* inferido con la combinación de matrices particionadas por genes (18S + cox 1), mediante MP (148 pasos), MV (-ln de verosimilitud 3444.061065) e IB. Valores de bootstrap MP/MV y probabilidades posteriores.

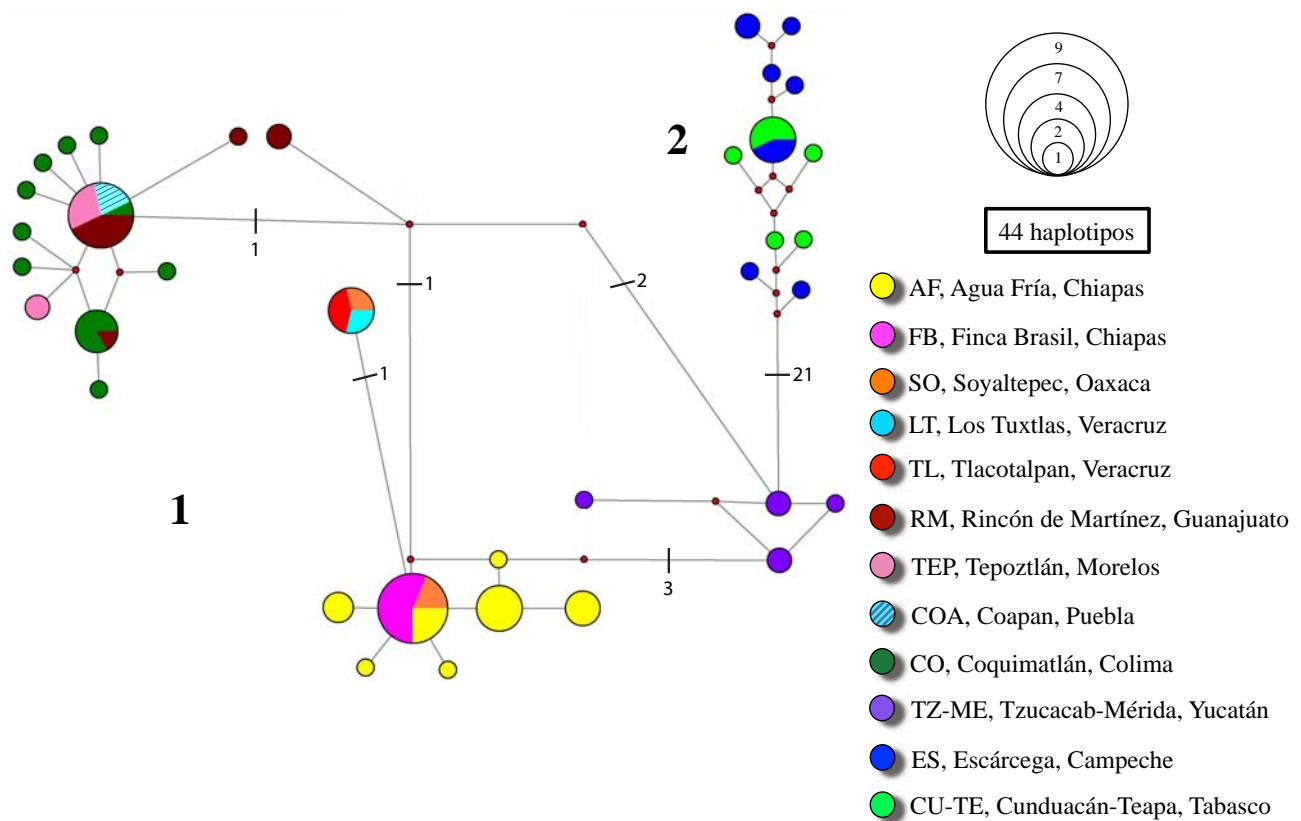


Figura 5. Red de haplotipos de *T. turgida* construida con base en el límite de 95% (parsimonia) con el programa TCS v1.21. Los grupos son identificados con los números 1 y 2, separados por 21 cambios. El tamaño de los círculos indica la frecuencia de los haplotipos. Las líneas conectan a cada haplotipo y los números sobre éstas muestran el número de cambios. Los círculos rojos representan haplotipos no muestreados. Los colores corresponden a las localidades enlistadas a la derecha de la figura.

V. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

El territorio mexicano, por su posición geográfica, históricamente ha sido utilizado como corredor biológico obligado por especies terrestres que migran de Norteamérica hacia Sudamérica y viceversa (Simpson, 1980; Stehli & Webb, 1985; Riddle *et al.*, 2000; Outlaw *et al.*, 2003). Los mamíferos son un grupo que se destaca por constituir un componente importante de la diversidad biológica de México (Arita, 1993; Ceballos & Oliva, 2005; Sánchez-Cordero *et al.*, 2014). Hasta la fecha se tienen registradas 564 especies (Sánchez-Cordero *et al.*, 2014), de las cuales 161 son endémicas (Ceballos & Oliva, 2005). De manera particular, los marsupiales, un grupo de origen Neotropical, tienen una historia evolutiva muy interesante asociada a eventos geológicos y climáticos que permitieron la dispersión y colonización de nuevas áreas como resultado de migraciones masivas que se dieron a partir del Gran Intercambio Biótico Americano (GABI, por sus siglas en inglés) (Jansa *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2014).

De las 89 especies de marsupiales que se distribuyen en el Continente Americano, ocho han sido registradas en México (Ramírez-Pulido *et al.*, 2005). De éstas, *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander opossum* se distinguen por ser las especies más ampliamente distribuidas, aunque en mayor grado la primera de éstas, por lo que presenta áreas de simpatria con respecto a las otras dos (Arcangeli-Álvarez, 2010; Cervantes *et al.*, 2010). Las relaciones filogenéticas de estos marsupiales han sido ampliamente estudiadas (Patton *et al.*, 1996; Patton & Costa, 2003; Voss & Jansa, 2003, 2009) y existe un conocimiento sobre la fauna de helmintos que los parasita. Todo lo anterior hace de estos marsupiales y sus helmintos un sistema de estudio ideal para entender las implicaciones que tuvo el GABI en la composición de la biodiversidad actual en Mesoamérica.

En México, alrededor del 25% de las 564 especies de mamíferos silvestres han sido estudiadas desde el punto de vista helmintológico. Se ha registrado un total de 336 taxa de helmintos en este grupo de hospederos, de los cuales 36 parasitan a las tres especies de marsupiales en estudio; y particularmente, nueve especies de helmintos son compartidas entre *D. marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum* (García-Prieto *et al.*, 2012). Estos autores consideraron que el conocimiento sobre los helmintos asociados a este grupo de hospederos era incompleto debido a la amplia distribución que éstos tienen en territorio mexicano. Por ello, el presente trabajo inicia con un estudio mas detallado de la diversidad de helmintos que parasitan a marsupiales, a partir de muestreos realizados en diferentes áreas de México, aportando así un listado de taxa de helmintos presentes en ciertas localidades del país (Capítulo I). Esta información básica fue utilizada entonces para realizar un estudio sobre la diversidad genética de tres de las especies de helmintos que, además de estar compartidas por las tres especies de hospederos, fueron comúnmente encontradas y con un rango de distribución mayor. De esta manera, los capítulos II y III abordan en principio el análisis de prospección molecular de cada uno de esos helmintos, para reconocer la existencia potencial de un complejo de especies entre lo que se considera (con una base morfológica solamente), una sola especie. Con los linajes genéticos establecidos, se procedió entonces a tratar de delimitar las especies de manera mas objetiva aportando datos adicionales sobre su distribución geográfica y grupo de hospedero. Toda esta información se utilizó en conjunto para tratar de determinar si los patrones de distribución geográfica y la asociación con las especies de hospederos, habrían influido en la historia evolutiva de los parásitos. De esta manera, los datos generados contribuyen al entendimiento de la historia evolutiva y biogeográfica de esta asociación parásito-hospedero.

