

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



Caracterización morfológica y molecular de *Opecoelus adsphaericus* (Opecoelidae: Opecoelinae): parásito de *Clinocottus analis* (Scorpaeniformes: Cottidae) en Baja California, México

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Arturo Rincon Sandoval

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, 23 DE SEPTIEMBRE DE 2024

Ensenada, Baja California, México 2024

Tesis defendida por

Arturo Rincon Sandoval

Y aprobada por el siguiente comité



Dr. Andrés Martínez Aquino
Director de tesis



Dr. Carlos Alberto Flores López
Codirector de tesis



Dr. Gorgonio Ruiz Campos
Miembro de comité



Dra. Fadia Sara Ceccarelli
Miembro de comité



Dra. Ma. Leopoldina Aguirre Macedo
Miembro de comité

Arturo Rincon Sandoval © 2024

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

RESUMEN

Resumen de la tesis que presenta Arturo Rincon Sandoval como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

“Caracterización morfológica y molecular de *Opecoelus adsphaericus* (Opecoelidae: Opecoelinae): parásito de *Clinocottus analis* (Scorpaeniformes: Cottidae) en Baja California, México.”

Resumen aprobado por:



Dr. Andrés Martínez Aquino
Director de Tesis


La familia de trematodos Opecoelidae cuenta con más de 900 especies descritas, de las cuales solo 98 de ellas cuentan con datos moleculares. El pez *Clinocottus analis* es la especie más abundante en el intermareal rocoso de Baja California, alberga cuatro especies de parásitos Opecoelidos: *Opecoelus adsphaericus*, *O. cameroni*, *O. pacificus* y *O. caballeroi*, las cuales solo han sido estudiadas de manera puntual hace más de 50 años. El objetivo de este estudio es caracterizar a nivel morfológico y molecular a *Opecoelus adsphaericus* como parásito de *C. analis* en la costa noroeste de Baja California, México. Se examinaron un total de 93 ejemplares de *Clinocottus analis*: 77 de la localidad de El Mosquito (EM), en la ciudad de Ensenada, y 16 de Playa Piedra Blanca (PPB) de Ejido Eréndira. Mil treinta y seis especímenes de *O. adsphaericus* fueron recolectados de EM y 38 de PPB, sin identificar otras especies del mismo género. Se llevó a cabo la tinción de 44 individuos; 40 de EM y 4 de PPB, y la separación en tres grupos de tallas (pequeños, medianos y grandes). Posteriormente, se realizaron análisis morfométricos mediante PCA, crecimiento alométrico y descripción taxonómica. Además, se generaron dibujos de línea de preparaciones permanentes y se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido. La extracción y amplificación del gen ADNr 28S y de la región del BarCode (COI) fueron realizadas, seguidas de análisis filogenéticos y genética de poblaciones. Los análisis morfológicos revelaron una amplia variación en *O. adsphaericus*, sin detectar una separación entre las tres tallas analizadas y un crecimiento alométrico positivo en la longitud cuerpo anterior y posterior, y negativo en el largo de testículo anterior y posterior. Por primera vez, *O. adsphaericus* fue colocada sobre un marco filogenético de Opecoelidae, ubicándose dentro del clado de la subfamilia Opecoelinae y teniendo como grupo hermano al género *Opegaster*. Los resultados genético-poblacionales identificaron una amplia diversidad de haplotipos. *Opecoelus adsphaericus* presenta amplio polimorfismo y diversidad haplotípica genética sin relación a las tallas observadas.

ABSTRACT

Summary of the thesis presented by Arturo Rincon Sandoval as a partial requirement to obtain the degree of Master of Science.

"Morphological and molecular characterization of *Opecoelus adsphaericus* (Opecoelidae: Opecoelinae): Parasite of *Clinocottus analis* (Scorpaeniformes: Cottidae) in Baja California, Mexico."

Summary approved by:



Dr. Andrés Martínez Aquino
Director de Tesis

The trematode family Opecoelidae includes more than 900 described species, of which only 98 have molecular data. The fish *Clinocottus analis* is the most abundant species in the rocky intertidal zone of Baja California, serving as the host for four species of Opecoelid parasites: *Opecoelus adsphaericus*, *O. cameroni*, *O. pacificus*, and *O. caballeroi*, which have only been studied sporadically more than 50 years ago. The objective of this study is to provide a morphological and molecular characterization of *Opecoelus adsphaericus* as a parasite of *Clinocottus analis* on the northwestern coast of Baja California, Mexico. A total of 93 specimens of *Clinocottus analis* were examined: 77 from the locality of El Mosquito (EM), in the city of Ensenada, and 16 from Playa Piedra Blanca (PPB) in Ejido Eréndira. From the dissected specimens of *C. analis*, 1,036 *Opecoelus adsphaericus* parasites were collected from the EM locality and 38 from PPB, with no other species from the same genus identified. Staining was performed on 44 individuals; 40 from EM and 4 from PPB, and they were categorized into three size groups (small, medium, and large). Subsequently, morphometric analyses were conducted using PCA, allometric growth, and taxonomic description. Additionally, line drawings of permanent mounts were made, and scanning electron microscopy images were obtained. DNA extraction and amplification of the 28S rDNA gene and the Barcode region (COI) were carried out, followed by phylogenetic and population genetic analyses. Morphological analysis revealed a wide variation in *O. adsphaericus*, without detecting a separation among the three analyzed size groups and showing positive allometric growth in the anterior and posterior body lengths, and negative allometric growth in the lengths of the anterior and posterior testis. For the first time, *O. adsphaericus* was placed within a molecular phylogenetic framework, positioning it within the clade of the subfamily Opecoelinae and identifying *Opegaster* as its sister genus. Population genetic results identified a wide diversity of haplotypes. *Opecoelus adsphaericus* exhibits extensive polymorphism and haplotypic genetic diversity that is unrelated to the observed sizes.

DEDICATORIA

A mi padre y madre, por todo el sincero cariño, comprensión, regaños, escarmientos y apoyo incondicional que me han brindado en todas mis ocurrencias, aventuras y por venir a lo largo de mi vida. Gracias por TODOS sus sacrificios, esfuerzo y ser los mejores padres, hoy y siempre.

A mis grandes amigos, colegas y considerados como hermanos mayores, M.C. Pei, Biól. Carlos Pan, por todas esas charlas, risas, ideas, ocurrencias, salidas de campo, regaños y apoyo incondicional que me han brindado. Gracias por ser y estar siempre.

A Biól. Maureen L. por su amistad, cariño y estar presente.

A la futura QFB. Aylin C. por su gran amistad a pesar de la distancia, los regaños y cariño brindado incondicionalmente.

Agradezco profundamente a Lic. En Nanotecnología Yunuhen, por todo el cariño sincero, compañía y el apoyo en inglés.

A mis amigos de infancia, biólogo y futuro M.C. Alejandro L., Ing. Alonso C. y mi taquero favorito Christopher R.

A mis mascotas Lili y Chaesy por ser las mascotas mas fieles, todo el cariño y apoyo en crisis emocionales.

Por ultimo, a todas esas personas que en algun momento fueron, y las son actualmente una parte importante de mi vida, gracias.

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MYDCI) de la Facultad de Ciencias (FC) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por brindarme la oportunidad y el apoyo necesario para desarrollar mi formación académica.
- Agradezco también al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (número #1569233633), la cual fue fundamental para la realización de mis estudios de maestría.
- Mi más sincero agradecimiento es para mi tutor y director de tesis, el Dr. Andrés Martínez Aquino, por su invaluable orientación, apoyo incondicional y confianza durante el desarrollo de este proyecto. Así como apoyo para la participación en el 6to Congreso Internacional Meredith Gould en Ensenada, México en 2023.
- Asimismo, agradezco al Dr. Carlos Flores López, mi codirector, por sus correcciones, sugerencias y acompañamiento en este proceso.
- Extiendo mi gratitud a mis sinodales, la Dra. Fadia Sara Ceccarelli, la Dra. Leopoldina Aguirre Macedo y el Dr. Gorgonio Ruiz Campos, por sus valiosas aportaciones y correcciones que enriquecieron este trabajo.
- Agradezco al Laboratorio de Biología Evolutiva de Parásitos (BEP) de la Facultad de Ciencias, UABC, por su apoyo y recursos durante este proceso.
- Agradezco al Director Dr. Alberto Leopoldo Moran y Solares y posgrado de MYDCI de la FC de la UABC por la gestión de apoyo para la participación en el congreso XVII Congreso Nacional y IX Simposio Latinoamericano de Ictiología en La Paz, Mexico, 2023.
- Especial agradecimiento al M.C. Adrián Garduño Martínez y a la Biól. Aimeé Del Río Trujillo, compañeros de posgrado, por su apoyo invaluable en campo y en las disecciones parasitológicas, que fueron esenciales para el desarrollo de este trabajo. También les agradezco por las charlas y las risas compartidas en el laboratorio, que hicieron de este proceso una experiencia más llevadera y agradable.
- Mi agradecimiento se extiende también al Departamento de Biología de la Conservación y a la División de Biología Experimental y Aplicada del Posgrado de Ciencias de la Vida

de El Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, por su colaboración y valiosas aportaciones.

- Un gran agradecimiento al Técnico Ocean. Eulogío López Reyes del departamento de biología de la conservación de CICESE, por todo el apoyo y charlas brindadas.
- Agradezco a M.C. LeRoy Sankey por todo el apoyo durante la preparación de placas de ADN, charlas y risas durante el laboratorio y salidas de campo.
- Deseo expresar mi agradecimiento al Laboratorio de Patología Acuática del Departamento de Recursos del Mar de El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Mérida, Yucatán. Agradezco especialmente a los profesores investigadores Dra. Leopoldina Aguirre Macedo y Dr. Víctor M. Vidal Martínez, por su orientación y apoyo.
- También quiero agradecer a Q.F.B. Clara Vivas Rodríguez, M.C. Oscar Arturo Centeno Chale y Ocean. Francisco Pue Itzá, por compartir sus conocimientos en las técnicas de tinción y trabajo de campo durante mi estancia de investigación en agosto de 2022.
- Un agradecimiento especial al M.C. Jhonny García Teh por su apoyo en las técnicas de dibujo y por sus recomendaciones en los análisis estadísticos y el procesamiento de muestras para SEM.
- Extiendo también mi gratitud a los compañeros y amigos del posgrado del Laboratorio de Patología Acuática, Dra. Linda Marmolejo Guzmán, M.C. Itzel Nayely Badillo Del Río y Dr. Aarón Hernández Núñez, por su apoyo en las técnicas de tinción, preparación de muestras para SEM, disecciones y valiosas recomendaciones durante este proyecto.
- Finalmente, expreso mi agradecimiento al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del Departamento de Física Aplicada de CINVESTAV - Unidad Mérida, por su valiosa colaboración durante mi investigación.
- A todos los que han contribuido de alguna manera en este camino, mis más sinceros agradecimientos.

CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Familia <i>Opecoelidae</i>	1
1.2. Subfamilia <i>Opecoelinae</i>	3
1.2.1. <i>Opecoelus</i> vs <i>Opegaster</i>	4
1.3. Registros de <i>Opecoelus</i> y <i>Opegaster</i> en México.....	6
1.3.1. Aproximaciones integrativas de análisis morfológicos y moleculares en trematodos...	8
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
5. MATERIALES Y METODOS	19
5.1. Obtención de peces	19
5.2. Disección de peces para la obtención de trematodos.....	20
5.3. Parámetros de infección.....	21
5.4. Técnica de tinción	21
5.5. Análisis morfométrico.....	22
5.6. Técnica de microscopia electrónica de barrido.....	25
5.7. Extracción de ADN y amplificación del gen nuclear 28S y mitocondrial <i>BarCode</i>	25
5.8. Análisis de reconstrucción filogenética con datos moleculares	27
5.8.1. Gen nuclear 28S.....	27
5.8.2. Gen mitocondrial <i>BarCode</i>	31
5.8.2.1. <i>BarCode</i> : Variación genética poblacional	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1. Caracterización morfológica de <i>Opecoelus adsphaericus</i> en Baja California (Figuras 3 – 6) 33	
6.2. Parámetro de infección.....	45
6.3. Análisis de componentes principales.....	46

6.4.	Análisis de crecimiento alométrico para la localidad de El Mosquito.....	48
6.5.	Reconstrucción filogenética con el gen 28S.....	52
6.6.	Variación genética poblacional usando el <i>BarCode</i>	54
7.	DISCUSIÓN.....	61
7.1.	Variación morfológica intraespecífica: repercusiones taxonómicas y recomendaciones.	61
7.2.	Variación morfológica intraespecífica de <i>Opecoelus adsphaericus</i> en Baja California.....	63
7.3.	Crecimiento alométrico.....	66
7.4.	Posición filogenética 28S.....	68
7.5.	Genética de poblaciones <i>BarCode</i>	70
8.	CONCLUSIONES.....	71
9.	PERSPECTIVAS.....	71
10.	REFERENCIAS.....	72
11.	ANEXOS.....	84

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Registros del género <i>Opecoelus</i> y <i>Opegaster</i> en las costas de Baja California.....	7
Cuadro 2. Registros de helmintos parásitos de <i>Clinocottus analis</i> en las costas de California y Baja California.	11
Cuadro 3. Lista de taxa y secuencias utilizadas para el análisis filogenético del gen 28S para la familia Opecoelidae en este estudio. GenBank = Número de acceso. Clado B, Clado C, y Grupo Inacertado I y Grupo Inacertado II, son taxa sin clasificar siguiendo a Bray <i>et al.</i> (2016), Martin <i>et al.</i> (2017; 2020a, b).	29
Cuadro 4. Medidas morfométricas en micras (μm) para <i>O. adsphaericus</i> en el hospedero <i>Clinocottus analis</i> y las especies de <i>Opecoelus</i> registradas para el mismo hospedero. Se menciona entre paréntesis en dos letras la abreviatura de cada atributo morfológico analizado y corresponde con los acrónimos mencionados para el Análisis de Componentes Principales (PCA).....	38
Cuadro 5. Parámetros de infección de <i>O. adsphaericus</i> en <i>C. analis</i> en El Mosquito (EM) y Playa Piedra Blanca (PPB). EvM# = Número de evento de muestreo desde EM y PPB; #p = Número de parásitos, He = Hospederos examinados, Hp = Hospederos parasitados, P (%) = Prevalencia en porcentaje, IP = Intensidad Promedio, AP = Abundancia Promedio, IAM = Individuos para Análisis Morfométricos. Tallas: Pe = Pequeña (< 1000 μm), M = Mediana (> 1000 < 2000 μm), G = Grande (2000 – 3200 μm).	45
Cuadro 6. Valores de crecimiento alométrico de <i>Opecoelus adsphaericus</i> en el Mosquito (EM), Baja California. Valores de la constante (α), exponente alométrico (b) con error estándar ($\pm\text{ES}$), coeficiente de correlación (r), t de <i>student</i> (t) para r, y probabilidad (p) de t. <i>Fb</i> = Cuerpo anterior; <i>Hb</i> = Cuerpo posterior; <i>Ta</i> = Testículo anterior y <i>Tp</i> = Testículo posterior.	51
Cuadro 7. Matriz de distancias genéticas calculada por el método de <i>p-distances</i> (valores en porcentajes) con secuencias del gen 28S para taxa relacionados de Opecoelinae a partir de análisis de reconstrucción filogenética de Inferencia Bayesiana y de Máxima Verosimilitud.	54
Cuadro 8. Secuencias obtenidas de <i>Opecoelus adsphaericus</i> para los genes 28S y <i>BarCode</i> en <i>Clinocotus analis</i> desde distintos sitios de infección, localidades y eventos de muestreo. #e = Número de espécimen secuenciado; #h = Número de hospedero examinado; Si = Sitio de infección; CP = Ciego Pilórico; INT = Intestino; EST = Estómago; #EM = Número de evento de muestreo; EM = El Mosquito; PPB = Playa Piedra Blanca; GenBank# = Número de acceso de GenBank para las secuencias generadas en este estudio; #ha = Número de haplotipo para secuencias del gen <i>BarCode</i> . Pg (a) = Paragonoforo tipo microfotografía de parásito secuenciado, Pg (b) = Paragonoforo tipo microfotografía de SEM, Pg (c) = Paragonoforo tipo preparación permanente de parásito del mismo hospedero, d = ilustración de parásito del mismo hospedero (siguiendo la terminología de Pleijel <i>et al.</i> , 2008). Tallas observadas para <i>O. adsphaericus</i> : Pe = Pequeña (< 1000 μm); M = Mediana (> 1000 < 2000 μm); G = Grande (> 2000 < 3200 μm).	55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-** Ciclo de vida de *Opecoelus variabilis* siguiendo a Cribb (1986). Hi I= Primer hospedero intermediario, Hi II= Segundo hospedero intermediario, Hd = Hospedero definitivo. 3
- Figura 2.** Mapa de los sitios de muestreo de *Clinocottus analis* para la recolecta de *Opecoelus adsphaericus* en Ensenada, Baja California (B.C.), México..... 20
- Figura 3.** *Opecoelus adsphaericus* de *C. analis* desde El Mosquito (EM), Ensenada, Baja California, México. **A** = Talla pequeña < 1000 μm ; **B – E** = Talla mediana > 1000 < 2000 μm ; **F – G** = Talla grande > 2000 < 3200 μm . Cada individuo ilustrado de *O. adsphaericus* proviene de distintos eventos de muestreo de EM (EM#) y diferentes sitios de infección (ie., Cp = Ciego pilórico; Int = Intestino). **A** = EM7–Cp, **B** = EM7–Cp; **C** = EM7–Cp; **D** = EM4–Int; **E** = EM5–Int; **F** = EM8–Cp; **G** = EM8–Cp. La enumeración de cada EM# corresponde con lo mencionado en el **Cuadro 5**. La abreviatura de cada carácter morfológico señalado en la figura se menciona en el **Cuadro 4**. Barra de escala = 100 μm 41
- Figura 4.** Imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido del cuerpo completo de ejemplares adultos de *Opecoelus adsphaericus*. **A** = EM8 – Cp – Talla Pequeña, **B** = EM7 – Cp – Talla Pequeña, **C** = EM8 – Cp – Talla Mediana, **D** = EM8 – Cp – Talla Pequeña, **E** = EM7 – Cp – Talla Pequeña, **F** = EM8 – Int – Talla Pequeña, **G** = PPB – Int – Talla Pequeña. La enumeración de cada EM# corresponde con lo mencionado en el **Cuadro 5**. Cp = Ciegos pilóricos. Int = Intestino. PPB = Playa Piedra Blanca. Barra de escala = 100 μm 42
- Figura 5.** Imágenes de microscopia de barrido de ejemplares adultos de *Opecoelus adsphaericus*. **A** = EM8 – Int, **B** = EM8 – Cp, **C** = EM8 – Cp. La enumeración de cada EM# corresponde con la mencionada en el **Cuadro 5**. Cp = Ciegos pilóricos. Int = Intestino. Se presentan pequeñas papilas aleatorias alrededor de la ventosa oral: **A** mostrando 14 [flechas blancas]; **B** mostrando 11 [flechas blancas] y **C** mostrando 12 grupos papilares [flechas blancas]. Barra de escala: 10 μm 43
- Figura 6.** Imágenes de microscopia electrónica de barrido de ejemplares adultos de *Opecoelus adsphaericus*. La enumeración de cada EM# corresponde con la mencionada en el **Cuadro 5**. Cp = Ciegos pilóricos. Int = Intestino. PPB = Playa Piedra Blanca. **A** = EM8 – Cp, **B** = EM7 – Cp, **C** = EM8 – Cp, **D** = EM8 – Cp, **E** = EM7 – Cp, **F** = PPB – Int. **A – F** muestran variación y disposición de las papilas sésiles sobre la ventosa ventral. **A)** Espécimen con ventosa ventral con tres pares de papilas sésiles [flechas blancas]; **B)** Espécimen con ventosa ventral con tres pares de papilas sésiles, tres en la parte anterior y tres en la parte posterior [flechas blancas]; **C)** Espécimen con ventosa ventral y papilas sésiles invaginadas [flechas blancas]; **D)** Espécimen con ventosa ventral protuberante con papilas sésiles [flechas blancas]; **E, F)** Dos especímenes con ventosa ventral con tres pares de papilas sésiles entrecruzados, respectivamente [flechas blancas]. Barra de escala = 100 μm 44
- Figura 7.** Gráfica de barras mostrando las tallas en centímetros (cm) para *Clinocottus analis* en la localidad de El Mosquito (EM; n = 77) y Playa Piedra Blanca (PPB; n = 16). La barra vertical en negro indica la desviación estándar de cada atributo morfológico medido. Lt = Longitud total; Lp = Longitud patrón; Alt = Altura. 46
- Figura 8.** Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con ocho variables morfométricas de 44 especímenes de *O. adsphaericus* distribuidos en tres grupos (i.e., grupo grande, mediano y pequeño) para la localidad de El Mosquito (EM); adicionalmente se incluyeron los individuos de Playa Piedra Blanca (PPB) que incluyo especímenes con talla pequeña y mediana. PC1 y PC2 explican el 80.46% de la varianza. Los acrónimos y símbolos de los grupos se muestran sobre la figura. Las líneas en verde se refieren a la importancia de las variables analizadas como se mencionó en el

Anexo 2. Las medidas fueron tomadas desde especímenes recolectados en ocho eventos de muestreo en EM y uno en PPB como se mencionó en el Cuadro 4 .	47
Figura 9. Regresión bivariada de <i>Opecoelus adsphaericus</i> en el Mosquito (EM), Baja California. Eje X = Longitud del cuerpo (Lc); Eje Y = largo del Cuerpo anterior (Fb). Los símbolos y las medidas de las tallas se refieren sobre esta misma figura. Los valores de la ecuación se mencionan en el Cuadro 6 .	48
Figura 10. Regresión bivariada de <i>Opecoelus adsphaericus</i> en el Mosquito (EM), Baja California. Eje X = Longitud del cuerpo (Lc); Eje Y = largo del Cuerpo posterior (Hb). Los símbolos y las medidas de las tallas se refieren sobre esta misma figura. Los valores de la ecuación se mencionan en el Cuadro 6 .	49
Figura 11. Regresión bivariada de <i>Opecoelus adsphaericus</i> en el Mosquito (EM), Baja California. Eje X = Longitud del cuerpo (Lc); eje Y = largo del Testículo anterior (Ta). Los símbolos y las medidas de las tallas se refieren sobre esta misma figura. Los valores de la ecuación se mencionan en el Cuadro 6 .	50
Figura 12. Regresión bivariada de <i>Opecoelus adsphaericus</i> en el Mosquito (EM), Baja California. Eje X = Longitud del cuerpo (Lc); eje Y = largo del Testículo posterior (Tp). Los símbolos y las medidas de las tallas se refieren sobre esta misma figura. Los valores de la ecuación se mencionan en el Cuadro 6 .	51
Figura 13. Árbol de consenso estricto obtenido por Inferencia Bayesiana a partir de secuencias parciales del gen 28S para taxones de la familia Opecoelidae. Los acrónimos de las nuevas secuencias de <i>Opecoelus adsphaericus</i> (en negritas) corresponden a los mencionados en el Cuadro 8 . Los círculos negros y blancos sobre los nodos de las ramas indican la probabilidad posterior ($PP \geq 0.95$) y los valores del <i>ultrafast bootstrap</i> ($UFBoot2 \geq 75$), respectivamente. La barra en la parte inferior izquierda del árbol representa la distancia de sustitución nucleotídica.	53
Figura 14. Árbol de consenso estricto obtenido por Inferencia Bayesiana a partir de secuencias del gen BarCode para <i>Opecoelus adsphaericus</i> . Los acrónimos de las nuevas secuencias de <i>O. adsphaericus</i> (en negritas) corresponden a los mencionados en el Cuadro 4. Los círculos negros y blancos sobre los nodos de las ramas indican la probabilidad posterior ($PP \geq 0.95$) y los valores de <i>ultrafast bootstrap</i> ($UFBoot2 \geq 75$), respectivamente. EM# = Secuencias obtenidas a partir de individuos de la localidad de El Mosquito desde distintos eventos de muestreo; PPB = secuencias obtenidas a partir de individuos de Playa Piedra Blanca (para más detalle ver Cuadro 8). La barra en la parte inferior izquierda del árbol representa la distancia de sustitución nucleotídica.	57
Figura 15. Curva de acumulación de haplotipos de <i>Opecoelus adsphaericus</i> observados desde El Mosquito y Playa Piedra Blanca, Baja California, México.	58
Figura 16. Red de haplotipos de <i>O. adsphaericus</i> observados desde El Mosquito y Playa Piedra Blanca, Baja California, México. Los círculos enumerados representan los haplotipos individuales, el tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos que representa cada haplotipo (para más detalle ver Cuadro 8). El número de mutaciones entre cada haplotipo se muestran como líneas cortas que conectan la línea entre cada haplotipo. Los colores de los círculos representan las diferentes localidades como se observa en la simbología.	59
Figura 17. Mapa de la distribución geográfica de los haplotipos encontrados en <i>Opecoelus adsphaericus</i> en el gen BarCode en El Mosquito (EM) y Playa Piedra Blanca (PPB), Baja California, México. Cada haplotipo se representa por un color en los gráficos de pastel circulares. El tamaño de los círculos de los gráficos de pastel es proporcional al número de individuos que comparten el haplotipo y se encuentra en cada localidad.	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Gráfica de sedimentación. Explicación de la variación total del análisis de componentes principales. PC1 + PC2 explican el 80.715% de la variación total.	84
Anexo 2. Gráfica de cargas de componentes principales 1. Las variables del largo y ancho de ventosa ventral (Vv) y ancho del ovario (Ov) son las que presentaron valores de cargas con mayor importancia. Acrónimos de variables mencionados en el Cuadro 4	85
Anexo 3. Gráfica de cargas de Componentes Principales 2. Las variables del largo de ventosa ventral (Vv) y ovario (Ov) son las que presentaron valores de carga con mayor importancia. Acrónimos de variables mencionados en Cuadro 4	86
Anexo 4. Valores de crecimiento alométrico de <i>Opecoelus adpshaericus</i> . Valores de la constante logarítmico de α ($\text{Log } \alpha$), exponente alométrico (b) con error estándar, coeficiente de correlación (r), "t" de <i>student</i> para r, y probabilidad (p) de t. <i>Fb</i> = Cuerpo anterior; <i>Hb</i> = Cuerpo posterior; <i>Ta</i> = testículo anterior y <i>Tp</i> = testículo posterior.	86
Anexo 5. Árbol filogenético obtenido por Máxima Verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen 28S para taxones de la familia Opecoelidae. Los valores frente a los nodos indican los porcentajes del <i>ultrafast bootstrap</i> ($\text{UFBoot2} \geq 75$). La barra representa la distancia de sustitución nucleotídica.	87
Anexo 6. Árbol filogenético obtenido por Máxima Verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen <i>BarCode</i> para <i>O. adsphaericus</i> y el género <i>Plagioporus</i> spp. Los valores frente a los nodos indican los porcentajes del <i>ultrafast bootstrap</i> ($\text{UFBoot2} \geq 75$). La barra representa la distancia de sustitución nucleotídica.	88

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Familia Opecoelidae

La familia Opecoelidae Ozaki, 1925 (Platyhelminthes: Trematoda) es altamente diversa, cuyos miembros parasitan una amplia cantidad de peces teleósteos marinos y dulceacuícolas a nivel mundial (Martin *et al.*, 2020a), y ocasionalmente algunos anfibios (Cribb, 2005). Esta familia cuenta con más de 900 especies válidas incluidas en 93 géneros (Littlewood *et al.*, 2015, Sokolov *et al.*, 2022). En los últimos 10 años, se han realizado cuatro estudios filogenéticos con datos moleculares (i.e., secuencias de ADN de los genes 28S y 18S) para 98 especies de 46 géneros, incluidas en 12 subfamilias (Bray *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2018a, 2020a, b; Sokolov *et al.*, 2022; WoRMS, 2024), lo que representa el 10% de su diversidad específica descrita. Con base en dichos estudios, se ha desarrollado un marco filogenético molecular para Opecoelidae, y se denota que parte de la clasificación taxonómica de sus especies aún no ha sido esclarecida, en parte debido a la falta de datos moleculares de opecoelidos de muchas regiones del mundo (Bray *et al.*, 2016).

La familia Opecoelidae incluye 14 subfamilias (WoRMS, 2024) dentro de las cuales se encuentra la subfamilia Opecoelinae, la cual incluye los géneros *Opecoelus* y *Opegaster* que han estado en controversia por décadas y cuyos límites morfométricos son variables muy probablemente por el alto polimorfismo en las especies que conforman estos géneros (Manter 1940, 1954; Crowcroft, 1974; Banerjee, 1965; Mehra, 1966; Prudhoe y Bray 1973; Cribb 1985, Bray 1987, Shimazu, 1988; Bray y Cribb 1989). De aquí la relevancia de estudiar un número considerable de especímenes recolectados de una sola especie de hospedero y de diferentes muestreos al menos a lo largo de un año para que se pueda visualizar a través de la caracterización molecular la gran variabilidad morfométrica de estos trematodos.

El ciclo de vida general de Opecoelidae se compone por dos hospederos intermediarios y uno definitivo; los hospederos intermediarios tipo I (Hi I) son caracoles prosobranquios, mientras que los hospederos intermediario tipo II (Hi II) están compuestos por peces y una amplia variedad de invertebrados como insectos, moluscos y principalmente crustáceos; los hospederos definitivos (Hd) son generalmente teleósteos

marinos y dulceacuícolas de distintas familias (Cribb, 2005). Los huevos son expulsados por medio de las heces del Hd, y de ellos se liberará un miracidio como larva ciliada de vida libre que infecta al Hi I. Dentro del Hi I, el miracidio se transforma en esporocisto madre, una etapa asexual que libera esporocistos hijas o redias que su vez producen cercarias, un estadio larvario que se caracteriza por presentar ventosa oral y ventral bien desarrolladas, así como glándulas de penetración, un estilete que esta incrustado en la ventosa ventral y la ausencia de manchas oculares. Las cercarias penetran al Hi II y se convierten en metacercarias en el que puede o no enquistarse; las metacercarias suelen estar bien desarrolladas y se asemejan al parásito adulto (Hickman, 1934; Shimazu, 1971; Holton, 1984). La metacercaria es ingerida por el Hd, alojándose generalmente en los intestinos y ciegos intestinales donde se desarrolla y madura sexualmente para convertirse en adulto (Cribb, 2005).

El ciclo de vida conocido para una especie de Opecoelidae (i.e., *Opecoelus variabilis* Cribb, 1985) muestra que es autogénico (i.e., que se desarrolla en ambientes acuáticos) y complejo, en el que participa una gran variedad de Hi y Hd en sus distintas etapas de desarrollo. Por ejemplo, en su primera fase de desarrollo los miracidios de *O. variabilis* penetran y se convierten en esporocistos madre, lo que desarrolla redias dentro del Hi I (un caracol prosobranquio; e.g., *Posticobia brazieri* Smith, 1882), del cual se liberan cercarias de vida libre que penetran al Hi II; la cercaria se desarrolla y se convierte en metacercaria parasitando a diferentes familias de crustáceos como las de Atyidae, Parastacidae y Palaemonidae (Hi II), y son ingeridas por distintos teleósteos (Hd) dulceacuícolas australianos (Hd) donde se convierten en adultos (Cribb, 1985) (**Figura 1**).

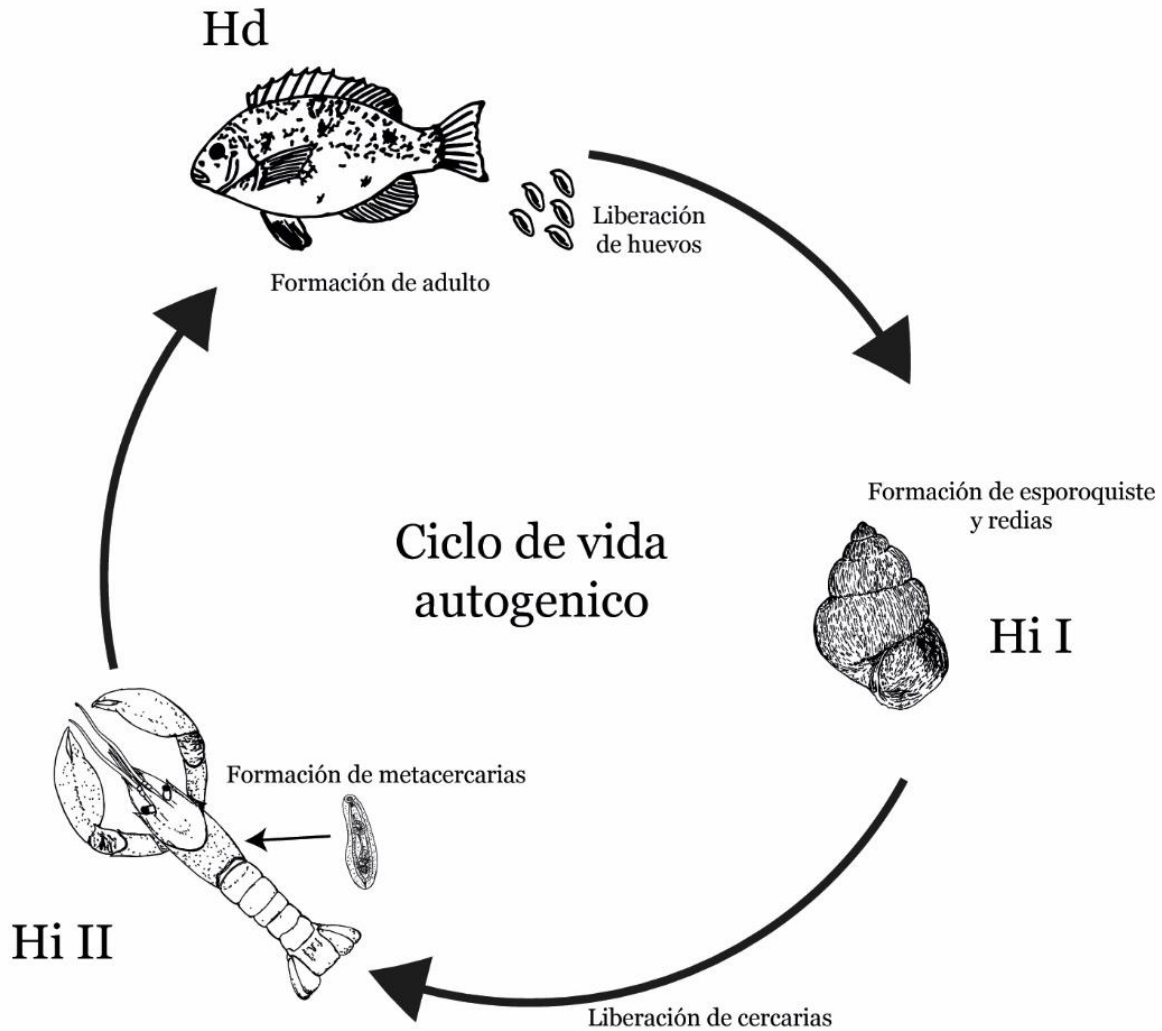


Figura 1.- Ciclo de vida de *Opecoelus variabilis* siguiendo a Cribb (1986). Hi I= Primer hospedero intermediario, Hi II= Segundo hospedero intermediario, Hd = Hospedero definitivo.

