



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Prospección molecular en la búsqueda de especies crípticas en dos especies
de nematodos parásitos de *Astyanax* spp. de México y Centro América:**

Rhabdochona mexicana* y *Procamballanus neocaballeroi

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANA OFELIA SANTACRUZ VÁZQUEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Gerardo Pérez Ponce De León,
Instituto De Biología, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: Dr. José Martín García Varela,
Instituto De Biología, UNAM.
Dr. Rogelio Aguilar Aguilar,
Facultad De Ciencias, UNAM.**

MÉXICO, CD. MX.

SEPTIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 EXPERIMENTAL

Prospección molecular en la búsqueda de especies crípticas en dos especies de nematodos parásitos de *Astyanax* spp. de México y Centro América:

Rhabdochona mexicana y *Procamallanus neocaballeroi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANA OFELIA SANTACRUZ VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Gerardo Pérez Ponce De León,
Instituto De Biología, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dr. José Martín García Varela,
Instituto De Biología, UNAM.
Dr. Rogelio Aguilar Aguilar,
Facultad De Ciencias, UNAM.

MÉXICO, CD. MX.

SEPTIEMBRE 2017



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora 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 5 de junio de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SANTACRUZ VÁZQUEZ ANA OFELIA** con número de cuenta **515015531** con la tesis titulada "**Prospección molecular en la búsqueda de especies crípticas en dos especies de nematodos parásitos de *Astyanax* spp. de México y Centro América: *Rhabdochona mexicana* y *Procamallanus neocaballeroi***", realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN**:

Presidente: DRA. CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA
Vocal: M. EN C. LUIS GARCÍA PRIETO
Secretario: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
Suplente: DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR
Suplente: DR. JOSÉ JAIME ZÚÑIGA VEGA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de agosto de 2017.



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACyT por la beca otorgada.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN 204514.

Al mi tutor principal el Dr. Gerardo Pérez Ponce de León, por su inigualable confianza y ayuda.

A los miembros del comité tutor: Dr. Gerardo Pérez Ponce de León, Dr. Martín García Varela y Dr. Rogelio Aguilar Aguilar.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Primero quiero agradecer a mi asesor el Dr. Gerardo Pérez Ponce de León por su ayuda y apoyo, por recibirme en su equipo de trabajo y confiar en mí.

A los personajes icónicos y esencia de la Colección Nacional de Helmintos (CNHE), los MAESTROS David Osorio y Luis García Prieto, por su invaluable ayuda y amistad.

Este estudio es el producto del trabajo y aportación de muchas personas, por lo que espero hacer justicia a sus horas esfuerzo, es así que agradezco enormemente a la Dra. Patricia Ornelas, al Laboratorio del Dr. García Varela y a otros colectores desconocidos.

En especial agradezco a David Hernández quién me apoyó en todo momento. David, este trabajo te pertenece.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y correcciones, la Dra. Patricia Ornelas, M. en C. Luis García Prieto, Dr. Martín García Varela, Dr. Rogelio Aguilar Aguilar y Dr. Jaime Zuñiga.

A Berenit Mendoza por su ayuda y enseñanzas en microscopía.

A mis amigos y *familia* de la CNHE: Nallely Ruíz, David Hernández, Alejandro Ocegüera, Leopoldo Andrade, Ricardo Salas, Omar Lagunas, Alma Islas, Brenda Solórzano, Gisela Flores, Yanet Velázquez, Berenit Mendoza, Leticia Barragán, Jhonatan Cabañas, Carlos Palmero, Zurya Díaz, Jossue Jiménez, Gerardo Torres, Nancy Bárcenas, Alejandra López, y en general, a todos los miembros de la CNHE. A quienes agradezco su ayuda en todos los aspectos de este trayecto. De verdad los quiero.

A mis amigos del laboratorio *Zebrafish*, Abigail, Maryana, Gabriela, Cecilia, José Luis, Sra. Rocío, con quienes viví grandes aventuras.

A mis amigos entrañables Alejandra Ayala, Aldo Téllez, Christian Robles, Cecilia Barragán y Jesús Jiménez.

A Oscar García por su apoyo incondicional.

Durante este proyecto la biblioteca central fungió como mi refugio y fuente de inspiración, junto a cientos de estudiantes con un mismo propósito, adquirir conocimiento. Por lo tanto, me emociona pensar que escribí dentro de las mismas paredes que han inspirado a otros cientos de estudiantes por décadas en esta

casa de estudios que ahora siento mi hogar, y que un sentido literal, lo ha sido. Gracias UNAM.

Siempre he pensado que la pregunta es más importante que el modelo, sin embargo, el misterio que *Astyanax* representa ha cautivado mis pensamientos, suscitando en torno a él una lluvia de incógnitas e inspiración. Llena mi fascinación y me produce un enorme entusiasmo. Serendipia me condujo a ellos a través de uno de los maestros que más admiro. Por eso y más, gracias Fausto Arellano.

A los peces ciegos y no ciegos, y a sus parásitos.

Se dice que los perros son los compañeros fieles, y así ha sido, mis cachorros Darwin y Bob han sido mi compañía incondicional en estos años.

A mi familia, en especial a mis hermanos y sobrinos.

Finalmente agradezco a mi padre, mi mayor fortaleza, a quien como siempre le dedico cada paso hacia adelante en mi vida.

Este estudio está dedicado a mi padre.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	4
II. ANTECEDENTES.....	10
▪ ¿Qué es una especie? Los conceptos de especie.....	10
▪ El proceso de especiación.....	11
▪ Las especies crípticas ¿Cómo se mantienen? ¿Cómo surgen? ¿Por qué no vemos cambios?	12
▪ La delimitación de especies; el aporte de distintas evidencias.....	14
▪ El estudio de las especies crípticas en nematodos.....	16
▪ El género <i>Procamallanus</i>	19
▪ El género <i>Rhabdochona</i>	24
▪ El hospedero, <i>Astyanax</i> spp.....	30
III. HIPÓTESIS.....	35
IV. OBJETIVOS.....	35
V. METODOLOGÍA GENERAL.....	36
VI. RESULTADOS.....	43
▪ CAPÍTULO I: Prospección molecular de <i>Procamallanus neocaballeroi</i> en especies de <i>Astyanax</i> spp. habitantes de cuevas y de superficie.....	44
▪ CAPÍTULO II: Diversidad genética de <i>Rhabdochona mexicana</i> en <i>Astyanax</i> spp. en México, ¿una sola especie o un complejo de especies?.....	80

VII. DISCUSIÓN GENERAL.....	126
VIII. CONCLUSIONES.....	134
IX. LITERATURA CITADA.....	135

RESUMEN

Las especies crípticas son morfológicamente indistinguibles pero genéticamente difieren. En el caso de los nematodos las especies crípticas constituyen un grupo numeroso dentro de los parásitos de vertebrados. Los nematodos *Rhabdochona mexicana* y *Procamallanus neocaballeroi* forman parte de la fauna principal de helmintos de peces del género *Astyanax*. Ambas especies de parásitos tienen historias evolutivas independientes, una de origen Neártico y otra de origen Neotropical, y han convergido en un área geográfica similar. *Astyanax* es un género de peces diverso, que ha sido capaz de colonizar ambientes de cueva en la región de la Sierra del Abra en México, en esta zona algunos de sus parásitos han sido capaces de continuar su ciclo de vida en un ambiente considerado extremo, incluso parásitos de ciclo de vida indirecto como *P. neocaballeroi*. La colonización de *Astyanax* desde Mesoamérica hacia su distribución más al norte, ha dado lugar a varios linajes evolutivos, y tres especies que se distribuyen en México. Esta divergencia permite plantear la hipótesis de que sus nematodos parásitos también han divergido, pero los análisis morfológicos clásicos no han permitido determinar la presencia de otras especies. Una aproximación molecular, es por tanto la metodología inicial para la prospección de especies crípticas en este estudio. A partir de los resultados del marcador mitocondrial (Cox1), y dos marcadores nucleares (28S y 18S rDNA) se encontró que ambos géneros de parásitos están conformados por un complejo de especies, donde varios de estos linajes corresponden a especies crípticas debido a que hasta el momento no se encontraron diferencias morfológicas. Cada linaje propuesto presenta monofilia recíproca, que permite observar una especificidad hospedatoria aún más estricta que la reportada previamente, y en la mayoría de los linajes, un patrón geográfico, pero sin un significativo aislamiento por distancia. La delimitación de los linajes se complementa con las distancias genéticas propuestas para nematodos, siendo mayor al 5% para el gen Cox1 en todos los linajes. Sin embargo, no existe una correspondencia aparente con los linajes conocidos de *Astyanax*, lo que permite inferir que ambos grupos de parásitos han seguido una historia evolutiva distinta a

la de su hospedero. Este estudio logra identificar especies crípticas de nematodos parásitos de *Astyanax* y separar morfológicamente a uno los linajes.

ABSTRACT

The cryptic species are morphologically indistinguishable but genetically different. In nematodes the cryptic species constitute a numerous group within vertebrate parasites. The nematodes *Rhabdochona mexicana* and *Procamallanus neocaballeroi* are part of the main helminth fauna from *Astyanax* genus. Both parasite species have distinct evolutionary histories, one of them is from the Nearctic and the other one is from the Neotropics, but had converged in a similar distribution. *Astyanax* is a genus of fishes highly diverse, it has been able to colonize even cave environment in the region of Sierra El Abra in Mexico, where some of its parasites have continued its life cycle in this environment considered extreme, even parasites with complex life cycles as *P. neocaballeroi*. Since the *Astyanax* colonization from Mesoamerica to its northern distribution have given place to evolutive lineages and three species distributed in Mexico. This divergence allows to postulate the hypothesis that nematode parasites from *Astyanax* also had diverged, but the classical morphological analysis do not have permitted to determine the presence of other species. A molecular approach is hence the initial methodology for the prospection of cryptic species in this study. With the results from the mitochondrial (Cox1) and two nuclear markers (28S and 18S rDNA) it was found that both genus are constituted by a species complex, where the lineages correspond to cryptic species due to at the moment no morphological differences were found. Each lineage displays reciprocal monophyly, which allow to measure a host specificity even higher than previously reported, and in most of the lineages a geographic pattern but without a significant isolation by distance. The lineage delimitation is complemented with the genetic distances postulated for nematodes, been superior to 5% for the Cox1 gene in all the lineages. However, there is not a direct correspondence with the lineages from *Astyanax*, which allows to infer that both parasite groups have follow an evolutive history distinct to the one from the host. This study achieves to identify cryptic species of parasitic nematodes from *Astyanax* and separate morphologically to one of the lineages.

INTRODUCCIÓN

Las especies crípticas son morfológicamente indistinguibles pero difieren genéticamente; es decir, tienen historias evolutivas separadas (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010; Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011; Poulin, 2014). Así el concepto de especies crípticas se opone al de especies polimórficas; distintas morfológicamente pero sin diferencias genéticas (Wyrobisz *et al.*, 2016). Esto implica que los eventos de especiación pueden ocurrir sin cambios fenotípicos, o bien, el cambio fenotípico no necesariamente está acompañado de especiación (Susoy *et al.*, 2016). La premisa recae en cómo diferenciar especies cuando el fenotipo es el mismo y, dónde establecer el límite para considerar que se trata de linajes separados. La especie entonces, es aquella unidad fundamental en biología. Para Darwin, una especie es un continuo en el tiempo, cuya historia evolutiva va siempre acompañada de distintos mecanismos, así, lo que vemos son sólo los linajes sobrevivientes (Darwin, 1859). Sin embargo, nos preguntamos ¿Qué es una especie? ¿Por qué hay especies? (Coyne & Orr, 1998). Quizá resultan preguntas triviales, pero entender el mecanismo aún en nuestros días es incierto.

Ferris (1999) mencionó: “*Species Concepts Do Matter in Nematology*” haciendo referencia a que las especies y las relaciones entre éstas son la base de la investigación biológica; cualquier pregunta de investigación planteada, estará íntimamente ligada a la especie o especies que elijamos para contestarla. Existen conceptos de especie como el planteado para nematodos por Adams (1998) que propone conjugar el concepto de especie evolutiva (Simpson, 1951) y el concepto filogenético (Eldredge & Cracraft, 1980). De Queiroz (1998; 1999) planteó el “concepto unificador de especie”: linajes de metapoblaciones que evolucionan por separado; considerando que es la única propiedad necesaria para definir una especie. Este concepto permite superar el inconveniente en donde no todas las aproximaciones metodológicas responden a cualquier concepto de especie

(concepto operacional), y el uso de un concepto *ad hoc* y *a posteriori* a los resultados.

Los estudios en donde se reconoce la presencia de especies crípticas pueden partir de una aproximación morfológica o bien, una molecular. En la primera, el estudio de la morfología de individuos de lo que se considera es una misma especie, apoyada en datos moleculares, puede resultar en el descubrimiento de nuevas especies. Por otra parte, estudios para entender la estructura genética poblacional de una especie, pueden encontrar que lo que se consideraba una sola especie es en realidad un complejo de especies (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010). Ambas aproximaciones parten de la hipótesis nula de que el taxón representa la misma especie. Al partir de un análisis molecular, se pone a prueba la monofilia recíproca, si se rechaza la hipótesis inicial, el siguiente paso es reevaluar la diagnosis morfológica, o buscar diferencias ecológicas (funcionales) (De Meester *et al.*, 2012), y en última instancia, describir a los taxones que representan especies distintas (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010). Así, el uso de técnicas moleculares ayuda a corroborar la delimitación de especies ya descritas o reconocer especies nuevas (Blouin, 2002). Identificar el número de especies es pertinente por muchas razones, por ejemplo, determinar el impacto de los parásitos en la naturaleza, hacer una estrategia de conservación apropiada de especies, o simplemente tener un mejor conocimiento de la biodiversidad (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010). Si bien los parásitos no han sido considerados en la conservación, algunos son de importancia médica y zoonótica, por lo tanto delimitar apropiadamente a las especies conlleva a una apropiada estrategia de control (Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011; Sithithaworn *et al.*, 2015), como sucede en nematodos como *Trichuris* (Hawash *et al.*, 2015) u *Oesophagostomum* (Ota *et al.*, 2015), que parasitan a humanos y otras especies cercanas filogenéticamente. O bien, ante un escenario de cambio climático, donde la distribución de algunas especies puede ampliarse, como sucede en las dirofilarias, parásitos de caninos, y accidentales de humanos (Yilmaz *et al.*, 2016). Para algunos científicos como Beveridge y Spratt (2015) sólo: „importa, en un nivel

puramente científico", porque permite entender los procesos de la evolución de los parásitos y su nivel de diversidad.

La identificación de especies crípticas ha aumentado exponencialmente a partir del uso de técnicas moleculares (Bickford *et al.*, 2007), en particular con el uso de marcadores mitocondriales, que han hecho posible dilucidar relaciones evolutivas entre taxones con una divergencia reciente y descubrir especies crípticas (v. gr., Razo-Mendivil *et al.*, 2010, 2015; Derycke *et al.*, 2010; Rosas-Valdez *et al.*, 2011; Pérez-Ponce de León & Poulin, 2017). Revelando que especies que parecían ampliamente distribuidas u hospedero-generalistas, en realidad representan linajes separados con patrones hospedatorios, geográficos, y ecológicos distintos. Sin embargo, mantener el estatus de especie críptica puede deberse a una metodología inapropiada para distinguirlos o a un esfuerzo de identificación insuficiente (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010; Zuñiga-Reinoso & Benitez, 2015).

Las especies crípticas son un componente importante de la diversidad global (Bickford *et al.*, 2007; Pérez-Ponce de León & Poulin, 2016). Los primeros estudios encontraron que las especies crípticas tienen una distribución uniforme en todos los grupos de animales (Pfenninger & Schwenk, 2007). Análisis posteriores revelaron que hay phyla de Metazoa con mayor diversidad (Trontelj & Fišer, 2009), por ejemplo, dentro de los helmintos, las especies crípticas son más frecuentes en trematodos (Poulin, 2011). Sin embargo, el análisis más reciente muestra que no hay una homogeneidad en el número de especies crípticas por taxón dentro de los Metazoa, es decir que hay grupos de animales con mayor propensión a tener especies crípticas (Pérez-Ponce de León & Poulin, 2016). El patrón de heterogeneidad de especies crípticas en helmintos fue corroborado en un meta-análisis reciente, donde se analizó un mayor número de estudios y después de corregir por el esfuerzo de muestreo y la riqueza de especies, se ratificó que efectivamente los trematodos contienen mayor número de especies crípticas que otros helmintos (Pérez-Ponce de León & Poulin, 2017). En nematodos, el número de especies crípticas descritas ha aumentado en los

últimos años, sobre todo en formas de vida parásitas (Costello, 2016; Poulin & Pérez-Ponce de León, 2016), donde se ha sugerido existe mayor potencial para diversificar en comparación con las especies de vida libre (Huys *et al.*, 2005), aunque Poulin & Pérez-Ponce de León (2017) mostraron que no existe diferencias entre especies de vida libre y parásitos en animales en cuanto a la propensión a tener mayor número de especies crípticas. Los nematodos son uno de los grupos más diversos de animales, distribuidos en una amplia variedad de ambientes, una enorme diversidad de historias de vida y múltiples convergencias a una forma de vida parásita (Blaxter & Koutsovoulos, 2015). Estas características hacen de este grupo un modelo para probar patrones en relación a la diversidad críptica; detectar zonas de alta diversidad, determinar las variables que determinan su presencia, o inferir los mecanismos de diversificación de éstas y sus hospederos, en el caso de especies parásitas. Sin embargo, el estudio de las especies crípticas de parásitos enfrenta ciertos retos, como la dificultad de encontrar diferencias morfológicas, conocer el ciclo de vida complejo de los parásitos, probar el aislamiento reproductivo, o distinguir diferencias ecológicas o conductuales, que en ausencia de variación morfológica aparente, podrían confirmar la presencia de especies crípticas.

Por otra parte, el estudio de especies con distribución compartida (o co-distribuidas) permite inferir patrones similares en los procesos evolutivos que han actuado sobre ambas especies (Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009), y han conducido a su dispersión y colonización, reforzando así las hipótesis planteadas, aun cuando las especies responden de manera diferente, es decir, presentan historias de vida distintas que dependen de su modo de reproducción o de transmisión, entre muchos otros factores. En este mismo contexto, los estudios de filogeografía comparada se basan en la premisa de que algunas especies presentan una distribución geográfica similar y por lo tanto, una historia evolutiva compartida (Avice, 2000). Se pueden dividir en dos fases, una primera que busca describir genéticamente a las poblaciones a lo largo del área de distribución, y en una segunda fase, que es explicativa, mostrar si los mecanismos y patrones evolutivos en las especies de estudio han sido similares (Arbogast & Kenagy,

2001). Los nematodos *Procamallanus neocaballeroi* y *Rhabdochona mexicana* representan en este contexto, un modelo de estudio para una filogeografía comparada hospedero-parásito (Galbreath & Hoberg, 2012) y para probar la presencia de especies crípticas. Ambas especies parasitan específicamente a dos especies de peces dentro del mismo género (*Astyanax*), que son cercanas filogenéticamente. Comparten un área geográfica similar, desde el norte de México a partir de Chihuahua y Coahuila, hasta Chiapas en el caso de *R. mexicana* y extendiéndose hacia Nicaragua y Costa Rica para el caso de *P. neocaballeroi*. Además, en parásitos con amplia distribución o múltiples especies de hospederos, es posible que representen especies crípticas (Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011).

Asimismo, una mayor especialización (especificidad hospedatoria) está asociada a una mayor posibilidad de co-especiar (Thompson, 1994). Tanto *Rhabdochona mexicana* como *P. neocaballeroi*, parásitos específicos de *Astyanax* spp., forman parte de su fauna principal de parásitos en México, es decir, son especies de parásitos asociadas a un grupo monofilético de especies de hospederos (Pérez-Ponce de León & Choudhury, 2005). Existen dos especies de *Astyanax* en México, *A. aeneus* y *A. mexicanus* y al parecer cinco linajes que representan especies aún no descritas (Ornelas-García & Pedraza-Lara, 2015) La especie *A. mexicanus* presenta dos morfotipos, uno de cueva y otro de superficie y está restringida al centro-norte de México siendo la especie que tiene el límite más norteño de la distribución de todo el orden Characiformes en el Continente Americano (Miller *et al.*, 2009). *Astyanax aeneus* tiene amplia distribución en Mesoamérica, desde el centro de México hasta Panamá (Bussing, 2015; Miller *et al.*, 2009).

Los parásitos de peces han sido uno de los grupos de vertebrados más estudiados en México, en comparación a otros grupos de vertebrados (Pérez-Ponce de León & Choudhury, 2010; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2011). No obstante, la mayoría de las poblaciones de *A. mexicanus* habitantes de cuevas han sido poco exploradas; solo existen datos de tres cuevas de las 29 conocidas (Santacruz, 2013). Esta exploración registró varios grupos de helmintos en *A. mexicanus* de

cueva, incluyendo parásitos con ciclos de vida indirecto, como las larvas de nematodos *Spiroxys* sp. (donde el pez es el hospedero intermediario), y adultos de *P. neocaballeroi* (Santacruz, 2013). Es decir, al menos una de las especies de la fauna principal de *Astyanax* acompañó a su hospedero durante la colonización de las cuevas. Este paisaje ofrece un modelo de estudio de los procesos de diversificación en un conjunto parásito-hospedero, que conducen a plantearse preguntas tales como ¿el aislamiento producido hace millones de años entre las poblaciones de cueva y superficie del hospedero ha producido especiación en sus parásitos?, o si la variación genética del hospedero se corresponde con la del parásito.

El proceso de diversificación de las especies dentro de *Procamallanus* y *Rhabdochona* en México se desconoce. *Rhabdochona* constituye el género de nematodos con la mayor riqueza de especies en peces de agua dulce de México (Garrido-Olvera *et al.*, 2006) y tienen marcada especificidad hospedatoria, que hace posible observar patrones geográficos y probar hipótesis evolutivas de asociaciones parásito-hospedero. *Rhabdochona lichtenfelsi*, por ejemplo, es un parásito exclusivo de peces de la familia Goodeidae, que tiene una diferenciación genética asociada al aislamiento de las regiones hidrológicas en las cuencas de la Mesa Central (Mejía-Madrid *et al.*, 2007), mientras que sus hospederos experimentaron una importante radiación adaptativa en el centro-norte de México (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2010).

De esta manera, los parásitos de las especies de *Astyanax* ofrecen un modelo para estudiar los procesos de diversificación de su fauna helmintológica, haciendo uso de marcadores moleculares que nos permitan explorar si la distribución de estas especies de hospederos en diferentes cuencas hidrológicas, o su distribución entre ambientes de superficie o de cuevas (donde al menos una especie de pez ha desarrollado adaptaciones a esa forma de vida), han influido en la formación de especies de parásitos, integrado en el contexto de México como un escenario de transición entre la fauna Neártica y Neotropical, donde confluyen de manera similar *R. mexicana* y *P. neocaballeroi*. Por tal motivo, este estudio

tiene como objetivo determinar la variación genética de ambas especies asociadas de forma específica a *Astyanax* spp., para establecer si éstas representan una única especie o bien, un complejo de especies crípticas, y si los patrones observados se asocian a la diversificación de sus hospederos.

¿Qué es una especie? Los conceptos de especie

«Nada impide imaginar dos seres idénticos (de idéntica identidad). Sin embargo, para asegurar tal verdad habría que detener el tiempo porque un ser vivo ni siquiera se mantiene idéntico a sí mismo cuando el presente se desliza de un instante al siguiente».
(Jorge Wagensberg, 2010, *Las raíces triviales de lo fundamental*)

“**E**l problema de la especie”. Hohenegger (2014) argumentó que „el talón de Aquiles en el concepto de especie es la confusión entre aquellos conceptos basados en factores que causan las especies y aquellos que proponen los métodos para reconocer las especies”, en este contexto, el concepto de especie resulta fundamental, ya que el uso de distintos criterios puede producir resultados diferentes (Doyle, 1995), como definir un número variable de especies (de Queiroz, 2005). Este inconveniente es reconciliado al considerar la característica compartida entre todos los conceptos de especie, la única propiedad que necesita y que conduce a un concepto unificador: metapoblaciones de linajes que evolucionan por separado (de Queiroz, 1998). Mientras que para Hohenegger (2014) el concepto evolutivo de especie es el único que es consistente con otros conceptos. Como se mencionó, Adams (1998) propuso que el concepto más adecuado en el campo de los nematodos, es una reconciliación entre el concepto evolutivo de especie y el concepto filogenético, ya que de este modo es menos vulnerable a errores en el reconocimiento de especies. En el error tipo I se reconocen más especies de las que realmente existen; en el error tipo II se predicen menor número, y en el error tipo III, las relaciones evolutivas entre las especies no están bien representadas (Adams, 1998).

El concepto de especie biológica (Mayr, 1942), ha sido por mucho tiempo el más aceptado en biología. En nematodos probar la compatibilidad reproductiva resulta

complicado. Sólo en algunos estudios ha resultado posible, como en especies de *Caenorhabditis* (organismo modelo), donde se ha propuesto debido a la presencia de especies crípticas, utilizar el aislamiento reproductivo como criterio principal para diferenciar especies, y no la morfología (Felix *et al.*, 2014). En pocos trabajos las descripciones taxonómicas hacen mención del concepto de especie aplicado, y en el estudio de las especies crípticas no hay consenso en el concepto de especie (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010). En este contexto, en este estudio utilizamos el concepto unificador de de Queiroz (1998; 1999).

El proceso de especiación

*'El origen de las especies, este misterio de los misterios,
como lo ha llamado uno de nuestros mayores filósofos'
(Darwin, 1959, El origen de las especies)*

La especiación fue para Darwin el proceso principal para tratar de explicar cómo un continuo en la evolución da lugar a grupos discontinuos morfológicamente llamados especies (Coyne, 1992). Esto nos conduce a más preguntas: ¿Cuáles son las presiones de selección que conllevan a la especiación? ¿Cuál es la cantidad de cambio genético que acompaña a la especiación? (Avice, 2004) o ¿Qué tan frecuente ocurre en simpatria? En este sentido, este estudio es un primer paso, pues no sólo se trata de encontrar diferencias genéticas. Como Butlin & Ritchie (2009) señalan: “es acerca de tratar de identificar los cambios clave que subyacen la diferenciación y el aislamiento reproductivo, el orden en que los cambios ocurren, la forma en que interactúan, y las fuerzas evolutivas que causan su propagación”. La especiación depende de que haya menor flujo génico entre las poblaciones o las especies incipientes (Coyne & Orr, 2004). Los mecanismos pueden ser varios, graduales o puntuales, así, diversos modelos pueden explicar la especiación considerando distintas zonas adaptativas: evolución reticulada, equilibrio puntuado, entre muchos otros (Hogenerger, 2014).

Desde un nivel microgeográfico, es decir, en pequeñas escalas espaciales, existen adaptaciones locales que trascienden en la historia evolutiva de las especies

(Richardson *et al.*, 2014). El efecto fundador en un área geográfica aislada, cuellos de botella, deriva génica más selección, también son mecanismos que conducen a la especiación. Estos dejan ciertas huellas genéticas que permiten inferir por ejemplo, si la población se ha establecido recientemente a partir de un evento fundador; donde se esperaría menor variación genética y una relación parafilética con la especie de la que derivaron.

Las especies crípticas ¿Cómo se mantienen? ¿Cómo surgen? ¿Por qué no vemos cambios?

*Críptico, del latín crypticus ('oculto')
La importancia del gran principio de selección principalmente
recae en el poder de seleccionar diferencias escasamente apreciables...
que pueden acumularse hasta que el resultado se manifiesta ante los ojos de cada espectador
Charles Darwin, 1859, El origen de las especies*

La teoría evolutiva propone que la adaptación ambiental puede producir cambios morfológicos, conductuales, fisiológicos o en el desarrollo (Van Campenhout & Vanreusel, 2016), que en última instancia pueden conducir a la especiación. La especiación no necesariamente conlleva un cambio, al menos no uno aparente, puede haber cambios a nivel genético que no se manifiesten en el fenotipo y permanecen como *variación genética escondida* (Waddington, 1953). Lo contrario puede ocurrir, pequeños cambios genéticos conducir a grandes cambios morfológicos (Orr, 2005). La variación genética escondida, o críptica, es definida como la presencia de más de un alelo en un locus en una población (Barrett & Schluter, 2008), que se sigue segregando y no está fijo en la población (Paaby & Rockman, 2014). Este puede representar un mecanismo de adaptación incluso más rápido que el surgimiento de nuevas mutaciones (Barrett & Schluter, 2008), ya que la conservación de la morfología o estasis morfológica, puede enmascarar eventos de divergencia profundos (Fujita *et al.*, 2012). La variación genética escondida puede revelarse mediante distintos mecanismos, por ejemplo un cambio o estrés ambiental (Barrett & Schluter, 2008). Por ejemplo, en *Astyanax mexicanus*, la proteína HSP90 ya estudiada en *Drosophila melanogaster* para probar la teoría de canalización (Waddington, 1953), produjo mediante un solo

cambio ambiental un aumento en la conductividad del agua, la manifestación de mayor variación morfológica en la descendencia (Rohner *et al.*, 2013), que en condiciones ambientales normales no se presenta. Las especies están expuestas a un constante cambio, pero el fenotipo por lo general no varía, o lo hace dentro de un intervalo esperado, como sucede en las especies con plasticidad fenotípica.

En nematodos se ha sugerido que la alta diversidad de especies crípticas está asociada a su tipo de estructuras sensoriales; donde las señales químicas rebasan el efecto de las señales visuales (Bickford *et al.*, 2007). La acumulación de mutaciones generando variación genética, puede dar lugar a un fenotipo invariante, que puede ser mantenido por mecanismos como una fuerte selección estabilizadora o la 'robustez' a estas mutaciones que se acumulan y generan variación críptica. Los cambios pueden amortiguarse desde el desarrollo embrionario (Waddington, 1942), como ocurre durante el desarrollo de la vulva en nematodos (Braendle *et al.*, 2010). Mientras que los caracteres más susceptibles a ser afectados por las mutaciones son aquellos que evolutivamente muestran más variación entre especies cercanas (Braendle *et al.*, 2010). Esta variación es la que estará sujeta a selección y representa posibles trayectorias evolutivas.

Existen grupos donde la morfología no permite distinguir entre especies como en *Caenorhabditis brenneri* y *C. remanei*, pero presentan aislamiento reproductivo y distinta distribución geográfica (Sudhaus & Kiontke, 2007). Surge la cuestión ¿qué permite mantener la misma forma?, una posible respuesta, es una fuerte selección estabilizadora sobre la morfología (Dey *et al.*, 2013), o bien, que hay un estasis morfológico debido a que no son caracteres sujetos a selección (Bickford, 2007). La especiación alopátrica que no implica necesariamente un cambio, sino la „simple“ separación de las poblaciones puede ser un mecanismo que mantiene el estasis morfológico y da lugar a especies crípticas. Si bien, es un mecanismo 'más sencillo' de explicar, también existen especies crípticas en simpatria (Murphy *et al.*, 2016).

La delimitación de especies; el aporte de distintas evidencias

Un concepto operacional de especie determinará la metodología para abordar nuestra pregunta. En los estudios sobre especies crípticas, la sistemática molecular ha sido la aproximación metodológica preponderante, que en principio se basa en la obtención de monofilia recíproca. La información genética es el medio para construir una teoría acerca de cómo los organismos están relacionados evolutivamente, es decir, una filogenia. Felix *et al.*, 2014 proponen utilizar la información genética para distinguir aquellos grupos muy cercanos susceptibles de poner a prueba la hipótesis de aislamiento reproductivo. En este contexto el gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (Cox1) ha sido uno de los más eficientes. Los marcadores ribosomales para genes como el 18S rDNA o 28S rDNA (región D2-D3) han sido ampliamente usados en nematodos (Lazarova *et al.*, 2016), debido a una tasa de sustitución más lenta en comparación con los genes mitocondriales, y han permitido establecer “Unidades morfológicas operacionales” (OTUs por sus siglas en inglés) (Floyd *et al.*, 2002).

El nivel de divergencia genética ha sido empleado para delimitar a las especies, pero no existe un patrón generalizado en nematodos. En *Ostertagia ostertagi* hay variación intra-específica de 6% (Blouin *et al.*, 1998). Van Campenhout *et al.*, (2013) en el nematodo de vida libre *H. disjuncta*, reportó distancias-p intra-específicas de 0.3-2.9% e inter-específicas de 13.3-25.7%. Mientras que Solorzano *et al.*, (2016) reportó 5.9% de variación intra-específica y 9-12% de divergencia inter-específica en nematodos parásitos del género *Trypanoxyuris*. En otros nematodos como *Caenorhabditis brenneri* aun con la diversidad nucleotídica intraespecífica más alta observada en eucariontes, poblaciones de distintos continentes son capaces de reproducirse (Dey *et al.*, 2013). Dada la heterogeneidad en los patrones evolutivos en los diferentes organismos, el umbral genético de diferenciación será variable para los distintos taxones, o quizá, más datos de distintos géneros de nematodos permitan observar si existe un umbral para este grupo. Blouin (2002) menciona como punto de corte, un intervalo del 10 al 20% de diferencias genéticas entre especies hermanas, y una variación intra-

específica menor al 2%, al utilizar Cox1. Los genes mitocondriales tienen una alta tasa de sustitución, y ofrecen la ventaja de ser heredados por línea materna y por lo tanto tienen un solo haplotipo por muestra (Wu *et al.*, 2008). No obstante, usar el marcador más 'eficaz' no garantiza identificar especies crípticas, sino el esfuerzo de muestreo, es decir, el mayor número de secuencias posibles que representen la variación de la población (Poulin, 2011).

Resulta crucial determinar hasta qué nivel de divergencia se trata en realidad de poblaciones aisladas que constituyen una sola especie, o qué tanto es reflejo de la estructura poblacional. Es por esto, que el aporte de distintas evidencias puede contrarrestar este inconveniente, así como establecer un patrón de divergencia para nuestro grupo de estudio. Múltiples criterios permiten delimitar especies, y en conjunto conllevan a una taxonomía integrativa (Fujita *et al.*, 2012). Los métodos de coalescencia por ejemplo, pueden ser objetivos en especies donde la morfología por sí sola no es suficiente. Estos métodos se basan en identificar linajes evolutivos distintos (Fujita *et al.*, 2012). El uso de coalescencia se ha aplicado en múltiples modelos, entre los más populares destacan el *General Mixed Yule Coalescence Method* (GMYC) (Fujisawa & Barraclough, 2013) o el *Poisson Tree Processes* (PTP) (Zhang *et al.*, 2013). Aunque hasta donde sabemos, ninguno de ellos ha sido aplicado en el estudio de especies crípticas de nematodos.

Diversos análisis y representaciones gráficas permiten reconocer diferentes mecanismos evolutivos. Las redes de haplotipos permiten inferir los sitios de origen de la especie, trazar la ruta de colonización en una infección, observar haplotipos únicos o compartidos. Las reconstrucciones filogenéticas representadas en cladogramas permiten estudiar las relaciones entre especies, y contrastarla con la filogenia de su hospedero, que sumado a una datación molecular, puede dar idea del tiempo transcurrido desde su divergencia (Ricklefs & Outlaw, 2010). Otros avances metodológicos han surgido, para optimizar el tiempo de análisis y resultados de datos cada vez más numerosos. Estudios recientes han empleado el genoma mitocondrial, tanto en especies de vida libre como *Litoditis marina*

(Grosemans *et al.*, 2016), como en el estudio de especies crípticas de parásitos de anisakidos, donde ayudó a confirmar a *P. decipiens* como un complejo de especies y refutó el estatus de *O. ogmorhini* como complejo de especies (Liu *et al.*, 2016).

La taxonomía integrativa, además de utilizar aproximaciones moleculares, también hace uso de análisis estadísticos con los datos morfológicos, para determinar no sólo diferencias significativas, sino también definir las variables que explican la diferencia, por ejemplo análisis discriminantes, análisis de componentes principales, análisis canónicos, análisis de la varianza, etc. Esto ha sido muy útil en nematodos en estadios de vida larvarios, donde no existen aún caracteres diagnósticos para separar especies, por ejemplo, en larvas de *Pseudoterranova decipiens* se encontró variación morfológica dependiente de la especie de hospedero (Hernández-Orts *et al.*, 2013). O bien, en el complejo de especies crípticas de *Xiphinema* (ectoparásitos de plantas) donde además de utilizar información filogenética, el análisis multivariado permitió describir dos especies nuevas en un grupo donde los caracteres morfológicos se sobrelapan (Archidona-Luste *et al.*, 2015).

El escenario ideal es llegar a una taxonomía completa, usando datos morfológicos, describir a las nuevas especies y preservar el material en colecciones científicas (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010).

El estudio de las especies crípticas en nematodos

*'Nuestro conocimiento en relación a la evolución
de los nematodos es cercano a nada'
(Alfred Kaestner, 1965)*

Los nematodos son uno de los grupos más diversos de animales, con más de 27,000 especies descritas (Hugot *et al.*, 2001; Blaxter, 2003), enorme diversidad de formas de vida, y múltiples convergencias al parasitismo, tanto de plantas como

animales (Blaxter & Koutsovoulos, 2015). Las especies crípticas pueden estar presentes en cualquier ambiente, incluso en aquellos considerados *extremos*: nematodos parásitos conviviendo con sus hospederos anfípodos marinos en ventilas hidrotermales a casi 10,000 m de profundidad (Librado & Rozas, 2009), nematodos de vida libre en las heladas temperaturas de la Antártica, donde constituyen uno de los grupos más comunes en la zona (Velasco-Castrillón & Stevens, 2014), o presentes en cuevas (Eberhard *et al.*, 2014).

Existen grupos de especies crípticas en nematodos que han sido particularmente muy estudiados, y han permitido inferir ante una aparente ausencia de diferencias morfológicas si existen otros factores diferenciando a las especies, y explicar cómo especies tan similares pueden co-existir. Por ejemplo, los nematodos de vida libre *Trobilus gracilis* representan un complejo de especies en la zona Paleártica donde al menos tres linajes crípticos han sido encontrados (Ristau *et al.*, 2013) o los parásitos de plantas *Xiphinema* que representan un complejo de más de 55 especies (Archidona-Yuste *et al.*, 2016). Otro ejemplo es el de las especies crípticas de *Litoditis marina*, que pese a haber divergido hace varios millones de años no han cambiado morfológicamente (Grosemans *et al.*, 2016). Estas especies difieren en la composición de su microbioma, comportamiento alimenticio, preferencia de temperatura, su efecto en la descomposición de algas y en el uso de recursos (De Meester *et al.*, 2015, 2016; Derycke *et al.*, 2016). Es decir, que las especies crípticas pueden estar desempeñando una función distinta en el ecosistema.

Existen análisis previos de la literatura en relación a especies crípticas de nematodos parásitos. Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010, por ejemplo, en un periodo de junio de 1999 a noviembre de 2009, encontraron 17 estudios sobre este tema, donde la mayoría de las especies nuevas descritas correspondieron a parásitos. Poulin (2011) en un meta análisis de las especies crípticas de helmintos encontró que el número de individuos secuenciados se asocia a la probabilidad de encontrar especies crípticas. Pérez-Ponce de León & Poulin (2016) de 1998 a

2015 encontraron 49 estudios sobre especies crípticas de nematodos, de los cuales 39 corresponden a parásitos.

Al analizar brevemente la tendencia en los estudios de especies crípticas en nematodos, en un periodo de seis años comprendido de julio de 2010 a julio de 2016 a través de una búsqueda en la *ISI Web of Knowledge* (www.webofknowledge.com) y PubMed con las palabras “cryptic” y “nematod*” arroja 166 publicaciones, que incluyen especies de vida libre y parásitas ([Fig. 1](#)). De estos estudios, sólo 54 publicaciones hacen mención de críptico en el contexto de especies morfológicas similares pero genéticamente distintas. Como Trontelj & Fišer, (2009) mencionan, el número de especies crípticas no se correlaciona con el número de publicaciones, ya que no es una medida directa de la intensidad de estudio. Muchos de estos artículos argumentan en relación al uso de Cox1 como marcador molecular para la delimitación de especies sobre todo en aquellas muy cercanas. No obstante, el número de estudios que utilizan marcadores nucleares como el 18S y 28S, casi iguala a aquellos con mitocondriales. Aunque algunos de ellos concuerdan en la baja resolución filogenética para resolver relaciones inter-especie. Pocos estudios tienen como objetivo principal la prospección de especies crípticas, en la mayoría el hallazgo de éstas es un resultado secundario. En *Rugopharynx* que son nematodos parásitos de macropódidos de Australia, se planteó como hipótesis la presencia de especies crípticas, con base en que las especies conocidas presentan pocas diferencias morfológicas (Chilton *et al.*, 2016). De tal forma, una aproximación molecular los llevó a validar las especies ya descritas morfológicamente y detectar especies crípticas (Chilton *et al.*, 2016). Sin embargo, como en muchos de los estudios moleculares similares, no se hizo una caracterización morfológica.

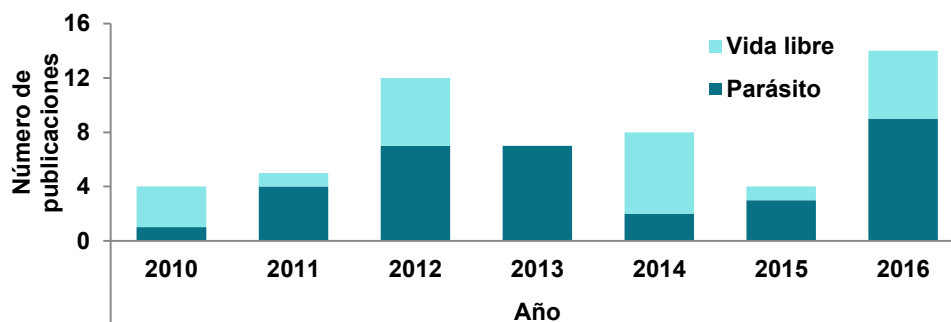


Figura 1. Número de publicaciones por año de estudios sobre especies crípticas de nematodos.

En este momento del estudio de las especies crípticas de nematodos, aun no es posible observar un patrón que explique su presencia en un ambiente en particular o área biogeográfica, ya que los estudios están concentrados a ciertas áreas de estudio, o grupos de parásitos, por ejemplo en la zona Paleártica (Pérez-Ponce de León & Poulin, 2016).

El género *Procamallanus*

El género *Procamallanus* (Baylis, 1923) incluye especies marinas y de agua dulce que parasitan el sistema digestivo de peces y anfibios (Moravec & Van As, 2015). Pertenece a la familia Camallanidae, considerada monofilética, mientras que géneros dentro de la familia como *Camallanus* y *Procamallanus* forman un grupo parafilético, que difieren únicamente en características de la cápsula bucal, lo que ha llevado a proponer la reclasificación del grupo (Wijová *et al.*, 2006). El género *Procamallanus* está dividido en tres subgéneros de acuerdo con la clasificación de Moravec (1998): *Procamallanus* y *Spirocamallanus*, presentan una cápsula bucal lisa o con surcos espirales, respectivamente, mientras que en el subgénero *Denticamallanus* sólo las hembras tienen surcos espirales y los machos asemejan la morfología bucal de *Procamallanus*. Los espirales bucales por lo tanto, parecen haber aparecido en distintos linajes, uno parasitando peces marinos, un segundo en anfibios africanos y un tercero, en peces neotropicales (Chabaud & Bain, 1994).

