

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Sistemática molecular y caracterización morfológica de la forma inmadura de *Lecithochirium* sp. (Trematoda: Hemiuridae) en el pulpo *Octopus bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, Baja California

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología

PRESENTA:

Biól. Alberto de Jesus Chan Martin

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Andrés Martínez Aquino

CO DIRECTORA: Dra. Sheila Castellanos Martínez

SINODAL: Dra. Ma. Leopoldina Aguirre Macedo

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. 10 DE SEPTIEMBRE DE 2020

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

**SISTEMÁTICA MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA
FORMA INMADURA DE *LECITHOCHIRIUM* SP. (TREMATODA: HEMIURIDAE)
EN EL PULPO *OCTOPUS BIMACULATUS* EN BAHÍA DE LOS ÁNGELES,
BAJA CALIFORNIA**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ALBERTO DE JESUS CHAN MARTIN

APROBADO POR:



Dr. Andrés Martínez Aquino

Director de tesis



Dra. Sheila Castellanos Martínez

Sinodal



Dra. Ma. Leopoldina Aguirre Macedo

Sinodal

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS VI

DEDICATORIAS VII

GLOSARIO DE TÉRMINOS VIII

RESUMEN - 1 -

ABSTRACT - 2 -

1. INTRODUCCIÓN - 3 -

 1.1. Sistemática Molecular en trematodos marinos - 3 -

 1.2. Taxonomía en Hemiuridae y Sistemática Molecular - 5 -

 1.3. Ciclo de vida de los Hemiuridae - 6 -

 1.4. Los cefalópodos y su papel dentro de los ciclos de vida de los trematodos- 9 -

 1.5. Los trematodos en cefalópodos: Hemiuridae..... - 9 -

 1.6. Biología e importancia comercial de *Octopus bimaculatus* Verril, 1883 ... - 12 -

2. JUSTIFICACIÓN..... - 15 -

3. HIPÓTESIS..... - 16 -

4. OBJETIVOS..... - 16 -

 4.1. Objetivo general..... - 16 -

 4.2. Objetivos específicos - 16 -

5. MATERIALES Y MÉTODOS..... - 17 -

 5.1. Obtención de pulpos - 17 -

 5.2. Disección - 18 -

 5.3. Estudio morfológico - 18 -

 5.4. Técnicas de biología molecular - 19 -

 5.5. Alineamiento y análisis filogenético molecular - 20 -

 5.6. Parámetros de infección parasitaria y análisis estadístico - 23 -

6. RESULTADOS - 24 -

 6.1. Caracterización morfológica de *Lecithochirium* sp. en fase inmadura - 24 -

 6.2. Parámetros de la infección de *Lecithochirium* sp..... - 27 -

 6.3. Reconstrucción filogenética - 28 -

7. DISCUSIÓN..... - 31 -

7.1. Determinación taxonómica de gusanos inmaduros <i>Lecithochirium</i> sp.	- 31 -
7.2. Parámetros de infección de <i>Lecithochirium</i> sp.	- 33 -
7.3. Relaciones filogenéticas	- 34 -
7.4. Distancias genéticas	- 36 -
8. CONCLUSIONES	- 38 -
9. PERSPECTIVAS	- 39 -
10. REFERENCIAS	- 40 -
11. ANEXOS.....	- 55 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Registros de parásitos de la familia Hemiuridae en cefalópodos.....	- 11 -
Tabla 2. Lista de especies de la familia Hemiuridae con secuencias parciales del gen 28S disponibles en el GenBank y usadas en el análisis filogenético de este estudio. Grupos externos (*). Familia sin caracterizar (☉) y subfamilia sin caracterizar (§) siguiendo a Bao et al. (2015), Atopkin et al. (2017) y Sokolov et al. (2019).	- 22 -
Tabla 3. Parámetros de infección parasitaria de <i>Lecithochirium</i> sp. de <i>Octopus bimaculatus</i> . ± = Desviación estándar; Pd= Pulpos disectados; Pi = Pulpos infectados; P (%) = Prevalencia; IM = Intensidad media; AM = Abundancia media.....	- 27 -

