



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA

**Caracterización morfológica y molecular de
especímenes del género *Homalometron*
Stafford, 1904 (Trematoda) asociados al pez
Eugerres plumieri, distribuido en el Golfo de
México y Mar Caribe.**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Ramírez Pineda Gloria Nohemí

Matrícula

2162029130

Asesor interno Dr. Jorge Ignacio Servín Martínez

No. Económ.32615

Asesor externo Dr. Martín García Varela

Cédula 5508899

UNAM, Instituto de Biología

México, CDMX.

Agosto, 2022

Resumen

Parásitos adultos del género *Homalometron* Stafford, 1904, fueron recolectados de 5 localidades, 4 del Golfo de México y una del Mar Caribe, asociados a la mojarra rayada (*Eugerres plumieri*). Los parásitos fueron teñidos, y montados en preparaciones permanentes. La revisión y comparación morfológica con otras especies congénicas reveló la presencia de dos morfotipos nuevos. Estas diferencias morfológicas fueron corroboradas con dos marcadores moleculares (secuencias del ADN nuclear de los espaciadores transcritos internos (ITS1, ITS2 y 5.8S) y del dominio D2+D3 de la subunidad mayor del 28S de ADN ribosomal). Las nuevas secuencias generadas de individuos de las 5 localidades fueron alineadas con secuencias disponibles en la base de datos del genbank. Los análisis filogenéticos inferidos independientemente con cada base de datos, fueron congruentes debido a que formaron dos grupos o clados independientes, que pertenecen a cada morfotipo encontrado. Los análisis sugieren que el morfotipo 1 está distribuido en el Golfo de México, mientras que el morfotipo 2 está restringido a una sola localidad del mar Caribe. La evidencia morfológica, ecológica y molecular generada en este trabajo nos permitió reconocer dos nuevas especies candidatas para la ciencia incrementando la diversidad de este grupo de parásitos en las costas de México.

Agradecimientos

La alumna Gloria Nohemi agradece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN201122 a nombre del Dr. Martín García Varela, por el apoyo para llevar a cabo el presente proyecto de investigación.

Índice

Introducción	1
Ciclo de vida	3
Marcadores moleculares	5
Revisión de literatura	7
Objetivos particulares	13
Metodología	13
Caracterización molecular	14
Alineamientos y análisis filogenético	16
Resultados	17
Comentarios taxonómicos	19
Análisis filogenéticos y distancias genéticas	29
Discusión	32
Conclusiones	34
Bibliografía	35

Introducción

Los helmintos parásitos son organismos que se transmiten entre invertebrados y vertebrados a través de complejos ciclos de vida. Los helmintos son abundantes en la naturaleza y están ampliamente distribuidos. Si, consideramos que cualquier organismo de vida libre es un hospedero potencial para más de una especie de parásitos, entonces es probable que existan más especies parásitas que organismos de vida libre y por lo tanto es muy difícil estimar el número de parásitos en los ecosistemas. Se reconoce que los parásitos pueden regular las poblaciones y comunidades de hospederos, además pueden estabilizar las redes tróficas en los ecosistemas y juegan un papel importante en la evolución, historias de vida y en el comportamiento de sus hospederos (Poulin, 2014).

El phylum Platyhelminthes está compuesto por aproximadamente 20,000 especies de organismos aplanados dorso ventral, acelomados, triblásticos con simetría bilateral. Los platelmintos están agrupados en tres clases: Trematoda, Monogenea y Cestoda (Brusca & Brusca, 2003). Particularmente, la clase Trematoda se compone de aproximadamente 18,000 especies, lo cual los ubica como el grupo de metazoarios endoparásitos más diverso (Cribb *et al.*, 2001). Son organismos de gran relevancia desde el punto de vista antropocéntrico, debido a que parasitan al ser humano, animales domésticos y pueden generar severas epizootias. Los miembros de la familia Apocreadiidae Skrjain, 1942, son endoparásitos del intestino de peces marinos, salobres y de agua dulce. Morfológicamente los miembros de esta familia se caracterizan por presentar un cuerpo largo, ventosa oral subterminal, faringe muscular, manchas oculares (probablemente cuerpos sensoriales), ventosa ventral muscular, por debajo de estas se encuentra el ovario y un par de testículos, los ciegos

intestinales alcanzan la parte posterior del cuerpo folículos vitelinos extensos, dispersos en la parte anterior del cuerpo, una vesícula excretora en forma de I, no presentan saco del cirro y el poro genital se encuentra anteriormente a la ventosa ventral. Con base en estas características, morfológicas la familia está subdividida en tres subfamilias (Apocrediinae, Schistochiinae y Postporrinae). La subfamilia Apocreadiinae, contiene al género *Homalometron* Stafford 1904, en donde se encuentran clasificados los organismos bajo este estudio (Cribb & Bray, 1999).

El género *Homalometron* es la más grande en tamaño en la subfamilia. El género contiene aproximadamente 32 especies, las cuales maduran sexualmente en el intestino de peces que habitan agua dulce, salobres y marinas (Gibson & Bray, 2002; Fayton *et al.*, 2016). En el continente americano se han registrado 10 especies del género *Homalometron* representando *ca* 30.3 % de la biodiversidad, mientras que en la región Neártica se han registrado 6 especies *Homalometron cupuloris* (Ramsey, 1965), Cribb y Bray (1999), *Homalometron manteri* (Overstreet, 1970) Cribb y Bray, 1999, *Homalometron pallidum* Stafford, 1904 y *Homalometron palmeri* Curran, Tkach y Overstreet, 2013. *Homalometron armatum* (MacCallum, 1895) Manter (1947), *Homalometron currani* Barger y Wellenstein, 2015 y *Homalometron microlophi* Barger y Wellenstein, 2015. En la región Neotropical se han registrado 4 especies, dos se encuentran asociadas a peces de agua dulce de Centro América: *Homalometron mesoamericanum* Pérez-Ponce de León, Razo-Mendivil y García-Maga, 2012 y *Homalometron octopapillatum* Pérez-Ponce de León, Razo-Mendivil y García-Maga, 2012. Finalmente, 2 especies, *Homalometron papilliferum* (Szidat, 1956) Ostrowski de Núñez, Brugni y Viozzi, 2000 y *Homalometron pseudopallidum*, Martoreli, 1986, se han registrado en Sur América (Fayton *et al.*, 2016).

Ciclo de vida

Los adultos del género *Homalometron*, se encuentran parasitando el intestino de peces dulceacuícolas, salobre y marinos. Los huevos son liberados al medio ambiente, en donde eclosiona a una larva ciliada libre nadadora llamada miracidio (Fig. 1). El miracidio penetra al primer hospedero intermediario, generalmente un caracol del género *Hydrobia* Hartmann, en donde sufre una metamorfosis dando origen a un esporocisto el cual alberga una serie de embriones que se desarrollan asexualmente, los cuales forman las redias. Morfológicamente, las redias desarrollan la faringe y el intestino, al madurar se convierten en cercarias. Las cercarias emergen del primer hospedero intermediario, las cuales poseen una cola que les permite nadar en el ambiente en busca de su segundo hospedero intermediario el cual puede ser un bivalvo y/o un poliqueto en donde la cercaria se enquista formado la metacercaria (que es la fase infectiva), una vez que los peces consumen a un bivalvo y/o a un poliqueto con las metacercarias se completa el ciclo de vida (Roberts & Janovy, 2000; Curran *et al.*, 2013; Figura 1).