Chabaud & Bain (1994) propusieron el origen de Camallanidae en África, durante el Cretácico tardío en nematodos parásitos de anfibios, posteriormente alcanzaron Sudamérica al adaptarse a peces marinos, y secundariamente parasitaron a peces de agua dulce. Esta hipótesis indica la posibilidad de oleadas de colonización separadas de nematodos marinos parasitando a peces de agua dulce, donde una reconstrucción filogenética ayudaría a reconocer dicho planteamiento. Además, postulan a Procamallaninae con un origen en Gondwana, en peces Siluriformes y Cypriniformes (Chabaud & Bain, 1994).

El ciclo de vida de *Procamallanus rebecae* y *P. neocaballeroi* estudiado experimentalmente ha permitido conocer la morfología en distintos estadios del desarrollo (Moravec *et al.*, 1995) (Fig. 2) en los dos hospederos involucrados. Primero la larva del nematodo infecta copépodos, luego estos son ingeridos por el pez donde el nematodo madura y se reproduce (Moravec *et al.*, 1995). Se ha sugerido también un ciclo de vida directo, donde el vertebrado se alimenta de la larva de vida libre (Schmidt-Rhaesa *et al.*, 2014), o bien, una reproducción partenogenética en especies como *P. pacificus* dada la baja prevalencia de machos (Moravec *et al.*, 2006).

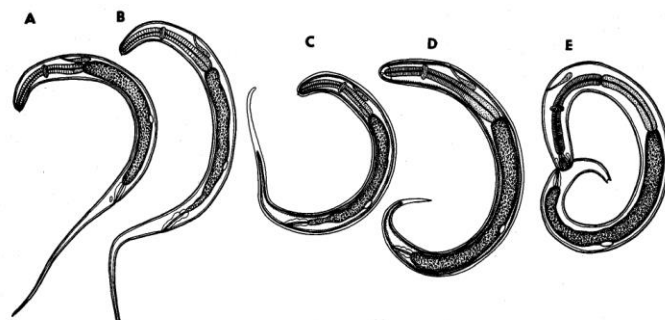


Figura 2. Desarrollo embrionario del primer al tercer estadio de *P. neocaballeroi*. Imagen tomada de (Moravec *et al.*, 1995).

En México, se han descrito cinco especies de *Procamallanus* en peces de agua dulce: *P. jaliscensis* parásito de *Agonostomus monticola* (Mugilidae), *P. gobiomori* en *Gobiomorus maculatus* (Eleotridae), *P. mexicanus* en *Cichlasoma geddesi*

(Cichlidae) (Moravec *et al.*, 2000), *P. rebecca* en varias especies de cíclidos (Salgado-Maldonado, 2006) y *P. neocaballeroi* en *A. aeneus* (Characidae) (Caballero-Deloya, 1977). Además, una especie marina, *P. chetumalensis* en *Ariopsis assimilis* (Ariidae) (González-Solís *et al.*, 2002). La especificidad hospedatoria es variable (Fig. 3), por ejemplo, la especie más generalista, *P. rebecca*, parasita cuatro familias de hospederos (Salgado-Maldonado, 2006), aunque puede considerarse como un parásito de cíclidos pues 21 de las 24 especies donde ha sido registrado pertenecen a esta familia.

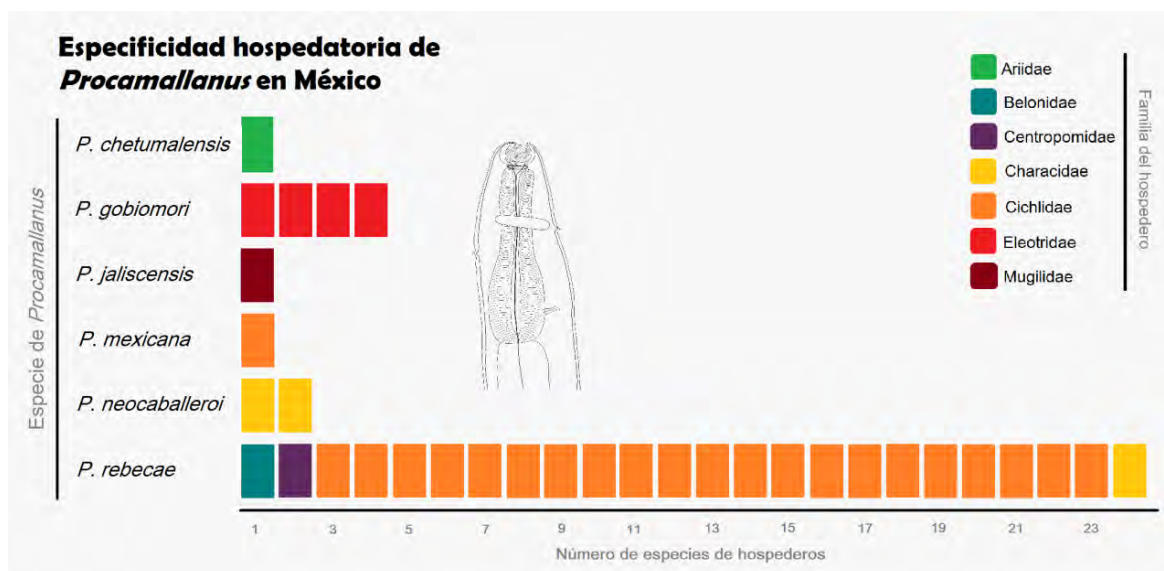


Figura 3. Especificidad hospedatoria de las especies de *Procamallanus* distribuidas en México.

La especie *Procamallanus neocaballeroi* fue descrita como *Spirocamallanus neocaballeroi* por Caballero-Deloya (1977) en *A. fasciatus* en el Lago de Catemaco, Veracruz. La especie fue después transferida al género *Procamallanus* y *Spirocamallanus* pasó a ser considerado un subgénero (Moravec, 1995). Desde entonces, la especie sólo ha sido encontrada en el hospedero tipo cuya validez taxonómica ha sido cuestionada y parece corresponder a *A. aeneus* (Ornelas-García *et al.*, 2008), y en *A. mexicanus*.

La morfología de *P. neocaballeroi* es muy similar a la de *P. hillari*; ocho papilas en la región bucal distribuidas en dos círculos, cuatro papilas prelocales y espículas

simétricas (Gallas *et al.*, 2015). Las espículas simétricas también están presentes en *S. inopinatus* y *S. incarocai*, sin embargo, *P. neocaballeroi* es la única especie mexicana descrita con esta morfología. De este modo, al observar individuos que provienen de especies de *Astyanax*, estos tienen cápsula bucal surcada, casi simétrica, y espículas iguales, y por ello se asignan a *P. neocaballeroi*. La distribución de esta especie es amplia; existen registros casi tan al norte como la distribución de su hospedero *A. mexicanus*, y al sur llegando hasta Costa Rica (Sandlund, 2010), aunque existen grandes áreas geográficas intermedias donde no ha habido reportes ([Tabla 1, Fig. 4](#)). Otras especies de *Procamallanus* reportadas en el género *Astyanax* incluyen a *Procamallanus (Spirocamallanus) hillari* en *A. fasciatus*, *A. jacuhiensis*, *A. bimaculatus* y *A. parahybae* (Luque *et al.*, 2011) en Brasil, así como en *A. abramis* en Argentina (Ramalho, 2005).



Figura 4. Registros previos de *P. neocaballeroi* de México y Centroamérica. Su distribución histórica más al norte llega a los estados de Coahuila y Chihuahua, y al sur alcanza hasta Centroamérica, donde habita en el río Torsuani en Nicaragua, y en Guanacaste, Costa Rica.

Tabla 1. Registros previos de *Procamallanus neocaballeroi*

País/Estado	Localidad	Referencia geográfica		Hospedero	Referencia
		Norte	Oeste		
México					
Chihuahua	Río Primero	26° 48' 54.2"	105° 12' 12.9"	<i>A.mexicanus</i>	1
	Meoqui	28° 15' 51.00"	105° 28' 37.53"	<i>Astyanax sp.</i>	1
Coahuila	Río en Celemania, Cuatro Ciénegas	27° 02' 40"	101° 41' 54"	<i>A.mexicanus</i>	2
Hidalgo	Afluente del Río Acamaluco	21° 09' 45"	98° 33' 28"	<i>A.mexicanus</i>	3
	Río Candelaria	21°04' 59"	98° 04' 27"	<i>A.mexicanus</i>	3; 4
	Río Tecoloco	21° 11' 16"	98° 17' 18"	<i>A.mexicanus</i>	3
	Río Tempoal at Atlapexco	20° 55' 16"	98° 17' 27"	<i>A.mexicanus</i>	3; 4
	Río Tempoal at Río Calabozo	21° 00' 53"	98° 20' 24"	<i>A.mexicanus</i>	3; 4
Quintana Roo	Cenote Box Toro	20° 16' 27"	87° 29' 09"	<i>A. fasciatus</i>	12
	Cenote Kawash	20° 14' 44"	87° 27' 54"	<i>A. fasciatus</i>	12
	Gran Cenote	20° 14' 44"	87° 27' 54"	<i>A. fasciatus</i>	12
San Luis Potosí	Axtla de Terrazas	21° 26.02'	98° 52.568'	<i>A.mexicanus</i>	5
	Cueva Chica	21° 51.586'	98° 56.198'	<i>A.mexicanus</i>	5
Tabasco	Lago El Rosario	17° 50' 00" - 17° 56' 00"	93° 45' 00" - 99° 56' 00"	<i>A. aeneus</i>	6
Veracruz	Lago de Catemaco	18° 25' 00"	95° 07' 00"	<i>A. fasciatus</i>	7
	Lago de Catemaco	18° 25' 00"	95° 07' 00"	<i>B. caballeroi</i>	9
	Lago de Catemaco	18° 25' 00"	95° 07' 00"	<i>R. guatemalensis</i>	8; 9
	Lago de Catemaco	18° 24' 50"	95° 06' 34"	<i>A. fasciatus</i>	10
Costa Rica	Parque Nacional Guanacaste	10° 49' 48"	85° 19' 26"	<i>A. aeneus</i>	13
Nicaragua	Río Mahogany	12° 03' 22"	83° 59' 07"	<i>A. fasciatus</i>	11
	Río Torsuani	11° 47' 06"	83° 52' 38"	<i>V.maculicauda</i>	11

REFERENCIA: 1: Pérez-Ponce de León *et al.*, 2013; 2: Aguilar-Aguilar *et al.*, 2014; 3: Salgado- Maldonado *et al.*, 2004; 4: Caspeta-Mandujano, 2000; 5: Santacruz, 2013; 6: López-Jiménez, 2001; 7: Salgado-Madonado, 2006; 8: Pérez-Ponce de León *et al.*, 1992; 9: Salgado-Maldonado *et al.*, 2005; 10: CNHE 2233; 11: Aguirre-Macedo *et al.*, 2001; 12: Moravec *et al.*, 1995; 13: Sandlund *et al.*, 2010

Existen pocos estudios utilizando técnicas moleculares en *Procamallanus* spp., y en general para los miembros de Camallanidae. Li *et al.*, (2008) estudiaron la estructura genética poblacional de *P. fulvidraconis* en el pez gato *Pelteobagrus fulvidraco*, mientras que los estudios de Wu *et al.*, 2008 establecieron una distancia de hasta 20.3% en las regiones de espaciadores transcritos internos (ITS1) entre especies de *Camallanus*. A nivel de morfología ultraestructural, están los estudios hechos en *P. halitrophus* (Cárdenas *et al.*, 2005), o la distinción morfológica entre *Spirocamallanus itsblenni* y *S. monotaxis* con base en sólo una diferencia morfológica; la posición de la segunda papila preanal en machos (Rigby & Font, 2001).

El género *Rhabdochona*

Los spiruridos incluyen especies parásitas de vertebrados con distintas formas de vida (Blaxter *et al.*, 2004; Blaxter, 2011). Entre estas especies, el género *Rhabdochona* es un grupo diverso donde cerca de 98 especies han sido descritas (Moravec *et al.*, 2013). *Rhabdochona* está situado dentro de la familia Rhabdochonidae que incluye otros nueve géneros: *Beaninema*, *Fellicola*, *Hepatinema*, *Heptochona*, *Johnstonmawsonia*, *Megachona*, *Pancreatonema*, *Prosungulonema* y *Vasorhabdochona* (Moravec, 2007). La distribución de *Rhabdochona* es cosmopolita (Moravec *et al.*, 2010), parasitando en su mayoría a peces de agua dulce (Moravec *et al.*, 2012), que representan el hospedero definitivo donde el nematodo madura y se reproduce, mientras que efemerópteros pueden actuar como hospederos intermediarios (Moravec, 2007).

Moravec (1972) subdividió a *Rhabdochona* en cinco subgéneros: *Rhabdochona*, *Globochona*, *Globochonoides*, *Sinonema* y *Beaninema*, con base en el número de dientes en el prostoma y la morfología de la cauda de la hembra (Moravec, 1975), y consideró a los filamentos o protuberancias en los huevos como caracteres importantes pero no diagnósticos (Moravec, 1975). Sin embargo, otra clasificación ampliamente aceptada, es la propuesta por Chabaud (1975) que dividió al género en tan solo tres subgéneros: *Rhabdochona*, *Filochona* y *Globochona*, con base en

las características del huevo; huevos sin filamentos, huevos filamentosos y huevos con glóbulos, respectivamente (Chabaud, 1975 en Pinto *et al.*, 2010).

La hipótesis evolutiva de *Rhabdochona* sustentada en el conocimiento morfológico, lo considera de origen marino; a partir del Cretácico temprano diversificó a peces de agua dulce en cuencas cercanas al mar de Tetis, es decir, al sur de Laurasia y norte de Gondwana (Mejía-Madrid *et al.*, 2007). La presencia de *Rhabdochona* en peces ciprínidos sugiere una relación coevolutiva (Moravec, 2010). Aparentemente el género se originó en Norte América y posteriormente colonizó hacia Centroamérica y Sudamérica con los peces Characiformes y probablemente otros hospederos (Moravec, 2010), después de emerger el Istmo de Panamá (Mejía-Madrid *et al.*, 2007). Sin embargo, la morfología de especies neotropicales de *Rhabdochona*, como la presencia de procesos cuticulares en la cauda, muestra mayor afinidad con las especies de África, particularmente con especies de Etiopía (Moravec, 2007). La reconstrucción filogenética de *habdochona* empleando datos morfológicos, lo sitúa como un grupo monofilético, pero las especies distribuidas en América no se encuentran cercanamente relacionadas, mostrando relaciones geográficas Trans-Pacífico (Mejía-Madrid *et al.*, 2007). Las 21 especies americanas, incluyen tres especies reportadas en cácaridos; *R. mexicana*, *R. acuminata* y *R. uruyeni* (Moravec, 1998; Pinto *et al.*, 2009), donde *R. acuminata* es la especie con la distribución más amplia, desde México hasta la Patagonia, Argentina (Cremonte *et al.*, 2002).

En México existen tres géneros de la familia Rhabdochonidae: *Vasorhabdochona*, *Beaninema*, y *Rhabdochona*, siendo éste último el más diverso con 12 especies descritas, distribuidas en ambas regiones biogeográficas Neártica y Neotropical (Moravec *et al.*, 2012). Las especies de *Rhabdochona* registradas en México, presentan una especificidad hospedatoria variable ([Fig. 5](#)), por ejemplo, *R. kidderi* ha sido reportada en 18 especies de hospederos incluidas en siete familias (Garrido-Olvera *et al.*, 2006; Salgado-Maldonado, 2006), en contraste las especies *R. salgadoi* o *R. mexicana* se encuentran restringidas a una sola familia de hospederos (Caspeta-Mandujano, 2000; Pinacho-Pinacho *et al.*, 2015). La amplia

distribución de *Rhabdochona* en México y gran número de especies en contraste con otros géneros de parásitos de peces de agua dulce, los hace modelos ideales para proponer patrones geográficos y probar hipótesis evolutivas de asociaciones parásito-hospedero. Este es el caso de *R. mexicana*, una especie Neotropical asociada con peces de la familia Characidae, en particular con *A. mexicanus* y *A. aeneus* ([Fig. 5](#)).

Los caracteres diagnósticos de *R. mexicana* es una cauda cónica y sin terminación en punta, huevo maduros sin filamentos, 10 dientes en el prostoma y ocasionalmente 11 (Caspeta-Mandujano, 2010), al igual que *R. kitsutchi* (parásito de *Oncorhynchus kisuth*, Salmoniforme, en Canadá), *R. catostomi* (de *Catostomus* sp., Cypriniformes, en Canadá), *R. paxmani* y *R. salmonis* (de *Oncorhynchus mykiss* en California, EUA) (Caspeta-Mandujano *et al.*, 2000). Además, *R. mexicana* tiene deiridios bifurcados al igual que *R. ahuhuellensis* y *R. lichtenfelsi*, parásitos de goodeidos y *R. kitsuchi*, *R. paxmani*, *R. salmonis*, parásitos de salmónidos que no están relacionados filogenéticamente a los goodeidos (Mejía-Madrid *et al.*, 2003).

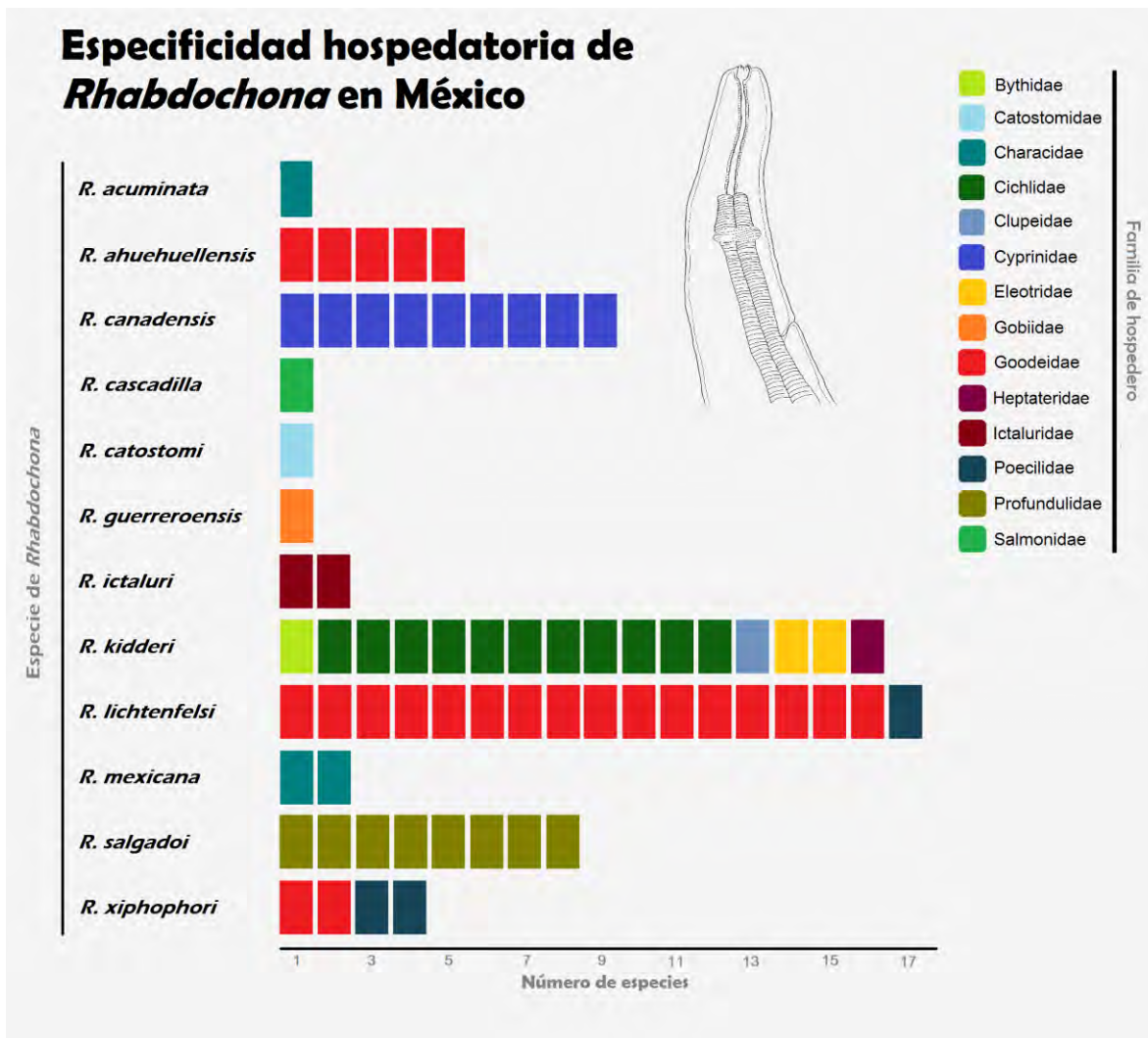


Figura 5. Especificidad hospedatoria de las especies de *Rhabdochona* descritas en México. Número de especies de hospederos de cada especie de nematodo y familias compartidas entre especies de parásitos.

Rhabdochona mexicana se distribuye actualmente tan solo en México, habiéndose registrado hasta antes del presente estudio en 20 localidades de ocho estados de la República Mexicana, entre la región central y sur del país ([Fig. 6, Tabla 2](#))



Figura 6. Registros previos de *R. mexicana* en hospederos de *Astyanax* spp.

Existen escasos estudios utilizando marcadores moleculares en *Rhabdochona*; por ejemplo, a partir del gen 18S rDNA, el género fue situado dentro del Clado III (suborden Spirurina) de los nematodos y el género *Spinitectus* resultó su grupo hermano (Nadler *et al.*, 2000). A nivel poblacional, únicamente *R. lichtenfelsi* ha sido estudiada como parásito de goodeidos en el Centro de México (Mejía-Madrid *et al.*, 2007).

Tabla 2. Registros previos de *Rhabdochona mexicana*

Estado	Localidad	Referencia geográfica		Hospedero	Referencia
		Norte	Oeste		
Chiapas	Puente La Calzada	15° 57' 04"	91° 39' 46"	<i>A. aeneus</i>	1
	Río Palenque	17° 12' 57"	92° 06' 22"	<i>A. aeneus</i>	1
	Río Suchiapa, José María Garza	16° 36' 36"	93° 05' 03"	<i>A. aeneus</i>	1
Guerrero	Río Petatlán	17° 35' 31"	99° 00' 27"	<i>A. fasciatus*</i>	2; 3
	Laguna Tres Palos	-	-	<i>A. fasciatus*</i>	4
Jalisco	Río Ayuquila, Achacales	19° 42' 24"	104° 08' 60"	<i>A. aeneus</i>	5
Morelos	Río Amacuzac, Amacuzac	18° 38' 47"	99° 27' 02"	<i>A. fasciatus*</i>	3
	Río Amacuzac, Contlalco	18° 38' 58"	99° 27' 38"	<i>A. fasciatus*</i>	3
	Río Amacuzac, Las Planchas	18° 49' 03"	99° 30' 14"	<i>A. fasciatus*</i>	3
Oaxaca	Arroyo San Juan Bautista	17° 43' 13"	96° 18' 46"	<i>A. aeneus</i>	6
	Arroyo Santiago Dominguillo	17° 41' 16"	96° 56' 02"	<i>A. aeneus</i>	6
	Puente Valle Nacional	17° 46' 15"	96° 18' 33"	<i>A. aeneus</i>	6
	Río Cuyotepeji	17° 57' 35"	97° 41' 06"	<i>A. fasciatus*</i>	2; 3
	Río Petlalcingo	18° 04' 35"	97° 55' 29"	<i>A. fasciatus*</i>	2; 3
	Río San Agustín Atenango	17° 39' 03"	97° 57' 00"	<i>A. fasciatus*</i>	2; 3
	Río Grande, Guelatao	17° 18' 26"	96° 30' 38"	<i>A. aeneus</i>	6
Querétaro	Río Estórax, El Oasis	21° 00' 27"	99° 42' 43"	<i>A. mexicanus</i>	2; 5; 7
	Río Estórax	21° 02' 11"	99° 50' 45"	<i>A. mexicanus</i>	2; 5
San Luis Potosí	Arroyo Fracción Sánchez	21° 47' 10"	100° 41' 13"	<i>A. mexicanus</i>	2; 5
	Canoas	22° 9.79"	99° 32' 36.55"	<i>A. mexicanus</i>	7
	Río Gallinas, Arroyo Canoas	21° 56' 47"	99° 23' 47"	<i>A. mexicanus</i>	5
	Río Gallinas, El Rascón	21° 59' 06"	99° 15' 27"	<i>A. mexicanus</i>	2; 5
	Vereda	21° 02' 35.34"	99° 50' 30.5"	<i>A. mexicanus</i>	7
Veracruz	Los Tuxtlas, Lago Escondida	18° 38' 09"	95° 07' 28"	<i>A. aeneus</i>	6

*A partir de los estudios de Ornelas-García *et al.*, (2008) *A. fasciatus* no se considera distribuido en México, por lo tanto, los registros posiblemente corresponden a *A. aeneus*

REFERENCIA: 1: Salgado-Maldonado *et al.*, 2011; 2: Caspeta-Mandujano *et al.*, 2000; 3: Salgado-Maldonado *et al.*, 2001; 4: Violante-González *et al.*, 2007; 5: Salgado-Maldonado *et al.*, 2004; 6: Salgado-Maldonado *et al.*, 2005; 7: Santacruz, 2013

El hospedero; *Astyanax*

En la familia Characidae se incluye el género *Astyanax*, distribuido ampliamente en América con más de 210 especies (Eschemeyer, 2014 en Ornelas-García & Pedraza-Lara, 2016). Las poblaciones de *Astyanax* spp. distribuidas en Norte América y Centroamérica forman un grupo monofilético que migró desde Sudamérica antes del cierre del Istmo de Panamá hace cerca de 8 millones de años (Ornelas-García *et al.*, 2008), mediante puentes que conectaban ambas partes del continente y permitieron que muchas especies se intercambiaran de norte a sur (Winston *et al.*, 2016) en el llamado „Gran Intercambio Biótico Americano“ (Stehli & Webb, 1985).

El número de especies de *Astyanax* distribuidas en esta región es controversial; la hipótesis más aceptada considera tres especies: *A. aeneus*, *A. mexicanus* y *A. caballeroi*, pero se han encontrado al menos cinco linajes en México (Ornelas-García *et al.*, 2008). Sin embargo, hipótesis con base en caracteres morfológicos infieren casi 27 especies en México y Centroamérica (Schmitter-Soto, 2016). De acuerdo a Ornelas-García *et al.*, (2008), se considera a *A. mexicanus* la especie con la distribución más norteña entre todos los *Astyanax*, desde el centro de México hasta el Río Colorado en Texas (Miller *et al.*, 2009). Por su parte, *A. aeneus* se distribuye desde el río Papaloapan hasta algunas áreas de Centroamérica (Bussing, 2002; Miller *et al.*, 2005), con ciertas áreas de contacto y flujo génico entre ambas especies (Hausdorf *et al.*, 2011 en Ornelas-García & Pedraza-Lara, 2016). Mientras que *A. caballeroi* es endémica en el Lago de Catemaco, Veracruz (Ornelas-García *et al.*, 2014).

Cuando poblaciones ancestrales de *Astyanax* se dispersaron hacia el norte y llegaron a México, algunas de ellas lograron colonizar ambientes de cueva en al menos tres eventos de colonización (Gross, 2012), que conllevó a la presencia actual en 32 cuevas en el noreste de México de individuos de *A. mexicanus* (Fig. 7) (Espinasa *in prep*, 2017).

Estás poblaciones de cueva sufrieron múltiples adaptaciones que convergieron a un fenotipo troglobio ([Fig. 8](#)), es decir, ausencia de ojos y pigmentación, dando lugar a un paralelismo evolutivo. Otras diferencias también evolucionaron en las cuevas, como modificaciones en el cerebro: telencéfalo, cerebelo y bulbos olfatorios más grandes, tectum óptico reducido (Jeffery, 2001); aumento en el número de papilas gustativas, cambios en el esqueleto craneofacial (Gross *et al.*, 2014); mayor número de neuromastos, etc. (Jeffery, 2001). Los peces de cuevas además poseen diferentes comportamientos que en conjunto han sido nombrados „síndrome del comportamiento del pez de cueva“ (Elipot *et al.*, 2014), en que se incluyen la pérdida del comportamiento de cardumen (Kowalko *et al.*, 2013), disminución de la agresión (Elipot *et al.*, 2013), modificaciones en angulo de alimentación (Kowalko *et al.*, 2013) y una atracción hacia las vibraciones (Yoshizawa *et al.*, 2010). Por lo tanto, parece que el pez de cueva ha evolucionado estrategias diferentes para encontrar comida, reproducirse y orientarse físicamente.

Todas estas características aunadas a la interfertilidad entre poblaciones de cueva y superficie permiten hacer experimentos comparativos y complementarios para dilucidar los mecanismos que produjeron los cambios adaptativos. Esto ha convertido a *A. mexicanus* en un *modelo de estudio* (Jeffery, 2001; Borowsky, 2008) de numerosos temas, como el sueño (Yoshizawa *et al.*, 2015), el ritmo circadiano (Beale *et al.*, 2013), la obesidad (Aspiras *et al.*, 2015), la formación de mapas espaciales en oscuridad (Santacruz *et al.*, 2015) o la regeneración (Yamamoto, comunicación personal), entre otros.

Astyanax mexicanus representa un modelo ideal para contestar preguntas evolutivas tales como ¿cuáles son las características que le ha permitido a esta especie colonizar una y otra vez las cuevas y presentar tales paralelismos adaptativos en todas sus poblaciones troglobias? ¿Qué especies de parásitos han conservado? ¿La divergencia de los peces de cueva han modificado morfoómicamente o genéticamente a sus parásitos?

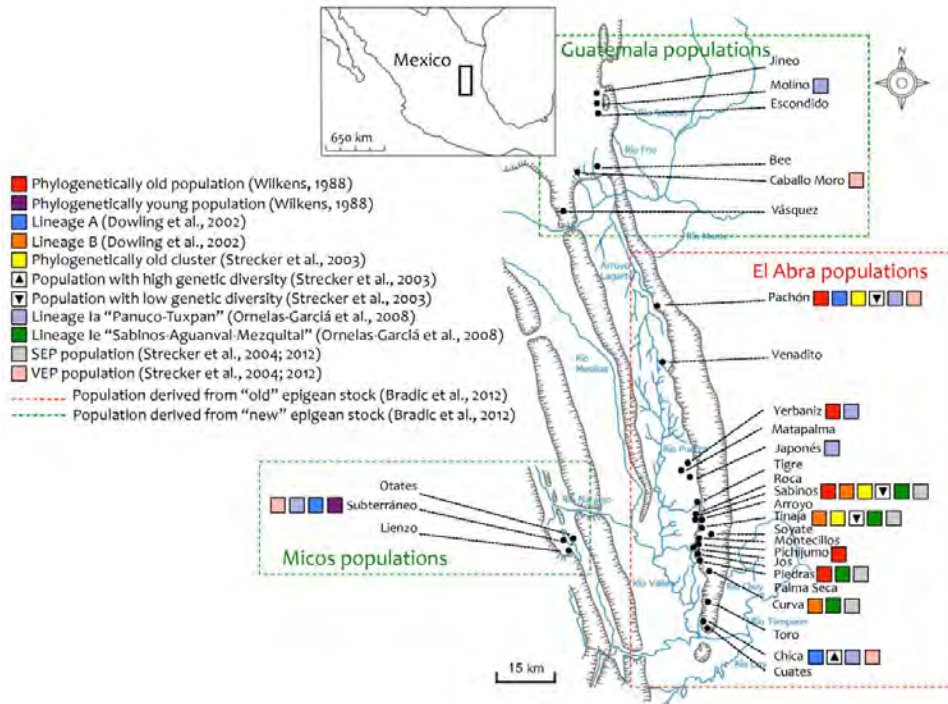


Figura 7. Distribución de las poblaciones de *A. mexicanus* de cuevas. La mayoría de las cuevas están localizadas en la Sierra del Abra. Las poblaciones enmarcadas en rojo corresponden a una primera oleada de colonización, mientras que las poblaciones de cueva en los recuadros verde fueron colonizadas en una segunda oleada más reciente. Imagen tomada de Gross (2012).

Los helmintos de las especies de *Astyanax* parecen haberlo acompañado desde su origen en el sur del continente, conformando una fauna de parásitos principal. Al menos 41 especies de helmintos parasitan *Astyanax* (Pérez-Ponce de León & Choudhury, 2010), siendo algunas exclusivas del género, como las especies de los géneros de digeneos *Wallinia* (*W. mexicana*) (Pérez-Ponce de León et al., 2015), y *Auriculostoma* (*A. totonacapanensis* y *A. lobatum*, Razo-Mendivil et al., 2014 Hernández-Mena et al., 2016), o los nematodos *P. neocaballeroi* y *R. mexicana*, que son objeto del presente estudio.

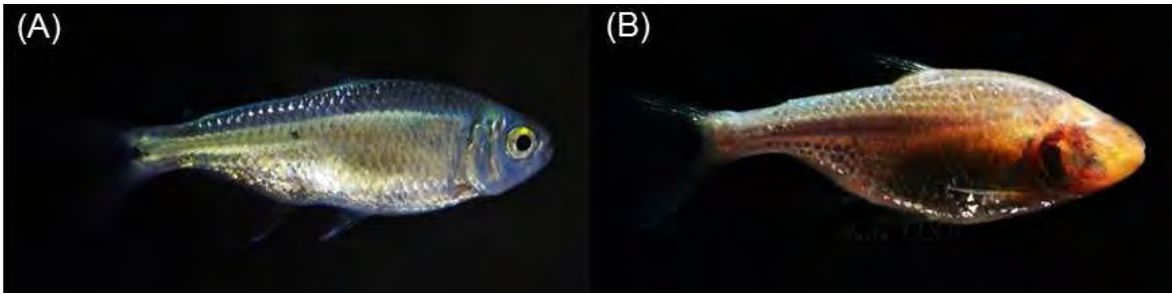


Figura 8. Morfotipos de *Astyanax mexicanus* habitantes de cuevas y de superficie. A) Fenotipo de las poblaciones de superficie de *A. mexicanus*, B) *A. mexicanus* de cueva Pachón, donde se muestra la ausencia de ojos y pigmentación.

La co-diversificación parásito-hospedero

En las asociaciones parasitarias los parásitos están asociados a sus hospederos, y en ocasiones específicamente a una sola especie, por lo tanto, eventos de especiación en el hospedero, pueden generar una barrera reproductiva en las poblaciones de parásitos (Avice, 2004). La repetición de estos eventos puede dar lugar a una concordancia en filogenias comparadas entre parásitos y hospederos. Desde Fahrenholz (Eichler 1948 en Falks & Perkins, 2013), se propuso que la diversificación de los parásitos refleja la de sus hospederos, pero ¿qué tan común es la co-especiación? La concordancia entre las filogenias no es el fenómeno más frecuente en la naturaleza, „es la excepción a la regla“ (Avice, 2004). Existen otros procesos evolutivos que intervienen en la diversificación y generan otros patrones, por ejemplo, eventos de duplicación (especiación en el mismo hospedero), extinción o cambio de hospedero (Paterson & Gray, 1997). Por ejemplo, en el género de nematodos *Rugopharynx*, parásitos del ualabí y el canguro en Australia no hay evidencia de coevolución hospedero-parásito y más bien se observa un patrón de cambio de hospedero en la evolución del género de nematodos (Chilton *et al.*, 2016).

En el modelo de estudio *Rhabdochona-Astyanax*; *Procamallanus-Astyanax*, ambos nematodos tienen una alta especificidad hospedatoria con *Astyanax*. La teoría sugiere que la especificidad hospedatoria moldea la diversificación de los

parásitos y su estructura genética, mediada por la capacidad de dispersión del hospedero, y el flujo génico que puede ser regulado por el número de especies que un parásito puede infectar. Por lo tanto, es posible que se observen patrones en común entre *Astyanax* y sus nematodos, aun cuando estos parecen no acompañar a su hospedero en toda su distribución.

III. HIPÓTESIS

Las poblaciones de *Procamallanus neocaballeroi* y *Rhabdochona mexicana* representan una sola especie a lo largo de su área de distribución, pese al aislamiento geográfico y diferencias de sus hospederos.

A partir de esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

IV. OBJETIVOS

- Reconocer la posible presencia de especies crípticas a partir del análisis de prospección molecular.
- Estimar la divergencia genética de *Rhabdochona mexicana* y *Procamallanus neocaballeroi* en *Astyanax* spp. a lo largo de su distribución utilizando marcadores nucleares y mitocondriales.
- Realizar análisis filogenéticos de los individuos de diferentes poblaciones de ambas especies a lo largo de su área de distribución en busca de monofilia recíproca.
- Analizar la variación morfológica de los individuos de *P. neocaballeroi* y *R. mexicana* en *Astyanax* spp., y su correlación con la potencial variación molecular.
- En el caso de la especie *P. neocaballeroi*, analizar la divergencia genética entre las poblaciones que habitan en *Astyanax mexicanus* en ambientes de superficie con respecto a aquellos que habitan en cuevas.

METODOLOGÍA GENERAL

Colecta de los hospederos

Individuos de *Astyanax aeneus* y *A. mexicanus* fueron colectados en 50 localidades (Tabla 3; Fig. 9) de México, Guatemala y Honduras, utilizando distintas artes de pesca, en el periodo comprendido entre 2013 y 2016. Los peces fueron sacrificados para llevar a cabo el análisis parasitológico, en el cual se revisaron los órganos internos del hospedero. Los nematodos encontrados fueron separados por morfoespecie, fijados en formol caliente al 4% para análisis morfológico y en etanol 100% para el análisis molecular.

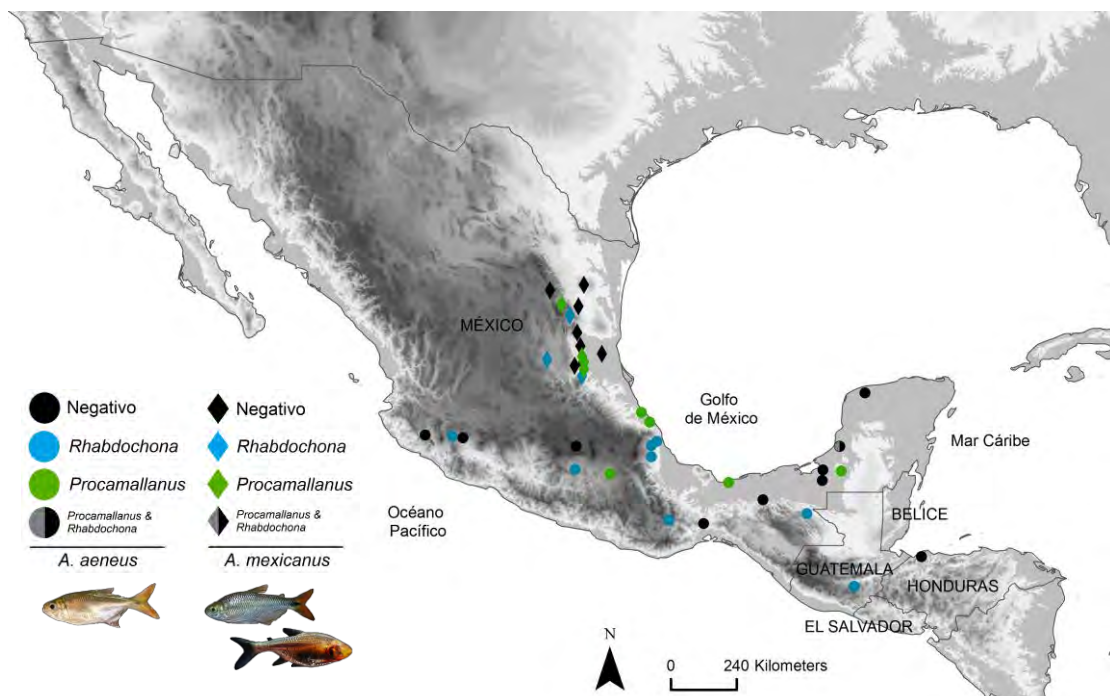


Figura 9. Sitios de colecta de *A. aeneus*, *A. mexicanus* y *A. caballeroi*. Se muestran los puntos de colecta positivos para *R. mexicana* y *P. neocaballeroi* indicando la especie de hospedero, las localidades en que los parásitos están en simpatria, y los sitios donde se encontró el hospedero pero no los nematodos de interés.