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Hemiurus luehei sensu Køie* (1990b). *Philine denticulata* es el primer hospedero intermediario (Hi1). Los copépodos calanoides actúan como segundos hospederos intermediarios (Hi2). *Sagitta* sp. participa como hospedero paraténico (Hp) y los peces clupeidos y salmónidos actúan como hospederos definitivos (Hd3 y Hd4). c: cercaria cistocerca, h: huevo, m: metacercaria. Imagen tomada y modificada de Køie (1990b). - 8 -
- Figura 2.** Vista dorsal del pulpo *Octopus bimaculatus*, mostrando los ocelos laterales con apariencia de una cadena con eslabones rotos. Tomado y modificado de Jereb et al. (2014). - 14 -
- Figura 3.** Localización del área de estudio: Bahía de Los Ángeles, Baja California, México. - 17 -
- Figura 4.** *Octopus bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, Baja California, México. Las flechas en negro señalan los ocelos conformados por un anillo azul iridiscente y con apariencia de una cadena con eslabones rotos. (Fotografías de Jorge Fernández Sánchez Solís). - 18 -
- Figura 5.** Vista ventral de *Lecithochirium* sp. con el ecsoma invaginado (Laminilla #H36P28). Ventosa oral (Vo); Faringe (Fr); Poro genital (Pg); Ciego Intestinal (Ci); Ventosa ventral (Vv); Testículos (Ts); Ovario (Ov); Vitelógenas (Vt); Ecsoma retraído (E). Dibujo realizado a un aumento de 10X. Fotografía tomada con el software ZEN lite, Blue edition (Zeiss). - 26 -
- Figura 6.** Árbol filogenético obtenido por Inferencia Bayesiana a partir de secuencias parciales del gen 28S para especies de la familia Hemiuridae. Los círculos negros sobre los nodos indican la probabilidad posterior ($PP \geq 0.95$). La barra representa la distancia de sustitución nucleotídica. Hi: Hospedero intermediario. Hd: Hospedero definitivo. (*): Especificidad hospedatoria...- 30 -

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Morfometría de pulpos *Octopus bimaculatus* y registro de abundancias parasitarias por cada hospedero. LDM: Longitud Dorsal del Manto; PT: Peso Total; AP: Abundancia parasitaria. - 55 -
- Anexo 2.** Orden metodológico del proceso de tinción mediante Carmín clorhídrico. OH = Etanol. ACID = Alcohol acidulado..... - 56 -
- Anexo 3.** Matriz de distancias genéticas calculada por el método de *p-distances* (valores en porcentaje) con secuencias del gen 28S obtenidas en el presente estudio (*), y de la base de datos del GenBank..... - 57 -

AGRADECIMIENTOS

Al Pueblo de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de la tesis de Maestría (agosto 2018-julio 2020). Numero de apoyo: 712235.

Al proyecto CONACyT No. 286347, el cual financió el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Andrés Martínez Aquino (mi director de tesis) por su paciencia y apoyo durante la realización de la presente tesis. Personalmente lo considero una persona apacible y benevolente ya que, gracias a su ayuda pude entender algunos principios para el buen uso de ciertos programas informáticos. Ha logrado inclusive, suscitar mi interés, confianza, firmeza y seguridad, para el desarrollo y cumplimiento de mis metas en la maestría. Le agradezco por darme la oportunidad de trabajar con usted.

A la Dra. Sheila Castellanos Martínez y a la Dra. Leopoldina Aguirre Macedo (mis síndicos) que conforman el comité de tesis, por su apoyo, esfuerzo y paciencia durante los asesoramientos en el desarrollo del trabajo.

Al cuerpo académico de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y a la Facultad de Ciencias Marinas por permitirme estudiar la maestría, y por proporcionarme los conocimientos y las bases metodológicas para cumplir mi meta.