1.2. Subfamilia Opecoelinae

La subfamilia Opecoelinae Ozaki, 1925, incluye parásitos de teleósteos dulceacuícolas, salobres y marinos, con una amplia distribución principalmente en el Océano Pacífico (Shimazu, 1988; Cribb, 2005). Este taxón se caracteriza morfológicamente por poseer una vesícula seminal desnuda y la ausencia de receptáculo seminal, así como la presencia de papilas en la ventosa ventral (Gibson y Bray, 1982; Jones *et al.*, 2005). En esta subfamilia se incluyen 240 especies distribuidas en 22 géneros (Cribb, 2005). Los datos filogenético-moleculares para Opecoelinae son escasos, solo se han puesto a prueba las relaciones

filogenéticas para ocho especies de cinco géneros (i.e., *Anamalotrema*, *Discoverytrema*, *Dimerosaccus*, *Opecoeloides* y *Pseudopecoeloides*) (Bray *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2020b), lo que representa un 3% de la diversidad conocida de opecoelinos (Opecoelinae).

1.2.1. *Opecoelus* vs *Opegaster*

La historia taxonómica de las especies de los géneros opecoelinos *Opecoelus* Ozaki, 1925 y *Opegaster* Ozaki, 1928 ha sido controversial por presentar alta similitud morfológica (Manter 1940, 1954; Crowcroft, 1974; Banerjee, 1965; Mehra, 1966; Prudhoe y Bray 1973; Cribb 1985, Bray 1987, Shimazu, 1988; Bray y Cribb 1989). Su alta similitud se deriva de inadecuadas descripciones de especies debidas principalmente a escasos tamaños de muestra y/o sutiles diferencias morfológicas, aunado a una alta sobreposición de los intervalos de las medidas de los caracteres morfológicos provistos (ver Aken´Ova, 2007; Bray y Justine, 2013).

Debido a que las especies de *Opecoelus* y *Opegaster* son muy similares, algunos autores han sugerido sinonimizar *Opegaster* con *Opecoelus* (Crowcroft, 1974; Cribb, 1985; Shimazu, 1988; Aken´Ova, 2007). Por ejemplo, Aken´Ova (2007) reubicó 33 especies de *Opegaster* a *Opecoelus* y propuso 11 grupos morfológicos para la clasificación de las especies de *Opecoelus*, con base en la extensión anterior de los folículos vitelinos, la extensión posterior de la vesícula seminal y a la naturaleza de los testículos y del ovario. Aken´Ova (2007) reconoce que algunas de las especies de *Opecoelus* presentan variación morfológica, por lo que podrían entrar en dos o más grupos de su clasificación.

Seis años después, Bray y Justine (2013) implementaron un “tabulador de proporciones para 16 caracteres morfológicos” para diferenciar especies dentro de *Opegaster*. Con ello, de las 33 especies que fueron reubicadas por Aken´Ova (2007) de *Opegaster* a *Opecoelus*, Bray y Justine (2013) retuvieron 28 en *Opegaster*, las cuales son reconocidas en WoRMS (2024). Tanto la clasificación morfológica sugerida por Aken´Ova (2007) para *Opecoelus*, como la de Bray y Justine (2013) para *Opegaster*, están basadas en datos obtenidos desde las descripciones morfológicas originales y no mencionan la revisión de material de referencia de alguna colección parasitológica reconocida a nivel

internacional. Con base en la literatura publicada hasta la fecha para las especies de *Opecoelus* y *Opegaster*, es evidente que no se ha realizado algún estudio que analice y/o compare el material tipo de las 73 especies de estos géneros (WoRMS 2024) para apoyar su validez taxonómica. Cribb (2005) comentó que el uso de los nombres de ambos géneros está extremadamente arraigado en la literatura, por lo que es necesaria su distinción filogenética. Bray y Justine (2013) coinciden con Cribb (2005) y argumentan que ambos géneros deben ser usados hasta que se genere un marco filogenético con datos moleculares que pueda diferenciar a sus especies.

El género *Opecoelus* y *Opegaster* se caracterizan porque ambos presentan 1) *saco del cirro reducido*, 2) *un ano común*, y 3) *papilas simples en la abertura de la ventosa ventral*. Sin embargo, *Opegaster* se diferencia por la presencia de folículos vitelinos que se extienden hasta la parte anterior del cuerpo. Este último carácter es considerado con valor de fiabilidad equivoca, por lo que debe ser tomado con precaución (ver Cribb 1985, 2005; Shimazu, 1988). Así, los géneros *Opecoelus* y *Opegaster* solo se diferencian por la distribución de los folículos vitelinos; en *Opecoelus* se extienden hasta el origen de la ventosa ventral, mientras que en *Opegaster* se extienden hasta la parte media anterior del cuerpo (Cribb, 2005). A la fecha, *Opecoelus* y *Opegaster* incluyen 41 y 32 especies taxonómicas válidas, respectivamente (WoRMS 2024a, b).

A pesar de que se ha detectado que las especies de *Opecoelus* y *Opegaster* presentan una alta variación morfológica (Manter y Pritchard, 1960; Cribb 1985; Prudhoe y Bray, 1973; Aken'Ova, 2007), la mayoría de ellas no han sido revisadas con base en estudios morfológicos a nivel intraespecífico e interespecífico, y no han sido caracterizadas con datos moleculares a nivel específico o poblacional, ni puesto a prueba sus especies sobre un contexto filogenético (Bray y Justine, 2013). Hasta el momento, solo se cuenta con información molecular de dos secuencias de ADN del gen 28S, una para la metacercaria del género *Opecoelus* (Bennett *et al.*, 2022) y una para un taxa sin fase de desarrollo determinado del género *Opegaster* (Pérez-Ponce de León y Hernández-Mena, 2019). Desafortunadamente, para dichas fuentes de información molecular, no se cuenta con

acceso de ejemplares de referencia en ninguna colección parasitológica que apoye su identidad taxonómica.

1.3. Registros de *Opecoelus* y *Opegaster* en México

En México, han sido registradas seis y cuatro especies del género *Opecoelus* y *Opegaster*, respectivamente, en al menos 20 especies de peces teleósteos. De ellas, cinco especies de *Opecoelus* y una de *Opegaster* se han registrado parasitando a seis especies de peces marinos en la Península de Baja California (Ver **Cuadro 1**).

Cuadro 1. Registros del género *Opecoelus* y *Opegaster* en las costas de Baja California.

PARÁSITO	LOCALIDAD	HOSPEDERO	REFERENCIA
Opecoelinae			
<i>Opecoelus inimici</i> Yamaguti, 1934	Isla Cedros, Baja California	<i>Paralabrax nebulifer</i>	Manter (1940)
<i>Opecoelus mexicanus</i> Manter, 1940	Isla Ángel de la Guarda, Baja California	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	Arai (1962)
<i>Opecoelus minor</i> Yamaguti, 1934	Bahía de Ensenada, Baja California	<i>Sebastes</i> sp.	Sin referencia
<i>Opecoelus</i> sp.	Localidad entre Isla Coronado y Bahía de San Quintín, Baja California	<i>Sebastes rosaceus</i>	Alvarado-Villamar y Ruiz-Campos (1992)
<i>Opegaster paraprastipomatis</i> Yamaguti, 1938	Bahía Todos Santos, Baja California	<i>Paralichthys californicus</i>	Castillo-Sánchez <i>et al.</i> (1998)

1.3.1. Aproximaciones integrativas de análisis morfológicos y moleculares en trematodos

Algunos estudios en trematodos han implementado aproximaciones integrativas de análisis morfológicos y moleculares para resolver problemas taxonómicos cuando las diagnósticos son sutiles al momento de diferenciar dos o más grupos taxonómicos; por ejemplo, especies cogenéricas y/o especies intergenéricas (Villora-Montero *et al.*, 2020; Corner *et al.*, 2022). Así, cuando la delimitación de especies presenta dificultades al momento de diferenciarlas debido a que pueden presentar un amplio polimorfismo y/o una mala diagnóstico taxonómica de origen, puede ser abordada de acuerdo a Bray *et al.* (2022) como sigue: 1) Monofilia recíproca detectada al nivel más inclusivo del marcador molecular con mayor poder discriminante (i.e., secuencias de ADN nuclear, ribosomal y/o mitocondrial); 2) Diferencias morfológicas consistentes con relación a otras especies; 3) Distribución del hospedero consistente desde sus parientes cercanos. Este último punto puede implicar diferenciación de patrones de especificidad hospedatoria, y diferenciación dentro y entre los intervalos de distribución geográfica de los hospederos.

Además de los criterios de Bray *et al.* (2022), existen otros métodos de análisis morfológicos como el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés *Principal Componente Analysis*). El PCA es una técnica estadística que se utiliza para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos mientras se conserva la mayor cantidad de variación posible. El PCA se ha utilizado para agrupar diferentes especies de parásitos basándose en caracteres morfométricos, permitiendo diferenciar, sinonimizar y delimitar especies nuevas con base en tamaños o rasgos similares, tal es el caso de especies de trematodos marinos como *Plesiochorus irwinorum* Corner, Booth & Cutmore, 2022 diferenciándolo de *P. cymbiformis* (Rudolphi, 1819) Looss, 1901 y *Plesiochorus elongatus* Pigulevsky, 1953 (Corner *et al.*, 2022).

Por otra parte, el crecimiento alométrico se refiere a cómo diferentes partes del cuerpo crecen a distintas tasas en relación con el tamaño total del organismo. El crecimiento alométrico positivo ocurre cuando una parte del cuerpo crece a una tasa más rápida que el crecimiento general del cuerpo, mientras que la alometría negativa se da cuando una parte

del cuerpo crece más lentamente que el resto, provocando una disminución proporcional de su tamaño. En contraste, la isometría describe un crecimiento en el que todas las partes del cuerpo crecen a la misma tasa, manteniendo proporciones constantes (Huxley, 1993). Los análisis de crecimiento alométrico son útiles para entender cómo crecen distintas partes del cuerpo de un parásito en relación con su tamaño total (Fischthal, 1978a, b; 1979). Por ejemplo, en trematodos marinos el crecimiento alométrico positivo ha sido registrado en la región anterior del cuerpo de *Metadena globosa* (Linton, 1910) Manter, 1947 y *Euclinostomum heterostomum* Rudolphi, 1809 (Fischthal, 1980; Jhansilakshmibai y Madhavi, 1997), y en la región posterior de *Apocreadium mexicanum* Manter, 1937 y *Stenopera equilata* Manter, 1933 (Fischthal, 1978a, b). En contraste, *A. mexicanum* y *S. equilata* muestran un crecimiento alométrico negativo en órganos sexuales masculinos (i.e., testículos), mientras que en *Asymphylogora fishelsoni* Fischthal, 1979 se ha observado un crecimiento alométrico positivo en los testículos (Fischthal, 1979). Lo anterior destaca una gran ventaja al implementar análisis alométricos en trematodos con alto polimorfismo, porque permiten identificar y describir sus variaciones morfométricas asociadas al crecimiento de sus diversas estructuras corporales.

1.4. Intermareal rocoso de Baja California: *Clinocottus analis*

El intermareal rocoso es un ecosistema que se localiza entre la interfase del hábitat marino y terrestre, y que está bajo la influencia de la bajamar y altamar (Horn y Martin, 2005). El intermareal rocoso de Baja California (BC), México (MX) y California (USA) forma parte de una región biogeográfica marino-costera denominada “Región Californiana”, que a su vez incluye la provincia biogeográfica “San Dieguina” (*sensu* Briggs, 1974).

En el intermareal de la Bahía de Todos Santos, BC, se han realizado múltiples estudios sobre la diversidad ictiológica y registrado 48 especies de teleósteos (Ruiz-Campos *et al.*, 2009, 2010). La especie *Clinocottus analis* Girard, 1958 (Scorpaeniformes, Cottidae) o “charrasco lanudo”, es el teleósteo más abundante en el intermareal rocoso de la Península de Baja California (Ruiz-Campos *et al.*, 2010). Al norte, la distribución del charrasco lanudo abarca desde Cabo Mendocino, California (USA) y llega al Sur hasta Punta Asunción, Baja

California Sur (BCS) (incluyendo Isla de Cedros e Isla Guadalupe) (Miller y Lea, 1972). En Point Fermin, California, la madurez sexual de *C. analis* se ha registrado en tallas a partir de los 60 mm de longitud total, con base en observaciones de gónadas bien desarrolladas en ambos sexos (Wells, 1986). La dieta carnívora de *C. analis* constituye pequeños invertebrados como crustáceos de los órdenes Amphipoda, Isopoda y Decapoda (Brachyura); así como poliquetos, moluscos e insectos. También se le ha registrado algas marinas como parte de su dieta (Ruiz-Campos, 1986; Wells, 1986; Ruiz-Campos y Hammann, 1991; Acosta-Zamorano 2009).

El intermareal de la costa de la playa de Ejido Eréndira (Playa Piedra Blanca) es una costa expuesta, en ésta se han realizado distintos estudios de la comunidad de macroinvertebrados del intermareal rocoso de distintas partes de Baja California (Canales-Gómez, 2012; Salas-Garza *et al.*, 1989). Se ha registrado la presencia de *C. analis* en Playa Piedra Blanca en Ejido Eréndira (Ruiz-Campos *et al.*, 2010); sin embargo, no se han realizado estudios detallados sobre las comunidades de peces de esta localidad, así como la diversidad parasitaria de éstos.

1.5. Registros de helmintos parásitos de *Clinocottus analis*

A la fecha, se han registrado 11 especies de trematodos parasitando el intestino de *C. analis* desde las costas del sur de California (USA), Islas del Pacífico Sur de USA, Península de Baja California e Islas aledañas (México) (ver **Cuadro 2**). Las 11 especies de trematodos se reparten en tres familias: Hemiuridae, Haplosporididae y Opecoelidae. Esta última familia incluye tres subfamilias: Helicometrinae, Opecoelinae y Podocotylineae. Solo una especie de nematodo de la familia Cystidicolidae ha sido registrada como parásita en el estómago de *C. analis*, desde Ensenada, Baja California a Punto Fermín, Los Ángeles County, California, USA (ver **Cuadro 2**).

Cuadro 2. Registros de helmintos parásitos de *Clinocottus analis* en las costas de California y Baja California.

PARÁSITO	LOCALIDAD	HÁBITAT	REFERENCIA
TREMATODA			
Fam. Hemiuridae			
<i>Genolinea anura</i> (Layman, 1930) Manter, 1954	California, USA	Estómago	Anneraux (1947)
<i>Genolinea laticauda</i> Manter, 1925	California Central, USA	Estómago	Nahhas (1976)
Fam. Haplospalchnidae			
<i>Schikhalotrema girellae</i> (Manter y Van Cleave, 1951) Skrjabin y Guschanskaja, 1955	Punta Morro, Ensenada, B.C., México	Intestino	Garduño-Martínez (2023)
Fam. Opecoelidae			
Opecoelinae			
<i>Dactylostomum winteri</i> Caballero y Caballero, 1971	Laguna Beach, California, USA	Mucosa de intestino anterior	Caballero y Caballero R. (1976)
<i>Opecoelus adsphaericus</i> Manter y Van Cleave, 1951	La Jolla, California, USA	Intestino	Manter y Van Cleave (1951)
<i>Opecoelus adsphaericus</i>	Point Fermin, California, USA	Intestino	Wells (1986)
<i>Opecoelus adsphaericus</i>	Bahía San Francisquito, B.C., México	Intestino	Arai (1962)
<i>Opecoelus adsphaericus</i>	Bahía Magdalena, B.C.S., México	Intestino	Arai (1962)
<i>Opecoelus adsphaericus</i>	Punta Morro, Ensenada, B.C., México	Intestino, estómago y ciegos pilóricos	Garduño-Martínez (2023)
<i>Opecoelus cameroni</i> (Caballero C. y Caballero R., 1969) Aken´Ova, 2007	Laguna Beach, California, USA	Intestino	Caballero C. y Caballero R., 1969
<i>Opecoelus pacificus</i> Caballero C. y Caballero R., 1976	Isla Catalina, California, USA	Intestino	Caballero C. y Caballero R., 1976
<i>Opecoelus caballeroi</i> Caballero-Rodríguez, 1977	Isla Catalina, California, USA	Intestino	Caballero-Rodríguez, 1977

Helicometrinae				
<i>Helicometrina nimia</i> Linton, 1910	La Jolla, California, USA	Intestino	Manter y Van Cleave, 1951	
<i>Helicometrina nimia</i>	Sur de California, USA	Intestino	Yamaguti, 1971	
<i>Helicometrina nimia</i>	California Central, USA	Intestino	Chapa, 1976	
<i>Helicometrina nimia</i>	Bahía San Francisquito B.C., México	Intestino	Arai, 1962	
<i>Helicometrina nimia</i>	Isla Ángel de la Guarda, B.C., México	Intestino	Arai, 1962	
<i>Helicometrina nimia</i>	Bahía Santa Inés, B.C., México	Intestino	Arai, 1962	
<i>Helicometrina nimia</i>	Bahía Magdalena, B.C.S., México	Intestino	Arai, 1962	
Podocotylinae				
<i>Podocotyle</i> sp.	Norte de California, USA	Intestino	Edmiston, 1978	
<i>Podocotyle californica</i> Park, 1937	Norte de California, USA	Intestino	Nahhas y Krupin, 1977	
Nematoda				
Fam. Cystidicolidae				
<i>Ascarophis morrainei</i> Aguilar-Aguilar, Ruiz-Campos, Martorelli, Montes y Martínez-Aquino, 2019	Punta Morro, B.C., México	Estómago	Aguilar-Aguilar <i>et al.</i> , 2019	
<i>Ascarophis morrainei</i>	Punta Morro, Ensenada, B.C., México	Estómago	Garduño-Martínez, 2023	
<i>Ascarophis</i> sp.	Point Fermín, Los Ángeles County, California, USA	Estómago	Wells (1986)	

De manera particular, para Opecoelinae, se describieron cuatro especies del género *Opecoelus* en el intermareal rocoso de California asociadas a *C. analis*, y en algunas ocasiones junto con *G. nigricans*, como se muestra a continuación.

1) *Opecoelus adsphaericus* Manter y Van Cleave, 1951, descubierta a partir de 60 especímenes parasitando el intestino de *C. analis* (Cottidae) y *Girella nigricans* Ayres, 1860 (Khyposidae) en La Jolla, California, USA. *Opecoelus adsphaericus* fue descrita con base en medidas morfológicas de siete individuos que representaron los intervalos extremos de sus tallas (Manter y Van Cleave, 1951). Posteriormente, *O. adsphaericus* se ha registrado como parásito de peces de la familia Mullidae (*Mullus argentinae* Hubbs y Marini, 1933; *Parupeneus chrysonemus* Jordan y Evermann, 1903; *Parupeneus pleurostigma* Benett, 1831) y de la familia Scorpaenidae (*Scorpaena plumieri* Jordan y Starks, 1985) (Fabio, 1981; Arai, 1963; Pritchard, 1966; Luque *et al.*, 2002).

2) *Opecoelus* (ex *Opegaster*) *cameroni* (Caballero y C. y Caballero R., 1969) Aken´Ova, 2007 (especie originalmente descrita dentro del género *Opegaster*). La descripción original de *O. cameroni* fue a partir de especímenes que fueron recolectados 21 años antes de 1969 por Howard A. Winter (5 de noviembre de 1948) por lo que se desconoce si los trematodos fueron fijados vivos. La especie fue detectada a partir de observaciones de ocho preparaciones previamente montadas y provenientes de la “Colección de Winter”. Así mismo, Caballero y Caballero R. (1969) menciona que, debido al mal estado de preservación de los especímenes observados, *O. cameroni* solo fue descrita a partir de un único ejemplar como parásito del intestino de *G. nigricans* de Palos Verdes, Los Ángeles, California. Adicionalmente, registraron a *O. cameroni* como parásito intestinal de *C. analis* en Laguna Beach, Los Ángeles, California. Debido a que la ilustración que se presenta para la descripción original de *O. camaroni* en Caballero y C. y Caballero R. (1969; Figura 3, pp. 961) se muestra un tegumento arrugado, desde la parte inferior de la ventosa ventral a la parte final del cuerpo, parece indicar que dicho ejemplar fue fijado muerto y/o contraído. A la fecha, se desconoce la existencia y/o ubicación del holotipo (“Colección Helminológica E. Caballero y C. No. 500”) y paratipo (“Colección Nacional de Helminfos [CNHE], Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM] [No. 2655] [ex Colección

Helminológica del Instituto de Biología, U.N.A.M. No. 223-10]) mencionados por Caballero y C. y Caballero R. (1969) para *O. cameroni* (también ver Lamothe-Argumedo *et al.*, 1997).

Con base en la alta similitud morfológica entre las especies de *Opecoelus* y *Opegaster*, Aken'ova (2007) transfirió a *Opegaster cameroni* al género *Opecoelus*. Dicha transferencia es considerada válida en WoRMS (2024); sin embargo, tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, la veracidad taxonómica de *O. cameroni* aún no ha sido revisada, por lo que se sugiere tomar con precaución su identidad taxonómica.

3) *Opecoelus pacificus* Caballero y C. y Caballero R., 1976 descrita a partir de 10 individuos parasitando el intestino de *C. analis* en Isla Catalina, California (Caballero y C. y Caballero R., 1976). Los especímenes usados en la descripción original de *O. pacificus* fueron recolectados 28 años antes por Howard A. Winter (el 3 de diciembre de 1948). Adicionalmente, Caballero y C. y Caballero R. mencionan que la longitud del cuerpo de *O. pacificus* varía un poco por presentar diversos grados de contracción muscular. Así mismo, no se menciona si los trematodos fueron fijados, o si se trabajó con preparaciones permanentes realizadas previamente por Howard A. Winter. A la fecha, se desconoce la existencia del holotipo ("Colección Helminológica E. Caballero y C. No. 523") mencionado por Caballero y C. y Caballero R. (1976) para *O. pacificus*; solo un espécimen paratipo No. 1012 se encuentra depositado en la CNHE-IB-UNAM (ex Colección Helminológica del Laboratorio de Helminología del IB-UNAM No. 227-10) (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1997).

4) *Opecoelus caballeroi* Caballero-Rodríguez, 1977 descrita a partir de dos individuos parasitando el intestino de *C. analis* en Isla Catalina (Caballero-Rodríguez, 1977). Los especímenes usados para la descripción original de *O. caballeroi* en 1977, fueron recolectados 29 años antes por Howard A. Winter (el 3 de diciembre de 1948). Caballero-Rodríguez (1977) no menciona si los trematodos fueron fijados vivos o si trabajó con preparaciones permanentes realizadas previamente por Howard A. Winter. Existen dos especímenes con designación taxonómica como "Holotipo" No. 896 CNHE-IB-UNAM (ex "Colección Helminológica E. Caballero y C. No. 522") y "paratipo" No. 902 CNHE-IB-UNAM

(ex Colección Helminológica del IB-UNAM No. 227-14]) (Caballero-Rodríguez, 1977; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1997).

2. JUSTIFICACIÓN

De las cuatro especies descritas del género *Opecoelus* como parásitos de *C. analis* desde la región Californiana, ninguna ha sido analizada a nivel morfológico intraespecífico, ni con datos moleculares o puesto a prueba sobre un marco filogenético molecular dentro de Opecoelidae. Particularmente, *O. adsphaericus* es un excelente modelo para realizar análisis de variación morfológica debido a que presenta alto polimorfismo expresado en sus distintos intervalos de medidas registradas; e.g., desde tallas de longitud pequeña (1,336 μm), hasta tallas que triplican dicha longitud (4,000 μm). La variación morfológica de *O. adsphaericus* también puede resultar debido a que originalmente fue descrita con base en un buen tamaño de muestra (basado en 60 especímenes y seleccionando 7 individuos parásitos por rango de tamaño a partir de dos especies hospederas y una localidad) (Manter y Van Cleave, 1951). Además, *O. adsphaericus* es la primera especie descrita desde la región Californiana y es la especie parásita en fase adulta con mayor prevalencia registrada para *C. analis* (Manter y Van Cleave, 1951; Arai, 1962; Wells, 1986; Garduño-Martínez, 2023); sin embargo, su variación morfológica no ha sido caracterizada a nivel intraespecífico. Por último, su hospedero definitivo (*Clinocottus analis*) es la especie de pez intermareal que presenta las densidades poblacionales más altas en el intermareal rocoso del noroeste de Baja California (Ruiz-Campos *et al.*, 2010), lo que lo hace un modelo factible para la obtención de buenos tamaños de muestra para la recolecta de especímenes de *O. adsphaericus*.

Tomando en cuenta la carencia de información descrita para las especies de *Opecoelus* desde la región Californiana, *O. adsphaericus* permite desarrollar nuevas fuentes de datos para caracterizar su variación morfológica y molecular a nivel intraespecífico, en el sentido de explicar parte de su historia evolutiva en un contexto filogenético. Siguiendo las recomendaciones de Cribb (1985, 2005), Aken'ova (2007) y Bray y Justine (2013) para caracterizar especies del género *Opecoelus* que presentan alto polimorfismo morfológico, el presente estudio aporta por primera vez las cuatro temáticas siguientes.

- 1) Caracterización morfológica de *O. adsphaericus* en dos localidades de Baja California (El Mosquito, Bahía de Todos Santos, Ensenada; y Playa Piedra Blanca, Ejido Eréndira) a

través de análisis de PCA, crecimiento alométrico, imágenes de microscopía electrónica de barrido y dibujos de línea.

- 2) Parámetros de infección parasitaria de *O. adsphaericus* a lo largo de un año con muestreos bimensuales en la Bahía de Todos Santos.
- 3) Producción y análisis de datos moleculares de *O. adsphaericus* sobre un marco filogenético de Opecoelidae.
- 4) Producción y análisis de datos moleculares de *O. adsphaericus* a nivel genético poblacional para determinar su variación genética a partir de individuos colectados en dos localidades.

Por tanto, para desarrollar este estudio, se planteó la siguiente hipótesis y objetivos (general y particulares):

3. HIPÓTESIS

El helminto parásito *Opecoelus adsphaericus* presenta alto polimorfismo y alta variación genética a nivel intraespecífico en la Bahía de Todos Santos y Playa Piedra Blanca, Baja California.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar a nivel morfológico y molecular a *Opecoelus adsphaericus* como parásitos del pez *Clinocottus analis* en el intermareal rocoso de la Bahía de Todos Santos y Playa Piedra Blanca, Baja California, México.

4.2. Objetivos específicos

1. Describir la variación morfológica de ejemplares de *Opecoelus adsphaericus* de dos localidades en Baja California, usando caracteres morfológicos y generando datos merísticos, microfotografías de microscopía electrónica de barrido y dibujos de línea.

2. Evaluar la variación morfológica de ejemplares de *Opecoelus adsphaericus* a través de análisis de componentes principales y crecimiento alométrico.
3. Determinar las relaciones filogenéticas con datos moleculares del gen 28S de *Opecoelus adsphaericus* dentro de un marco filogenético de la familia Opecoelidae, a través de métodos de Inferencia Bayesiana y de Máxima Verosimilitud.
4. Describir la variación genética de *Opecoelus adsphaericus* con base en ejemplares recolectados en dos localidades en Baja California, usando el gen de la región del *BarCode* (COI), y calculando su diversidad haplotípica y distancias genéticas.
5. Inferir las repercusiones evolutivas de *Opecoelus adsphaericus* asociadas a *C. analis* en Baja California, en función de su polimorfismo morfológico y molecular, y sobre un contexto filogenético dentro de Opecoelidae.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Obtención de peces

Se realizaron nueve muestreos en la localidad de El Mosquito (EM), ubicada en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California ($31^{\circ} 51' 36.4''$ N; $116^{\circ} 38' 55.5''$ W) en los meses de agosto, septiembre y octubre de 2021; y enero, febrero, marzo, mayo, junio y septiembre de 2022. Además, en la localidad de Playa Piedra Blanca (PPB), Ejido Eréndira, B.C., ($31^{\circ} 17' 37.5''$ N; $116^{\circ} 24' 55.1''$ W) se realizó un muestreo en el mes de agosto de 2021 (**Figura 2**). Los ejemplares de *C. analis* fueron capturados en las pozas de marea del intermareal rocoso durante condiciones de bajamar. Cada colecta fue programada seleccionando las fechas de bajamar menor a cero de referencia del Nivel de Bajamar Media Inferior (NBMI), con base en el programa Mar v. 1.0 (González, 2011). En cada poza de marea se aplicó una solución de quinaldina al 20% mediante un atomizador manual (Gibson, 1967, 1999). Después de 10 minutos, los peces anestesiados fueron capturados usando una red de cuchara y colocados en una cubeta de 20 litros de agua del medio (sin anestésico). Una vez colectados, los peces fueron transportados vivos al Laboratorio de Biología Evolutiva de Parásitos (BEP) de la Facultad de Ciencias (FC), UABC, para su examinación parasitológica. La identificación de los peces fue apoyada con base en las claves taxonómicas (Miller y Lea, 1972), y verificada posteriormente con ejemplares de referencia de la Colección Ictiológica (CI), FC, UABC.

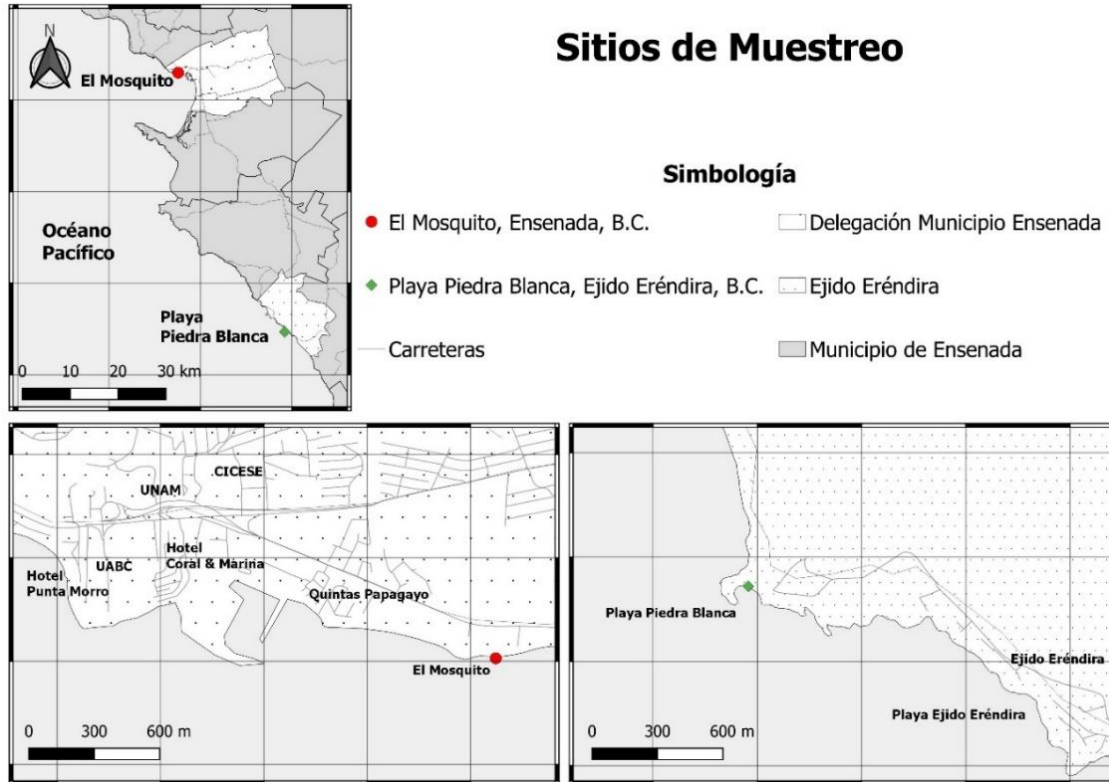


Figura 2. Mapa de los sitios de muestreo de *Clinocotus analis* para la recolecta de *Opecoelus adspiraericus* en Ensenada, Baja California (B.C.), México.