Tabla 3. Localidades de colecta y número de individuos de cada especie de nematodo parásito de *A. aeneus* y *A. mexicanus*

País/Estado	Localidad	Especie hospedero	N	Coordenadas		Especie nematodo
				Norte	Oeste	
México						
Campeche	La Libertad, Escárcega	<i>A. aeneus</i>	-	18° 30' 53.77"	90° 30' 6.44"	<i>P. neocaballeroi</i>
	Mamantel	<i>A. aeneus</i>	-	18° 32' 31.09"	91° 5' 51.09"	X
	Río Champoton, San Antonio del Río	<i>A. aeneus</i>	-	19° 19' 13.32"	90° 33' 21.52"	<i>P. neocaballeroi</i> , <i>R. mexicana</i>
	Salto Grande, Candelaria	<i>A. aeneus</i>	-	18° 11' 46.01"	91° 7' 10.48"	X
Chiapas	Finca Santa Ana, Pichucalco	<i>A. aeneus</i>	-	17° 34' 14.81"	93° 3' 55.56"	X
	Gregorio Méndez	<i>A. aeneus</i>	-	17° 27' 1.97"	91° 35' 48.37"	<i>P. neocaballeroi</i>
	Metzabok	<i>A. aeneus</i>	-	17° 7' 3.41"	91° 37' 54.61"	<i>R. mexicana</i>
Durango	San Juan Francisco Javier de Lajas	<i>A. mexicanus</i>	4	-	-	X
Jalisco	Arroyo Manántlán	<i>A. aeneus</i>	-	19° 41' 45.99"	104° 8' 32.33"	X
	Barranca el Limón, Santa María del Oro	<i>A. aeneus</i>	-	19° 35' 48.70"	102° 54' 14.98"	X
	Río La Rosa, San Vicente, Tamazula	<i>A. aeneus</i>	-	19° 38' 56.04"	103° 15' 24.59"	<i>R. mexicana</i>
Morelos	Real de Coacalco, Yautepec	<i>A. aeneus</i>	-	18° 51' 35.56"	99° 4' 33.23"	<i>R. mexicana</i>
	Río Amacuzac, El Chisco	<i>A. aeneus</i>	-	18.45° 80' 73"	95.19° 04' 02"	<i>R. mexicana</i>
Oaxaca	Nacimiento del Río Tehuantepec	<i>A. aeneus</i>	-	16° 53' 57.68"	96° 9' 57.33"	<i>R. mexicana</i>
	Río Grande, Matias Romero	<i>A. aeneus</i>	-	16° 47' 30.81"	95° 1' 0.50"	X
	San Juan del Río	<i>A. aeneus</i>	-	19° 19' 14.54"	99° 11' 39.34"	X
Tamaulipas	Carr. A Cd. Victoria, Soto La Marina	<i>A. mexicanus</i>	7	23° 42' 55"	98° 49' 07"	X
	Plan de Ayala	<i>A. mexicanus</i>	5	23° 34' 02.2"	99° 24"	<i>R. mexicana</i>
	Puente Guemez	<i>A. mexicanus</i>	-	23° 54' 43.25"	99° 6' 48.68"	X
	Río Purificación	<i>A. mexicanus</i>	10	24° 05' 21.3"	99° 09' 54"	X
	Río Guayalejo, La Peñita	<i>A. mexicanus</i>	-	23° 19' 39.59"	99° 01' 39.22"	<i>P. neocaballeroi</i>
Querétaro	Río Jalpán, Santa María, Jalpán	<i>A. mexicanus</i>	-	21° 12' 14.76"	99° 28' 28.2"	<i>P. neocaballeroi</i> , <i>R. mexicana</i>
San Luis Potosí	Arroyo Lagartos, Praxis de Guerrero	<i>A. mexicanus</i>	13	-	-	X
	Canoas	<i>A. mexicanus</i>	2	22° 0' 9.79"	99° 32' 36.54"	<i>R. mexicana</i>
	Cascada Micos	<i>A. mexicanus</i>	-	22° 21' 12.42"	98° 20' 38.52"	X
	Cueva Arroyo	<i>A. mexicanus</i>	10	-	-	X
	Cueva Chica	<i>A. mexicanus</i>	15	21° 51' 35.16"	98° 56' 11.87"	<i>P. neocaballeroi</i>
	Cueva Molinos	<i>A. mexicanus</i>	10	-	-	X
	Cueva Pachon	<i>A. mexicanus</i>	19	-	-	X
	Cueva Pichijumo	<i>A. mexicanus</i>	1	-	-	X

	Cueva Sabinos	<i>A. mexicanus</i>	24	22° 6' 0"	89° 55' 59.99"	<i>P. neocaballeroi</i>
	Nacimiento del Río Huichihuayán	<i>A. mexicanus</i>	-	21° 28' 48'	98° 58' 1.99"	<i>P. neocaballeroi</i>
	Río Gallinas, Rascón	<i>A. mexicanus</i>	-	21° 57' 59.25"	99° 14' 41.92"	X
	Vereda	<i>A. mexicanus</i>	8	21° 2' 35.34"	99° 0' 0"	<i>R. mexicana</i>
Tabasco	Camino a Coronel Traconis	<i>A. aeneus</i>	10	17° 56' 13.15"	92° 48' 41.09"	<i>P. neocaballeroi</i>
Veracruz	Afluente Río Actopan, Loc. La Esperanza	<i>A. aeneus</i>	-	19° 28' 53.95"	96° 33' 16.33"	<i>R. mexicana</i>
	Agua Dulce	<i>A. aeneus</i>	-	18° 7' 45.49"	94° 11' 19.99"	<i>P. neocaballeroi</i>
	Catemaco	<i>A. caballeroi</i>	-	18° 25' 00"	95° 07' 00"	<i>P. neocaballeroi</i>
	El Crucero, Paso de Ovejas	<i>A. aeneus</i>	-	19° 19' 1.35"	96° 32' 11.59"	<i>R. mexicana</i>
	Laguna Encantada, San Andrés, Tuxtla	<i>A. aeneus</i>	-	18.45° 80' 73"	95.19° 04' 02"	<i>R. mexicana</i>
	Paso del Macho	<i>A. aeneus</i>	-	18° 58' 18.80"	96° 43' 53.32"	X
	Puente Galeana, Tecolutla	<i>A. mexicanus</i>	-	20° 25' 44"	97° 3' 14"	<i>P. neocaballeroi</i>
	Río Nautla, Camino a Mizantla, En "El Jasco"	<i>A. mexicanus</i>	-	20° 6' 31.77"	96° 47' 11.23"	<i>P. neocaballeroi</i>
	Río Paso de Ovejas, Pueblo el Crucero	<i>A. aeneus</i>	-	19° 19' 1.35"	96° 32' 11.59"	<i>R. mexicana</i>
	Río Tonola, Agua Dulce	<i>A. aeneus</i>	-	18° 7' 45.49"	94° 11' 19.99"	<i>P. neocaballeroi</i>
Yucatán	Cenote Noc-Ac	<i>A. aeneus</i>	-	21° 4' 23.00"	89° 43' 14.00"	X
Guatemala	Guatemala	<i>A. aeneus</i>	-	14° 16' 16"	90° 53' 59"	<i>R. mexicana</i>
	Puente Sansare	<i>A. aeneus</i>	-	14° 44' 52"	90° 06' 33"	<i>R. mexicana</i>
	Río las Cabezas, Saranate	<i>A. aeneus</i>	-	14° 44' 23"	90° 4' 52"	<i>R. mexicana</i>
Honduras	Baja Mar	<i>A. aeneus</i>	-	15° 53' 4"	87° 52' 24"	X

X: sitios negativos para ambas especies de parásitos

Análisis morfológico

Los nematodos fijados en formol caliente al 4%, y algunos ejemplares almacenados en alcohol, fueron aclarados en una solución 1:1 de glicerol-alcohol 70%, medidos y fotografiados en un microscopio invertido motorizado Olympus IX81, mediante microscopía de luz e iluminación Normarski. Individuos seleccionados fueron preparados para microscopía electrónica de barrido (MEB), a través de deshidrataciones graduales en alcohol, a partir de una concentración del 30% hasta el 100%, secadas a punto crítico con CO₂, montadas en portamuestras con cinta de carbono, recubiertas una mezcla de oro-paladio, y observadas en un microscopio Hitachi SU1510.

Los esquemas de cada morfotipo encontrado se hicieron con una cámara clara acoplada a un microscopio Olympus BX51 y editadas en Adobe Illustrator CS6.

Algunos ejemplares de *R. mexicana* y *P. neocaballeroi* depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) del Instituto de Biología, UNAM, fueron revisados para contrastar la morfología con los ejemplares obtenidos en este estudio.

Análisis molecular

Para el análisis morfológico de cada individuo se preservó la región anterior y posterior de cada individuo para el análisis morfológico (hologenóforo *sensu* Pleijel *et al.*, 2008). La extracción de ADN genómico de nematodos individuales, se llevó a cabo colocando la muestra en 100 µl de solución de lisis (100 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 0.5M EDTA pH8, 10% Sarkosyl) y se añadió proteínasa K previo a la incubación de 8 h a 56°C (ocasionalmente agitando el tubo). Después de la disolución del tejido, se añadió DNAzol® Reagent (Invitrogen, cat. 10503027) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la extracción de ADN también se utilizó para la extracción de ADN el kit REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma, cat. XNAT) siguiendo el protocolo del fabricante. Las condiciones óptimas para una amplificación específica se obtuvieron probando varias temperaturas de alineamiento. Se amplificaron dos regiones nucleares; el gen 18S y el gen 28S rDNA, además, una región mitocondrial que corresponde al gen citocromo oxidasa subunidad 1 (Cox1). Los primers empleados se enlistan en la [Tabla 4, Fig. 10](#). Las reacciones de PCR (25 µl) consistieron en 2 µl de DNA genómico, 1 µl de cada cebador (10 pmol cada uno), 0.125 µl Taq DNA Polymerase (Vivantis, cat. PL1202), 2.5 µl dNTP (2 mM), 1.5 µl MgCl₂, y 14.375 µl de ddH₂O. Las condiciones del PCR para los cebadores JB3-JB4.5 y pr-a-pr-b fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), 40°C por 1 min (alineación), 72°C por 2 min (extensión) y 72°C por 7 min (extensión final). Para los cebadores COIntF-COIntR: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° por 1 min, 45°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72° C por 7 min. Para las combinaciones de cebadores LCO-HCO y 507-HCO las condiciones fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° por 1 min, 48°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72° C por 7 min. Para los

cebadores para 28S rDNA fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94° por 1 min, 50°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72°C por 7 min. Para amplificar la región 18S rDNA el programa fue: desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido de 33 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 30s, 72°C por 1 min, y una extensión final de 7 min a 94°C. Los productos de PCR fueron purificados enzimáticamente con ExoSAP (Affymetrix, cat. 78201), y secuenciados en las instalaciones del Laboratorio de Secuenciación Genómica del Instituto de Biología-UNAM, y en el High Througput Genomics Unit de la Universidad de Washington, EUA.

Tabla 4. Secuencias de *primers* utilizados para amplificar marcadores nucleares y mitocondriales

Nombre del primer	Región	Secuencia (5'-3')	Referencia
JB3	Cox1	F: TTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	Gasser <i>et al.</i> , 1999
JB4.5	Cox1	R: TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG	Gasser <i>et al.</i> , 1999
pr-a	Cox1	F: TGGTTTTTTGTGCATCCTGAGGTTTA	Bessho <i>et al.</i> , 1992
pr-b	Cox1	R: AGAAAGAACGTAATGAAAATGAGCAAC	Bessho <i>et al.</i> , 1992
COLintF	Cox1	F: TGATTGGTGGTTTTGGTAA	Casiraghi <i>et al.</i> , 2001
COLintR	Cox1	R: ATAAGTACGAGTATCAATATC	Casiraghi <i>et al.</i> , 2001
LCO1490	Cox1	F: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> , 1994
HCO2198/588	Cox1	R: TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> , 1994
507	Cox1	F: AGTTCTAATCATAARGATATYGG	Nadler <i>et al.</i> , 2006
391	28S rDNA	F: AGCGGAGGAAAAGAACTAA	Nadler & Hudspeth, 1998
502	28S rDNA	F: CAAGTACCGTGAGGAAAGTTGC	García-Varela & Nadler., 2005
536	28S rDNA	R: CAGCTATCCTGAGGAAAC	García-Varela & Nadler., 2005
G18S4	18S rDNA	F: GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC	Nadler <i>et al.</i> , 2000
136	18S rDNA	R: TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Nadler <i>et al.</i> , 2000
649	18S rDNA	R: TAAGAACGGCCATGCACCAC	Nadler <i>et al.</i> , 2000
ssU18A	18S rDNA	F: CATGAAAGATTAAGCCATG	-
ssU26R	18S rDNA	R: CATTCTTGGCAAATGCTTTG	-

(F) *primer* forward; (R) *primer* reverse.

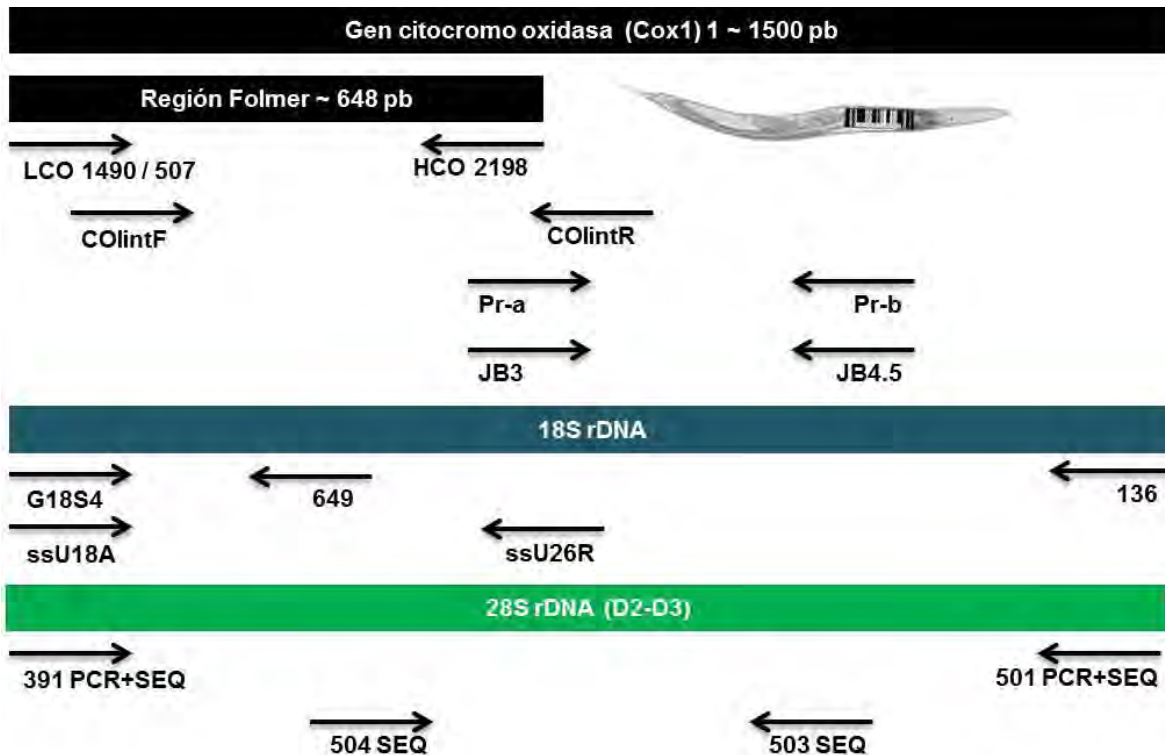


Figura 10. Diagrama esquemático de la posición relativa de los *primers*. Las flechas indican la dirección de la amplificación de cada primer durante el PCR. PCR: primer utilizado en la amplificación, SEQ: primer utilizado en la reacción de secuenciación.

Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas en el programa Geneious v4.8.4 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). Posteriormente, se alinearon con el algoritmo de ClustalW v2 (ClustalW2) del EMBL-EBI (McWilliam *et al.*, 2013). El modelo de evolución para cada marcador molecular, se obtuvo mediante jModelTest v2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012) y fue seleccionado mediante el criterio Akaike (AIC). Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo mediante dos aproximaciones; Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI), mediante los programas RAxML 1.3 (Stamatakis, 2014) y Mr. Bayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), respectivamente. Los árboles finales fueron visualizados en FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2016). Las distancias genéticas observadas (distancia p) a nivel intraespecífico e interespecífico fueron calculadas en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2015).

Análisis genéticos

Se utilizó Cox1 como marcador molecular para medir la estructura genética de los linajes de *Rhabdochona* y *Procamallanus* de *Astyanax*, a través de varios estadísticos implementados en DNASP v. 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009): número de haplotipos, diversidad haplotípica, promedio de diferencias nucleotídicas por sitio (π), tasa de mutación poblacional usando el número de sitios segregantes y la distribución del número de diferencias apareadas entre las muestras de cada linaje con un análisis de mismatch.

Aislamiento por distancia

Se calcularon las distancias euclidianas entre pares de localidades de colecta, y las distancias genéticas con el marcador mitocondrial Cox1, asumiendo cada localidad como poblaciones separadas. Con esta información se evaluó si las diferencias genéticas entre poblaciones están asociadas con el aislamiento geográfico. Se hizo una prueba de Mantel implementada en el programa en línea "Isolation by distance" v3.23 para determinar si la correlación es significativa estadísticamente (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>) (Bohonak, 2002).

RESULTADOS

Los resultados de la tesis están presentados en dos capítulos con formato de artículo. El primer artículo describe el análisis de prospección molecular de especies en *Procamallanus neocaballeroi*, y el segundo capítulo expone los resultados de variación genética y morfológica en *Rhabdochona mexicana*. Finalmente, la discusión general esboza los puntos en común entre los dos géneros de nematodos parásitos de *Astyanax*.

CAPÍTULO I

Prospección molecular de *Procamallanus neocaballeroi* (Nematoda: Camallanidae) en *Astyanax* spp. (Characidae) habitantes de cuevas y de superficie

RESUMEN

Procamallanus neocaballeroi es un nematodo parásito de la familia Camallanidae que se distribuye desde Coahuila, en el norte de México, hasta Nicaragua, mostrando una estricta especificidad hospedatoria a dos especies del género *Astyanax*; *A. aeneus* y *A. mexicanus*. Esta última tiene poblaciones que habitan en diferentes cuencas hidrológicas y también algunas que habitan en cuevas en algunas localidades de México. En este estudio, ejemplares de *P. neocaballeroi* fueron recolectados de 10 localidades en México, dos de ellas correspondiendo a cuevas. Se generaron secuencias nucleóticas de un marcador mitocondrial (Cox1) y dos marcadores nucleares (18S y 28S rDNA). Las reconstrucciones filogenéticas se infirieron a través de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, con base en Cox1, permitieron recuperar tres linajes genéticos, cada uno con un patrón geográfico y hospedatorio definido, y divergencias genéticas de 5 a 7% entre dichos linajes. El Linaje I agrupó las dos poblaciones de cueva y varias de superficie, es decir, mientras que el hospedero ha divergido en varios linajes, las poblaciones de *Procamallanus* Linaje I no reflejan la misma divergencia. El estudio morfológico no permitió, por el momento, encontrar diferencias entre linajes. Con base en estos resultados, se propone que *P. neocaballeroi* de *Astyanax* spp. constituye un complejo de especies crípticas.

Palabras clave: especie críptica, nematodos, *Procamallanus*, *Astyanax*.

INTRODUCCIÓN

Procamallanus neocaballeroi (Nematoda: Camallanidae), fue descrita como *Spirocamallanus neocaballeroi* por Caballero-Deloya (1977) parasitando a

Astyanax fasciatus (= *A. caballeroi*) del Lago Catemaco, Veracruz. Originalmente se describió como *Spirocamallanus neocaballeroi*. Pertenece a una familia de nematodos parásitos de hospederos marinos y de agua dulce (Moravec & Van, 2015). El género está dividido en seis subgéneros, tres de ellos presentes en América (Moravec, 1998). En México, seis especies de *Procamallanus* son conocidas en peces de agua dulce, y sólo una de peces marinos; *P. chetumalensis* de *Ariopsis assimilis* (González-Solís *et al.*, 2002). *Procamallanus neocaballeroi* es considerado dentro del subgénero *Spirocamallanus*, por la presencia de surcos espirales en la cápsula bucal en ambos sexos (Olsen, 1952). Esta especie difiere claramente de las especies congénicas que se distribuyen en México, por la presencia de espículas simétricas. Este nematodo tiene una amplia distribución; desde Cuatro Ciénegas, Coahuila en la parte norte de México, hasta Nicaragua (Aguirre-Macedo *et al.*, 2001) y Costa Rica (Sandlund *et al.*, 2010). Asimismo, exhibe una estricta especificidad hospedatoria hacia carácidos, en particular *Astyanax mexicanus* y *A. aeneus*. *Astyanax mexicanus* se ha registrado en 29 cuevas (Jeffery, 2001). Esta especie tiene dos morfos interfértiles, uno que habita la superficie y otro que habita cuevas, y tiene características troglóbias. El origen de *Astyanax* es complejo, la divergencia entre las poblaciones de cueva y superficie ocurrió hace varios millones de años, resultando en múltiples colonizaciones de cueva, que repetidamente dieron lugar a un fenotipo troglóbico, es decir, ocurrió un paralelismo evolutivo (Gross, 2012). Las especies de *Astyanax* distribuidas en México y Centro América, están conformadas por al menos cinco linajes genéticamente distintos, que implican la presencia de mayor número de especies, además de *A. aeneus* y *A. mexicanus* (Ornelas-García *et al.*, 2008).

El surgimiento de los estudios moleculares ha sido de gran importancia en varios niveles de la clasificación taxonómica; particularmente, su uso ha sido clave en la detección de especies crípticas (Leduc, 2016; Schenk, 2016), es decir, organismos morfológicamente indistinguibles, pero genéticamente distintos (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010; Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011). La teoría sugiere que especies de parásitos con amplia distribución y que se encuentran en múltiples

especies de hospederos tienen mayor probabilidad de representar especies crípticas. *Procamallanus neocaballeroi* es altamente específico hacia carácidos, sin embargo, parece que junto a su hospedero ha invadido una amplia área geográfica, incluyendo ambientes de cueva (Santacruz, 2013). La amplia distribución geográfica de la especie, aunada a la divergencia de su hospedero en dos ambientes contrastantes hace millones de años, permite realizar un estudio de prospección molecular para determinar si es posible que la especie represente un complejo de especies crípticas.

El objetivo principal de este estudio es realizar una prospección molecular con el fin de detectar especies crípticas en *P. neocaballeroi* como parásito de *Astyanax* spp., e investigar si existe una diferenciación genética del parásito que este correlacionada con los linajes de *Astyanax* en Norte América, considerando en el caso de *A. mexicanus* a aquellas poblaciones habitantes de cuevas y de superficie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras, extracción de ADN y secuenciación

Ejemplares de dos especies de *Astyanax* fueron recolectados de 10 localidades en México ([Tabla 1](#), [Fig. 1](#)), incluyendo ambientes de cuevas y superficie. Los peces se obtuvieron con redes tipo chinchorro o con electropesca, se mantuvieron con vida hasta su traslado al laboratorio, donde fueron sacrificados para posteriormente ser disectados y obtener los órganos internos. Estos fueron colocados separadamente en cajas de Petri con solución salina al 0.65%. Los nematodos recuperados se fijaron, algunos en alcohol caliente para el estudio morfológico y otros se colocaron directamente en OH 100% para el estudio molecular. La región intermedia del nematodo se utilizó para los análisis moleculares, la región anterior y posterior, se preservó para los análisis morfológicos y como vouchers para ser depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE).

Para el estudio morfológico, los organismos, o los extremos de éstos, fueron colocados en glicerina y montados en preparaciones semipermanentes. Para el estudio molecular, el ADN genómico fue extraído utilizando el kit de extracción REDEextract kit (Sigma) y DNAzol (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los PCR fueron hechos en reacciones de 25µl; 0.125µl de TaqDNA polimerasa (Vivantis), 1µl de cada primer, 2.5 µl dntp 2mM, 1.5 µl MgCl₂, 2.5 µl Buffer, 14.375 µl de agua libre de nucleasas, y 2µl del templado de ADN. Los primers utilizados se enlistan en [Tabla 2](#). Los detalles de amplificación para los primers pr-a–pr-b fueron los siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), 40°C por 1 min (alineación), 72°C por 2 min (extensión) y 72°C por 7 min (extensión final). Para los *primers* COLintF-COLintR: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° por 1 min, 45°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72° C por 7 min. Para las combinaciones de *primers* LCO-HCO y 507-HCO las condiciones fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° por 1 min, 48°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72° C por 7 min. Para los primers del marcador 28S rDNA fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94° por 1 min, 50°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72°C por 7 min. Para amplificar la región 18S rDNA se efectuó la desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido de 33 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 30s, 72°C por 1 min, y una extensión final de 7 min a 94°C. Los productos de PCR fueron purificados enzimáticamente con Exo-SAP-IT (Affymetrix) y secuenciados en el Laboratorio de Secuenciación Genómica, Instituto de Biología, UNAM.

Análisis filogenéticos

Las secuencias de ADN fueron ensambladas en Geneious (Kearse *et al.*, 2012), alineadas en la plataforma en línea Clustal W (McWilliam *et al.*, 2013), y analizadas visualmente en Mesquite (Maddison & Maddison, 2016), para determinar ambigüedades. El modelo de sustitución más adecuado se calculó en JModelTest (Darriba *et al.*, 2012) utilizando el criterio de información Akaike (AIC).

Las filogenias para cada gen fueron reconstruidas mediante una aproximación de Máxima Verosimilitud (ML) y de Inferencia Bayesiana (BI). Se incluyeron en la matriz del gen Cox1 las secuencias disponibles en el GenBank de las especies *Camallanus cotti* (EU598890.1), *C. hypophthalmichthys* (EU598816.1), *S. istiblenni* (KC517405.1) y *D. lutrae* (EU646614.1) miembro de Dracunculoidea, la familia hermana de Camallanoidea (Nadler *et al.*, 2000). Para el análisis del 28S se utilizaron las secuencias del GenBank: *C. waelhreow* (FJ969499.1), *C. nithoggi* (FJ969498.1), *C. tuckeri* (FJ969497.1) y *Camallanus* sp. (HQ730896.1), y se generó una secuencia de *Rhabdochona mexicana* para utilizarse como grupo externo. En la matriz del marcador 18S se incluyeron las secuencias del GenBank: *P. monotaxis* (JF803931.1), *S. istiblenni* (EF180076.1), *P. annulatus* (JF803932.1), *P. sigani* (HM545908.1), *S. philippinensis* (JF934736.1), *P. pinto* (DQ442666.1), *C. oxycephalus* (DQ503463.1), *C. lacustris* (DQ442663.1), *C. cotti* (EF180071.1), *S. rarus* (DQ494195.1), *P. pacificus* (DQ442665.1), *P. laevionchus* (KP274849.1), *P. fulvidraconis* (JF803914.1), *P. cyathopharynx* (DQ813445.1) y *D. lutrae* (JF934737.1) como grupo externo. Además, se generaron secuencias para los tres marcadores moleculares de especies de *Procamallanus* de varias especies de ciclidos (Cichlidae) y de *Procamallanus* recuperados en *A. monticola* (Mugilidae). Los análisis de Máxima Verosimilitud fueron realizados en el programa RAXML 1.3 mediante un análisis completo de bootstrap (Stamatakis, 2014). La reconstrucción bayesiana se hizo en MrBayes 3 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Consistió en dos corridas independientes de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) por 10 millones de generaciones con muestreos de árboles cada 1000 generaciones. Todos los árboles generados fueron visualizados en in FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2016).

Divergencia genética y aislamiento por distancia

Las *distancias-p* no corregidas del marcador mitocondrial Cox1 fueron calculadas en MEGA v.6 (Kumar *et al.*, 2015). Las *distancias-p* en conjunto con las distancias geográficas euclidianas, se emplearon para definir si la similitud genética entre las poblaciones disminuye cuando aumenta la distancia geográfica, es decir, un

patrón de aislamiento por distancia (Wright, 1940 en Jensen *et al.*, 2005). Los resultados se evaluaron con una prueba de Mantel para probar la asociación no aleatoria entre ambas matrices (diferencias significativas estadísticamente). El análisis se hizo con 10, 000 permutaciones en el programa en línea de *Isolation by distance* v3.23 (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>) (Bohonak, 2002). Los análisis se hicieron considerando a cada localidad como una población distinta, y se compararon entre los linajes recuperados en las reconstrucciones filogenéticas.

Análisis de estructura poblacional

Las matrices alineadas del marcador Cox1 fueron utilizadas para los análisis efectuados en DNAsp (Librado & Rozas, 2009), excluyendo los sitios con gaps del alineamiento. El formato de los datos se asignó como haploide usando un código genético “mtflatworm”. Se calculó el número de haplotipos, diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, D de Tajima e índice Nei. Para determinar la estructura poblacional, se calculó Fst entre cada par de poblaciones en el programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Se construyó una red de haplotipos usando *Minimum Spanning Network* (Bandelt *et al.*, 1999) utilizando *Population Analysis with Reticulate Trees* (PopART) (<http://popart.otago.ac.nz>) (Leight & Bryant, 2015).

RESULTADOS

Relaciones filogenéticas con base en las secuencias mitocondriales

Se generaron 40 secuencias del gen Cox1 de *P. neocaballeroi* recolectados de *A. mexicanus*, *A. aeneus* y *A. caballeroi*. El alineamiento final consistió de 70 terminales, incluyendo las 40 secuencias de *P. neocaballeroi* y 26 secuencias de otras tres especies de *Procamlanus*, con una longitud de 806 pares de bases. El análisis se corrió utilizando GTR+G+I como el mejor modelo de sustitución. Los análisis con Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana produjeron topologías similares, ambos recuperando tres linajes separados por especie de hospedero cada uno con altos valores de bootstrap y probabilidad posterior (Fig. 2). El primer linaje incluye a la especie nominal *P. neocaballeroi* de la localidad tipo (Lago de

Catemaco, Veracruz), y dos localidades más (Puente Galeana, en el Río Tecolutla - PGT y en el Río Nautla, camino a Mizantla - RNJ, ambos también en Veracruz) ([Tabla 1](#)), parasitando inclusive carácidos que ocurren en simpatria, *A. aeneus* y *A. caballeroi*. El segundo linaje incluye las poblaciones que se encuentran más al norte de la distribución de *P. neocaballeroi* (cueva Sabinos y cueva Chica), así como poblaciones de superficie de Tamaulipas, Querétaro y San Luis Potosí, todos en *A. mexicanus*. Las dos localidades de cueva se agrupan en subclados distintos, que también contienen a las poblaciones de superficie. Un tercer linaje está conformado por ejemplares de *P. neocaballeroi* que parasitan a *A. aeneus* de Campeche (LLE) y Veracruz (RTA) ([Tabla 1](#)).

Relaciones filogenéticas con base en las secuencias nucleares

Los árboles obtenidos con las regiones del gen 28S y 18S rDNA no recuperan los tres linajes genéticos obtenidos con el gen mitocondrial, y muestran una menor resolución en relación a la relación entre los tres linajes ([Fig. 3 y 4](#)). La posición filogenética de *P. neocaballeroi* con base al gen 18S rDNA, la coloca como especie hermana de *P. pintoii*. La parafilia con el género *Camallanus* se mantiene como había propuesto previamente Nadler *et al.*, (2007).

Divergencia genética y aislamiento por distancia

La divergencia genética entre los linajes fue mayor al 5% entre cada linaje del complejo *Procamallanus-Astyanax* ([Tabla 3](#)): variando de 5.11% a 6.79%, donde el valor más alto corresponde a la distancia genética entre *P. neocaballeroi* y *Procamallanus* Linaje I. La variación intra-específica fue de 0.40% a 1.76%, siendo el valor más bajo de *Procamallanus* Linaje I y el valor más alto a *P. neocaballeroi*.

No se observó un patrón significativo de aislamiento por distancia, aun cuando la correlación fue alta: *P. neocaballeroi* (prueba de Mantel, $r= 0.9587$) y *Procamallanus* Linaje I (prueba de Mantel, $r= 0.8484$, $p= 0.0574$). Las gráficas de las correlaciones entre las distancias genéticas y geográficas se muestran en la

[Fig. 6](#). *Procamallanus* linaje II no fue analizado porque está representado únicamente por dos localidades.

Análisis de estructura poblacional

Los valores de diversidad genética se muestran en la [Tabla 4](#). Los linajes de *Procamallanus-Astyanax* mostraron alta diversidad genética: la haplotípica fue de 0.250 a 0.858, y la nucleotídica de 0.00247 a 0.01050, con *P. neocaballeroi* mostrando la mayor diversidad genética.

Los valores de F_{st} ([Tabla 5](#)) fueron altos entre todas las poblaciones comparadas, lo que indica elevada diferenciación genética, es decir, poco flujo génico y alta deriva génica. Los valores más altos fueron entre las poblaciones de *Procamallanus* Linaje I de Cueva Chica y Cueva Sabinos, aspecto que sugiere poblaciones más aisladas y con mayor diferenciación genética. Los valores de F_{st} de *Procamallanus* Linaje II no se calcularon debido a que la población de Río Tonalá (RTA) está representada por un solo individuo.

Las redes de haplotipos concuerdan con los resultados anteriores; la mayoría de los haplotipos en el complejo *Procamallanus-Astyanax* no fueron compartidos entre poblaciones ([Fig. 6](#), [Tabla 6](#)). En *P. neocaballeroi* se observó un patrón geográfico en la distribución de los haplotipos ([Fig. 6A](#)), la población de Lago de Catemaco (LC) presentó el mayor número de haplotipos únicos, mientras que las poblaciones más cercanas entre ellas (Río Tecolutla - PGT y en el Río Nautla, camino a Mizantla – RNJ) compartieron un haplotipo. En *Procamallanus* Linaje I, un haplotipo fue compartido entre seis individuos de cuatro poblaciones ([Fig. 6B](#)), tanto de nematodos de *A. mexicanus* de superficie y de Cueva Chica. Los nematodos de cueva Sabinos no tuvieron ningún haplotipo en común con las otras poblaciones. En *Procamallanus* Linaje II cada población tuvo haplotipos únicos conectados por pocos pasos ([Fig. 6C](#)).

Estudio morfológico

Las medidas de cada uno de los linajes de *Procamallanus-Astyanax* se detallan en la [Tabla 7](#). En el análisis de los caracteres diagnósticos utilizados en el género *Procamallanus*, no se encontraron diferencias morfológicas que permitieran separar y describir a cada uno de los linajes ([Fig. 7](#)); la terminación caudal en las hembras y machos es similar ([Fig. 8](#)). Los nematodos de *Procamallanus* Linaje I difieren en tamaño en la mayoría de los caracteres, pero es necesario un mayor número de individuos. En *Procamallanus* Linaje II, no se dispusieron de nematodos adultos machos para hacer mediciones. A continuación se detallan algunas de las principales características de cada uno de los linajes.

Procamallanus neocaballeroi (de *A. aeneus* y *A. caballeroi*) ([Fig. 9](#))

Nematodos de tamaño mediano con cutícula lisa. La apertura oral ovalada está rodeada por seis elevaciones; el par de elevaciones laterales son de mayor tamaño ([Fig. 9A](#)). Además, ocho papilas en un arreglo circular (cuatro grandes y cuatro pequeñas) y un par de anfidios laterales. Cápsula bucal casi circular (levemente más ancha que larga) de color naranja, con una superficie interna con 15 a 18 surcos espirales serrados en toda la cápsula bucal ([Fig. 9B](#)). Esófago glandular tres veces más grande que el esófago muscular. Deiridios pequeños simples situados a la altura del anillo nervioso ([Fig. 9C](#)). El poro excretor se encuentra por debajo del anillo nervioso. Cauda con terminación en punta sin extensiones cuticulares en ambos sexos ([Fig. 9D](#)).

***Procamallanus* Linaje I** (de *A. mexicanus*) ([Fig. 10](#))

Nematodos de tamaño mediano con cutícula ligeramente estriada. La apertura oral tiene forma oval, está rodeada por seis elevaciones, siendo el par de elevaciones laterales más prominentes que el resto ([Fig. 10B](#)). Además, 13 a 16 surcos espirales apenas visibles en posición apical. Anillo nervioso rodeando al esófago muscular en la primer mitad, poro excretor por debajo del anillo nervioso ([Fig. 10A](#)). Deiridios pequeños y simples. La cauda en ambos sexos tiene terminación en punta ([Fig. 10C](#)).

***Procamallanus* Linaje II (de *A. aeneus*) (Fig. 11)**

Nematodos de tamaño mediano, con capsula bucal simétrica. La apertura oral está rodeada por ocho papilas y dos anfidios, además seis elevaciones; siendo el par lateral más prominente que el resto (Fig. 11A). La cápsula bucal presenta 18 surcos espirales dentados (Fig. 11A). Deiridios pequeños y simples (Fig. 11C).

Observaciones

Individuos de *Procamallanus* Linaje I a diferencia de *P. neocaballeroi* y *Procamallanus* Linaje II tienen una apertura oral más pequeña que apenas deja visibles los surcos internos, además un menor número de surcos espirales. El margen serrado de los surcos espirales se ha reportado en *P. belenensis* parásito de *Ageneiosus ucayalensis* (Giese *et al.*, 2009). Los nematodos de *Procamallanus-Astyanax* son muy similares morfológicamente a *P. hilarii* reportada en los carácidos *A. fasciatus* y *A. jacuhiensis* en Brasil (Gallas *et al.*, 2015); pero son de mayor tamaño, tienen menor número de surcos espirales y presentan una bifurcación distal en ambas espículas, carácter que no se observa en los individuos analizados en este estudio.

DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que *Procamallanus neocaballeroi* representa un complejo de al menos tres especies crípticas, apoyado en la monofilia recíproca, divergencia genética y un patrón hospedatorio y geográfico distinto. Los dos linajes genéticos que fueron reconocidos, denominados aquí como Linaje I y Linaje II, tienen una gran similitud morfológica, por este motivo, decidimos referir ambos linajes como especies crípticas. La divergencia genética entre los linajes del complejo *Procamallanus-Astyanax* está por encima del umbral propuesto para especies congénicas de nematodos utilizando el marcador mitocondrial Cox1, que es ampliamente utilizado en estudios de prospección molecular (Blouin, 2002; Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010).

Los resultados permiten inferir una distribución geográfica más restringida en el complejo de especies *Procamallanus-Astyanax* y una especificidad hospedatoria más estricta. *Procamallanus neocaballeroi* parásita a *A. aeneus* y *A. caballeroi*, y se encontró en ambos morfotipos de *Astyanax* en el Lago de Catemaco (Ornelas-García *et al.*, 2014), la localidad tipo de *P. neocaballeroi* (Caballero-Deloya, 1977). Esto indica que ambos morfotipos se alimentan del hospedero intermediario de *P. neocaballeroi*. Las poblaciones de *Procamallanus* de cueva y superficie se agrupan en un mismo linaje, *Procamallanus* linaje I. La hipótesis inicial era que los nematodos de hospederos de cueva y superficie formarían linajes distintos, considerando que los peces de cueva se separaron hace millones de años de los peces de superficie (Bradic *et al.*, 2012). Ambas cuevas donde se encontraron nematodos corresponden a hospederos provenientes de la oleada de colonización más antigua (Bradic *et al.*, 2012), pero pertenecen a linajes distintos (Dowling *et al.*, 2002; Ornelas-García *et al.*, 2008; Strecker *et al.*, 2012). Las poblaciones de parásitos podrían estar conectadas si existe flujo génico entre sus hospederos (Bradic *et al.*, 2012) que permita el intercambio genético entre sus parásitos. Una siguiente hipótesis es que *Procamallanus* Linaje I estaba presente en *Astyanax* desde antes que éste colonizara las cuevas, y por lo tanto, el tiempo de separación no ha sido el suficiente para generar un proceso de especiación del parásito. El hospedero podría representar un ambiente constante para el parásito, donde los cambios fenotípicos del hospedero no se han reflejado en cambios en su respuesta al parásito, actuando como un amortiguador del ambiente contrastante donde vive el hospedero. Por otro lado, el linaje II de *Procamallanus* parasita exclusivamente a *A. aeneus*.

El complejo *Procamallanus-Astyanax* constituye por lo tanto un ejemplo de especiación reciente, donde un género de parásitos ha divergido en un solo grupo de hospederos, los carácidos. El tiempo corto de la separación de los linajes podría explicar la aparente estasis morfológica observada, o bien, debemos considerar también la carencia de las herramientas para encontrar las diferencias. Es probable que un estudio más detallado de microscopía electrónica de barrido

permita observar diferencias ultraestructurales entre las poblaciones y que, con base al conjunto de caracteres puedan describirse como especies nuevas.

LITERATURA CITADA

Aguirre-Macedo, M., Scholz, T., Gonzalez-Solis, D., Vidal-Martinez, V.M., Posel, P., Arjona-Torres, G., Dumailo, S., & Siu-Estrada, E. (2001). Some adult endohelminths parasitizing freshwater fishes from the Atlantic drainages of Nicaragua. *Comparative parasitology*, 68, 190-195.

Aguirre-Macedo, M.L., Scholz, T., Gonzalez-Solis, D., Vidal-Martinez, V. M., Posel, P., Arjona-Torres, G., Dumailo, S. & Siu-Estrada, E. (2001). Some adult endohelminths parasitizing freshwater fishes from the Atlantic drainages of Nicaragua. *Comparative Parasitology*, 68, 190-195.

Bessho, Y., Ohama, T., & Osawa, S. (1992). Planarian mitochondria II. The unique genetic code as deduced from cytochrome c oxidase subunit I gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 34, 331-335.

Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., & Vida, J.T. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75.

Bohonak, A.J. (2002). IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93, 153-154.

Caballero-Deloya, J. (1977). Estudio helmintológico de los animales silvestres de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtles”, Veracruz Nematoda II. Descripción de *Spirocamallanus neocaballeroi* sp nov (Nematoda: Camallanidae), del intestino de *Astyanax fasciatus* (Cuvier). pp 409–414 In *Excerta parasitológica en memoria del Dr Eduardo Caballero y Caballero*. Publicación Especial 4 Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.

Casiraghi, M., Anderson, T.J.C., Bandi, C., Bazzocchi, C., & Genchi, C. (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, 122, 93-103.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.

- Excoffier, L. & Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Folmer, O., Hoeh, W.R., Black, M.B., & Vrijenhoek, R.C. (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.
- García-Varela, M., & Nadler, S.A. (2005). Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 91, 1401-1409.
- Grant, B.R., & Grant, P.R. (2017). Watching speciation in action. *Science*, 355, 910-911.
- González-Solís, D., Moravec, F., & Vidal-Martínez, V.M. (2002). *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *chetumalensis* n. sp. (Nematoda: Camallanidae) from the Mayan sea catfish, *Ariopsis assimilis*, off the Caribbean coast of Mexico. *Journal of Parasitology*, 88, 765-768.
- Gross, J.B. (2012). The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 1.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-1649.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- Leduc, D., & Wilson, J. (2016). Benthimermithid nematode parasites of the amphipod *Hirondellea dubia* in the Kermadec Trench. *Parasitology research*, 115, 1675-1682.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P. & Lopez, R. (2013). *Nucleic acids research*: W597-600.

Moravec, F. (1998). Nematodes of freshwater fishes of the Neotropical Region. Academia, Publishing House of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Moravec, F., & Van As, L.L. (2015). *Procamallanus* (*Procamallanus*) spp.(Nematoda: Camallanidae) in fishes of the Okavango River, Botswana, including the description of *P.(P.) pseudolaeviconchus* n. sp. parasitic in *Clarias* spp.(Clariidae) from Botswana and Egypt. *Systematic parasitology*, 90, 137-149.

Nadler, S.A., Carreno, R.A., Mejía-Madrid, H., Ullberg, J., Pagan, C., Houston, R., & Hugot, J.P. (2007). Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology*, 134, 1421-1442.

Nadler, S.A., & Hudspeth, D.S. (1998). Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10, 221-236.

Nadler, S.A., Bolotin, E. & Stock, S.P. (2006) Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobine: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Systematic Parasitology*, 63, 161–181.

Nakano, T., Okamoto, M., Ikeda, Y., & Hasegawa, H. (2006). Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene and nuclear rDNA regions of *Enterobius vermicularis* parasitic in captive chimpanzees with special reference to its relationship with pinworms in humans. *Parasitology Research*, 100, 51-57.

Nieberding, C.M., Durette-Desset, M.C., Vanderpoorten, A., Casanova, J.C., Ribas, A., Deffontaine, V., Feliu, C., Morand, S., Libois, R., & Michaux, J.R. (2008). Geography and host biogeography matter for understanding the phylogeography of a parasite. *Molecular phylogenetics and evolution*, 47, 538-554.

Polzi, Ti., & Daneschmand, S.V. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letter*, 31, 12-20.

Poulin, R., & Pérez-Ponce de León, G. (2016). Global analysis reveals that cryptic diversity is linked with habitat but not mode of life. *Journal of Evolutionary Biology*, 30, 641–649.

Sandlund, O.T., Daverdin, R.H., Choudhury, A., Brooks, D.R., & Diserud, O.H. (2010). A survey of freshwater fishes and their macroparasites in the Guanacaste Conservation Area (ACG), Costa Rica. NINA Rapport 635: 45 pp. Norsk institutt for naturforskning, Trondheim, 635.

Schenk, J., Traunspurger, W., & Ristau, K. (2016). Genetic diversity of widespread moss-dwelling nematode species in German beech forests. *European Journal of Soil Biology*, 74, 23-31.

Stamatakis, A. (2014). "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". En *Bioinformatics*.

Lista de tablas

Tabla 1. Sitios de colecta, especie de nematodo, número de nematodos recuperados (n), especie de hospedero y código de identificación de cada nematodo. El número de localidad corresponde al mismo utilizado en la [Fig. 1](#)

#	Especie de nematodo	n	Estado	Localidad	Código	Especie de hospedero	Latitud	Longitud	Cox1	28S	18S
1	<i>Procamallanus</i> Linaje I	1	Tamaulipas	Río Guayalejo, La Peñita	RGP	<i>A. mexicanus</i>	23°19' 39.59"	99°01' 39.22"	172A	172A	-
4	<i>Procamallanus</i> Linaje I	1	San Luis Potosí	Nacimiento del Río Huichihuayán	NRH	<i>A. mexicanus</i>	21° 28' 48'	98° 58' 1.99"	73A	73A	73A
3	<i>Procamallanus</i> Linaje I	12+4		Cueva Sabinos	CS	<i>A. mexicanus</i>	22° 06' 00"	89° 55' 59.99"	119A, 37A, 121A, 27A, 198A	37A, 30A, 198A, 119A	121A
2	<i>Procamallanus</i> Linaje I	6+?		Cueva Chica	CC	<i>A. mexicanus</i>	21° 51' 35.16"	98° 56' 11.87"	28A, 123A, 36A, 197A	28A, 197A	197A
5	<i>Procamallanus</i> Linaje I	2+?	Querétaro	Río Jalpán, Santa María, Jalpán	RJ	<i>A. mexicanus</i>	21° 12' 14.76"	99° 28' 28.2"	145A	59A, 145A	145A
7	<i>P. neocaballeroi</i>	7+?	Veracruz	Puente Galeana, Tecolutla	PGT	<i>A. aeneus</i>	20° 25' 44"	97° 03' 14"	55A, 150A, 149A, 72A, 151A, 64A	72A, 151A, 149A	55A, 149A
8	<i>P. neocaballeroi</i>	2+1		Río Nautla, Camino a Mizantla, En "El Jasco"	RNJ	<i>A. aeneus</i>	20° 06' 31.77"	96° 47' 11.23"	38A	38A	-
6	<i>P. neocaballeroi</i>	7+4		Lago Catemaco	LC	<i>A. caballeroi</i>	18° 25' 00"	95° 07' 00"	110A, 109A, 115A, 143A, 108A, 140A, 141A	110A, 108A, 115A, 109A	109A
9	<i>Procamallanus</i> Linaje II	1		Río Tonola, Agua Dulce	RTA	<i>A. aeneus</i>	18° 07' 45.49"	94° 11' 19.99"	58A	58A	-
10	<i>Procamallanus</i> Linaje II	7	Campeche	La Libertad, Escárcega	LLE	<i>A. aeneus</i>	18° 30' 53.77"	90° 30' 6.44"	82A, 99A, 160A, 161A, 162A, 163A, 164A	160A, 161A, 99A	161A

Código del sitio de muestreo (#), número de nematodos colectados (n).