Al Dr. David Iván Hernández Mena por apoyarme en el laboratorio de Biología molecular, así como en la parte de la Bioinformática.

A la Biól. Deyanira Rodarte Venegas, al Dr. Rafal Bello Bedoy y a todo el equipo de Microscopia de la Facultad de Ciencias de la UABC por el apoyo en el uso de los microscopios ópticos para la obtención de microfotografías Zeiss Zen.

Al personal del Departamento de Recursos del mar del CINVESTAV (Mérida) y en particular al Dr. Víctor Vidal por permitirme el acceso a las instalaciones y por los apoyos durante la tinción de muestras biológicas parasitológicas.

Al Ocean. Jesus Galarza Placencia alias el “Chuy” por su apreciable apoyo durante las salidas de campo a Bahía de Los Ángeles, fue imprescindible su presencia en las recolectas de pulpos, e inclusive su comportamiento imperativo y afable hizo entretenido el viaje.

A los futuros Biólogos, Félix del Ángel y Arianna Jiménez por su apoyo en las disecciones de los pulpos para la obtención de material parasitológico. Muchas gracias.

A los Pescadores ribereños y a la CONANP de la región Bahía de Los Ángeles por proporcionarnos las muestras durante los meses de muestreo. Su ayuda hizo posible el desarrollo de la tesis.

DEDICATORIAS

*Este trabajo está dedicado a la memoria de mi abuelita “**Francisca Rivero Chan [panchita]**” (1932-2019), quien estuvo en todo momento (desde la niñez hasta la adolescencia) acompañándome y apoyándome. Además, aunque en este instante no esté físicamente con nosotros, siempre evocaré sus enseñanzas y sabiduría para seguir adelante.*

Agradezco a mis hermanos (Gustavo, Adriana y Feliciano) y a mis padres (Tirso Chan Rivero y Elda María Martín May) por sus constantes motivaciones para el cumplimiento de la meta. Incluso, agradezco a mis amigos (e.g., Abril, Andrea, Andrés, Ángel, Álvaro, Ingrid, Jesús, Karla, Yesenia; en particular mi tía Honorina Chan Rivero) por sus consejos y enseñanzas para alcanzar la superación personal.

¡Gracias!

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Árbol filogenético: es una representación gráfica de las relaciones evolutivas entre las distintas especies (taxa), retratando la historia de la evolución (e.g., especiación) en los niveles específicos y supra-específicos.

Ciclo de vida heteroxeno: conocido también como ciclo de vida indirecto, se refiere a aquellos parásitos (e.g., trematodos) que requieren de varios hospederos para desarrollarse y alcanzar su etapa adulta.

Cistocerca: también llamada cercaria con cola de saco; es un tipo de cercaria que puede retraer su cuerpo dentro de una cavidad localizada en la base de la cola (cola hipertrofiada).

Clado: agrupación de especies (taxa) filogenéticamente relacionados y provenientes de un antepasado común. Es sinónimo del término grupo monofilético pero con un uso distinto, es decir, es considerada una agrupación y no un proceso de descendencia (un ancestro en común).

Distancia genética: medida de la diferencia genética entre especies o poblaciones.

Doliforme: forma de barril.

Ecsoma: extremo posterior del cuerpo capaz de retraerse (protrusible). Presente en la mayoría de los trematodos de la familia Hemiuridae.

Endoparásito: son organismos parásitos que viven en los tejidos y órganos internos de sus hospederos (e.g., cestodos, trematodos, nematodos, protozoos).

Eurixeno: especie parasitaria que no muestran afinidad hospedatoria (e.g., no están relacionados filogenéticamente a una categoría taxonómica).

Filogenia: hipótesis evolutiva de las relaciones ancestro-descendiente (ascendencia común).

Monocíclico: forma de reproducción de algunas especies que solo procrean una sola vez en su vida y mueren (pero sin antes esperar a que eclosionen los huevos).