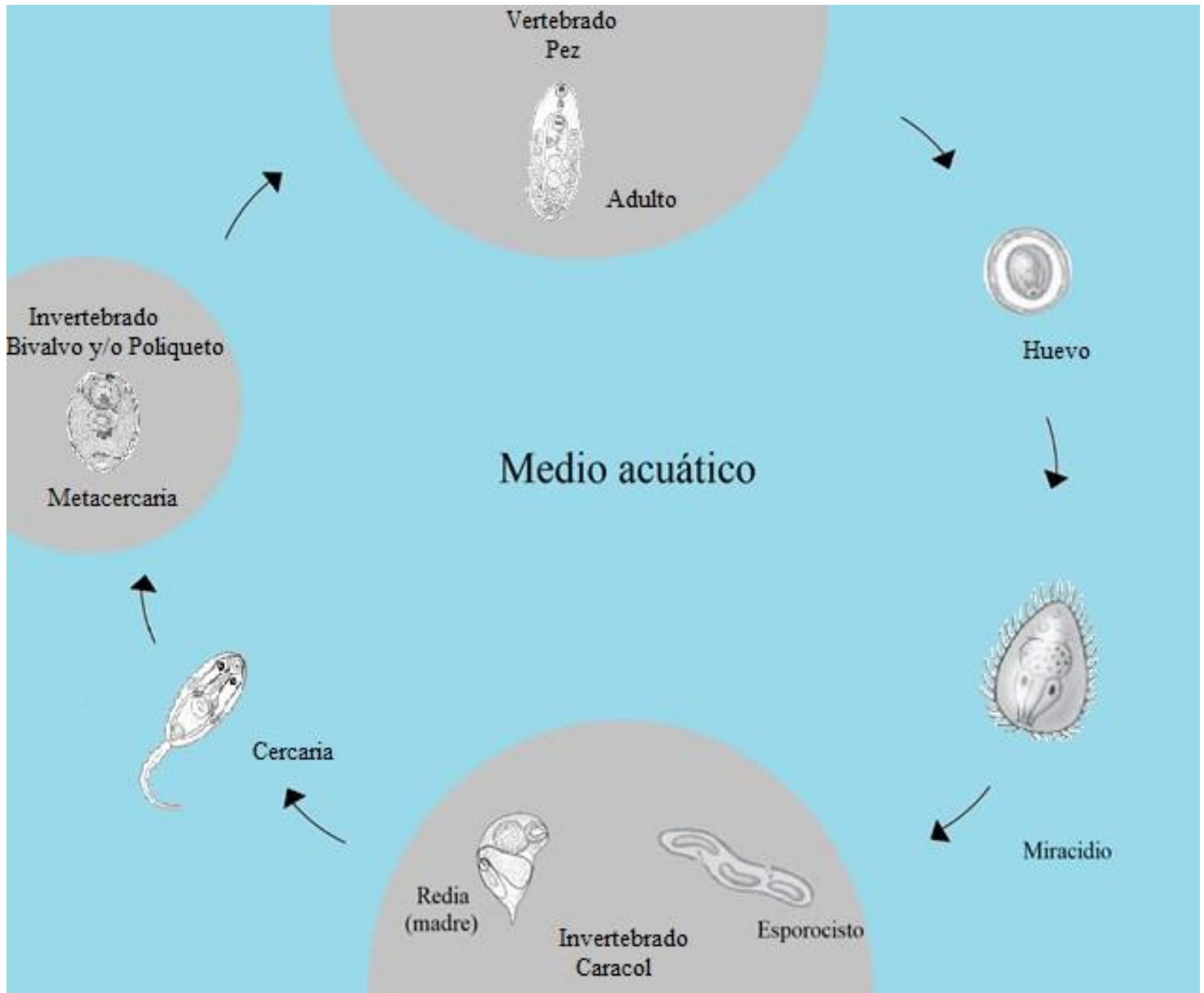


Figura 1. Ciclo de vida del género *Homalometron* tomado y modificado de (Roberts & Janovy, 2000).

Marcadores moleculares

La identificación de las especies de Trematodos o Digeneos se basa en las características morfológicas de los adultos y en características ecológicas (tipo de hospedero definitivo). Sin embargo, la incertidumbre sobre la validez de los caracteres morfológicos, la plasticidad fenotípica, la falta de caracteres morfométricos adecuados para asociar distintos estados del ciclo de vida y la similitud morfológica entre especies estrechamente relacionadas, son factores que han generado controversias que dificultan la correcta determinación taxonómica de estas especies (Nolan & Cribb, 2005). Estos problemas de diagnóstico en los taxones nos motivaron a usar herramientas alternas como secuencias de ADN. Las secuencias del ADN ofrecen varias ventajas que se enumeran a continuación: 1) La generación de los datos moleculares es relativamente rápida 2) Diferentes regiones del genoma pueden ser usadas para identificar, especies, géneros, poblaciones etc. 3) El número de caracteres moleculares analizados es mucho mayor que en caracteres morfológicos 4) La variación en las secuencias de ADN no son influenciadas por el fenotipo (McManus & Bowles, 1996). En el genoma de los eucariontes, los genes ribosomales del RNA se encuentran en gran número de copias, en tándem (secuencia de dos o más pares de bases de ADN, generalmente asociadas con el ADN no codificante), las cuales sufren un fenómeno de recombinación que homogeniza sus secuencias nucleotídicas (evolución concertada). La unidad de transcripción de los genes ribosomales se conforma de tres genes (5.8S, 18S y 28S) y de dos espaciadores transcritos internos (ITS1, ITS2). Las regiones que separan a estas unidades son conocidas como espaciadores no transcritos (NTS). Los genes ribosomales del

RNA y sus regiones espaciadoras (transcritas y no transcritas) son llamadas colectivamente ADN ribosomal (ADNr). El ADNr es ampliamente utilizado en estudios filogenéticos a distintos niveles taxonómicos, debido a que presenta regiones conservadas (genes) y variables (espaciadores) que pueden ser usadas para separar a los taxones (Hillis & Dixon, 1991). Particularmente los espaciadores transcritos internos son regiones pequeñas de aproximadamente 1,000 pares de bases (pb) que tienen una alta tasa de mutación, esta característica los convierte en ideales marcadores moleculares, para separar especies, géneros y poblaciones, definir complejos de especies crípticas (Luton *et al.*, 1992; Adlard *et al.*, 1993; Jousson *et al.*, 1998; Bell & Sommerville, 2002; Razo-Mendivil *et al.*, 2010).

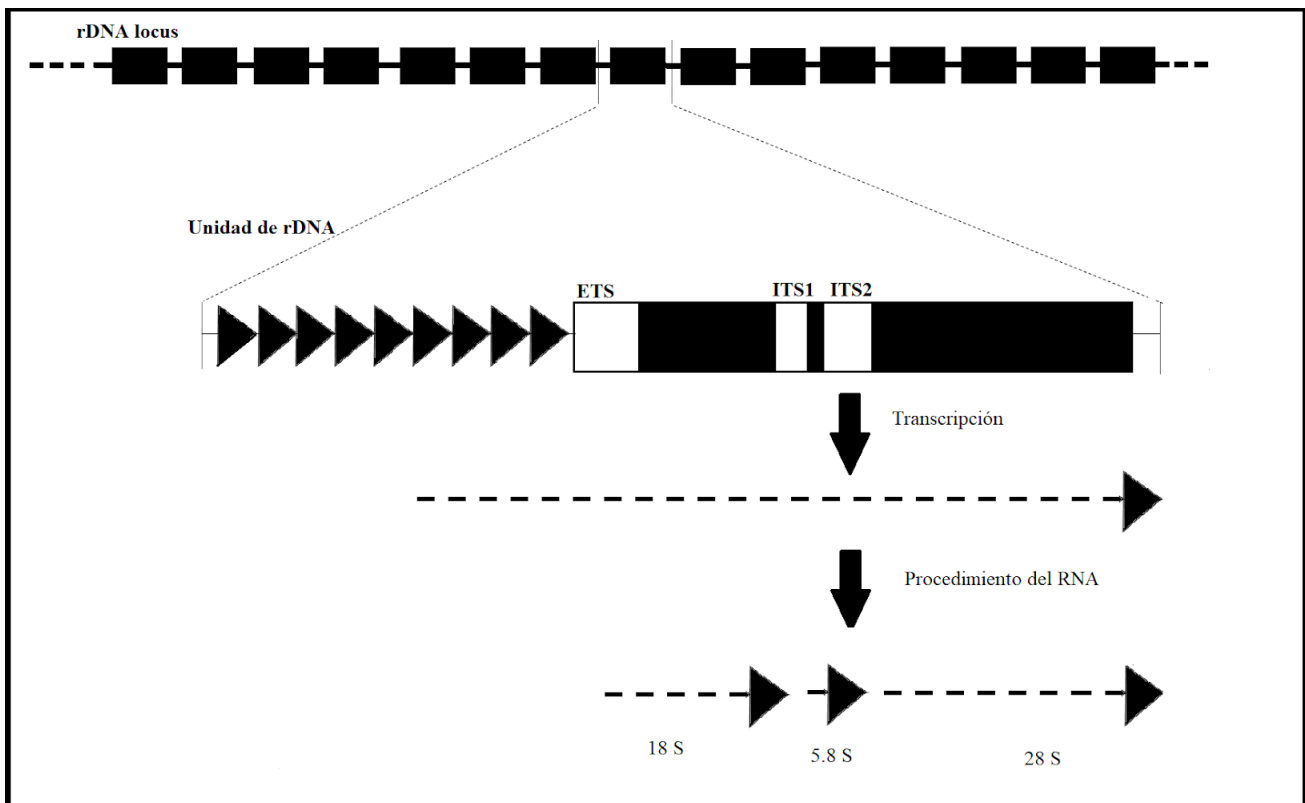


Figura 2. Organización de los genes DNA ribosomales en Eucariontes (Tomado y modificado de Eickbush & Eickbush, 2007)

Revisión de literatura

Con base en la evidencia morfológica y siguiendo la clave taxonómica para la familia Apocreadiidae (Cribb, 2005), los ejemplares colectados en las vertientes del Golfo de México y Mar Caribe fueron identificados como miembros del género *Homalometron*. Para comparar nuestros ejemplares de *Homalometron* se revisaron las descripciones originales de las siguientes especies distribuidas en el continente americano como: *H. palmeri*, *H. pallidum*, *H. manteri*, *H. pseudopallidum*, *H. elongatum*, *H. armatum*, *H. ribosonu*, *H. fracioneae*, *H. octopapillatum*, *H. mesoamericanum*, *H. currani*, *H. currani*, *H. microlophi*, más 3 especies candidatas (Martorelli, 1986; Cribb & Bray, 1999; Jones & Bray, 2005; Pérez- Ponce de León *et. al.*, 2007; Parker *et. al.*, 2010; Pérez Ponce de León *et. al.*, 2012; Curran *et al.*, 2013; Barger & Wellenstein, 2015; Fayton *et. al.*, 2016; Lopes, *et. al.*, 2017; Ostrowski de Nuñez *et. al.*, 2017). Las secuencias generadas en este proyecto de investigación fueron comparadas con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank de diferentes especies del género. Las bases de datos conformadas de genes nucleares fueron empleadas como un marco teórico filogenético para entender la evolución delimitación y reconocer especies (ver Tabla 1) (Martorelli, 1986; Cribb & Bray, 1999; Jones & Bray, 2005; Pérez- Ponce de León *et. al.*, 2007; Parker *et. al.*, 2010; Pérez Ponce de León *et. al.*, 2012; Curran *et al.*, 2013; Barger & Wellenstein, 2015; Fayton *et. al.*, 2016; Lopes, *et. al.*, 2017; Ostrowski de Nuñez *et. al.*, 2017).