5.2. Disección de peces para la obtención de trematodos

Los peces fueron medidos individualmente con un vernier (precisión 0.01 mm) para el registro de su longitud total (Lt), longitud Patrón (Lp) y altura del cuerpo (Alt). Estas mediciones se registran en valores promedio y su desviación estándar ($\pm sd$) seguido entre paréntesis el intervalo (mín. y máx.). Después, la eutanasia de los peces fue realizada con el método de “clavija perforadora”, la cual causa pérdida de conciencia inmediata en los organismos (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2019). Posteriormente, se aplicó el examen parasitológico interno realizando un corte longitudinal en el pez, desde el ano hasta la región del istmo e incluso prolongándose hasta la boca. Para la examinación de trematodos se extrajeron los órganos internos como intestino, ciegos pilóricos, vejiga natatoria, estómago y mesenterios. Todos los trematodos fueron colectados vivos y se colocaron en diferentes cajas de Petri (por órgano infectado) con un sobrenadante de

solución salina al 0.75%. Posteriormente, para estudios morfológicos, los trematodos fueron fijados con formol al 4% caliente antes de alcanzar el grado de ebullición, mientras que los trematodos utilizados para los análisis moleculares fueron fijados en alcohol absoluto (OH=100%). Para los análisis moleculares, se fijaron al menos tres especímenes trematodos vivos que representaran las medidas extremas (i.e., talla pequeña, mediana y grande) en un único individuo hospedero y sitio de infección específico (i.e., intestino y ciegos pilóricos).

5.3. Parámetros de infección

Se registraron los parámetros de infección (i.e., prevalencia, abundancia e intensidad media) para cada mes de muestreo, y para el total de muestreos por localidad (ver **Cuadro 5**). Los parámetros de infección se definieron de acuerdo con Bush *et al.* (1997) como se expresa en las fórmulas siguientes. Hospedero.

1. Prevalencia (*P*): $P: \frac{\text{No. Hospederos infectados}}{\text{No. Hospederos de la muestra}} \times 100$
2. Abundancia Promedio (*AP*): $AP: \frac{\text{No. Total de parásitos}}{\text{No. Hospederos de la muestra}} \times 100$
3. Intensidad Promedio (*IP*): $IP: \frac{\text{No. Total de parásitos}}{\text{No. Hospederos infectados}} \times 100$

5.4. Técnica de tinción

Para la identificación morfológico-taxonomía de cada trematodo recolectado, se aplicó la tinción de carmín hidroclorehídrico realizando preparaciones permanentes siguiendo y modificando la técnica de Vidal-Martínez *et al.* (2001). La técnica consistió en lavar los especímenes opecoelidos con agua destilada y posteriormente almacenados al menos 24 horas en OH=96%, después fueron teñidos con carmín hidroclorehídrico durante 30 minutos. Una vez teñidos, se aclararon con alcohol acidulado al 2% hasta obtener una coloración translúcida. Cada ejemplar se deshidrato a través de una serie de alcoholes graduales (80%, 90% y 96%) durante 10 minutos y 30 minutos en OH=100%. Seguido de la deshidratación, los trematodos se colocaron en aceite de clavo absoluto durante 5 minutos, y posteriormente fueron montados en Bálsamo de Canadá para su preservación permanente. La identificación taxonomía de los trematodos fue realizada siguiendo las claves

dicotómicas para trematodos de Cribb (2005), Jones *et al.* (2005), Madhavi y Bray (2018) y literatura especializada (Manter y Van Cleave, 1951; Caballero C. y Caballero R., 1969, 1976; Caballero-Rodríguez, 1977; Aken' Ova, 2007). Adicionalmente, el holotipo y paratipo de *Opecoelus adsphaericus* (No. 1337837 y No. 1338191, respectivamente, Smithsonian National Museum of Natural History [NMNH] [ex USNM Helm. Col. No. 37143 y 37510, respectivamente] de *Clinocotus analis* de La Jolla, San Diego, California, USA fueron revisados comparándose con los especímenes colectados en este estudio. Así mismo, se revisaron los paratipos de *Opecoelus caballeroi* y *Opecoelus pacificus* y (CNHE 902 y CNHE 1012 respectivamente, [ex No. 227-9 y 227-14, respectivamente] de *Clinocottus analis* de Isla Catalina, California, USA).

5.5. Análisis morfométrico

Se realizó una observación y comparación de los ejemplares recolectados de *O. adsphaericus* en los distintos meses de muestreo. En total, se seleccionaron 212 ejemplares de preparaciones permanentes en fase adulta (no se observó ningún ejemplar en fase juvenil o no grávida; es decir, todos los ejemplares observados y montados presentaron huevos). Se seleccionaron 40 especímenes adultos y grávidos de la localidad de EM, mínimo cuatro por muestreo para representar los extremos de las tallas presentes como sigue. Talla pequeña = < 1000 micras (μm); Talla mediana = > 1000 y < 2000 μm ; Talla grande = > 2000 < 3200 μm . Los 40 especímenes de la localidad de EM se eligieron desde el muestreo EM2 hasta EM9, debido a que el número de peces examinados del EM1 fue bajo (tres peces) (para más información ver **Cuadro 5**). Adicionalmente, se eligieron cuatro especímenes adultos y grávidos de la localidad de PPB (dos tallas pequeñas y dos tallas medianas) provenientes de tres individuos de *C. analis*, en los cuales se les lograba observar todos los caracteres morfológicos requeridos para el análisis morfométrico.

Las medidas de los especímenes analizados de *O. adsphaericus* fueron tomadas en micrómetros (μm) y se obtuvieron valores promedio (mín. y máx.). Con base en la literatura especializada para la diagnosis de las especies del género *Opecoelus* (Manter y Van Cleave, 1951; Caballero C. y Caballero R, 1976; Cribb 1985, 2005), 24 atributos morfológicos fueron

seleccionados para su análisis incluyendo: Largo y ancho de Longitud del cuerpo (Lc), Ventosa oral (Vo), Ventosa ventral (Vv), Faringe (Fa), Testículo anterior (Ta), Testículo posterior (Tp), Ovario (Ov), Huevos (Hu), Saco del cirro (Sc), Vesícula seminal (Vs); ancho de Ciego intestinal (Ci); largo de la región anterior del cuerpo (o *forebody* [Fb], por su término en inglés, que generalmente alberga la ventosa oral y órganos continuos como la pre-faringe o faringe, poro reproductor, saco de cirro, cirro y parte de la vesícula seminal), largo de la región posterior del cuerpo (o *hindbody* [Hb], por su término en inglés, que generalmente alberga la ventosa ventral y órganos reproductivos) y Cirro (Cr). Además, se consideró como atributo cualitativo la presencia o ausencia de un ano común (ver **Cuadro 4**).

Se aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés *Principal Component Analysis*), para evaluar a un conjunto de variables morfométricas no correlacionadas, y detectar la presencia de otras especies a nivel morfológico de *Opecoelus*; i.e., *O. cameroni*, *O. pacificus* y *O. caballeroi*. El PCA fue aplicado al conjunto de datos de las 24 variables morfométricas (i.e., atributos morfológicos anteriormente mencionados) obtenidas de los 44 especímenes seleccionados (40 de la localidad de EM y cuatro de la localidad de PPB). De las 24 variables morfométricas analizadas, se realizó la eliminación de variables altamente correlacionadas (> 0.65) por medio de la prueba de correlación de *Pearson* usando el programa PAST v. 4.16 (SCIEM, Austria), considerando así ocho variables significativas para el análisis de PCA (i.e., largo y ancho de: Vv, Ov, Hu; ancho de Ci y largo de Fa).

Previo al análisis de PCA, el conjunto de datos se dividió en tres grupos, tomando en cuenta el efecto del tamaño como posible diferencia morfométrica *a priori* entre especies (e.g., Hernández-Mena *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2017; Villora-Montero *et al.*, 2020; Corner *et al.*, 2022). De este modo, para la localidad de EM (40 individuos) y PPB (cuatro individuos), se seleccionaron las tallas de los trematodos analizados con base a la longitud del cuerpo (Lc) y se dividieron en tres grupos de la manera siguiente: 1) Grupo pequeño < 1000 μm (12 individuos); 2) Grupo mediano > 1000 y < 2000 μm (23 individuos) y; 3) Grupo grande > 2000 < 3200 μm (nueve individuos). Los cuatro individuos de PPB se distribuyeron

en el análisis de la siguiente manera: dos especímenes de talla pequeña de 595.05 y 627.32 μm ; y dos tallas medianas de 1099.7 y 1157.58 μm .

Se aplicó la ecuación de crecimiento alométrico de Huxley (Huxley, 1993) para detectar si existe relación de crecimiento alométrico (i.e., el crecimiento y desarrollo del cuerpo) asociado a las tres tallas observadas entre los 44 individuos adultos de *O. adsphaericus* de la localidad de EM y PPB, mediante el programa PAST como sigue. Para los análisis de crecimiento alométrico se excluyeron los cuatro especímenes de PPB de este análisis, para evitar sesgo en los resultados debido al poco tamaño de muestra y poco esfuerzo de muestreo para esta localidad.

Fórmula 1: $y = ax^b$, expresada en forma logarítmica como: $\log y = \log a + b \log x$;

Donde y equivale al tamaño estimado del órgano o parte del cuerpo; a equivale a la fracción del tamaño corporal que representa la parte u órgano (i.e., cuerpo anterior, cuerpo posterior y largo de testículo anterior y posterior, seleccionados con base en los valores de “ r ”); x equivale al largo de la longitud del cuerpo (L_c); b equivale al coeficiente de crecimiento alométrico, y \log equivale al logaritmo. La expresión logarítmica es utilizada para transformar los datos de un modelo exponencial a un modelo lineal. Cuando el valor de $b = 1$, las dos variables tienen tasas de crecimiento similares (isometría). Cuando el valor de $b \neq 1$, la proporción del cuerpo o el órgano se considera positivo o negativo en el crecimiento alométrico, y tiene una tasa de crecimiento mayor o menor que la longitud del cuerpo.

Para describir de manera visual el polimorfismo intraespecífico de *O. adsphaericus* detectado en EM, se realizaron dibujos de línea de 7 individuos que representan los intervalos de la variación morfológica presente entre los tres grupos de tallas (Pequeña [$< 1000 \mu\text{m}$], Mediana [> 1000 y $< 2000 \mu\text{m}$], Grande [$> 2000 < 3200 \mu\text{m}$]). Cada dibujo de línea se realizó a mano con ayuda de una cámara lucida conectada a un microscopio Olympus BX50, con aumento a 20X en el Laboratorio de Patología Acuática del Departamento de Recursos del Mar del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Mérida, Yucatán, México. Posteriormente, cada

dibujo de línea fue digitalizado y editado con una tableta de dibujo digital Huion Inspiroy Q11K V. 2 a través del programa Adobe Illustrator 2024.

5.6. Técnica de microscopía electrónica de barrido

La morfología externa de los opecoelidos se analizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*) en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO) del CINVESTAV-Mérida. Para ello, se lavaron los trematodos con agua destilada y se fijaron con OH-96%, posteriormente se trasladaron a glutaraldehído al 3% con tapón cacodilato 0.2M, pH 7.5 durante 24 horas a 4 °C. Las muestras se lavaron con *PBS* (por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) y se deshidrataron con alcoholes graduales por 10 minutos (50%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%), respectivamente. Después, las muestras se colocaron en capsulas porosas y se realizó el desecado en CO₂ a punto crítico con el Secador de Punto Crítico Quorum K 850, donde se recubrieron con oro-paladio en un metalizador Quorum Q150R ES y finalmente se observaron en un microscopio electrónico de barrido marca Philips XLE30 ESEM (FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA).

5.7. Extracción de ADN y amplificación del gen nuclear 28S y mitocondrial *BarCode*

Las técnicas moleculares se realizaron en el Laboratorio Multidisciplinario de la Facultad de Ciencias (LMFC-UABC). Para cada evento de muestreo, fueron seleccionados al menos un único individuo parásito recolectado desde un único individuo pez hospedero. Además, en lo posible, se seleccionaron opecoelinos (*Opecoelinae*) parasitando órganos diana específicos; i.e., intestino, ciegos pilóricos y estómago. Para el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa C 1.p (región *BarCode*), los ejemplares opecoelinos usados para la extracción de su ADN fueron seleccionados con base en su talla (pequeña < 1000 µm; mediana > 1000 y < 2000 µm; grande > 2000 < 3200 µm). Esto último con el fin detectar si existe o no variación genética asociada con las tallas observadas en EM (para más detalle ver **Cuadro 8**). Así, a los opecoelinos fijados en etanol absoluto (OH–100%) se les realizó la técnica de extracción de ADN a través de un kit comercial DNeasy® Blood & Tissue de la marca QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron digeridas con proteinasa K durante 3

horas a 56 °C. Posterior a cada extracción de ADN, se determinó la concentración y pureza de las muestras de ADN mediante espectrofotometría con el uso del NanoDrop® 1000 (USA).

Se seleccionaron marcadores moleculares del gen 28S ADNr (= *lsrDNA* región D1–D2), implementados previamente para detectar las relaciones filogenéticas dentro de la familia Opecoelidae (Bray *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2020a, b). Los marcadores moleculares fueron amplificados mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), utilizando un termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (USA). El gen nuclear 28S se amplificó con oligonucleótidos específicos, *forward* LSU-5 (5′- TAG GTC GAC CCG CTG AAY TTA AGC -3′) (Littlewood, 1994) y *reverse* 1500R (5′- GCT ATC CTG AGG GAA ACT TCG -3′) (Tkach *et al.*, 2003). Para explorar la variación genética poblacional se amplificó el gen mitocondrial *BarCode* mediante los primers *forward* Dice1F (5′- ATT AAC CCT CAC TAA ATT WCN TTR GAT CAT AAG -3′) y *reverse* Dice11R (5′- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CWG WAC HAA ATT THC GAT C -3′) (Steenkiste *et al.*, 2015). La concentración de los reactivos para las reacciones de PCR de ambos genes se realizó a un volumen total de 25 µl: 7.5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de cada oligonucleótido respectivo, 3 µl de ADN, 12.5 µl de solución Green GoTaq Máster Mix (ProMega), la cual se conforma por Taq polimerasa, Buffer (pH 8.5), 3 mM de MgCl₂ y 400 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Las preparaciones finales de las reacciones de PCR para el gen 28S fueron realizadas con las condiciones siguientes: un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 4 minutos, 35 ciclos de amplificación (94 °C por 45 segundos, 56 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos), un ciclo de 72 °C por 10 minutos y finalmente se terminó con la temperatura a 4 °C. Las reacciones de PCR para el gen *BarCode* fueron las sugeridas por Martínez-Aquino *et al.* (2019); i.e., un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificación (94 °C por 30 segundos, 47 °C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto), un ciclo de 72 °C por 10 minutos y se finalizó el ciclo a 4 °C. Los productos de PCR fueron verificados con un gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR® Safe, usando un buffer TAE 1X como amortiguador y una escalera de 100 pares de bases (pb) (Biolabs: New England), a través de un equipo de electroforesis Bio-Rad® PowerPac Basic (Los Ángeles, USA), operado a 110 V por 30 minutos. Las bandas obtenidas en el gel de la

electroforesis fueron visualizadas para su corroboración en un fotodocumentador de luz UV c200 Azure Biosystems® (Dublin, USA). Por último, los productos de PCR amplificados fueron enviados a Macrogen (Corea del Sur; <https://dna.macrogen.com/>) para la manufacturación y secuenciación Sanger para cada cadena independiente y su complementaria, respectivamente (i.e., *forward* y *reverse*).

5.8. Análisis de reconstrucción filogenética con datos moleculares

Las secuencias *forward* y *reverse* fueron editadas y ensambladas para la obtención de secuencias consenso para cada trematodo para ambos genes (28S y *BarCode*), a través del programa Sequencher v. 4.1.4 (Gene Codes Corp. Ann Arbor, MI).

5.8.1. Gen nuclear 28S

Para el gen 28S se obtuvieron 8 secuencias bidireccionales que representan tres órganos de infección en dos localidades de la manera siguiente. Localidad 1 (EM), dos secuencias del ciego pilórico (de 1,348 y 1,290 pb) y dos del intestino (de 1,343 pb), provenientes desde tres peces *C. analis* recolectados en dos muestreos. Localidad 2 (PPB), una secuencia del estómago (de 1,285 pb), una del ciego pilórico (de 1,284 pb) y dos del intestino (de 1,296 y 1277 pb), provenientes desde 3 *C. analis* de un solo muestreo (**Cuadro 8**). Las secuencias obtenidas fueron evaluadas y su veracidad contrastada con la base de datos del GenBank del NCBI (por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el análisis filogenético, se construyó una base de datos de secuencias del gen 28S de la familia Opecoelidae, realizando una búsqueda exhaustiva en GenBank y siguiendo a Bray *et al.* (2016) y Martin *et al.* (2017, 2020a, b). En total, con base en la homología detectada previamente por Bray *et al.* (2016), Fayton y Andres (2016), Sokolov *et al.* (2019) y Martin *et al.* (2017, 2020b), se seleccionaron 69 secuencias para nuestro análisis filogenético: 66 taxa son pertenecientes a la familia Opecoelidae, incluyendo nueve subfamilias y 48 géneros (ver **Cuadro 3**). Además, tres secuencias referentes a *Stephanostomum pristis* Deslongchamps, 1824 (Acanthocolpidae), *Zalophotrema hepaticum* Stunkard y Alver, 1929 (Brachycladiidae) y *Biospeedotrema jolliveti* Bray, Waeschenbach, Dyal, Littlewood y Morand, 2014 (Stenakridae) fueron usadas

como grupos externos con base en su cercanía filogenética con Opecoelidae establecida anteriormente por Bray *et al.* (2016) y Martin *et al.* (2020b). El alineamiento de las secuencias fue realizado con el programa MAFFT v. 7 (Kato *et al.*, 2019) a través del servidor en línea (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) y tuvo una longitud de 1,305 pb. Posteriormente, se utilizó el programa Gblocks v. 0.91b (Castresana, 2000) para excluir regiones hipervariables en el alineamiento de las secuencias del gen 28S, y tuvo una longitud final de 1,118 pb.

Para la selección del modelo evolutivo que mejor se ajustó a los datos, se utilizó el programa jModelTest v 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) mediante el Criterio de información Bayesiana (BIC, por sus siglas en inglés *Bayesian Information Criterion*). El modelo que mejor se ajustó a la tasa de sustitución nucleotídica de la base de datos analizada del gen 28S fue GTR+I+G (Tavaré, 1986).

La reconstrucción filogenética fue realizada mediante Inferencia Bayesiana (IB) y Máxima Verisimilitud (ML, por sus siglas en inglés *Maximum Likelihood*). La IB fue realizada utilizando el programa MrBayes v. 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012) implementada en la plataforma de CIPRES (Miller *et al.*, 2010) (<https://www.phylo.org/>). La IB se analizó utilizando el método de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), con 4 corridas en paralelo por 20×10^6 generaciones, con un diagnóstico para cada 1,000 generaciones. La reconstrucción filogenética con ML se realizó a través del programa IQ-TREE v. 1.6.12 (Trifinopoulos *et al.*, 2016) mediante el servidor web (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) con los parámetros siguientes: 10,000 réplicas de *Ultrafast Bootstrap* (UFBoot2) (Hoang *et al.*, 2018) y una prueba de SH-aLRT con 1,000 réplicas (Guindon *et al.*, 2010). Finalmente, se estimaron las distancias genéticas entre las especies de Opecoelidae en el programa MEGA v. 11 (Tamura *et al.*, 2021) usando el algoritmo de *p-distances* (Nei y Kumar, 2000), mediante el método de Bootstrap, aplicando 1,000 réplicas y una tasa uniforme de sustitución de nucleótidos.

Cuadro 3. Lista de taxa y secuencias utilizadas para el análisis filogenético del gen 28S para la familia Opecoelidae en este estudio. GenBank = Número de acceso. Clado B, Clado C, y Grupo Inacertado I y Grupo Inacertado II, son taxa sin clasificar siguiendo a Bray *et al.* (2016), Martin *et al.* (2017; 2020a, b).

Taxon	Hospedero	GenBank	Referencia
Helicometrinae			
<i>Helicometra antarcticae</i>	<i>Dissostichus mawsoni</i>	OK644193	Sokolov <i>et al.</i> (2022)
<i>Helicometra boseli</i>	<i>Sargocentron spiniferum</i>	KU320600	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Helicometra fasciata</i>	<i>Epinephelus fasciatus</i>	KU320597	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Helicometra manteri</i>	<i>Prionotus alatus</i>	KJ701238	Andres <i>et al.</i> (2014a)
<i>Helicometrina nimia</i>	<i>Haemulon flavolineatum</i>	MK648305	Peréz-Ponce de León y Hernández-Mena (2019)
Opecoelinae			
<i>Anamalotrema koaie</i>	<i>Sebastes viviparus</i>	KU320595	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Dimerosaccus oncorhynchi</i>	<i>Oncorhynchus masou</i>	FR870262	Shedko <i>et al.</i> (2015)
<i>Discoverytrema gibsoni</i>	<i>Muraenolepis marmorata</i>	MH161430	Sokolov <i>et al.</i> (2019)
<i>Opecoeloides fimbriatus 1</i>	<i>Micropogonias undulatus</i>	KJ001211	Andres <i>et al.</i> (2014b)
<i>Opecoeloides fimbriatus 2</i>	<i>Lutjanus guttatus</i>	MK648309	Peréz Ponce de León y Hernandez-Mena (2019)
<i>Opecoeloides sp. 2</i>	<i>Umbrina xanti</i>	MK648307	Peréz Ponce de León y Hernandez-Mena, (2019)
<i>Opecoelus sp.</i>	<i>Nyctiphanes australis</i>	ON661329	Bennett <i>et al.</i> (2022)
<i>Opegaster sp.</i>	<i>Tomicodon sp.</i>	MK648306	Peréz Ponce de León y Hernandez-Mena (2019)
<i>Pseudopecoeloides tenuis</i>	<i>Priacanthus hamrur</i>	KU320605	Bray <i>et al.</i> (2016)
Stenakrinae			
<i>Holsworthotrema enboubalichthys</i>	<i>Kyphosus cornelii</i>	MK052937	Martin <i>et al.</i> (2019)
<i>Scorpidotrema longistipes</i>	<i>Scorpis georgiana</i>	MK052936	Martin <i>et al.</i> (2019)
Inacertado I			
<i>Neolebouria lanceolata</i>	<i>Polymixia lowei</i>	KJ001210	Andres <i>et al.</i> (2014b)
Opecoelidae gen. sp.	<i>Trizocheles spinosus</i>	ON661328	Bennett <i>et al.</i> (2022)
<i>Podocotyloides brevis</i>	<i>Conger esculentus</i>	KJ001212	Andres <i>et al.</i> (2014b)
<i>Tellervotrema beringi</i>	<i>Coryphaenoides sp.</i>	MN959859	Sokolov <i>et al.</i> (2020)
Podocotylineae			
<i>Bathypodocotyle margolisii</i>	<i>Coryphaenoides mediterraneus</i>	KU320596	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Buticulotrema thermichthysi</i>	<i>Thermichthys hollisi</i>	KF733984	Bray <i>et al.</i> (2014)
<i>Halosaurotrema halosauropsi</i>	<i>Abyssal halosau</i>	AY222207	Olson <i>et al.</i> (2003)
<i>Neolebouria georgiensis</i>	<i>Trematomus pennellii</i>	MH892478	Faltynkova <i>et al.</i> (2017)

Taxon	Hospedero	GenBank	Referencia
<i>Podocotyle atomon</i>	<i>Littorina saxatilis</i>	MH161437	Sokolov <i>et al.</i> (2019)
Plagioporinae			
<i>Neoplagioporus elongatus</i>	<i>Sarcocheilichthys variegatus microoculus</i>	KX553948	Fayton y Andres (2016)
<i>Nicolla skrjabini</i>	<i>Ponticola gorlap</i>	MH161438	Sokolov <i>et al.</i> (2019)
<i>Plagioporus chiliticorum</i>	<i>Notropis chiliticus</i>	KX553943	Fayton y Andres (2016)
<i>Plagioporus wataugaensis</i>	<i>Hypentelium nigricans</i>	ON059353	Truong <i>et al.</i> (2022)
<i>Sphaerostoma bramae</i>	<i>Abramis brama</i>	MH161435	Sokolov <i>et al.</i> (2019)
<i>Urorchis acheilognathi</i>	<i>Tanakia limbata</i>	KX553945	Fayton y Andres (2016)
Bathycreadinae			
<i>Bathycreadium elongatum</i>	<i>Trachyrincus scabrus</i>	JN085948	Constenla <i>et al.</i> (2011)
Clado B			
<i>Allopodocotyle epinepheli</i>	<i>Epinephelus cyanopodus</i>	KU320598	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Allopodocotyle palmi</i>	<i>Epinephelus coioides</i>	OL439065	Theisen <i>et al.</i> (2022)
<i>Allopodocotyle</i> sp.	<i>Scolopsis bilineatus</i>	KU320599	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Bentholebouria blatta</i>	<i>Pristipomoides argyrogrammicus</i>	KU320606	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Cainocreadium lintoni</i>	<i>Epinephelus morio</i>	KJ001208	Andres <i>et al.</i> (2014b)
<i>Cainocreadium</i> sp. 1	<i>Hoploplogagrus guentherii</i>	MK648303	Peréz Ponce de León y Hernandez-Mena (2019)
<i>Cainocreadium</i> sp. 2	<i>Haemulon flavolineatum</i>	MK648304	Peréz Ponce de León y Hernandez-Mena (2019)
<i>Hamacreadium mutabile</i>	<i>Lutjanus griseus</i>	KJ001209	Andres <i>et al.</i> (2014b)
<i>Macvicaria macassarensis</i>	<i>Lethrinus miniatus</i>	AY222208	Olson <i>et al.</i> (2003)
<i>Pacificreadium serrani</i>	<i>Plectropomus leopardus</i>	KU320602	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Pedunculacetabulum inopinipugnus</i>	<i>Plectorhinchus chrysotaenia</i>	MF805700	Martin <i>et al.</i> (2018c)
<i>Podocotyloides australis</i>	<i>Diagramma picta</i>	MF805696	Martin <i>et al.</i> (2018c)
Clado C			
<i>Choerodonicola arothokoros</i>	<i>Choerodonicola arothokoros</i>	MG844418	Martin <i>et al.</i> (2018b)
<i>Macvicaria pennelli</i>	<i>Trematomus bernacchii</i>	MH892477	Faltynkova <i>et al.</i> (2017)
<i>Opecoelidae</i> sp. 1	<i>Haemulon flavolineatum</i>	MK648308	Peréz Ponce de León y Hernandez-Mena (2019)
<i>Podocotyloides parupenei</i>	<i>Mulloidichthys vanicolensis</i>	MF926409	Martin <i>et al.</i> (2018c)
<i>Trilobovarium parvvatis</i>	<i>Lethrinus nebulosus</i>	KY551562	Martin <i>et al.</i> (2017)
Ophistolebetinae			
<i>Gaevskajatrema perezii</i>	-	AF184255	Tkach <i>et al.</i> (2014)
<i>Heterolebes maculosus</i>	<i>Diodon hystrix</i>	MH933878	Martin <i>et al.</i> (2018d)

Taxon	Hospedero	GenBank	Referencia
<i>Maculifer diodontis</i>	<i>Diodon hystrix</i>	MH933879	Martin <i>et al.</i> (2018d)
<i>Macvicaria crassigula</i>	<i>Calamus bajonado</i>	KJ701237	Andres <i>et al.</i> (2014a)
<i>Magnaosimum brooksae</i>	<i>Tripodichthys angustifrons</i>	MG813907	Martin <i>et al.</i> (2018a)
<i>Opistholebes amplicoelus</i>	<i>Lagocephalus lunaris</i>	MH933875	Martin <i>et al.</i> (2018d)
<i>Parallelolebes virilis</i>	<i>Meuschenia hippocrepis</i>	MH933880	Martin <i>et al.</i> (2018d)
<i>Peracreadium idoneum</i>	<i>Anarhichas lupus</i>	AY222209	Olson <i>et al.</i> (2003)
<i>Propycnadenoides philippinensis</i>	<i>Gymnocranius grandoculis</i>	KU320604	Bray <i>et al.</i> (2016)
<i>Pseudoheterolebes diodontis</i>	<i>Diodon hystrix</i>	MH933876	Martin <i>et al.</i> (2018d)
<i>Pseudopycnadena fischthali</i>	<i>Diplodus vulgaris</i>	MF166851	Rima <i>et al.</i> (2017)
Pseudoplagioporinae			
<i>Pseudoplagioporus roseovulatus</i>	<i>Monotaxis heterodon</i>	MN081752	Martin <i>et al.</i> (2020a)
<i>Fairfaxia cribbi</i>	<i>Lethrinus harak</i>	MN081755	Martin <i>et al.</i> (2020a)
<i>Pseudoplagioporinae</i> sp.	<i>Lethrinus nebulosus</i>	MN081757	Martin <i>et al.</i> (2020a)
<i>Shimazuia lethrini</i>	<i>Lethrinus atkinsoni</i>	MN081756	Martin <i>et al.</i> (2020a)
Polypipaliolebatinae			
<i>Polypipaliolebatina heniochi</i>	<i>Heniochus chrysostomus</i>	MF926406	Martin <i>et al.</i> (2017)
Incertado II			
<i>Pseudopycnadena tendu</i>	<i>Pseudobalistes fuscus</i>	FJ788506	Bray <i>et al.</i> (2016)
Grupo externo			
<i>Stephanostomum pristis</i>	<i>Phycis phycis</i>	DQ248222	Bray <i>et al.</i> (2005)
<i>Zalophotrema hepaticum</i>	<i>Zalophus californianus</i>	AY222255	Olson <i>et al.</i> (2003)
<i>Biospeedotrema jolliveti</i>	<i>Ventichthys biospeedoi</i>	KF733985	Bray <i>et al.</i> (2014)

5.8.2. Gen mitochondrial *BarCode*

Se obtuvieron 18 secuencias ensambladas del gen de *BarCode* a partir de 14 hospederos de *C. analis*, provenientes de seis muestreos de la localidad de EM colectados de dos órganos diana (i.e., 13 infectaron el intestino y cinco el ciego pilórico). Las secuencias obtenidas de EM presentaron los tamaños siguientes: 13 secuencias asociadas al intestino presentaron de 577 a 615 pb, mientras que las cinco secuencias asociadas al ciego pilórico presentaron de 531 a 614 pb. Para PPB se obtuvieron nueve secuencias ensambladas desde tres órganos diana (i.e., cinco provenientes del intestino, tres de ciego pilórico y una del estómago, todas presentaron 583 pb) (**Cuadro 8**). Las secuencias fueron evaluadas y contrastadas con la base de datos disponible para este gen en GenBank. Se detectaron tres secuencias de Opecoelidae disponibles en GenBank e incluidas en la subfamilia Plagioporinae, mismas que

fueron usadas como grupo externo en el análisis filogenético: dos secuencias de la especie *Plagioporus sinitsini* Muller, 1934 (KM538106, FJ477213) (Steenkiste *et al.*, 2015; Moszczyńska *et al.*, 2009) y una de *Plagioporus cf. skrjabini* (MT756015) (Rothmeier *et al.*, 2021). Así, se realizó un alineamiento de las secuencias de *BarCode* a través del programa MAFFT, y fue verificado usando la traducción de aminoácidos con base en el código genético de platelmintos implementada en MEGA. Para la selección del modelo evolutivo que mejor se ajustó a la base de datos de *BarCode*, se utilizó el programa PartitionFinder, implementando el criterio de BIC y particionando en 1^a, 2^{da} y 3^{ra} posición nucleotídica. El modelo que mejor se ajustó a la primera posición nucleotídica fue HKY+G (Hasegawa *et al.*, 1985), para la segunda posición fue F81 (Felsenstein, 1981) y para la tercera posición fue HKY (Hasegawa *et al.*, 1985). Seguido de esto, se realizó la reconstrucción del árbol filogenético mediante IB en MrBayes con los mismos parámetros previamente mencionados. La reconstrucción filogenética mediante ML se realizó con el programa IQ-TREE implementado los tres modelos de evolución molecular para cada partición (i.e., partición 1 = HKY+G; partición 2 = F81; partición 3 = HKY) y con los mismos parámetros de UFBoot2 y SH-aLRT mencionados anteriormente para los análisis de ML.

Los árboles de consenso estricto del gen 28S y *BarCode* de IB se basaron a partir de 30,002 árboles; mientras que los realizados con ML fueron basados a partir de 10,000 árboles de UFBoot2. Los árboles consenso fueron visualizados mediante el programa FigTree v 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y editados con Adobe Illustrator 2023. Para la IB, la robustez de los nodos fue evaluada por valores de probabilidad posterior (PP), donde la $PP \geq 0.95$ representa un soporte estadístico significativo (Ronquist *et al.*, 2012). Para ML, la robustez de los nodos fue evaluada con un soporte de UFBoot2 $\geq 75\%$, considerándolo como un soporte estadísticamente significativo.