El primer capítulo representa un manuscrito que incrementa el conocimiento taxonómico de los helmintos asociados a estas tres especies de marsupiales y en el número de especies que comparten estos hospederos. De los 68 tlacuaches analizados, se recuperaron 12,188 ejemplares de helmintos distribuidos en 21 taxa (10 nematodos, 6 digeneos, 3 acantocéfalos y 2 cestodos) todos en estadio adulto. Aun cuando la mayoría de los taxa de helmintos obtenidos ya habían sido registrados en estudios anteriores (García-Prieto *et al.*, 2012), se incluyen nueve registros de helmintos en alguna de las tres especies de hospederos y 66 registros de localidades nuevas. Asimismo, se adicionó una especie más a la composición de la helmintofauna de los tlacuaches en México: el digeneo *Brachylaima didelphus*, parásito de *D. virginiana*, el cual no había sido registrado en México, ya que se pensaba que su distribución se restringía tan solo a Estados Unidos (Premvati & Bair, 1979). Con esto se incrementa el número de taxa de helmintos conocidos para estos marsupiales en México a 41, por lo que éstos hospederos continúan siendo los mamíferos con la mayor número de registros de helmintos, aunque cabe señalar que hay muchas especies de mamíferos que no han sido estudiadas en detalle (Pérez-Ponce de León & García-Prieto 2001). Además, se observa que las tres especies de hospederos son parasitadas principalmente por nematodos, seguido de los digeneos y acantocéfalos, y en menor grado los cestodos. Estos resultados confirman lo encontrado por otros autores previamente para México (Cañeda-Guzman, 1997; Monet-Mendoza *et al.*, 2005), y en otras áreas de Norteamérica (Cordell, 1974; Alden, 1995; Ellis *et al.*, 1999; Richardson & Campo, 2005), e incluso para Sudamérica (Navone & Suriano, 1992; Jiménez-Ruíz *et al.*, 2011).

Por otra parte, del total de las especies registradas, se encontró que la mayoría de los taxa parasitaron el aparato digestivo, lo que también concuerda con estudio previos (Cañeda-Guzmán, 1997; Jiménez-Ruíz *et al.*, 2011). El factor más importante que puede explicar esta tendencia es

el amplio espectro de fuentes de alimento que tienen estos marsupiales, ya que la mayoría de las especies de helmintos registradas infectan a estos hospederos por medio de la ingestión de huevos, larvas u hospederos intermediarios (Carvalho *et al.*, 2005). Esto claramente se relaciona con la forma de vida y dieta que tienen estas tres especies de tlacuaches, exponiéndolos de cierto modo a las mismas especies de parásitos (Krause & Krause, 2006), aunque la composición y abundancia relativa estén dadas por diferencias locales en disposición de presas, de hospederos intermediarios o los mismos parásitos, como ha sido mostrado en trabajos previos (Cañeda-Guzmán, 1997; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2011). Estos autores señalaron que las especies del género *Didelphis* tienen una mayor variedad de alimento en comparación con *P. opossum*, la cual se relaciona más a cuerpos de agua (riachuelos, ríos, lagos, etc.) en busca de artrópodos acuáticos. De este modo, con el estudio de los helmintos se aporta información sobre la biología de sus hospederos (Marcogliese, 2003).

Asimismo, los resultados revelan que las especies *Rhopalias coronatus*, *Oligacanthorhynchus microcephalus*, *Cruzia tentaculata*, *Gnathostoma turgidum* y *Turgida turgida* son típicas de didélfidos distribuidos en México y en otras partes del Continente Americano (ver Alden, 1995; Corrêa-Gomes *et al.*, 2003; Haverskot & Gardner, 2008; Bertoni-Ruiz *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2014). Con estos resultados, resalta el hecho de que en los estados donde las tres especies de marsupiales están distribuidas simpátricamente, el digeneo *R. coronatus* y el nematodo *T. turgida* son las especies más frecuentemente compartidas entre las tres especies de tlacuaches, y con menor frecuencia, el acantocéfalo *O. microcephalus*. Estos resultados concuerdan con lo citado por Jiménez-Ruiz *et al.* (2011), quien concluyó que especies de didélfidos con distribución simpátrica comparten más especies de parásitos que aquellas que se encuentran en alopatría, aún cuando estén relacionadas filogenéticamente. Esto puede deberse

en primera instancia a las condiciones ecológicas del medio donde co-habitan y a la similitud en su estilo de vida (etología, alimentación, etc.) por lo que están expuestos a las mismas cargas parasitarias locales.

Con base en los resultados del primer capítulo se determinó entonces que las especies de helmintos mas comúnmente encontradas y con mayor rango de distribución en las tres especies de hospederos fueron el acantocéfalo *Oligacanthorhynchus tortuosa*, el digeneo *Rhopalias coronatus* y el nematodo *Turgida turgida*. Dado que no existen trabajos previos que describan la diversidad genética que existe entre los individuos y poblaciones de estas tres especies, se planteó el objetivo de explorar el uso de diferentes marcadores moleculares para evaluar si cada una de estas entidades biológicas -consideradas tradicionalmente como una misma especie-, con rangos amplios de distribución geográfica y de hospederos, estaban conformadas por distintos linajes genéticos que pudieran ser consideradas como especies crípticas. Asimismo, se planteó determinar si el potencial reconocimiento de linajes independientes podría evidenciar eventos de especiación que pudiesen corresponder con la propia historia filogenética de los hospederos, o bien, si dichos eventos estaban asociados a patrones de distribución que indicaran procesos de especiación simpátrica o alopátrica. La primera especie, el acantocéfalo *O. microcephalus*, se abordó de manera independiente en virtud de que fue la que presentó menores niveles de infección, en comparación con las otras dos especies de helmintos. Asimismo, su intervalo de distribución está mas restringido y no fue recolectado de la mayor parte de las localidades donde realizamos muestreos en el centro y sur de México.