Grupo Monofilético: es un taxón compuesto por tres o más especies, con su especie ancestral y todos los descendientes de cada una de las especies (considerando a las especies no como grupo monofilético sino como entidades de autoreferencia en el proceso). Es decir, todos los grupos monofiléticos tienen la propiedad de estar compuestos de especies que tienen descendencia genealógica exclusiva o única de una especie fundadora (ascendencia común). Por tanto, un grupo monofilético es referido como una hipótesis evolutiva que predice que los grupos ancestrales resultan de patrones evolutivos a través de procesos de especiación.

Genes ortólogos: genes homólogos de diversas especies derivados de un gen ancestral (antepasado de esas especies) mediante procesos de especiación.

Grupo parafilético: son grupos incompletos conformados por algunos de sus descendientes (no incluidos todos) y su antepasado común. Es considerado un grupo artificial hipotético.

Parasitosis: relación simbiótica de un organismo parásito que se beneficia de la asociación, y de un hospedador utilizado como hábitat por parte del parásito, el cual es dañado de manera “metabólica” y/o “ecológica”.

Sacular: forma de saco.

Sistemática Molecular: es una disciplina encargada de la clasificación de organismos basado en el uso de datos genéticos (e.g., DNA, RNA, proteínas) y análisis moleculares (e.g., métodos filogenéticos) para reconstruir las relaciones evolutivas entre los organismos y deducir los procesos de evolución relacionados con el origen de las especies. Las clasificaciones que resultan de los análisis filogenéticos moleculares son herramientas críticas para los estudios de comprensión de la evolución en la biodiversidad.

Taxón: es una agrupación de organismos emparentados a un nivel determinado, con la aplicación de un nombre científico (e.g., *Pisaster giganteur*), una descripción y un tipo (ejemplar asociada taxonómicamente a una especie u otra categoría taxonómica; e.g., Equinodermos situada en una categoría de filo (Equinodermata). El plural es Taxa o taxones.

Taxonomía integrativa: disciplina sinérgica que emplea un conjunto de herramientas, métodos y criterios para precisar la congruencia en la distinción y delimitación de las especies.

Taxonomía: comprende la teoría y la práctica para describir, nombrar y ordenar grupos de organismos denominados taxones e incluye reglas establecidas por Códigos Internacionales de Nomenclatura.

Vector: organismo que no es causante de una enfermedad, pero que propaga la infección al transmitir patógenos de un hospedero a otro (e.g., mosquitos).

Zoonosis: son enfermedades e infecciones que se transmiten de manera natural entre animales vertebrados y el hombre.

RESUMEN

El género *Lecithochirium* Lühe, 1901 pertenece al grupo de endoparásitos heteroxenos de amplia distribución geográfica, invaden generalmente el tracto digestivo de distintos hospederos invertebrados y vertebrados. En cefalópodos, la presencia de parásitos de la familia Hemiuridae se considera accidental y ocurre a través de la ingesta de presas infectadas con estadios larvarios (e.g., crustáceos o bivalvos parasitados por metacercarias), mismas que se acumulan en el tracto digestivo de los cefalópodos sin alcanzar otra fase de desarrollo. En México, son escasos los estudios referentes a larvas de *Lecithochirium* en cefalópodos. El presente trabajo describe la morfología y delimita la posición filogenética de larvas de trematodos recolectados en *Octopus bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, Baja California, México. Se revisaron 39 *O. bimaculatus* de los cuales se recolectaron 100 gusanos en estadio inmaduro de 7 pulpos infectados. Se realizó un análisis filogenético por Inferencia Bayesiana usando 4 secuencias parciales del gen 28S (DNAr) generadas en este estudio, mismas que se alinearon con secuencias homologas de la familia Hemiuridae obtenidas de GenBank. Los caracteres morfológicos (e.g., ecsoma protrusible y parcialmente evaginado, vesícula seminal sacular indiscernible y dos glándulas vitelógenas sobrepuestas inconspicuas aparentemente con bordes ovals irregulares) y los análisis moleculares, apoyan que los especímenes pertenecen a la familia Hemiuridae y corresponden al género *Lecithochirium*. Con base en los resultados filogenéticos, se infiere que el grupo hermano de las muestras aquí analizadas es *Pulmovermis cyanovitellosus*, y que el género *Lecithochirium* y la subfamilia Lecithochiriinae son grupos parafiléticos. Sin embargo, debido a la carencia de datos moleculares para especies del género *Lecithochirium* en GenBank, estas inferencias filogenéticas deben ser tomadas con precaución. Los datos y resultados obtenidos servirán de apoyo para posteriores estudios sobre el intrincado ciclo de vida de *Lecithochirium* sp. de *O. bimaculatus*. Este trabajo representa el primer registro de gusanos inmaduros de *Lecithochirium* sp. en *O. bimaculatus* y sugiere que este pulpo puede fungir como hospedero intermediario u hospedero paraténico de estos parásitos.