5.8.2.1. *BarCode*: Variación genética poblacional

La variación genética de *O. adsphaericus* a partir de las 27 secuencias del gen *BarCode* desde dos localidades (EM [N = 18] y PBB [N = 9]) fue calculada con base en el número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (H) y diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987), mediante

el programa DnaSP v. 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017). Para señalar el esfuerzo de muestreo a nivel genético poblacional, se realizó una curva de acumulación de haplotipos (Brown *et al.*, 2012; Coeur d'acier *et al.*, 2014). Finalmente, se caracterizó la variación genética a través de una red de haplotipos utilizando el programa popART v.1.7 (Leigh y Bryant 2015).

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización morfológica de *Opecoelus adsphaericus* en Baja California (Figuras 3 – 6)

La caracterización morfológica se realizó con base en ejemplares en fase adulta de *O. adsphaericus* provenientes de la localidad de EM. Las medidas morfológicas corresponden a 40 individuos de la localidad de EM, provenientes de 20 hospederos examinados y ocho muestreos (EM2–EM9); y 4 individuos de la localidad de PPB provenientes de tres hospederos analizados y un solo muestreo (**Cuadro 4 y Figura 3**)

Descripción: Cuerpo alargado y ovalado con extremos anterior y posterior redondeados (**Figura 3A–G**). Tegumento ligeramente rugoso con papilas aleatorias en la parte anterior del cuerpo (**Figura 4A, D**). Longitud del cuerpo con 1,560 (758–3,019) de largo y 261 (116–496) de ancho. La región anterior del cuerpo (*Fb*), mide 240 (55–588) mientras que la región posterior del cuerpo (*Hb*) es de 1,128 (459–2,287); la región posterior del cuerpo es cuatro veces más largo que la región anterior del cuerpo, la relación en promedio entre las dos regiones del cuerpo es de 1:4.69. Ventosa oral subsférica y subterminal, más pequeña que la ventosa ventral, con 105 (63–219) de largo y 105 (63–242) de ancho. Ventosa oral con seis pares de papilas de manera bilateral (**Figura 5A**). Prefaringe corta seguida de una faringe ovalada, con 69 (38–100) de largo y 52 (28–86) de ancho. Ventosa ventral sésil, protuberante y retráctil, con 191 (114–288) de largo y 193 (116–426) de ancho. Ventosa ventral armada de tres pares de papilas sésiles en la abertura, tres papilas distribuidas en el borde anterior y tres papilas en el borde inferior de la ventosa ventral (**Figura 4A, B; Figura 6A, B**). Ventosa ventral casi el doble de tamaño de la ventosa oral; la relación en promedio entre las dos ventosas es de 1:1.81 x 1:1.84. Ciegos intestinales lisos, dorsales y laterales, se unen cerca del extremo posterior del cuerpo a través de un ano común, con 30 (13–55)

de ancho. Poro genital siniestral, ligeramente a la izquierda, entre la faringe y la bifurcación de los ciegos intestinales. Vesícula excretora se extiende hasta el testículo anterior. Folículos vitelinos extendidas desde el extremo posterior del cuerpo hasta el borde posterior de la ventosa ventral e incluso prolongándose hasta la parte media anterior del cuerpo (B).

Aparato reproductor masculino. Testículos ovalados o semiovalados, en tándem, con bordes lisos, ocasionalmente más largos que anchos (**Figura 3F, G**). Testículo anterior con 141 (65–297) de largo y 146 (92–244) de ancho. Testículo posterior con 160 (78–312) de largo y 152 (84–241) de ancho. La vesícula seminal es grande y desnuda, inicia desde la parte final del cuerpo anterior y finaliza hasta la región posterior del cuerpo donde comienzan los ovarios y testículos (**Figura 3G**). La vesícula mide 286 (82–680) de largo y 52 (27–119) de ancho. El saco del cirro es pequeño y difícil de observar, localizado en la parte media del cuerpo, con 144 (82–289) de largo y 32 (17–65) de ancho, y contiene el cirro, que mide 57 (24–124) de largo.

Aparato reproductor femenino. Ovario trilobulado poco observable, pretesticular, con 75 (33–160) de largo por 109 (35–180) de ancho, receptáculo seminal ausente. Huevos operculados de color amarillo, con 52 (41–65) de largo y 26 (20–34) de ancho. Útero poco observable, restringido al área entre el ovario y el poro genital. Ootipo y Canal de Lauren muy poco observables.

Comentarios: Con base en la caracterización morfológica que obtuvimos para *O. adsphaericus* desde dos localidades de Baja California, con un tamaño de muestra representativo (44 especímenes) y aunada a su homología filogenética molecular de dos genes, detectamos que presenta alto polimorfismo morfológico similar al registrado para otras especies del género *Opecoleus*; eg., *O. variabilis* (Cribb 1985). Además, observamos que las especies *O. caballeroi*, *O. cameroni* y *O. pacificus* presentan errores en sus diagnósticos originales, así como altas similitudes morfológicas respecto con *O. adsphaericus*, las cuales se resumen a continuación:

- 1) Tamaño total del cuerpo. Las medidas de las tallas de los especímenes obtenidos en este estudio, así como las de descripciones originales de *O. cameroni*, *O. pacificus* y *O. caballeroi* se encuentran dentro de los intervalos de la descripción original de *O. adsphaericus* (Manter y Van Cleave, 1951).
- 2) Ventosa ventral. Para los ejemplares analizados en este estudio se obtuvo una proporción promedio de 1:1.81 de largo y 1:1.84 de ancho. Las medidas del largo y ancho de la ventosa ventral de *O. cameroni*, *O. pacificus* y *O. caballeroi* se encuentran dentro de los intervalos observados para *O. adsphaericus* desde su descripción original (Manter y Van Cleave, 1951) y lo obtenido en este estudio. La proporción de la ventosa ventral respecto a la ventosa oral, registrada en las cuatro especies es: *O. cameroni* 1:1.8 de largo y 1:2.3 de ancho; *O. pacificus* 1:1.7 de largo y 1:1.7 de ancho; *O. caballeroi* 1:1.7 de largo y 1:1.5 de ancho; *O. adsphaericus* 1:1.33 a 1.66 de diámetro. Por tanto, existe un traslape de medidas respecto a la proporción de la ventosa ventral entre las cuatro especies; i.e., *O. cameroni*, *O. pacificus*, *O. caballeroi* y *O. adsphaericus*.
- 3) Número de papilas sobre la ventosa ventral. *Opecoleus adsphaericus* presenta tres pares de papilas sobre la ventosa ventral, tres en el margen superior y tres en el margen inferior. Manter y Van Cleave (1951; pp. 318) mencionan que las papilas son poco perceptibles cuando están retraídas. *Opecoleus pacificus* y *O. caballeroi*, presentan tres papilas sésiles sobre el borde anterior de la ventosa ventral (Caballero y C. y Caballero R, 1976, pp. 192; Caballero-Rodríguez, 1977, pp. 136, respectivamente). En la descripción original de *Opecoleus cameroni* se menciona que tiene “grandes papilas sésiles” sobre el borde anterior de la ventosa ventral, dos de ellas “ligeramente digitiformes” (Caballero y C. y Caballero R, 1969, pp. 962). Sin embargo, en la ilustración de la descripción de *O. cameroni* (pp. 961) se logra diferenciar tres papilas en la parte inferior de la ventosa ventral y una cuarta papila, probablemente “digitiforme”, sobre el margen superior de la ventosa ventral. Desafortunadamente Caballero y C. y Caballero R. (1969) no mencionan de manera explícita el número total de papilas como parte de la diagnosis de *O. cameroni*, y aunado a la carencia de holotipos y paratipos, su interpretación a la fecha es especulativa. Por otra parte, cuando es revisado los

paratipos de *O. caballeroi* (CNHE 902) y *O. pacificus* (CNHE 1012) se detecta que ambos especímenes poseen tres pares de papilas sobre la ventosa ventral, i.e., tres en el margen superior y tres en el margen inferior, igual y como se diagnosticó para *Opecoelus adsphaericus* por Manter y Van Cleave (1951).

- 4) Testículo posterior y anterior. En los ejemplares *O. adsphaericus* analizados en este estudio se encontró que ocasionalmente se encuentran más anchos que largos en tallas pequeñas, y ocasionalmente en tallas medianas, debido a la contracción y relajación del espécimen al momento de ser fijado vivo, así como al tamaño del parásito, siendo similares a los de *Opecoelus caballeroi* y *Opegaster cameroni*. En *O. adsphaericus* se observó testículos separados con mayor frecuencia, y testículos más largos que anchos en tallas medianas y grandes. Las medidas de los testículos de *O. cameroni*, *O. pacificus* y *O. caballeroi* se encuentran dentro de los intervalos de *O. adsphaericus*, registrados desde su descripción original (Manter y Van Cleave, 1951) y los obtenidos en este estudio. La disposición de los testículos anterior y posterior, respecto al cuerpo, en las cuatro especies no presenta diferencia de acuerdo con las descripciones originales (*O. adsphaericus*, *O. cameroni*, *O. caballeroi* y *O. pacificus*) y lo observado en este estudio.
- 5) Ovario. *Opecoelus adsphaericus*, *O. cameroni*, *O. caballeroi* y *O. pacificus* presentan un ovario trilobulado, más ancho que largo. Las medidas de los ovarios de *O. cameroni*, *O. caballeroi* y *O. pacificus* se encuentran dentro de los intervalos de *O. adsphaericus* mencionados desde su descripción original (Manter y Van Cleave, 1951) y los obtenidos en el presente estudio. La disposición del ovario, respecto al cuerpo, en las cuatro especies está por debajo de la ventosa ventral, similar a lo diagnosticado para las especies del género *Opecoelus* y *Opegaster* (Cribb, 2005).
- 6) Receptáculo seminal. En la descripción original de *O. pacificus* se menciona la presencia de receptáculo seminal en forma de “coma” (,); sin embargo, dicha observación debe tomarse con precaución ya que puede ser errónea debido a que la subfamilia Opecoelinae carece de receptáculo seminal (a excepción del género *Genitocotyle* Park, 1937 (Cribb, 2005). Al observar al paratipo de *O. pacificus* (CNHE 1012), se puede inferir que el receptáculo seminal puede ser parte del conducto uterino; sin embargo, debido

a que esta observación solo se refiere a un único espécimen debe tomarse con cautela. Tanto *O. cameroni*, *O. caballeroi* y *O. adsphaericus* carecen de receptáculo seminal (Caballero y C. y Caballero R, 1969; Caballero y C. y Caballero R, 1976; Caballero-Rodríguez, 1977).

- 7) Tamaño de muestra escaso y carencia de ejemplares de referencia. El número de especímenes con que se realizaron las descripciones de *O. cameroni* (N = 1) y *O. caballeroi* (N = 2) es escaso, lo que puede provocar descripciones inadecuadas de la especie e incertidumbre en cuanto a su validez taxonómica, aunado a la ausencia del holotipo de referencia para *O. cameroni*. En el caso de *O. pacificus*, aun cuando tiene un mejor tamaño de muestra analizado en su descripción original (N = 10), su diagnóstico presenta errores como el mencionado anteriormente; también, el escaso número de ejemplares paratipos de la localidad tipo para su revisión incrementa su incertidumbre taxonómica. A la fecha, solo se conoce un paratipo (No. 1012) de la localidad tipo de *O. pacificus*, y se desconoce la ubicación de su holotipo. Por tanto, con base en las observaciones de los especímenes de referencia revisados en este estudio para *O. caballeroi* (CNHE 902) y *O. pacificus* (CNHE 1012), y tomando en cuenta los escasos datos de sus medidas proporcionadas desde las descripciones originales, y la ausencia de holotipos de *O. cameroni* y *O. pacificus*, sugerimos tomar con cautela el estatus taxonómico de *O. cameroni*, *O. pacificus* y *O. caballeroi*. Es un hecho, impera la necesidad de realizar la revisión taxonómica de *O. cameroni*, *O. pacificus* y *O. caballeroi*, con base en nuevos datos morfológicos y moleculares desde sus localidades tipo y especies hospederos de referencia, respectivamente, para validar o no su identidad y estatus taxonómico.

Cuadro 4. Medidas morfométricas en micras (μm) para *O. adsphaericus* en el hospedero *Clinocottus analis* y las especies de *Opecoelus* registradas para el mismo hospedero. Se menciona entre paréntesis en dos letras la abreviatura de cada atributo morfológico analizado y corresponde con los acrónimos mencionados para el Análisis de Componentes Principales (PCA).

Especie	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. cameroni</i>	<i>O. pacificus</i>	<i>O. caballeroi</i>	
	N = 40	N = 4	N= 7	N= 1	N= 10	N= 2	
Hospedero	<i>C. analis</i>	<i>C. analis</i>	<i>C. analis</i>	<i>C. analis</i>	<i>C. analis</i>	<i>C. analis</i>	
Localidad	El Mosquito, Ensenada, Baja California, México.	Playa Piedra Blanca, Ejido Eréndira, Baja California.	La Jolla, San Diego, California, USA.	Laguna Beach, California, USA.	Isla Catalina, California, USA.	Isla Catalina, California, USA.	
Referencia	Presente estudio	Presente estudio	Manter y Van Cleave, 1951	Caballero C. y Caballero R., 1969	Caballero C. y Caballero R., 1976	Caballero-Rodríguez, 1977	
	Prom (Mín – Máx)	Prom (Mín – Máx)					
	Longitud del cuerpo (Lc)						
1	Largo	1,560 (758 – 3,019)	869 (595 – 1157)	1,336 – 4,000	1575	1,361 – 2,835	729 – 1,262
2	Ancho	261 (116 – 496)	211 (119 – 282)	167 – 409	472	324 – 356	308 – 518
	Ventosa oral (Vo)						
3	Largo	105 (63 – 229)	87 (58 – 108)	84 – 146	148	92 – 129	74 – 111
4	Ancho	105 (63 – 242)	84.59 (69 – 95)		133	92 – 111	81 – 129
	“Boca”						
	Largo						15
	Ancho						66
	Ventosa ventral (Vv)						
5	Largo	191 (114 – 288)	152 (122 – 198)	112 – 255	266	159 – 185	74 – 111
6	Ancho	193 (116 – 426)	165 (131 – 180)		259	159 – 196	81 – 129
	Dist. Extremo Anterior (VV)						
	Largo						104 – 129
	Faringe (Fa)						
7	Largo	69 (38 – 100)	51 (35 – 71)	51 – 95	92	70 – 92	74 – 92
8	Ancho	52 (28 – 86)	34 (23 – 47)	51 – 102	74	44 – 78	55 – 63
	Esófago						
	Largo			119 – 153	55	85	73

	Especie	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. cameroni</i>	<i>O. pacificus</i>	<i>O. caballeroi</i>
		N = 40	N = 4	N= 7	N= 1	N= 10	N= 2
	Ancho				37	26	15
	Testículo anterior (Ta)						
9	Largo	141 (65 – 297)	81 (46 – 124)		92	141 – 240	92 – 148
10	Ancho	146 (92 – 244)	134 (103 – 152)		337	178 – 240	137 – 240
	Testículo posterior (Tp)						
11	Largo	160 (78 – 312)	90 (57 – 120)		166	185 – 259	81 – 129
12	Ancho	152 (84 – 241)	132 (94 – 180)		296	189 – 222	133 – 259
	Ovario (Ov)						
13	Largo	75 (33 – 160)	50 (29 – 70)		100	63 – 129	55 – 74
14	Ancho	109 (35 – 180)	103 (75 – 151)		196	133 – 189	78 – 148
	Huevos (Hu)						
15	Largo	52 (41 – 65)	59 (58 – 62)	49 – 59	55	52 – 55	52
16	Ancho	26 (20 – 34)	29 (26 – 31)	25 – 39	37	26 – 33	33 – 37
	Ciego intestinal (Ci)						
17	Ancho	30 (13 – 55)	19 (12 – 25)		37		
	Bifurcación Int. Borde Anterior						
	Largo				281		121 – 221
	Poro Rep. Borde Anterior						
	Largo				222	166 – 259	111 – 192
	Cuerpo anterior (Fb)						
18	Largo	240 (55 – 588)	159 (137 – 188)				
	Cuerpo posterior (Hb)						
19	Largo	1,128 (459 – 2,287)	558 (274 – 821)				
	Saco del cirro (Sc)						
20	Largo	144 (82 – 289)	84 (75 – 94)				85
21	Ancho	32 (17 – 65)	18 (15 – 20)				40
	Cirro (Cr)						
22	Largo	57 (24 – 124)	32				
	Vesícula Seminal (Vs)						

	Especie	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. adsphaericus</i>	<i>O. cameroni</i>	<i>O. pacificus</i>	<i>O. caballeroi</i>
		N = 40	N = 4	N= 7	N= 1	N= 10	N= 2
23	Largo	286 (82 – 680)	189 (138 – 235)				280 – 370
24	Ancho	52 (27 – 119)	41 (31 – 52)				50 – 70
	Vesícula Seminal						
	Anterior						
	Largo					74	
	Ancho					37 – 44	
	Vesícula Seminal						
	Posterior						
	Largo					229 – 329	
	Ancho					55 – 121	
	Receptáculo Seminal						
	Largo					148 – 185	
	Ancho					30 – 37	
	Folículos vitelinos						
	Largo						18 – 52
	Ancho						18 – 52
	Ano común						
	Ausencia/Presencia	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente

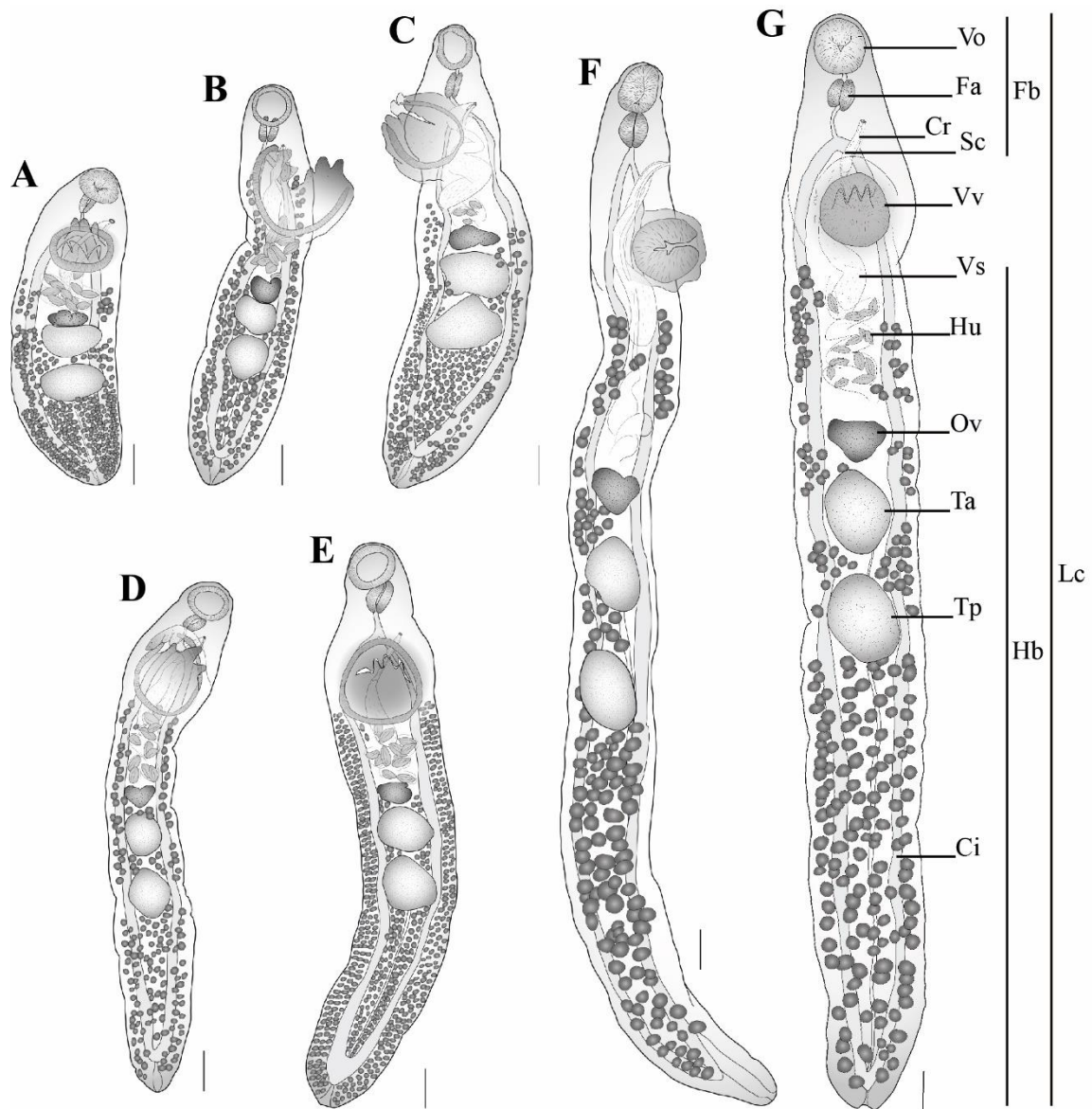


Figura 3. *Opecoelus adsphaericus* de *C. analis* desde El Mosquito (EM), Ensenada, Baja California, México. **A** = Talla pequeña < 1000 μm ; **B – E** = Talla mediana > 1000 < 2000 μm ; **F – G** = Talla grande > 2000 < 3200 μm . Cada individuo ilustrado de *O. adsphaericus* proviene de distintos eventos de muestreo de EM (EM#) y diferentes sitios de infección (ie., Cp = Ciego pilórico; Int = Intestino). **A** = EM7–Cp, **B** = EM7–Cp; **C** = EM7–Cp; **D** = EM4–Int; **E** = EM5–Int; **F** = EM8–Cp; **G** = EM8–Cp. La enumeración de cada EM# corresponde con lo mencionado en el **Cuadro 5**. La abreviatura de cada carácter morfológico señalado en la figura se menciona en el **Cuadro 4**. Barra de escala = 100 μm .

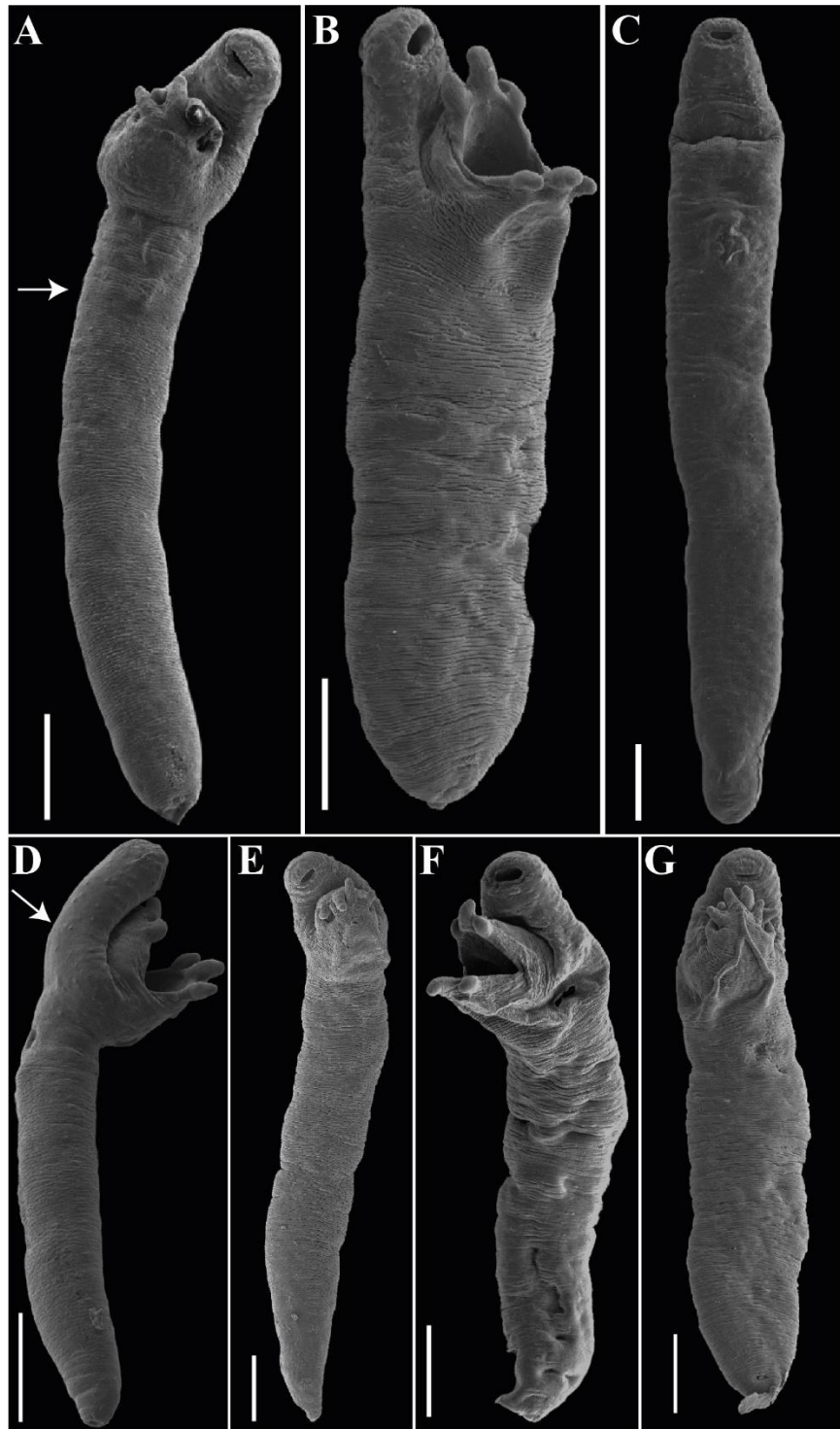


Figura 4. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido del cuerpo completo de ejemplares adultos de *Opecoelus adsphaericus*. **A** = EM8 – Cp – Talla Pequeña, **B** = EM7 – Cp – Talla Pequeña, **C** = EM8 – Cp – Talla Mediana, **D** = EM8 – Cp – Talla Pequeña, **E** = EM7 – Cp – Talla Pequeña, **F** = EM8 – Int – Talla Pequeña, **G** = PPB – Int – Talla Pequeña. La enumeración de cada EM# corresponde con lo mencionado en el **Cuadro 5**. Cp = Ciegos pilóricos. Int = Intestino. PPB = Playa Piedra Blanca. Barra de escala = 100 μ m.

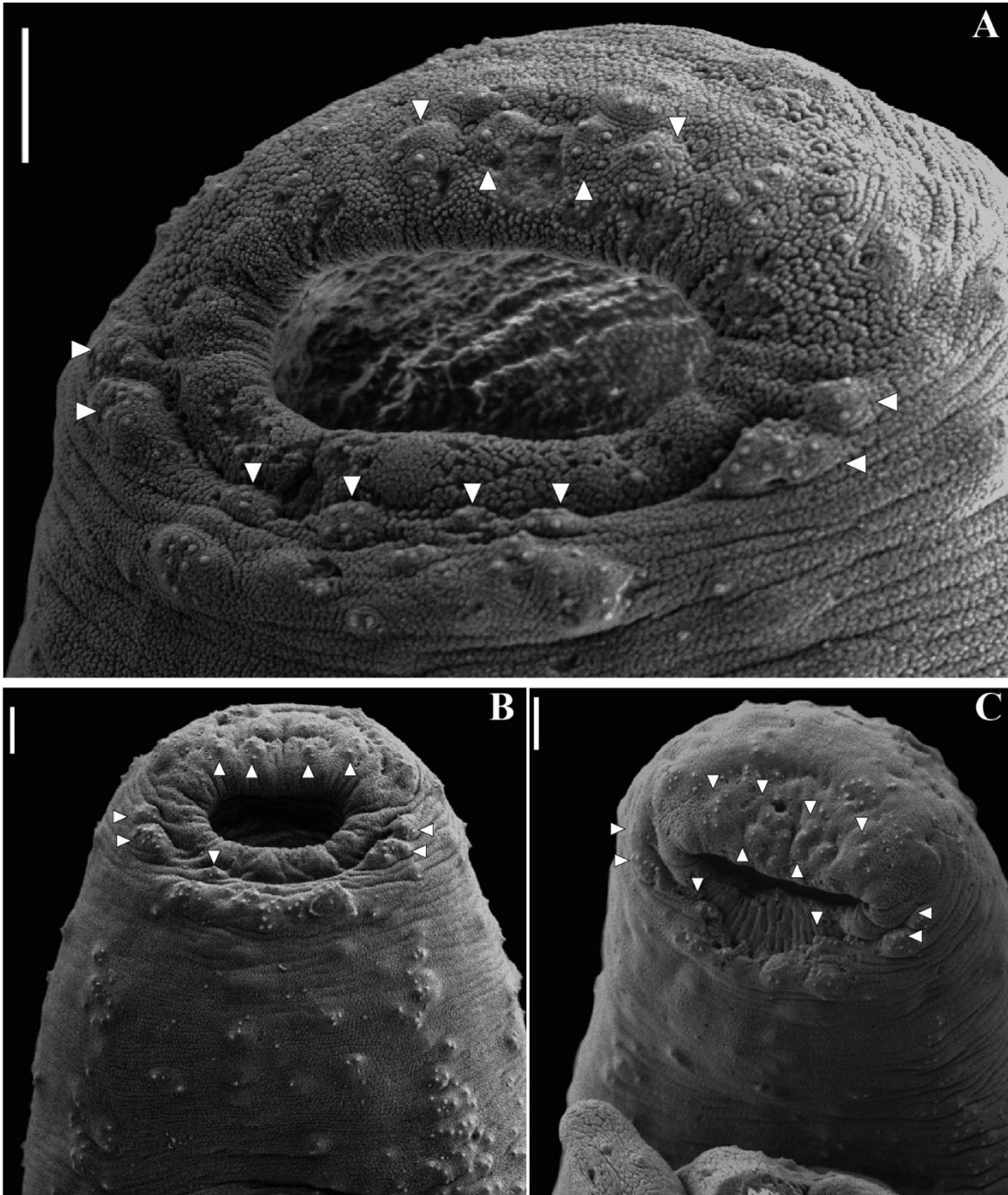


Figura 5. Imágenes de microscopia de barrido de ejemplares adultos de *Opecoelus adsphaericus*. **A** = EM8 – Int, **B** = EM8 – Cp, **C** = EM8 – Cp. La enumeración de cada EM# corresponde con la mencionada en el **Cuadro 5**. Cp = Ciegos pilóricos. Int = Intestino. Se presentan pequeñas papilas aleatorias alrededor de la ventosa oral: **A** mostrado 14 [flechas blancas]; **B** mostrando 11 [flechas blancas] y **C** mostrando 12 grupos papilares [flechas blancas]. Barra de escala: 10 μ m.