Ambos capítulos estuvieron enmarcados en la disciplina de la Sistemática filogenética, que junto con aspectos biogeográficos, han permitido explicar la historia evolutiva tanto de los hospederos como de los parásitos, evidenciando de esta manera sí la asociación en este sistema

hospedero-parásito es producto de co-especiación por descendencia (sus ancestros se asociaron entre sí en el pasado y las especies heredaron dicha asociación) o por colonización (una de las especies se originó en otro hospedero y subsecuentemente se relacionaron por dispersión), o si dentro de la historia compartida hay más de un proceso involucrado (Brooks & McLennan, 1993; Morrone, 2004). En principio, el análisis de secuencias de ADN, a través de una prospección molecular en especies de helmintos que parasitan diversos grupos de hospederos a lo largo de un rango geográfico amplio, ha permitido reconocer la existencia de complejos de especies y/o de especies crípticas (Blouin, 2002; Criscione *et al.*, 2005; Vilas *et al.*, 2005; Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010; Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011). Las poblaciones de las tres especies de helmintos que se estudiaron en este trabajo (*O. microcephalus*, *R. coronatus* y *T. turgida*) fueron evaluadas mediante la incorporación de secuencias de ADN. En los tres casos se analizaron secuencias de genes ribosomales (28S, 18S e ITS1-5.8S-ITS2), así como secuencias del gen mitocondrial (cox 1) (ver Capítulos II y III). De manera general, los marcadores ribosomales no fueron lo suficientemente informativos a este nivel ya que en los respectivos análisis filogenéticos se obtuvieron arboles no resueltos. Esto puede ser explicado por la baja tasa de evolución de estos genes (por ejemplo, sustituciones nucleotídicas), y debido a que los procesos de especiación son graduales, algunas entidades pueden encontrarse en etapas tempranas del proceso de divergencia (zona gris *sensu* de Queiroz, 2007). No obstante, la evaluación conjunta de éstos con secuencias mitocondriales permitieron la identificación de al menos dos linajes genéticos en cada una de los taxa analizados. Estos resultados corresponden con lo mencionado por varios autores (v. gr. Blouin, 2002; Vilas *et al.*, 2005), quienes mencionan las ventajas de utilizar genes mitocondriales en estudios de prospección molecular, ya que éstos presentan alta tasa de mutación, no recombinan y su herencia es casi exclusivamente materna (Lanteri &

Confalonieri, 2003). Sin embargo, aun cuando el uso de un solo marcador molecular mitocondrial es cuestionable para la delimitación de especies, es de gran utilidad en la identificación de posibles especies (Hey, 2009). Adicionalmente, el uso de herramientas filogeográficas como las redes de haplotipos, han auxiliado, entre otras cosas, en la determinación de límites entre especies (Avice *et al.*, 2000, 2008; Vázquez-Domínguez, 2002, 2007; Freeland, 2005). De este modo, las aproximaciones filogeográficas pudiesen corresponder con la identificación de grupos filogenéticos, como sucedió en los taxa *R. coronatus* y *T. turgida* (Capítulo III).

De manera paralela, se pudo evidenciar por un lado, que los linajes identificados en cada uno de los taxa analizados no muestran ninguna correspondencia con respecto al hospedero a la que parasitan, ya que en los análisis filogenéticos se encuentran de manera indistinta las tres especies de marsupiales (ver discusión de los Capítulos II y III, respectivamente). Con respecto a correspondencia geográfica, se identificaron distintos niveles, desde la nula correspondencia mostrada en el acantocéfalo *O. microcephalus* (Capítulo II), hasta correspondencias geográficas particulares identificadas en los linajes del digeneo *R. coronatus* y el nematodo *T. turgida* (Capítulo III). El hecho de que ninguno de los linajes detectados en los tres taxa correspondieron con la filogenia de sus hospederos, sugieren fuertemente que no es la filogenia de estos últimos la que ha influido en la historia evolutiva de sus parásitos sino que están determinados por la distribución geográfica donde se encuentran sus hospederos y estos helmintos *per se*, influenciada principalmente por factores ecológicos. En este contexto, a partir de lo expuesto anteriormente se infiere que la divergencia de los linajes de *R. coronatus* y *T. turgida*, en primera instancia, está influenciada por eventos vicariantes y no por la asociación con sus hospederos, lo que a su vez parece indicar que las poblaciones de marsupiales no se desplazan de manera muy

activa y existe aislamiento reproductivo. De este modo, los resultados del tercer capítulo se suman a otros trabajos donde se proponen que el escenario geográfico está determinando los procesos de diferenciación genética de los parásitos (v. gr. Nieberding *et al.*, 2008; Mizukoshi *et al.*, 2012; Razo-Mendivil *et al.*, 2015).

Los resultados mencionados anteriormente indican que a pesar de que estos tres taxa parasitan de manera indistinta a diferentes especies de marsupiales en México (debido a sus hábitos alimenticios por los cuales son considerados generalistas oportunistas), las propiedades intrínsecas e historias evolutivas independientes de estos helmintos, muestran diferentes escenarios de diferenciación genética en este sistema hospedero-parásito. Estos argumentos, así como también la baja tasa de evolución de estos marsupiales (Jansa & Voss, 2000; Steiner & Catzeflis, 2004), pueden contribuir en gran medida a la falta de congruencia con respecto a la historia evolutiva de los hospederos.

La información generada en el presente trabajo de investigación indica sin lugar a dudas que las nuevas fuentes de información (como el análisis de datos moleculares) que se han incluido en los análisis de diversidad biológica, incrementa el número de entidades naturales que no habían sido detectadas por las fuentes de información tradicionales (morfología). Además, nos indica que aún falta mucho por estudiar a estos niveles, pues el presente trabajo se distingue por ser el primero en su tipo en realizarse con taxa de helmintos con historias evolutivas independientes que parasitan a un grupo de hospederos con historias evolutivas bien conocidas como lo son los didélfidos. De igual manera, el presente trabajo proporciona las bases para realizar estudios con otros grupos de mamíferos que compartan especies de helmintos y presenten un amplio rango de distribución con el objetivo de comparar las asociaciones ya que cada relación hospedero-parásito tiene su propia historia evolutiva. Asimismo, brinda la pauta

para investigar este mismo modelo en otras partes del Continente Americano donde se co-distribuyen las tres especies de marsupiales terrestres y los mismos taxa. En el intervalo geográfico que se analizó en el presente trabajo, permitió evidenciar la existencia de linajes genéticos en donde existe no solo un nivel de divergencia lo suficientemente alta para considerarlas especies diferentes (principalmente el marcador *cox 1*), sino que cada linaje exhibe monofilia recíproca y además la red de haplotipos indica que cada uno de ellos se diferencia por un número alto de pasos mutacionales, lo que apunta a que sean consideradas como unidades evolutivas independientes, o especies. La propia descripción de éstas basada en caracteres morfológicos (y el nombre correspondiente para cada una) requiere en principio la identificación de los caracteres diagnósticos a través del estudio de la morfometría y de la ultraestructura de la superficie del cuerpo con microscopía electrónica de barrido, lo que constituye un siguiente paso en nuestro proyecto de investigación. Asimismo, es necesario el contar con información de la variación genética de las tres especies a lo largo de su intervalo de distribución completo, que se extiende hacia algunas áreas del norte, centro y sur del Continente Americano, para poder tomar las decisiones taxonómicas pertinentes.