Tabla 1. Especies registradas del género *Homalometron* su hospedero, localidad, así como las claves de acceso a GenBank de sus secuencias genéticas.

Especies	Hospedero	Localidad	ITS	LSU	Referencia
1.- <i>Homalometron annahoinaeffae</i> Correa Gomes & de Fabio, 1970		Río de Janeiro, Brasil			(Kohn & Fernandes, 1981)
2.- <i>Homalometron armatum</i> MacCallum, 1895; Manter, 1947	<i>Acipenser rubicundus</i> , <i>Lepomis gibbosus</i>	Mississippi, EUA	HM038045 HM038046 KC710977 KC10978	KC10975 KC10976	(Cribb & Bray, 1999)
3.- <i>Homalometron balistis</i> Manter, 1947	<i>Balistes caprisca</i>	Florida, EUA			(Cribb & Bray, 1999)
4.- <i>Homalometron caballeroi</i> Bravo-Hollis, 1954; Cribb & Bray, 1999	<i>Sufflamen</i> sp.	Jalisco, México			(Cribb & Bray, 1999)
5.- <i>Homalometron carapevae</i> Amato, 1983	<i>Eugerres brasilianus</i>	Río de Janeiro, Brasil			(López <i>et. al.</i> , 2017) (Pérez Ponce de León <i>et. al.</i> , 2012)
6.- <i>Homalometron cryptum</i> Overstreet, 1969	<i>Anisotremus virginicus</i>	Florida, EUA			(Cribb & Bray, 1999)
7.- <i>Homalometron cupuloris</i> Ramsey, 1965	<i>Lepomis microlophus</i>	Mississippi, EUA	KT823420	KT823420	(Fayton <i>et. al.</i> , 2016)
8.- <i>Homalometron currani</i> Barger & Wellenstein, 2015	<i>Aplodinotus grunniens</i>	Mississippi, EUA	KC710977 KC710978		(Curran <i>et. al.</i> , 2013) (Barger & Drew, 2015)
9.- <i>Homalometron dowgialloi</i>	<i>Haemulon flavolineatum</i>	Puerto Rico			(Cribb & Bray, 1999)

Dyer, Williams & Bunkley- Williams, 1992					
10.- <i>Homalometron elongatum</i> Manter, 1947	<i>Eucinostomus californiensis</i> , <i>Gerres cinereus</i>	Florida, EUA Panamá, Mar Caribe	HM038039 HM038040	HM038039 HM038040	(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2007) (Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2012)
11.- <i>Homalometron foliatum</i> Siddiqi & Cable, 1960	<i>Chaetodipterus faber</i> <i>Brachygenys</i> <i>chrysargyreus</i>	Puerto Rico Florida, EUA			(Cribb & Bray, 1999)
12.- <i>Homalometron frocioneae</i> Fayton & Andres, Overstreet & McAllister, 2016	<i>Fundulus diphanus</i>	New York, EUA	KT823419	KT823419	(Fayton <i>et. al.</i> , 2016)
13.- <i>Homalometron galaicus</i> Sanmartín Alvarez, Quinteiro & Paniagua, 1995; Cribb & Bray, 1999	<i>Microchirus variegatu</i>	España			(Cribb & Bray, 1999)
14.- <i>Homalometron lesliorum</i> Parker, Curran, Overstreet & Tkach, 2010	<i>Gerreidae</i>	Costa Rica, Nicaragua	HM038041 HM038042	HM038041 HM038042	(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2012)
15.- <i>Homalometron longisinosum</i> Manter, 1937; Cribb & Bray 1999	<i>Sphoeroides angusticeps</i>	Isla Galápagos, Pacífico Sur			(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2007)
16.- <i>Homalometron longulum</i> Travassos, Teixeira de Freitas & Bührnheim, 1965	<i>Diapterus rhombeus</i> <i>Eugerres</i> sp.	Jalisco, México Río de Janeiro, Brasil			(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2007)

17.- <i>Homalometron manteri</i> Overstreet, 1970; Cribb & Bray, 1999	<i>Leiostomus xanthurus</i>	Massachussets, EUA hasta el Norte de Golfo de México	JX400851 JX400852 JX400855 JX400857	JX400851	(Cribb & Bray, 1999)
18.- <i>Homalometron mesoamericanum</i> Pérez- Ponce de León, <i>et. al.</i> , 2012	<i>Ciclasoma urophalmus</i>	Tabasco, México	JQ389876	JQ389866	(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2012)
19.- <i>Homalometron mexicanum</i> Manter, 1937; Cribb & Bray 1999	<i>Balites capriscus</i>	Florida, EUA Tangolunda, México	JQ389877	JQ389867	(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2007)
20.- <i>Homalometron microlophi</i> Barger & Wellenstein, 2015	<i>Lepomis microlophus</i>	Mississippi, EUA	KC710975 KC710976		(Barger & Wellenstein, 2015)
21.- <i>Homalometron moraveci</i>	<i>Mulloidichthys vanicolensis</i>	Nueva Caledonia, Mar Coral, Australia			(Bray <i>et. al.</i> , 2007)
22.- <i>Homalometron octopapillatum</i> Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2012	<i>Cichlasoma beani</i>	Nayarit, México	JQ389874 JQ389875	JQ389862 JQ389863	(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2012)
23.- <i>Homalometron pallidum</i> Stafford,1904	<i>Menticirrhus saxatilis</i> <i>Morone americana</i>	Campeche, Tabasco, Veracruz, Yucatán, México	HM038044 HM038043	HM038043 HM038044	(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2007)
24.- <i>Homalometron palmeri</i> Curran <i>et. al.</i> , 2013	<i>Micropogonias</i> <i>Fundulus similis</i> <i>Eucinostomus argenteus</i>	Mississippi, EUA	JX400850 JX400853 JX400854 JX400859	JX400850 JX400858	(Pérez- Ponce de León <i>et. al.</i> , 2012)

25.- <i>Homalometron papilliferum</i> Szidat, 1956; Ostrowski de Nuñez, Brugni & Viozzi, 200	<i>Percichthys trucha</i>	Río Limay, Argentina			(Ostrowski de Nuñez <i>et. al.</i> , 2017)
26.- <i>Homalometron pseudopallidum</i> Martorelli, 1986	<i>Gymnogeophagus australis</i>	Río Paraná, Argentina	JX400856	JX400856	(Martorelli, 1986)
27.- <i>Homalometron ribosoni</i> Fayton & McAllister in Fayton <i>et. al.</i> , 2016	<i>Fundulus notatus</i>	Oklahoma, EUA	KT823418	KT823418	(Fayton <i>et. al.</i> , 2016)
28.- <i>Homalometron senegalense</i> Fischthal & Thomas, 1972	<i>Solea hexophthalma</i>	Senegal, África			(Cribb & Bray, 1999)
29.- <i>Homalometron sophiae</i> Stossich, 1886; Yamaguti, 1971	<i>Pagellus mormyrus</i>	Trieste, Italia			(Cribb & Bray, 1999)
30.- <i>Homalometron stradbokensis</i> Cribb & Bray, 1999	<i>Gerres subfasciatus</i>	Queensland, Australia			(Cribb & Bray, 1999)
31.- <i>Homalometron synagris</i> Yamaguti, 1953	<i>Scolopsis monogramma</i>	Indonesia, Malaysia, Queensland, Australia		AJ287523	(Cribb & Bray, 1999)
32.- <i>Homalometron verrunculi</i> Cribb & Bray, 1999	<i>Balistes [Verrunculus] polylepis</i>	Sonora, México			(Cribb & Bray, 1999) (Pérez-Ponce de León <i>et. al.</i> , 2012)
33.- <i>Homalometron vinodae</i> Ahmad, 1985	<i>Sufflamen chrysopterum</i>	India			(Cribb & Bray, 1999)

34.- <i>Homalometron wrightae</i> Cribb & Bray, 1999	<i>Achlyopa nigra</i>	Queensland, Australia			(Cribb & Bray, 1999)
---	-----------------------	-----------------------	--	--	----------------------

Objetivos particulares

1. Describir morfológica y molecularmente a los organismos adultos del género *Homalometron* asociados al pez *Eugerres plumieri* distribuido en el Golfo de México y Mar Caribe.
2. Obtener secuencias del DNA nuclear, particularmente de los genes nucleares ITS, 28S para cada población muestreada en la zona de estudio.
3. Estimar la diversidad genética para cada una de las poblaciones de especies muestreadas en la zona de estudio.
4. Con base en caracteres moleculares se generó una hipótesis filogenética para el género *Homalometron*, con el objetivo de comprender con mayor precisión las relaciones filogenéticas de los individuos bajo estudio.