Tabla 2. Primers utilizados en este estudio.

Gen amplificado	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Referencia
Cox1	COI int F	F: TGATTGGTGGTTTTGGTAA	1
	COI int R	R: ATAAGTACGAGTATCAATATC	1
	pr-a	F: TGGTTTTTTGTGCATCCTGAGGTTTA	2; 3
	pr-b	R: AGAAAGAACGTAATGAAAATGAGCAAC	2; 3
	LCO1490	F: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	4
	HCO2198/588	R: TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	4
28S rDNA	507	F: AGTTCTAATCATAARGATATYGG	
	391	F: AGCGGAGGAAAAGAACTAA	3; 5
	502	F: CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC	6
18S rDNA	536	R: CAGCTATCCTGAGGGAAAC	6
	G18S4	F: GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC	7; 8
	136	R: TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	5; 8
	649	R: TAAGAACGGCCATGCACCAC	8

F: forward; R: reverse

REFERENCIA: 1: Casiraghi *et al.*, 2001; 2: Bessho *et al.*, 1992; 3: Nakano *et al.*, 2006; 4: Folmer *et al.*, 1994; 5: Nadler & Hudspeth, 1998; 6: García-Varela & Nadler, 2005; 7: Blaxter *et al.*, 1998; 8: Nadler *et al.*, 2000

Tabla 3. Estimación de la divergencia evolutiva entre las especies del complejo *Procamallanus-Astyanax* con el marcador Cox1

	<i>P. neocaballeroi</i>	<i>Procamallanus</i> Linaje I	<i>Procamallanus</i> Linaje II	<i>Procamallanus</i> Costa Rica	<i>P. rebecca</i>	<i>S. istiblenni</i>	<i>P. jaliscensis</i>	<i>C. cotti</i>	<i>C. hypophthalmichthys</i>
<i>P. neocaballeroi</i>	1.76 (0.29)								
<i>Procamallanus</i> Linaje I	6.79 (0.78)	0.40 (0.11)							
<i>Procamallanus</i> Linaje II	5.11 (0.68)	6.51 (0.77)	0.66 (0.14)						
<i>Procamallanus</i> Costa Rica	14.11 (1.12)	15.93 (1.20)	14.79 (1.19)	0.98 (0.27)					
<i>P. rebecca</i>	14.53 (1.17)	14.33 (1.19)	14.85 (1.18)	11.73 (1.12)	0.93 (0.15)				
<i>S. istiblenni</i>	16.42 (1.96)	16.44 (1.91)	16.17 (1.91)	13.77 (1.65)	12.01 (1.61)	-			
<i>P. jaliscensis</i>	16.99 (1.23)	17.65 (1.21)	17.20 (1.24)	12.53 (1.07)	12.14 (1.06)	12.98 (1.60)	2.79 (1.16)		
<i>C. cotti</i>	17.91 (1.76)	19.39 (1.86)	17.19 (1.73)	15.23 (1.69)	13.81 (1.57)	17.13 (1.88)	16.53 (1.67)	-	
<i>C. hypophthalmichthys</i>	19.67 (1.91)	20.38 (1.81)	19.09 (1.79)	16.20 (1.90)	15.32 (1.75)	15.51 (1.81)	15.93 (1.61)	12.65 (1.52)	-
<i>Dracunculus lutrae</i>	24.80 (1.73)	25.28 (1.70)	23.19 (1.61)	23.32 (1.77)	22.98 (1.76)	24.59 (2.28)	22.31 (5.23)	23.36 (1.95)	24.12 (2.10)

Las distancias p están expresadas en porcentajes, el error estándar se muestra entre paréntesis. Los número en la diagonal son las distancias intra-específicas. Sombreado en gris están las distancias inter-específicas y en azul las distancias intra-específicas, del complejo *Procamallanus-Astyanax*.

Tabla 4. Diversidad genética de las poblaciones de *Procamallanus* colectadas en hospederos *Astyanax* spp.

Poblaciones	No. Individuos	No. sitios variables (S)	No. haplotipos	Diversidad haplotípica	No. promedio de diferencias nucleotídicas (k)	Diversidad nucleotídica (Pi)	D de Tajima	Fu's Fs
<i>Procamallanus neocaballeroi</i>								
PGT	7	1	2	0,600	0,600	0,00168	1,22474	0,626
RNJ	2	0	1	0	0	0	-	-
LC	7	6	4	0,900	2,600	0,00436	-0,66823	-0,567
Total	16	9	6	0,848	3,757	0,01050	1,05800	0,273
<i>Procamallanus</i> Linaje I								
RJ	2	-	-	-	-	-	-	-
CC	5	0	1	0	-	0	-	-
NRH	1	-	-	-	-	-	-	-
CS	7	1	2	0,286	0,28571	0,00073	-1,00623	-0,095
RGP	1	-	-	-	-	-	-	-
Total	16	4	4	0,670	0,96703	0,00247	-0,76153	-0,494
<i>Procamallanus</i> Linaje II								
LLE	7	0	1	0	0	0	-	-
RTA	1	-	-	-	-	-	-	-
Total	8	2	2	0,250	0,50000	0,00248	-1,31009	0,762

Tabla 5. Haplotipos en el complejo *Procamallanus-Astyanax*

<i>Procamallanus neocaballeroi</i>		<i>Procamallanus</i> Linaje I		<i>Procamallanus</i> Linaje II	
H	I	H	I	H	I
H 1	150A, 149A, 153A, 38A	H 1	189A, 198A, 190A, 37A, 119A, 121A	H 1	58A
H 2	55A, 152A, 151A	H 2	27A	H 2	163A, 82A, 162A, 161A, 164A, 160A, 99A
H 3	140A	H 3	192A, 188A, 197A, 123A, 145A, 73A		
H 4	108A, 109A	H 4	172A		
H 5	143A				
H 6	110A				

H: haplotipo, I: clave individuo

Tabla 6. Comparaciones entre las poblaciones de *Procamallanus* spp. de hospederos *Astyanax* spp.

<i>Procamallanus neocaballeroi</i>						
Población 1	Población 2	Fst	Dxy	Da	Gst	Nst
LC	PGT	0,81250	0,01788	0,01453	0,14286	0,81415
LC	RNJ	0,84483	0,01620	0,01369	0,27607	0,84592
PGT	RNJ	0,50000	0,00168	0,00084	0,24119	0,50000
<i>Procamallanus</i> Linaje I						
CC	CS	0,87500	0,00292	0,00256	0,68643	0,87505

Tabla 7. Morfometría de los adultos de *Procamallanus* spp. parásitos de *Astyanax* spp.

	<i>P. neocaballeroi</i> (Caballero-Deloya, 1970)		CNHE	<i>P. neocaballeroi</i>		<i>Procamallanus</i> Linaje I		<i>Procamallanus</i> Linaje II
	n=8	n=4	n=2	n=2	n=5	n=7	n=7	n=2
	M	H	H	M	H	M	H	H
Longitud del cuerpo	4.620-7.208	11.460-17.024	7.393-8.679	-	-	3.08592-3.8205	-	-
Anchura máxima	0.128-0.201	0.248-0.425	0.172-0.218	0.14105-0.19747	0.161665-0.3276	0.11718-0.1519	0.273-0.546	0.17794
Largo cápsula bucal	0.059-0.064	0.064-0.068	0.065816-0.076989	0,04991	0.05208-0.06293	-	-	-
Longitud cápsula incluyendo anillo basal (largo)	-	-	0.077449-0.080523	0.05859-0.06727	0.06076-0.09485	0.04774-0.06944	0.0651-0.07378	0.06727
Ancho cápsula bucal	0.059-0.072	0.068-0.077	0.063283-0.069511	0.05859-0.06293	0.06076-0.066185	0.04123-0.05859	0.04774-0.04774	0.06293
Anillo basal (largo x ancho)	-	-	(0.013451-0.013683) x (0.037824-0.045777)	(0.011935-0.01302)x(0.3255-0.03689)	(0.00651-0.01302)x(0.03638-0.05691)	(0.005425-0.01736) x (0.02604-0.03472)	(0.01085-0.01519) x (0.03038-0.04123)	0.05691 x 0.01302
Número de surcos espirales (en vista lateral)	-	-	17	16	15-18	13-16	14-16	18
Longitud esófago muscular	0.342-0.428	0.356-0.440	0.400-0.455	0.3731-0.4186	0.4004-0.455	0.27993-0.36239	0.34937-0.39277	0.40145
Ancho esófago muscular	0.068-0.094	0.124-0.136	0.113-0.121	0.06293-0.09114	0.09982-0.1365	0.06293-0.07378	0.0868-0.1183	0.09982
Longitud esófago glandular	0.813-1.672	1.459-1.672	1.274-1.428	1,2558	1.5379-1.729	0.7735-0.9191	1,95013	-
Ancho esófago glandular	0.055-0.107	0.124-0.171	0.110-0.115	0,07161	0.1085-0.11501	0.05859-0.0819	0.0819-0.12152	-
Longitud de radio entre esófago muscular y glandular	-	-	-	-	-	-	-	-
Anillo nervioso desde la extremidad anterior	0.166-0.179	0.192	0.188-0.206	-	0.18622-0.1953	0.12369-0.1729	0.1456-0.2002	-
Poros excretor desde la extremidad anterior	0.235-0.295	0.299-0.372	0.332	0,24738	0.23219	0.18879-0.20181	0.21917-0.31038	-
Deiridios desde la extremidad anterior	-	-	0.210-0.214	0,135625	0,18011	0.08029-0.11718	-	-
Ancho máximo intestino	0.049-0.107	0.085-0.145	-	-	-	-	-	-
Ala caudal	-	-	-	Presente	-	-	-	-
Papilas precloacales	4	-	-	4	-	4	-	-

Papilas postcloacales	4 + 1	-	-	4	-	4+1	-	-
Espícula izquierda	0.049- 0.107	-	-	0.06076-0.06727	-	0.07812-0.10465	-	-
Espícula derecha	0.049- 0.107	-	-	0,0651	-	-	-	-
Ancho máximo espículas	0.008	-	-	0.00651-0.01519	-	-	-	-
Gubernaculum	Ausente	-	-	-	-	-	-	-
Longitud cauda	0.119- 0.192	0.094-0.181	-	0,14973	0.07595-0.1085	0.11284-0.13454	0.08897-0.11501	-
Vulva postecuatorial desde extremidad anterior	-	6.612-9.821	4.564	-	-	-	-	-
Larvas	-	-	-	-	-	-	-	-
Procesos terminales	-	0.021-0.028	0.03038-0.03689	-	0.019153-0.03906	0.03689-0.04991	0.01736-0.03472	-

CNHE: Colección Nacional de Helminfos; M: macho; H: hembra.

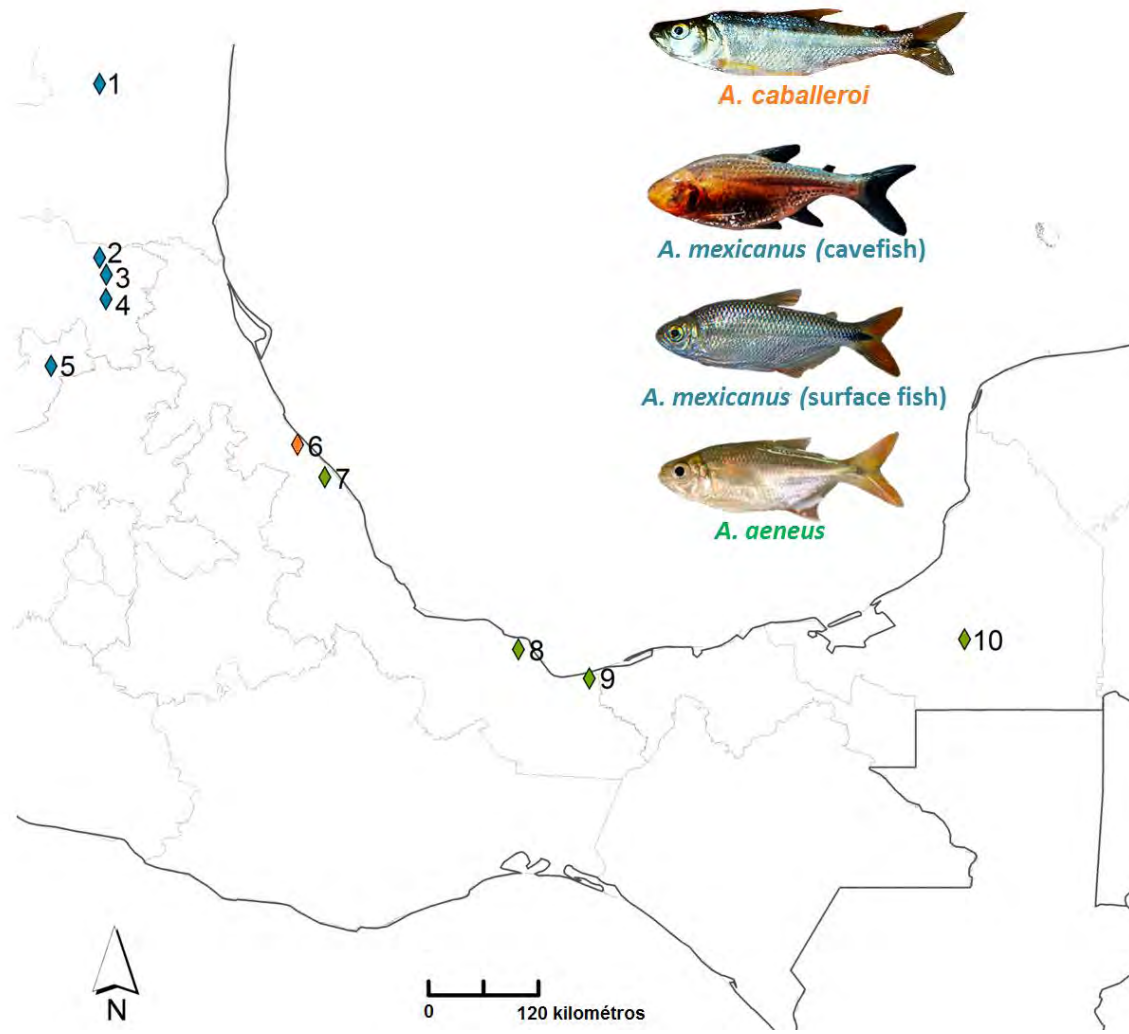


Fig. 1

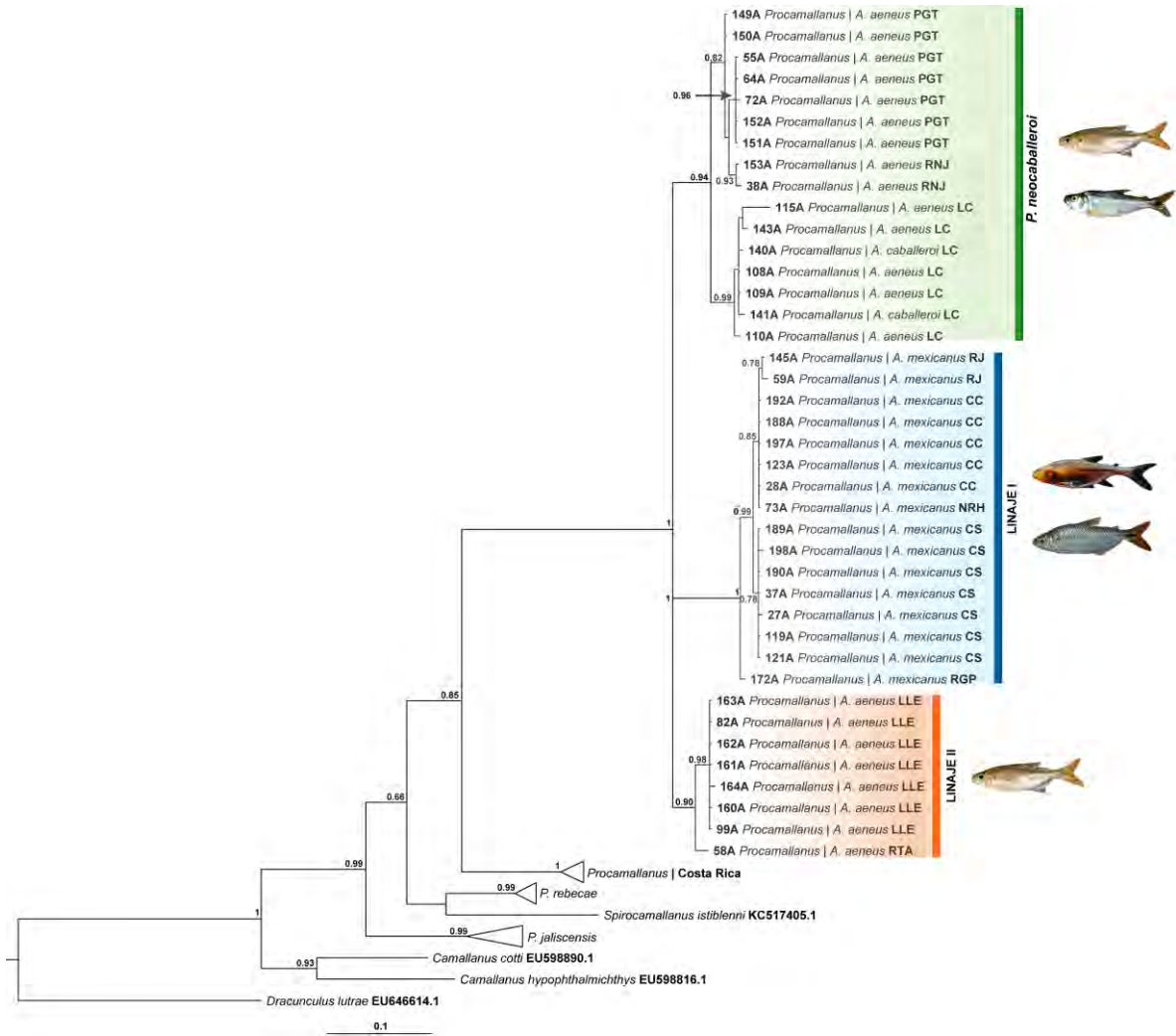


Fig. 2

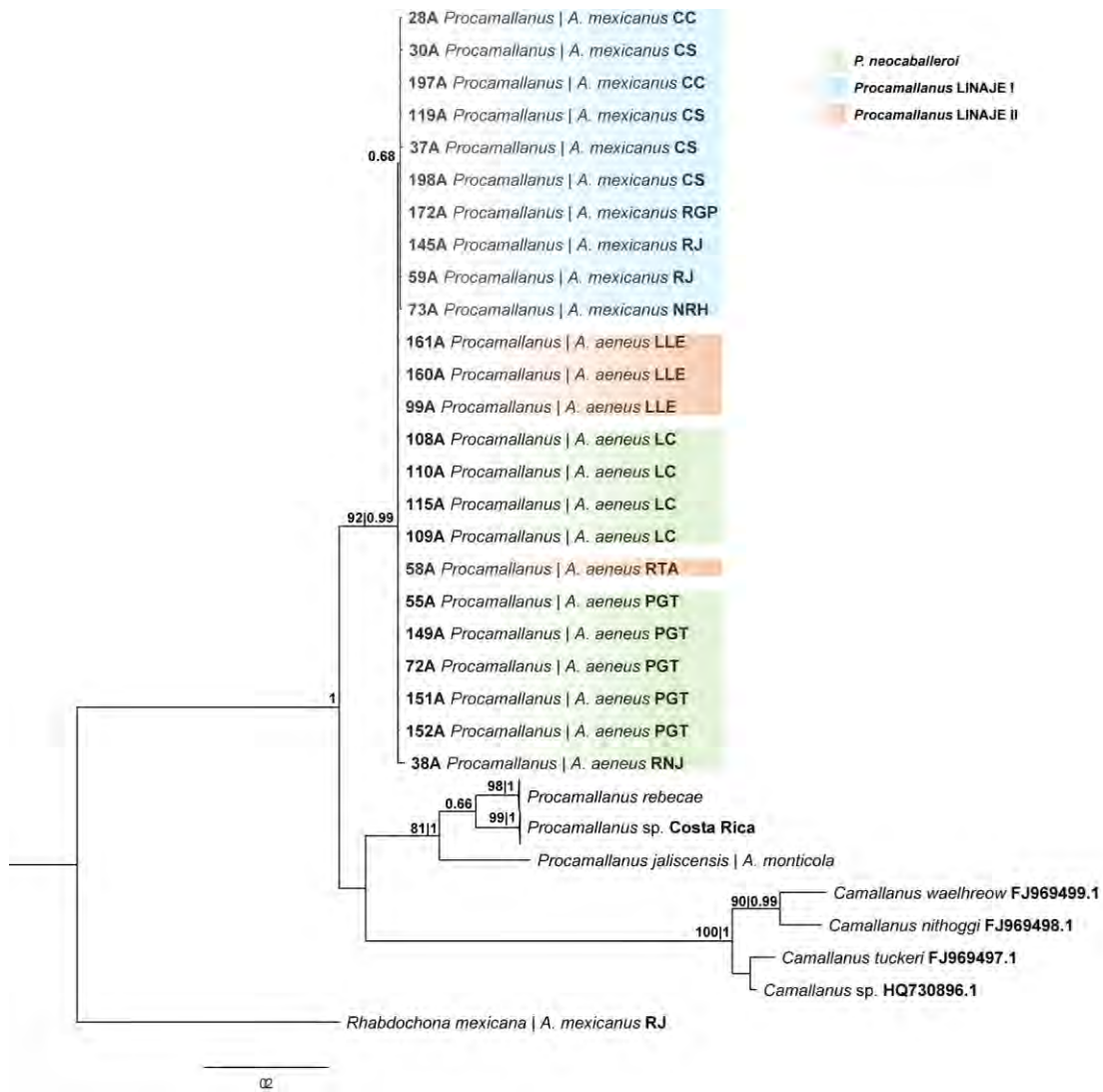


Fig. 3

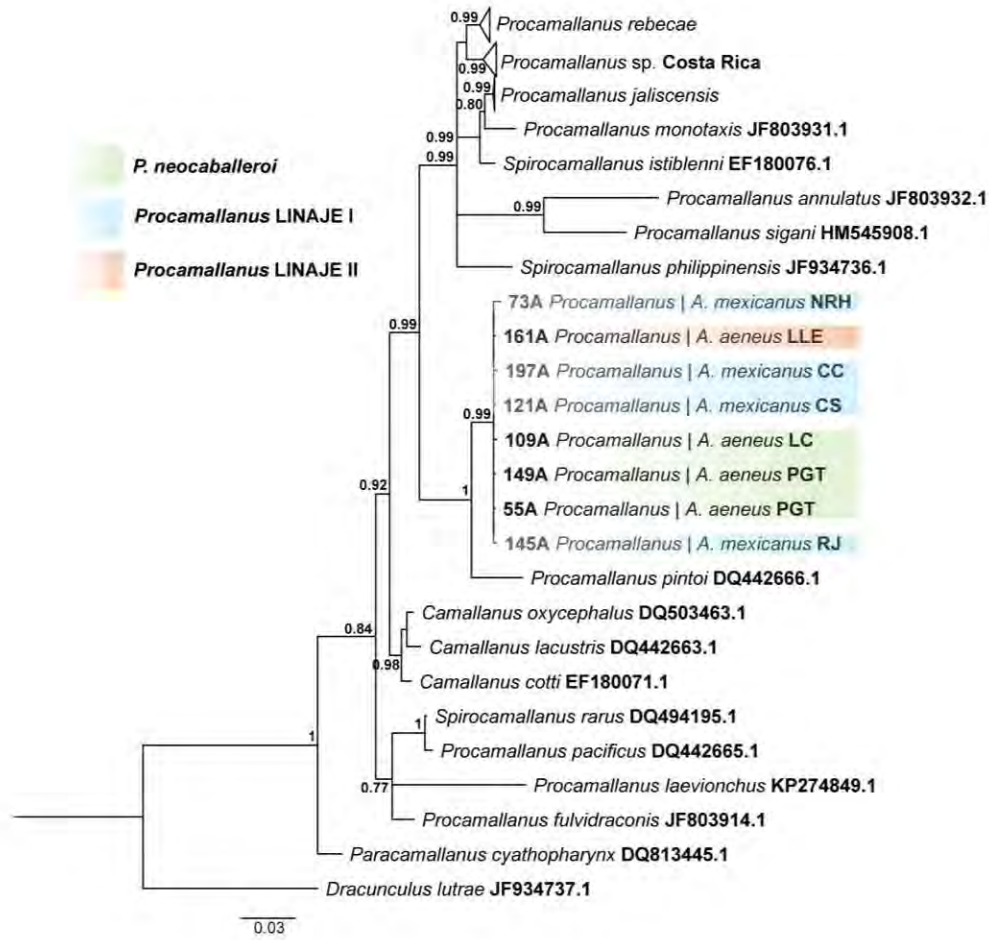


Fig. 4

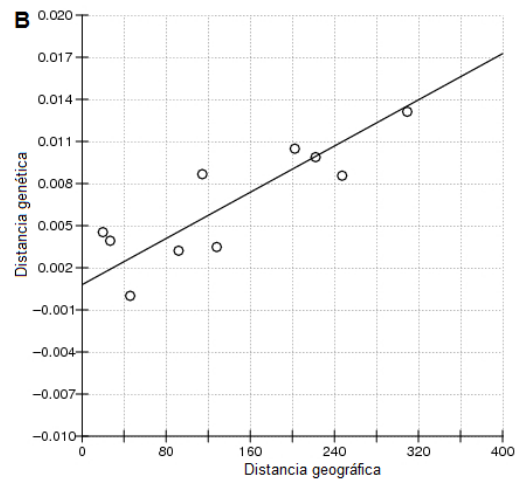
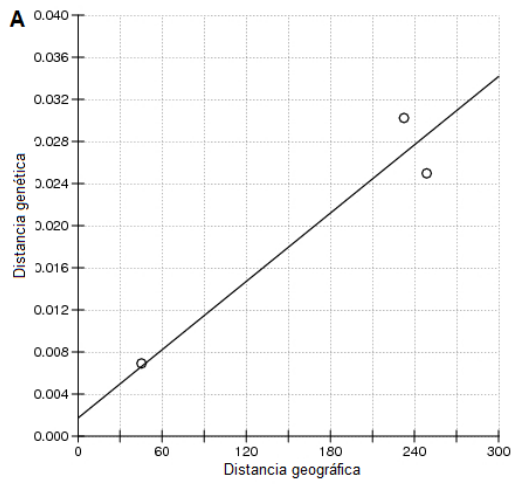


Fig. 5

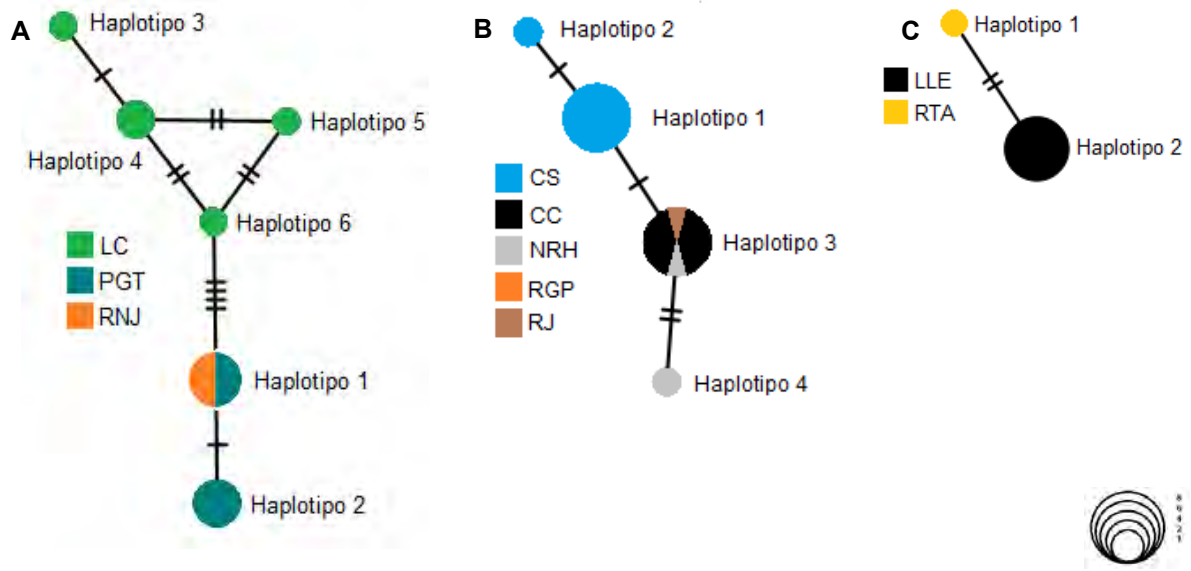


Fig. 6

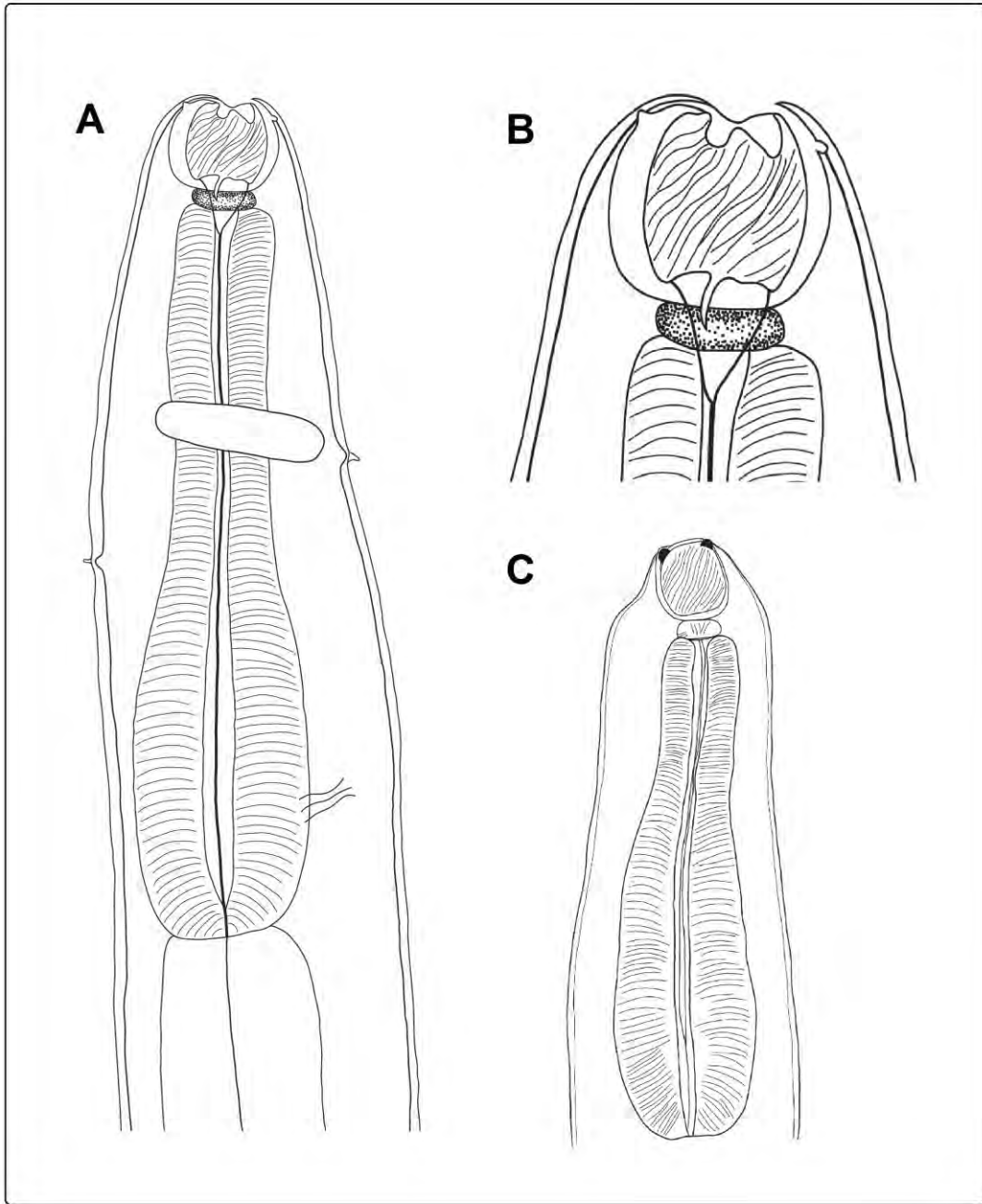


Fig. 7

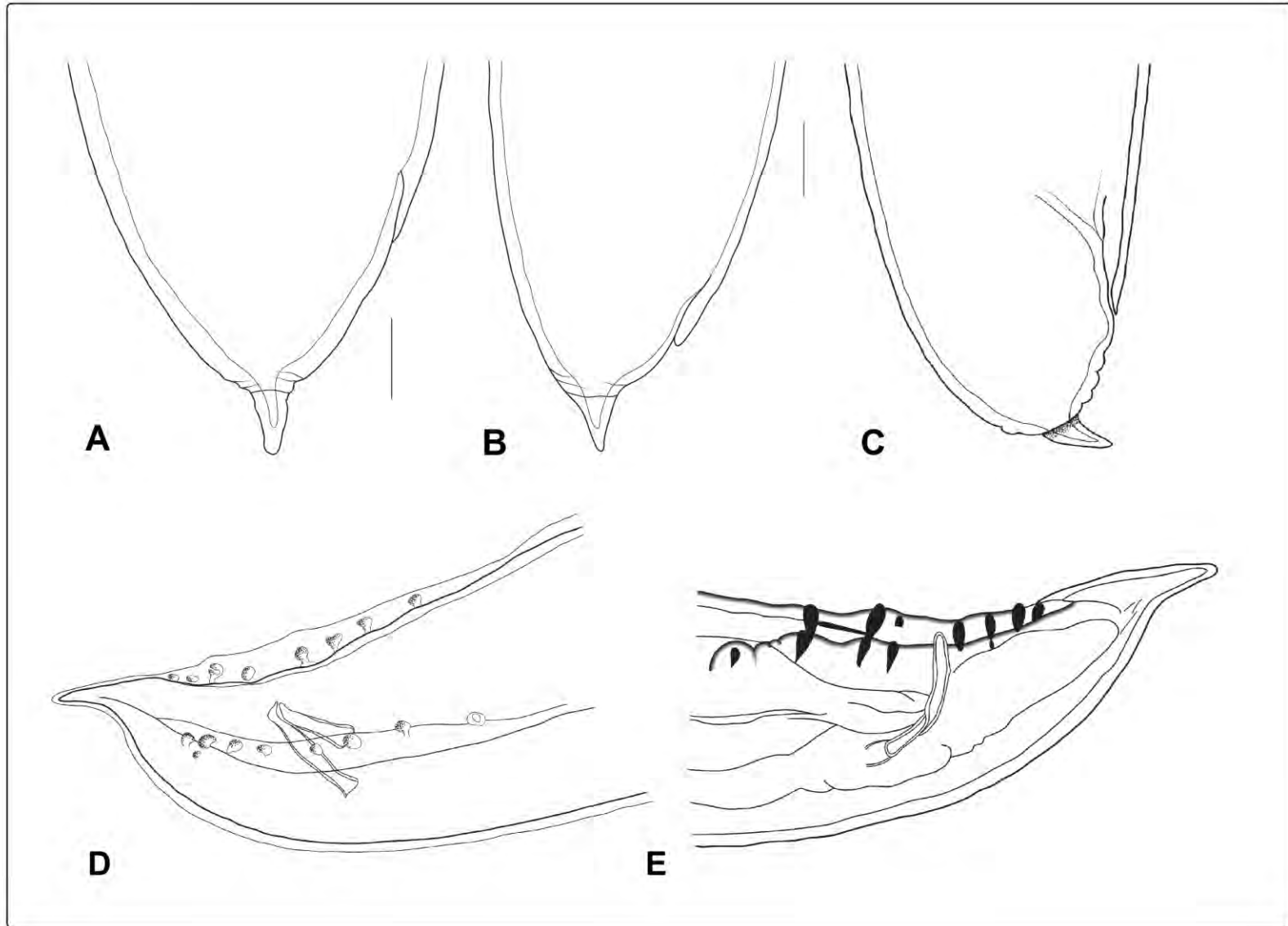


Fig. 8

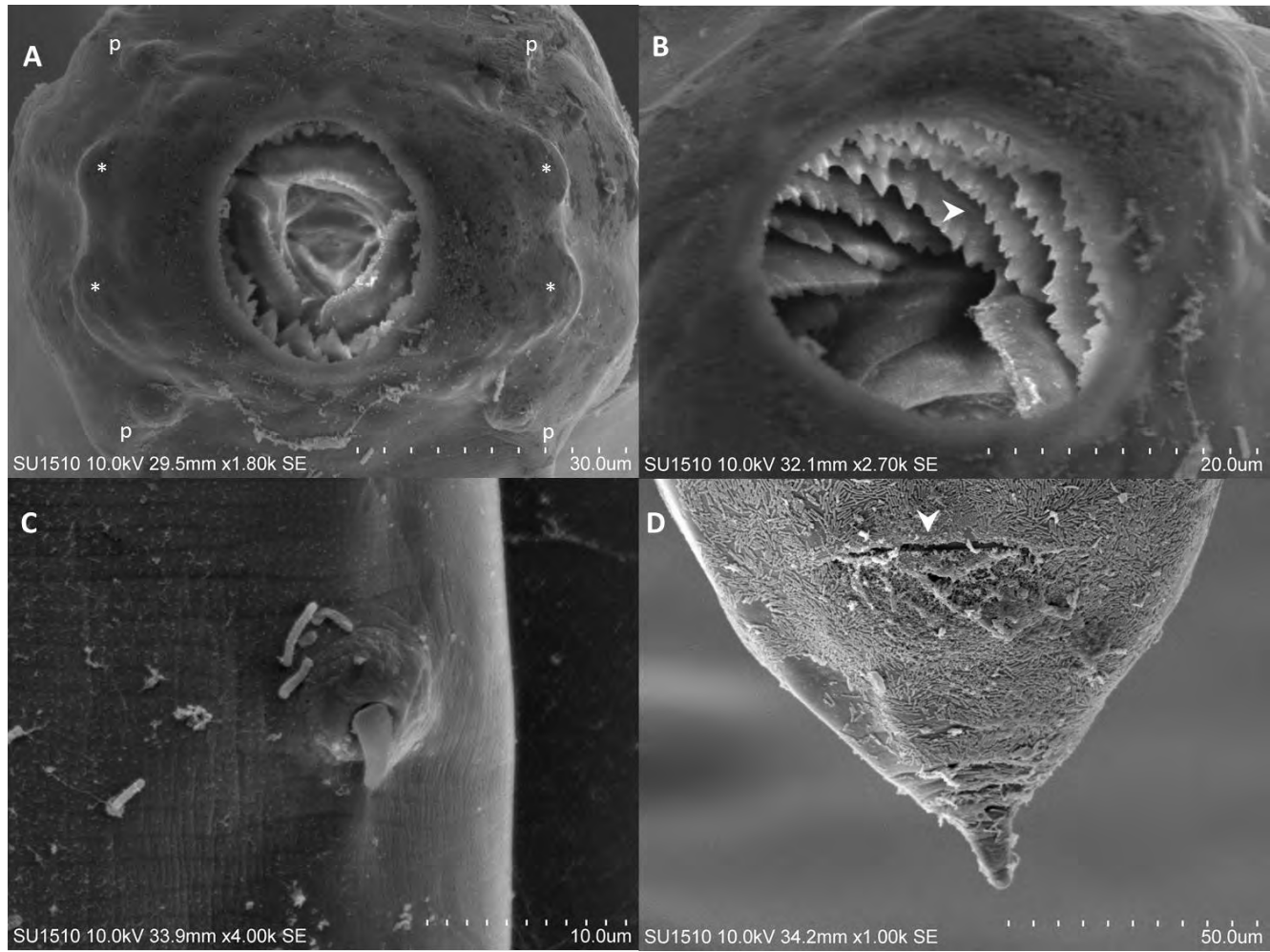


Fig. 9



Fig. 10

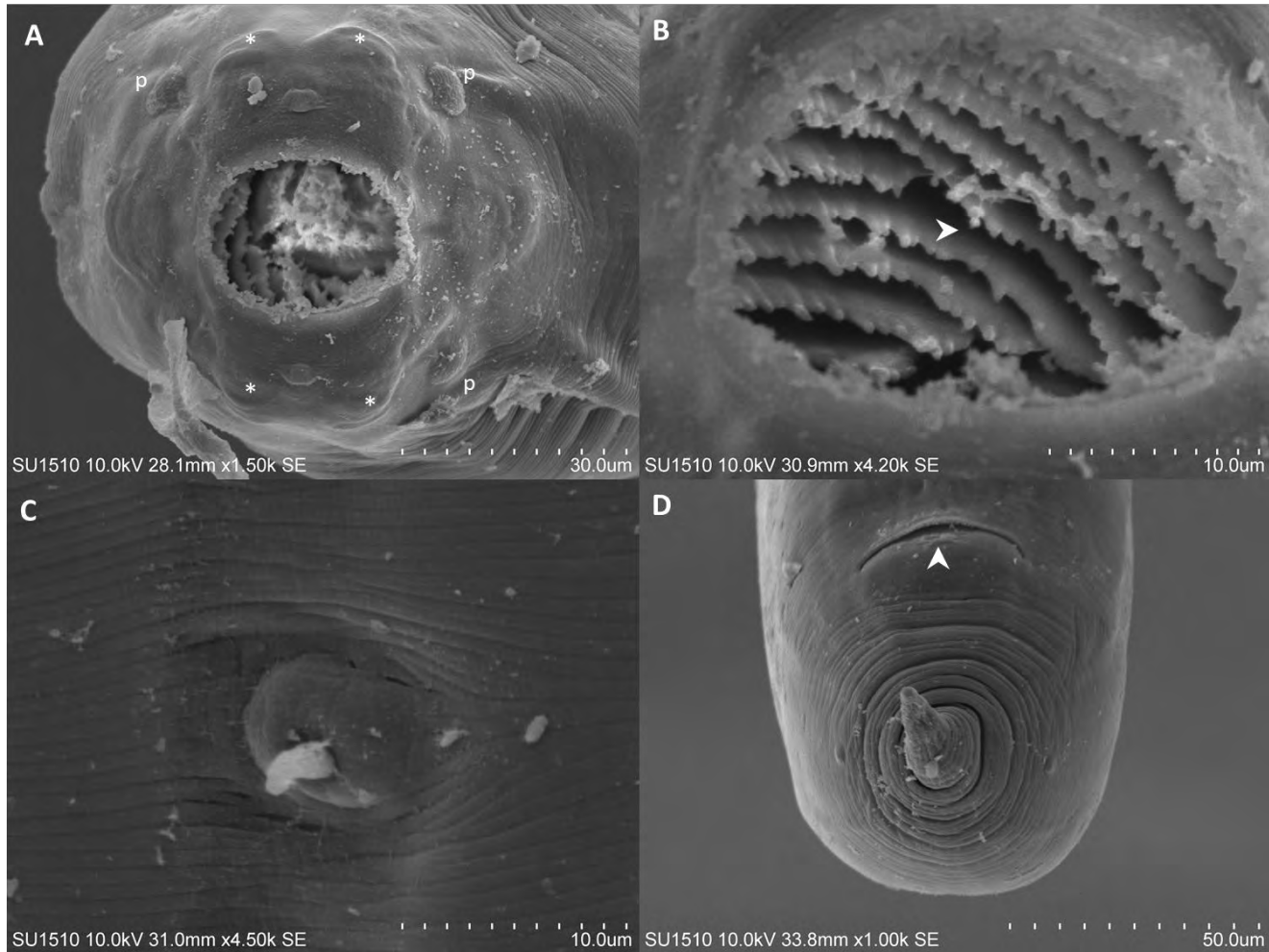


Fig. 11

Leyendas de figuras

Figura 1. Sitios de colecta.