Considerando la rápida obtención de datos moleculares y métodos más novedosos para su análisis, esta permitiendo realizar trabajos de prospección molecular como primer paso en la determinación y delimitación de especies, así como la sistemática de helmintos parásitos de diversos grupos de vertebrados silvestres (*v. gr.* Pinacho-Pinacho *et al.*, 2012, 2014; Martínez-Aquino, 2014); además de formular e interpretar posibles escenarios sobre la historia evolutiva de éstos organismos con respecto a las asociaciones que tienen con sus hospederos (*v. gr.* Mejía-Madrid *et al.*, 2005; Martínez-Aquino *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta la fecha no se contaba

con ningún trabajo que abordara estos temas en helmintos parásitos de didélfidos y aspectos evolutivos en este sistema hospedero-parásito.

Conclusiones

1. El sistema hospedero-parásito analizado en el presente trabajo ha permitido caracterizar la diversidad biológica de los helmintos asociados a tres especies de marsupiales terrestres distribuidos en México a diferentes niveles. Asimismo, ha permitido caracterizar molecularmente poblaciones de tres taxa de helmintos compartidos entre estos hospederos e inferir sus relaciones de parentesco a partir de su variación genética.
2. La tasa de acumulación de especies de helmintos en el estudio de este grupo de marsupiales está decreciendo considerando solo la región Neotropical incluida en el presente estudio. Sin embargo, la realización de muestreos en la región Neártica de nuestro país, incrementaría la riqueza del inventario helmintológico de este grupo de mamíferos.
3. Hasta la fecha, la fauna helmintológica de las tres especies de didélfidos cuenta con 41 taxa, 17 en *D. virginiana*, 11 en *D. marsupialis* y ocho en *P. opossum*, lo cual indica que el número de helmintos asociados a estos hospederos es proporcional a su amplitud geográfica.
4. Se señala que los estudios de prospección molecular son necesarios en la re-evaluación del status taxonómico de diferentes especies de helmintos que tienen una amplia distribución geográfica o que se encuentran parasitando diferentes hospederos, con el objetivo de identificar posibles complejos de especies o bien, identificar especies crípticas.

5. Se sugiere el uso de múltiples fuentes de datos para establecer criterios más robustos en la delimitación de especies, a través de una aproximación integrativa para describir y delimitar entidades biológicas, pues la información genética no puede ser utilizada por sí sola, especialmente si solo se consideran los niveles de variación genética.
6. Ninguno de los linajes detectados en los tres taxa de helmintos correspondieron con la filogenia de sus hospederos, sugiriendo fuertemente que no es la filogenia de estos últimos la que ha repercutido en la historia evolutiva de sus parásitos sino que la diferenciación genética esta determinada por los patrones de distribución geográfica de sus hospederos, sugiriendo la interrupción del flujo genético entre las poblaciones de parásitos.

VI. LITERATURA CITADA

- Adams DC, Rohlf JF & Slice DE (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16
- Alden KJ (1995) Helminths of the opossum *Didelphis virginiana*, in southern Illinois, with a compilation of all helminths reported from this host in North America. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 62: 197-208
- Amrine-Madsen H, Scally M, Westerman M, Stanhope MJ, Krajewski C & Springer MS (2003) Nuclear gene sequences provide evidence for the monophyly of australidelphian marsupials. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 28: 186-196
- Aplin KP & Archer M (1987) Recent advances in marsupial systematics with a new syncretic classification. p 15-61 *In*: Possums and opossums: studies in evolution. Archer M (ed.), Royal Zoological Society of new south wales, Sydney, Australia
- Aranda M (2000) Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, México: pp 212
- Arbogast BS & Kenagy GJ (2001) Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28: 819-825
- Arcangeli-Álvarez J (2010) Comparación molecular de dos especies de tlacuache: *Didelphis virginiana* y *Didelphis marsupialis* (Mammalia: Didelphimorphia). Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Arita HT (1993) Riqueza de especies de la mastofauna de México. p 109-125 *In*: Avances en el estudio de los mamíferos de México. Medellín RA & Ceballos G (eds.), Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C., México
- Asher RJ, Horovitz I & Sánchez-Villagra MR (2004) First combined cladistic analysis of marsupial mammal interrelationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 240-250
- Avice JC (2000) *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge, England
- Avice JC (2008) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3-15
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, L. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review in Ecology and Systematics* 18: 489-522

- Ballard JW & Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744
- Baptiste E, Brinkmann H, Lee JA, Moore DV, Sensen CW, Gordon P, Duruflé L, Gaasterland T, Lopez P, Müller M & Philippe H (2002) The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba*, and *Mastigamoeba*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences* 99: 1414-1419
- Bartoli G, Sarnthein M, Weinelt M, Erlenkeuser H, Garbe-Schönberg D, Lea DW (2005) Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation. *Earth and Planetary Science Letters* 237: 33-44
- Beck RMD (2008) A dated phylogeny of marsupials using a molecular supermatrix and multiple fossil constraints. *Journal of Mammalogy* 89: 175-189
- Bell CJ, Lundelius EL Jr, Barnosky AD, Graham RW, Lindsay EH, Ruez DR Jr, Semken HA Jr, Webb SD, Zakrezewski RJ (2004) The Blancan, Irvingtonian and Rancholabrean mammal ages. p 232–314 *In: Late Cretaceous and Cenozoic Mammals of North America: biostratigraphy and geochronology*. Woodburne MO (ed.), Columbia University Press, New York, USA
- Bergsten J (2005) A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163-193
- Berry A & Barbadilla A (2000) Gene conversion is a major determinant of genetic diversity at the DNA level. p 102-123 *In: Evolutionary Genetics from Molecules to Morphology*. Singh RS & Krimbas CB (eds.) Cambridge University Press, New York, USA
- Bertoni-Ruiz F, García-Prieto L, Osorio-Sarabia D & León-Règagnon V (2011) Systematics of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in the Americas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 453-464
- Blaxter ML (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 359: 669-679
- Blouin MS (2002) Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology* 32: 527-531
- Bozinovic R, Ruiz, G, Cortés, A & Rosenmann M (2005) Energetics, thermoregulation and torpor in the Chilean mouse-opossum *Thylamys elegans* (Didelphidae). *Revista Chilena de Historia Natural* 78: 199-206
- Brooks DR & Hoberg EP (2000) Triage for the Biosphere: the need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. *Comparative Parasitology* 67: 1-25