ABSTRACT

The genus *Lecithochirium* Lühe, 1901 is a group heteroxenous endoparasites of wide geographical distribution that usually invade the digestive tract of several host groups; from invertebrates to vertebrates. For cephalopods, the presence of parasites of the family Hemiuridae has been considered accidental and occurs through the ingestion of infected prey with larval stages with infected preys (i.e., crustaceans or bivalves parasitized by metacercariae), which accumulate in the digestive tract of cephalopods without reaching another stage of development. In Mexico, there are few studies referring to *Lecithochirium* larvae in cephalopods. The present study aims to describe the morphology and circumscribe the phylogenetic position of trematode larvae, collected in *Octopus bimaculatus* from Bahía de Los Ángeles, Baja California. Thirty-nine *O. bimaculatus* were examined, getting 100 immature stage worms from seven infected octopuses. A phylogenetic analysis by Bayesian Inference was carried out using 4 partial amplified sequences of the gene 28S (rDNA), which were aligned with homologous sequences of the family Hemiuridae obtained from GenBank database. The morphological characters (i.e., protrusible and partially evaginated ecsoma; indiscernible sacular seminal vesicle, and two apparently inconspicuous overlapping vitellarium follicles with irregular oval edges), and the molecular analyses support that our specimens belong to the family Hemiuridae and correspond to the genus *Lecithochirium*. Based on the phylogenetic results, it was detected that the samples appear to be sister to *Pulmovermis cyanovitellosus*, and that the genus *Lecithochirium* and subfamily Lecithochiriinae are paraphyletic. However, due to the lack of molecular data for species in the genus *Lecithochirium* in GenBank, these phylogenetic inferences must be taken with caution. These results contribute to extend the description of the complex life cycle of *Lecithochirium* sp. from *O. bimaculatus*. This is the first record of immature worms of *Lecithochirium* sp. in *O. bimaculatus* and suggests that this octopus may serve as intermediate or paratenic host for these parasites.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemática Molecular en trematodos marinos

La Sistemática es una disciplina que busca describir, explicar y clasificar a las especies que conforman a la biodiversidad (Martínez 1997; Morrone 2000; Padial et al. 2010). La Sistemática apoyada de la Taxonomía y de la Filogenética, cada vez logra una mejor delimitación e identificación de la biodiversidad (Dayrat 2005; Wiley y Lieberman 2011). La incorporación de datos y análisis moleculares (e.g., secuencias de DNA [por sus siglas en inglés *Deoxyribonucleic acid*] analizadas por métodos filogenéticos probabilísticos) condujo a la modernización de la Sistemática, dando paso a la “Sistemática Molecular” e innovando sus métodos clásicos como el de la “Taxonomía Integrativa” (Yang y Rannala 2012; Pante et al. 2015). En el caso de los organismos parásitos de ambientes marinos, la combinación de la Sistemática Molecular y la Taxonomía han contribuido a una mejor resolución para la descripción de distintas especies de grupos de parásitos en el mundo; e.g., Trematodos (Blasco-Costa et al. 2016).