Figura 2. Análisis de inferencia bayesiana inferido de las secuencias del marcador Cox1. La barra de escala muestra el número de sustituciones por sitio. Los valores de probabilidad posterior se muestran en cada nodo.

Figura 3. Árbol de máxima verosimilitud utilizando el gen ribosomal 28S rDNA. *Rhabdochona mexicana*, es utilizado como grupo externo.

Figura 4. Árbol de Inferencia Bayesiana utilizando gen 18S rDNA. *Dracunculus lutrae* fue utilizado como grupo externo.

Figura 5. Redes de haplotipos del complejo *Procamallanus-Astyanax*. Cada haplotipo está numerado de acuerdo a la [Tabla 7](#). Las líneas transversales representan el número de cambios en pares de bases entre haplotipos. El tamaño y color de los círculos corresponde al número de individuos y la población a la que pertenecen, respectivamente. A) *P. neocaballeroi*, B) *Procamallanus* Linaje I y C) *Procamallanus* Linaje II.

Figura 6. Análisis de aislamiento por distancia entre las poblaciones de cada linaje del complejo *Procamallanus-Astyanax*. A) *P. neocaballeroi*, B) *Procamallanus* Linaje I.

Figura 7. Región anterior de *P. neocaballeroi*. A) *P. neocaballeroi* Linaje I, B) Cápsula bucal de *P. neocaballeroi* Linaje I, y C) *P. neocaballeroi* Linaje II.

Figura 8. Variación morfológica de la región posterior de hembras de *Procamallanus-Astyanax*. A) *P. neocaballeroi*, B) *P. neocaballeroi* Linaje I y C) *P. neocaballeroi* Linaje II, D) Vista ventrolateral terminación posterior macho

Procamallanus Linaje I, E) Terminación posterior del macho *Procamallanus* Linaje II en vista lateral.

Figura 9. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de *P. neocaballeroi*. A) Vista apical del extremo anterior, mostrando las elevaciones cuticulares (asteriscos) y las papilas (p). B) Detalle de la cápsula oral mostrando los surcos espirales serrados (flecha). C) Región del deiridio. D) Vista ventral de la región posterior de una hembra, la flecha señala el ano.

Figura 10. Microfotografías *Procamallanus* Linaje I. A) Fotografía mediante iluminación Nomarski de la región anterior, donde se muestra el anillo nervioso (asterisco), el poro excretor (flecha blanca) y la separación entre el esófago muscular y glandular (flecha negra). B) Vista apical de la región anterior, se muestran las elevaciones cuticulares (asterisco) y las papilas (p). C) Región anterior macho en vista ventral, con las espículas invaginadas (flecha blanca) y las papilas pareadas (flecha negra).

Figura 11. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de *Procamallanus* Linaje II. A) Vista apical región anterior. B) Detalle de los surcos de la cápsula oral. C) Región del deiridio. D) Cauda hembra.

CAPÍTULO II

Diversidad genética de *Rhabdochona mexicana* en *Astyanax* spp. en México, ¿una sola especie o un complejo de especies?

RESUMEN

El análisis de la diversidad genética en nematodos ha revelado la existencia de entidades desconocidas con los estudios taxonómicos clásicos, las denominadas especies crípticas, aquellas que son morfológicamente similares pero genéticamente distintas. El género *Rhabdochona* es un grupo de nematodos ampliamente estudiado. Algunos representantes exhiben una estricta especificidad hospedatoria, como es el caso de *R. mexicana* que ha sido reportada únicamente en *A. aeneus* y *A. mexicanus* en México. El hospedero ha divergido en varios linajes desde Centroamérica hasta el norte de su distribución en la frontera entre México y E.U. A. Debido a la marcada asociación de *R. mexicana* y su hospedero en un área geográfica amplia, es posible plantear la hipótesis de que el parásito también ha divergido y que está conformado por varios linajes evolutivos morfológicamente similares. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es realizar una prospección molecular en la búsqueda de especies crípticas en *R. mexicana*. Los resultados obtenidos con el marcador mitocondrial y los datos concatenados de todos los marcadores moleculares (mitocondrial y dos genes nucleares), revelaron cuatro linajes evolutivos distintos de *R. mexicana* en *Astyanax* spp., indicando la presencia de tres especies crípticas, con patrones geográficos distintos, y con una especificidad hospedatoria estricta. Los linajes en ambos complejos de nematodos son similares morfológicamente y por lo tanto permanecen como especies crípticas, con la excepción del Linaje III presenta caracteres fenotípicos distintos.

Palabras clave: *Rhabdochona mexicana*, *Astyanax*, especie críptica.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos son un grupo numeroso de organismos con más de 27,000 especies descritas (Hugot et al., 2001; Blaxter, 2003); están distribuidos en una amplia variedad de ambientes, presentan una enorme diversidad de historias de vida y múltiples casos de convergencia a una forma de vida parásita (Blaxter & Koutsovoulos, 2015). Estas características hacen de este grupo un modelo para probar patrones evolutivos en relación a la diversidad críptica, es decir, aquellas especies con una morfología indistinguible pero genéticamente distintas (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010).

Rhabdochona es un género cosmopolita de nematodos con 97 especies descritas asociadas a peces de agua dulce (Moravec et al., 2013). En América, *Rhabdochona* conforma un ensamblaje no monofilético de cerca de 21 especies (Mejía-Madrid et al., 2007a). En México 12 especies se han reconocido, la mayoría con especificidad hospedatoria a nivel de familia, entre ellas *Rhabdochona mexicana* (Caspeta-Mandujano et al., 2000), que ha sido registrada en ocho estados, parasitando a dos especies de carácidos, *Astyanax aeneus* y *A. mexicanus*, es decir, exhibiendo una estricta especificidad hospedatoria. *Astyanax* es el género que alcanza la distribución más al norte en el Continente Americano dentro de la familia Characidae (Miller et al., 2009). Su historia evolutiva ha sido sumamente estudiada (Ornelas-García et al., 2008; Bradic et al., 2012; Gross, 2012), y aun cuando sigue siendo controversial, ha permitido inferir un origen Neotropical y el proceso de colonización en Mesoamérica, donde ha dado lugar a múltiples linajes (Ornelas-García et al., 2008).

Las asociaciones evolutivas entre los hospederos y sus parásitos, pueden resolverse cuando las filogenias de ambos están resueltas, pero la presencia de especies crípticas aún desconocidas puede cambiar el escenario evolutivo de la diversificación de las especies. Los nematodos parásitos están limitados a la distribución del hospedero, el cual está restringido a cuerpos de agua, lo que promueve una mayor estructura poblacional y limita la dispersión de sus parásitos, sobre todo aquellos donde el pez representa el hospedero definitivo; además, la

estricta especificidad hospedatoria está asociada a una mayor posibilidad de co-especiar (Thompson, 1994). Existen otros escenarios plausibles donde el hospedero no guía la diversificación de sus parásitos, por ejemplo en *R. lichtenfelsi* parásito exclusivo de peces de la familia Goodeidae (Pérez-Ponce de León, 2003), la diferenciación genética está asociada al aislamiento de las regiones hidrológicas donde habita, y no a la diversificación de sus hospederos (Mejía-Madrid *et al.*, 2007b).

Actualmente, la delimitación de especies en *Rhabdochona* está basada únicamente en la morfología, lo que conlleva constantes cambios nomenclaturales y conflictos taxonómicos, como ocurre en la discriminación entre *R. kidderi* y *R. ictaluri* (Moravec *et al.*, 2012). El problema puede ser resuelto con el uso de técnicas moleculares que ayudan a corroborar la delimitación de especies ya descritas o reconocer especies nuevas (Blouin, 2002), así como revelar especies que aparentemente tienen una amplia distribución o son hospedero-generalistas, en realidad son linajes separados con patrones hospedatorios, geográficos y ecológicos distintos. En particular, el marcador molecular citocromo oxidasa subunidad 1 (Cox1) ha sido útil para resolver la presencia de especies crípticas, debido a su alta tasa de sustitución (Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011) que provee resolución filogenética aún en especies muy cercanas.

El objetivo de este estudio es hacer una prospección de especies crípticas de *Rhabdochona mexicana* asociada de forma específica a *Astyanax* spp. a partir de una aproximación molecular, donde se pone a prueba la monofilia recíproca, es decir, se hace uso del concepto unificador de especie como linajes evolutivos separados (De Queiroz, 2007). La hipótesis nula es que el taxón representa una sola especie en toda su área de distribución, independiente de la especie de hospedero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras y métodos moleculares

Los nematodos se recuperaron de 15 poblaciones naturales en diferentes localidades de México y Guatemala ([Tabla 1, Fig. 1](#)). Los peces se obtuvieron con redes tipo chinchorro o con electropesca. Los peces recolectados se mantuvieron con vida hasta su traslado al laboratorio, donde fueron sacrificados para posteriormente ser disectados y sujetos a un análisis parasitológico. Los nematodos recuperados se fijaron, algunos en alcohol caliente para el estudio morfológico y otros se colocaron directamente en OH 100% para el estudio molecular. La extracción de ADN genómico se hizo de nematodos individuales, utilizando un fragmento medio del cuerpo, preservando la región anterior y posterior para análisis morfológicos. En la extracción se empleó REDE-Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma) y DNAzol Reagent (ThermoFisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una región del gen Cox1 fue amplificada y dos regiones nucleares de los genes 28S y 18S rDNA. Los *primers* se enlistan en la [Tabla 2](#). Las reacciones de PCR (25 µl) consistieron en 2 µl de DNA genómico, 1 µl de cada primer (10 pmol cada uno), 0.125 µl Taq DNA Polymerase (Vivantis, cat. PL1202), 2.5 µl dNTP (2 mM), 2.5 µl Buffer, 1.5 µl MgCL₂, y 14.375 µl de ddH₂O. Las condiciones del PCR para los *primers* JB3-JB4.5 y pr-a-pr-b fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), 40°C por 1 min (alineación), 72°C por 2 min (extensión) y 72°C por 7 min (extensión final). Para los *primers* COlintF-COlintR: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° por 1 min, 45°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72° C por 7 min. Para las combinaciones de *primers* LCO-HCO y 507-HCO las condiciones fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° por 1 min, 48°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72° C por 7 min. Para los primers del marcador 28S rDNA fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94° por 1 min, 50°C por 1 min, 72° por 2 min y una extensión final de 72°C por 7 min. Para amplificar la región 18S rDNA el programa fue: desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido de 33 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 30s, 72°C por 1 min, y una extensión final de 7 min a 94°C. Los amplicones fueron purificados enzimáticamente utilizando ExoSAP-IT (Affymetrix),

y secuenciados en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología, UNAM.

Análisis filogenéticos

Las secuencias *forward* y *reverse* fueron ensambladas en Geneious v7 (Kearse *et al.*, 2012), alineadas con el algoritmo implementado en Clustal Omega (McWilliam *et al.*, 2013) y editadas en Mesquite v3.10 (Maddison & Maddison, 2016). La matriz de Cox1 fue cortada después del alineamiento final. El mejor modelo de sustitución para los alineamientos generados se obtuvo en jModelTest v2.1.7 (Posada, 2008) y fue seleccionado bajo el criterio de información Akaike (AIC). El modelo de sustitución GTR + I + I se usó en los análisis de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Se utilizaron secuencias de cuatro especies más de *Rhabdochona* obtenidas en este estudio. En la reconstrucción con base al gen Cox1 se usó una secuencia del GenBank de *R. lichtenfelsi* (DQ991009.1). Para la matriz del gen 28S rDNA no se encontraron secuencias en GenBank. En la reconstrucción filogenética con el gen 18S rDNA se emplearon las secuencias disponibles en GenBank: *R. hospeti* JF803938.1, *R. hellichi hellichi* JF803913.1, *R. hellichi turkestanica* JF803937.1, *R. denudata* DQ442659.1, *R. guerreroensis* JF934732.1, *R. mazeedi* JF803936.1. Para todos los análisis se generaron secuencias *Spinitectus* spp., el grupo hermano de *Rhabdochona* (Nadler *et al.*, 2000). Para el gen 18S rDNA se utilizó también como grupo externo la secuencia de *S. tabascoensis* JF803922.1 que esta disponible en Genbank. Se hicieron reconstrucciones filogenéticas de la matriz concatenada de los genes nucleares (28S +18S rDNA) y con una matriz concatenada con secuencias de los tres marcadores (Cox1 +28S rDNA +18S rDNA). Los análisis de ML se hicieron en RaxML v1.5 mediante un análisis completo de bootstrap (Stamatakis, 2014). Los análisis de IB se llevaron a cabo en MrBayes v3.2.5 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), incluyeron dos corridas paralelas de 10 millones de generaciones, los árboles en cada cadena fueron evaluados cada 1000 generaciones y se usó un *burn-in* de 25%. Los árboles generados se visualizaron en FigTree v1.4.2 y editaron en Adobe Illustrator CS6.

Análisis de la diversidad genética

En el programa DnaSP v5.10.1 (Librado & Rozas, 2009) se obtuvieron los valores de número de haplotipos, número de sitios variables (S), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), D de Tajima, Fu's Fs y promedio de diferencias nucleotídicas (k). Las redes de haplotipos se construyeron por separado para cada uno de los linajes encontrados en el programa PopArt (<http://popart.otago.ac.nz>). El nivel de variación entre especies y dentro de cada especie, se calculó a partir de la distancia-*p* no corregida en MEGA v7 (Kumar *et al.*, 2015) utilizando secuencias de Cox1 y 28S rDNA. Para evaluar la correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas euclidianas se usó una prueba de Mantel implementada en el programa en línea de *Isolation by distance* v3.23 (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>) (Bohonak, 2002).

Análisis morfológico

Las regiones anterior y posterior de cada nematodo, así como material de la Colección Nacional de Helminthos, UNAM (CNHE), se aclararon en una solución alcohol-glicerol y examinaron por medio de microscopía de luz e iluminación Normarski (DIC). Algunos individuos fueron preparados para observación en microscopía electrónica de barrido (MEB). Los dibujos se hicieron con cámara clara acoplada a un microscopio Olympus BX51 y editadas en Adobe Illustrator CS6.

RESULTADOS

Análisis filogenéticos

Un total de 37 individuos colectados en 15 localidades de *R. mexicana* asociados a *A. aeneus* y *A. mexicanus* fueron secuenciados. En total 48 secuencias para el gen Cox1 de otras especies de *Rhabdochona* y siete secuencias de especies de *Spinitectus* que se usaron como grupo externo. Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas con ML e IB utilizando el marcador mitocondrial, recuperaron topologías similares con altos valores de probabilidades posteriores y apoyo de bootstrap en los nodos que separan los cuatro linajes recuperados en *Rhabdochona mexicana*

en *Astyanax* spp. (Fig. 2). Las topologías recuperadas con Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud para el marcador mitocondrial Cox1 y la matriz concatenada del gen mitocondrial y los nucleares fueron similares. Diferencias en la topología fueron encontradas con el marcador 28S rDNA y los datos combinados de los marcadores ribosomales (28S y 18S rDNA), donde no se recupera la monofilia de todo el complejo *Rhabdochona-Astyanax*, debido al cambio en la posición filogenética de *R. acuminata* como especie hermana del complejo *Rhabdochona-Astyanax*. Es por esto, que la delimitación de los linajes dentro del complejo está basada en la topología del análisis de los datos combinados.

El primer linaje está integrado por poblaciones de *R. mexicana* de la localidad tipo, que es el Río Jalpan en el estado de Querétaro (RJ) y poblaciones de otras seis localidades, obtenidas tanto en *A. mexicanus* como en *A. aeneus*. Este linaje corresponde con la especie *R. mexicana*. El segundo grupo (Linaje I) está conformado por poblaciones de Jalisco (RRT) y Guatemala (G y RCG) en *A. aeneus*. El Linaje II corresponde a poblaciones de nematodos de *A. mexicanus* obtenidos en las localidades más al norte de México, incluyendo San Luis Potosí (CA) y un registro nuevo para el estado de Tamaulipas (PA). El linaje más divergente es el Linaje III, que corresponde a individuos que parasitan a *A. aeneus* distribuidos en Veracruz (PM y RPO) y Chiapas (ME). La especie hermana del complejo de especies *Rhabdochona-Astyanax* es *R. acuminata*, quien es también parásito de carácidos. No obstante, el árbol obtenido en el análisis de máxima verosimilitud de la región del gen 28S (Fig. 3), *R. acuminata* separa el Linaje III del resto del complejo *Rhabdochona-Astyanax*. Las relaciones filogenéticas usando el marcador 18S tienen una resolución baja y no están bien resueltas en todos los nodos (Fig. 4), sin embargo, la monofilia del Linaje III está apoyada en ambos análisis con los marcadores nucleares. Los datos concatenados de los tres marcadores moleculares produjeron un alineamiento de 3671pb. Se obtuvo la misma topología que separa a las especies de *Rhabdochona-Astyanax* en cuatro linajes, y mantiene el estatus de *R. acuminata* como especie hermana (Fig. 5), con altos valores de apoyo de bootstrap y de probabilidades posteriores a partir de los

análisis con ML y BI. El árbol concatenado de los marcadores nucleares generó un alineamiento de 3097 pb, donde la reconstrucción filogenética bayesiana mantiene cuatro linajes monofiléticos con apoyo de probabilidades posteriores de alto a moderado, recupera a *Rhabdochona acuminata* como el grupo hermano de los linajes I y II, así como *R. mexicana*, con el Linaje III como hermano de todos ellos (Fig. 6). En la misma Fig. 6 se muestra el contraste en relación a la monofilia obtenida con el marcador mitocondrial para los cuatro linajes que parasitan a *Astyanax*.

Análisis de la divergencia y diversidad genética

El promedio de la distancia genética con el marcador mitocondrial Cox1 entre las especies de *Rhabdochona* fue de 10.78%, con un mínimo y máximo de 5.21% y 15.17%, respectivamente y una variación intra-específica de 0.08 a 4.83%. En los linajes del complejo *Rhabdochona-Astyanax*, la variación intra-específica más alta fue en *R. mexicana* (1.16%) y la más baja en *Rhabdochona* Linaje I (0.24%) (Tabla 3). La variación en la región 28S rDNA entre especies de *Rhabdochona* y el complejo *Rhabdochona-Astyanax* fue de 0.33 a 7.24%, donde el valor más alto de variación correspondió al Linaje III de *Rhabdochona* (Tabla 4), y no existió variación a nivel intra-específico.

Los resultados de la diversidad genética de las 15 poblaciones muestreadas se presentan en la Tabla 5. El número de haplotipos dentro de cada linaje fue de dos a ocho, la diversidad haplotídica (Hd) fue de 0.500 a 0.897 y la diversidad nucleotídica (Pi) fue de 0.002 a 0.010. *Rhabdochona mexicana* y el Linaje II mostraron dos haplotipos cada uno. El Linaje I exhibió cinco haplotipos, sólo uno de ellos compartido entre dos individuos de la población de Jalisco (RRT), y el resto de los individuos con haplotipos únicos (Tabla 6). La red de haplotipos del Linaje III mostró un patrón en forma de estrella con cuatro haplotipos (Fig. 7). El aislamiento por distancia (Fig. 8) en todos los linajes, excepto el Linaje I donde no fue posible analizarlo, mostraron una alta correlación entre la distancia geográfica y la divergencia genética, sin embargo en ninguno de los casos la correlación fue

estadísticamente significativa. La estructura genética de las poblaciones de los distintos linajes se muestra en la [Tabla 7](#). El valor más alto de F_{st} fue entre las poblaciones de Chiapas (PM) y Veracruz (RPO) dentro del Linaje III ($F_{st} = 0.9444$), y el valor más bajo entre las dos poblaciones de Guatemala (G y RCG) ($F_{st} = 0.28571$). La divergencia nucleotídica (D_{xy}) fue muy baja, de 0.00856 a 0.01956, lo que indica que existe diferenciación entre las poblaciones dentro de cada linaje.

Análisis morfológico

El Linaje III de *Rhabdochona* presenta los rasgos morfológicos más diferentes en relación a *R. mexicana* y el resto del complejo *Rhabdochona-Astyanax* ([Tabla 8](#)). Es por tanto, la especie que se detalla morfológicamente en el presente estudio. Del resto de los linajes se obtuvieron además muy pocos ejemplares para el análisis morfológico. Para *Rhabdochona* Linaje I, con dos ejemplares no se observan diferencias morfológicas ([Fig. 9 y 10](#)) respecto a *R. mexicana* ([Fig. 11](#)), pues ambas presentan deiridios bifurcados ([Fig. 12 y 13](#)), 10 dientes en el prostomo ([Fig. 14](#)), y un arreglo similar de las papilas cloacales. *Rhabdochona*. El Linaje III, a diferencia de los otros tres linajes presenta un prostoma con 14 dientes (en lugar de 10), y un número de 14 a 15 papilas precloacales, y el resto de los linajes tan solo de 3 a 8. A continuación se presenta una pequeña descripción morfológica de este linaje a partir de 15 ejemplares que se recolectaron de *A. aeneus*.

***Rhabdochona* Linaje III ([Fig. 15 y 16](#))**

Nematodos de tamaño mediano, con cutícula lisa. Prostoma provisto con 14 dientes internos. La apertura oral está rodeada por cuatro papilas cefálicas y dos anfidios laterales. Los deiridios son simples y de gran tamaño, situados en posición posterior al prostomo ([Fig. 16C](#)). La cauda en individuos de ambos sexos es cónica, sin extensiones cuticulares.

Macho (medidas en milímetros, con base en ocho individuos de *A. aeneus*)

Longitud del cuerpo 7.864-10.522 (9.514), ancho máximo 0.163-0.200 (0.181) . Longitud del prostoma 0.023-0.034 (0.029), ancho del prostoma 0.015-0.023 (0.019), longitud del vestíbulo incluyendo el prostoma 0.112-0.128 (0.117). Longitud esófago muscular 0.221-0.342 (0.305), longitud esófago glandular 1.783-3.235 (2.458). Anillo nervioso, deiridios y poro excretor 0.125-0.169 (0.150), 0.039-0.049 (0.042) y 0.202-0.249 (0.220), respectivamente desde la región anterior. Deiridios largos, simples. Área rugosa ausente. Catorce pares de papilas preanales, y de seis a ocho papilas post cloacales. Longitud de la espícula izquierda 0.414-0.451 (0.430), longitud espícula derecha 0.117-0.138 (0.125). Longitud cauda 0.151-0.347 (0.272).

Hembra (medidas en milímetros, con base en siete individuos de *A. aeneus*)

Longitud del cuerpo 11.615-27.258 (16.866), ancho máximo 0.154-0.327 (0.218). Longitud del prostoma 0.024-0.041 (0.034), ancho del prostoma 0.021-0.028 (0.024), longitud del vestíbulo incluyendo el prostoma 0.112-0.128 (0.117). Longitud esófago muscular 0.173-0.436 (0.300). Anillo nervioso, deiridios y poro excretor 0.147-0.227 (0.185), 0.039-0.045 (0.042) y 0.173-0.240 (0.204) respectivamente, desde la región anterior. Deiridios largos, simples. Distancia entre la vulva y la la región anterior 4.618-14.100 (7.862). Longitud de la cauda 0.218-0.364 (0.311).

Hospedero: *Astyanax aeneus*.

Sitio de infección: intestino

Localidad: Río Paso de Ovejas, Pueblo el Crucero en Veracruz, México (RPO) (19° 19' 1.35" N, 96° 32' 11.59" O).

Otras localidades: Metzabok en Chiapas, México. (17° 7' 3.41" N, 91° 37' 54.61" O) y Paso del Macho (18° 58' 18.80", 96° 43' 53.32") en Veracruz, México.

Observaciones:

Rhabdochona Linaje III posee deiridios simples y 14 dientes en el prostoma al igual que dos especies congénicas, *R. marcusenii*, especie descrita en África (Moravec & Jirků, 2014) y *R. acuminata* (Cremonte *et al.*, 2002), la especie hermana del complejo *Rhabdochona-Astyanax*.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se reconocieron cuatro linajes genéticos con monofilia recíproca en las especies de *Rhabdochona* parasitando a dos especies de *Astyanax*, que de acuerdo al concepto unificador de especie (De Queiroz 1998; 1999) corresponden a linajes evolutivos que se han separado, es decir, especies distintas. No existe un patrón geográfico evidente en las relaciones evolutivas entre los linajes, y dentro de algunos linajes, el agrupamiento de las poblaciones es difícil de explicar, como sucede en el Linaje I que agrupa poblaciones de Jalisco, México y Guatemala, poblaciones aisladas por cientos de kilómetros sin aparentes poblaciones intermedias. Sin embargo, sólo observamos el paisaje actual, de tal manera que muchas poblaciones pudieron haberse extinguido, o el muestreo no permitió recuperarlas. Los otros linajes están conformados por las poblaciones más cercanas geográficamente, aunque aparentemente, el aislamiento por distancia no es el factor que ha moldeado la estructura genética actual de las poblaciones. Los niveles de diferenciación entre las poblaciones de cada linaje muestran estructura genética poblacional, considerando los valores de F_{st} .

El complejo *Rhabdochona-Astyanax* es monofilético de acuerdo a los análisis mitocondriales y combinados de todos los marcadores, y los linajes que lo conforman tienen monofilia recíproca. Si bien la topología en las reconstrucciones filogenéticas no es exactamente igual, puede ser reflejo de eventos de especiación recientes. Un tiempo corto desde el evento de especiación también puede ser la explicación de la aparente ausencia de variación morfológica en las especies crípticas de *R. mexicana* (Linaje I y Linaje II). Predecimos que la metodología empleada en este estudio aumenta la probabilidad de encontrar otras especies crípticas aún en las especies de *Rhabdochona* ya descritas, así como resolver

conflictos taxonómicos en el grupo, por lo que será recomendable expandir el muestreo de lo que se considera una misma especie y obtener muestras para realizar un estudio de prospección molecular como el presente.

Al analizar por primera vez organismos nunca antes estudiados mediante aproximaciones moleculares, hace muy probable encontrar especies nuevas. Esta tendencia es particularmente común en nematodos, donde la diagnosis está basada en pocos caracteres morfológicos. En *Rhabdochona*, la asignación de especie a menudo es dada en automático considerando únicamente la especie de hospedero donde el parásito es encontrado, es decir, basada en la especificidad hospedatoria.

En nematodos, distintos niveles en las distancias genéticas entre especies han sido propuestos (Blouin, 2002). Pero las diferencias en las tasas de sustitución y la alta variación intra-específica en algunas especies (Blouin *et al.*, 1998) hacen necesario establecer un umbral para cada grupo de estudio, donde una buena aproximación puede ser comparar la divergencia genética con especies cercanas filogenéticamente. En este estudio, la inclusión de otras especies de *Rhabdochona* permite establecer un valor aproximado en el patrón de divergencia genética. Aunque la adición de más especies puede modificar esta tendencia, así como las relaciones filogenéticas encontradas. El único estudio genético poblacional previo en especies de *Rhabdochona* corresponde a *R. lichtenfelsi* especie que parasita a godeidos en el centro de México, donde se obtuvo una variación intraespecífica de 4.3-4.9% para el marcador Cox1 y no hubo evidencia de especiación (Mejía-Madrid *et al.*, 2007), mientras que las especies del complejo *Rhabdochona-Astyanax* superan el 5% de diferencia inter-específica.

Este trabajo muestra la primera hipótesis filogenética basada en caracteres moleculares de algunas especies de *Rhabdochona* en peces de México y Centroamérica y la no monofilia de las especies de *Rhabdochona* en América. Además, cada especie de *Rhabdochona* parasita a la especie de hospedero

esperado, evidenciando su historia evolutiva en conjunto y la especificidad hospedatoria como un valor importante en los eventos de especiación del parásito.

Estos resultados infieren aún mayor especificidad hospedatoria a la esperada, con linajes exclusivos de *A. mexicanus* o *A. aeneus*, y sólo *R. mexicana* en ambos hospederos. También destaca la importancia de las filogenias moleculares en diferenciar especies cercanas aún en simpatría.

Nuestra visión de las asociaciones hospedero-parásito puede ser modificada con el descubrimiento de especies crípticas, por ejemplo, las hipótesis establecidas sobre la diversificación de los parásitos con sus hospederos desde que colonizaron el continente Americano. Este trabajo reconoció complejos de especies crípticas y además generó información relevante como códigos de barras genéticos para la futura identificación de especies de *Rhabdochona*.

LITERATURA CITADA

Bessho, Y., Ohama, T., & Osawa, S. (1992). Planarian mitochondria II. The unique genetic code as deduced from cytochrome c oxidase subunit I gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 34, 331-335.

Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T. & Thomas, W.K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75.

Blaxter, M.L. (2003). Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. *Advances in Parasitology*, 54, 101-195.

Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142, S26-S39.

Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H. & Dame, J.B., (1998). Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1719–27.

- Blouin, M.S. (2002). Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology*, 32, 527-531.
- Bohonak, A.J. (2002). IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93, 153-154.
- Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F. J., Esquivel-Bobadilla, S., & Borowsky, R.L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC evolutionary biology*, 12, 9.
- Casiraghi, M., Anderson, T.J.C., Bandi, C., Bazzocchi, C., & Genchi, C. (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, 122, 93-103.
- Caspeta-Mandujano, J.M., Moravec, F., & Salgado-Maldonado, G. (2000). *Rhabdochona mexicana* sp. n.(Nematoda: Rhabdochonidae) from the intestine of characid fishes in Mexico. *Folia Parasitologica*, 47, 211-215.
- De Queiroz K. (1998). The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. En: Howard DJ, Berlocher SH, editors. *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford, England: *Oxford University Press*. p 57–75.
- De Queiroz, K. (1999). The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. En: Wilson RA, editor. *Species: New Interdisciplinary Essays*. Cambridge, MA: *MIT Press*. p 49–89.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56, 879-886.
- Folmer, O., Hoeh, W.R., Black, M.B., & Vrijenhoek, R.C. (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.
- García-Varela, M., & Nadler, S. A. (2005). Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 91, 1401-1409.
- Gross, J.B. (2012). The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC evolutionary biology*, 12, 105.

Harpending, H., (1994). Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66, 591-600.

Hugot, J.P., Baujard, P., & Morand, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3, 199-208.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-1649.

Kumar, S., Stecher, G. & Koichiro T. (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*.

Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

Maddison, W.P. & Maddison, D.R. (2016). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10 <http://mesquiteproject.org>

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P. & Lopez. (2013). R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue): W597-600 doi:10.1093/nar/gkt376.

Miller, R.R.M., Norris, W.L., & Soto, S.M.S. (2009). Peces dulceacuícolas de México (No. EE/597.092972 M5).

Mejía-Madrid, H.H., Choudhury, A., & de León, G.P.P. (2007a). Phylogeny and biogeography of *Rhabdochona* Railliet, 1916 (Nematoda: Rhabdochonidae) species from the Americas. *Systematic Parasitology*, 67, 1-18.

Mejía-Madrid, H.H., Vázquez-Domínguez, E., & Pérez-Ponce de León, G. (2007b). Phylogeography and freshwater basins in central Mexico: recent history as revealed by the fish parasite *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda). *Journal of Biogeography*, 34, 787-801.

Moravec, F., Salgado-Maldonado, G., González-Solís, D., & Caspeta-Mandujano, J.M. (2012). Host–parasite relationships of *Rhabdochona kidderi* Pearse, 1936 (Nematoda: Rhabdochonidae) in fishes of the Lacantún River in the Lacandon rain

forest of Chiapas State, southern Mexico, with a key to Mexican species of *Rhabdochona* Railliet, 1916. *Systematic parasitology*, 82, 1-12.

Moravec, F., Pachanawan, A., & Kamchoo, K. (2013). *Rhabdochona* (*Rhabdochona*) *hypsibarbi* n. sp. (Nematoda: Rhabdochonidae) from the freshwater cyprinid fish *Hypsibarbus wetmorei* (Smith) in northeast Thailand. *The Journal of Parasitology*, 99, 297-302.

Moravec, F. & Jirků, M. (2014). *Rhabdochona* spp. (Nematoda: Rhabdochonidae) from fishes in the Central African Republic, including three new species. *Folia Parasitologica*, 61, 157–172.

Nadler, S.A., Carreno, R.A., Mejía-Madrid, H., Ullberg, J., Pagan, C., Houston, R., & Hugot, J.P. (2007). Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology*, 134, 1421-1442.

Nadler, S.A., Bolotin, E., & Stock, S.P. (2006). Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Systematic Parasitology*, 63, 159-179.

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

Nakano, T., Okamoto, M., Ikeda, Y., & Hasegawa, H. (2006). Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene and nuclear rDNA regions of *Enterobius vermicularis* parasitic in captive chimpanzees with special reference to its relationship with pinworms in humans. *Parasitology Research*, 100, 51-57.

Ornelas-García, C.P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC evolutionary biology*, 8, 340.

Pérez-Ponce de León, G. (2003). Biodiversity and biogeographic patterns in the Mesa Central of México: Insights from host-parasite systems. *Journal of Parasitology*, 89, 126-133.

Pérez-Ponce de León, G. & Nadler, S.A. (2010). What we don't recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species. *Journal of Parasitology*, 96, 453-464.

Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.

Ronquist, F. & Huelsenbeck J.P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.

Stamatakis, A. (2014). "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". En *Bioinformatics*.

Thompson, J.N. (1994). The coevolutionary process. University of Chicago Press.

Lista de tablas

Tabla 1. Sitios de colecta de individuos de *Rhabdochona* de *Astyanax* spp.

#	Especie de nematodo	n	Estado/Pais	Localidad	Código	Especie de hospedero	Latitud	Longitud	Cox1	28S rDNA	18S rDNA
México											
1	<i>R. mexicana</i> Linaje II	6	Tamaulipas	Plan de Ayala	PA	<i>A. mexicanus</i>	23°34'02.2"	99°24"	136A, 139A	136A, 137A, 139A	136A, 137A
2	<i>R. mexicana</i> Linaje II	1	San Luis Potosí	Río Gallinas, en Arroyo Canoas	CA	<i>A. mexicanus</i>	22° 0' 9.79"	99° 32' 36.549"	186A	186A	-
3	<i>R. mexicana</i>	1		Antes Vereda, Aquismón	VE	<i>A. mexicanus</i>	21° 2' 35.34"	99° 0' 0"	187A	-	-
4	<i>R. mexicana</i>	5	Querétaro	Río Jalpán, Santa María, Jalpán	RJ	<i>A. mexicanus</i>	21° 12' 14.76"	99° 28' 28.2"	15A, 26A	2A, 14A, 15A	15A
5	<i>R. mexicana</i>	1		Río Estórax, en El Oasis	OA	<i>A. mexicanus</i>	20° 59' 59.98"	99° 42' 30.37"	185A	-	-
6	<i>R. mexicana</i>	1	Morelos	Real de Coacalco, Yautepec	RCY	<i>A. aeneus</i>	18° 51' 35.561"	99° 4' 33.232"	1A	1A	-
7	<i>R. mexicana</i>	1		Río Amacuzac, en El Chisco	RAM	<i>A. aeneus</i>	18.45° 80' 73"	95.19° 04' 02"	206A	206A	-
8	<i>R. mexicana</i>	6	Veracruz	Afluente Río Actopan, Loc. La Esperanza	RAE	<i>A. aeneus</i>	19° 28' 53.95"	96° 33' 16.33"	7A, 8A, 9A, 10A, 11A, 12A	7A, 9A, 11A	11A
9	<i>Rhabdochona</i> Linaje III	18		Río Paso de Ovejas, Pueblo el Crucero	RPO	<i>A. aeneus</i>	19° 19' 1.35"	96° 32' 11.59"	154A, 155A, 56A, 125A, 126A	125A, 126A, 154A	126A, 155A
10	<i>Rhabdochona</i> Linaje III	1		Paso del Macho	PM	<i>A. aeneus</i>	18° 58' 18.80"	96° 43' 53.32"	71A	71A	-
11	<i>R. mexicana</i> Linaje I	2	Jalisco	Río La Rosa, San Vicente, Tamazula	RRT	<i>A. aeneus</i>	19° 38' 56.04"	103° 15' 24.59"	24A	23A, 24A	24A
12	<i>R. mexicana</i>	2	Oaxaca	Nacimiento del Río Tehuantepec	NCR	<i>A. aeneus</i>	16° 53' 57.68"	96° 9' 57.33"	21A, 168A	21A, 168A	-
13	<i>Rhabdochona</i> Linaje III	6	Chiapas	Metzabok	ME	<i>A. aeneus</i>	17° 7' 3.41"	91° 37' 54.61"	97A, 165A, 166A	97A, 166A	-
14	<i>Rhabdochona</i> Linaje I	2	Guatemala	Guatemala	G	<i>A. aeneus</i>	14° 4' 16"	90° 53' 59"	204A, 205A	204A, 205A	
15	<i>Rhabdochona</i> Linaje I	2		Río las Cabezas, Saranate	RCG	<i>A. aeneus</i>	14° 44' 23"	90° 4' 52"	89A, 193A	89A	89A

Código del sitio de muestreo (#), número de nematodos colectados (n).

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados en este estudio.

Gen amplificado	Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Referencia
Cox1	COI int F	F: TGATTGGTGGTTTTGGTAA	1
	COI int R	R: ATAAGTACGAGTATCAATATC	1
	pr-a	F: TGGTTTTTTGTGCATCCTGAGGTTTA	2; 3
	pr-b	R: AGAAAGAACGTAATGAAAATGAGCAAC	2; 3
	LCO1490	F: GGTCACAAATCATAAAGATATTGG	4
	HCO2198/588	R: TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	4
	507	F: AGTTCTAATCATAARGATATYGG	9
28S rDNA	391	F: AGCGGAGGAAAAGAACTAA	5; 9
	502	F: CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC	6
	536	R: CAGCTATCCTGAGGGAAAC	6
18S rDNA	G18S4	F: GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC	7; 8
	136	R: TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	5; 8
	649	R: TAAGAACGGCCATGCACCAC	8

F: forward; R: reverse

REFERENCIA: **1:** Casiraghi *et al.*, 2001; **2:** Bessho *et al.*, 1992; **3:** Nakano *et al.*, 2006; **4:** Folmer *et al.*, 1994; **5:** Nadler & Hudspeth, 1998; **6:** García-Varela & Nadler, 2005; **7:** Blaxter *et al.*, 1998; **8:** Nadler *et al.*, 2000; **9:** Nadler *et al.*, 2006

Tabla 3. Estimación de la divergencia evolutiva entre las especies de *Rhabdochona* y el grupo externo *Spinitectus* spp. con el marcador Cox1

Clave especie	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-							
2	5.21 (0.8)	-						
3	6.84 (0.9)	7.20 (0.9)	-					
4	12.15 (1.2)	12.31 (1.2)	12.83 (1.3)	-				
5	12.59 (1.2)	12.83 (1.3)	13.51 (1.3)	8.90 (1.0)	-			
6	13.88 (1.2)	14.20 (1.2)	15.01 (1.3)	12.39 (1.2)	10.99 (1.1)	-		
7	11.92 (1.3)	12.53 (1.3)	13.07 (1.3)	10.34 (1.2)	7.34 (1.0)	9.61 (1.0)	-	
8	12.24 (1.4)	13.60 (1.5)	14.70 (1.5)	12.04 (1.4)	9.16 (1.3)	10.02 (1.2)	8.99 (1.3)	-
9	15.19 (1.4)	16.18 (1.5)	16.53 (1.4)	14.88 (1.4)	14.30 (1.4)	14.30 (1.3)	12.16 (1.3)	11.99 (1.5)

Clave	Especie	Variación intra-específica
1	<i>R. mexicana</i>	1.16%
2	<i>Rhabdochona</i> Linaje II	0.24%
3	<i>Rhabdochona</i> Linaje I	1.50%
4	<i>Rhabdochona</i> Linaje III	0.96%
5	<i>R. acuminata</i>	0.08%
6	<i>R. canadensis-Gila</i>	4.83%
7	<i>R. salgadoi</i>	0.45%
8	<i>R. lichtenfelsi</i>	-
9	<i>Spinitectus</i> spp.	6.10%

Las distancias p están expresadas en porcentajes, el error estándar se muestra entre paréntesis. Sombreado en gris corresponde a las distancias del complejo *Rhabdochona-Astyanax*

Tabla 4. Estimación de la divergencia evolutiva entre las especies de *Rhabdochona* y el grupo externo *Spinitectus* spp. con el marcador 28S rDNA

Clave especie	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-							
2	0.46 (0.20)	-						
3	0.33 (0.17)	0.35(0.19)	-					
4	7.21 (0.89)	7.24 (0.90)	6.93 (0.87)	-				
5	5.24 (0.70)	5.33 (0.70)	5.03 (0.68)	5.46 (0.80)	-			
6	5.78 (0.71)	5.83 (0.72)	5.41 (0.68)	5.68 (0.79)	4.69 (0.64)	-		
7	6.47 (0.73)	6.46 (0.73)	6.14 (0.71)	6.32 (0.80)	5.07 (0.65)	2.57 (0.48)	-	
8	5.91 (0.71)	5.94 (0.72)	5.52 (0.69)	5.26 (0.76)	3.89 (0.61)	2.47 (0.48)	2.76 (0.49)	-
9	22.59 (1.29)	22.65 (1.31)	21.80 (1.25)	24.09 (1.35)	22.82 (1.27)	20.01 (1.16)	20.74 (1.17)	20.28 (1.16)

Clave	Especie
1	<i>R. mexicana</i>
2	<i>Rhabdochona</i> Linaje I
3	<i>Rhabdochona</i> Linaje II
4	<i>Rhabdochona</i> Linaje III
5	<i>R. acuminata</i>
6	<i>R. salgadoi</i>
7	<i>R. lichtenfelsi</i>
8	<i>R. canadensis</i>
9	<i>Spinitectus</i> spp.