- Brooks DR & Hoberg EP (2006) Systematics and emerging infectious diseases: from management to solution. *Journal of Parasitology* 92: 426-429
- Brooks DR & McLennan DA (1993) *Parascript: parasites and the language of evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., USA: pp 430
- Brooks DR, Van Veller M & McLennan DA (2001) How to do BPA, really? *Journal of Biogeography* 28: 343-358
- Caballero CE (1937) Nematodos de algunos vertebrados del Valle del Mezquital, Hidalgo. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 8: 189-193
- Caballero CE (1951) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda 2a parte. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 15: 389-407
- Caballero CE (1958) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda 10a parte. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN* 9: 61-76
- Caballero CE, Bravo-Hollis M, Zerecero C (1944) Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Trematoda I. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 15: 59-72
- Campbell N & Reece JB (eds.) (2009) *Biology*. 8th edition, Pearson Education, Inc.
- Cañeda-Guzman C (1997) Parásitos de tres especies de marsupiales de la Estación “Los Tuxtlas” y algunas zonas cercanas, Veracruz, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., pp 193
- Carrillo JD, Forasiepi A, Jaramillo C & Sánchez-Villagra M (2014) Neotropical mammal diversity and the Great American Biotic Interchange: spatial and temporal variation in South America's fossil record. *Frontiers in Genetics* 5: 451-481
- Carvalho FMV, Fernandez FAS & Nessimian JL (2005) Food habits of sympatric opossums coexisting in small Atlantic Forest fragments in Brazil. *Mammalian Biology* 70: 366-375
- Case JA, Goin FJ & Woodburne MO (2005) “South American” marsupials from the Late Cretaceous of North America and the origin of marsupial cohorts. *Journal of Mammalian Evolution* 11: 223-255
- Catalán-Rodríguez P (2001) Análisis filogenéticos. pp 182
- Caujape-Castells J, Pedrola-Monfort J & Membrives-Fernández N (2003) Aspectos filosóficos del análisis de datos en sistemática molecular. *Botánica Macaronésica* 24: 127-141

- Ceballos G & Oliva G (2005) Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica, México: pp 986
- Ceballos G, Arroyo-Cabrales J, Medellín RA & Domínguez-Castellanos Y (2005) Lista actualizada de los mamíferos de México. *Revista Mexicana de Mastozoología* 9: 21-71
- Ceccarelli FS, Sharkey MJ & Zaldívar-Riverón A (2012) Species identification in the taxonomically neglected, highly diverse, neotropical parasitoid wasp genus *Notiospathius* (Braconidae: Doryctinae) based on an integrative molecular and morphological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 485-495
- Cerqueira R & Tribe CJ (2008) Genus *Didelphis* Linnaeus, 1758. p 17-25 *In: Mammals of South America: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. Vol. 1.* Gardner AL (ed.), Chicago University Press, Chicago, USA
- Cerritos-Flores R (2007) La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. p 325-359 *En: Ecología Molecular.* Eguiarte L, Souza V & Aguirre X (compiladores) INE-SEMARNAT-CONABIO, México: pp 592
- Cervantes FA, Arcangeli-Álvarez J, Hortelano-Moncada Y, Borisenko AV (2010) DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. *Mitochondrial DNA* 21: 44-50
- Cifelli RL & Davis BM (2003) Marsupial origins. *Science* 302: 1899-1900
- Coates A, Collins L, Aubry M & Berggren W (2004) The geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama arc with northwestern South America. *Geological Society of American Bulletin* 116: 1327-1344
- Cordell RL (1974) Helminth parasites of the Virginia opossum, *Didelphis virginiana*, in Southern Illinois. Master's Scholar Thesis. Southern Illinois University, Carbondale, USA: pp 55
- Corréa-Gomes D, Pereira da Cruz R, Vicente JJ, Pinto MR (2003) Nematode parasites of marsupials and small rodents from the Brazilian Atlantic forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 699-707
- Cozzuol MA (2006) The Acre vertebrate fauna: age, diversity, and geography. *Journal of South American Earth Sciences* 21: 185-203

- Cracraft J (2000) Species Concepts in Theoretical and Applied Biology: a systematic debate with consequences. p 3-14 *In: species concepts: a debate*. Wheeler QD & Meier R (eds.) Columbia University Press, New York, USA: pp 256
- Criscione CD, Poulin R & Blouin MS (2005) Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* 14: 2247-2257
- Cummings MP, Neel MC & Shaw KL (2008) A genealogical approach to quantifying lineage divergence. *Evolution* 62: 2411-2422
- de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879-886
- Domínguez-Domínguez O & Vázquez-Domínguez E (2009) Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32: 59-70
- Dorris M, Viney ME & Blaxter ML (2002) Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *International Journal for Parasitology* 32: 1507-1517
- Eaton MJ, Meyers GL, Sergios-Orestis K, Matthew SL, Andrew PM & Amato G (2010) Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics* 11: 1389-1404
- Eguiarte LE, Souza V, Nuñez-Farfán J, Hernández-Baños B (1997) El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. *Boletín de la Sociedad de Botánica de México* 60: 169-181
- Elias M, Hill RI, Willmott KR, Dasmahapatra KK, Brower AVZ, Mallet J & Jiggins CD (2007) Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 2881-2889
- Ellis RD, Pung OJ & Richardson DJ (1999) Site selection by intestinal helminths of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Journal of Parasitology* 85: 1-5
- Flores DA, Díaz MM & Barquez RM (2007) Systematics and distribution of marsupials in Argentina: a review. *Publications in Zoology* 134: 579-669.
- Freeland JR (2005) Molecular ecology. John Wiley & Sons, England
- García-Prieto L, Falcón-Ordaz J, Guzmán-Cornejo C (2012) Helminth parasites of wild mexican mammals: list of species, hosts and geographical records. *Zootaxa* 3290: 1-92
- Gardner AL (1973) The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. *Special Publication of the Texas Tech University* 4: 1-81
- Gardner AL & Creighton GK (2007) Genus *Micoureus* Lesson, 1842. p 74-82 *In: Mammals of South America: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. Vol. 1. Gardner AL (ed.), Chicago