Metodología

Los peces se colectaron con una red atarraya en 5 localidades; 4 en el Golfo de México y una en el Mar Caribe. A cada pez se les realizó una disección y se revisaron los órganos como: intestino, hígado, mesenterio, gónadas, músculo, ojos, corazón, cerebro, branquias, opérculos y riñón en búsqueda de parásitos. Los parásitos colectados fueron relajados en agua a punto de ebullición. Posteriormente, los ejemplares se colocaron en tubos con etanol absoluto. Para la colecta de los organismos se contó

con una licencia de colector científico No. FAUT0202 (Martín García Varela) otorgada por la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT. Los peces recolectados se etiquetaron y depositaron en la colección Nacional de Ictiología del Instituto de Biología, UNAM. Los parásitos recolectados fueron deshidratados en alcoholes graduales hasta ser teñidos con la técnica de tinción paracarmín de Mayer. Posteriormente, se montaron en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá. Los ejemplares posteriormente se observaron usando un Microscopio Leica modelo DM 1000 LED (Leica, Wetzlar, Germany) y se tomaron fotografías, resaltando las características diagnósticas, además se realizó la medición de las estructuras para la caracterización morfológica (expresada en milímetros). Las mediciones se realizaron con un microscopio óptico equipado con una cámara de campo claro y un ocular con micrómetro calibrado.

Caracterización molecular

Los parásitos preservados en etanol absoluto se colocaron individualmente en un tubo de 0.5 ml que contenían 100 µl de la solución de digestión (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 200mM NaCl, 0.5 M EDTA pH 8.0, 10% Sarkosil, 0.1 mg/ml de proteinasa K y agua ultrapura) y se incubaron por 12 horas a 56°C. Posteriormente los tubos se incubaron a 95°C durante 15 minutos, para desactivar la proteinasa K. El ADN genómico se aisló del sobrenadante usando el reactivo DNazol (Invitrogene, CA, USA). La amplificación de los genes nucleares se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers Forward 391 (5'- AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3') (Carreno & Nadler, *et al.*, 2003) y Reverse 536 (5'-CAGCTATCCTGAGGGAAAC-3') (García-Varela & Nadler, 2005) en el caso del gen 28S del ADN Ribosomal. Para la región de los ITS se emplearon los primers Forward BD1 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3' y reversa BD2, 5'-

ATCTAGACCGGACTAGGCTGTG-3' (Bowles and McManus 1993). El contenido final de la mezcla de reacción fue de 25 µl que incluía, 2.5 µl de Buffer Platinum 10X, 1.5 µl de MgCl₂, 0.5 µl de dNTPs, 1 µl de cada primer, 0.125 µl de Taq polimerasa Platinum (Invitrogene, CA, USA), 16.375 µl de agua destilada y 2 µl del ADN genómico. Las muestras se incubaron en un termociclador. El programa de amplificación consistió en los siguientes pasos: 1) 94°C 5 minutos: Desnaturalización; 2) 94°C 1 minuto; 3) 50°C 1 minuto: Alineación de los primers; 4) 72°C 1 minuto: Elongación; 5) Repetir 35 veces a partir del paso número dos; 6) 72°C 5 minutos: Extensión de la Taq polimerasa; 7) 8°C 12 horas. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con Red Gel en un buffer de Tris-Boratos-EDTA. Los productos amplificados se marcaron a través de una reacción de PCR con el método de Sanger (Sanger, 1977) el cual se basa en el empleo de dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3'. El método comienza cuando la doble hélice de ADN es desnaturalizada, posteriormente se le agrega un nucleótido que tiene un grupo libre 3'-OH en su desoxirribosa en donde se añaden los nucleótidos. La muestra se divide en cuatro submuestras, en cada una se le añade uno de los cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP). La secuencia de ADN es extendida por la ADN polimerasa usando la cadena simple como templado, cuando uno de estos dideoxinucleótidos se incorpora a una cadena en crecimiento, esta cadena no puede continuar con el proceso de elongación debido a que los dideoxinucleótidos carecen del grupo hidroxilo del carbono. Los electroferogramas derivados de la reacción de secuenciación se exportaron al programa de cómputo Codoncode (versión 9.0) en donde se revisó cada pico correspondiente a un nucleótido. Finalmente se ensamblaron las dos cadenas del ADN en una secuencia consenso.

Alineamientos y análisis filogenético

Se construyeron dos matrices de datos en las cuales se incluyeron las secuencias generadas en el presente trabajo más otras secuencias de la familia Apocreadiidae disponibles en la base de datos del GenBank. Las bases de datos del gen 28S y de ITS, fueron alineadas con el programa de cómputo ClustalW (Thompson *et al.*, 1997). Los análisis filogenéticos se realizaron a través del método de Máxima Verosimilitud (MV). El mejor modelo de evolución que se ajustó fue GTR+G+I a cada base de datos fue estimado utilizando el criterio Akaike Information Criterion (AIC) con el programa de cómputo jModelTest v.2 (Darriba *et al.*, 2012). Para la obtención del árbol de Máxima Verosimilitud se utilizó el modelo de sustitución GTRGAMMAI con el programa de cómputo RAxML v. 7.0.4 (Stamatakis, 2006). El soporte de los nodos fue evaluado con búsquedas de 1000 réplicas de remuestreo (bootstrap). Los árboles de ordenación (Dendrograma) obtenidos fueron editados con el programa FigTree v. 1.4.2. Las distancias genéticas entre las especies fueron estimadas con el método de distancias no corregidas “*p*” en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.5 (Tamura *et al.*, 2011).

Resultados

En el presente proyecto de investigación se reconocieron morfológicamente dos especies del género *Homalometron*, las cuales son nombradas como morfotipo 1 y morfotipo 2. Los especímenes del morfotipo 1, se encuentran distribuidos en 4 localidades del Golfo de México. El morfotipo 2, se restringe a una localidad del Mar Caribe en la localidad de Chetumal, Quintana Roo. A continuación, se describen los dos morfotipos.

Phylum: Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Clase: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclase: Digenea Carus, 1863

Orden: Plagiorchiida LaRue, 1957

Superfamilia: Apocreadioidea

Familia: Apocreadiidae Skrjabin, 1942

Subfamilia: Apocreadiidae Skrjabin, 1942

Especie: morfotipo 1

Sitio de infección: intestino

Hospedero tipo: *Eugerres plumieri*

La caracterización morfológica está basada en 16 ejemplares recolectados en 3 localidades: Tupilco, Tabasco; Ostión, Veracruz y Alvarado, Veracruz (Fig. 3. A-C; Tabla 2).

Los especímenes presentan un tegumento liso, ventosa oral subterminal muscular esférica, prefaringe larga visible, faringe de forma globular y musculosa por debajo se

extienden los ciegos que alcanzan la parte posterior del cuerpo, y la vesícula excretora en forma de I, ventosa ventral, circular musculosa situada en la parte media anterior del cuerpo, aparato reproductor conformado por dos testículos con márgenes irregulares situados en tándem, ovario sub esférico colocado a la izquierda, entre el receptáculo seminal y la glándula de Mehlis, el poro genital abre por debajo de la ventosa ventral, vesícula seminal situada del lado derecho, huevos presentes de 1-3, folículos vitelino confinados entre la bifurcación de los ciegos y alcanzan la parte posterior del cuerpo.

Phylum: Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Clase: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclase: Digenea Carus, 1863

Orden: Plagiorchiida LaRue, 1957

Superfamilia: Apocreadioidea

Familia: Apocreadiidae Skrjabin, 1942

Subfamilia: Apocreadiidae Skrjabin, 1942

Especie: morfotipo 2

Sitio de infección: intestino

Hospedero tipo: *Eugerres plumieri*

Los especímenes identificados como el morfotipo 2 fueron colectados en la isla Tamalacab, Chetumal, Quintana Roo, en el mar Caribe. La descripción está basada en 12 ejemplares (Fig. 3.D; Tabla 3).

Los ejemplares presentan tegumento liso, ventosa oral subterminal musculosa, prefaringe ausente, faringe pequeña globular y muscular, por debajo se sitúa la bifurcación

de los ciegos que alcanzan la parte posterior del cuerpo, ventosa ventral, circular musculosa situada en la parte media anterior del cuerpo, aparato reproductor conformado por dos testículos con márgenes lisos situados en tándem, ovario sub esférico colocado a la izquierda, entre el receptáculo seminal y la glándula de Mehlis, poro genital abre por debajo de la ventosa ventral, vesícula seminal situada del lado derecho, huevos presentes de 1-2, folículos vitelino confinados entre la bifurcación de los ciegos y alcanzan la parte posterior del cuerpo, vesícula excretora en forma de I.