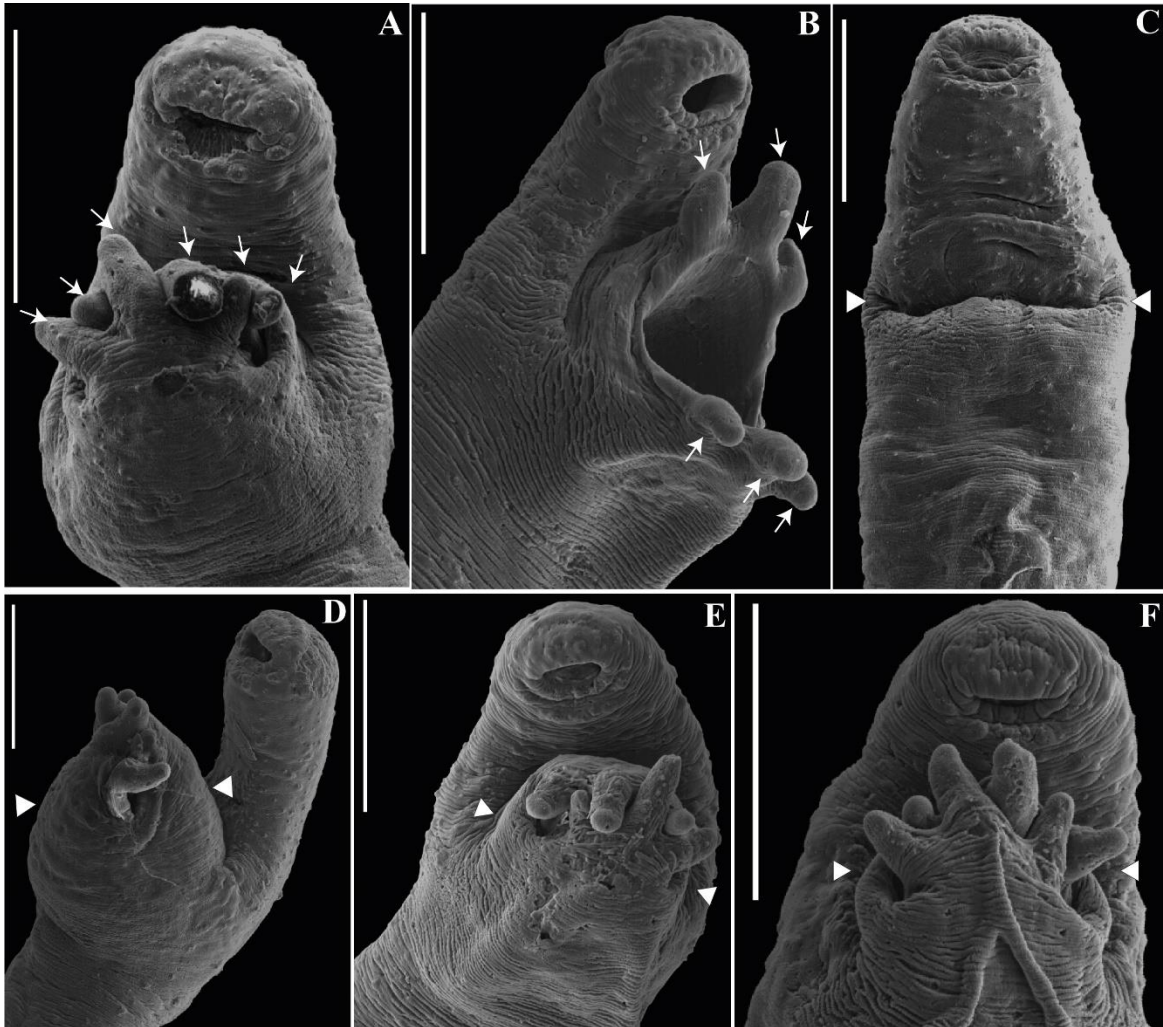


Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de ejemplares adultos de *Opecoelus adsphaericus*. La enumeración de cada EM# corresponde con la mencionada en el **Cuadro 5**. Cp = Ciegos pilóricos. Int = Intestino. PPB = Playa Piedra Blanca. **A** = EM8 – Cp, **B** = EM7 – Cp, **C** = EM8 – Cp, **D** = EM8 – Cp, **E** = EM7 – Cp, **F** = PPB – Int. **A – F** muestran variación y disposición de las papilas sésiles sobre la ventosa ventral. **A)** Espécimen con ventosa ventral con tres pares de papilas sésiles [flechas blancas]; **B)** Espécimen con ventosa ventral con tres pares de papilas sésiles, tres en la parte anterior y tres en la parte posterior [flechas blancas]; **C)** Espécimen con ventosa ventral y papilas sésiles invaginadas [flechas blancas]; **D)** Espécimen con ventosa ventral protuberante con papilas sésiles [flechas blancas]; **E, F)** Dos especímenes con ventosa ventral con tres pares de papilas sésiles entrecruzados, respectivamente [flechas blancas]. Barra de escala = 100 μ m.

6.2. Parámetro de infección

En total, a lo largo de un año se recolectaron 93 ejemplares de *C. analis*: 77 para la localidad de EM y 16 para PPB. Las medidas de las tallas en longitud total (Lt) y patrón (Lp) de los peces de EM fueron como sigue: Lt = 8.56 ± 2.64 cm (3.7 – 16.6 cm), Lp = 6.99 ± 2.17 cm (3.4 – 13.5 cm) y Alt = 1.66 ± 0.67 cm (0.8 – 4 cm). Las medidas de los peces de PPB fueron: Lt = 5.81 ± 1.35 cm (4.5 – 9 cm), Lp = 4.71 ± 1.21 cm (3.6 – 7.5 cm) y Alt = 1.10 ± 0.23 cm (0.8 – 1.6 cm) (**Figura 7**). En EM el 98% de los peces (76 de 77) estuvieron infectados por 1036 parásitos de *O. adsphaericus*, con una intensidad promedio (IP) de 13.63. En PPB el 63% de los peces (10 de 16) estuvieron infectados por *O. adsphaericus* con 38 individuos parásitos, con una intensidad promedio de 3.80. En junio de 2022 se registró la mayor abundancia de *O. adsphaericus* (227 individuos parásitos); mientras que en agosto de 2021 se registró la menor abundancia (31 individuos parásitos) así como el menor número de hospederos colectados de *C. analis* (3 individuos peces) (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Parámetros de infección de *O. adsphaericus* en *C. analis* en El Mosquito (EM) y Playa Piedra Blanca (PPB). EvM# = Número de evento de muestreo desde EM y PPB; #p = Número de parásitos, He = Hospederos examinados, Hp = Hospederos parasitados, P (%) = Prevalencia en porcentaje, IP = Intensidad Promedio, AP = Abundancia Promedio, IAM = Individuos para Análisis Morfométricos. Tallas: Pe = Pequeña (< 1000 μ m), M = Mediana (> 1000 < 2000 μ m), G = Grande (2000 – 3200 μ m).

EvM#	Mes-Año	He	Hp	#p	P (%)	IP	AP	IAM		
								Pe	M	G
EM1	Ago-2021	3	3	31	100	10.33	10.33			
EM2	Sep-2021	10	9	43	90	4.78	4.30	4		
EM3	Oct-2021	10	10	81	100	8.10	8.10	1	2	1
EM4	Ene-2022	10	10	203	100	20.30	20.30		7	
EM5	Feb-2022	9	9	82	100	9.11	9.11	1	3	
EM6	Mar-2022	10	10	131	100	13.10	13.10	1	3	
EM7	May-2022	10	10	145	100	14.50	14.50	3	2	
EM8	Jun-2022	10	10	227	100	22.70	22.70			8
EM9	Sep-2022	5	5	93	100	18.60	18.60		4	
Total (EM)		77	76	1036	98	13.63	13.45	10	21	9
								TOTAL 40		
PPB1	Ago-2021	16	10	38	63	3.80	2.38	2	2	

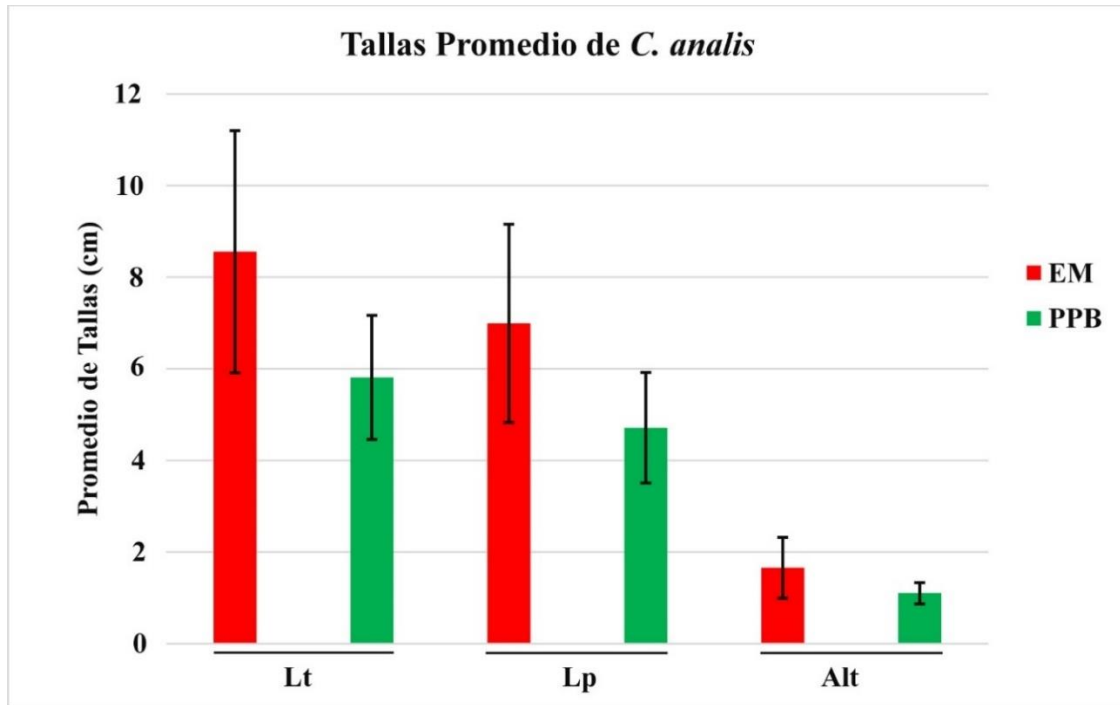


Figura 7. Gráfica de barras mostrando las tallas en centímetros (cm) para *Clinocottus analis* en la localidad de El Mosquito (EM; n = 77) y Playa Piedra Blanca (PPB; n = 16). La barra vertical en negro indica la desviación estándar de cada atributo morfológico medido. Lt = Longitud total; Lp = Longitud patrón; Alt = Altura.

6.3. Análisis de componentes principales

De las 24 variables morfométricas (i.e., atributos morfológicos) analizadas, ocho fueron seleccionadas debido a que presentaron bajo valor de correlación (< 65) de acuerdo con los resultados del análisis de correlación de Pearson. Las ocho variables morfométricas consideradas en el PCA y su valor de contribución a los dos primeros componentes principales derivados fueron los siguientes: Vv – Largo (0.55; 0.34), Vv – Ancho (0.68; -0.68), Fa – Largo (0.20; 0.03), Ov – Largo (0.23; 0.40), Ov – Ancho (0.33; 0.48), Hu – Largo (-0.01; -0.01), Hu – Ancho (-0.002; 0.0008) y Cr (0.08; 0.04). Las variables de largo y ancho de la Vv y ancho del Ov fueron las que presentaron mayor importancia en el PC 1 desde la gráfica de cargas de componentes principales y gráfica de PCA (**Figura 8**); mientras que el largo y el ancho del Ov y el largo de Vv fueron las que presentaron mayor importancia en el PC 2 (**Anexo 2 y Anexo 3**).

Con base en la correlación de las ocho variables morfométricas (ver detalle más adelante), se obtuvo un gráfico para tres grupos artificiales de tallas (**Figura 8**). Así, se obtuvo que los tres grupos analizados desde las dos localidades de Baja California representan el polimorfismo de *O. adsphaericus*. Para el gráfico de los tres grupos artificiales, los primeros dos componentes principales (i.e., PC 1 y PC 2) del PCA explicaron el 80.71% de la variación total del conjunto de datos; el PC 1 explicó el 60.525% de la variación, mientras que el PC 2 explica el 20.19% (**Anexo 1**).

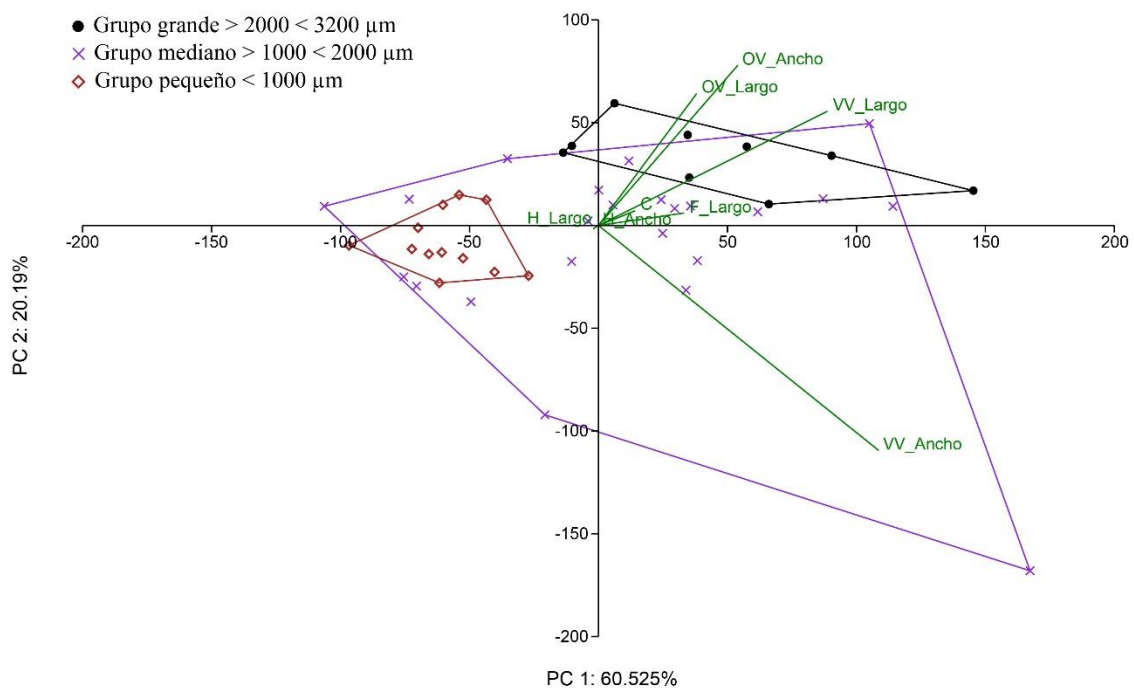


Figura 8. Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con ocho variables morfométricas de 44 especímenes de *O. adsphaericus* distribuidos en tres grupos (i.e., grupo grande, mediano y pequeño) para la localidad de El Mosquito (EM); adicionalmente se incluyeron los individuos de Playa Piedra Blanca (PPB) que incluye especímenes con talla pequeña y mediana. PC1 y PC2 explican el 80.46% de la varianza. Los acrónimos y símbolos de los grupos se muestran sobre la figura. Las líneas en verde se refieren a la importancia de las variables analizadas como se mencionó en el **Anexo 2**. Las medidas fueron tomadas desde especímenes recolectados en ocho eventos de muestreo en EM y uno en PPB como se mencionó en el **Cuadro 4**.

6.4. Análisis de crecimiento alométrico para la localidad de El Mosquito

La comparación de las medidas de 40 especímenes adultos de *O. adsphaericus* de la localidad de EM reflejó un crecimiento alométrico positivo para la longitud de la región anterior (*Fb*) ($b = 1.0495$, $p < 0.001$) (**Figura 9**), y para la longitud de la región posterior (*Hb*) ($b = 1.1079$, $p < 0.001$) (**Figura 10**), así las variables anteriores presentan una tasa de crecimiento mayor respecto a la longitud del cuerpo (**Cuadro 6**). El largo del testículo anterior (*Ta*) y posterior (*Tp*) mostraron alometría negativa ($b = 0.8783$, $p < 0.001$; $b = 0.8226$, $p < 0.001$, respectivamente) (**Figura 11** y **Figura 12**). Además, se detectó una alta correlación entre el largo del cuerpo respecto al *Fb* ($r = 0.9004$, $p < 0.001$) y *Hb* ($r = 0.9922$, $p < 0.001$) (**Cuadro 6**). Los valores logarítmicos de las mismas variables analizadas en términos de crecimiento alométrico se muestran en el cuadro del **Anexo 4** (ie., *Fb*, *Hb*, largo de *Ta* y *Tp*).

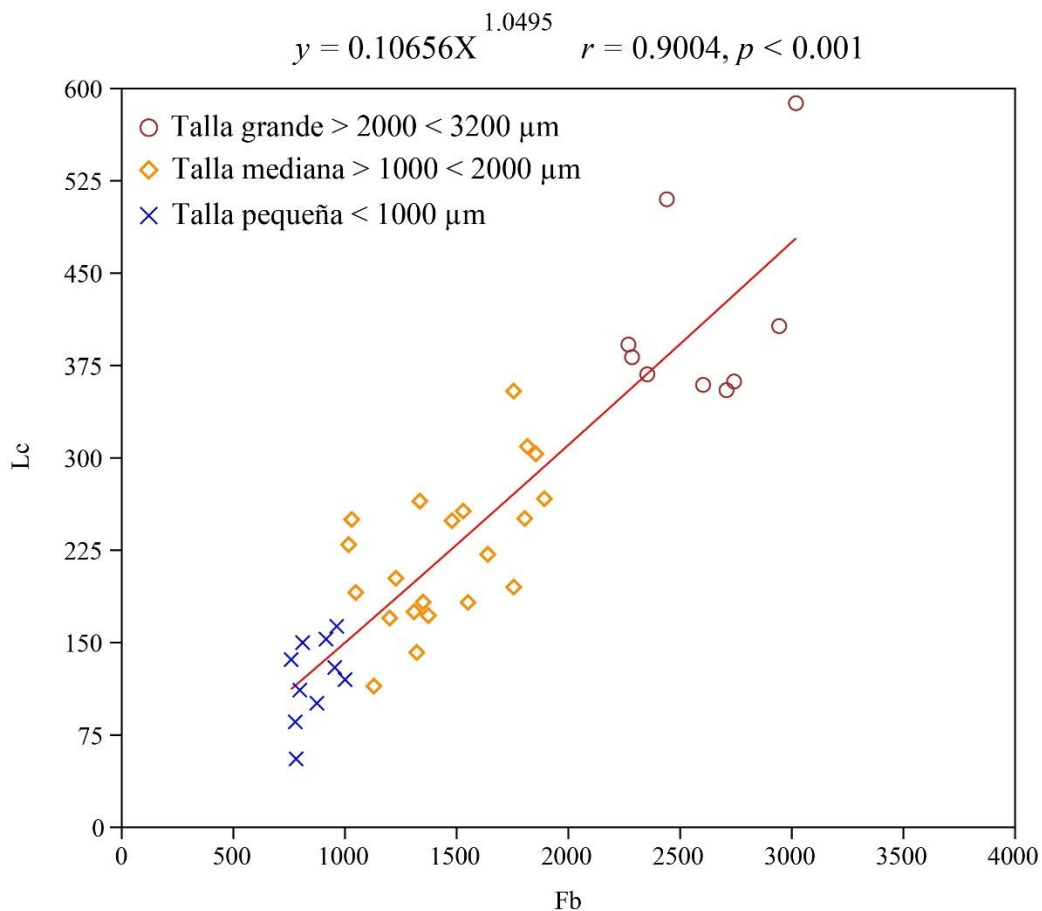


Figura 9. Regresión biviariada de *Opecoelus adsphaericus* en el Mosquito (EM), Baja California. Eje X = Longitud del cuerpo (Lc); Eje Y = largo del Cuerpo anterior (*Fb*). Los símbolos y las medidas de las tallas se refieren sobre esta misma figura. Los valores de la ecuación se mencionan en el **Cuadro 6**.

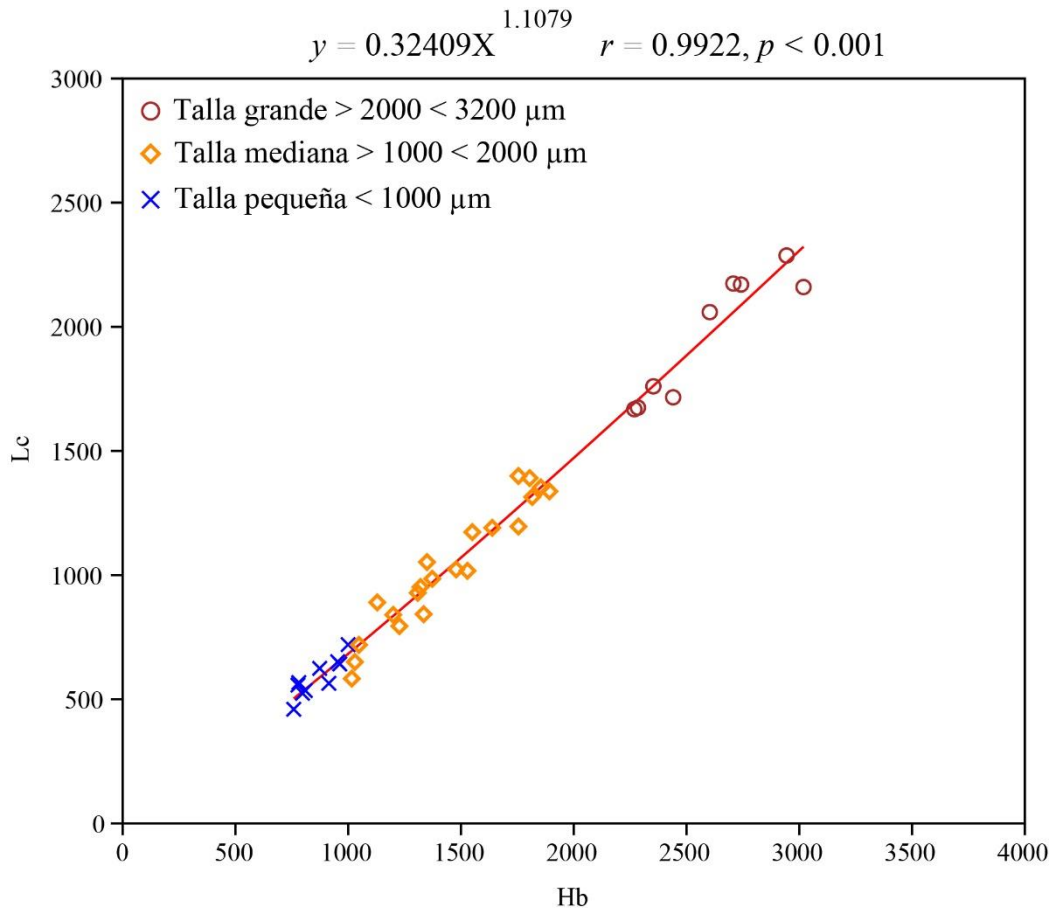


Figura 10. Regresión bivariada de *Opecoelus adsphaericus* en el Mosquito (EM), Baja California. Eje X = Longitud del cuerpo (Lc); Eje Y = largo del Cuerpo posterior (Hb). Los símbolos y las medidas de las tallas se refieren sobre esta misma figura. Los valores de la ecuación se mencionan en el **Cuadro 6**.

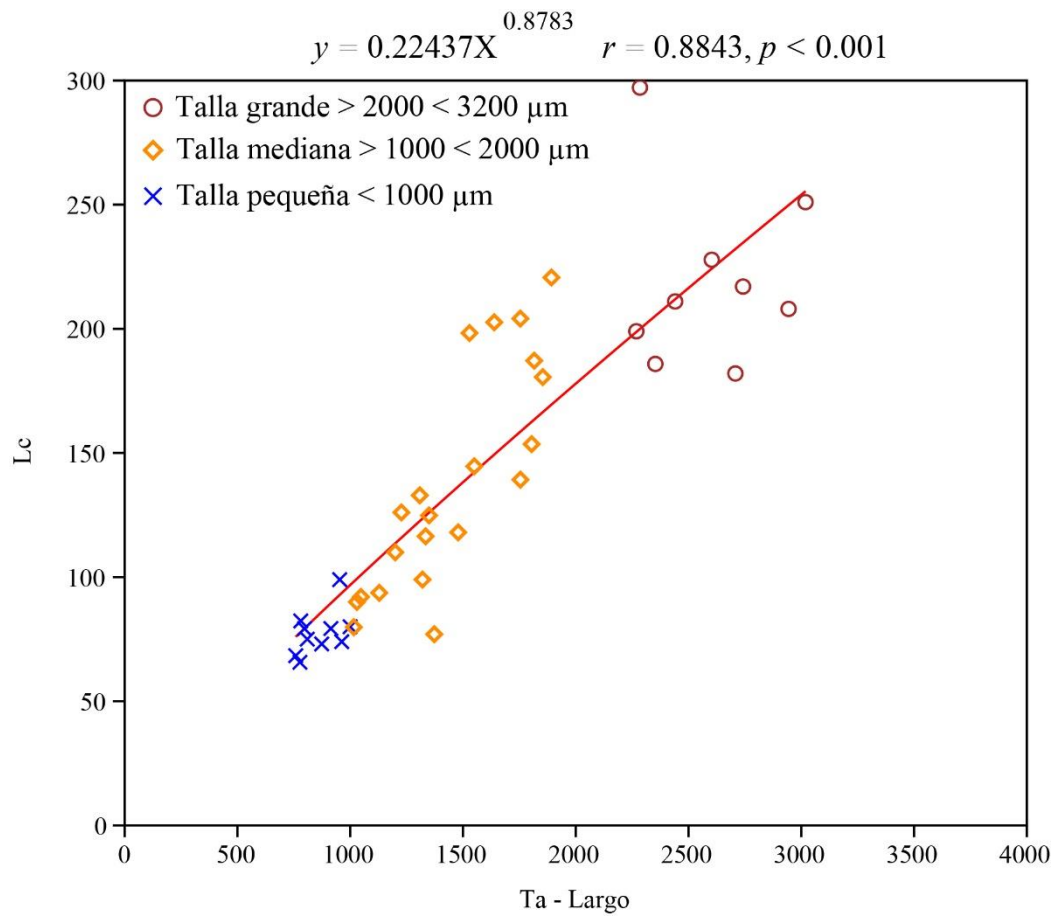


Figura 11. Regresión bivariada de *Opecoelus adsphaericus* en el Mosquito (EM), Baja California. Eje X = Longitud del cuerpo (Lc); eje Y = largo del Testículo anterior (Ta). Los símbolos y las medidas de las tallas se refieren sobre esta misma figura. Los valores de la ecuación se mencionan en el **Cuadro 6**.

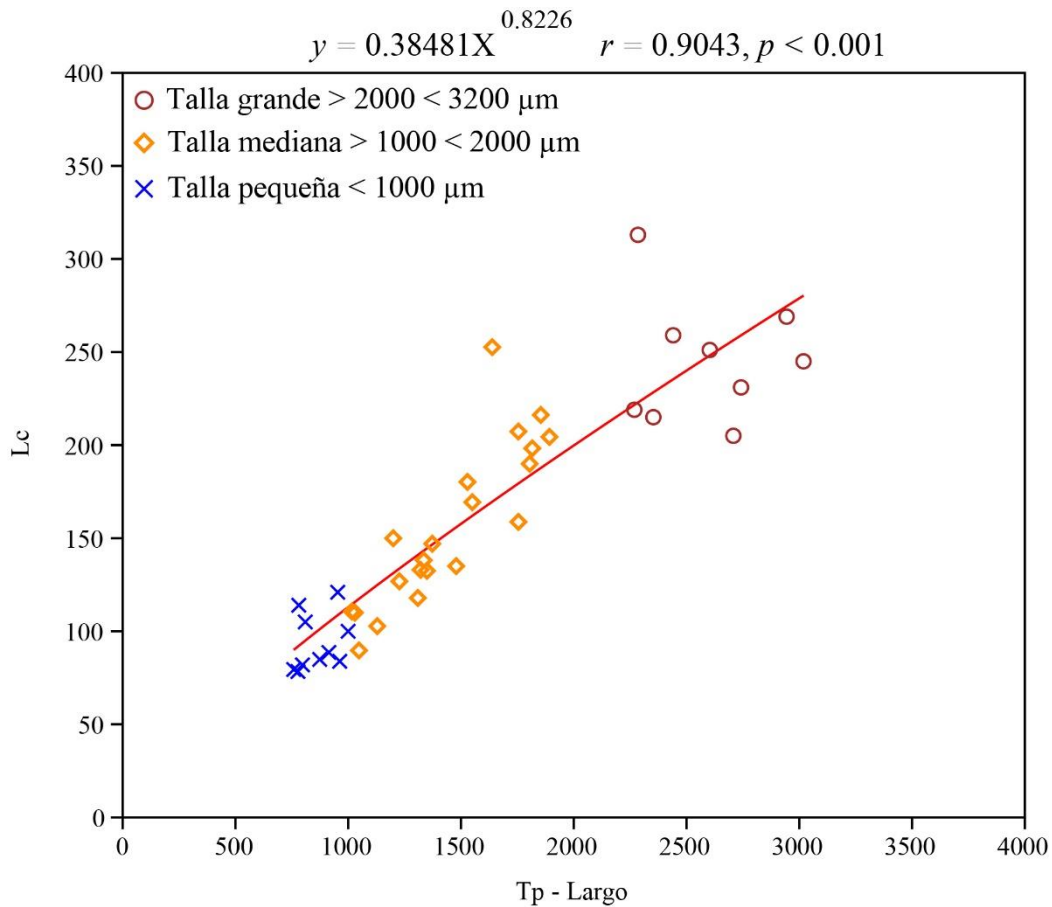


Figura 12. Regresión bivariada de *Opecoelus adsphaericus* en el Mosquito (EM), Baja California. Eje X = Longitud del cuerpo (Lc); eje Y = largo del Testículo posterior (Tp). Los símbolos y las medidas de las tallas se refieren sobre esta misma figura. Los valores de la ecuación se mencionan en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Valores de crecimiento alométrico de *Opecoelus adsphaericus* en el Mosquito (EM), Baja California. Valores de la constante (α), exponente alométrico (b) con error estándar ($\pm ES$), coeficiente de correlación (r), t de *student* (t) para r , y probabilidad (p) de t . *Fb* = Cuerpo anterior; *Hb* = Cuerpo posterior; *Ta* = Testículo anterior y *Tp* = Testículo posterior.

Variable	α	$b \pm ES$	r	t	p
<i>Fb</i>	0.10656	1.0495 \pm 0.0876	0.9004	11.622	< .001
<i>Hb</i>	0.32409	1.1079 \pm 0.0243	0.9922	44.133	<.001
Ta - Largo	0.22437	0.8783 \pm 0.0808	0.8843	14.423	<.001
Tp - Largo	0.38481	0.8226 \pm 0.0668	0.9043	15.478	<.001

6.5. Reconstrucción filogenética con el gen 28S

Los árboles filogenéticos obtenidos por IB y ML fueron congruentes en su mayoría y solo mostraron diferencias de soporte estadístico en algunos de sus nodos (**Figura 13; Anexo 5**). Ambos análisis filogenéticos detectaron como grupo monofilético y con soporte estadístico ($PP \geq 0.95$ y $UFBoot2 \geq 75$) a la subfamilia Opecoelinae conformada por 10 taxa: *Anamalotrema koiae* Gibson y Bray 1984, dos secuencias de *O. fimbriatus* Linton, 1934, *Opecoeloides* sp., *Pseudopecoeloides tenuis* Yamaguti, 1940, *Opegaster* sp., *O. adsphaericus* Manter y Van Cleave, 1951, *Opecoelus* sp., *Discoverytrema gibsoni* Zdzitowiecki, 1990 y *Dimerosaccus oncorhynchi* Shimazu, 1980 (**Figura 13**). Los nodos de soporte de *A. koiae*, *D. gibsoni* y el nodo que une a los clados (*P. tenuis* (*O. fimbriatus* 1 (*O. fimbriatus* 2 + *Opecoeloides* sp.))) + (*Opecoelus* sp. (*Opegaster* sp. + *O. adsphaericus*)) presentaron soporte estadístico únicamente con UFBoot2. Las secuencias generadas para *O. adsphaericus* formaron un grupo monofilético con buen soporte con UFBoot2. *Opegaster* sp. es el grupo hermano del clado de *O. adsphaericus*; mientras que *Opecoelus* sp. es el grupo hermano del clado (*O. adsphaericus* + *Opegaster* sp.), ambas relaciones presentaron buen soporte estadístico ($PP \geq 0.95$ y $UFBoot2 \geq 75$).

La distancia genética calculada para los taxa Opecoelinae con el gen 28S mostró que *O. adsphaericus* a nivel intraespecífico presentó distancia genética nula; mientras que *O. adsphaericus* presentó un valor de 0.76% con *Opegaster* sp., seguida de *Opecoelus* sp. (3.33%), *Anamalotrema koiae* (6.59%), *O. fimbriatus* (KJ001211) (7.19%), *O. fimbriatus* (MK648309) (8.74%), *Opecoeloides* sp. (8.87%), *P. tenuis* (7.87), *D. gibsoni* (7.09%) y *D. oncorhynchi* (8.21%) (**Cuadro 7**).

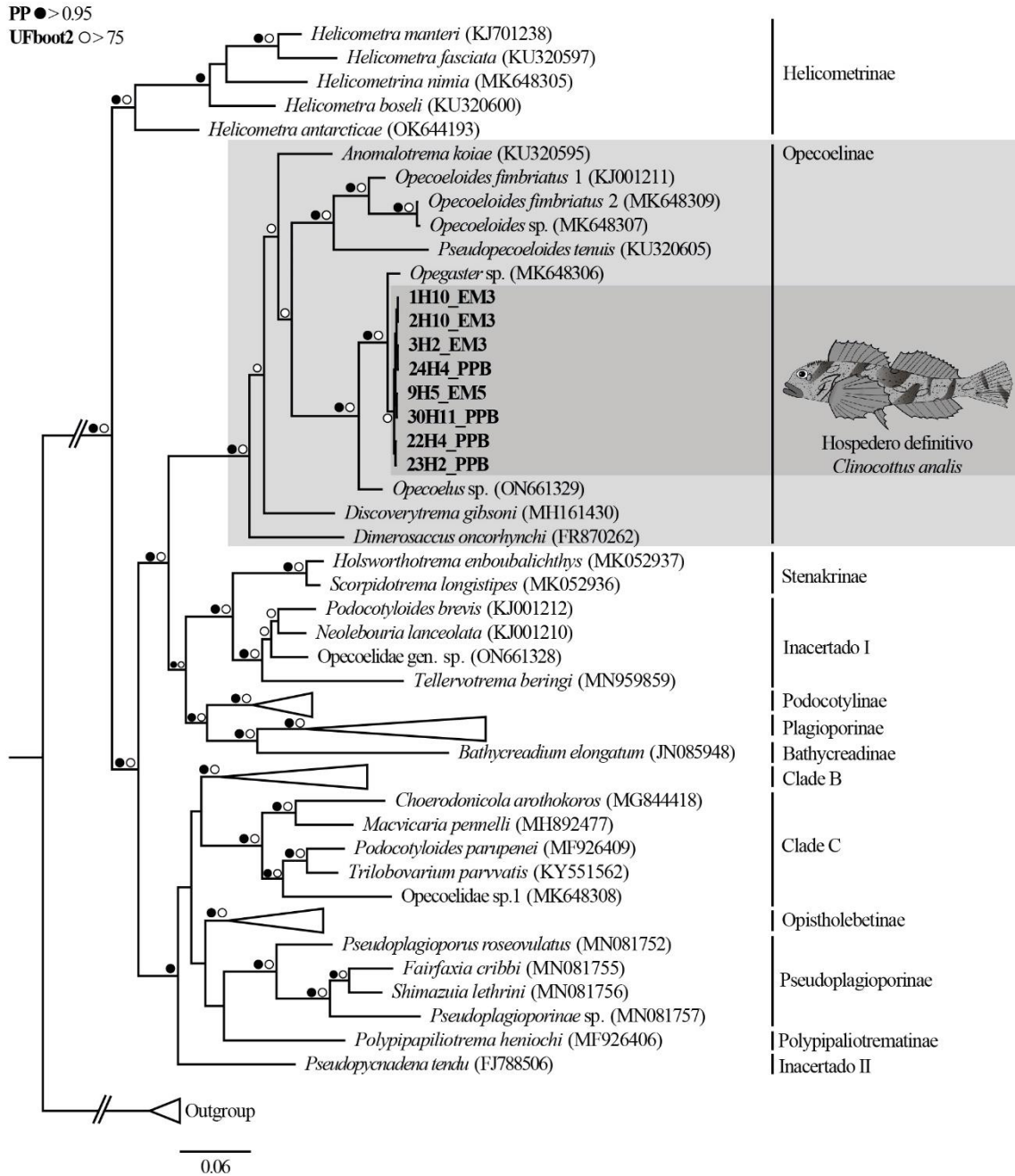


Figura 13. Árbol de consenso estricto obtenido por Inferencia Bayesiana a partir de secuencias parciales del gen 28S para taxones de la familia Opacoelidae. Los acrónimos de las nuevas secuencias de *Opacoelus adsphaericus* (en negritas) corresponden a los mencionados en el Cuadro 8. Los círculos negros y blancos sobre los nodos de las ramas indican la probabilidad posterior (PP \geq 0.95) y los valores del *ultrafast bootstrap* (UFBoot2 \geq 75), respectivamente. La barra en la parte inferior izquierda del árbol representa la distancia de sustitución nucleotídica.