Las distancias *p* están expresadas en porcentajes, el error estándar se muestra entre paréntesis. Sombreado en gris corresponde a las distancias del complejo *Rhabdochona-Astyanax*

Tabla 5. Diversidad genética de las poblaciones de *Rhabdochona* spp. recolectadas de *Astyanax* spp. en México y Centroamérica

Población	No. Individuos	No. Haplotipos	No. sitios variables (S)	Diversidad haplotídica (Hd)	Diversidad nucleotídica (Pi)	D de Tajima	Fu's Fs	Número promedio de diferencias nucleotídicas (k)
<i>Rhabdochona mexicana</i>								
RJ	5	2	3	0,40000	0.00231	-1,04849	1,688	1,20000
VE	1	-	-	-	-	-	-	-
OA	1	-	-	-	-	-	-	-
RCY	1	-	-	-	-	-	-	-
RAE	6	5	8	0,93300	-	-1,40833	-1,515	2,66667
NCR	2	1	0	0	0	-	-	-
RAM	1	-	-	-	-	-	-	-
Total	17	8	12	0,89744	0.00368	0,085120	0,507	3,96154
<i>Rhabdochona</i> Linaje I								
G	2	2	3	1	0.00563	-	-	3,00000
RCG	2	2	3	1	0.00721	-	-	3,00000
RRT	2	1	0	0	0	-	-	-
Total	6	5	11	0.93300	0.00236	0.73124	-0,217	5,40000
<i>Rhabdochona</i> Linaje II								
PA	3	1	0	0	0	-	-	-
CA	1	-	-	-	-	-	-	-
Total	4	2	3	0.50000	0.00241	-0,75445	1,716	1,50000
<i>Rhabdochona</i> Linaje III								
RPO	5	3	2	0.73333	0.00287	-0,05002	-0,427	0,86670
PM	1	-	-	-	-	-	-	-
ME	4	2	1	0.50000	0.00083	-0,61237	0,172	0.50000
Total	10	4	7	0.78800	0.01067	1,28010	1,731	3,22222

Tabla 6. Haplotipos en el complejo *Rhabdochona-Astyanax*

<i>Rhabdochona mexicana</i>		<i>Rhabdochona</i> Linaje I		<i>Rhabdochona</i> Linaje II		<i>Rhabdochona</i> Linaje III	
H	I	H	I	H	I	H	I
H 1	10A, 11A, 12A, 15A, 13A, 14A, 168A, 187A, 206A, 21A, 26A, 7A, 8A, 9A	H 1	193A	H 1	136A, 137A, 139A	H 1	191A, 166A, 165A, 97A
H 2	1A, 2A, 185A	H 2	204A	H 2	186A	H 2	126A, 125A, 154A
		H 3	205A			H 3	155A, 56A
		H 4	23A, 24A			H 4	71A
		H 5	89A				

H: haplotipo, I: individuo

Tabla 7. Comparaciones entre las poblaciones de *Rhabdochona* spp. de hospederos *Astyanax* spp.

<i>Rhabdochona mexicana</i>						
Población 1	Población 2	Fst	Dxy	Da	Gst	Nst
RAE	RJ	0.68072	0.01143	0.00778	0.19354	0.68193
RAE	NCR	0.75933	0.00999	0.00758	0.24664	0.75933
RJ	NCR	0.84229	0.00785	0.00661	0.54023	0.84229
<i>Rhabdochona</i> Linaje I						
G	RRT	0.87500	0.01956	0.01711	0.33333	0.87623
G	RCG	0.28571	0.00856	0.00244	0.00000	0.28787
RRT	RCG	0.80000	0.01834	0.01467	0.33333	0.80149
<i>Rhabdochona</i> Linaje III						
ME	RPO	0.94444	0.01788	0.01689	0.50943	0.94499

Tabla 8. Medidas morfológicas de *Rhabdochona* spp. de *Astyanax* spp.

	<i>R. mexicana</i> (Caspeta-Mandujano et al., 2000)		<i>R. mexicana</i>		<i>Rhabdochona</i> Linaje I		<i>Rhabdochona</i> Linaje II		<i>Rhabdochona</i> Linaje III	
	n=23 M	n=25 H	n=25 M	n=21 H	n=1 M	n=1 H	n=2 M	n=2 H	n=8 M	n=7 H
Longitud del cuerpo	4.55-9.23	8.90-18.18	3.13-6.67	2.61-10.56	-	23.65	5.914-6.128	-	7.864-10.522 (9.514)	11.615-27.258 (16.866)
Anchura máxima	0.079-0.188	0.155-0.300	0.037-0.076	0.036-0.092	0.149	0.291	0.127-0.145	0.221	0.163-0.200 (0.181)	0.154-0.327 (0.218)
Prostoma (largo)	0.019-0.026	0.023-0.033	0.012-0.024	0.009-0.024	0.021	0.034	0.017-0.019	-	0.023-0.034 (0.029)	0.024-0.041 (0.034)
Prostoma (ancho)	0.013-0.023	0.019-0.026	0.007-0.015	0.004-0.016	0.010	0.017	0.008-0.010	-	0.015-0.023 (0.019)	0.021-0.028 (0.024)
Longitud del vestíbulo incluyendo el prostoma	0.115-0.161	0.102-0.234	0.076-0.112	0.076-0.109	-	0.173	0.101-0.104	0.0868	0.084-0.123 (0.110)	0.112-0.128 (0.117)
Longitud del esófago muscular	0.184-0.280	0.214-0.425	0.136-0.266	0.112-0.240	0.253	0.527	0.210-0.269	0.2137	0.221-0.342 (0.305)	0.173-0.436 (0.300)
Longitud del esófago glandular	1.50-4.55	2.40-5.41	0.729-1.101	0.674-1.082	-	3.931	2.764	-	1.783-3.235 (2.458)	-
Anillo nervioso desde región anterior	0.135-0.188	0.165-0.250	0.115-0.153	0.108-0.158	-	0.254	0.136-0.138	-	0.125-0.169 (0.150)	0.147-0.227 (0.185)
Poro excretor desde región anterior	0.204-0.306	0.250-0.359	0.117-0.232	0.124-0.230	0.217	0.392	0.234-0.260	-	0.202-0.249 (0.220)	0.173-0.240 (0.204)
Deiridios desde región anterior	0.039-0.059	0.052-0.075	0.019-0.055	0.023-0.055	0.049	0.073	0.039	-	0.039-0.049 (0.042)	0.039-0.045 (0.042)
Papilas precloacales subventrales	3-4 y 5	-	6-8	-	7	-	3, 4	-	14, 15	-
Papilas postcloacales	6	-	3-5	-	4+1	-	4, 5	-	6, 8	-
Área rugosa	ausente	-	ausente	-	-	-	-	-	-	-
Espícula izquierda	0.468-0.587	-	0.297-0.379	-	0.616	-	0.401-0.501	-	0.414-0.451 (0.430)	-
Longitud del fuste	0.138-0.178	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espícula derecha	0.082-0.108	-	0.067-0.100	-	0.115	-	0.088-0.091	-	0.117-0.138 (0.125)	-

Longitud de radio entre las espículas	1 : 5.2-6.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cauda cónica	0.165-0.217	0.101-0.224	0.134-0.194	0.122-0.170	0.171	0.291	0.112-0.130	-	0.151-0.347 (0.272)	0.218-0.364 (0.311)
Vulva postecuatorial desde la extremidad anterior	-	4.96-10.89	-	1.580-4.730	-	13.20	-	-	-	4.618-14.100 (7.862)
Huevos	-	0.036-0.039 x 0.019	-	0.035 x 0.016	-	-	-	0.023- 0.033 x 0.011- 0.013	-	-

M: macho, H: hembra. Las medidas están expresadas en milímetros. Entre paréntesis se muestran las medidas promedio.