Comentarios taxonómicos

Los especímenes del morfotipo 1, colectados en el Golfo de México difieren morfológicamente del morfotipo 2, colectados en el mar Caribe por presentar las siguientes características: prefaringe presente (morfotipo 1) vs prefaringe ausente (morfotipo 2), largo de los ciegos (625-1301 vs 454-117 μm), abertura del poro genital (8-29 vs 14-41 μm), forma de testículos (márgenes irregulares vs márgenes lisos), número de huevo en el útero (1-3 vs 1-2 μm) (ver Tabla 2 y 3; Figura. 3). Los ejemplares de los dos morfotipos recolectados presentaron un tegumento liso el cual es diagnóstico, mientras que las especies *H. mesoamericanum*, *H. armatum*, *Homalometron* sp. A, *Homalometron* sp. B, *H. palmeri*, *H. pallidum*, *H. ribosoni*, *H. frocioneae*, *H. elongatum*, *H. lesliorum*, *H. octopapillatum*, *H. currani* sp. y *H. microlophi* sp., presentan espinas tegumentales. Un rasgo morfológico a considerar es la ausencia de manchas oculares (estructuras sensoriales) en los morfotipos 1 y 2, mientras que las otras especies si presentan éstas estructuras (Tablas 2 y 3).

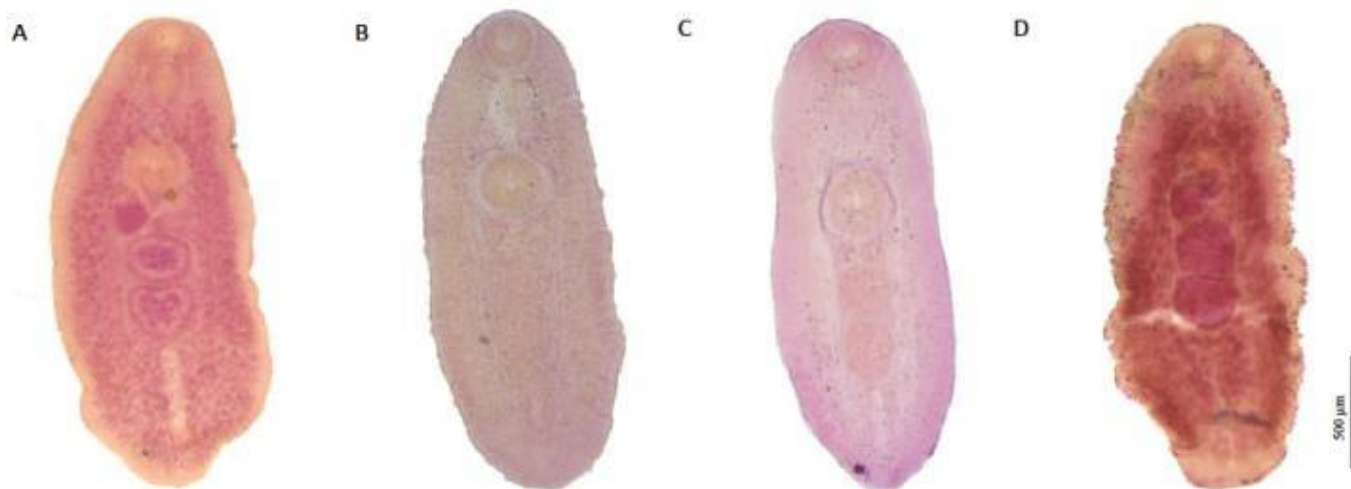


Figura 3. Los ejemplares A, B, C, fueron colectados en el Golfo de México y D, Mar Caribe. A) Alvarado, Veracruz, B) Tupilco, Tabasco, C) Ostión, Veracruz, D) Chetumal, Quintana Roo.

Tabla 2. Medidas de los ejemplares pertenecientes al Golfo de México. Las medidas están expresadas en micrómetros (μm).

	Homalometron morfortipo 1 N= 8	Homalometron morfortipo 1 N= 6	Homalometron morfortipo 1 N= 2
Hospedero	<i>Eugerres plumieri</i>	<i>Eugerres plumieri</i>	<i>Eugerres plumieri</i>
Localidad	Tupilco, Tabasco	Ostión, Veracruz	Alvarado, Veracruz

Cuerpo			
Largo	721-1794	740-	1469-1939
Ancho	271-600	272-653	640-878
Tegumento	Liso	Liso	Liso
Ciegos A) B)	A:625 Largo -		A:920-1301 Largo
Largo	B:598 Largo-	-	B:989-1283 Largo
Ancho	A:17 Ancho-		A:67-85 Ancho
	B:31 Ancho-		B:70-77 Ancho
Huevo			
N=	N= 1	N= 2-3	N=1-2
Largo	83	72-90	66-80
Ancho	12	41-58	58-92
Vesícula excretora			
Largo	91-196	98-198	253-387
Ancho	23-107	26-146	67-89
Poros genitales			
Largo	8-29	10-26	22-26
Ancho	12-18	12-23	18-21
Glándula de Mehlis			
Largo	32-85	25-51	61-
Ancho	39-87	14-78	93-
Ovario			
Largo	43-107	39-75	115-147
Ancho	46-107	34-90	117-148
Receptáculo seminal			
Largo	46-115	213 largo	111-185
Ancho	29-95	150 ancho	61-90
Vesícula seminal			
Largo	91-174	48-108	253-387
Ancho	23-107	38-76	67-89
Testículo anterior			
Largo	77-152	80-147	169-213
Ancho	69-175	83-183	206-281
Testículo posterior			
Largo	86-172	102-203	197-231
Ancho	83-164	79-196	208-278
Folículo vitelino	Debajo de la faringe a la parte subterminal del cuerpo	Debajo de la faringe a la parte subterminal del cuerpo	Debajo de la faringe a la parte subterminal del cuerpo
Ventosa oral			
Largo	68-151	86-651	159-170
Ancho	65-152	86-568	168-169
Ventosa ventral			
Largo	93-177	100-650	170-214
Ancho	94-190	99-724	179-235
Prefaringe			
Largo	18-68	20-170	-

Ancho	5-34	22-88	
Faringe	46-98	58-736	124-
Largo	47-86	57-331	108-

Las medidas obtenidas del morfotipo 2, se muestran en la tabla siguiente, en la cual se ha integrado la información previa y correspondiente de las especies descritas, de las descripciones originales.

Tabla 3. Medidas de los ejemplares del Mar Caribe (morfotipo 2) y de otras especies del género *Homalometron*

	<i>Homalometron</i> Morfotipo 2 N= 12	<i>Homalometron</i> <i>armatum</i> N= 12	<i>Homalometron</i> sp. A N= 13	<i>Homalometron</i> sp. B N= 10	<i>Homalometron</i> <i>palmeri</i> N= 13	<i>Homalometron</i> <i>pallidum</i> N= 13	<i>Homalometron</i> <i>ribosoni</i> N= 8	<i>Homalometron</i> <i>frocioneae</i> N= 14	<i>Homalometron</i> <i>elongatum</i>	<i>Homalometron</i> <i>lesliorum</i>	<i>Homalometron</i> <i>octopapillatum</i> sp. N= 12	<i>Homalometron</i> <i>mesoamericanum</i> sp. N= 11	<i>Homalometron</i> <i>currani</i> sp. N= 28	<i>Homalometron</i> <i>microlophi</i> sp. N= 12
Hospedero	<i>Eugerres plumieri</i>	<i>Lepomis gibbonus</i> <i>Aplodinotus grunniens</i> <i>Acipenser fulvescens</i>	<i>Aplodinotus grunniens</i>	<i>Lepomis microlophus</i>	<i>Micropogonias undulatus</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	<i>Fundulus notatus</i>	<i>Fundulus diphanus</i>	<i>Gerres cinereus</i>	<i>Eucinostomus currani</i>	<i>Cichlasoma beani</i>	<i>Vieja synspila</i> <i>Cichlasoma urophthalmus</i>	<i>Aplodinotus grunniens</i>	<i>Lepomis microlophus</i>
Localidad	Tamalacab, Chetumal	Ontario, Canadá	Mississippi, Estados Unidos	Mississippi, Estados Unidos	Mississippi, Estados Unidos	Massachusetts, Estados Unidos	Oklahoma, Estados Unidos	New York, Estados Unidos	Puerto Rico, Estados Unidos	Cuajiniquíl, Costa Rica	Nayarit, México	Tabasco, México	Mississippi, Estados Unidos	Mississippi, Estados Unidos
Cuerpo														
Largo	995-1794	1885-2802	2505-5893	1689-2330	1780-3705	1400-2273	1380-1879	924-1429	1797-3564	1628-2675	113-198	130-319	9429-3853	309-1683
Ancho	270-600	563-851	761-1820	386-720	450-954	427-673	414-467	227-438	214-424	234-424	264-462	400-890	largo	largo
Tegumento	Liso	Tegumento cubierto por	Tegumento relativamente delgado	Tegumento relativamente	Espinas robustas, largas, anchas	Espinoso, espinas delicadas en la	Espinas tegumentales, limitadas	Espinas presentes que terminan	Enteramente cubierto de	Cuerpo cubierto de	Tegumento cubierto por	Espinas en el tegumento	Tegumento con espinas	Tegumento con espinas