Cuadro 7. Matriz de distancias genéticas calculada por el método de *p-distances* (valores en porcentajes) con secuencias del gen 28S para taxa relacionados de Opecoelinae a partir de análisis de reconstrucción filogenética de Inferencia Bayesiana y de Máxima Verosimilitud.

Taxas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>Opecoelus adsphaericus</i>										
2. <i>Opegaster</i> sp.	0.76									
3. <i>Opecoelus</i> sp.	3.35	3.35								
4. <i>Anamatotrema koiae</i>	6.59	6.59	9.33							
5. <i>Opecoeloides fimbriatus</i> 1	7.19	7.36	9.19	5.66						
6. <i>Opecoeloides fimbriatus</i> 2	8.74	8.65	10.42	6.56	2.88					
7. <i>Opecoeloides</i> sp.	8.87	8.78	10.42	6.83	3.05	0.09				
8. <i>Pseudopecoeloides tenuis</i>	7.87	8.30	10.82	7.87	6.18	7.21	7.49			
9. <i>Discoverytrema gibsoni</i>	7.09	7.35	10.39	5.31	6.93	8.00	8.30	7.70		
10. <i>Dimerosaccus oncorhynchi</i>	8.21	8.21	10.56	6.93	8.46	9.35	9.41	9.32	6.84	

6.6. Variación genética poblacional usando el *BarCode*

Los árboles filogenéticos obtenidos por IB y ML para el gen COI (*BarCode*) fueron idénticos en topología, solo mostraron diferencias de soporte estadístico en algunos de sus nodos (**Figura 14; Anexo 6**). Las 27 secuencias obtenidas de *O. adsphaericus* provenientes de tres sitios de infección, tres tallas, dos localidades y siete muestreos distintos a lo largo de un año (ver **Cuadro 8**), en ambos análisis filogenéticos formaron un grupo monofilético con buen soporte estadístico ($PP \geq 0.95$ y $UFBoot2 \geq 75$) (**Figura 14**). De manera particular, dentro del clado de *O. adsphaericus* se formó un subclado que incluye tres de las ocho secuencias provenientes de Playa Piedra Blanca (PPB) (de tres sitios de infección distintos y que representan dos tallas (pequeña y mediana) y provenientes de un solo muestreo), con buen soporte estadístico ($PP \geq 0.95$ y $UFBoot2 \geq 75$); otro subclado incluye a 15 secuencias de El Mosquito (EM) de distintos muestreos/tallas/sitios de infección, pero únicamente con soporte estadístico para ML ($UFBoot2 \geq 75$).

Con base en la curva de acumulación de haplotipos se detecta que aún no se ha alcanzado la asíntota de haplotipos en las dos localidades analizadas (**Figura 15**). La red de haplotipos tiene un patrón en forma de red de estrella (**Figura 16**). Para las 27 secuencias de *O. adsphaericus* se encontraron 11 haplotipos, 7 para EM y 4 para PPB. Se obtuvo una

diversidad haplotípica (Hd) de 0.7920 y una diversidad nucleotídica (π) de 0.0072. La distribución de haplotipos en el espacio geográfico muestra que no hay haplotipos compartidos entre las dos localidades muestreadas (**Figura 17**). Los 11 haplotipos están repartidos entre los 27 individuos/secuencias analizadas de *O. adsphaericus* de la manera siguiente (Hap # – # ind): hap 1 – tres individuos, hap 2 – tres individuos, hap 3 – un individuo, hap 4 – un individuo, hap 5 – un individuo, hap 6 – dos individuos, hap 7 – un individuo, hap 8 – 12 individuos, hap 9 – un individuo, hap 10 – un individuo y hap 11 – un individuo (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Secuencias obtenidas de *Opecoelus adsphaericus* para los genes 28S y *BarCode* en *Clinocotus analis* desde distintos sitios de infección, localidades y eventos de muestreo. #e = Número de espécimen secuenciado; #h = Número de hospedero examinado; Si = Sitio de infección; CP = Ciego Pilórico; INT = Intestino; EST = Estómago; #EM = Número de evento de muestreo; EM = El Mosquito; PPB = Playa Piedra Blanca; GenBank# = Número de acceso de GenBank para las secuencias generadas en este estudio; #ha = Número de haplotipo para secuencias del gen *BarCode*. Pg (a) = Paragonoforo tipo microfotografía de parásito secuenciado, Pg (b) = Paragonoforo tipo microfotografía de SEM, Pg (c) = Paragonoforo tipo preparación permanente de parásito del mismo hospedero, d = ilustración de parásito del mismo hospedero (siguiendo la terminología de Pleijel *et al.*, 2008). Tallas observadas para *O. adsphaericus*: Pe = Pequeña (< 1000 μm); M = Mediana (> 1000 < 2000 μm); G = Grande (> 2000 < 3200 μm).

#e	#h	Si	#EM	GenBank#		#ha	Talla	Pg (a, b, c, d)
				28S	<i>BarCode</i>			
1	10	CP	EM3	1H10_EM3				c
2	10	INT	EM3	2H10_EM3				c
3	2	INT	EM3	3H2_EM3				c
4	2	INT	EM4		4H2_EM4	4	Pe	
5	3	CP	EM6		5H3_EM6	9	M	
6	3	INT	EM3		6H3_EM3	8	Pe	
7	2	INT	EM3		7H2_EM3	10	Pe	
8	3	INT	EM1		8H3_EM1	8	Pe	
9	5	CP	EM5	9H5_EM5	9H5_EM5	8	M	c, d
10	6	INT	EM6		10H6_EM6	8	Pe	
11	2	INT	EM1		11H2_EM1	8	Pe	
12	3	CP	EM5		12H3_EM5	8	M	
13	1	CP	EM6		13H1_EM6	3	M	
14	1	INT	EM9		14H1_EM9	8	Pe	a
15	1	INT	EM9		15H1_EM9	8	G	a
16	2	INT	EM9		16H2_EM9	8	G	a, c
17	3	INT	EM9		17H3_EM9	11	Pe	a, c
18	3	INT	EM9		18H3_EM9	8	M	a, c
19	3	INT	EM9		19H3_EM9	5	G	a, c
20	4	INT	EM9		20H4_EM9	8	M	a
21	4	CP	EM9		21H4_EM9	8	G	a
22	4	EST	PPB1	22H4_PPB	22H4_PPB1	1	M	c

#e	#h	Si	#EM	GenBank#		#ha	Talla	Pg (a, b, c, d)
				28S	BarCode			
23	2	CP	PPB1	23H2_PPB	23H2_PPB1	1	M	
24	4	INT	PPB1	24H4_PPB	24H4_PPB1	2	M	c
25	5	CP	PPB1		25H5_PPB1	2	M	
26	3	CP	PPB1		26H3_PPB1	6	M	
27	8	INT	PPB1		27H8_PPB1	6	Pe	c
28	7	INT	PPB1		28H7_PPB1	1	Pe	
29	10	INT	PPB1		29H10_PPB1	2	Pe	b
30	11	INT	PPB1	30H11_PPB	30H11_PPB1	7	Pe	

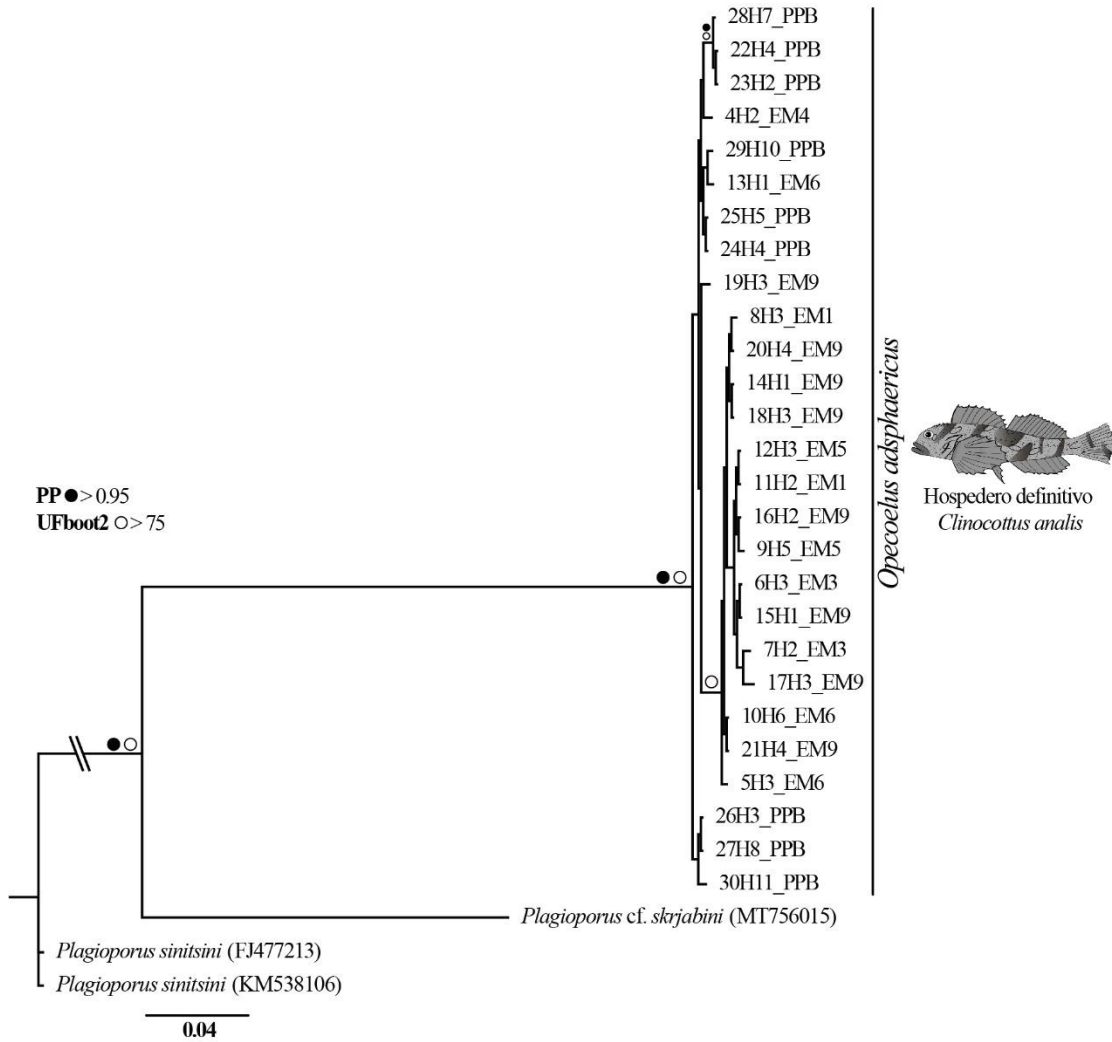


Figura 14. Árbol de consenso estricto obtenido por Inferencia Bayesiana a partir de secuencias del gen *BarCode* para *Opencoelus adsphaericus*. Los acrónimos de las nuevas secuencias de *O. adsphaericus* (en negritas) corresponden a los mencionados en el Cuadro 4. Los círculos negros y blancos sobre los nodos de las ramas indican la probabilidad posterior ($PP \geq 0.95$) y los valores de *ultrafast bootstrap* ($UFBoot2 \geq 75$), respectivamente. EM# = Secuencias obtenidas a partir de individuos de la localidad de El Mosquito desde distintos eventos de muestreo; PPB = secuencias obtenidas a partir de individuos de Playa Piedra Blanca (para más detalle ver **Cuadro 8**). La barra en la parte inferior izquierda del árbol representa la distancia de sustitución nucleotídica.

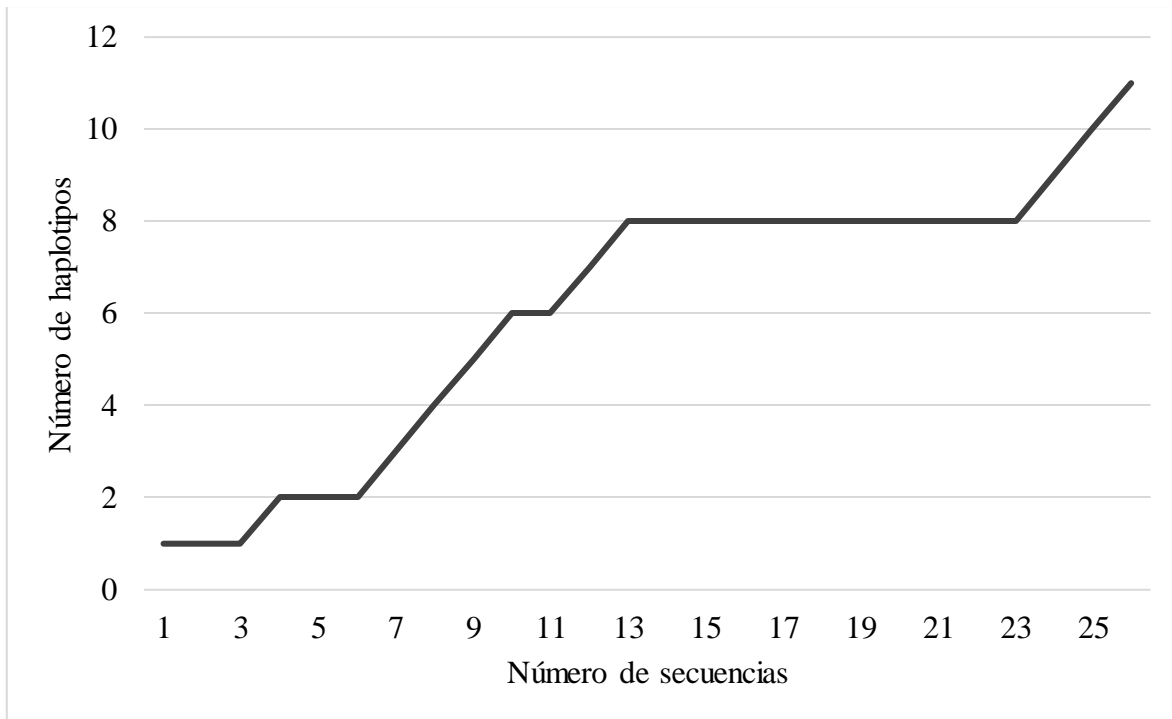


Figura 15. Curva de acumulación de haplotipos de *Opecoelus adsphaericus* observados desde El Mosquito y Playa Piedra Blanca, Baja California, México.

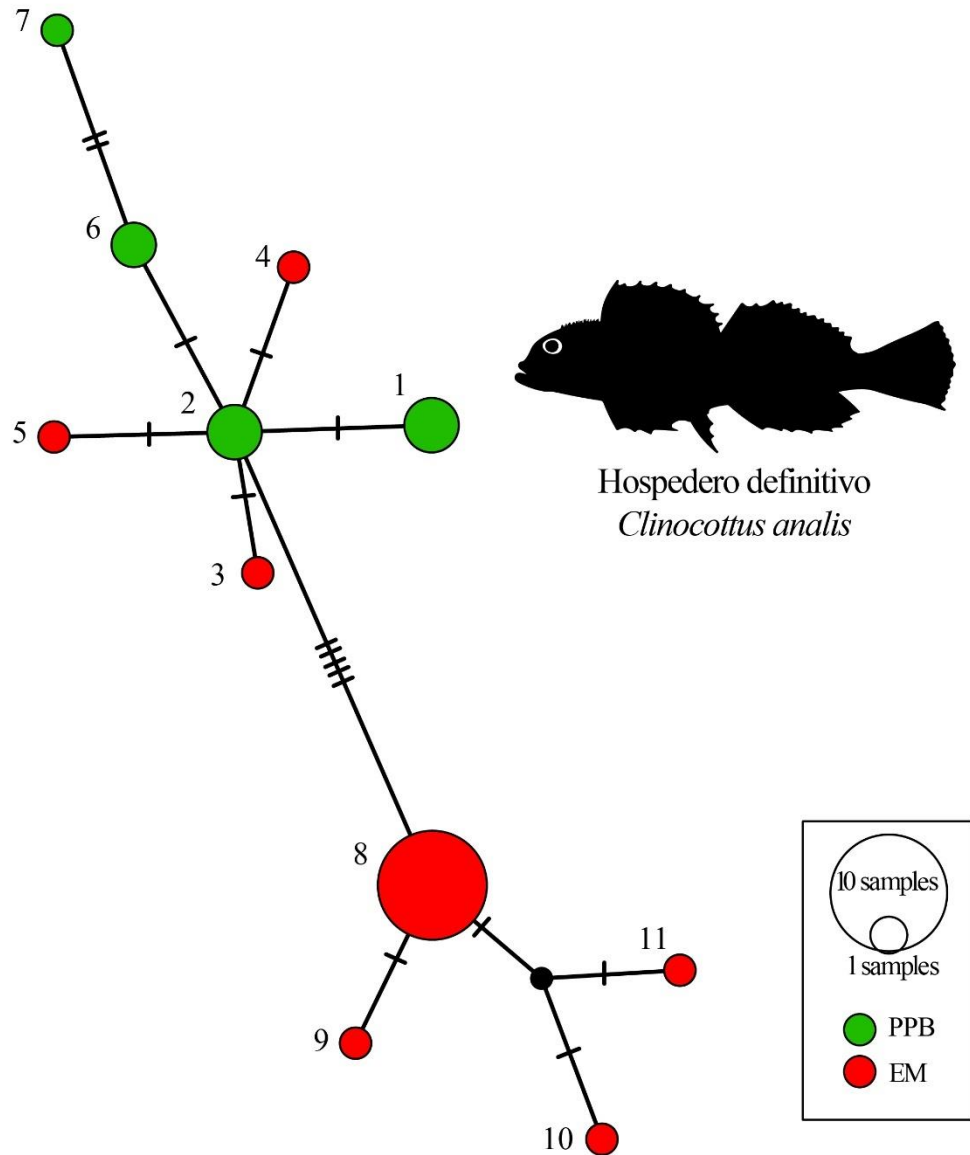


Figura 16. Red de haplotipos de *O. adspbaericus* observados desde El Mosquito y Playa Piedra Blanca, Baja California, México. Los círculos enumerados representan los haplotipos individuales, el tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos que representa cada haplotipo (para más detalle ver **Cuadro 8**). El número de mutaciones entre cada haplotipo se muestran como líneas cortas que conectan la línea entre cada haplotipo. Los colores de los círculos representan las diferentes localidades como se observa en la simbología.

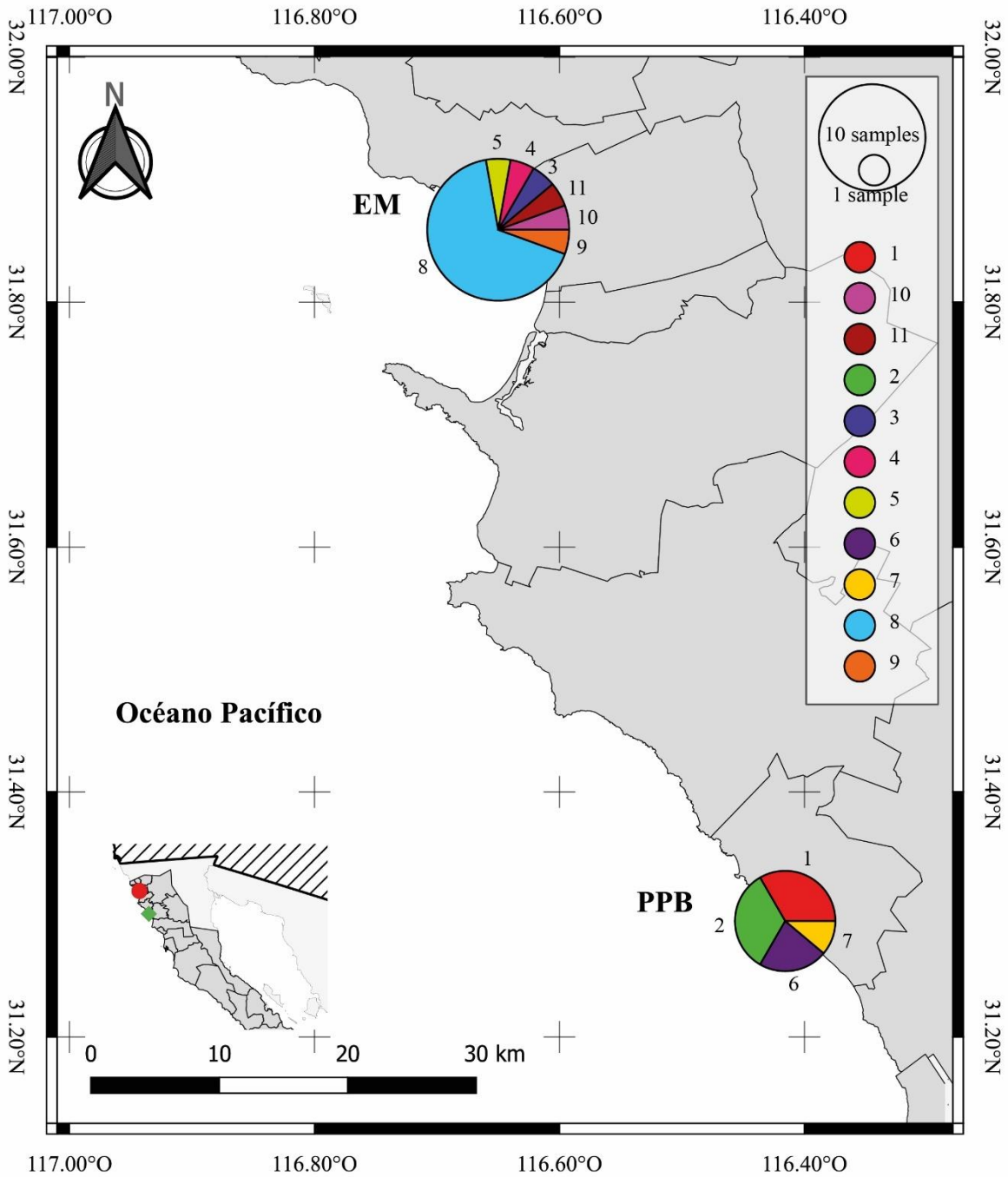


Figura 17. Mapa de la distribución geográfica de los haplotipos encontrados en *Opecoleus adsphaericus* en el gen *BarCode* en El Mosquito (EM) y Playa Piedra Blanca (PPB), Baja California, México. Cada haplotipo se representa por un color en los gráficos de pastel circulares. El tamaño de los círculos de los gráficos de pastel es proporcional al número de individuos que comparten el haplotipo y se encuentra en cada localidad.

7. DISCUSIÓN

7.1. Variación morfológica intraespecífica: repercusiones taxonómicas y recomendaciones

Las medidas morfológicas mencionadas en la descripción original de tres especies cogenéricas de *Opecoelus* registradas como parasitas de *C. analis* (i.e., *O. caballeroi*, *O. cameroni* y *O. pacificus*) desde la provincia biogeográfica Californiana (Caballero C. y Caballero R., 1969, 1976; Caballero R. 1977), presentaron una superposición con las analizadas en este estudio y comparadas con las de la descripción original de *O. adsphaericus* (Manter y Van Cleave, 1951). Sumado a la superposición de medidas, notamos algunas ambigüedades en las descripciones originales de *O. caballeroi*, *O. cameroni* y *O. pacificus* que necesitan ser consideradas en términos taxonómicos como se muestra a continuación.

1) Caballero C. y Caballero R. (1969) en su descripción original de *O. cameroni* no compararon sus medidas con respecto a las de *O. adsphaericus* (Manter y Van Cleave, 1951) debido a que *O. cameroni* originalmente fue descrita como una especie adscrita al género *Opegaster*. Caballero C. y Caballero R. (1969; pp. 963) solo compararon sus medidas de *O. cameroni* con *Opecoelus minimus* Tabungui, 1928, *Opegaster pristipomatis* Yamaguti, 1934 y *Opegaster syngnathi* Yamaguti, 1934. Posteriormente, Aken`Ova (2007) transfirió a *ex Opegaster cameroni*, junto con otras nueve especies más del género *Opegaster*, al género *Opecoelus*. La transferencia de género de las 10 especies fue sugerida con base en que todas compartían “*folículos vitelinos que se extienden anteriormente hasta el margen anterior de la ventosa ventral, una vesícula seminal que se extiende hacia la región posterior del cuerpo, testículos enteros a irregulares y un ovario entero*”. Aken`Ova (2007) no menciona que haya revisado las medidas de los caracteres morfológicos de la descripción original de *Opecoelus cameroni*. A la fecha, a nuestro conocimiento, no existe un estudio que revise y/o compare la identidad taxonómica de *Opecoelus cameroni*.

2) Caballero C. y Caballero R. (1976; pp. 193) mencionaron que diferenciaron a *O. pacificus* de “*las otras 32 especies conocidas en su momento por la longitud y forma de la vesícula seminal y de la bolsa del cirro; por la forma ovoidea de los órganos reproductores*

masculinos y por la posición dorsal subterminal del ano y la distribución de las vitelogenas". Caballero C. y Caballero R. (1976) no hacen una comparación explícita entre las medidas de *O. pacificus* contra las de *O. adsphaericus*. De hecho, Caballero C. y Caballero R. (1976) no mencionan cuáles son las otras "32 especies del género" con las que difieren de *Opecoelus pacificus*.

3) Caballero-Rodríguez (1977) diferenció *O. caballeroi* de *O. adsphaericus* por "*la forma alargada del cuerpo, la situación del poro reproductor, la posición de los testículos y por la distribución de las vitelógenas*". Sin embargo, Caballero-Rodríguez (1977) no hace una comparación entre las medidas morfológicas observadas entre *O. caballeroi* y *O. adsphaericus*.

De manera general, podemos notar que *O. pacificus* y *O. caballeroi* fueron diferenciados de *O. adsphaericus* por cualidades sutiles expresadas en los tamaños del cuerpo y órganos (i.e., testículos, ovario, poro reproductor y folículos vitelinos). En este estudio se ha detectado que *O. adsphaericus* presenta polimorfismo intraespecífico capaz de incluir las medidas de *O. pacificus* y *O. caballeroi*. Por otra parte, previo al presente estudio, las medidas de *O. cameroni* nunca habían sido contrastadas de manera crítico-taxonómica con *O. adsphaericus*. En este estudio detectamos que existe alta similitud morfológica del testículo anterior y posterior, y longitud del cuerpo y la ventosa ventral de *O. cameroni* con *O. adsphaericus*. Tomando en cuenta la superposición de las medidas morfológicas de *O. caballeroi*, *O. cameroni* y *O. pacificus*, así como su inadecuada descripción taxonómica, consideramos muy probable que estas especies puedan ser sinonimas de *Opecoelus adsphaericus*. Adicionalmente, desde las descripciones originales de hace más de 50 años de *O. caballeroi*, *O. cameroni* y *O. pacificus*, no han sido registradas en *C. analis* (ni *G. nigricans* en el caso de *O. cameroni*) u otra especie de hospedero en la región Californiana, USA. Múltiples estudios en la región californiana han registrado como la especie más prevalente del género *Opecoelus* a *O. adsphaericus* en *C. analis* y *G. nigricans* (Wells, 1986; Arai, 1962; Garduño-Martínez, 2023). Por tanto, la carencia de registros de *O. caballeroi*, *O. cameroni* y *O. pacificus* suma a su cuestionamiento taxonómico.

Una de las principales debilidades de las descripciones originales de *O. caballeroi*, *O. cameroni* y *O. adsphaericus* fue la de trabajar con especímenes que probablemente fueron fijados cuando ya estaban muertos, o que fueron montados con técnicas poco eficientes de la época. En nuestro estudio, para caracterizar la variación morfológica de *O. adsphaericus* fue crucial la observación de los especímenes *in vivo* para adquirir conocimiento sobre la forma tridimensional de su cuerpo y su comportamiento. Con ello, logramos captar como es la relajación y contracción del cuerpo, así como el movimiento de estructuras de la ventosa ventral (ver y dar click en [Video 1](#) y [Video 2](#)). Posteriormente, al comparar nuestras observaciones de los especímenes en vivo contra las preparaciones permanentes (en vista bidimensional) logramos discernir la variación de la forma natural de los caracteres morfológicos causada por artefactos debido a los procesos de fijación y/o de montaje. Por ejemplo, debido a que *O. adsphaericus* presenta una amplia variación en el tamaño del cuerpo, es importante fijar los especímenes desde muestras frescas de manera casi inmediata para evitar contracciones que pudieran representar tamaños de cuerpo erróneos resultantes de un mal proceso de fijación, o bien de la fijación y análisis de especímenes ya muertos (**Figura 3**). También, es importante tomar en cuenta la tridimensionalidad y capacidad de movimiento e invaginación de la ventosa ventral que, junto con sus tres pares de papilas sésiles, en las preparaciones permanentes pueden pasar desapercibidas (**Figura 6 A, B y C**). La ventosa ventral con papilas sésiles invaginadas también fue observada por Cribb (1985) en *O. variabilis*, por lo que esta recomendación deber ser tomada en cuenta al momento de caracterizar especies de Opecoelidae.

7.2. Variación morfológica intraespecífica de *Opecoelus adsphaericus* en Baja California

Con base en los resultados obtenidos por el PCA se demostró que *O. adsphaericus* presenta amplio polimorfismo a nivel intraespecífico. Además, las ocho variables morfométricas analizadas en el PCA con bajo valor de correlación (< 65) de los tres grupos analizados, no identificó una separación entre los grupos y las tres tallas (pequeña, mediana y grande) analizadas para *O. adsphaericus*, en dos localidades de Baja California. Un caso de polimorfismo similar al de *O. adsphaericus* fue registrado para su especie cogenérica *O.*

variabilis Cribb, 1985, en donde la variación morfológica se expresó en la extensión y tamaño de los folículos vitelinos, extensión de la vesícula seminal, la proyección de la ventosa ventral y el tamaño del ovario. Aunado a lo anterior, se observó que en individuos más grandes, la ventosa ventral es más prominente y la región posterior del cuerpo ocupa una mayor proporción de la longitud del cuerpo (Cribb, 1985). *Opecoelus variabilis* es una especie generalista que parasita a nueve familias de peces dulceacuícolas, i.e., Teraponidae Richardson, 1842, Plotosidae Bleeker, 1858, Anguillidae Rafinesque, 1810, Retropinnidae Gill, 1862, Eleotridae Bonaparte, 1835, Ambassidae Klunzinger, 1870, Cyprinidae Rafinesque, 1815, Melanotaeniidae T.N. Gill, 1894, Poeciliidae Bonaparte, 1831, Atherinopsidae Risso, 1827 de la localidad de Río Burdekin y cuatro localidades dentro del sistema del Río Brisbane del continente Australiano. Así, la variación morfológica de *O. variabilis* fue observada respecto los tamaños de sus especímenes (732 μm min – 1,461 μm máx) a partir de 28 individuos analizados. En el caso de *O. adsphaericus*, también su variación morfológica se observa en distintos tamaños, aquí categorizados como tres intervalos de tallas: pequeña, mediana y grande.