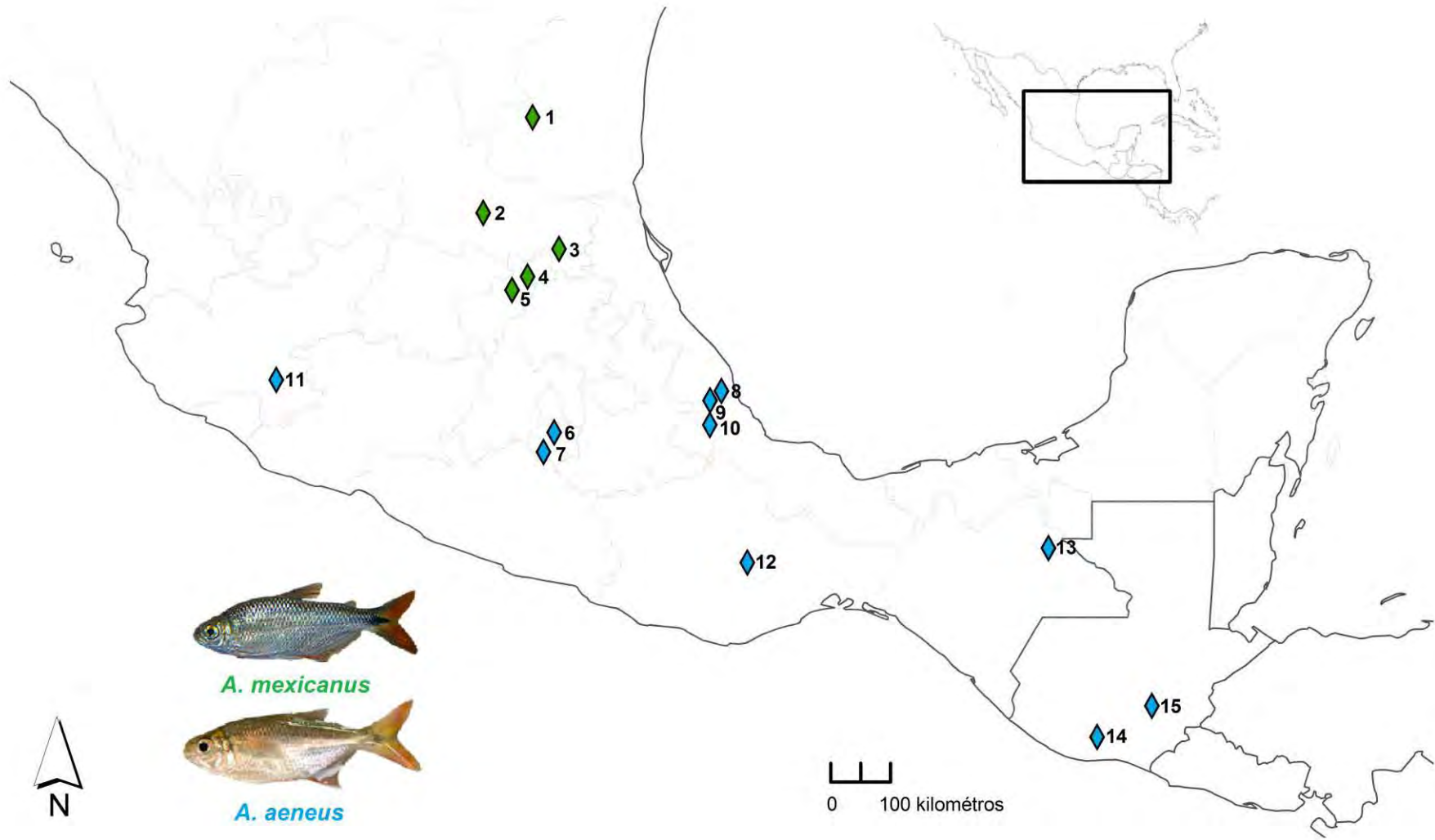


Fig. 1

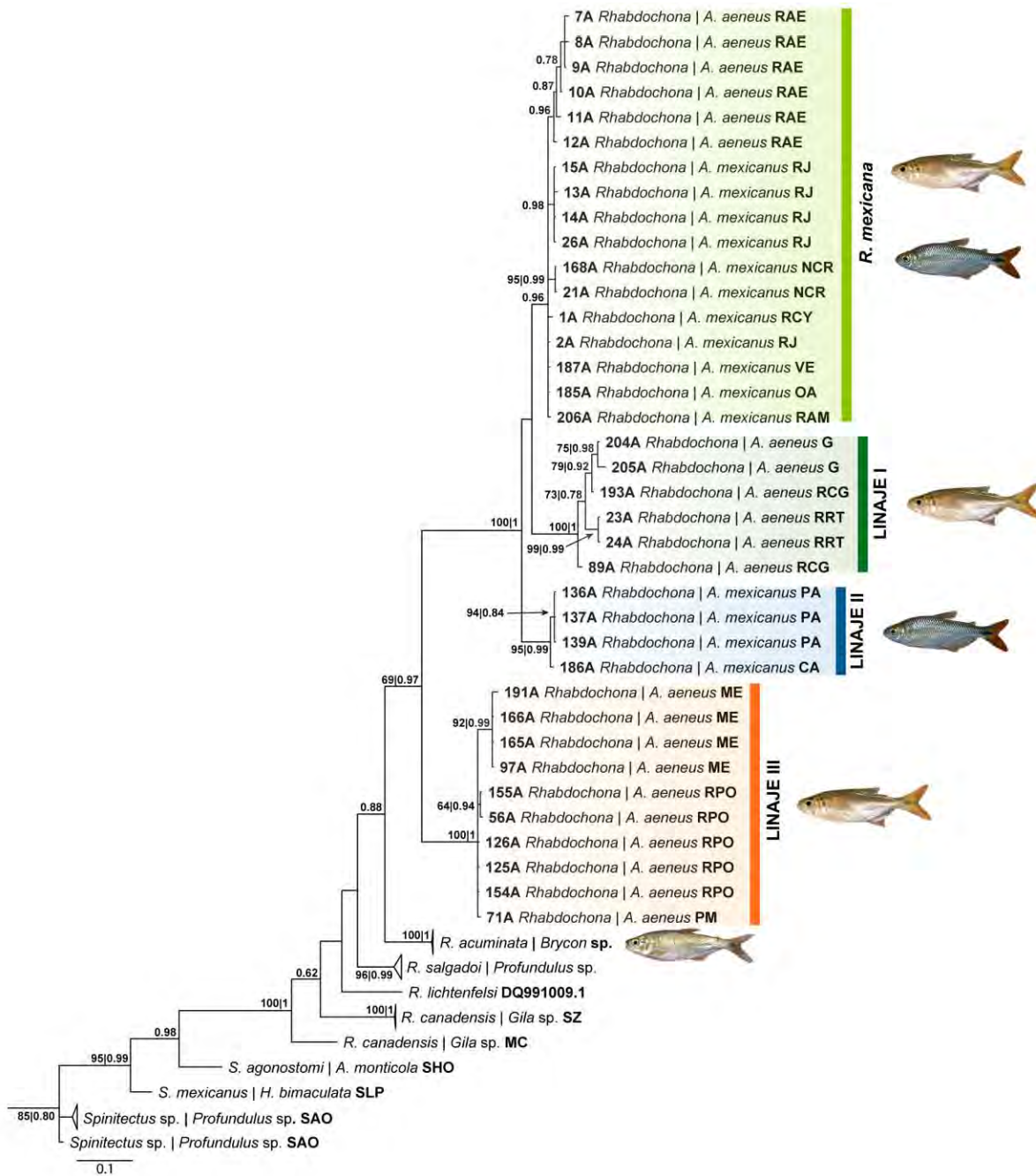


Fig. 2

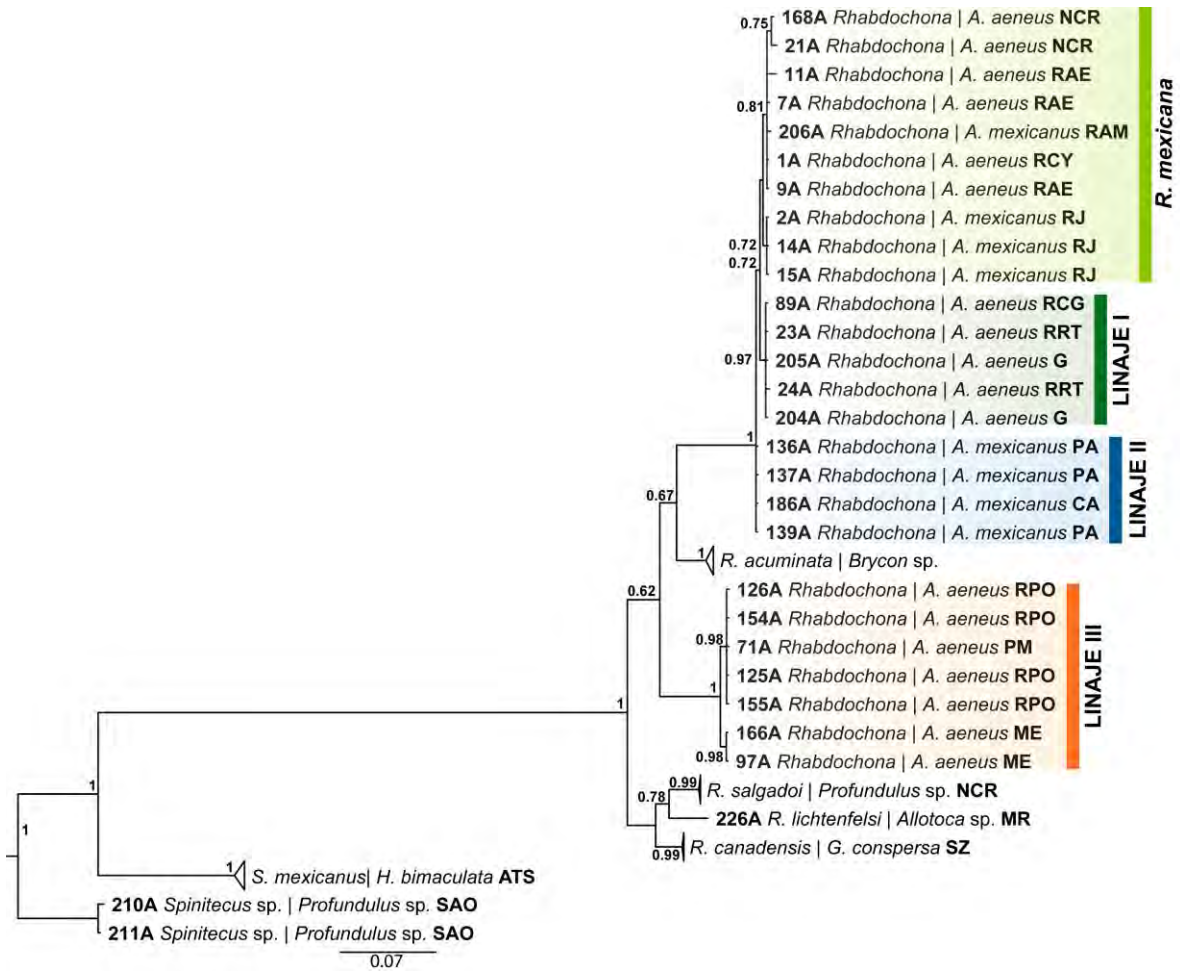


Fig. 3

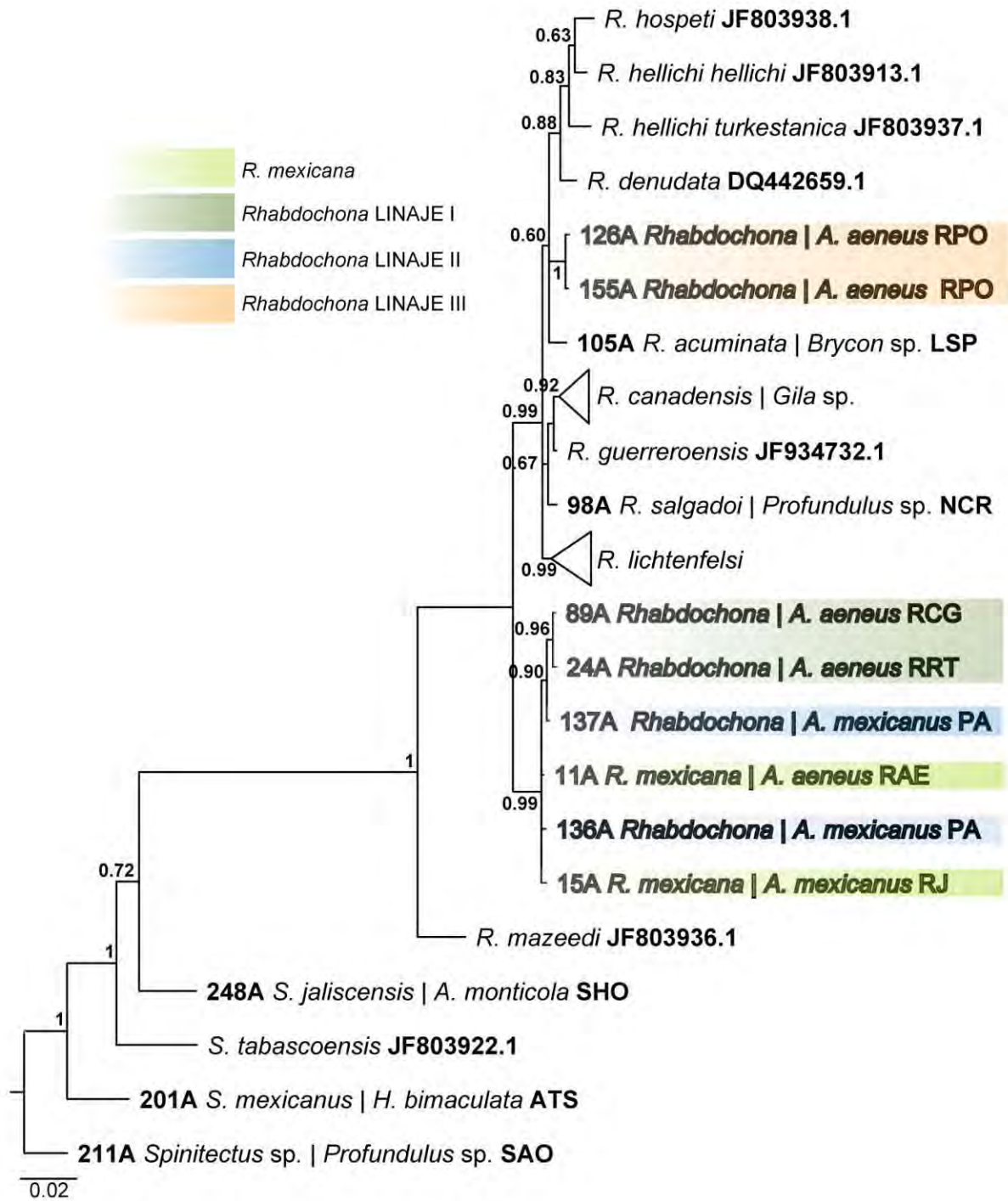


Fig. 4

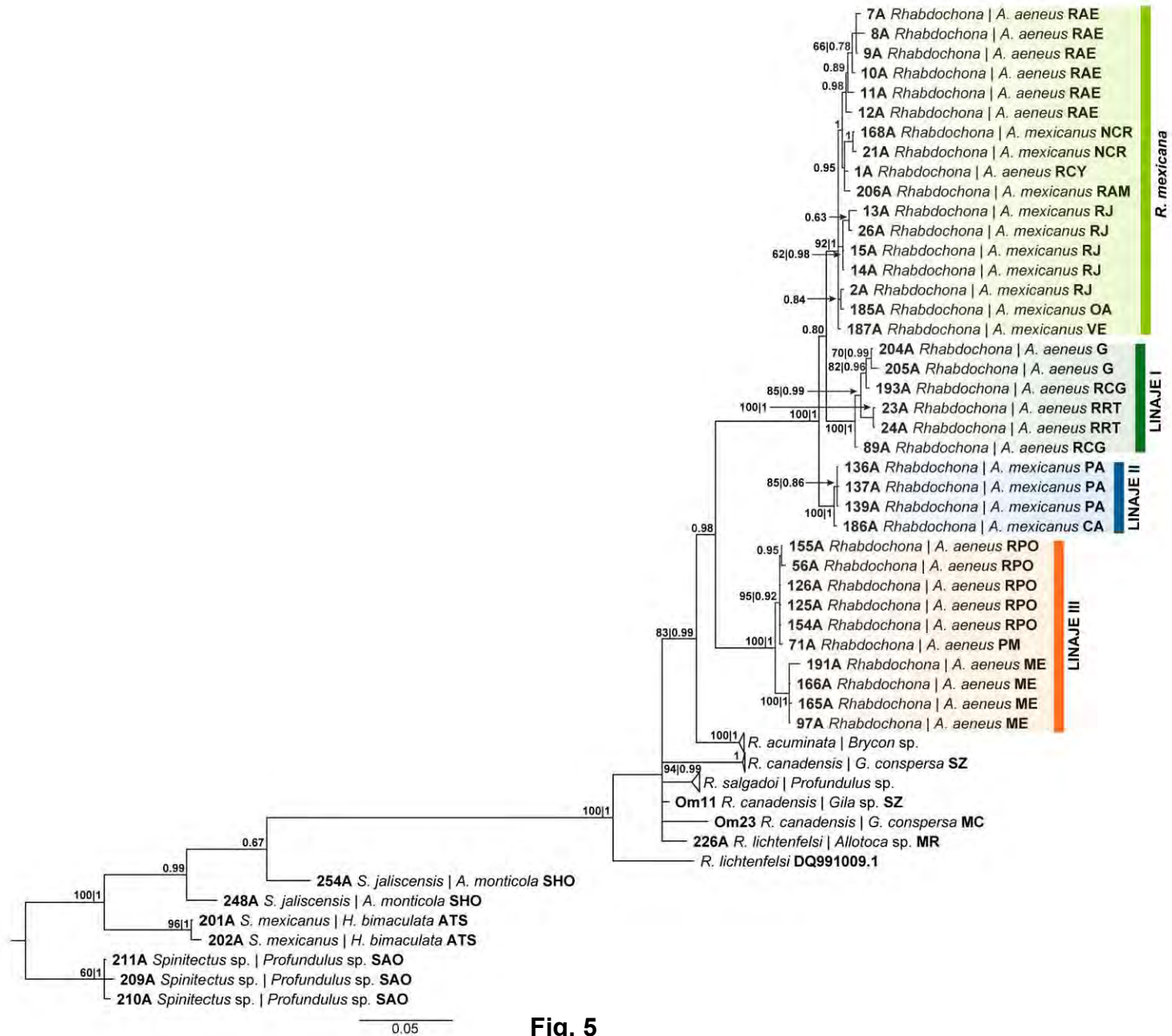


Fig. 5

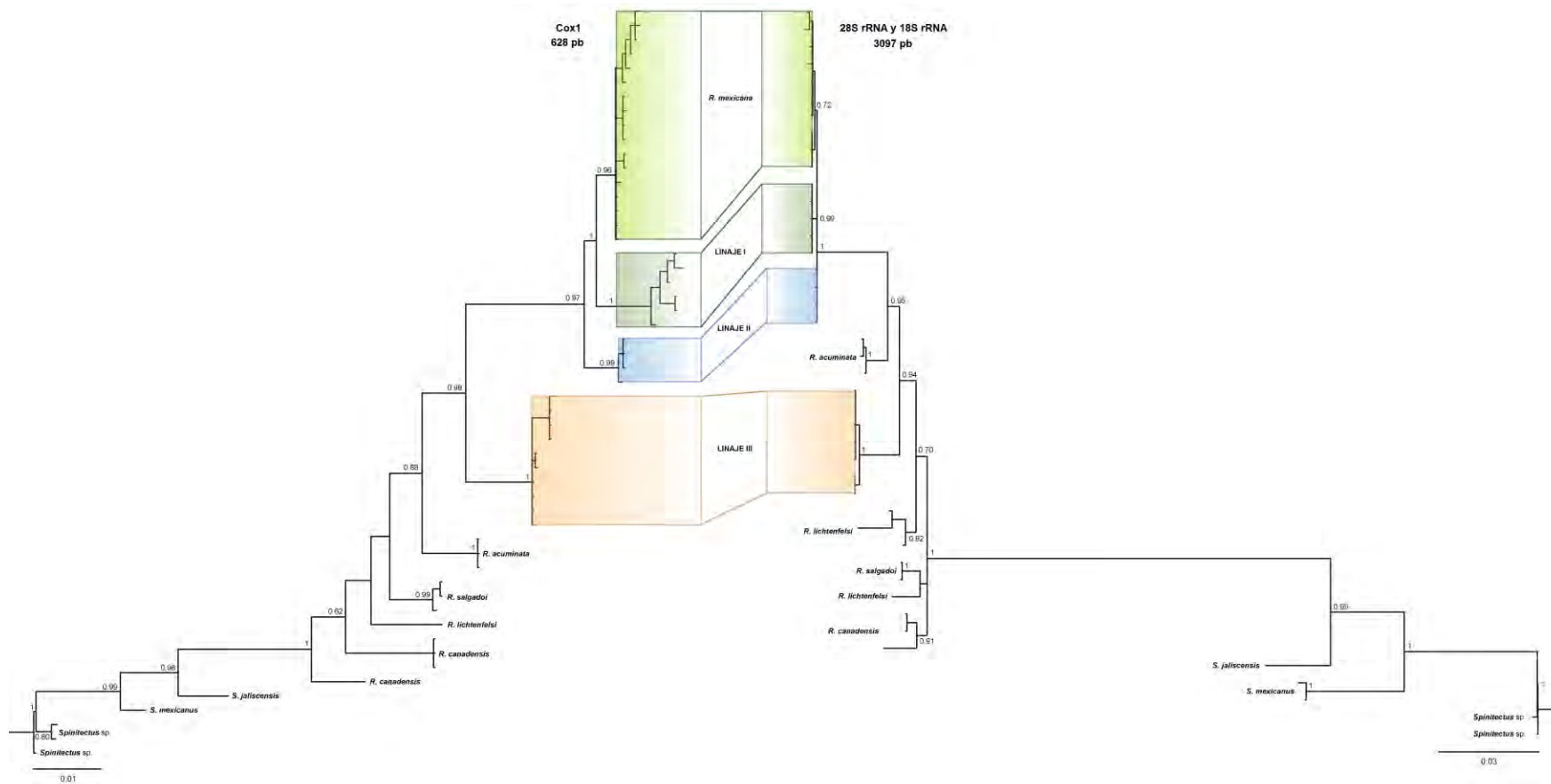


Fig. 6

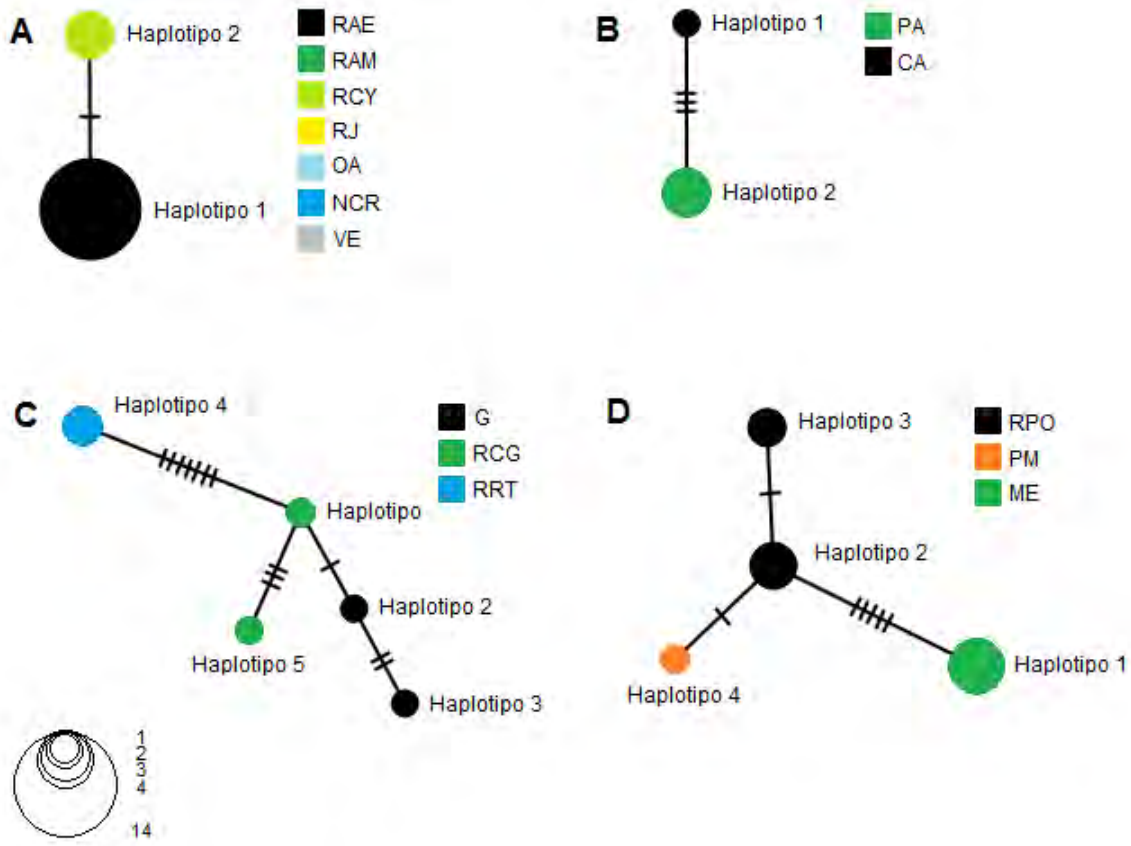


Fig. 7

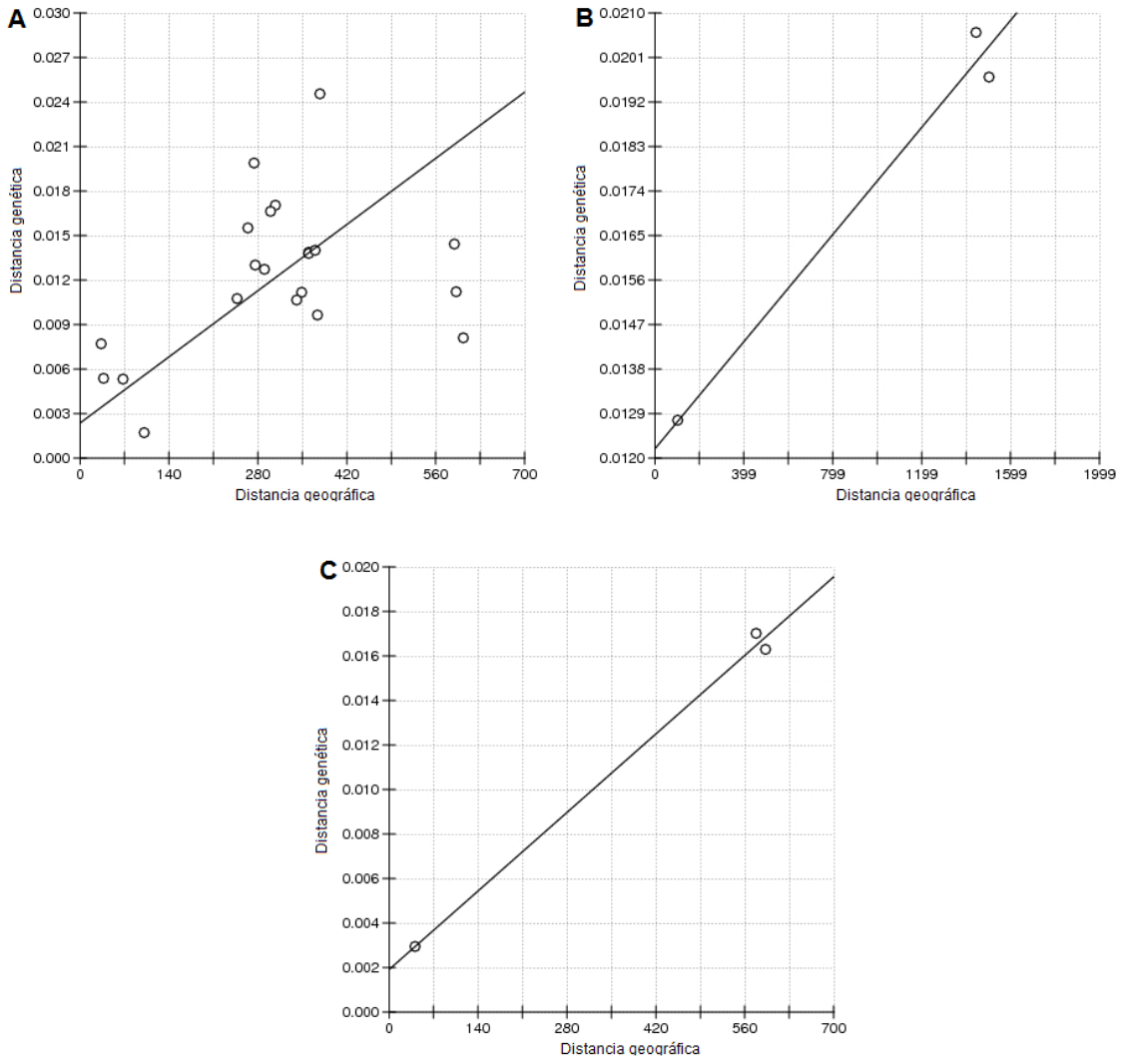


Fig. 8

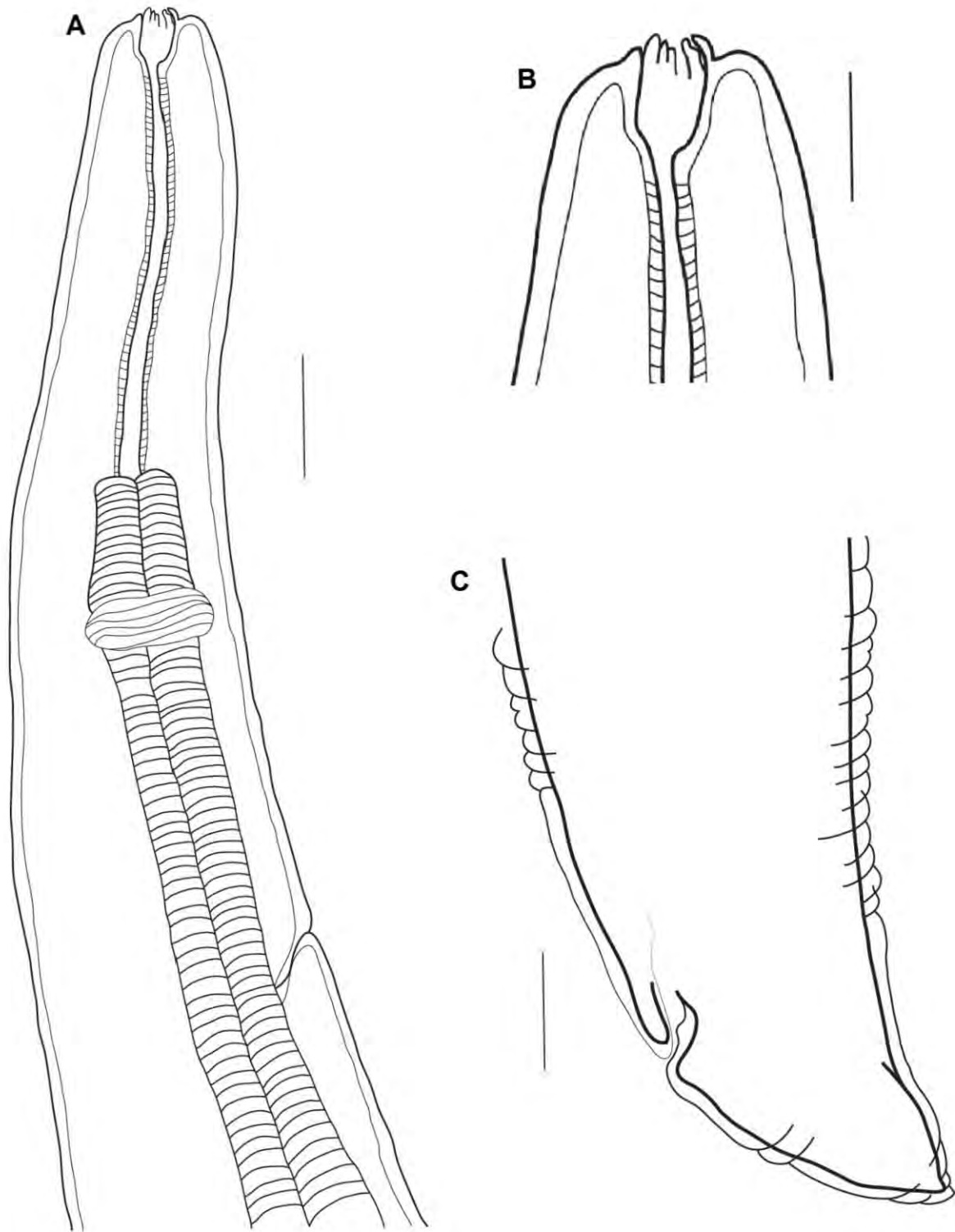


Fig. 9

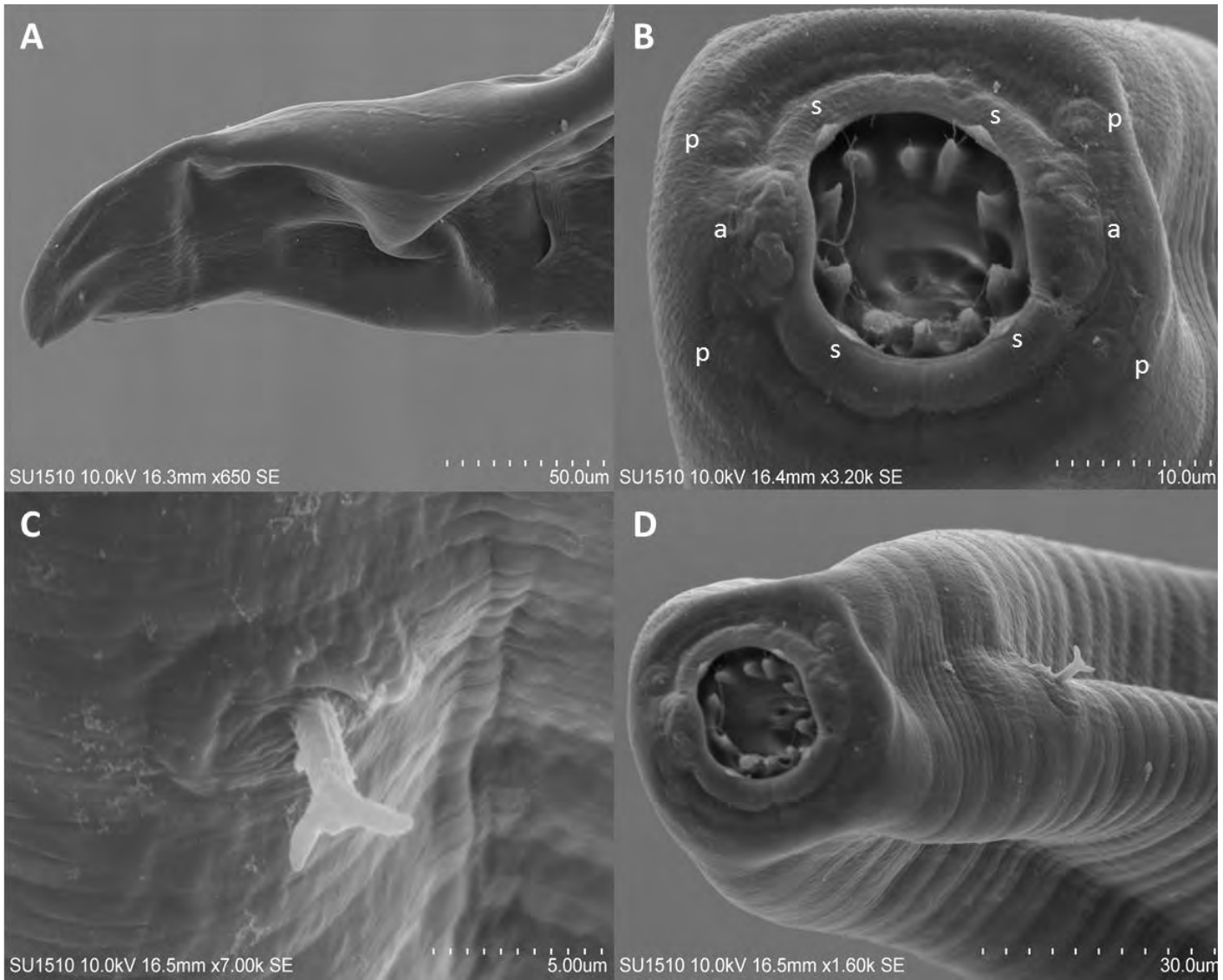


Fig. 10

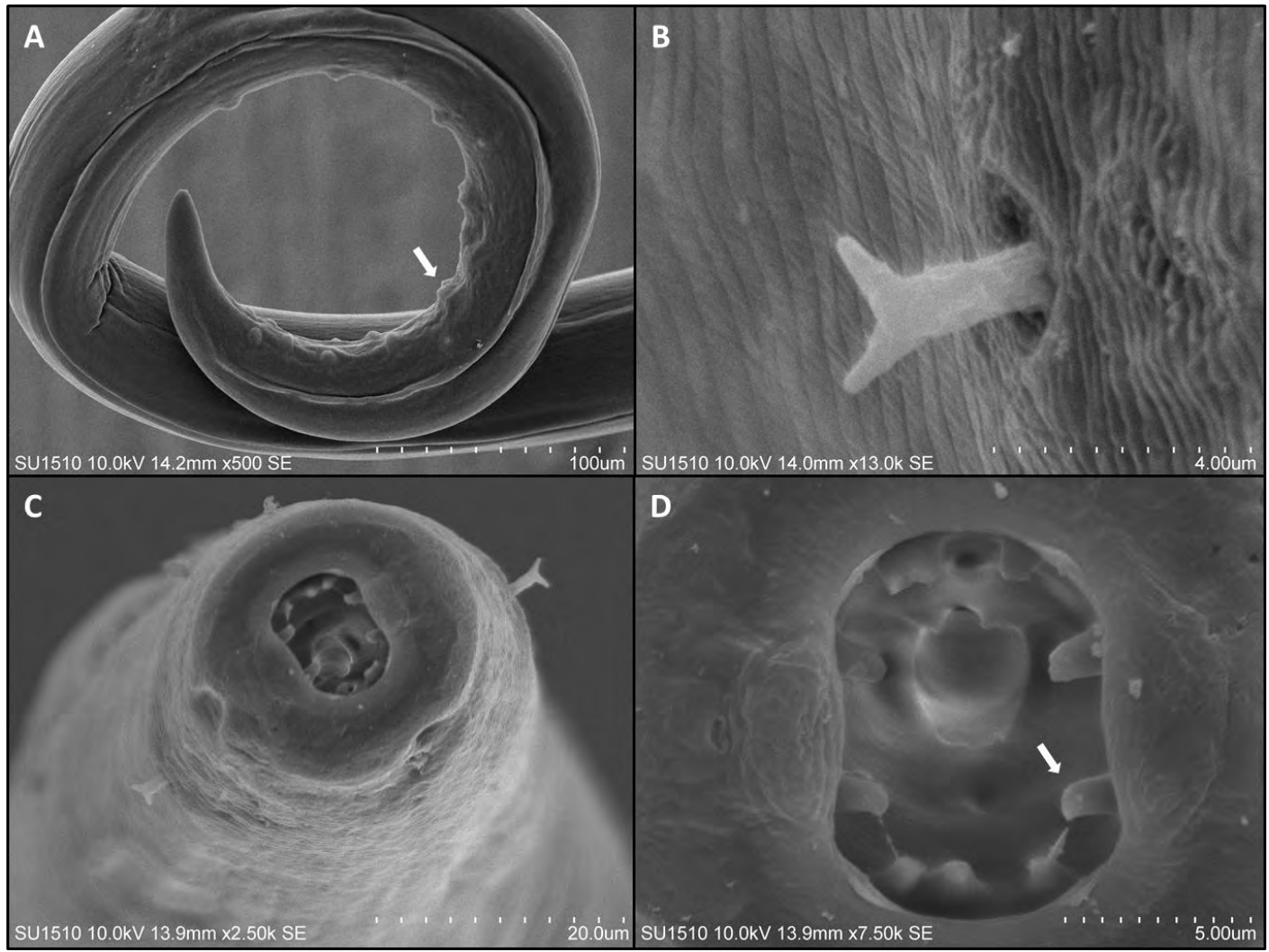


Fig. 11

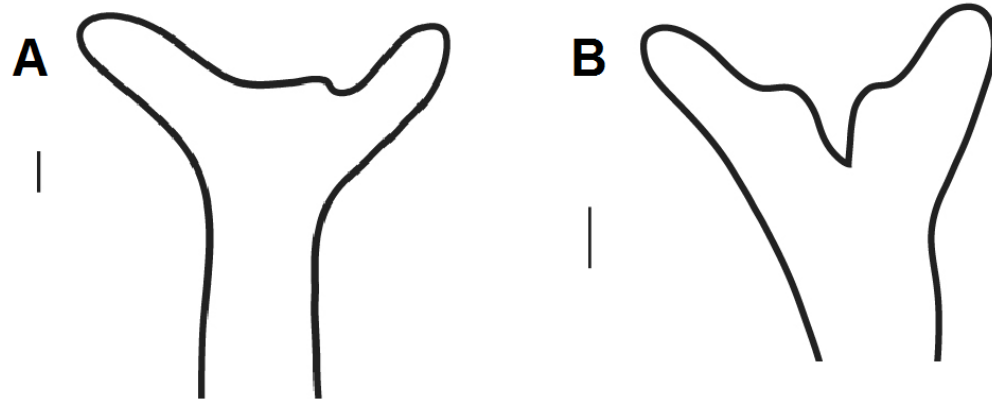


Fig. 12

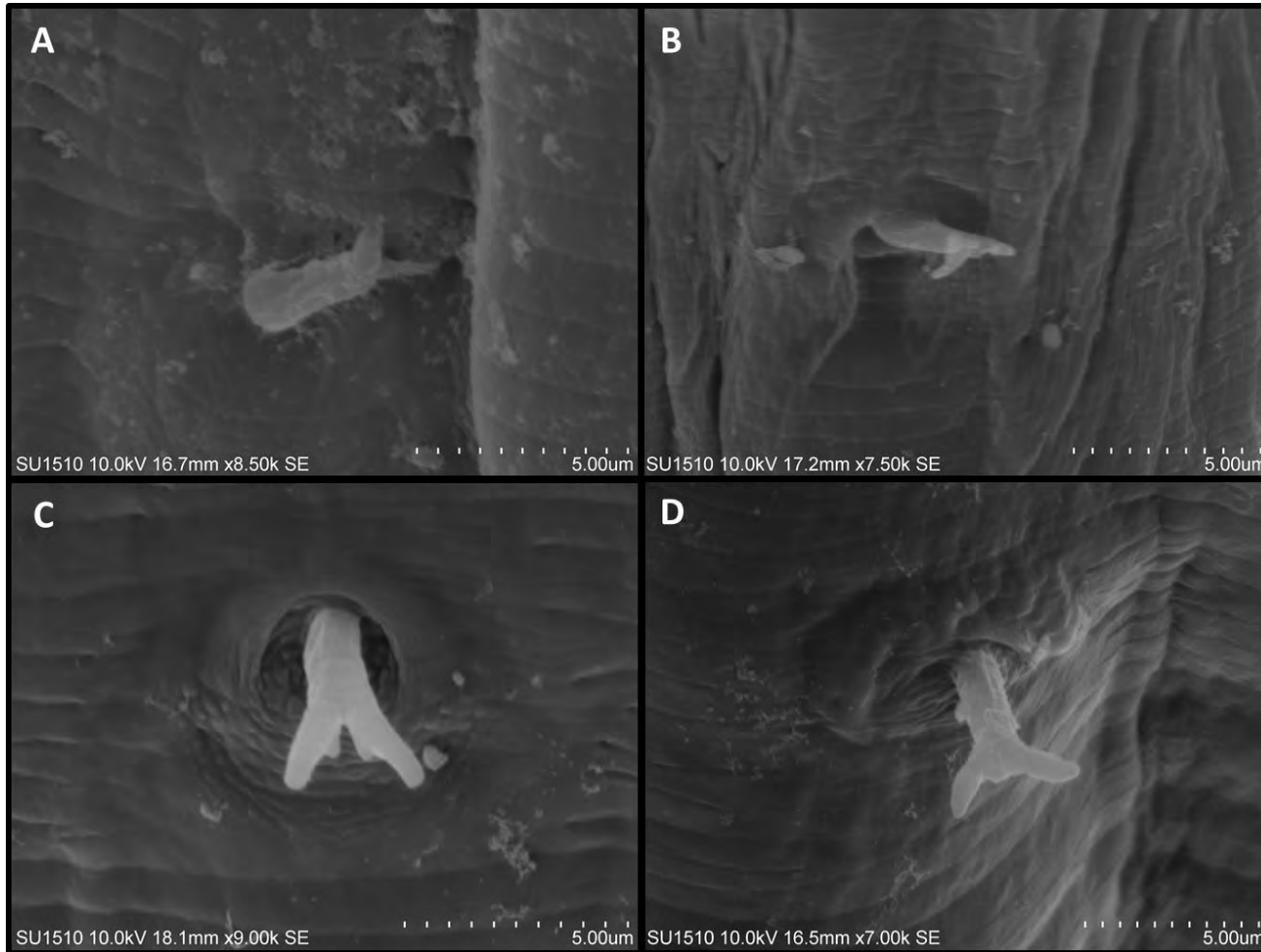


Fig. 13

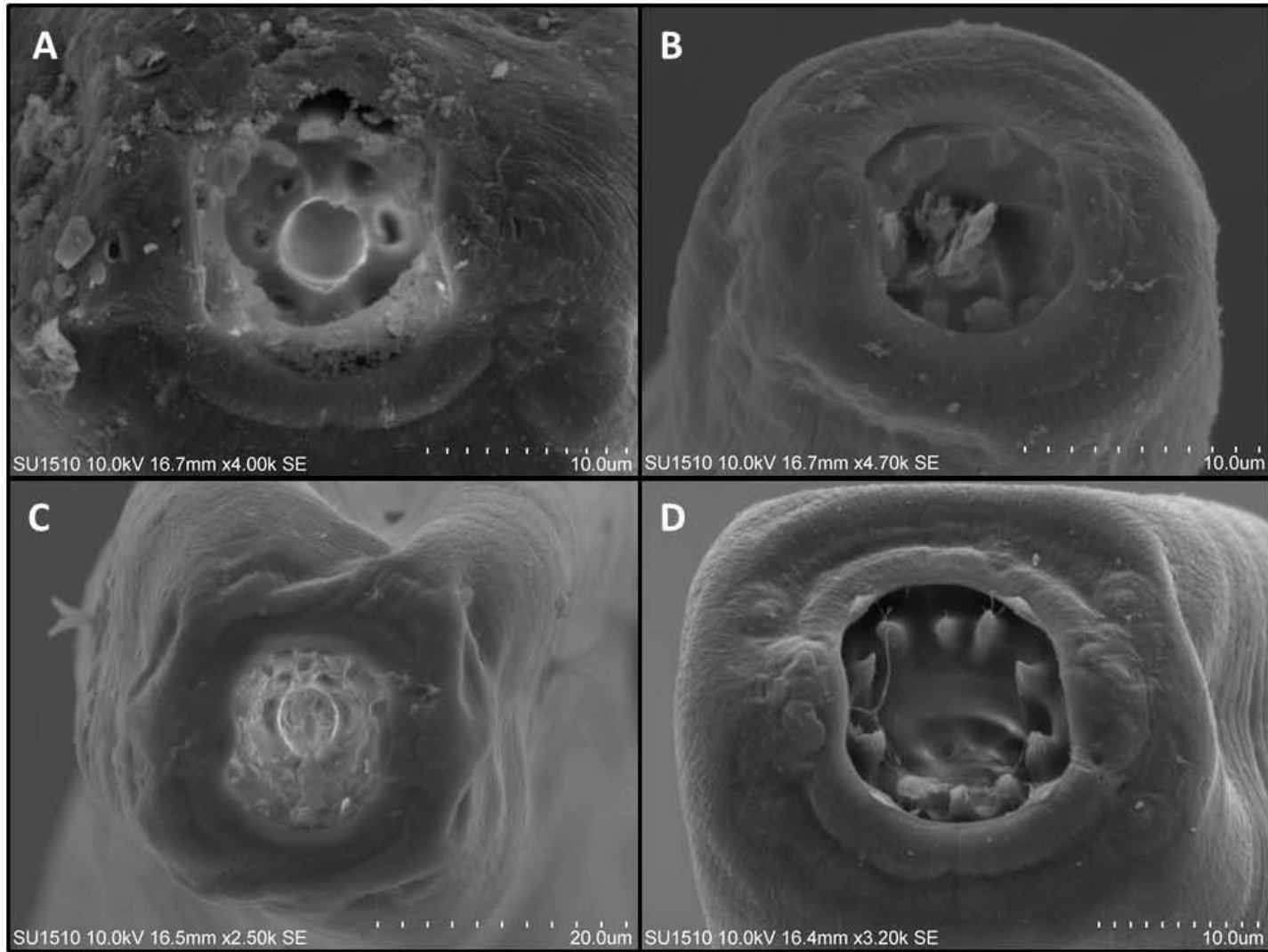


Fig. 14

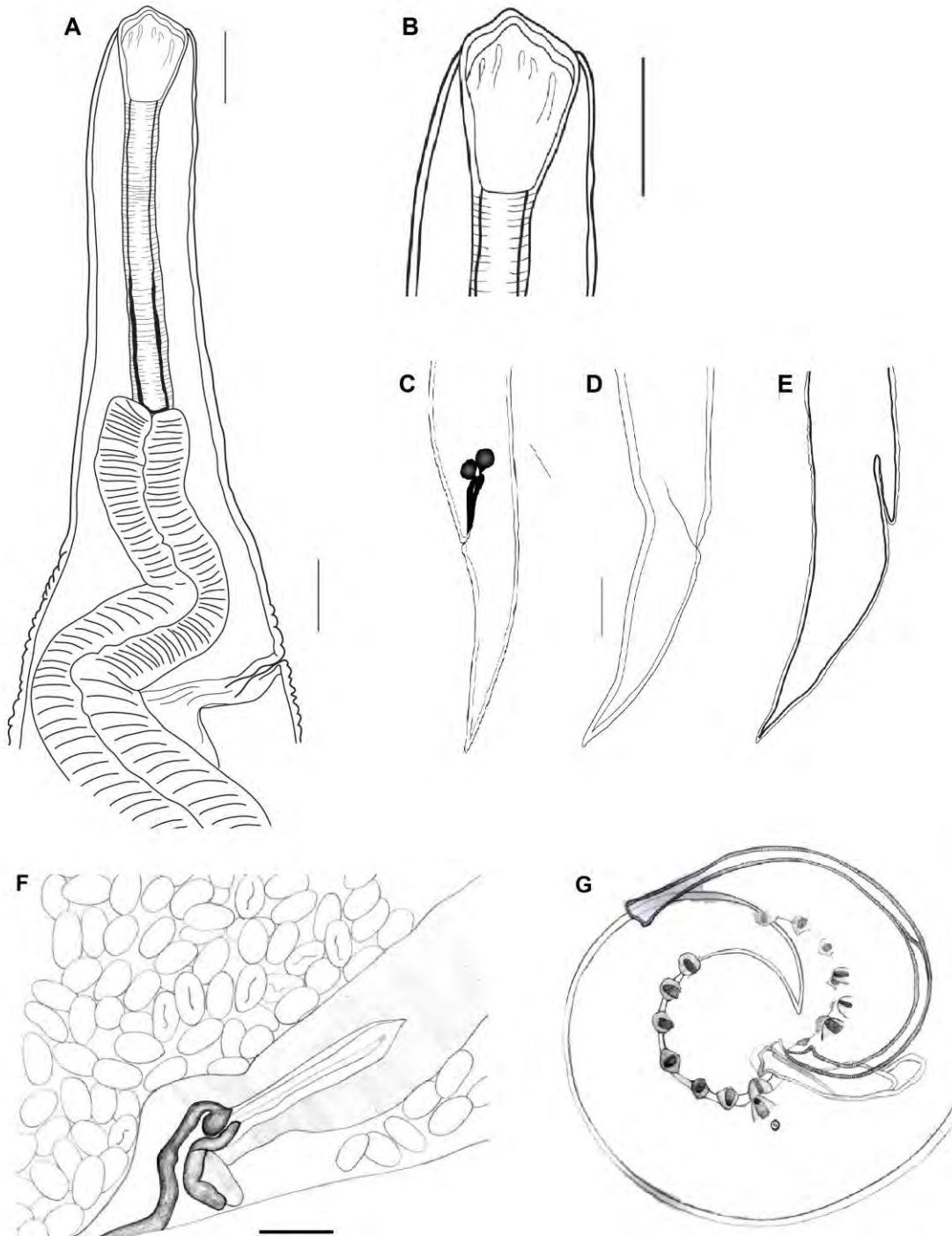


Fig. 15

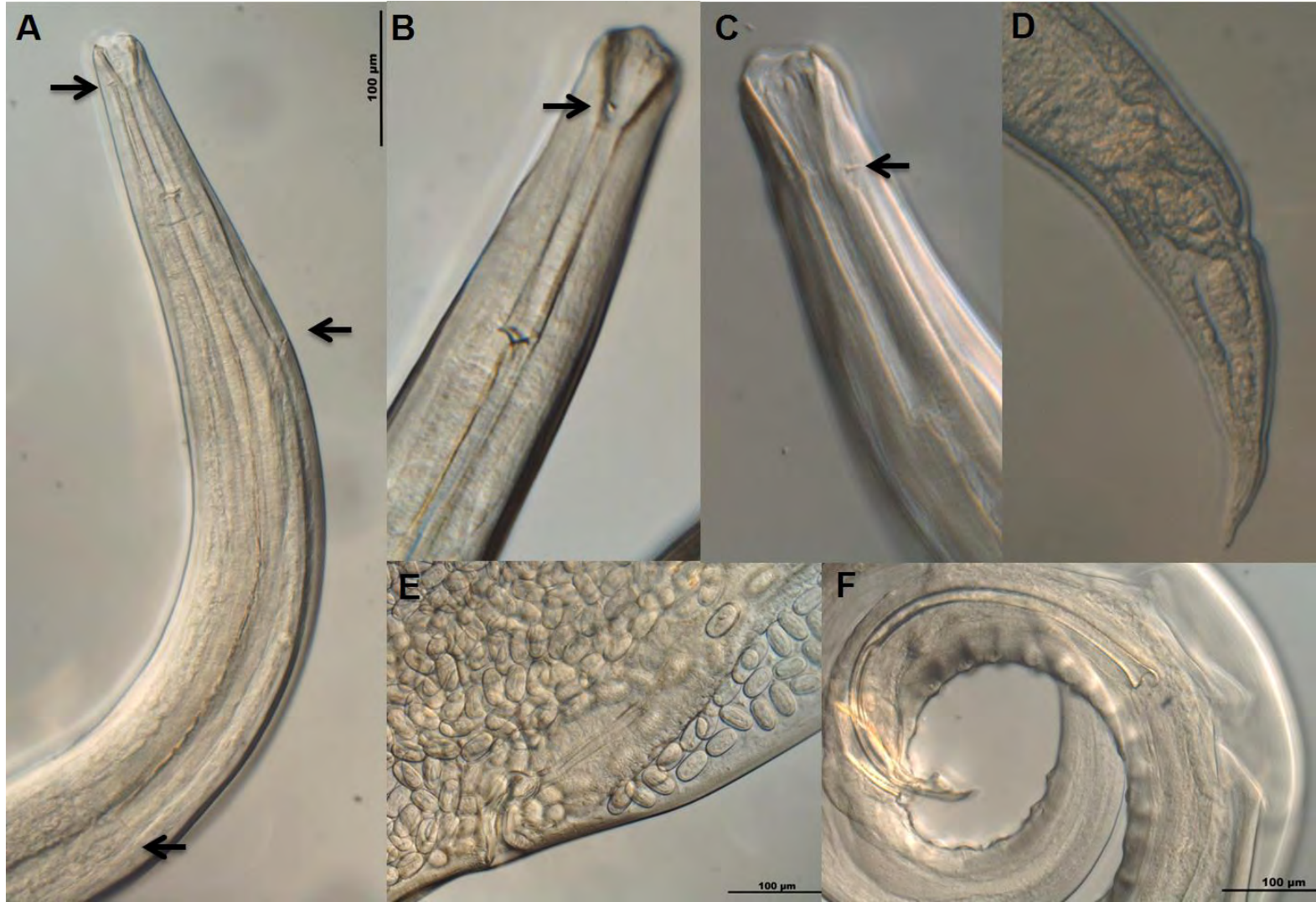


Fig. 16

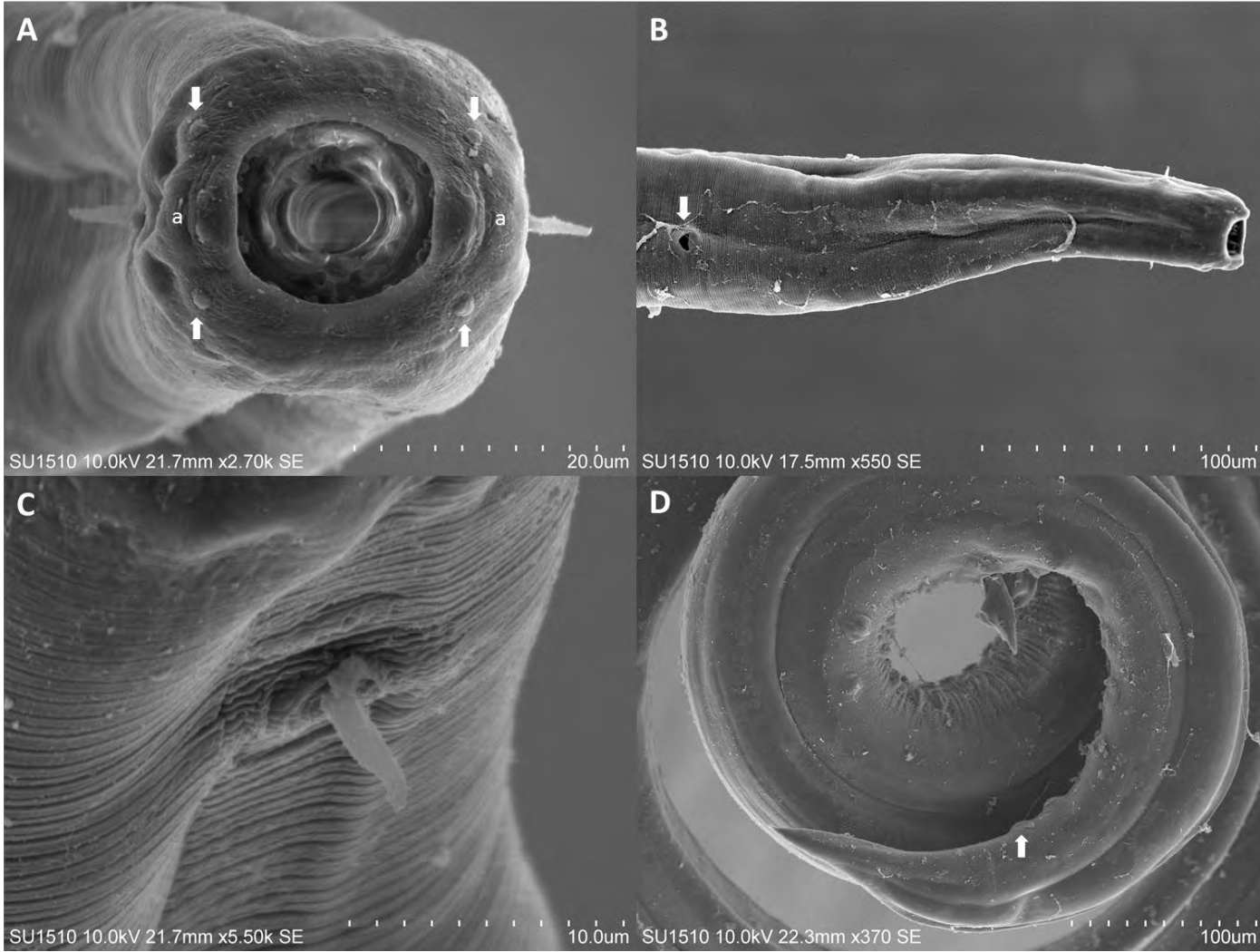


Fig. 17

Leyendas de las figuras

Figura 1. Localidades de muestreo de *Rhabdochona* en hospederos de *Astyanax mexicanus* y *A. aeneus*. El número de cada localidad corresponde con los números de la [Tabla 1](#).

Figura 2. Análisis de inferencia bayesiana utilizando el marcador mitocondrial Cox1. Se muestran las probabilidades posteriores y valores de bootstrap. Los linajes se establecieron con base en los datos del árbol concatenado.

Figura 3. Análisis de Inferencia Bayesiana utilizando el marcador 28S rDNA. En los nodos se muestran las probabilidades posteriores.

Figura 4. Análisis de Inferencia Bayesiana utilizando el marcador 18S rDNA. En los nodos se muestran los valores de las probabilidades posteriores.

Figura 5. Reconstrucción filogenética mediante Inferencia Bayesiana utilizando una matriz concatenada de los marcadores mitocondriales y nucleares (Cox1+ 28S rDNA + 18S rDNA). En los nodos se muestran los valores de probabilidad posterior y valores de bootstrap obtenidos en el análisis de Máxima Verosimilitud.

Figura 6. Congruencia entre los árboles de Inferencia Bayesiana utilizando secuencias mitocondriales y nucleares que muestran cuatro linajes distintos en *Rhabdochona-Astyanax*, y que son señalados con las cajas grandes de diferentes colores. El árbol a la izquierda muestra la reconstrucción filogenética mediante utilizando datos mitocondriales de Cox1 y el árbol de la derecha corresponde a la matriz concatenada de los marcadores nucleares (28S + 18S rDNA). En los nodos se muestran los valores de probabilidad posterior.

Figura 7. Redes de haplotipos de los linajes del complejo *Rhabdochona-Astyanax*. Cada haplotipo está numerado de acuerdo a la [Tabla 6](#). Las líneas transversales representan el número de cambios en pares de bases entre haplotipos. El tamaño y color de los círculos corresponde al número de individuos y la población a la que pertenecen, respectivamente. A) *R. mexicana*, B) *Rhabdochona* Linaje I, C) *Rhabdochona* Linaje II y C) *Rhabdochona* Linaje III.

Figura 8. Aislamiento por distancia. A) *R. mexicana*, B) *Rhabdochona* Linaje II, C) *Rhabdochona* Linaje III.

Figura 9. *Rhabdochona mexicana* Linaje I. A) y B) Terminación anterior hembra, C) cauda hembra.

Figura 10. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de *Rhabdochona mexicana* Linaje I. A) Región posterior de una hembra, B) Vista apical de la región anterior, la flecha señala una papila cefálica, C) deiridio bifurcado, y D) vista lateral de la región anterior. Abreviaciones: a-anfidio; p-papila cefálica y s-sublabio.

Figura 11. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de *R. mexicana*. A) Región posterior de un macho, la flecha señala las papilas, B) deiridios bifurcados, C) región anterior y D) prostoma armado con 10 dientes, la flecha señala uno de los dientes.

Figura 12. Deiridios bifurcados. A) *Rhabdochona* Linaje II y B) *Rhabdochona mexicana*.

Figura 13. Microfotografías con microscopía electrónica de barrido de los deiridios bifurcados en representantes del complejo *Rhabdochona-Astyanax*. A) *R. mexicana* de *A. aeneus* de una en Veracruz, B) *R. mexicana* de

A. mexicanus de la localidad tipo en el Río Estórax, Querétaro, C) *R. mexicana* parásito de *A. mexicanus*, en Oaxaca, y D) *Rhabdochona* Linaje I.

Figura 14. Vista apical de las especies crípticas del complejo *Rhabdochona-Astyanax*. A), B) y C) *Rhabdochona mexicana* y D) *Rhabdochona* Linaje I.

Figura 15. *Rhabdochona* Linaje III. A) Vista lateral de la región anterior en una hembra, B) terminación cefálica en vista lateral, C), D) y E) variación morfológica de la terminación posterior en hembras, de las localidades ME, PM, RPO, respectivamente, F) vulva y G) región posterior macho.

Figura 16. Microfotografías Nomarski de *Rhabdochona* Linaje III. A) Región anterior del holotipo, las flechas señalan la posición del deiridio, el poro excretor y la división entre el esófago muscular, y glandular, desde la región anterior, respectivamente, B) y C) variación morfológica de la región anterior, las flechas señalan los deiridios, D) terminación posterior de una hembra, E) vulva y F) región posterior macho.

Figura 17. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de *Rhabdochona* Linaje III. A) Vista apical de una hembra, B) vista lateral, la flecha indica la posición del poro excretor, C) deiridio simple, y D) Región caudal de un macho, la flecha indica el último par de papilas postcloacales.

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados generados en el presente estudio nos permitieron reconocer que *Procamallanus neocaballeroi* y *Rhabdochona mexicana*, que parasitan a *Astyanax* en el área geográfica comprendida en Mesoamérica, están formadas por múltiples linajes que no difieren morfológicamente y por tanto se decidió mantenerlas como especies crípticas. La excepción ocurre en uno de los linajes de *Rhabdochona*, el Linaje III, que presenta características morfológicas conspicuas que lo separan del resto del complejo *Rhabdochona-Astyanax* y que fueron observadas una vez que la divergencia genética demostró que podían representar unidades evolutivas independientes. Esta especie será descrita en otro trabajo.

El complejo de especies de *Rhabdochona-Astyanax* forman un grupo monofilético, independientemente de que el *Rhabdochona* Linaje III se asemeje más a la especie hermana de todo el complejo, *R. acuminata*, que es parásito de otros carácidos principalmente, en particular de *Brycon* spp. Los patrones de diversificación en *Rhabdochona-Astyanax* están estrechamente ligados a la historia evolutiva de sus hospederos. Lo anterior corrobora la idea de que *Rhabdochona* es un género diverso y reconocido por su alta especificidad hospedatoria a nivel de familia. Es de esperar que las relaciones filogenéticas dentro del género estén dictadas primordialmente por las de sus hospederos, es decir, especies de hospederos más cercanos evolutivamente tendrán especies de *Rhabdochona* relacionadas. En *Procamallanus-Astyanax* se presenta un patrón similar, con un complejo de tres especies que conforman un grupo monofilético exclusivo de *Astyanax*. Es posible que la adición de otras especies de *Procamallanus* que parasitan a *Astyanax* y a otros carácidos del Neotrópico, que incluso son más similares morfológicamente (Gallas *et al.*, 2015), permita evidenciar un patrón de diversificación de *Procamallanus* dentro de *Astyanax*.

La historia de dos especies de nematodos de los géneros *Procamallanus* y *Rhabdochona* que parasitan a especies del género *Astyanax*, representa un

escenario de especiación reciente donde ambos grupos de parásitos parecen haber diversificado en asociación con *Astyanax*, es decir, la historia evolutiva de los parásitos está ligada estrechamente a la del hospedero definitivo (Criscione *et al.*, 2005), hacia quienes exhiben una alta especificidad hospedatoria y congruencia geográfica (Poulin *et al.*, 2011), es decir, parasitan a un linaje de hospederos cercanamente relacionados que incluye especies hermanas (forman un grupo monofilético en Norte América y la parte alta de Centro América) (Ornelas-García *et al.*, 2008), e incluye linajes que utilizan al mismo hospedero en todos los sitios, o que infectan como máximo a dos especies de hospederos. La especificidad hospedatoria puede evolucionar rápidamente en nematodos cuando sólo un hospedero está disponible (Jaenike, 1993), pero no refleja si los parásitos efectivamente perdieron la habilidad de infectar a otros hospederos. La teoría sugiere que la especialización hospedatoria de un parásito lo puede conducir a la extinción (Day *et al.*, 2016), y pocos estudios sustentan una idea opuesta (Mendlova & Šimková, 2014). Muchos factores pueden moldear la evolución de la especificidad hospedatoria: el ciclo de vida del parásito, tamaño del hospedero e incluso la longevidad del mismo (Walker *et al.*, 2017).

Se ha postulado para ambos parásitos un origen totalmente opuesto, *Procamallanus* de origen Neotropical (Chabaud & Bain, 1994) y *Rhabdochona* de origen Neártico (Moravec, 2010). Sin embargo, en *Rhabdochona* nuestros resultados no coinciden claramente con un origen Neártico, lo cual puede deberse a distintas explicaciones, una de ellas que el género *Rhabdochona* estaba en Mesoamérica antes de la llegada de los carácidos, y diversificó dentro de *Astyanax* cuando estos colonizaron Sudamérica. En *Procamallanus* la reconstrucción filogenética muestra claramente un origen Neotropical, que sumado a la abundancia de especies del género en territorios al sur (De Oliveira, *et al.*, 1991; Moravec *et al.*, 2004) y las relativamente pocas especies descritas al norte (Moravec *et al.*, 2000; González-Solís *et al.*, 2002), sugieren un origen Neotropical. A su vez *Procamallanus*, es un grupo parafilético, pero la adición de más especies de *Procamallanus* sobre todo aquellas reportadas en *Astyanax* de Sudamérica

(Kohn *et al.*, 1989; Acosta *et al.*, 2015) podría resultar en la formación de un grupo monofilético de parásitos de carácidos, dada la importante diversificación de especies que han dado lugar a la fauna núcleo de *Astyanax* en todo América (Choudhury *et al.*, 2017).

Se sabe que *Astyanax* colonizó Mesomamérica a partir de Sudamérica, tras el cierre del Istmo de Panamá (Ornelas-García *et al.*, 2008), trayendo consigo parásitos del sur, dando como resultado la diversificación de ambos grupos de nematodos, ya que los patrones de colonización de estos parecen estar determinados por el hospedero y su distribución geográfica. Esto se ha visto en otros helmintos específicos de *Astyanax*, por ejemplo, en el tremátodo *Wallinia mexicana* se ha sugerido que el aislamiento de su hospedero, *A. mexicanus*, en la región norte de México ha mediado su diversificación (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015).

El género *Astyanax* no solamente ha diversificado ampliamente en diferentes linajes genéticos (Ornelas-García *et al.*, 2008), sino que parece que también ha contribuido a la diversificación de sus parásitos. Esto mediado quizá por factores de competencia o aislamiento en conjunto, es decir, eventos de alopatria que han producido diversidad en tan sólo dos especies de nematodos en tres especies de hospederos. *Astyanax* mantiene una enorme riqueza de parásitos con diversas formas de vida, que en conjunto podrían revelar el efecto del hospedero en los procesos de diversificación, sobre todo si estos están más ligados a su hospedero, como se ha visto en *Procamallanus* y *Rhabdochona*, siendo más predominantes en los procesos de diversificación que las características de sus helmintos. Por ejemplo, se podría esperar que hubiera comunidades de parásitos de *A. mexicanus* en la región norte de su distribución, separadas de poblaciones al sur. En conjunto con evidencia de parásitos con ciclo de vida directo, donde la diversificación esperada es más alta que la de su hospedero (ej. Light & Hafner, 2007) y que ciertos estudios muestran patrones de co-especiación más evidentes (ej. Vanhove *et al.*, 2015), podrían dar más robustez a esta hipótesis.

En ambos complejos de especies, los nematodos que parasitan a *A. aeneus* se encuentran en la parte basal de los árboles filogenéticos, lo que podría coincidir con aislamiento geográfico o algún evento geológico que actuó como barrera. Esto subraya el potencial de los estudios comparativos entre dos especies con un patrón de distribución similar y hospedero-específicas, para contrastar de manera más precisa la historia evolutiva de estos nematodos con la de sus hospederos.

En ambos géneros de parásitos, pese al muestreo extensivo de poblaciones de *Astyanax* desde Centroamérica que realizamos, se infiere que no han „seguido“ a su hospedero en toda su área de distribución, siendo variables ambientales o la distribución diferencial del hospedero intermediario aquellas que explican su ausencia. Cabe destacar que variaciones estacionales en las prevalencias de los parásitos también pueden afectar su representatividad en el muestreo y sesgar las inferencias planteadas.

Existen poblaciones cercanas a las cuevas donde *Rhabdochona* en *Astyanax* ha sido encontrado (Santacruz, 2013); sin embargo, sólo *Procamallanus* ha sido capaz de invadir las cuevas, posiblemente junto con su hospedero, pero en eventos relativamente recientes, pues conforma un grupo monofilético con poblaciones de superficie cercanas a las cuevas, aún en *Astyanax* de cueva de linajes distintos.

De las dos especies con las que se trabajó en este estudio inicialmente, solo una de ellas, *P. neocaballeroi*, incluyó poblaciones que fueron recolectadas de *Astyanax mexicanus* habitantes de cuevas, particularmente en Cueva Chica y Cueva Sabinos. Consideramos que el habitat en este caso podría representar una barrera ecológica que hubiera generado un mecanismo de diversificación y que era posible que estas poblaciones representaran un linaje y por consiguiente una especie que está asociada con *A. mexicanus* en localidades de superficie. Sin embargo, nuestros resultados arrojan que las poblaciones de cueva y superficie representan la misma especie, tal y como pasa con la especie de hospedero, *A.*

mexicanus, que a pesar de tener rasgos morfológicos diferentes como la ausencia de ojos en las poblaciones de cuevas (Jeffery, 2001; Gross *et al.*, 2016), representan la misma especie y los rasgos son considerados adaptaciones a esa forma de vida en la oscuridad.

La presencia de *Procamallanus* Linaje I en el pez de cueva y la monofilia recíproca que conforma con poblaciones en hospederos de superficie permite proponer varias hipótesis: 1) El Linaje I de *Procamallanus* estaba presente en *Astyanax* desde antes que éste colonizara las cuevas. Esta propuesta tiene consistencia si se asume que las poblaciones están efectivamente aisladas, y si el tiempo de separación es reciente y no ha sido el suficiente para generar un proceso de especiación del parásito, ya que ambas cuevas corresponden a linajes distintos de hospederos (Dowling *et al.*, 2002; Ornelas-García *et al.*, 2008; Strecker *et al.*, 2012). Esto concuerda con un origen en común de la especie de hospedero derivado de un ancestro que habitaba la superficie y colonizó las dos cuevas donde se ha registrado el Linaje I de *Procamallanus* (Bradic *et al.*, 2012). Autores como Hausdorf *et al.*, (2011), proponen una hipótesis diferente, donde los individuos de Cueva Chica llegaron a partir de un grupo de peces distinto del que llegó a Cueva Sabinos. Bradic *et al.*, (2012) también menciona que las poblaciones de *A. mexicanus* de cada una de estas cuevas difieren más entre sí de lo que difieren de sus contrapartes de superficie, quizá debido a un fenómeno de cuello de botella. Por su parte, las poblaciones de *Procamallanus* se vieron menos afectadas por estos eventos microevolutivos y por lo tanto no han experimentado un proceso de diversificación. 2) En una segunda hipótesis, se postula que efectivamente ha habido flujo génico entre las poblaciones de hospederos de cueva y superficie posterior a la colonización de las cuevas (Bradic *et al.*, 2012) y junto con este intercambio ha habido flujo génico de las poblaciones de *Procamallanus* Linaje I, por lo cual representan un mismo linaje genético. Los estudios en peces indican que tanto en Cueva Sabinos como en Cueva Chica se ha reportado poco o nulo flujo génico con *Astyanax* de superficie (Strecker *et al.*, 2012), pero es probable que éste sea suficiente para los parásitos, pues sus

tamaños poblacionales podrían ser mayores que los de su hospedero y suficientes para mantener la variación genética (Criscione & Blouin, 2005; Huyse *et al.*, 2005). Cabe resaltar que si bien este estudio no tuvo un enfoque ecológico, las prevalencias de *Procamallanus* Linaje I aparentemente son mayores en los peces de cueva que aquellos en superficie. La presencia de otros parásitos en los peces de cueva (p. ej. monogeneos, Santacruz datos no publicados) podría ayudar a esclarecer el patrón evolutivo en *Procamallanus* Linaje I, aunque es el único parásito con ciclo de vida indirecto registrado dentro de las cuevas (Santacruz, 2013).

La presencia de *Procamallanus* Linaje I en las cuevas permite inferir que las cuevas no sólo fueron invadidas por *Astyanax*, sino también organismos capaces de fungir como hospederos intermediarios de nematodos con ciclo de vida indirecto y que los estadios de vida libre de *Procamallanus* han podido adaptarse y sobrevivir en las condiciones ambientales de las cuevas. Las cuevas son consideradas como ambientes extremos donde es difícil sobrevivir y por lo tanto presentan una baja diversidad de especies, y aquellas que han logrado sobrevivir han desarrollado múltiples adaptaciones para la vida en las cuevas (ej. Jeffery, 2001; Liu *et al.*, 2017). *Procamallanus* Linaje I parecería haber „encontrado“ mejores condiciones si efectivamente las prevalencias son más altas y se ha mantenido por tanto tiempo tras el aislamiento de su hospedero. Sin embargo, en cuevas el estudio de helmintos es escaso (Castle *et al.*, 1987; Santacruz, 2013) y tiene como principal limitante el hecho de que las poblaciones de hospederos tienen muy baja abundancia y no es posible tener tamaños de muestra lo suficientemente altos como para hacer comparaciones que den mayor sustento a los datos.

El trabajo que aquí presentamos constituye un claro ejemplo de la existencia de especies de parásitos con especificidad hospedatoria, donde caracteres morfológicos, al menos aquellos empleados tradicionalmente como diagnósticos entre especies, han permanecido en estasis y prácticamente no han cambiado, o

lo han hecho muy poco. Es probable que la similitud fenotípica resulte de nuestra incapacidad, por el momento, de observar cambios entre los linajes (Pérez-Ponce de León & Nadler, 2010), o bien, puede reflejar una especiación reciente (Poulin & Pérez-Ponce de León, 2017) con una huella genética aparente, pero no aún fenéticamente. Asimismo, es posible que las diferencias se presenten en otros rasgos, como aquellos conductuales, ecológicos, etc. (De Meester *et al.*, 2015, 2016; Derycke *et al.*, 2016). Esto claramente se contrapone a la visión clásica donde se espera que un evento de especiación sea acompañado de un cambio morfológico (*ver Raboski et al.*, 2013). En parásitos y sobre todo aquellos con ciclo de vida complejos, es difícil demostrar un aislamiento reproductivo completo, pero la monofilia recíproca, un patrón geográfico y hospedatorio distinto, la estructuración genética de sus poblaciones, así como divergencias genéticas por encima del umbral para especies distintas (Blouin, 2002) son argumentos que corroboran el planteamiento de la existencia de complejos de especies crípticas.

Por otro lado, estudios más detallados de la morfología de las especies crípticas propuestas, en donde se añada un mayor número de ejemplares y se busquen caracteres de diversa índole, quizás a través de análisis ultraestructurales con microscopía electrónica de barrido o confocal, por ejemplo, quizá permitirán encontrar diferencias morfológicas. Además, incrementar el esfuerzo de muestreo al incorporar otras localidades donde se han registrado tanto *Rhabdochona* como *Procamallanus* en *Astyanax* a lo largo de su distribución en Mesoamérica, pero no están representadas en este estudio, será de gran ayuda para comprender la biogeografía histórica derivada de las interpretaciones filogenéticas.

La historia de *Procamallanus* spp. y *Rhabdochona* spp. en *Astyanax* analizada en conjunto será aún más evidente cuando la propia historia de su hospedero llegue a un mayor consenso y esclarecimiento (Gross, 2015) y se defina con exactitud el número de linajes genéticos (especies) que constituyen lo que en la actualidad se reconoce como *A. mexicanus* y *A. aeneus*.