		espinas robustas	con espinas delicadas en la parte anterior, progresivamente más robustas en la parte posterior	delgado con espinas en toda la superficie	en forma de escamas en todo el cuerpo	parte anterior del cuerpo	en la parte anterior del cuerpo, representando un 13% del largo del cuerpo	en dorso ventral.	espinas pequeñas	pequeñas espinas	espinas muy delgadas, apenas visibles con microscopía óptica	, apenas visibles		
Ciegos A-B														
Largo	454-1117	-	-	-	-	128-312	-	-	-	-	A: 149-297	A:149-297	-	-
Ancho	487-1112 17-55 27-63					donde termina el cuerpo					B:198-287	B:198-287		
Huevo														
N=	N=1	N= 2-14					N=17							
Largo	42	80-108	89-107	86-113	N= 1-21	N= 11-28	aproximadamente	N= 2-8	74-91	77-91	N= 61	N= 85	-	-
Ancho	18	54-74	51-71	67-72	91-116	93-108	91-111	66-77	42-57	48-65	51-70	73-93		
					56-71	57-72	49-58	45-54			42-57	45-56		
Ducto hermafrodita														
Largo	-	50-195 largo	161-273 largo	161-210 largo	97-124 largo	91-136	67-176 largo	38-70 largo	43	60 largo	-	-	-	-
Ancho						31-42			28-37					
Conducto eyaculador														
Largo	8	-	-	-	-	-	-	-	105-163	-	-	-	-	-
Ancho	30								10					

Manchas oculares	Ausentes	-	Difusas presentes en la mitad anterior del cuerpo	-	Resto de manchas oculares presentes	Restos de manchas presentes	Remanentes presentes en la región faríngea, difusos	Remanentes difusos	-	-	-	-	-	-
Vesícula excretora	73-283 46-158	-	En forma de I, ocupando el paso intercecal, post-testicular	En forma de I, se extiende hasta el nivel del testículo posterior	-	-	En forma de I, región post-testicular	En forma de I, región post-testicular	En forma de I, en el espacio post-testicular	En forma de I, en la región posterior a los testículos	86-157 72-113	En forma de I, terminando o el espacio post-testicular	-	-
Poros genitales	14-41 14-51	-	-	-	-	-	8-16 anterior a la ventosa ventral	8-12 posterior al margen de la ventosa ventral	-	-	-	-	-	-
Glándula de Mehlis	26-75 24-84	-	-	-	-	-	Ocupa espacio entre el ovario y el testículo anterior	-	-	-	-	-	-	-
Ovario	26-75 24-84	121-188 123-219	139-314 164-356	78-149 82-160	128-267 150-239	79-145 78-167	65-127 anterior al margen del testículo anterior	69-118 72-100	94-173 82-153	85-182 88-145	75-105 64-99	60-190 66-183	19-240 17-201	20-96 21-103
Pars prostático	-	150-200 largo	114-236 largo	62-82 largo	104-186 largo	131-148 largo	48-83 largo	-	-	-	-	-	-	-

Largo														
Ancho														
Receptáculo seminal														
Largo	66-302 60-122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35-210 14-113	28-97 12-48
Ancho														
Vesícula seminal														
Largo	44-196 49-165	-	-	-	Se extiende hasta el nivel de ovario	-	113-176 64-109	71-111 58-87	136-221 74-105	151-199 88-142	-	-	38-356 20-192	31-115 17-82
Ancho														
Testículo anterior														
Largo	69-268 81-259	200-357 266-435	247-562 356-1087	164-289 184-384	173-446 167-357	108-267 113-279	86-148 94-167	93-144 93-149	165-352 145-246	116-296 125-190	130-254 134-234	133-283 133-299	42-334 59-546	35-183 43-201
Ancho														
Testículo posterior														
Largo	84-208 76-235	219-431 548-838	263-589 432-1154	184-286 200-384	206-468 178-401	110-334 105-279	116-197 91-156	109-151 108-158	193-391 151-262	139-379 134-193	157-264 144-250	127-310 140-308	50-377 64-599	40-197 44-212
Ancho														
Folículo vitelino	Por debajo de la faringe hasta la parte subtermin	Rodean el ciego, confluyente en la región	-	Circunda nte a la ceca, confluyente en el margen	Confluyente en la región post- testicular	Dividido en lo extensos campos laterales	-	De la ventosa ventral a la región post- testicular	Se extiende n anterior mente en la región	Se extiende n anterior mente hasta la	De la ventosa ventral al final del cuerpo	-	-	-

	al del cuerpo	post- testicular		posterior de la ventosa ventral					de la vesícula seminal	ventosa ventral				
Ventosa oral	60-157 73-143	196-278 215-301	199-360 234-368	186-227 160-243	167-267 156-256	159-234 142-228	154-187 157-184	131-198 124-176	156-223 162-218	125-207 162-213	128-181 123-171	134-275 152-287		
Largo														
Ancho														
Ventosa ventral	91-203 89-195	235-438 254-462	328-540 328-572	211-305 211-302	210-329 206-340	184-267 184-251	162-206 168-201	153-202 163-225	128-187 134-185	125-199 131-199	132-202 134-189	148-304 150-318		
Largo														
Ancho														
Prefaringe	24-46 14-32	42-109 largo	20-70 largo	39-86 largo	45-156 largo	37-109 largo	28-60 largo	18-60 largo	130-187 largo	larga 45-125 ancho	18-99 largo	7-66 largo		
Largo														
Ancho														
Faringe	50-118 33-81	98-133 98-148	107-223 112-212	86-102 52-102	85-140 74-139	83-106 83-100	83-106 83-100	70-96 59-82	68-102 65-99	45-91 51-85	51-153 34-129	80-193 60-160		
Largo														
Ancho														
Esófago	-	Aproxima damente la mitad de la faringe	55-117 largo	31-74 largo	34-100	-	75-106 largo	51-98 largo	99-219 largo	116-190	39-80 largo	26-129 largo		
Largo														
Ancho														
Saco del cirro	-	-	-	-	Ausente	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	-		
Largo														
Ancho														

Largo														
Ancho														

Análisis filogenéticos y distancias genéticas

En el presente proyecto de investigación se generaron secuencias del ADN nuclear de los espaciadores transcritos internos (ITS1, ITS2, más el 5.8S) y del 28S de los genes ribosomales. El alineamiento de los ITS, estuvo conformado por 47 secuencias, 12 generadas en este trabajo y las restantes fueron obtenidas de la base de datos del Genbank. El alineamiento, contenía 1,045 pares de bases. El análisis filogenético inferido con máxima verosimilitud mostró que el género *Homalometron* es monofilético (Fig. 4A). Los especímenes identificados como morfotipo 1, conformaron un subclado el cual es hermano de un subclado conformado por cinco secuencias del morfotipo 2. La cercana relación entre ambos subclados fue apoyada por altos valores del remuestreo (bootstrap; 100 %). Las distancias genéticas estimadas para las secuencias que conforman el morfotipo 1, osciló entre el 0 al 0.2 %, mientras que las distancias genéticas de las secuencias que conforman el morfotipo 2, fue del 0 al 0.3 %. Finalmente, las distancias genéticas entre las secuencias de los dos morfotipos osciló entre el 3.3 al 3.6 % para los ITS.

El segundo alineamiento, está conformado por 43 secuencias, incluyendo 10 nuevas secuencias del 28S del ADN ribosomal generadas en este trabajo. El análisis filogenético inferido con máxima verosimilitud, confirmó que el género *Homalometron* es monofilético (Fig. 4B). Los especímenes identificados como morfotipo 1, conformaron un subclado el cual es hermano de un subclado conformado por tres secuencias del morfotipo 2. La cercana relación entre ambos subclados fue apoyada por altos valores del remuestreo (bootstrap; 100 %). Las distancias genéticas estimadas para las secuencias que conforman el morfotipo 1, osciló entre el 0 al 0.05 %, mientras que las distancias genéticas de las secuencias que

conforman el morfotipo 2, fue del 0 al 0.007 %. Finalmente, las distancias genéticas entre las secuencias de los dos morfotipos osciló entre el 1.1 al 1.3 % para el 28S.