Pinto *et al.* (2017) detectaron polimorfismo intraespecífico expresado en intervalos de tallas en trematodos de la especie *Platynosomum illicens* Braun, 1901, parásito de primates no humanos en Brasil. Mediante un análisis morfológico de PCA evaluaron el polimorfismo de tres especies (grupos) cogenéricas; i.e., *P. illicens*, *P. amazonensis* Kingston and Cosgrove, 1967 y *P. marmoseti* Kingston y Cosgrove, 1967. En general, *P. amazonensis* y *P. marmoseti* se diferenciaban por presentar tallas medianas y pequeñas, respectivamente, en contraste con *P. illicens*. Pinto *et al.* (2017) detectaron que *P. illicens* presentaba intervalos de tallas (pequeños, medianos y grandes) y al no encontrar caracteres morfológicos que delimitaran dichas especies cogenéricas, sugirieron sinonimizar a *P. amazonensis* y *P. marmoseti* con *P. illicens*. Debido a lo anterior Pinto y colaboradores (2017) propusieron que la presencia de parásitos de tallas pequeñas puede deberse a una infección reciente y transmisión activa hacia el hospedero; mientras que la presencia de tallas grandes puede ser indicativo de la edad del parásito y del hospedero. Aunado a lo anterior, la presencia de tallas pequeñas de *O. adsphaericus* puede representar una

infección reciente en *C. analis* relacionada a una transmisión activa vía ingestión de hospederos intermediarios hacia el hospedero definitivo. Esto último es posible debido a que *C. analis* presenta una dieta carnívora basada principalmente en crustáceos, anélidos, moluscos e insectos (Ruiz-Campos, 1986; Wells, 1986; Ruiz-Campos y Hamman, 1991; Acosta-Zamorano, 2009), invertebrados que pudieran fungir como hospederos intermediarios en el ciclo de vida de *Opecoelus adsphaericus*. Por otra parte, la presencia de tallas grandes de *O. adsphaericus* en *C. analis* puede deberse tanto a la edad del parásito como a la del hospedero. Por ejemplo, en un escenario de recién infección de *O. adsphaericus* (i.e., fases adultas de talla pequeña) en peces juveniles, el crecimiento y desarrollo del hospedero podría influir en el crecimiento y desarrollo del parásito. Para analizar si las tallas de *O. adsphaericus* están asociadas al crecimiento de sus hospederos, se requiere de un estudio que cuantifique de manera explícita el número de especímenes de talla pequeña, mediana y grande, por cada talla de hospedero de *C. analis* examinado, y detectar si existen correlación estadísticamente significativa entre las tallas del hospedero y la de sus parásitos, al menos a lo largo de un año de muestreo. Un futuro estudio en esta temática ayudará a poner a prueba esta inferencia.

Otra posibilidad que puede explicar el alto polimorfismo es la competencia intraespecífica de individuos parásitos cuando compiten por los recursos dentro del mismo hospedero, lo que puede influir en el crecimiento y desarrollo de los parásitos, implicando que algunos individuos alcancen tamaños mayores mientras que otros permanezcan más pequeños (Gower y Webster, 2014). Esch y Fernandez (1993) examinaron la variación en el tamaño de distintos trematodos y sugirieron que la competencia intraespecífica afecta cuando se observa una alta abundancia parasitaria coexistiendo en un mismo sitio de infección de un mismo hospedero, en este caso, los parásitos suelen alcanzar tamaños más pequeños. Mouritsen y Andersen (2017) demostraron en distintas especies de trematodos que en infecciones con múltiples individuos parásitos que comparten un mismo hospedero pueden llegar a desarrollar estrategias para maximizar su éxito reproductivo, lo que puede influir en diferencias en el tamaño de los parásitos.

7.3. Crecimiento alométrico

El análisis de crecimiento alométrico intraespecífico detectó un gradiente de crecimiento en las estructuras del cuerpo, como región anterior, región posterior, largo del testículo anterior y posterior, respecto a la longitud del cuerpo. El crecimiento alométrico fue positivo tanto en la región anterior y región posterior; en otras palabras, tanto a región anterior y posterior crecen a una tasa más alta en comparación con la longitud del cuerpo. El patrón de crecimiento alométrico positivo de la región anterior (*Fb*) ha sido registrado en otras especies de trematodos marinos como *M. globosa* y *E. heterostomum* (Fischthal, 1980; Jhansilakshmibai y Madhavi, 1997). También, el crecimiento alométrico positivo de la región posterior (*Fb*) ha sido encontrado en distintas especies de trematodos marinos; e.g., *A. mexicanum*, *A. fishelsoni*, *E. heterostomum*, *M. globosa*, *Multitestis rotundus* Sparks, 1984, *Proctophantastes nettastomatis* Machida, Kamegai y Kuramochi, 2006 *Pseudocreadium lamelliforme* (Linton, 1907) Manter, 1945, *Paracryptogonimus americanus* Manter, 1940, *S. equilata* y *Leurodera decora* Linton, 1910 (Fischthal, 1978a, b; Fischthal, 1979, 1980; Jhansilakshmibai y Madhavi, 1997; Mouahid *et al.*, 2011). En nuestro análisis, las estructuras del largo del testículo anterior y posterior de *O. adsphaericus*, sugieren que estas crecen a una baja tasa de crecimiento en relación con la longitud del cuerpo, lo que coincide en estudios realizados en los trematodos *A. mexicanum* y *S. equilata*, registrando un crecimiento alométrico negativo en el testículo anterior y posterior. En contraste, en el trematodo *A. fishelsoni* se registró un crecimiento alométrico positivo en el testículo respecto a la longitud del cuerpo (Fischthal, 1978a, b; 1979). Jhansilakshmibai y Madhavi (1997) han observado que en etapas de metacercaria de *E. heterostomum*, se presenta un mayor crecimiento y desarrollo de estructuras del cuerpo, mientras que en etapa adulta hay un crecimiento limitado, enfocado principalmente en la producción de huevos. Nuestros resultados de crecimiento alométrico negativo detectados en ambos testículos de la fase adulta de *O. adsphaericus* coinciden con el caso anterior, lo que probablemente representa un bajo crecimiento y desarrollo en las estructuras morfológicas internas analizadas. De manera paralela, hipotetizamos que el alargamiento del cuerpo pudiera repercutir en una mayor producción de huevos, beneficiando de esta manera la aptitud reproductiva, i.e., un proceso de plasticidad fenotípica.

Fishchthal *et al.* (1980) midieron si distintos hospederos definitivos teleósteos del género *Lutjanus* afectaban al crecimiento del trematodo *Metadena globosa* (Linton, 1910) Manter, 1947, y no encontraron correlación. Sin embargo, Mouahid *et al.* (2011) encontraron correlación del largo y ancho de las tallas grandes del trematodo *Protophantastes nettastomatis* Machida, Kamegai y Kuromochi, 2006, con las tallas mayores de sus hospederos definitivos, i.e., peces marinos del orden Anguilliformes. Con base en la comparación de tallas entre sus distintos grupos de hospederos (Ophidiiformes y Anguilliformes), Mouahid *et al.* (2011) sugirieron que existía una correlación de tamaños debida a un proceso de plasticidad fenotípica de *P. nettastomatis* influenciado por el tamaño del hospedero de definitivo. Por tanto, el crecimiento alométrico intraespecífico y las diferencias de tallas observadas de *O. adsphaericus* probablemente están relacionadas al tamaño del hospedero definitivo asociados a procesos de plasticidad fenotípica. Lo anterior sugiere que las estructuras morfológicas pueden responder a cambios alométricos respecto a la longitud del cuerpo debido a factores ambientales que modifiquen la relación constante de las tasas de crecimiento de diferentes estructuras, lo que puede incluir: infección por otras especies de parásitos en el hospedero, nutrición del hospedero y el parásito, así como el tamaño y especie del hospedero (Watertor, 1967; Noble y Noble, 1976).

Otra manera de explorar como actúa el proceso evolutivo de la variación morfológica intraespecífica en *O. adsphaericus*, es conocer qué grupos de invertebrados participan como hospederos intermediarios en su ciclo de vida. Si bien, anteriormente ya se comentó que *C. analis* presenta una dieta carnívora; es importante mencionar que dicha dieta presenta intervalos preferenciales según la fase de desarrollo de *C. analis* (Ruiz-Campos y Hamman, 1991). Por ejemplo, las fases juveniles de *C. analis* se alimentan de ostrácodos, copépodos, insectos, anfípodos, isópodos y poliquetos; mientras que las fases de talla adulta (> 60 mm) (Wells, 1986) presentan una dieta preferencial de anfípodos, isópodos, poliquetos, bivalvos, gasterópodos y braquiuros (Ruiz-Campos y Hamman, 1991). Por tanto, la variación morfológica de tallas observada en *O. adsphaericus* pudiera estar relacionada a la ingestión preferencial de algún hospedero intermediario. Los hospederos

intermediarios de Opecoelidae son principalmente moluscos y crustáceos (Cribb, 2005). En el caso de *O. adsphaericus* es importante considerar el efecto de la naturaleza filogenética de cada grupo de hospederos intermediarios que pudieran involucrarse en su ciclo de vida y detectar su posible repercusión causal de su variación morfológica intraespecífica (ver Martin *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2020a y b).

Opecoelus adsphaericus ha sido registrado como parásito en fase adulta en cuatro familias de peces distintas (i.e., Cottidae, Khyposidae, Mullidae y Scorpaenidae) (Manter y Van Cleave, 1951; Fabio, 1981; Arai, 1963; Pritchard, 1966; Lique *et al.*, 2002) por lo que es considerada una especie generalista. Así mismo, sería interesante conocer y comparar la variación morfológica asociada a las especies/familias de hospederos definitivos en relación con la dieta, tamaño del pez y su ecología, e investigar cómo influye en el crecimiento y desarrollo del parásito.

7.4. Posición filogenética 28S

En este estudio se determinan por vez primera las relaciones filogenéticas de *Opecoelus* y *Opegaster* dentro de la subfamilia Opecoelinae. El análisis filogenético de la base de datos del gen 28S agrupó en un clado las secuencias de *O. adshpaericus* dentro de Opecoelinae y se relaciona con *Opegaster* sp. (MK648306), y junto con *Opecoelus* sp. (ON661329) forman el Clado *Opecoelus–Opegaster* con soporte estadístico con PP y UFBoot2. Las relaciones filogenéticas obtenidas dentro Opecoelidae con IB y ML, fueron similares a las obtenidas en estudios filogenéticos usando el mismo gen (Fayton y Andrés, 2016; Bray *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2017, 2018, 2020a, b; Sokolov *et al.*, 2019). La secuencia de *Opecoelus* sp. (ON661329) fue obtenida de un espécimen en fase de metacercaria como parásita del crustáceo marino *Nyctiphanes australis* G.O. Sars, 1883, en el puerto de Otago, Dunedin, Nueva Zelanda (Bennett *et al.*, 2022). La secuencia de *Opegaster* sp. (MK648306) fue obtenida de un espécimen en fase desconocida como parásito del pez intermareal *Tomicodon* sp. (Gobiesocidae) en Barra de Cuatunilco, Oaxaca, México (Pérez-Ponce de León y Hernández-Mena, 2019). Con base en las relaciones filogenéticas del Clado *Opecoelus–Opegaster*, resalta la preponderancia de evaluar si la presencia de los folículos vitelinos, antes o

después de la ventosa ventral, es un carácter robusto o no para discernir especies de ambos géneros (Cribb, 1985, 2005; Shimazu, 1988; Aken'Ova, 2007; Bray y Justine, 2013). Desafortunadamente, Pérez-Ponce de León y Hernández-Mena (2019) no mencionan si existen ejemplares de referencia de los especímenes de procedencia de sus secuencias, por lo que se desconoce su veracidad taxonómica.

En este estudio, las especies representantes en el análisis filogenético de la subfamilia Opecoelinae son de hábitats marinos (a excepción de *Dimerosaccus oncorhynchi*, debido a que su hospedero definitivo es de hábitats diádromos), y se han registrado parasitando a ocho familias de teleósteos (Gobiesocidae, Priacanthidae, Sciaenidae, Lutjanidae, Salmonidae, Muraenolepididae y Scorpaenidae). Estos hospederos definitivos habitan aguas poco profundas en zonas rocosas e infralitorales, plataformas continentales, estuarios, arrecifes costeros, charcas litorales, arrecifales e intermareales (Andrés *et al.*, 2014b; Shedko *et al.*, 2015, 2019; Bray *et al.*, 2016; Pérez Ponce de León y Hernández-Mena, 2019; Bennett *et al.*, 2022). Por tanto, los opecoelinos analizados en este estudio representan un grupo monofilético asociado a la zona litoral y nerítica marina.

Las distancias genéticas (en porcentajes) del gen 28S, entre las 10 especies de la subfamilia Opecoelinae, osciló entre 0.09 – 10.82. Las distancias genéticas entre las especies de *Opegaster* y *Opecoelus* fue de 0.76 – 3.35; de manera similar, las distancias genéticas observadas entre *Opecoeloides* spp. fueron de 0.09 – 3.05. A la fecha, en otros estudios filogenéticos con datos moleculares (e.g. Fayton y Andrés, 2016; Bray *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2017, 2018, 2020a, b; Sokolov *et al.*, 2019) no se han calculado las distancias genéticas interespecíficas en Opecoelidae. Debido al bajo número de especies con información de secuencias por el momento no es posible detectar un patrón de divergencia genética interespecífico; sin embargo, los valores observados entre las especies de *Opegaster* y *Opecoelus* en contraste con *Opecoeloides* spp. podrían dar la primera evidencia de un posible patrón de divergencia genética en Opecoelinae.

Opegaster sp. (MK648306) y *O. adsphaericus* han sido registrados en las costas de la pacífico mexicano, pero no se observa un área de simpatría de sus hospederos definitivos.

La secuencia de *Opegaster* sp. (MK648306) fue obtenida de *Tomicodon* sp. (Gobiesocidae) en la Barra de Cuatunaco, Oaxaca (Pérez Ponce de León y Hernández-Mena, 2019) en hábitats intermareales, y no se han registrado especies de este pez en la Península de Baja California. Por otra parte, el hospedero definitivo de *O. adsphaericus*, *C. analis* (Cottidae) se restringe desde el Cabo Mendocino, California hasta el Sur de Punta Asunción Baja California Sur (Miller y Lea, 1972) restringiéndose únicamente en zonas del intermareal rocoso (Ruiz-Campos *et al.*, 2010). Por tanto, aun cuando observamos una baja divergencia genética de 0.76% entre *O. adsphaericus* y *Opegaster* sp. (MK648306), la separación filogenética de ambos grupos está mostrando que son linajes con una evolución independiente.

7.5. Genética de poblaciones *BarCode*

Este trabajo aporta el primer estudio de variación genética entre dos localidades en opecoelidos mediante la utilización de la región “*BarCode*” del gen COI. Los árboles filogenéticos obtenidos para el gen *BarCode* de IB y ML fueron similares en su topología y formaron un grupo monofilético con alto soporte estadístico para todas las secuencias de *Opecoelus adsphaericus*. No se detectaron relaciones genéticas dentro de las 27 secuencias analizadas en las dos localidades (18 de EM y 9 de PPB), con respecto a sus tallas, meses de muestreo o sitios de infección. Esto implica que no existe relación genética asociada a la talla y como consecuencia a su polimorfismo morfológico.

Los datos obtenidos de las secuencias del *BarCode* para individuos de *O. adsphaericus* de EM y PPB revelaron una alta variación genética intraespecífica (0.0072 de diversidad nucleotídica) así como una alta diversidad de haplotipos. En estudios previos, también se ha registrado una alta diversidad de haplotipos en distintos grupos de parásitos platelmintos marinos. Por ejemplo, en el trematodo marino *Microphallus piriformes* Galaktionov, 1983, se obtuvo a partir de 64 muestras secuenciadas, una alta diversidad de 29 haplotipos encontradas en cuatro localidades de las cotas del Mar Atlántico Norte (Repkin *et al.*, 2020). En el cestodo *Oncomegas wagneri* (Linton, 1890) Dollfus, 1929, a partir de 52 secuencias se obtuvo 44 haplotipos distintos en una especie de hospederos intermediario (*Cyclopseta chittendeni* Bean, 1895) y dos especies de hospederos definitivos

(i.e., *Rhyzoprionodon terraenovae* Richardson, 1836 e *Hypanus americanus* Hildebrand y Schroeder, 1928) y nueve estaciones oceanográficas del Golfo de México (Martínez-Aquino *et al.*, 2019). Es necesario realizar más estudios y aumentar el tamaño de localidades y especies de peces hospederos a lo largo de la costa de la Península de Baja California e Islas aledañas para tener una inferencia más potente sobre la variación genética intraespecífica de *Opecoelus adsphaericus*.

8. CONCLUSIONES

- 1) *Opecoelus adsphaericus* presenta amplio polimorfismo morfológico intraespecífico a nivel local. No se detectó separación entre los tres grupos de tallas. Los resultados e interpretación de los análisis de PCA y crecimiento alométrico sugieren un proceso de plasticidad morfológica cuyos factores evolutivos necesitan ser explorados.
- 2) Los análisis filogenéticos con el gen 28S apoyan la posición taxonómica de *O. adsphaericus* dentro de la subfamilia Opecoelinae.
- 3) Las secuencias del fragmento del *BarCode* de *Opecoelus adsphaericus* presentan una amplia variación genética intraespecífica, aunado a la presencia de una gran cantidad de haplotipos presentes en las dos localidades muestreadas. Así, no se observó variación genética asociada a las tres tallas, sitios de infección, meses de muestreo o localidades analizadas (i.e., El Mosquito y Playa Piedra Blanca).

9. PERSPECTIVAS

- 1) Analizar si la influencia de las interacciones de hospedero-parásito pueden incidir en el polimorfismo morfológico intraespecífico de *O. adsphaericus*, investigando los distintos hospederos intermediarios y definitivos que pudieran estar involucrados en su ciclo de vida.
- 2) Ampliar el número de especies de *Opegaster* y *Opecoelus* a partir de distintos orígenes geográficos y hospederos en futuros estudios filogenéticos, para poder determinar la separación o sinonimia estos géneros.

- 3) Explorar la causa del polimorfismo morfológico intraespecífico en *O. adsphaericus*, combinando causas distintas; e.g., biológicas, ecológicas, morfológicas, de historias y ciclo de vida y filogenéticas.

10. REFERENCIAS

Acosta-Zamorano, D. (2009). Estructura poblacional y relaciones tróficas de peces intermareales de biotopos rocosos del noroeste de Baja California, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/1012/1/ENS061726.pdf>

Aguilar-Aguilar, R., Ruiz-Campos, G., Martorelli, S., Montes, M. M., y Martínez-Aquino, A. (2019). A new species of *Ascarophis* (Nematoda: Cystidicolidae) parasitizing *Clinocottus analis* (Pisces: Cottidae) from Baja California, Mexico. *Journal of Parasitology*, 105(4), 524-532. <https://doi.org/10.1645/19-14>

Aken'Ova, T. O. (2007). The taxonomic status of *Opegaster* Ozaki, 1928 and the description of four new species of *Opecoelus* Ozaki, 1925 (Digenea: Opecoelidae) from marine teleosts in Australian waters. *Systematic Parasitology*, 67(1), 25-42. <https://doi.org/10.1007/s11230-006-9068-0>

Aken'Ova, T. O., y Cribb, T. H. (1996). Two species of *Coitocaecum* Nicoll, 1915 (Digenea: Opecoelidae) from Moreton Bay, Queensland, Australia. *Systematic Parasitology*, 33, 217-224. <https://doi.org/10.1007/BF01531203>

Alvarado-Villamar, M. R., y Ruiz-Campos, G. (1992). Comparative study of the degree of incidence of macroparasites in six species of *Sebastes* (Pisces, Scorpaenidae) from the northwestern coast of Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas*, 18(1), 79-92. <https://doi.org/10.7773/cm.v18i1.882>

Andres, M. J., Pulis, E. E., y Overstreet, R. M. (2014b). New genus of opecoelid trematode from *Pristipomoides aquilonaris* (Perciformes: Lutjanidae) and its phylogenetic affinity within the family Opecoelidae. *Folia parasitologica*, 61(3), 223-230. <https://doi.org/10.14411/fp.2014.033>

Andres, M., Ray, C., Pulis, E., Curran, S. y Overstreet, R. (2014a). Molecular characterization of two opecoelid trematodes from fishes in the Gulf of Mexico, with a description of a new species of *Helicometra*. *Acta Parasitologica*, 59(3), 405-412. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0258-7>

Arai, H. P. (1963). Tremátodos digéneos de peces marinos de Baja California, México. *An Inst Biol Universidad Nac Autón México*, 33, 113-130.

Banerjee, A. C. (1965). Some opacoelid trematodes from California with a description of *Opecoelus noblei*, sp. nov. *American Midland Naturalist*, 74, 451–456. <https://doi.org/10.2307/2423274>

Bennett, J., Poulin, R., y Presswell, B. (2022). Annotated checklist and genetic data for parasitic helminths infecting New Zealand marine invertebrates. *Invertebrate Biology*, 141(3), e12380. <https://doi.org/10.1111/ivb.12380>

Bray, R. A. (1987). Some helminth parasites of marine fishes of South Africa: Family Opecoelidae (Digenea). *Journal of Natural History*, 21, 1049–1075. <https://doi.org/10.1080/00222938700770651>

Bray, R. A., Cribb, T. H., Littlewood, D. T., y Waeschenbach, A. (2016). The molecular phylogeny of the digenean family Opecoelidae Ozaki, 1925 and the value of morphological characters, with the erection of a new subfamily. *Folia parasitologica*, 63, 2016.013. <https://doi.org/10.14411/fp.2016.013>

Bray, R. A., Cutmore, S. C., y Cribb, T. H. (2022). A paradigm for the recognition of cryptic trematode species in tropical Indo-west Pacific fishes: the problematic genus *Preptetos* (Trematoda: Lepocreadiidae). *International Journal for Parasitology*, 52(2-3), 169-203. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.004>

Bray, R. A., Waeschenbach, A., Dyal, P., Littlewood, D. T. J., y Morand, S. (2014). New digeneans (Opecoelidae) from hydrothermal vent fishes in the south eastern Pacific Ocean, including one new genus and five new species. *Zootaxa*, 3768(1), 73-87. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3768.1.5>

Bray, R. A., Webster, B. L., Bartoli, P., y Littlewood, D. T. J. (2005). A molecular phylogenetic study of the Acanthocolpidae (Digenea). *Acta Parasitologica*, 50, 281-291.

Bray, R. A., y Cribb, T. H. (1989). Digeneans of the family Opecoelidae Ozaki, 1925 from the southern Great Barrier Reef, including a new genus and three new species. *Journal of Natural History*, 23, 429–473. <https://doi.org/10.1080/00222938900770261>

Bray, R. A., y Justine, J. L. (2013). A digenean parasite in a mudskipper: *Opegaster ouemoensis* sp. n. (Digenea: Opecoelidae) in *Periophthalmus argentilineatus* Valenciennes (Perciformes: Gobiidae) in the mangroves of New Caledonia. *Folia Parasitologica*, 60(1), 7. DOI: 10.14411/fp.2013.002

Briggs, J. C. (1974). Marine Zoogeography McGraw Hill. *Book Co*, 474.

Brown, S. D., Collins, R. A., Boyer, S., LEFORT, M. C., Malumbres-Olarte, J. A. G. O. B. A., Vink, C. J., y Cruickshank, R. H. (2012). Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular ecology resources*, 12(3), 562-565. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x>

Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., y Shostak, A. W. (1997). Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis *et al.* Revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4), 575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>

Caballero C., E., y Caballero R., G. (1976). Estudio de la colección de tremátodos colectados por Howard A. Winter en peces del Océano Pacífico de México y de los Estados Unidos de Norte América. V. *Revista De Biología Tropical*, 24(2), 191–198. Retrieved from <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/25881>

Caballero y C., E., Caballero R., G. (1969). Études des trématodes récoltés par Howard A. Winter chez les poissons marins de l'Océan Pacifique du Mexique et des États Unis. II. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 26(4): 957-963. <https://doi.org/10.1139/f69-093>

Caballero y C., E., y Caballero R., G. (1970). Estudios de la colección de tremátodos colectados por Howard A. Winter en peces del Océano Pacífico de México y de los Estados Unidos de Norte América. IV. *Revista De Biología Tropical*, 18(1-2), 139–147. <https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop.v18i1-2.28093>

Caballero-Rodríguez, G. (1977). Estudios de la colección de trematodos colectados por Howard A. Winter, en peces del Océano Pacífico de México y de los Estados Unidos de Norteamérica. 7. *Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biología Publicaciones Especiales*. 4, 135-140.

Castillo-Sánchez, E., Rosales-Casián, J. A., y Pérez-Ponce-de-León, G. (1998). Helminth parasites of *Purulichthys cuffornicus* (Osteichthyes: Paralichthyidae) in Estero de Punta Banda, Todos Santos Bay and San Quintín Bay, Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas*, 24(4), 443-462. <https://doi.org/10.7773/cm.v24i4.763>

Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution*, 17(4), 540-552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>

Coeur d'acier, A., Cruaud, A., Artige, E., Genson, G., Clamens, A. L., Pierre, E., ... y Rasplus, J. Y. (2014). DNA barcoding and the associated PhylAphidB@ se website for the identification of European aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *PLoS One*, 9(6), e97620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097620>

Constenla, M., Carrassón, M., Moyà, C. M., Fernàndez-Chacón, A., Padrós, F., Repullés-Albelda, A., y Montero, F. E. (2011). Parasitisation by *Bathycradium elongatum* (Digenea, Opecoelidae) in pyloric caeca of *Trachyrincus scabrus* (Teleostei, Macrouridae). *Diseases of aquatic organisms*, 96(3), 239-247. <https://doi.org/10.3354/dao02393>

Corner, R. D., Booth, R. J., y Cutmore, S. C. (2022). *Plesiochorus irwinorum* n. sp. (Trematoda: Gorgoderidae) from the urinary bladder of the hawksbill turtle, *Eretmochelys*

imbricata (Testudines: Cheloniidae), off the east coast of Australia. *Systematic Parasitology*, 99(4), 447-466. <https://doi.org/10.1007/s11230-022-10038-4>

Cribb, T. H. (1985). The life cycle and biology of *Opecoelus variabilis*, sp. nov. (Digenea: Opecoelidae). *Australian Journal of Zoology*, 33(5), 715-728. <https://doi.org/10.1071/ZO9850715>

Cribb, T. H. (2005). Family Opecoelidae Ozaki, 1925. In *Keys to the Trematoda: Volume 2* (pp. 443-531). Wallingford UK: CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851995878.0443>

Crowcroft, P. W. (1946). Some digenetic trematodes from fishes of shallow Tasmanian waters. In *Papers and proceedings of the Royal Society of Tasmania* (pp. 5-26).

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Esch, G. W., & Fernandez, J. C. (Eds.). (2013). A functional biology of parasitism: Ecological and evolutionary implications. *Springer Science & Business Media*.

Fabio, S. D. (1981). Sobre a ocorrência de tres especies de trematodeos em peixes brasileiros. *Rev. bras. biol.*, 549-52.

Faltýnková, A., Georgieva, S., Kostadinova, A., y Bray, R. A. (2017). Biodiversity and evolution of digeneans of fishes in the Southern Ocean. *Biodiversity and evolution of parasitic life in the Southern Ocean*, 49-75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46343-8_5

Fayton, T. J., y Andres, M. J. (2016). New species of *Plagioporus* Stafford, 1904 (Digenea: Opecoelidae) from California, with an amendment of the genus and a phylogeny of freshwater plagioporines of the Holarctic. *Systematic Parasitology*, 93, 731-748. <https://doi.org/10.1007/s11230-016-9664-6>

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, 17, 368-376.

Fischthal, J. H. (1978). Allometric growth in three species of digenetic trematodes of marine fishes from Belize. *Journal of Helminthology*, 52(1), 29-39.

Fischthal, J. H. (1979). *Asymphylogora fishelsoni* sp. n. (Trematoda: Monorchiiidae) from a cyprinodontid fish, *Aphanius dispar richardsoni* (Boulenger), from Israel, and its allometric growth. *Journal of Helminthology*, 53(4), 357-362. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00006192>

Fischthal, J. H., Fish, B. L., & Vaught, R. S. (1980). Comparative allometric growth of the digenetic trematode *Metadena globosa* (Linton 1910) Manter 1947 (Cryptogonimidae) in

three species of Caribbean fishes. *The Journal of Parasitology*, 642-644. <https://doi.org/10.2307/3280522>

Garduño-Martínez, A. 2023. Infracomunidades y comunidad componente de helmintos parásitos de *Clinocottus analis* (Scorpaeniformes: Cottidae) y *Girella nigricans* (Perciformes: Kyphosidae) en Punta Morro, Baja California, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California.

Gibson RN (1999) Methods for studying intertidal fishes. In *Intertidal fishes: life in two worlds*, Horn MH, Marti KLM, Chotkowski MA, eds. San Diego: *Academic Press*, pp. 7–25.

Gibson, D. I., y Bray, R. A. (1982). A study and reorganization of *Plagioporus* Stafford, 1904 (Digenea: Opecoelidae) and related genera, with special reference to forms from European Atlantic waters. *Journal of Natural History*, 16(4), 529-559. <https://doi.org/10.1080/00222938200770431>

Gibson, R. N. (1967). The Use of the Anaesthetic Quinaldine in Fish Ecology. *Journal of Animal Ecology*, 36(2), 295–301. <https://doi.org/10.2307/2913>

Gower, C. M., & Webster, J. P. (2005). Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution*, 59(3), 544-553. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01014.x>

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., y Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307-321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

Hasegawa, M., Kishino, H., y Yano, T. A. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22, 160-174. <https://doi.org/10.1007/BF02101694>

Hernández-Mena, D. I., García-Prieto, L., y García-Varela, M. (2014). Morphological and molecular differentiation of *Parastrigea* (Trematoda: Strigeidae) from Mexico, with the description of a new species. *Parasitology International*, 63(2), 315-323. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.11.012>

Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., y Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular biology and evolution*, 35(2), 518-522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>

Horn M. H., Martin K. L. (2006) Rocky intertidal zone. *The ecology of marine fishes: California and adjacent waters*, 205-226.

Huxley, J. (1993). Problems of relative growth. *Foundations of Natural History*, 276-21.

Jones, A., Bray, R. A., y Gibson, D. I. (Eds.). (2005). *Keys to the Trematoda* (Vol. 2, p. 733). Wallingford: CABI.

Katoh, K., Rozewicki, J., y Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., y Calcott, B. (2017). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 34(3), 772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>

Leigh, J. W., y Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in ecology and evolution*, 6(9), 1110-1116.

Littlewood, D. T. J. (1994). Molecular phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3(3), 221-229. <https://doi.org/10.1006/mpev.1994.1024>

Littlewood, D. T. J., Bray, R. A., y Waeschenbach, A. (2015). Phylogenetic patterns of diversity in cestodes and trematodes. *Parasite diversity and diversification: evolutionary ecology meets phylogenetics*, 304.

Luque, J. L., Mouillot, D., y Poulin, R. (2004). Parasite biodiversity and its determinants in coastal marine teleost fishes of Brazil. *Parasitology*, 128(6), 671-682. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005050>

Madhavi, R., y Bray, R. A. (2018). *Digenetic trematodes of Indian marine fishes*. Springer.

Manter, H. W. (1940). Digenetic trematodes of fishes from the Galapagos Islands and the neighboring Pacific. *Allan Hancock Pacific Expeditions*, 2, 364-473.

Manter, H. W. (1954) Some digenetic trematodes from fishes of New Zealand. *Transactions of the Royal Society of New Zealand*, 82, 475-568.

Manter, H. W., y Van Cleave, H. J. (1951). Some digenetic trematodes, including eight new species, from marine fishes of La Jolla, Calif. *Proceedings of the United States National Museum*.