Los trematodos representan el grupo más diverso dentro de los Platyhelminthes parásitos, con más de 18,000 especies descritas (Cribb et al. 2001; Olson et al. 2003; Abdel-Ghaffar et al. 2015; Pérez-Ponce de León y Hernández-Mena 2019). La mayoría de los trematodos desarrollan una compleja alternancia de generaciones, infectando a varias especies de hospederos, que van desde invertebrados (e.g., en sus fases larvianas) hasta vertebrados (e.g., en su fase adulta) (Niewiadomska y Pojmańska 2011; Lunaschi 2017). Además, han adquirido distintas estrategias de propagación (transmisión activa y pasiva) que les ha conferido un progreso exitoso en su ciclo de vida tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres (Castillo-Sánchez 1996; Niewiadomska y Pojmańska 2011; Littlewood et al. 2015; Lunaschi 2017).

En trematodos, el uso de marcadores moleculares (e.g., genes ortólogos) ha sido eficiente para descubrir su variación genética interespecífica (Nadler y Pérez-Ponce de León 2011; Blasco-Costa et al. 2016; Martínez-Aquino et al. 2020). Sin embargo, la mayoría de las especies estudiadas en trematodos, han sido con ejemplares en estadio adulto, ocasionando la problemática de la identificación de sus formas larvianas

de los distintos estadios que conforman sus ciclos de vida (Jousson et al. 1999; López-Caballero y Pérez-Suárez 1999; Leiva et al. 2017). Desafortunadamente, existe un fuerte desconocimiento acerca de las etapas larvianas de especies trematodos descubiertos, aunado a un reducido número de helmintólogos enfocados en la taxonomía y desarrollo de fases larvales (Jousson et al. 1999; Cribb y Bray 2011, Leiva et al. 2017). La problemática taxonómica en los estadios larvianos de trematodos radica en su alto polimorfismo e incongruencia morfológica entre sus distintas formas larvianas (e.g., el ciclo de vida típico de un trematodo presenta mínimo tres estadios con formas diferentes), y en muchos casos una disímil apariencia morfológica al estado adulto (resultado de la ausencia o presencia de órganos de maduración) (Poulin y Cribb 2002; Blasco-Costa y Poulin 2017). Por tanto, resulta indispensable incluir información molecular (e.g., secuencias de DNA de genes ortólogos) que permita vincular formas larvianas y adultas, para descubrir si las distintas formas de desarrollo corresponden o no a una misma especie de trematodo (Littlewood et al. 2015; Blasco-Costa y Poulin 2017; Leiva et al. 2017). Para ello, es necesario combinar la información molecular con una caracterización morfológica para cada estadio larvario que conforma su ciclo de vida.

En los últimos 25 años en México, se han desarrollado distintos estudios de taxonomía integrativa para describir la diversidad de parásitos marinos, siendo los helmintos de vertebrados - principalmente peces - el mejor grupo estudiado en contraste con el de invertebrados., e.g., moluscos (Aguirre-Macedo et al. 2016; Vidal-Martínez et al. 2016; Martínez-Aquino et al. 2017). Los moluscos son invariablemente los primeros y, comúnmente, los segundos hospederos intermediarios de parásitos larvales con ciclos de vida heteroxenos reconocidos en América Latina y el Caribe (ALC), donde se han registrado 80 especies de moluscos marinos infectados por 195 taxa de helmintos, principalmente trematodos (Aguirre-Macedo et al. 2016). Los moluscos son hospederos intermediarios importantes en el ciclo de vida de los trematodos y permiten ampliar la distribución de los parásitos al actuar como vectores de transmisión, favoreciendo así su éxito de diversificación y supervivencia (Littlewood et al. 2015).