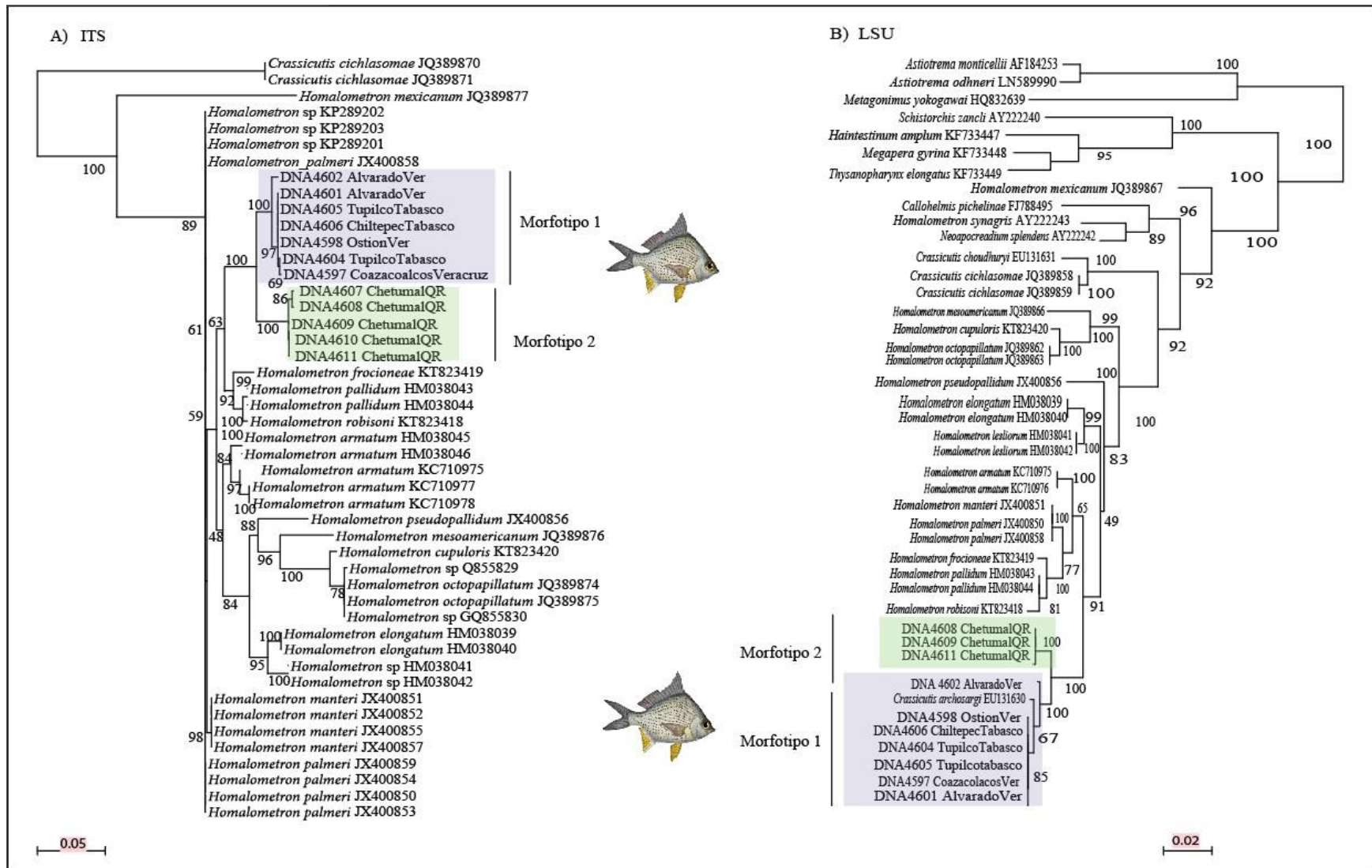


Figura 4. Árbol filogenético del género *Homalometron*, morfotipo 1 y morfotipo 2, secuencias ADN de las regiones ITS (4A) y LSU (4B).

Discusión

El género *Homalometron* está conformado por 33 especies distribuidas en todo el mundo, asociados a peces marinos, dulceacuícolas y salobres. En el continente americano se han descrito 10 especies, que representa el 30.3 % de la biodiversidad del género, de las cuales 6 especies se han registrado en la región Neártica y otras 4 especies en la región Neotropical, particularmente dos en Centro América y dos en Sur América (Fayton *et al.*, 2016).

En el presente proyecto de investigación se reconocieron dos morfotipos del género *Homalometron* que presenta las siguientes características morfológicas: tegumento espinoso, ventosa oral subterminal, ventosa ventral pre-ecuatorial, pre-faringe corta en ocasiones más larga que la faringe, esófago corto o largo. Ciegos intestinales que surgen entre las ventosas y terminan en la parte posterior del cuerpo. Testículos, en tándem, oblicuos u opuestos, saco del cirro ausente. Poro genital mediano, inmediatamente anterior a la ventosa ventral. Ovario liso o profundamente lobulado. Folículo vitelino extenso, restringido a la parte anterior o posterior del cuerpo. Vesícula excretora en forma de I, corta y algunas veces puede extenderse anteriormente al testículo posterior o al ovario; poro excretor terminal o dorsal o subterminal ventral. Huevos no embrionados (Cribb & Bray 2005).

Los dos morfotipos reconocidos fueron comparados con especies previamente descritas (ver Tabla 2), por lo que consideramos que se tratan de dos especies nuevas para la ciencia que se describirán en el futuro empleando la taxonomía integrativa, es decir incorporando información proveniente de diferentes fuentes como, datos moleculares, morfológicos, ecológicos y ultraestructurales. El morfotipo 1, fue registrado en 4 localidades

del Golfo de México (Alvarado, Ostión, Veracruz y Tupilco, Tabasco); mientras que, el morfotipo 2, está restringido a una sola localidad (Isla Tamalacab) del mar Caribe. Cabe mencionar que, ambos morfotipos fueron recolectados en la mojarra rayada (*Eugerres plumieri*), la cual se distribuye desde Estados Unidos de América, en Carolina del Norte, Florida y Golfo de México hasta Brasil, alimentándose de insectos acuáticos, crustáceos, micro bivalvos y detritus. Sin embargo, la mojarra rayada tiene una preferencia alimenticia por el bivalvo *Mytilopsis sallei* (Morton, 1989). Aunque ambos morfotipos comparten el mismo huésped definitivo, estos no se distribuyen simpátricamente. Consideramos dos factores determinantes que se deben de tomar en cuenta para entender este patrón de distribución de estos dos morfotipos y son los siguientes. 1) el huésped intermediario (molusco) el cual es fundamental en el ciclo de vida de estas especies, pueden ser diferente en los dos morfotipos de *Homalometron*, 2) las corrientes marinas del Golfo de México y Mar caribe pueden ser claves en la distribución de los 2 morfotipos ya que las corrientes pudieron haber aislado las poblaciones ancestrales y que en combinación con fuerzas evolutivas promovieron la divergencia dando origen a estas dos nuevas especies.

Las diferencias morfológicas detectadas en los dos morfotipos de *Homalometron* fueron corroboradas con los datos genéticos generados en el actual proyecto de investigación. Los dos árboles filogenéticos obtenidos fueron fundamentales y claves, debido a que las secuencias de ADN de cada morfotipo formaron dos clados o linajes independientes dentro del género *Homalometron*, apoyando contundentemente las dos nuevas entidades, las cuales recibieron un soporte de remuestreo del 100% en ambos análisis filogenéticos. La divergencia genética detectada entre las secuencias de los dos morfotipos, fue de 3.3-3.6 % con el ITS y del 1.1-1.3 % con el 28S del ADN ribosomal. Estos valores de divergencia son

menores entre otras especies congénicas, por ejemplo, los valores de divergencia entre *H. papillatum* y *H. mesoamericanum* fue de 4.61-4.81 con el ITS (Pérez-Ponce de León *et al.* 2021), En contraste, la divergencia genética entre otras cuatro especies de *Homalometron* osciló entre 2.5 -8.7 % con ITS y del 0.8-3.2 % con 28S del ADN ribosomal (Parker *et al.* 2010). Aunque las distancias genéticas pueden oscilar entre las especies del género *Homalometron*, éstas representan una fuente de evidencia adicional, que en combinación con otras fuentes de información como caracteres morfológicos, ecológicos, moleculares y datos biogeográficos, deben ser empleados para entender mejor a las especies candidatas o linajes que permitirán describir y comprender mejor a las especies.

Conclusiones

1. Se reconocieron dos morfotipos que fueron clasificados dentro del género *Homalometron* asociados al pez *Eugerres plumieri*.
2. El morfotipo I, se encuentra distribuido en 4 localidades del Golfo de México.
3. El morfotipo II, se encontró en una sola localidad (Isla Tamalacab) del mar Caribe.
4. Las diferencias morfológicas encontradas entre los dos morfotipos, fueron corroborados con las distancias genéticas estimadas.
5. Los análisis filogenéticos obtenidos con datos moleculares, indicaron que las muestras de los morfotipos I y II, formaron dos entidades independientes dentro del género *Homalometron*.
6. Los resultados derivados de este proyecto de investigación revelaron la presencia de dos entidades nuevas e independientes que en un futuro serán reconocidas como especies nuevas para la ciencia en México.