Manter, H. W., y Pritchard, M. H. (1960). Some digenetic trematodes of eels of Hawaii. *The Journal of Parasitology*, 46(5), 651-658. <https://doi.org/10.2307/3274956>

Martin, S. B., Cribb, T. H., Cutmore, S. C., y Huston, D. C. (2018b). The phylogenetic position of *Choerodonicola* Cribb, 2005 (Digenea: Opecoelidae) with a partial life-cycle for a new species from the blue-barred parrotfish *Scarus ghobban* Forsskål (Scaridae) in Moreton Bay, Australia. *Systematic Parasitology*, 95(4), 337-352. <https://doi.org/10.1007/s11230-018-9785-1>

Martin, S. B., Cutmore, S. C., y Cribb, T. H. (2017). Revision of *Neolebouria* Gibson, 1976 (Digenea: Opecoelidae), with *Trilobovarium* ng, for species infecting tropical and subtropical shallow-water fishes. *Systematic Parasitology*, 94(3), 307-338. <https://doi.org/10.1007/s11230-017-9707-7>

Martin, S. B., Cutmore, S. C., y Cribb, T. H. (2018c). Revision of *Podocotyloides* Yamaguti, 1934 (Digenea: Opecoelidae), resurrection of *Pedunculacetabulum* Yamaguti, 1934 and the naming of a cryptic opecoelid species. *Systematic Parasitology*, 95(1), 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11230-017-9761-1>

Martin, S. B., Cutmore, S. C., y Cribb, T. H. (2020b). The Pseudoplagioporinae, a new subfamily in the Opecoelidae Ozaki, 1925 (Trematoda) for a small clade parasitizing mainly lethrinid fishes, with three new species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(1), 79-113. <https://doi.org/10.1111/jzs.12331>

Martin, S. B., Downie, A. J., y Cribb, T. H. (2020a). A new subfamily for a clade of opecoelids (Trematoda: Digenea) exploiting marine fishes as second-intermediate hosts, with the first report of opecoelid metacercariae from an elasmobranch. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 188(2), 455-472. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlz084>

Martin, S. B., Huston, D. C., Cutmore, S. C., y Cribb, T. H. (2019). A new classification for deep-sea opecoelid trematodes based on the phylogenetic position of some unusual taxa from shallow-water, herbivorous fishes off south-west Australia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 186(2), 385-413. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zly081>

Martin, S. B., Ribu, D., Cutmore, S. C., y Cribb, T. H. (2018d). Opistholobetines (Digenea: Opecoelidae) in Australian tetraodontiform fishes. *Systematic Parasitology*, 95(8-9), 743-781. <https://doi.org/10.1007/s11230-018-9826-9>

Martin, S. B., Sasal, P., Cutmore, S. C., Ward, S., Aeby, G. S., y Cribb, T. H. (2018a). Intermediate host switches drive diversification among the largest trematode family: evidence from the Polypipapiliotrematinae n. subf. (Opecoelidae), parasites transmitted to butterflyfishes via predation of coral polyps. *International Journal for Parasitology*, 48(14), 1107-1126. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.09.003>

Martínez-Aquino, A., Vidal-Martínez, V. M., Ceccarelli, F. S., Méndez, O., Soler-Jiménez, L. C., y Aguirre-Macedo, M. L. (2020). Phylogeny, genetics, and the partial life cycle of *Oncomegas wagneri* in the Gulf of Mexico. *Current zoology*, 66(3), 275-283. <https://doi.org/10.1093/cz/zoz045>

Mehra, H. R. (1966). Revision of Allocreadioidea Nicoll, 1934 Part I Families Opecoelidae Ozaki, 1925 Opistholebetidae Fukui, 1929 Allocreadiidae Stossich, 1903, Bunoderidae Nicoll, 1914, Acanthocolpidae Lühe, 1909, Pleorchiidae Poche, 1925. Published by the author, 58 p.

Merlo-Serna, A. I., y García-Prieto, L. (2016). A checklist of helminth parasites of Elasmobranchii in Mexico. *ZooKeys*, (563), 73–128. <https://doi.org/10.3897/zookeys.563.6067>

Miller DJ, Lea RN (1972) Guide to the coastal marine fishes of California. Cal. Dep. Fish Game. Fish Bull, 157, 249.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., y Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 gateway computing environments workshop (GCE)* (pp. 1-8). IEEE. doi: 10.1109/GCE.2010.5676129.

Morrone, J. J. (2008). *Evolutionary biogeography: an integrative approach with case studies*. Columbia University Press.

Moszczyńska, A., Locke, S. A., McLaughlin, J. D., Marcogliese, D. J., y Crease, T. J. (2009). Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Molecular Ecology Resources*, 9, 75-82. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02634.x>

Mouahid, G., Faliex, E., Allienne, J. F., Cribb, T. H., y Bray, R. A. (2011). *Proctophantastes nettastomatis* (Digenea: Zoogonidae) from Vanuatu deep-sea fish: new morphological features, allometric growth, and phenotypic plasticity aspects. *Parasitology research*, 110, 1631-1638. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2674-z>

Mouritsen, K. N., & Andersen, C. (2017). Worms at war: interspecific parasite competition and host resources alter trematode colony structure and fitness. *Parasitology*, 144(11), 1530-1542. <https://doi.org/10.1017/S003118201700107X>

Nahhas, F. M., y Krupin, R. (1977). Parasites of *Liparis calliodon* (Pallas) with a description of a new species, *Metadena caballeroi*. *Excerta Parasitologia en Memoria del Doctor Eduardo Caballero y Caballero. Universidad Nacional Autónoma de México*, 261-266.

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.

Nei, M., y Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, USA.

Noble, E. R. y Noble G. A. (1976) *Parasitology: The Biology of Animal Parasites*, 4th edition. Philadelphia: Lea and Febiger.

Olson, P. D., Cribb, T. H., Tkach, V. V., Bray, R. A., y Littlewood, D. T. J. (2003). Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International journal for parasitology*, 33(7), 733-755. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00049-3)

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) 2019 Código sanitario para los animales acuáticos. Recuperado en: <https://www.oie.int/es/normas/codigoacuatico/acceso-en-linea/>

Pérez-Ponce de León, G., y Hernández-Mena, D. (2019). Testing the higher-level phylogenetic classification of Digenea (Platyhelminthes, Trematoda) based on nuclear rDNA sequences before entering the age of the 'next-generation' Tree of Life. *Journal of Helminthology*, 93(3), 260-276. doi:10.1017/S0022149X19000191

Pinto, H. A., Mati, V. L., Pujoni, D. G., y Melo, A. L. (2017). *Platynosomum illiciens* (Trematoda: Dicrocoeliidae) in captive black-tufted marmoset *Callithrix penicillata* (Primates: Cebidae) from Brazil: a morphometric analyses with taxonomic comments on species of *Platynosomum* from nonhuman primates. *Journal of Parasitology*, 103(1), 14-21. <https://doi.org/10.1645/16-1>

Pritchard, M. H. (1966). Studies on digenetic trematodes of Hawaiian fishes: family Opecoelidae Ozaki, 1925. *Zoologische Jahrbucher. Abteilung fur Systematik, Okologie und Geographie der Tiere.*, 93, 173-202.

Prudhoe, S., y Bray, R. A. (1973). Digenetic trematodes from fishes. *B.A.N.Z. Antarctic Research Expedition Reports, Series B (Zoology and Botany)*, 8, 199–225.

Repkin, E. A., Maltseva, A. L., Varfolomeeva, M. A., Aianka, R. V., Mikhailova, N. A., y Granovitch, A. I. (2020). Genetic and morphological variation of metacercariae of *Microphallus piriformes* (Trematoda, Microphallidae): Effects of paraxenia and geographic location. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 11, 235-245. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.02.004>

Rima, M., Marzoug, D., Pérez-del-Olmo, A., Kostadinova, A., Bouderbala, M., y Georgieva, S. (2017). New molecular and morphological data for opecoelid digeneans in two Mediterranean sparid fishes with descriptions of *Macvicaria gibsoni* n. sp. and *M. crassigula* (Linton, 1910) (sensu stricto). *Systematic Parasitology*, 94, 739-763. <https://doi.org/10.1007/s11230-017-9736-2>

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... y Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Rothmeier, L. M., Sahm, R., Watermann, B., Grabow, K., Koester, M., Cichy, A., y Martens, A. (2021). The Ponto-Caspian parasite *Plagioporus* cf. *skryabini* reaches the River Rhine system in Central Europe: higher infestation in the native than in the introduced Danubian form of the gastropod *Theodoxus fluviatilis*. *Hydrobiologia*, 848(10), 2569-2578. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04578-x>

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

Ruiz-Campos, G. (1986). Estructura trófica, composición y dinámica de la comunidad íctica de las pozas de marea durante otoño-invierno en la playa rocosa de Granada Cove, Bahía Todos Santos, BC, México. 16-17 (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, BC Ensenada, Baja California, México*).

Ruiz-Campos, G., González-Guzmán, S., Ramírez-Valdéz, A., González-Acosta, A. F., Castro-Aguirre, J. L., y De La Cruz-Aguero, J. (2010). Composition, density and biogeographic affinities of the rocky intertidal fishes on the western coast of the Baja California peninsula, Mexico. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 51, 210-220.

Ruiz-Campos, G., Ramírez-Valdez, A., González-Guzmán, S., González-Acosta, A. F., y Zamorano, D. A. (2009). Length–weight and length–length relationships for nine rocky tidal pool fishes along the Pacific coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Ichthyol*, 26, 118-119. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2009.01344.x>

Ruiz-Campos, G., y Hamman, M. G. (1991). Feeding of the Woolly Sculpin, *Clinocottus analis* (Pisces: Cottidae), in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 36(3), 348–353. <https://doi.org/10.2307/3671688>

Shedko, M. B., Sokolov, S. G., y Atopkin, D. M. (2015). The first record of *Dimerosaccus oncorhynchi* (Trematoda: Opecoelidae) in fishes from rivers of Primorsky Territory, Russia, with a discussion on its taxonomic position using morphological and molecular data. *Parazitologiya*, 49(3), 171-189.

Shimazu, T. (1988). Trematodes of the genera *Coitocaecum*, *Dimerosaccus* and *Opecoelus* (Opecoelidae: Opecoelinae) from freshwater fishes of Japan. In *Proceedings of the Japanese Society of Systematic Zoology* (Vol. 37, pp. 1-19). The Japanese Society of Systematic Zoology.

Sokolov, S. G., Shchenkov, S. V., Frolov, E. V., y Gordeev, I. I. (2022). A phylogenetic re-evaluation of the Stenakrine Opecoelids (Trematoda, Digenea: Opecoeloidea) with some taxonomic novelties. *Diversity*, 14(11), 949. <https://doi.org/10.3390/d14110949>

Sokolov, S. G., Shchenkov, S. V., Khasanov, F. K., Kornychuk, Y. M., y Gordeev, I. I. (2022). Redescription and phylogenetic assessment of *Helicometra antarcticae* Holloway y Bier, 1968 (Trematoda, Opecoelidae), with evidence of non-monophyletic status of the genus *Helicometra* Odhner, 1902. *Zoosystema*, 44(15), 423-433. <https://doi.org/10.5252/zoosystema2022v44a15>

Sokolov, S., Shchenkov, S., y Gordeev, I. (2019). Records of opecoeline species *Pseudopecoelus* cf. *vulgaris* and *Anomalotrema koiae* Gibson y Bray, 1984 (Trematoda, Opecoelidae, Opecoelinae) from fish of the North Pacific, with notes on the phylogeny of the family Opecoelidae. *Journal of Helminthology*, 93(4), 475-485. doi:10.1017/S0022149X18000573

Tamura, K., Stecher, G., y Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequence. *Lecture of Mathematics for Life Science*, 17, 57.

Theisen, S., Neitemeier-Duventester, X., Kleinertz, S., Suthar, J., Bray, R. A., y Unger, P. (2022). *Allopodocotyle palmi* sp. nov. and *Prosorhynchus maternus* Bray y Justine, 2006 (Digenea: Opecoelidae y Bucephalidae) from the Orange-Spotted Grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) off Bali, Indonesia, Described Using Modern Techniques. *Acta Parasitologica*, 67(3), 1307-1328. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00581-x>

Thomson, D. A., Findley, L. T., y Kerstitch, A. N. (2000). Reef fishes of the Sea of Cortez: the rocky-shore fishes of the Gulf of California (Vol. 44). University of Texas Press.

Tkach, V. V., Littlewood, D. T. J., Olson, P. D., Kinsella, J. M., y Swiderski, Z. (2003). Molecular phylogenetic analysis of the microphalloidea ward, 1901 (trematoda: digenea). *Systematic Parasitology*, 56, 1-15. <https://doi.org/10.1023/A:1025546001611>

Tkach, V. V., Pawlowski, J., Mariaux, J., y Swiderski, Z. (2014). Molecular phylogeny of the suborder Plagiorchiata and its position in the system of Digenea. In *Interrelationships of the Platyhelminthes* (pp. 186-193). CRC Press.

Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., y Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research*, 44(W1), W232-W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>

Truong, T. N., Curran, S. S., Reyda, F. B., Rash, J. M., y Bullard, S. A. (2022). *Plagioporus wataugaensis* n. sp. (Digenea: Opecoelidae) infecting intestine of northern hogsucker, *Hypentelium nigricans*, and white sucker, *Catostomus commersonii* (Cypriniformes: Catostomidae) from the eastern USA, including an emended diagnosis, key to Nearctic congeners, and phylogenetic analysis. *Parasitology International*, 89, 102580. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102580>

Van Steenkiste, N., Locke, S. A., Castelin, M., Marcogliese, D. J., y Abbott, C. L. (2015). New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 945-952. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12358>

Vidal-Martínez, V. M., Aguirre-Macedo, M. L., Scholz, T., González-Solís, D., y Mendoza-Franco, E. F. (2001). Atlas of the helminth parasites of cichlid fish of Mexico. Academia, *The Publisher of the Academy of Sciences of the Czech Republic*.

Víllora-Montero, M., Pérez-del-Olmo, A., Georgieva, S., Raga, J. A., y Montero, F. E. (2020). Considerations on the taxonomy and morphology of *Microcotyle* spp.: redescription of *M. erythrini* van Beneden y Hesse, 1863 (*sensu stricto*) (Monogenea: Microcotylidae) and the description of a new species from *Dentex dentex* (L.) (Teleostei: Sparidae). *Parasites y Vectors*, 13(1), 1-23. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3878-9>

Watertor, J. L. (1967). Intraspecific variation of adult *Telorchis bonnerensis* (Trematoda: Telorchidae) in amphibian and reptilian hosts. *The Journal of Parasitology*, 962-968. <https://doi.org/10.2307/3276818>

Wells, A. (1986). Aspects of ecology and life history of the woolly sculpin. *Clinocottus analis*. *California Fish and Game*, 72(4), 213-226.

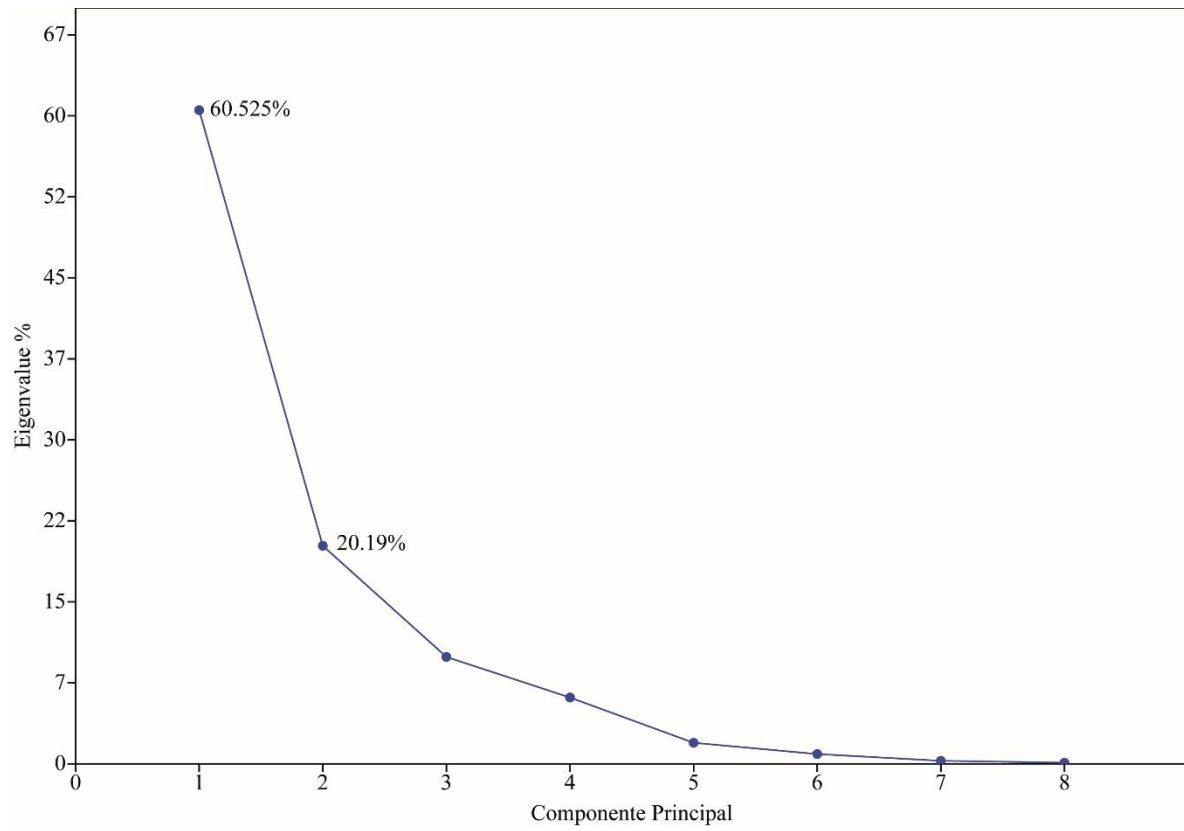
WoRMS (2024a). *Opecoelus* Ozaki, 1925. Accessed at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetailsyid=411531> on 2022-06-19

WoRMS (2024b). *Opegaster* Ozaki, 1928. Accessed at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetailsyid=344928> on 2022-06-17

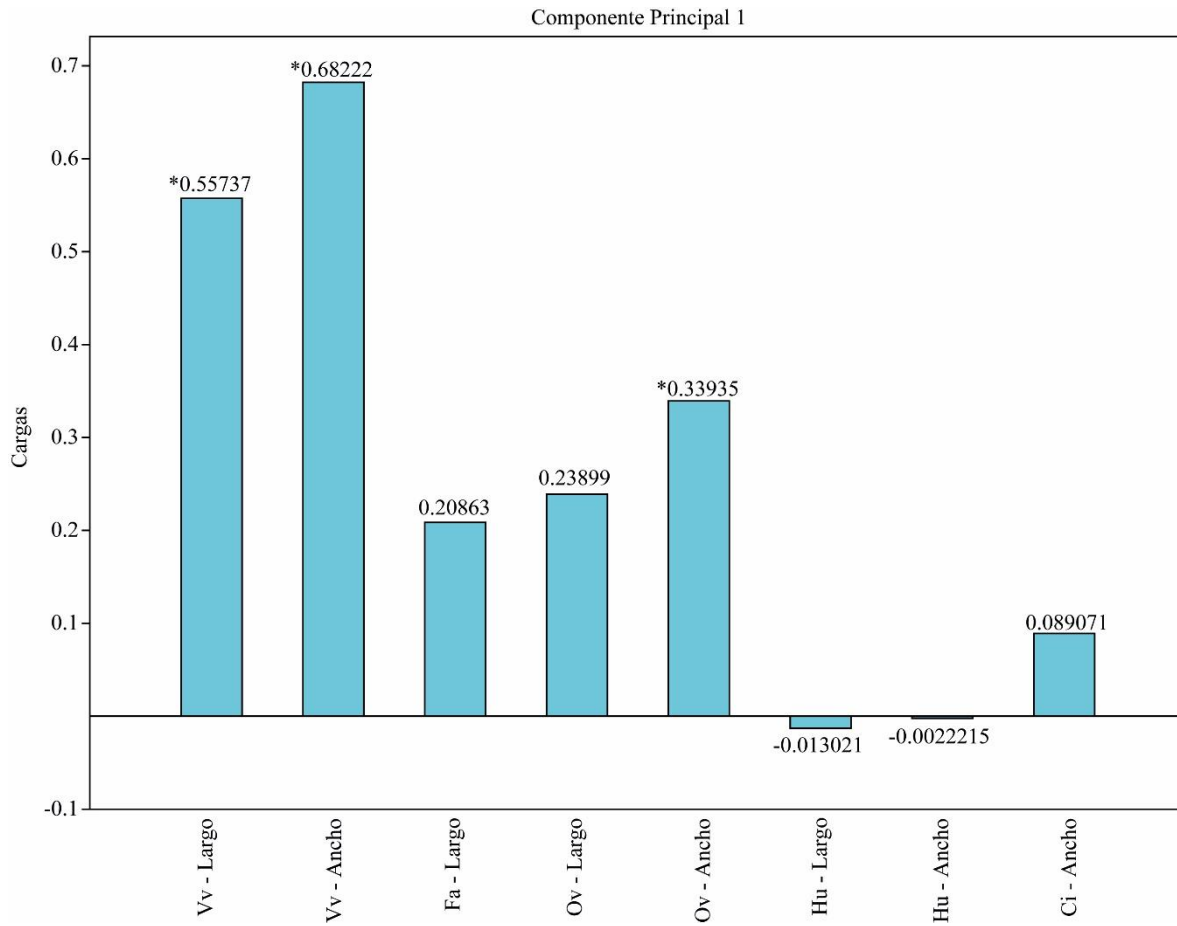
WoRMS (2023). *Opecoelus cameroni* (Caballero y C. y Caballero R., 1969) Aken'Ova, 2007. Accessed at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetailsyid=728409> on 2023-11-27

Yamaguti, S. (1971). Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Vols I and II. *Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Vols I and II*.

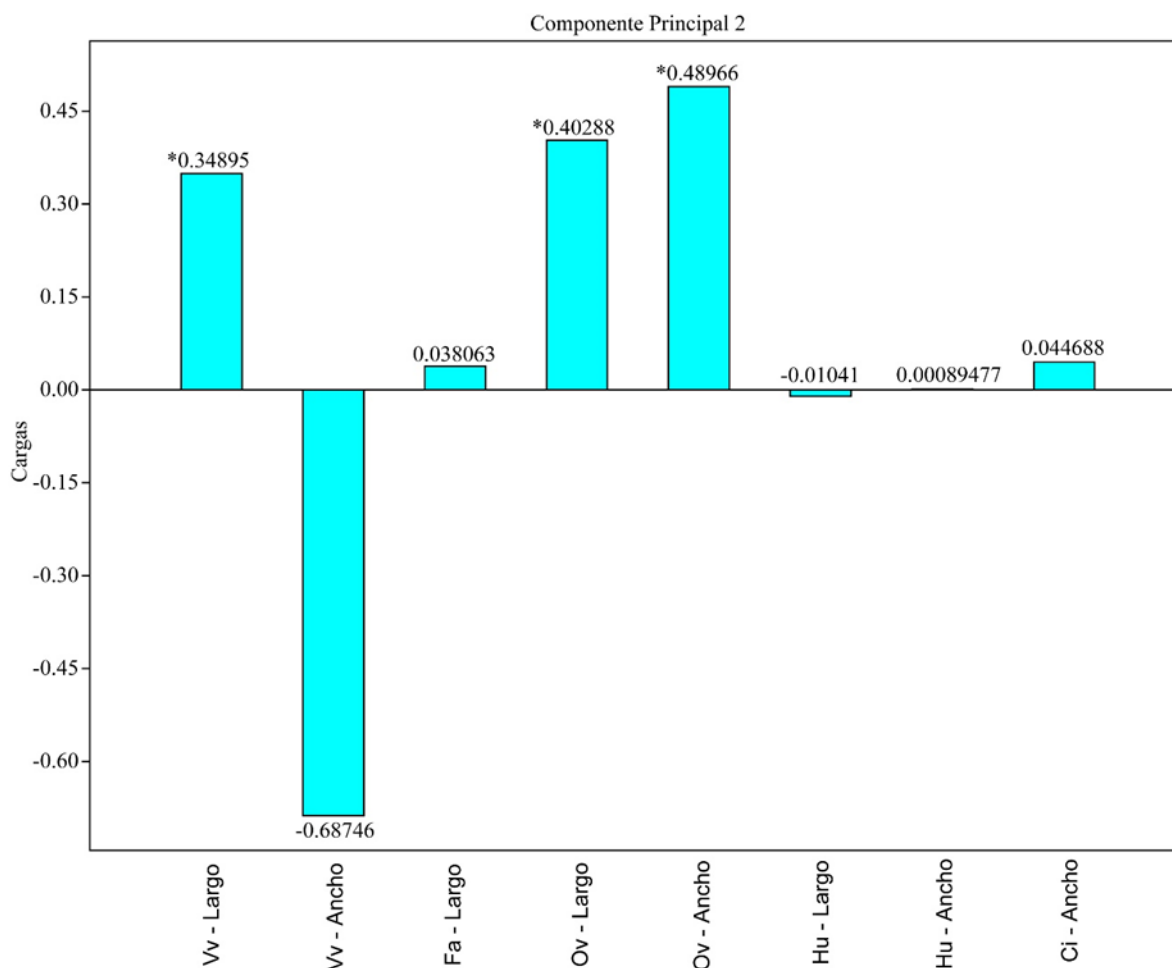
11. ANEXOS



Anexo 1.- Gráfica de sedimentación. Explicación de la variación total del análisis de componentes principales. PC1 + PC2 explican el 80.715% de la variación total.



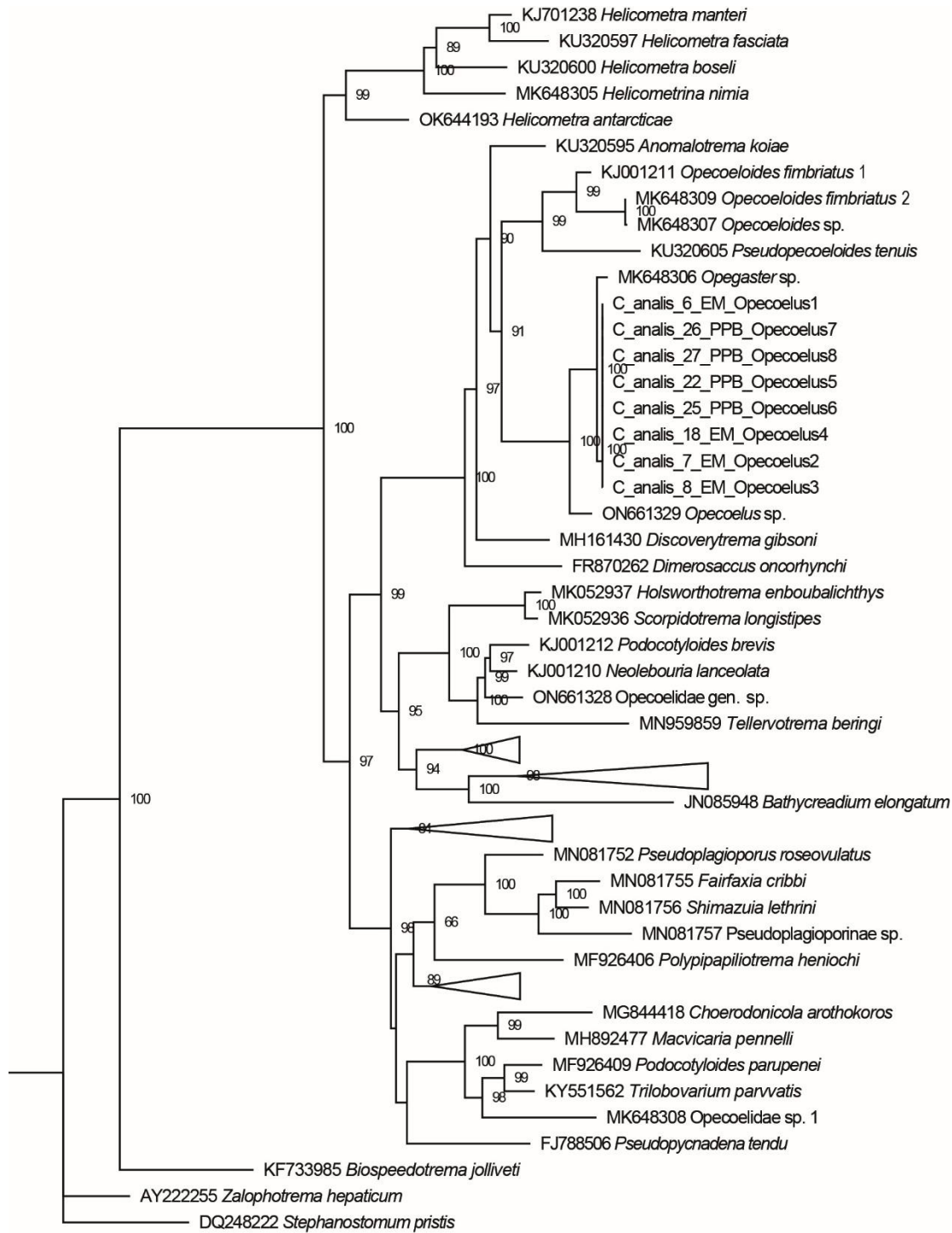
Anexo 2. Gráfica de cargas de componentes principales 1. Las variables del largo y ancho de ventosa ventral (Vv) y ancho del ovario (Ov) son las que presentaron valores de cargas con mayor importancia. Acrónimos de variables mencionados en el **Cuadro 4**.



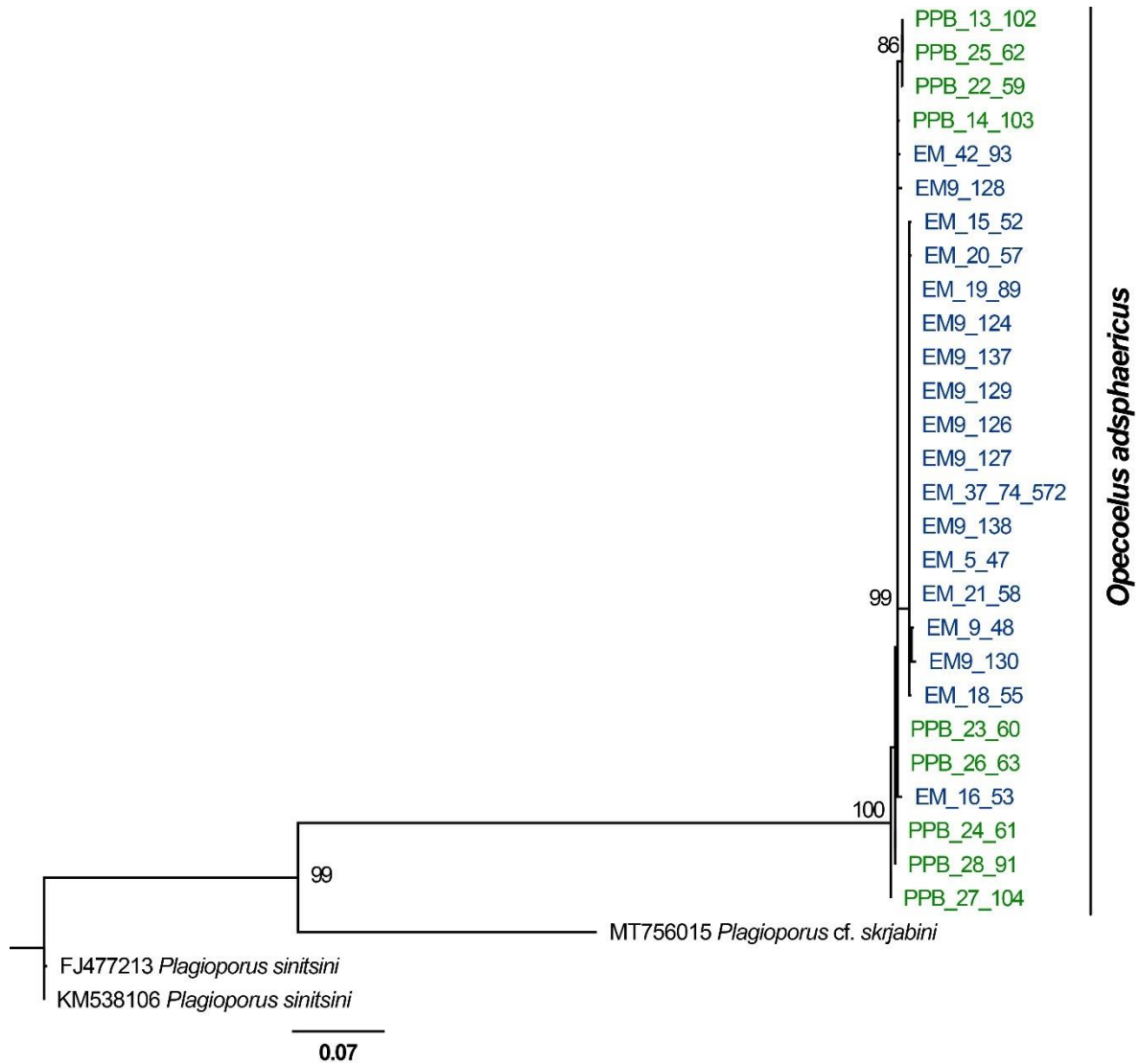
Anexo 3. Gráfica de cargas de Componentes Principales 2. Las variables del largo de ventosa ventral (Vv) y ovario (Ov) son las que presentaron valores de carga con mayor importancia. Acrónimos de variables mencionados en **Cuadro 4**.

Anexo 4. Valores de crecimiento alométrico de *Opecoelus adpshaericus*. Valores de la constante logarítmico de α ($\text{Log } \alpha$), exponente alométrico (b) con error estándar, coeficiente de correlación (r), "t" de student para r , y probabilidad (p) de t. *Fb* = Cuerpo anterior; *Hb* = Cuerpo posterior; *Ta* = testículo anterior y *Tp* = testículo posterior.

Variable	$\text{Log } \alpha$	$\text{Log } b \pm \text{ES}$	r	t	p
<i>Fb</i>	0.07920	1.0865 ± 0.0935	0.8834	11.622	<.001
<i>Hb</i>	0.31158	1.1129 ± 0.0252	0.9904	44.133	<.001
<i>Ta</i> - Largo	0.10994	0.9720 ± 0.0674	0.9195	14.423	<.001
<i>Tp</i> - Largo	0.21841	0.8973 ± 0.0580	0.9290	15.478	<.001



Anexo 5. Árbol filogenético obtenido por Máxima Verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen 28S para taxones de la familia Opecoelidae. Los valores frente a los nodos indican los porcentajes del *ultrafast bootstrap* (UFBoot2 \geq 75). La barra representa la distancia de sustitución nucleotídica.



Anexo 6. Árbol filogenético obtenido por Máxima Verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen *BarCode* para *O. adspheericus* y el género *Plagioporus spp.* Los valores frente a los nodos indican los porcentajes del *ultrafast bootstrap* (UFBoot2 \geq 75). La barra representa la distancia de sustitución nucleotídica.