1.2. Taxonomía en Hemiuridae y Sistemática Molecular

La familia Hemiuridae pertenece al grupo de trematodos endoparásitos registrados mayormente en el estómago de peces teleósteos y pulmón de serpientes marinas (Gibson y Bray 1979, 1986; Gibson 2002). Dentro de Hemiuridae existen ciertos obstáculos que requieren una revisión detallada, como el caso de las más de 100 especies nominales del género *Lecithochirium* (Abdel-Ghaffar et al. 2015), las cuales, debido a su variabilidad morfológica intraespecífica y a la carencia de caracteres prominentes de diagnóstico, es cuestionable su delimitación taxonómica (Gibson y Bray 1986; Bray 1991; Abdel-Ghaffar et al. 2013). Esta complicación, asociada a una premura por asignarles nombres específicos binomiales (e.g., especies taxonómicas) a ciertos especímenes que han sido parcialmente estudiados, o que exhiben caracteres difusos de diagnóstico, ha generado constantes sinonimias con especies congénéricas o con especies de otros géneros; e.g., *Lecithochirium fusiforme* Lühe, 1901 sinonima de *L. grandiporum* (Rudolphi, 1819), *Glomericirrus septemlobus* Teixeira de Freitas y Kohn, 1965 sinónima de *L. microstomum* Chandler, 1935 (Gibson y Bray 1986; Bartoli y Gibson 2007; Cribb y Bray 2011; Morsy et al. 2012; Abdel Ghaffar et al. 2013, 2015; WoRMS 2020). Esta premura taxonómica ha repercutido en un incremento de “especies nuevas” con descripciones taxonómicas incompletas, causando una sobreestimación de la diversidad de especies de *Lecithochirium* (Dayrat et al. 2005). Para regular este inconveniente, se ha sugerido mantener la asignación taxonómica específica como “pendiente” usando el acrónimo “sp.” mientras se genera evidencia robusta para una identificación y asignación taxonómica posterior; e.g., Acantocolpidae sp. o *Stephanostomum* sp. (Dayrat et al. 2005; Padial et al. 2010).

Los estudios en sistemática molecular de la familia Hemiuridae han sido realizados con base en marcadores moleculares como el gen 28S de DNA ribosomal (DNAr) (e.g., Atopkin et al. 2017; Sokolov et al. 2019). El uso de este gen se debe a su fuerte señal filogenética como región conservada para inferir límites a distintos niveles taxonómicos, desde familias hasta géneros y sus especies (Nolan y Cribb 2005; Blasco-Costa et al. 2016; Sokolov et al. 2019). De este modo, el gen 28S ha

permitido el reconocimiento y delimitación de especies de la familia Hemiuridae mediante análisis filogenéticos (Pankov et al. 2006; Bao et al. 2015; Atopkin et al. 2017; Sokolov et al. 2019).

1.3. Ciclo de vida de los Hemiuridae

La familia Hemiuridae presenta ciclos de vida heteroxeno, el cual puede involucrar de 3 a 4 hospederos para completar su desarrollo, según la especie y como se desarrolle la cadena trófica entre sus hospederos (Hochberg 1990; Køie 1990b; Bray 1991; Lunaschi 2017; Blasco-Costa y Poulin 2017). En un clásico ciclo de vida (autogénico y con 3 hospederos), el primer hospedero intermediario (Hi1) suele ser un molusco (e.g., gasterópodo) infectado a través de la ingesta de huevos del trematodo adulto en el ambiente acuático, a su vez, en el molusco infectado se dará origen a cercarias las cuales saldrán de él en busca de un segundo hospedero intermediario (Hi2; e.g., crustáceo), donde se desarrollará una segunda fase larvaria de trematodo conocida como metacercaria. La metacercaria se mantendrá en su Hi2 y solo podrá completar su ciclo mediante una transmisión pasiva, es decir, al ser ingerida junto con el Hi2 por un hospedero definitivo (Hd3) (Niewiadomska y Pojmańska 2011). En este contexto, es posible que *O. bimaculatus* pueda fungir como Hi2 u hospedero paraténico (vector transmisor) de Hemiuridae (Hochberg 1990; Armendáriz-Villegas et al. 2014; Pascual et al. 2019). Un Hi2 es aquel hospedero necesario en el desarrollo de las larvas infectivas (e.g., cercarias) provenientes del primer hospedero, para alcanzar otra fase de desarrollo infectiva (e.g., metacercaria o etapa inmadura). En contraste, el hospedero paraténico no necesariamente es imprescindible en el desarrollo del parásito, sino que actúa como un concentrador o dispersor de larvas infectivas (e.g., metacercarias, o mesocercarias en casos raros) (Hochberg 1990; Combes 2001; Parker et al. 2009; Niewiadomska y Pojmańska 2011).