Bibliografía

- Adlard, R. D., Barker, S. C., Blair, D., & Cribb, T. H. (1993). Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of *Fasciolidae* (Digenea). *International Journal for Parasitology*, 23, 423-425.
- Barger, M., & Wellenstein, D. (2015). Morphological Confirmation of *Homalometron* (Trematoda: Apocreadiidae) Species in Freshwater Fishes in Southeastern Texas, U.S.A., with Description of Two Species. *Comparative Parasitology*.82(2), 248-253.
- Bell, A. S., & Sommerville, C. (2002). Molecular evidence for the synonymy of two species of *Apatemon* Szidat, 2928, *A. gracilis* (Rudolphi, 1819) and *A. annuligerum* () (Digenea: Strigeidae) parasitic as metacercariae in British fishes. *Journal of Helminthology*, 76(3), 193-198.
- Bowles, J., & McManus, D., P. (1993). NADH dehydrogenase 1 gene sequence compared for species and strains and strains of genus *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology*, 23(7), 969-972.
- Bray, R.A., Justine, J.L., & Cribb T., H. (2007). *Homalometron moraveci* n. sp. (Digenea: Apocreadiidae) in the yellowfin goatfish, *Mulloidichthys vanicolensis* (Valenciennes, 1831) Perciformes: Mullidae), from New Caledonia and the Great Barrier Reef, with a checklist of digeneans of *Mulloidichthys* species. *Zootaxa*,1525(1525), 41-49.
- Brusca, R., & Brusca, G. (2003). *Invertebrate*. Sunderland: Massachusetts.

- Carreno, R., A., & Nadler, S., A. (2003). Phylogenetic analysis of the *Metastrongyloidea* (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 89(5), 965-973.
- Cribb, T. H., & Bray, R. A. (1999). A review of the Apocreadiidae Skrjabin, 1942 (Trematoda: Digenea) and description of Australian species. *Systematic Parasitology*, 44, 1-38.
- Cribb, T. H., Bray, R. A., Littlewood, T., Pichelin, S. P., & Herniou, E. A. (2001). The Digenea. *Interrelationships of the Platyhelminthes*, 168-185.
- Cribb, T. H. (2005). Family Apocreadiidae Skrjabin, 1942.
- Curran, S. S., Tkach, V.V., & Overstreet, R. M. (2013). A new species of *Homalometron* (Digenea: Apocreadiidae) from fishes in the Northern Gulf of Mexico. *Journal of Parasitology*, 99(1), 93-101.
- Darriba, D., Taboada, G., L., Doallo R., & Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772.
- Dobson, A., Lafferty, K., D., Kuris, A., M., Hechinger, R., F., & Jetz, W. (2008). Homage to Linnaeus: how many parasites? How many hosts? *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 105(1), 11482-11489.
- Eickbush, T. H., & Eickbush, D. G. (2007). Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175(2), 447-485.
- Fayton, T. J., Curran, S. S., Andres, M. J., Overstreet, R. M., & McAllister, C. T. (2016). Two new species of *Homalometron* (Digenea: Apocreadiidae) from Nearctic

- freshwater fundulids, elucidation of the life cycle of *H. cupuloris*, and molecular phylogenetic analysis of some congeners. *Journal of Parasitology*, *102*(1), 94-104.
- García-Prieto, L., Mendoza-Graffías, B., & Pérez-Ponce de León, G. (2013). Biodiversidad de Platyhelminthes parásitos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*, 164-170.
- García-Varela, M., & Nadler, S. A. (2005). Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, *91*(6), 1401-1409.
- Gibson, D. I., Jones, A., & Bray, R. A. (2002). Keys to the Trematoda Volume I. Wallingford, UK: CAB International and Natural History Museum.
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, *66*, 411-453.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, *17*, 754-755.
- Jiménes, L., & Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular* (págs. 3-37). México: Pearson Educación.
- Jones, A., Bray, RA y Gibson, DI (Eds.). (2005). *Keys to the trematoda*. Vol. 2 pág. 733. Wallingford: CABI.
- Jousson, O., Pawlowski, J., Zaninetti, L., Meinesz, A., & Boudouresque, C. F. (1998). Molecular evidence for the aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progres Series*, *172*, 275-280.

- Karp, G. (2011). *Biología Celular y Molecular conceptos y experimentos* (6a.) (págs. 386-457). McGraw Hill México.
- Konh, A. & Fernandes, B. M. (1981) The Adult form of *Himasthla piscícola* Stunkard, 1960 and other trematodes from Brazilian freshwater fishes. *Journal of Helminthology*, 55, 85-87.
- López M., F., Domínguez, D. & Costa S., J. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PloS one*, 12(12), e0290152.
- Luton, K., Walker, D., & Blair, D. (1992). Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 56, 323-327.
- Macnish, M., G., Ryan, U., M., Behnke, J., M., & Thompson. R., C., A. (2003), Delection of the rodent tapeworm *Rodentolepis* (= *Hymenolepis*) microstoma in humans. A new zoonosis? *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1079-1085.
- Manter, H., W. (1954). Some digenetic trematodes from fishes of New Zealand. In *Transactions of the Royal Society of New Zealand*, 82(2), 475-568.
- Martorelli, S., R. (1986). Estudios parasitologico en biotipo lenticos de la República Argentina II: El ciclo biológico de *Homalometron pseudopallidum* sp. nov. (Digenea), parasite de *Gymnogeophagus australis* (Eigenmann, 1907) (Pisces: Cichlidae). *Neotrópica*, 32, 3-12.
- MacCallum, W. G. (1895). On the anatomy of two distome parasites of freshwater fish. *The Veterinary Magazine*, (2):401-412.

- McManus, D. P., & Bowles, J. (1996). Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *International Journal for Parasitology*, 26, 687-704.
- Manter, H. W. (1947). The digenetic trematodes of marine fishes of Tortugas, Florida. *American Midland Naturalist*, 257-416.
- Morton B. (1989). Life-history characteristics and sexual strategy of *Mytilopis sallei* (Bivalvia: Dressenacea) introduced into Hong Kong. *Journal of Zoology* 219(3), 469-485.
- Nolan, M. J., & Cribb, T. H. (2005). The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Advance in Parasitology*, 60, 101-163.
- Ostrowski de Núñez, M., Arredondo, J. N., & Gil de Pertierra, A., A. (2017) Adult Trematodes (Platyhelminthes) of freshwater fishes from Argentina: a checklist. *Revue Suisse de Zoologie*, 124(1), 91-113.
- Overstreet, R. M., & Hawkins, W. E. (2009). Trematoda (Platyhelminthes) of the Gulf of Mexico. 419-486 in Felder, D.L. and D.K. Camp (eds), *Gulf of Mexico-Origins, Waters, and Biota. Biodiversity*. Texas A&M Press, Collage Station, Texas.
- Overstreet, R. M., & Hawkins, W. E. (2017). Diseases and mortality of fishes and other animals in the Gulf of Mexico In. *habitat and biota of the Gulf of Mexico: before the deepwater horizon oil spill*, 1589-1738. Springer, New York, NY.

- Palacio, J. (1977). Invertebrados del área estuárica de la Ciénega Grande de Santa Marta con énfasis en la fauna acompañante de *Crassostrea rhizophore*. (Guilding). *Instituto de Investigaciones Marinas punta de Betin, Santa Marta, Tesis de Grado*, 1-151.
- Parker, J., H., Curran, S., S., Overstreet, R., M., & Tkach V.V. (2010) Examination of *Homalometron elongatum* Manter, 1947, and description of a new congener from *Eucinostomus currani* Zahuranec, 1980 in the Pacific Ocean off Costa Rica. *Comparative Parasitology*, 77,154-163.
- Pérez-Ponce de León, G., García- Prieto, L., &Mendoza-Garfias, B. (2007). Trematode parasites (Platyhelminthes) of wildlife vertebrates in Mexico. *Zootaxa*, 1534(1), 1-247.
- Pérez-Ponce de León, G., Razo-Mendivil, U., & García- Magaña, L. (2012). Morphological and molecular evidences for the existence of two new species of *Homalometron* (Digenea: Apocreadiidae), parasites of cichlids (Osteichthyes: Cichlidae). *Zootaxa*, 37-48.
- Pérez-Ponce de León G. & Velázquez-Urrieta Y. (2021). Morphological and molecular assessment of the diversity of trematode communities in freshwater gastropods and bivalves in Los Tuxtlas tropical rainforest. *Journal of Helminthology*, 95.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 817-818.
- Poulin, R. (2014). Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *International Journal for Parasitology*, 44, 581-589.

- Ramsey, J. S. (1965). *Barbulotomum cupuloris* gen. et. sp. n. (Trematoda: Lepocreadiidae) from Sunfishes (*Lepomis* spp.) in lake Pontchartrain, Louisiana. *The Journal of Parasitology*, 777-780.
- Razo-Mendivil, U., Vázquez Domínguez, E., Rosas-Valdez, R., Pérez-Ponce de León, G., & 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.
- Roberts, L. S., & Janovy, JR, J. (2000). Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. In *Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts 'foundations of Parasitology*.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson A., R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Stamatakis, A. (2006). RaxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses which thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(1), 2688-2690.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.

Thompson, J., Gibson T., Plewnlak F., & Higgins, D. (1997) The ClustalW X windows interface; flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882.