University Press, Chicago, USA

- Gebiola M, Gómez-Zurita J, Monti MM, Navone P & Bernardo U (2012) Integration of molecular, ecological, morphological and endosymbiont data for species delimitation within the *Phnigalio soemius* complex (Hymenoptera: Eulophidae). *Molecular Ecology* 21: 1190-1208
- Gilmore SR, Gräfenhan T, Louis-Seize G & Seifert KA (2009) Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources* 9: 90-98
- Goldstein PZ & DeSalle R (2011) Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays* 33: 135-147
- Gutiérrez-Fuster I (1966) Estudio de helmintos parásitos de algunos animales del Parque Zoológico de Chapultepec, D.F., México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F.: pp 79
- Hall ER (1981) The mammals of North America. Wiley Interscience, New York, USA: pp 1181
- Hambäck PA, Weingartner E, Ericson L, Fors L, Cassel-Lundhagen A, Stenberg JA & Bergsten J. (2013) Bayesian species delimitation reveals generalist and specialist parasitic wasps on *Galerucella* beetles (Chrysomelidae): sorting by herbivore or plant host. *BMC Evolutionary Biology* 13: 92-106
- Hanzelová V & Scholz T (1999) Species of *Proteocephalus* Weinland, 1858 (Cestoda: Proteocephalidae), parasites of coregonid and salmonid fishes from North America: taxonomic reappraisal. *Journal of Parasitology* 85: 94-101
- Hanzelová V, Kuchta R, Scholz T & Shinn AP (2005) Morphometric analysis of four species of *Eubothrium* (Cestoda: Pseudophyllidae) parasites of salmonid fish: an interspecific and intraspecific comparison. *Parasitology International* 54: 207-214
- Hardy, ME, Grady JM & Routman EJ (2002) Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of United States. *Molecular Ecology* 11: 2393-2403
- Harverkost T & Gardner SL (2008) A review of species in the genus *Rhopalias* (Rudolphi, 1819). *Journal of Parasitology* 94: 716-726
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL & deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270: 313-321
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH & Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812-14817
- Hey J (2009) On the arbitrary identification on the real species. p 15-28 *In: Speciation and patterns of diversity*. Butlin R, Bridle J & Schluter D (eds.), Cambridge University Press, England
- Hillis DM & Wiens JJ (2000) Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. p 1-19 *In: Phylogenetic analysis of morphological data*. Wiens JJ (ed.), Smithsonian Institution Press, Washington, USA
- Hoberg EP & Brooks DR (2008) A macroevolutionary mosaic: episodic host-switching, geographical colonization and diversification in complex host-parasite systems. *Journal of Biogeography* 35: 1533-1550
- Horovitz I & Sánchez-Villagra MR (2003) A morphological analysis of marsupial mammal higher-level phylogenetic relationships. *Cladistics* 19: 181-212
- Hudson PJ, Dobson AP & Lafferty KD (2006) Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution* 21: 381-385
- Hudson RR (1998) Island models and the coalescent process. *Molecular Ecology* 7: 413-418
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R & Bollback JP (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314
- Hugot JP, Baujard P & Morand S (2001) Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology* 3: 199-208
- IUCN (International Union for the Conservation of Nature, 2008) Red List of Threatened Species (available online at: www.iucnredlist.org)
- Jansa SA & Voss RS (2000) Phylogenetic studies on didelphid marsupials I. Introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 7: 43-77
- Jansa SA, Keith-Barker F & Voss RS (2013) The early diversification history of Didelphid marsupials: a window into South America's "splendid isolation". *Evolution* 68: 684-695
- Jiménez-Ruiz A, Catzefflis F & Gardner SL (2011) Structure of parasite component communities of didelphid marsupials: insights from a comparative study. *Journal of Parasitology* 97: 779-787
- Johnson KP, Adams RJ, Page RDM & Clayton DH (2003) When do parasites fail to speciate in response to host speciation? *Systematic Biology* 52: 37-47
- Kielan-Jaworowska Z, Cifelli RL & Luo Z-X (2004) Mammals from the age of dinosaurs: origins,

- evolution, and structure. Columbia University Press, New York, USA
- Kirby MX & MacFadden B (2005) Was southern Central America an archipelago or a peninsula in the Middle Miocene? A test using land-mammal body size. *Palaeo* 228: 193-202
- Krause JW & Krause AW (2006) The opossum: it's amazing history. University of Missouri, Columbia, Missouri, USA: pp 87
- Krockenberger A (2006) Lactation. p 108-136 *In*: Marsupials. Armati P, Dickman C & Hume I. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, England
- Kuhner MK (2009) Coalescent genealogy samplers: windows into populations history. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 86-93
- Lamothe-Argumedo R (1978) Trematodos de mamíferos I. Redescrpción de *Rhopalias macracanthus* Chandler, 1932 y algunas consideraciones sobre el género. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 49: 25-34
- Lamothe-Argumedo R, Caballero-Deloya J, Pineda-López R, Meave-Gallegos O (1985) Hallazgo de *Paragonimus mexicanus* en nuevo hospedero y una localidad en México. *Universidad y Ciencia* 2: 41-45
- Lanteri A & Confalonieri V (2003) Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. p 185-194 *En*: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. Morrone JJ & Llorente J (eds.), CONABIO, México
- León-Règagnon V (2010) Evidence of new species of *Haematoloechus* (Platyhelminthes: Digenea) using partial *cox1* sequences. *Mitochondrial DNA* 21: 12-17
- León-Règagnon V & Brooks D (2003) Molecular phylogeny of *Haematoloechus* Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchiidae), with emphasis on north American species. *Journal of Parasitology* 89: 1206-1211
- León-Règagnon V, Pérez-Ponce de León G & Brooks D (1996) Phylogenetic analysis of *Opisthadenia* (Digenea: Hemiuridae). *Journal of Parasitology* 82: 1005-1010
- Lew D, Pérez-Hernández R & Ventura J (2006) Two new species of *Philander* (Didelphimorphia, Didelphidae) from northern South America. *Journal of Mammalogy* 87: 224-237
- Lewis PO (2001) A likelihood approach to inferring phylogeny from discrete morphological characters. *Systematic Biology* 50: 913-925

- López-Caballero J, Ocegüera-Figueroa A & León-Règagnon V (2013) Detection of multiple species of human *Paragonimus* from Mexico using morphological data and molecular barcodes. *Molecular Ecology Resources* 13: 1125-1136
- López-Caballero J, Osorio-Sarabia D & García-Prieto L (2009) *Cucullanus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Cucullanidae), a parasite of *Bagre pinnimaculatus* (Siluriformes: Ariidae) from Río Tempisque, Costa Rica. *Journal of Parasitology* 95: 413-423
- Luo Z-X, Ji Q, Wible JR & Yuan C-X (2003) An Early Cretaceous tribosphenic mammal and metatherian evolution. *Science* 302: 1934-1940
- Luo Z-X, Yuan C-X, Meng Q-J & Ji Q (2011) A Jurassic eutherian mammal and divergence of marsupials and placentals. *Nature* 476: 442-445
- Marcogliese D (2003) Food webs and biodiversity: are parasites the missing link? *Journal of Parasitology* 82: 389-399
- Marshall LG, Case JA & Woodbourne MO (1990) Phylogenetic relationships of the families of marsupials. p 433-505 *In: Current Mammalogy*. Genoways HH (ed.), Vol. 2. Plenum Press, New York, USA
- Martínez-Aquino A, Ceccarelli FS & Pérez-Ponce de León G (2013) Molecular phylogeny of the genus *Margotrema* (Digenea: Allocreadiidae), parasitic flatworms of goodeid freshwater fishes across central México: species boundaries, host-specificity and geographical congruence. *Zoological Journal of the Linnean Society* 168: 1-66
- Martínez-Aquino A, Ceccarelli FS, Eguiarte LE, Vázquez-Domínguez E & Pérez-Ponce de León G (2014) Do the historical biogeography and evolutionary history of the digenean *Margotrema* spp. across Central Mexico Mirror those of their freshwater fish hosts (Goodeinae)? *PLoS ONE* 9: e101700
- Mayden RL (1997) A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. p 381-424 *In: Species: the units of biodiversity*. Claridge MF, Dawah HA & Wilson MR (eds.), Chapman & Hall, London, England: pp 260
- Mayden RL & Wood RM (1995) Systematics, species concepts and the evolutionarily significant unit in biodiversity and conservation biology. *American Fisheries Society Symposium Series* 17: 58-113
- McManus JJ (1974) *Didelphis virginiana*. *Mammalian Species* 40: 1-6
- McNab BK (2005) Uniformity in the basal metabolic rate of marsupials: its causes and consequences. *Revista Chilena de Historia Natural* 78: 183-198