El género *Astyanax* resulta entonces un buen modelo de estudio sobre las interacciones hospedero-parásito, como ocurre con otras especies de peces (Barber, 2013; Vanhove *et al.*, 2016) que también exhiben paralelismos evolutivos. Pero *Astyanax* ofrece un modelo de estudio en ambientes contrastantes (cuevas), en el que ciclos de vida complejos se han mantenido.

La tendencia actual avanza hacia una taxonomía integrativa (Dayrat, 2005), particularmente cuando la taxonomía clásica con base en el diagnóstico morfológico es insuficiente para resolver conflictos taxonómicos o reconocer especies crípticas. Una taxonomía integrativa está constituida por herramientas de la taxonomía alfae incorpora otras aproximaciones metodológicas que incluyen morfometría, información molecular y análisis de delimitación de especies con el uso de coalescencia, entre muchos otros que ya han sido empleados en nematodos (Silva *et al.*, 2012; Hando *et al.*, 2014). El uso de aproximaciones moleculares en dos especies de nematodos parasitando tres especies de hospederos, y dando lugar a seis linajes más, esboza un escenario donde el número de especies de helmintos para esta región que incluye la zona de transición del componente Neártico y Neotropical puede incrementar exponencialmente.

CONCLUSIONES

- *Rhabdochona mexicana* y *Procamallanus neocaballeroi* están formados por múltiples linajes de parásitos asociados a peces del género *Astyanax*, definidos con base a monofilia recíproca, divergencia genética y patrón hospedatorio.
- El complejo *Procamallanus-Astyanax* está constituido por tres linajes; *P. neocaballeroi* parásito de *A. aeneus* y *A. caballeroi*, *Procamallanus* Linaje I específico de *A. mexicanus* de cueva y superficie, y *Procamallanus* Linaje II parásito de *A. aeneus*.
- Los nematodos parásitos de peces de cueva y superficie forman un linaje, *Procamallanus* Linaje I.
- El complejo de *Rhabdochona-Astyanax* está conformado por cuatro linajes: *R. mexicana*, dos linajes de especies crípticas y un tercer linaje que se detalla morfológicamente.
- Las especies de *Procamallanus* y *Rhabdochona* tienen una estricta especificidad hospedatoria hacia especies de *Astyanax* spp., más alta que la reportada previamente.
- Se necesita mayor número de ejemplares de nematodos para identificar si existen diferencias morfológicas que separen a los linajes propuestos para ambos complejos de especies crípticas.

LITERATURA CITADA

- Adams, B. J. (1998). Species concepts and the evolutionary paradigm in modern nematology. *Journal of nematology*, 30, 1.
- Acosta, A. A., Queiroz, J., Brandão, H. & Silva, R. J. D. (2015). Helminth fauna of *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819, in two distinct sites of the Taquari River, São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75, 242-250.
- Anderson, R.C. (2000). Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission, second ed. CABI Publishing, Wallingford, Oxon.
- Arbogast, B. S. & Kenagy, G. J. (2001). Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28, 819-825.
- Archidona-Yuste, A., Navas-Cortés, J. A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Palomares-Rius, J. E., & Castillo, P. (2016). Cryptic diversity and species delimitation in the *Xiphinema americanum*-group complex (Nematoda: Longidoridae) as inferred from morphometrics and molecular markers. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 176, 231-265.
- Aspiras, A. C., Rohner, N., Martineau, B., Borowsky, R. L. & Tabin, C. J. (2015). Melanocortin 4 receptor mutations contribute to the adaptation of cavefish to nutrient-poor conditions. *Proceedings of the national academy of sciences*, 112, 9668-9673.
- Avise, J.C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA.
- Avise, J. C. (2004). Molecular markers, natural history and evolution. Springer Science & Business Media.
- Bandelt, H., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Barber, I. (2013). Sticklebacks as model hosts in ecological and evolutionary parasitology. *Trends in parasitology*, 29, 556-566.
- Barrett, R. D., & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in ecology & evolution*, 23, 38-44.

Baylis HA. (1923). Report on a collection of parasitic nematodes mainly from Egypt. Part I. Ascaridae and Heterakidae. Part II. Oxyuridae Part III. Camallanidae etc., with a note on prostmayria and an appendix on Acanthocephala. *Parasitology*, 15.

Bessho, Y., Ohama, T., & Osawa, S. (1992). Planarian mitochondria II. The unique genetic code as deduced from cytochrome c oxidase subunit I gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 34, 331-335.

Beale, A., Guibal, C., Tamai, T. K., Klotz, L., Cowen, S., Peyric, E., Reynoso, V. H., Yamamoto, Y., & Whitmore, D. (2013). Circadian rhythms in Mexican blind cavefish *Astyanax mexicanus* in the lab and in the field. *Nature communications*, 4.

Beveridge, I., & Spratt, D. M. (2015). Biodiversity and parasites of wildlife: helminths of Australasian marsupials. *Trends in parasitology*, 31, 142-148.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winkler K., Ingram, K. K. & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.*; 22, 148–155.

Blasco-Costa, I., & Poulin, R. (2013). Host traits explain the genetic structure of parasites: a meta-analysis. *Parasitology*, 140, 1316-1322.

Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J.T. & Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75.

Blaxter, M. L. (2003). Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. *Advances in Parasitology*, 54, 101-195.

Blaxter M (2011). Nematodes: The Worm and Its Relatives. *PLoS Biol* 9: e1001050.

Blaxter, M., Floyd, R., Dorris, M., Eyualem, A., & De Ley, P. (2004). Utilising the new nematode phylogeny for studies of parasitism and diversity. *Nematology monographs and perspectives* (ed. R. Cook & DJ Hunt), 615-632.

Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142, S26-S39.

- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., & Dame, J.B., (1998). Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1719–27.
- Blouin, M.S. (2002). Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology*, 32, 527-531.
- Bohonak, A.J. (2002). IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity* 93, 153-154.
- Borowsky, R. (2008). *Astyanax mexicanus*, the blind Mexican cave fish: A model for studies in development and morphology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 11, doi:10.1101/pdb.emo107.
- Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F.J., Esquivel-Bobadilla, S., & Borowsky, R. L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC evolutionary biology*, 12, 9.
- Braendle, C., Baer, C.F., & Félix, M.A. (2010). Bias and evolution of the mutationally accessible phenotypic space in a developmental system. *PLoS Genet*, 6, e1000877.
- Bussing, W.A. (2015). Peces de las aguas continentales de Costa Rica. Segunda edición. Editorial Universidad de Costa Rica. 504 pp.
- Butlin, R.K., & Ritchie, M.G. (2009). Genetics of speciation. *Heredity*, 102, 1-3.
- Caballero-Deloya, J. (1977). Estudio Helmintológico de los animales silvestres de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz. Nematoda II. Descripción De *Spirocamallanus neocaballeroi* sp. nov. (Nematoda: Camallanidae), del intestino de *Astyanax fasciatus* (Cuvier). *Excerta Parasitológica*, Instituto De Biología Publicaciones Especiales.
- Caira, J.N. (1994). Parascript: Parasites and the Language of Evolution. *BioScience*, 44, 771-774.
- Cárdenas, M.Q., De Souza, W., & Lanfredi, R.M. (2005). Ultrastructure of *Procamallanus (Spirocamallanus) halitrophus* (Nematoda: Camallanidae) parasite of flounder. *Parasitology research*, 97, 478-485.

- Casiraghi, M., Anderson, T. J. C., Bandi, C., Bazzocchi, C., & Genchi, C. (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, 122, 93-103.
- Caspeta-Mandujano, J. M., Moravec, F., & Salgado-Maldonado, G. (2000). *Rhabdochona mexicana* sp. n. (Nematoda: Rhabdochonidae) from the intestine of characid fishes in Mexico. *Folia Parasitologica*, 47, 211-215.
- Castle, M.D., Strohlein, D.A., & Christensen, B.M. (1987). Helminth parasites of the cave salamander, *Eurycea lucifuga*, from western Kentucky. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 54, 269-270.
- Cernotikova, E., Horak, A., & Moravec, F. (2011). Phylogenetic relationships of some spirurine nematodes (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida: Spirurina) parasitic in fishes inferred from SSU rRNA gene sequences. *Folia parasitologica*, 58, 135.
- Chabaud, A.G., & Bain, O. (1994). The evolutionary expansion of the Spirurida. *International Journal for Parasitology*, 24, 1179-1201.
- Charleston, M.A. & D.L. Robertson. (2002). Preferential host switching by primate lentiviruses can account for phylogenetic similarity with the primate phylogeny. *Syst Biol*, 51, 528-535.
- Chilton, N.B., Huby-Chilton, F., Koehler, A.V., Gasser, R.B., & Beveridge, I. (2016). Detection of cryptic species of *Rugopharynx* (Nematoda: Strongylida) from the stomachs of Australian macropodid marsupials. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5, 124-133.
- Choudhury, A., García-Varela, M. & Pérez-Ponce de León, G. (2017). Parasites of freshwater fishes and the Great American Biotic Interchange: a bridge too far? *Journal of helminthology*, 91, 174-196.
- Colautti, R.I., Ricciardi, A., Grigorovich, I.A., MacIsaac, H.J., 2004. Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecol. Lett.* 7, 721e733.
- Costello, M.J. (2016). Parasite Rates of Discovery, Global Species Richness and Host Specificity. *Integrative and Comparative Biology*, 56, 588-599.
- Coyne, J.A. (1992). Genetics and speciation. *Nature*, 355, 511.

- Coyne, J.A., & Orr, H.A. (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 353, 287-305.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. (2004) Speciation. Sinauer & Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Cremonte, F., Navone, G.T., Gosztonyi, A.E., & Kuba, L. (2002). Redescription of *Rhabdochona (Rhabdochona) acuminata* (Nematoda: Rhabdochonidae) from freshwater fishes from Patagonia (Argentina), the geographical implications. *Journal of Parasitology*, 88, 934-941.
- Criscione, C.D., & Blouin, M.S. (2005). Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *TRENDS in Parasitology*, 21, 212-217.
- Criscione, C.D., Poulin, R. & Blouin, M.S. (2005) Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology*, 14, 2247–2257.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.
- Darwin, C. (1859). On the origin of the species by natural selection.
- Day, E. H., Hua, X., & Bromham, L. (2016). Is specialization an evolutionary dead end? Testing for differences in speciation, extinction and trait transition rates across diverse phylogenies of specialists and generalists. *Journal of evolutionary biology*, 29, 1257-1267.
- De Meester, N., Derycke, S. & Moens, T. (2012). Differences in Time until Dispersal between Cryptic Species of a Marine Nematode Species Complex. *PLoS ONE* 7: e42674.
- De Meester, N., Derycke, S., Rigaux, A. & Moens, T. (2015). Temperature and salinity induce differential responses in life histories of cryptic nematode species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 472, 54-62.
- De Meester, N., Gingold, R., Rigaux, A., Derycke, S., & Moens, T. (2016). Cryptic diversity and ecosystem functioning: a complex tale of differential effects on decomposition. *Oecologia*, 182, 559-571.

- De Oliveira R.H., Magalhães, P.R. & Noronha, D. (1991). Key to the species of Brazilian Procammallanus with general considerations (Nematoda, Camallanoidea). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86.
- De Queiroz K. (1998). The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard DJ, Berlocher SH, editors. *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford, England: Oxford University Press. p 57–75.
- De Queiroz K. (1999). The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. In: Wilson RA, editor. *Species: New Interdisciplinary Essays*. Cambridge, MA: MIT Press. p 49–89.
- De Queiroz, K. (2005). Different species problems and their resolution. *BioEssays*, 27, 1263-1269.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56, 879-886.
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., & Moens, T. (2010). Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS One*, 5, e13716.
- Derycke, S., De Meester, N., Rigaux, A., Creer, S., Bik, H., Thomas, W.K., & Moens, T. (2016). Coexisting cryptic species of the *Litoditis marina* complex (Nematoda) show differential resource use and have distinct microbiomes with high intraspecific variability. *Molecular ecology*, 25, 2093–2110.
- Dey, A., Chan, C. K., Thomas, C. G., & Cutter, A. D. (2013). Molecular hyperdiversity defines populations of the nematode *Caenorhabditis brenneri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 11056-11060.
- Duboué, E.R., Keene, A.C., & Borowsky, R.L. (2011). Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Current biology*, 21, 671-676.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution*, 29, 1969-1973.

- Domínguez-Domínguez, O., & Vázquez-Domínguez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal biodiversity and conservation*, 32, 59-70.
- Domínguez-Domínguez, O., Pedraza-Lara, C., Gurrola-Sánchez, N., Pérez-Rodríguez, R., Israde-Alcántara, I., Garduño-Monroy, V.H., Doadrio, G., Pérez-Ponce de León G. & Brooks, D.R. (2010). Historical biogeography of the Goodeinae (Cyprinodontiforms). *Viviparous Fishes II*. New Life Publications, Homestead, Florida, 33-74.
- Doyle, J.J. (1995). The irrelevance of allele tree topologies for species delimitation, and a non-topological alternative. *Syst. Biol.* 20, 574–588.
- Dowling, T.E., Martasian, D.P. & Jeffery, W.R. (2002). Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Mol Biol Evol*, 19, 446–455.
- Eberhard, S.M., Smith, G.B., Gibian, M.M., Smith, H.M., & Gray, M.R. (2014). Invertebrate cave fauna of Jenolan. In *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 136.
- Eldredge, N., & Cracraft, J. 1980. Phylogenetic patterns and the evolutionary process. New York: Columbia University Press.
- Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J., Launay, J. M., Blin, M., & Rétaux, S. (2014). A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome. *Nature communications*, 5.
- Falk, B.G. & Perkins, S.L. (2013). Host specificity shapes population structure of pinworm parasites in Caribbean reptiles. *Molecular Ecology*, 22, 4576–4590, doi: 10.1111/mec.12410.
- Félix, M.A., Braendle, C., & Cutter, A.D. (2014). A streamlined system for species diagnosis in *Caenorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) with name designations for 15 distinct biological species. *PLoS One*, 9, e94723.
- Ferris, V.R. (1999). Species Concepts Do Matter in Nematology.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology*, 11, 839-850.

Folmer, O., Hoeh, W.R., Black, M.B., & Vrijenhoek, R.C. (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.

Fujita, M.K., Leaché, A.D., Burbrink, F.T., McGuire, J.A., & Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in ecology & evolution*, 27, 480-488.

Fujisawa, T. & Barraclough, T.G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, 62, 707-24. doi: 10.1093/sysbio/syt033.

Galbreath, K.E. & Hoberg, E.P. (2012). Return to Beringia: parasites reveal cryptic biogeographic history of North American pikas. *Proc. R. Soc. B*, 279, 371-378.

Gallas, M., Calegario-Marques, C. & Bencke-Amato, S. (2015). Supplemental observations on the morphology of *Procamallanus (Spirocamallanus) hilarii* (Nematoda: Camallanidae) parasitizing two species of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) and ecological analyses. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 590-596.

García-Varela, M., & Nadler, S.A. (2005). Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 91, 1401-1409.

Garrido-Olvera, L., García-Prieto, L. & Pérez-Ponce de León, G. (2006). Checklist of the adult nematode parasites of fishes in freshwater localities from Mexico. *Zootaxa*, 1201, 1-45.

Gasser, R.B., Zhu, X. & McManus, D.P. (1999). NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda). *International Journal for Parasitology*, 29, 1965-1970.

Giese, E.G., Santos, J.N., & Lanfredi, R.M. (2009). A new species of Camallanidae from *Ageneiosus ucayalensis* (Pisces: Siluriformes) from Pará state, Brazil. *Journal of Parasitology*, 95, 407-412.

González-Solís, D., Moravec, F. & Vidal-Martínez, V.M. (2002). *Procamallanus (Spirocamallanus) chetumalensis* n. sp. (Nematoda: Camallanidae) from the

Mayan sea catfish, *Ariopsis assimilis*, off the Caribbean coast of Mexico. *Journal of Parasitology*, 88, 765-768.

Gross, J.B. (2012). The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC evolutionary biology*, 12, 105. doi: 10.1186/1471-2148-12-105.

Gross, J.B., Krutzler, A.J. & Carlson, B.M. (2014). Complex craniofacial changes in blind cave-dwelling fish are mediated by genetically symmetric and asymmetric loci. *Genetics*, 196, 1303-1319.

Gross, J.B., Gangidine, A. & Powers, A.K. (2016). Asymmetric Facial Bone Fragmentation Mirrors Asymmetric Distribution of Cranial Neuromasts in Blind Mexican Cavefish. *Symmetry*, 8, 118.

Grosemans, T., Morris, K., Thomas, W.K., Rigaux, A., Moens, T. & Derycke, S. (2016). Mitogenomics reveals high synteny and long evolutionary histories of sympatric cryptic nematode species. *Ecology and evolution*. 6, 1854–1870. doi: 10.1002/ece3.1975.

Gutiérrez-García, T.A. & Vázquez-Domínguez, E. (2011). Comparative phylogeography: designing studies while surviving the process. *BioScience*, 61, 857-868.

Handoo, Z.A., Palomares-Rius, J.E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Liebanas, G., Subbotin, S.A., & Castillo, P. (2014). Integrative taxonomy of the stunt nematodes of the genera *Bitylenchus* and *Tylenchorhynchus* (Nematoda, Telotylenchidae) with description of two new species and a molecular phylogeny. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 172, 231-264.

Hausdorf, B., Wilkens, H., & Strecker, U. (2011). Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular phylogenetics and evolution*, 60, 89-97.

Hawash, M.B.F., Andersen, L.O., Gasser, R.B., Stensvold, C.R. & Nejsum, P. (2015). Mitochondrial Genome Analyses Suggest Multiple *Trichuris* Species in Humans, Baboons, and Pigs from Different Geographical Regions. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0004059. doi:10.1371/journal.pntd.0004059.

Hernández-Orts, J.S., Aznar, F.J., Blasco-Costa, I., García, N.A., Villora-Montero, M., Crespo, E.A., Raga, J.A. & Montero, F.E. (2013). Description, microhabitat selection and infection patterns of sealworm larvae (*Pseudoterranova decipiens* species complex, nematoda: ascaridoidea) in fishes from Patagonia, Argentina. *Parasites & vectors*, 6, 252.

Hohenegger, J. (2014). Species as the basic units in evolution and biodiversity: Recognition of species in the Recent and geological past as exemplified by larger foraminifera. *Gondwana Research*, 25, 707-728.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754-755.

Hugot, J.P., Baujard, P. & Morand, S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3, 199-208.

Huyse, T., Poulin, R., & Theron, A. (2005). Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends in parasitology*, 21, 469-475.

Ibarra Manriquez, G., Villaseñor, J.L., & Duran Garcia, R. (1995). Riqueza de especies y endemismo del componente arbóreo de la Península de Yucatán, México. Species richness and endemisms of trees of Yucatan Peninsula, Mexico. *Bol. Soc. Bot. Mex*, 57, 49-77.

Jaenike, J. (1993). Rapid evolution of host specificity in a parasitic nematode. *Evolutionary Ecology*, 7, 103-108.

Jaggard, J., Robinson, B.G., Stahl, B.A., Oh, I., Masek, P., Yoshizawa, M. & Keene, A.C. (2017). The lateral line confers evolutionarily derived sleep loss in the Mexican cavefish. *Journal of Experimental Biology*, 220, 284-293.

Jeffery, W.R. (2001). Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Developmental biology*, 231, 1-12.

Jelle, V.C., Sofie, D., Alexei, T., Daria, P., & Ann, V. (2014). The *Halomonhystera disjuncta* population is homogeneous across the Håkon Mosby mud volcano (Barents Sea) but is genetically differentiated from its shallow-water relatives. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 52, 203-216.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies,

- P. & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-1649.
- Kohn, A., Fernandes, B.M.M., Pipolo, H.V. & Godoy M.P. (1989). List of helminth parasites of fishes from the Passo Fundo reservoir, Uruguay River Basin, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84, 427–428.
- Kowalko, J.E., Rohner, N., Linden, T. A., Rompani, S.B., Warren, W.C., Borowsky, R., Tabin C.J., Jeffery W.R. & Yoshizawa, M. (2013). Convergence in feeding posture occurs through different genetic loci in independently evolved cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 16933-16938.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- Lazarova, S., Peneva, V. & Kumari, S. (2016). Morphological and molecular characterisation, and phylogenetic position of *X. browni* sp. n., *X. penevi* sp. n. and two known species of *Xiphinema americanum*-group (Nematoda, Longidoridae). *ZooKeys*, 574.
- Leduc, D. & Wilson, J. (2016). Benthimermithid nematode parasites of the amphipod *Hirondellea dubia* in the Kermadec Trench. *Parasitology research*, 115, 1675-1682.
- Leigh, J.W. & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.*, 6.
- Lewis, S.C., Dyal, L.A., Hilburn, C.F., Weitz, S., Liao, W.S., LaMunyon, C.W. & Denver, D.R. (2009). Molecular evolution in *Panagrolaimus* nematodes: origins of parthenogenesis, hermaphroditism and the Antarctic species *P. davidi*. *BMC evolutionary biology*, 9.
- Li, W.X., Wang, G.T. & Nie, P. (2008). Genetic variation of fish parasite populations in historically connected habitats: Undetected habitat fragmentation effect on populations of the nematode *Procamallanus fulvidraconis* in the catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Parasitology*, 94, 643-647.

Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

Light, J.E. & Hafner, M.S. (2007). Cophylogeny and disparate rates of evolution in sympatric lineages of chewing lice on pocket gophers. *Molecular phylogenetics and evolution*, 45, 997-1013.

Liu, G.H., Nadler, S.A., Liu, S.S., Podolska, M., D'Amelio, S., Shao, R., Gasser, R.B. & Zhu, X.Q. (2016). Mitochondrial Phylogenomics yields Strongly Supported Hypotheses for Ascaridomorph Nematodes. *Scientific Reports*, 6.

Liu, W., Golovatch, S., Wesener, T. & Tian, M. (2017). Convergent evolution of unique morphological adaptations to a subterranean environment in cave millipedes (Diplopoda). *PloS one*, 12, e0170717.

Luque, J.L., Aguiar, J.C., Vieira, F.M., Gibson, D.I., & Santos, C.P. (2011). Checklist of Nematoda associated with the fishes of Brazil. *Zootaxa*, 3082, 1-88.

Mayr, E. (1942). Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. *Harvard University Press*.

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., & Lopez, R. (2013). Nucleic acids research, (Web Server issue): W597-600.

Mehta, R.S., Bryant, D. & Rosenberg, N.A. (2016). The probability of monophyly of a sample of gene lineages on a species tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 8002-8009.

Mejía-Madrid, H.H., Vázquez-Domínguez, E. & Pérez-Ponce de León, G. (2007). Phylogeography and freshwater basins in central Mexico: recent history as revealed by the fish parasite *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda). *Journal of Biogeography*, 34, 787-801.

Mendlová, M. & Šimková, A. (2014). Evolution of host specificity in monogeneans parasitizing African cichlid fish. *Parasites & vectors*, 7, 69.

McFrederick, Q.S. & Taylor, D.R. (2013). Evolutionary history of nematodes associated with sweat bees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 66, 847-856.

Miller, R.R.M., Norris, W.L. & Soto, S.M.S. (2009). Peces dulceacuícolas de México.

- Moon, Y.S., Son, J.A., & Jung, C.S. (2013). Morphometric Variation in Pine Wood Nematodes, *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*, Isolated from Multiple Locations in South Korea. *The plant pathology journal*, 29, 344.
- Moravec, F., Mendoza-Franco, E., Vargas-Vázquez, J. & Vivas-Rodríguez, C. (1995). Studies on the development of *Procamallanus (Spirocamallanus) rebecca* (Nematoda: Camallanidae), a parasite of cichlid fishes. *Folia Parasitologica*, 42, 281-292.
- Moravec, F., & Vargas-Vazquez, J. (1996). The development of *Procamallanus (Spirocamallanus) neocaballeroi* (Nematoda: Camallanidae), a parasite of *Astyanax fasciatus* (Pisces) in Mexico. *Folia parasitologica*, 43, 61-70.
- Moravec, F. (1998). Nematodes of freshwater fishes of the neotropical region. Praha: Academia.
- Moravec, F., Salgado-Maldonado, G., & Caspeta-Mandujano, J. (2000). Three new *Procamallanus (Spirocamallanus)* species from freshwater fishes in Mexico. *Journal of Parasitology*, 86, 119-127.
- Moravec, F., Chara, J. & Shinn, A.P. (2004). Two nematodes, *Dentinema trichomycteri* ng, n. sp.(Cosmocercidae) and *Procamallanus chimusensis* Freitas & Ibáñez, 1968 (Camallanidae), from catfishes *Trichomycterus* spp.(Pisces) in Colombia. *Systematic parasitology*, 59, 189-197.
- Moravec, F., Justine, J.L., Würtz, J., Taraschewski, H., & Sasal, P. (2006). A new species of *Procamallanus* (Nematoda: Camallanidae) from Pacific eels (*Anguilla* spp). *Journal of Parasitology*, 92, 130-137.
- Moravec, F. (2007). First experimental observations on the development of *Rhabdochona denudata* (Nematoda: Rhabdochonidae) in the intermediate host. *Folia parasitologica*, 54, 236.
- Moravec, F. (2010). Some aspects of the taxonomy, biology, possible evolution and biogeography of nematodes of the spirurine genus *Rhabdochona* Railliet, 1916 (Rhabdochonidae, Thelazioidea). *Acta Parasitologica*, 552, 144-160.
- Moravec, F., Salgado-Maldonado, G., González-Solís, D., & Caspeta-Mandujano, J.M. (2012). Host–parasite relationships of *Rhabdochona kidderi* Pearse, 1936 (Nematoda: Rhabdochonidae) in fishes of the Lacantún River in the Lacandon rain

forest of Chiapas State, southern Mexico, with a key to Mexican species of *Rhabdochona* Railliet, 1916. *Systematic parasitology*, 82, 1-12.

Moravec, F., Pachanawan, A. & Kamchoo, K. (2013). *Rhabdochona* (*Rhabdochona*) *hypsibarbi* n. sp. (Nematoda: Rhabdochonidae) from the freshwater cyprinid fish *Hypsibarbus wetmorei* (Smith) in northeast Thailand. *The Journal of parasitology*, 99, 297-302.

Moravec, F. & Van As, L.L. (2015). *Procamallanus* (*Procamallanus*) spp. (Nematoda: Camallanidae) in fishes of the Okavango River, Botswana, including the description of *P.(P.) pseudolaeviconchus* n. sp. parasitic in *Clarias* spp. (Clariidae) from Botswana and Egypt. *Systematic parasitology*, 90, 137-149.

Morcillo, F., Ornelas-García, C.P., Alcaraz, L., Matamoros, W.A., & Doadrio, I. (2016). Phylogenetic relationships and evolutionary history of the Mesoamerican endemic freshwater fish family Profundulidae (Cyprinodontiformes: Actinopterygii). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 242-251.

Murphy, J.C., Jowers, M.J., Lehtinen, R.M., Charles, S.P., Colli, G.R., Peres Jr, A.K., Hendry, C.R. & Pyron, R.A. (2016). Cryptic, sympatric diversity in Tegu Lizards of the *Tupinambis teguixin* group (Squamata, Sauria, Teiidae) and the description of three new species. *PloS one*, 11, e0158542.

Nadler, S.A., & Hudspeth, D.S. (1998). Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10, 221-236.

Nadler, S.A., Carreno, R.A., Mejía-Madrid, H., Ullberg, J., Pagan, C., Houston, R., & Hugot, J.P. (2007). Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology*, 134, 1421-1442.

Nadler, S.A., Bolotin, E., & Stock, S.P. (2006). Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Systematic Parasitology*, 63, 159-179.

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

- Nakano, T., Okamoto, M., Ikeda, Y., & Hasegawa, H. (2006). Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene and nuclear rDNA regions of *Enterobius vermicularis* parasitic in captive chimpanzees with special reference to its relationship with pinworms in humans. *Parasitology Research*, 100, 51-57.
- Orr, H.A. (2005). The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nature Reviews Genetics*, 6, 119-127.
- Ota, N., Hasegawa, H., McLennan, M.R., Kooriyama, T., Sato, H., Pebsworth, P.A., & Huffman, M.A. (2015). Molecular identification of *Oesophagostomum* spp. from „village“ chimpanzees in Uganda and their phylogenetic relationship with those of other primates. *Royal Society Open Science*, 2.
- Ornelas-García, C.P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC evolutionary biology*, 8, 340.
- Ornelas-García, C.P., Bastir, M., & Doadrio, I. (2014). Morphometric variation between two morphotypes within the *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Actinopterygii: Characidae) genus, From a Mexican tropical lake. *Journal of morphology*, 275, 721-731.
- Ornelas-García, C. P., & Pedraza-Lara, C. (2015). Phylogeny and Evolutionary History of *Astyanax mexicanus*. Biology and evolution of the Mexican cavefish. 1st Edition. United States: Elsevier, 77.
- Paaby, A.B., & Rockman, M.V. (2014). Cryptic genetic variation: evolution's hidden substrate. *Nature Reviews Genetics*, 15, 247-258.
- Paterson, A.M., & Gray, R.D. (1997). Host-parasite co-speciation, host switching, and missing the boat. Host–parasite evolution: general principles and avian models, 236-250.
- Pérez-Ponce de León, G. (2003). Biodiversity and biogeographic patterns in the Mesa Central of México: Insights from host-parasite systems. *Journal of Parasitology*, 89, 126-133.

- Pérez-Ponce de León, G. & Choudhury, A. (2010). Parasite inventories and DNA-based taxonomy: lessons from helminths of freshwater fishes in a megadiverse country. *Journal of Parasitology*, 96, 236-244.
- Pérez-Ponce de León, G. & Choudhury, A. (2005). Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: the search for patterns and processes. *Journal of Biogeography*, 32, 645-659.
- Pérez-Ponce de León, G., & Choudhury, A. (2010). Parasite inventories and DNA-based taxonomy: lessons from helminths of freshwater fishes in a megadiverse country. *Journal of Parasitology*, 96, 236-244.
- Pérez-Ponce de León, G & Nadler, S.A. (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. *Changing Diversity in Changing Environment* (ed. O. Grill y V. Gianfranco), 33-54.
- Pérez-Ponce de León, G., Mendoza-Garfias, B., Rosas-Valdez, R., & Choudhury, A. (2013). New host and locality records of freshwater fish helminth parasites in river basins north of the Transmexican Volcanic Belt: another look at biogeographical patterns. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 556-562.
- Pérez-Ponce de León G., Razo-Mendivil, U., Mendoza-Garfias, B., Rubio-Godoy, M., & Choudhury, A. (2015). A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) in *Astyanax mexicanus* (Characidae) from Mexico revealed by morphology and sequences of the 28S ribosomal RNA gene. *Folia parasitologica*, 62.
- Pérez-Ponce de León, G. & Poulin R. (2016) Taxonomic distribution of cryptic diversity among metazoans: not so homogeneous after all. *Biol. Lett.* 12.
- Pérez-Ponce de León, G. & Poulin, R. (2017). An updated look at the uneven distribution of cryptic diversity among parasitic helminths. *Journal of Helminthology*, 1-6. doi: 10.1017/S0022149X17000189.

- Pfenninger, M., & Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 121.
- Pinacho-Pinacho, C.D., García-Varela, M., Hernández-Orts, J.S., Mendoza-Palmero, C. A., Sereno-Uribe, A. L., Martínez-Ramírez, E., Andrade-Gómez, L., Hernández-Cruz, E., & Pérez-Ponce de León, G. (2015). Checklist of the helminth parasites of the genus *Profundulus* Hubbs, 1924 (Cyprinodontiformes, Profundulidae), an endemic family of freshwater fishes in Middle-America. *ZooKeys*, 523.
- Pinto, R.M., Noronha, D., Knoff, M., & Gomes, D.C. (2010). *Rhabdochona* (R.) *uruyeni* (Nematoda, Rhabdochonidae) in Brazil: present status of South American *Rhabdochona* Railliet with a worldwide bibliographical survey of the genus from 1845 to 2010. *Neotropical Helminthology*, 4, 49-69.
- Pleijel, F., Jondelius, U., Norlinder, E., Nygren, A., Oxelman, B., Schander, C., Sundberg, P., & Thollesson, M. (2008) Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 369-371.
- Poulin, R. (2011). Uneven distribution of cryptic diversity among higher taxa of parasitic worms. *Biology Letters*, 7, 241-244.
- Poulin, R., Krasnov, B.R., & Mouillot, D. (2011). Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends in parasitology*, 27, 355-361.
- Poulin, R. (2014). Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *International journal for parasitology*, 44, 581-589.
- Poulin, R., & Pérez-Ponce de León, G. (2016). Global analysis reveals that cryptic diversity is linked with habitat but not mode of life. *Journal of Evolutionary Biology*, 30, 641–649.
- Rabosky, D.L., Santini, F., Eastman, J., Smith, S. A., Sidlauskas, B., Chang, J. & Alfaro, M.E. (2013). Rates of speciation and morphological evolution are correlated across the largest vertebrate radiation. *Nature communications*, 4.

- Ramalho, G. (2005). *Procamallanus (Spirocamallanus) hilarii* Vaz and Pereira, 34 (Nematoda, Camallanidae), parásito de peces dulceacuícolas del norte de Argentina. *Acta Zoológica Lilloana*, 49, 137–139.
- Rambaut, A. (2016). <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Razo-Mendivil, U., Vázquez-Domínguez, E., Rosas-Valdez, R., de León, G.P.P., & Nadler, S.A. (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.
- Razo-Mendivil, U., Mendoza-Garfias, B., Pérez Ponce de León, G., & Rubio-Godoy, M. (2014). A new species of *Auriculostoma* (Digenea: Allocreadiidae) in the Mexican tetra *Astyanax mexicanus* (Actinopterygii: Characidae) from Central Veracruz, Mexico, described with the use of morphological and molecular data. *Journal of Parasitology*, 100, 331-337.
- 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.
- Richardson, J.L., Urban, M.C., Bolnick, D.I., & Skelly, D.K. (2014). Microgeographic adaptation and the spatial scale of evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 29, 165-176.
- Ricklefs, R.E., & Outlaw, D.C. (2010). A molecular clock for malaria parasites. *Science*, 329, 226-229.
- Rigby, M.C., & Font, W.F. (2001). Statistical reanalysis of the distinction between *Spirocamallanus istiblenni* and *S. monotaxis* (Nematoda: Camallanidae). *Journal of Parasitology*, 87, 1210-1213.
- Ristau, K., Steinfartz, S., & Traunspurger, W. (2013). First evidence of cryptic species diversity and significant population structure in a widespread freshwater nematode morphospecies (*Tobrilus gracilis*). *Molecular ecology*, 22, 4562-4575.

- Rohner, N., Jarosz, D.F., Kowalko, J.E., Yoshizawa, M., Jeffery, W.R., Borowsky, R. L., & Tabin, C.J. (2013). Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish. *Science*, 342, 1372-1375.
- Rosas-Valdez, R., Choudhury, A., & De León, G.P.P. (2011). Molecular prospecting for cryptic species in *Phyllodistomum lacustri* (Platyhelminthes, Gorgoderidae). *Zoologica Scripta*, 40, 296-305.
- Salgado-Maldonado, G. (2006). Checklist of helminth parasites of freshwater fishes from Mexico. *Zootaxa*, 1324, 1-357.
- Sandlund, O.T., Daverdin, R.H., Choudhury, A., Brooks, D.R., & Diserud, O.H. (2010). A survey of freshwater fishes and their macroparasites in the Guanacaste Conservation Area (ACG), Costa Rica. *Norwegian Institute for Nature Research (NINA) Report*, 635, 45.
- Santacruz, V.A.O. (2013). Análisis de las comunidades de peces y parásitos en la Cuenca del Pánuco (Tesis de licenciatura).
- Santacruz, V.A.O., García, G.O., Tinoco-Cuellar, M., Rangel-Huerta, E., & Maldonado, E. (2015). Spatial Mapping in Perpetual Darkness: EvoDevo of Behavior in *Astyanax mexicanus* Cavefish. Biology and evolution of the Mexican cavefish. 1st Edition. United States: Elsevier, 361-376.
- Schmidt-Rhaesa, A. (2013). Gastrotricha, Cycloneuralia, and Gnathifera: Nematoda. Berlín, De Gruyter.
- Schmitter-Soto, J.J. (2016). A phylogeny of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) in Central and North America. *Zootaxa*, 4109, 101-130.
- Silva de Oliveira, A.D., Decraemer, W., Holovachov, O., Burr, J.A.Y., Tandingan De Ley, I., De Ley, P., Moens, T., & Derycke, S. (2012). An integrative approach to characterize cryptic species in the *Thoracostoma trachygaster* Hope, 1967 complex (Nematoda: Leptosomatidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 164, 18-35.
- Simpson G.G. (1961). Principles of Animal Taxonomy. Columbia University Press, New York.
- Stamatakis, A. (2014). "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". En *Bioinformatics*.

Sithithaworn, P., Petney, T.N., & Andrews, R.H. (2015). What significance do helminths species-complexes have for the prevention, diagnosis and treatment of human infections?

Solórzano-García, B., Nadler, S.A., & de León, G.P.P. (2016). Pinworm diversity in free-ranging howler monkeys (*Alouatta* spp.) in Mexico: Morphological and molecular evidence for two new *Trypanoxyuris* species (Nematoda: Oxyuridae). *Parasitology international*, 65, 401-411.

Souza, V., Siefert, J.L., Escalante, A.E., Elser, J.J., & Eguiarte, L.E. (2012). The Cuatro Ciénegas basin in Coahuila, Mexico: an astrobiological precambrian park. *Astrobiology*, 12, 641-647.

Stehli F.G. & Webb S.D. (1985). The Great American Biotic Interchange, pp. 357–386. Plenum Press, New York, NY.

Strecker, U., Hausdorf, B. & Wilkens, H. (2012). Parallel speciation in *Astyanax* cave fish (Teleostei) in Northern Mexico. *Mol Phylogenet Evol*, 62, 62–70.

Sudhaus, W., & Kiontke, K. (2007). Comparison of the cryptic nematode species *Caenorhabditis brenneri* sp. n. and *C. remanei* (Nematoda: Rhabditidae) with the stem species pattern of the *Caenorhabditis Elegans* group. *Zootaxa*, 1456, 45-62.

Susoy, V., Herrmann, M., Kanzaki, N., Kruger, M., Nguyen, C. N., Rödelsperger, C., Röseler, W., Weiler, C., Giblin-Davis, R. M., Ragsdale, E. J. & Sommer, R. J. (2016). Large-scale diversification without genetic isolation in nematode symbionts of figs. *Science advances*, 2. doi: 10.1126/sciadv.1501031.

Stutz, W.E., Lau, O.L., & Bolnick, D.I. (2014). Contrasting patterns of phenotype-dependent parasitism within and among populations of threespine stickleback. *The American Naturalist*, 183, 810-825.

Thompson, J.N. (1994). The coevolutionary process. University of Chicago Press.

Tobler, M., Schlupp, I., de León, F.J.G., Glaubrecht, M., & Plath, M. (2007). Extreme habitats as refuge from parasite infections? Evidence from an extremophile fish. *Acta oecologica*, 31, 270-275.

Trontelj, P., & Fišer, C. (2009). Perspectives: cryptic species diversity should not be trivialised. *Systematics and Biodiversity*, 7, 1-3.

- Van Campenhout, J., Sofie, D., Alexei, T., Daria, P., & Ann, V. (2014). The *Halomonhystera disjuncta* population is homogeneous across the Håkon Mosby mud volcano (Barents Sea) but is genetically differentiated from its shallow-water relatives. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 52, 203-216.
- Van Campenhout, J., & Vanreusel, A. (2016). Closely related intertidal and deep-sea *Halomonhystera* species have distinct fatty acid compositions. *Helgoland Marine Research*, 70. doi:10.1186/s10152-016-0467-6.
- Vanhove, M.P., Pariselle, A., Van Steenberge, M., Raeymaekers, J.A., Hablützel, P. I., Gillardin, C., Hellemans, B., Breman, F.C., Koblmüller, S., Sturmbauer, C., Snoeks, J., Volckaert, F.A.M. & Hyse, T. (2015). Hidden biodiversity in an ancient lake: phylogenetic congruence between Lake Tanganyika trophic cichlids and their monogenean flatworm parasites. *Scientific reports*, 5.
- Vanhove, M.P., Hablützel, P.I., Pariselle, A., Šimková, A., Huyse, T., & Raeymaekers, J.A. (2016). Cichlids: a host of opportunities for evolutionary parasitology. *Trends in Parasitology*, 32, 820-832. doi:10.1038/srep13669.
- Velasco-Castrillón, A., & Stevens, M.I. (2014). Morphological and molecular diversity at a regional scale: a step closer to understanding Antarctic nematode biogeography. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 272-284.
- Viney, M., & Diaz, A. (2012). Phenotypic plasticity in nematodes: evolutionary and ecological significance. In *Worm*, 1, 98-106. Taylor & Francis.
- Waddington, C.H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150, 563-565.
- Waddington, C.H. (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, 7, 118–126.
- Wagensberg, J. (2010). Las raíces triviales de lo fundamental. Metatemas Tusquets Editores.
- Walker, J.G., Hurford, A., Cable, J., Ellison, A.R., Price, S.J., Cressler, C.E. (2017). Host allometry influences the evolution of parasite host-generalism: theory and meta-analysis. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 372. doi: 10.1098/rstb.2016.0089.

- Wijová, M., Moravec, F., Horák, A., & Lukeš, J. (2006). Evolutionary relationships of Spirurina (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida) with special emphasis on dracunculoid nematodes inferred from SSU rRNA gene sequences. *International Journal for Parasitology*, 36, 1067-1075.
- Winston, M.E., Kronauer, D.J., & Moreau, C.S. (2016). Early and dynamic colonization of Central America drives speciation in Neotropical army ants. *Molecular Ecology*, 26, 859-870.
- Wright, S. (1938). Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science*, 87, 430-431.
- Wright, S. (1940): Breeding structure of populations in relation to speciation. *American Naturalist*, 74, 232-248.
- Wu, S. G., Wang, G. T., Xi, B. W., Gao, D., & Nie, P. (2008). Molecular characteristics of *Camallanus* spp.(Spirurida: Camallanidae) in fishes from China based on its rDNA sequences. *Journal of Parasitology*, 94, 731-736.
- Wyrobisz, A., Kowal, J., & Nosal, P. (2016). Insight into species diversity of the Trichostrongylidae Leiper, 1912 (Nematoda: Strongylida) in ruminants. *Journal of helminthology*, 90, 639-646.
- Yilmaz, E., Fritzenwanker, M., Pantchev, N., Lendner, M., Wongkamchai, S., Otranto, D., Kroidl, I., Dennebaum, M., Hoa Le, T., Anh Le, T., Ramünke, S., Schaper, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Poppert, S., & Krücken, J. (2016). The Mitochondrial Genomes of the Zoonotic Canine Filarial Parasites *Dirofilaria (Nochtiella) repens* and *Candidatus Dirofilaria (Nochtiella) Honkongensis* Provide Evidence for Presence of Cryptic Species. *PLoS Negl Trop Dis*, 10.
- Yoshizawa, M., Gorički, Š., Soares, D., & Jeffery, W.R. (2010). Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Current Biology*, 20, 1631-1636.
- Zeisset, I., & Beebee, T.J.C. (2008). Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, 101, 109-119.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29, 2869-2876.

Zúniga-Reinoso, Á., & Benítez, H.A. (2015). The overrated use of the morphological cryptic species concept: An example with *Nyctelia darkbeetles* (Coleoptera: Tenebrionidae) using geometric morphometrics. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 255, 47-53.