- Mejía-Madrid H, Domínguez-Domínguez O & Pérez-Ponce de León G (2005) Adult endohelminth parasites of Goodeinae (Cyprinodontiformes: Goodeidae) from Mexico. *Comparative Parasitology* 72: 200-211
- Meredith RW, Westerman M, Case JA & Springer MS (2008) A phylogeny and timescale for marsupial evolution based on sequences for five nuclear genes. *Journal of Mammalian Evolution* 15: 1-36
- Miyazaki I, Ishii Y (1968) Studies on the mexican lung flukes, with special reference to a description of *Paragonimus mexicanus* sp. nov. (Trematoda: Troglotremitidae). *Japanese Journal of Parasitology* 17: 445-453
- Miyazaki I, Kifune T, Lamothe-Argumedo R (1980) Taxonomical and biological studies on the lung flukes of Central America. Department of Parasitology, School of Medicine, Fukuoka University, Japan: pp 28
- Mizukoshi A, Johnson KP & Yoshizawa K (2012) Co-phylogeography and morphological evolution of sika deer lice (*Damalinea sika*) with their hosts (*Cervus nippon*). *Parasitology* 139: 1614-1629
- Monaghan MT, Wild R, Elliot M (2009) Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology* 58: 298-311
- Monet-Mendoza A, Osorio-Sarabia D, García-Prieto L (2005) Helminths of the Virginia Opossum *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphidae) in Mexico. *Journal of Parasitology* 91: 213-219
- Monsiváis-Aguilar MBG (1958) Estudio sobre algunos nematodos de mamíferos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México DF: pp 89
- Morgan GS (2008) Vertebrate fauna and geochronology of the Great American Biotic Interchange in North America. *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin* 44: 93-140
- Morrone JJ (2004) Homología biogeográfica: las coordenadas espaciales de la vida. Cuadernos del Instituto de Biología número 37, Instituto de Biología, UNAM, México
- Muizon C & Lange-Badré B (1997) Carnivorous dental adaptations in tribosphenic mammals and phylogenetic reconstruction. *Lethaia* 30: 353-366
- Nadler SA (2002) Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. *Nematology* 4: 615-625
- Nadler SA & Pérez-Ponce de León G (2011) Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology* 13: 1688-1709

- Nadler SA & Pérez-Ponce de León G (2011) Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology* 138: 1688-1709
- Nadler SA, Pérez-Ponce de León G (2011) Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology *Parasitology* 13: 1688-1709
- Navone GT & Suriano DM (1992) Species composition and seasonal dynamics of the helminth community parasitizing *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) in savannas of central Argentina. *Ecological Australia* 2: 95-100
- Near TJ, Garey JR & Nadler SA (1998) Phylogenetic relationships of the Acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 10: 287-298
- Nieberding CM, Durette-Desset M-C, Vanderpoorten A, Casanova JC, Ribas A, Deffontaine V, Feliu C, Morand S, Libois R & Michaux JR (2008) Geographic and host biogeography matter for understanding the phylogeography of a parasite. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 538-554
- Nielsen R & Beaumont MA (2009) Statistical inferences in phylogeography. *Molecular Ecology* 18: 1034-1047
- Nilsson MA, Arnason U, Spencer PBS & Janke A (2004) Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana. *Gene* 340: 189-196.
- Nordborg M (2000) Coalescent theory. p 1-37 *In*: Handbook of statistical genetics. Balding DJ, Bishop MJ & Cannings C (eds.), John Wiley & Sons, London, United Kingdom
- Nowak RM (1999) Walker's Mammals of the World. Vol. 1. 6th edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA
- Oceguera-Figueroa A, León-Règagnon V & Siddall ME (2005) Phylogeny and revisión of Erpobdelliformes (Annelida, Arhynchobdellidae) from Mexico base on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76: 191-198
- Olson PD, Littlewood DTJ, Bray RA & Mariaux J (2001) Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) *Molecular Phylogenetic and Evolution* 19: 443-467
- Outlaw DC, Voelker G, Mila B, Girman DJ (2003) The evolution of migration in, and historical biogeography of the *Catharus thrushes*: a molecular phylogenetic approach. *The Auk* 120: 299-310

- Padial JM & De la Riva I (2006) Taxonomic inflation and the stability of species lists: the perils of ostrich's behavior. *Systematic Biology* 55: 859-867
- Page RDM (2003) Tangled Tress: phylogeny, cospeciation, and coevolution. The University of Chicago Press, Chicago, USA: pp 378
- Page RDM & Charleston MA (1998) Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Tree* 13: 356-359
- Patton JL & Costa LP (2003) Molecular phylogeography and species limits in rainforest *Didelphis marsupialis* of South America. p 63-81 *In: Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials*. Jones M, Dickerman C & Archer M (eds.) CSIRO, Collingwood, Australia
- Patton JL & da Silva MNF (1997). Definition of species of pouched four-eyed oposums (Didelphidae, *Philander*). *Journal of Mammalogy* 78: 90-102
- Patton JL, dos Reis SF & da Silva MNF (1996) Relationships among didelphid marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Journal of Mammalian Evolution* 3: 3-29
- Pérez-Ponce de León G & Brooks D (1995) Phylogenetic relationships of the genera of the Pronocephalidae Looss, 1902 (Digenea: Paramphistomiformes). *Journal of Parasitology* 81: 267-277
- Pérez-Ponce de León G & García-Prieto L (2001) Diversidad de helmintos parásitos de vertebrados silvestres de México. CONABIO, *Biodiversitas* 37: 7-11
- Pérez-Ponce de León G & Nadler SA (2010) What we don't recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species. *Journal of Parasitology* 96: 453-464
- Pérez-Ponce de León G, García-Prieto L & Mendoza-Garfias B (2011) Describing parasite biodiversity: the case of the helminth fauna of wildlife vertebrates in Mexico. p 33-54 *In: Changing diversity in changing environment*. Grillo O & Venora G (eds.) InTech Press, Rijeka, Croatia: pp 402
- Pinacho-Pinacho CD, Pérez-Ponce de León G & García-Varela M (2012) Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters. *Parasitology International* 61: 634-644
- Pinacho-Pinacho CD, Sereno-Urbe AL & García-Varela M (2014) Morphological and molecular data reveal a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from *Dormitator maculatus* in the Gulf of Mexico. *Parasitology International* 63: 763-771

- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD & Vogler AP (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595-609
- Posada D & Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818
- Poulin R & Morand S (2000) The diversity of parasites. *The Quarterly Review of Biology* 75: 277-293
- Poulin R & Morand S (2004) Parasite biodiversity. Smithsonian Institution Books, Washington D.C., USA: pp 216
- Powell JR (2012) Accounting for uncertainty in species delineation during the analysis of environmental DNA sequence data. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 1-11
- Prado-Ancona JD (1993) Estudio taxonómico de diez especies de acantocéfalos (*Acanthocephala* Rudolphi, 1801) de vertebrados de México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.: pp 156
- Premvati G & Bair TD (1979) Trematode parasites of the opossum, *Didelphis virginiana*, from Florida. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 46: 207-212
- Rach D, DeSalle R, Sarkar IN, Schierwater B & Hadrys H (2008) Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 237-247
- Ramírez-Pulido J, Arroyo-Cabrales J & Castro-Campillo A (2005) Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. *Acta Zoológica Mexicana* 21: 21-82
- Razo-Mendivil U, Rosas-Valdez R, Rubio-Godoy M, Pérez-Ponce de León G (2015) The use of mitochondrial and nuclear sequences in prospecting for cryptic species in *Tabascotrema verai* (Digenea: Cryptogonimidae), a parasite of *Petenia splendida* (Cichlidae) in Middle America. *Parasitology International* 64: 173-181
- Razo-Mendivil U, Vázquez-Domínguez E, Rosas-Valdez, Pérez-Ponce de León G & Nadler SA (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
- Richardson DJ & Campo JD (2005) Gastrointestinal helminths of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) in south-central Connecticut, USA. *Comparative Parasitology* 72: 183-185

- Richardson DJ, Gardner SL & Allen JW (2014) Redescription of *Oligacanthorhynchus microcephalus* (Rudolphi, 1819) Schmidt 1972 (syn. *Oligacanthorhynchus tortuosa*) (Leidy, 1850) Schmidt 1972 (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae). *Comparative Parasitology* 81: 53-60
- Ricklefs RE (2002) Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society of London* 269: 885-892
- Riddle BR, Hafner DJ & Alexander LF (2000). Phylogeography and systematics of the *Peromyscus eremicus* species group and the historical biogeography of North American warm regional deserts. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 17: 145-160
- Riddle BR, Hafner DJ, Alexander LF & Jaeger JR (2000) Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14438-14443
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574
- Rosas-Valdez R, Choudhury A & Pérez-Ponce de León G (2004) Phylogenetic analysis among the genera of Corallobothriinae (Cestoda: Proteocephalidae) using partial sequences of the 28S ribosomal gene. *Journal of Parasitology* 90: 1123-1127
- Rosenberg NA & Nordborg M (2002) Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 3: 380-390
- Rubinoff D & Holland BS (2005) Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology* 54: 952-961
- Sánchez-Cordero V, Botello F, Flores-Martínez JJ, Gómez-Rodríguez RA., Guevara-López L, Gutiérrez-Granados G & Rodríguez-Moreno A (2014) Biodiversidad de Chordata (Mammalia) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 496-504
- Sass C, Little DP, Stevenson DW & Specht CD (2007) DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of Cycads. *PLoS ONE* 2: e1154
- Sato Y, Le TH, Hiraike R, Yukawa M, Sakai T, Rajapakse RP & Agatsuma T (2008) Mitochondrial DNA sequence and gene order of the Sri Lankan *Schistosoma nasale* is affiliated to the African/Indian group. *Parasitology International* 57: 460-464

- Seberg O, Humphries CJ, Knapp S, Stevenson DW, Petersen G, Scharff N & Andersen NM (2003) Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 63-65
- Simpson G (1980) Splendid isolation: the curious history of mammals in South America. Yale University Press, New Haven, USA
- Sites JW & Marshall JC (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 462-470
- Sneath PHA (1976) Phenetic taxonomy at the species level and above. *Taxon* 25: 437-450
- Stehli FG & Webb SD (1985). The great American biotic interchange. Plenum Press, New York, USA
- Steinauer ML, Nickol BB & Ortí G (2005) Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of variable acanthocephalan parasite. *Molecular Ecology* 16: 4097-4109
- Steiner C, Catzefflis FM (2004) Genetic variation and geographical structure of five mouse-sized opossum (Marsupialia, Didelphidae) throughout the Guiana Region. *Journal of Biogeography* 31: 959-973
- Swofford DL (1998) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony* and Other Methods, Version 4b10. Computer software and manual. Sunderland MA: Sinauer Associate
- Tatlisumak E, Ovaldi GY, Asirdizer M, Aslan A, Ozyurt B, Bayindir P & Tarhan S (2008) CT Study on morphometry of frontal sinus. *Clinical Anatomy* 21: 287-293
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH & Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 70-74
- Templeton AR (2006) Genetic drift in large populations and coalescence. p 118- 167 *In: Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA: 705 pp
- Vahugan TA, Ryan JM & Czaplewski NJ (2015) Mammalogy 6th edition, Jones & Bartlett Learning, Burlington, USA
- Van der Molen S, Martínez NA & González JR (2007) Introducción a la morfometría geométrica: curso teórico-práctico. Universitat de Barcelona, España: pp 82
- Van Valen L (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*. 25, 233–239
- Vaughan TA, Ryan JM & Czaplewski NJ (2000) Mammalogy. Saunders Company, Toronto, Canadá: pp 565

- Vázquez-Domínguez E, Castañeda-Rico S, Garrido-Garduño T & Gutierrez-García T (2009) Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 277-297
- Vázquez-Domínguez E (2002) Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. p 369-378 *In: Protected areas and the regional planning imperative in North America*. Nelson G, Day JC, Sportza LM, Loucky J & Vásquez C (eds.), University of Calgary Press, Canada
- Vázquez-Domínguez E (2007) Filogeografía y vertebrados. p 441-466 *En: La Ecología molecular de plantas y animales*. Eguiarte L, Souza V & Aguirre X (eds.), INE, Mexico
- Vieira EM & Astúa de Moraes D (2003) Carnivory and insectivory in Neotropical marsupials. p. 267-280 *In: Predators with pouches: the biology of carnivorous marsupials*. Jones M, Dickman C & Archer M (eds.), CSIRO Publishing, Melbourne, Australia
- Vilas R, (2005) A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* 131: 1-8
- Vilas R, Criscione CD & Blouin MS (2005) A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* 131: 1-8
- Villa RB & Cervantes FA (2003) Los mamíferos de México. Grupo Editorial Iberoamérica e Instituto de Biología, UNAM, México
- Voss RS & Jansa SA (2003) Phylogenetic studies on Didelphids II. Nonmolecular data and new IRBP sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxón sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 276: 1-82
- Voss RS & Jansa SA (2005) On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *American Museum Novitates* 3482: 1-34
- Voss RS & Jansa SA (2009) Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of new world metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 322: 1-177
- Voss RS, Gardner AL & Jansa SA (2004) On the relationships of “*Marmosa*” formosa Shamel, 1930 (Marsupialia: Didelphidae), a phylogenetic puzzle from the Chaco of northern Argentina. *American Museum Novitates* 3442: 1-18

- Wahl C, Li T, Choden T & Howland H (2009) Morphometrics of corneal growth in chicks raised in constant light. *Journal of Anatomy* 214: 355-361
- Webb SD (2006) The Great American Biotic Interchange: patterns and processes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93: 245-257
- Wilkins JS (2009) Species: a history of the idea. University of California Press, Berkeley, CA, USA: pp 320
- Wilkins JS (2011) Philosophically speaking, how many species concepts are there? *Zootaxa* 2765: 58-60
- Wilson DE & Reeder DM (2005) Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference 3rd edition, Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA
- Woodburne M (2010) The Great American Biotic Interchange: dispersals, tectonics, climate, sea level and holding pens. *Journal of Mammalian Evolution* 17: 245-264
- Woodburne MO & Case JA (1996) Dispersal, vicariance, and the Late Cretaceous to Early Tertiary land mammal biogeography from South America to Australia. *Journal of Mammalian Evolution* 3: 121-161
- Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS & Ito A (2005) *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *International Journal for Parasitology* 35: 693-701
- Zink RM (2002) Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North America aridlands. *Integrative and Comparative Biology* 42: 953-959