Se han resuelto ciclos de vida de algunas especies de la familia Hemiuridae; e.g., *Brachyphallus crenatus* (Rudolphi, 1802), *Hemiurus luehei* Odhner, 1905, *H. communis* Odhner, 1905, *Lecithocladium excisum* (Rudolphi, 1819), *L. furcolabiatum* (Jones, 1933), *L. rufoviride* (Rudolphi, 1819) y *Tubulovesicula pinguis* (Linton, 1940) (Stunkard 1980; Gibson y Bray 1986; Matthews y Matthews 1988; Køie 1990a, b, 1991,

1992, 1995; Bray 1991; Bray et al. 2016). Particularmente, *H. luehei* ha sido estudiado de manera experimental por Køie (1990b), quien encontró de 3 a 4 hospederos en su ciclo de vida (Figura 1). La etapa adulta de *H. luehei* se encuentra registrada en el estómago de peces europeos salmónidos y clupeidos. Una vez adulto y en etapa reproductiva, *H. luehei* expulsa sus huevos en el agua mediante las heces de los hospederos Hd3 y/o Hd4, las cuales serán ingeridas por el Hi1, el caracol *Philine denticulata* (Adams, 1800). En los sacos germinales del caracol, se desarrollarán los esporocistos, los cuales darán origen a las cercarias cistocerca, que saldrán del Hi1 para encontrar un Hi2, como los copépodos calanoides *Acartia* spp. En los copépodos calanoides se desarrollarán las metacercarias infectivas que alcanzarán al Hd3/Hd4 por medio de una transmisión trófica o pasiva (como alimento), en el cual se originará el estado adulto del parásito, cerrando de esta manera su ciclo de vida.

Recientemente Blasco-Costa y Poulin (2017) resaltaron la importancia de conocer los ciclos de vida heteroxeno de parásitos. Sin embargo, los esfuerzos por descubrir y describir como son los ciclos de vida parasitarios de fauna silvestre han disminuido desproporcionalmente a través del tiempo, a tal grado que, comparando el número de las especies nuevas que se han descrito a la fecha, contra los ciclos de vida descubiertos, se observa una gran diferencia. Por ejemplo, de 326 especies descritas de trematodos en peces australianos (Cribb et al. 2014; Blasco-Costa y Poulin 2017), tan solo para cuatro de ellas se conocen sus ciclos de vida. Esta evidencia demuestra los pocos esfuerzos desarrollados en estudios relacionados a los ciclos de vida parasitarios (Blasco-Costa y Poulin 2017). Esta carencia de conocimiento se encuentra vinculado a las complicaciones al momento de identificar correspondencias entre las formas larvarias y adultas en muchos grupos de trematodos (Hochberg 1990). Por ejemplo, en el caso de las especies de la familia Hemiuridae, su descripción está basada en su mayoría en datos morfológicos provenientes de organismos en estadio adulto (e.g., Manter 1947, Yamaguti 1971; Gibson y Bray 1979; 1986; Gibson 2002). Asimismo, las etapas juveniles de especies Hemiuridae son poco estudiados (aunado a que presentan caracteres de diagnóstico poco semejantes y difusos); sin embargo, son importantes para extender la caracterización morfológica y vincular paulatinamente cada fase larvaria con su estadio

adulto a fin de dilucidar los ciclos de vida de las especies de Hemiuridae (e.g., Bray 1991; K oie 1990 a, b; Cribb y Bray 2011; Bray et al. 2016; Blasco-Costa y Poulin 2017).

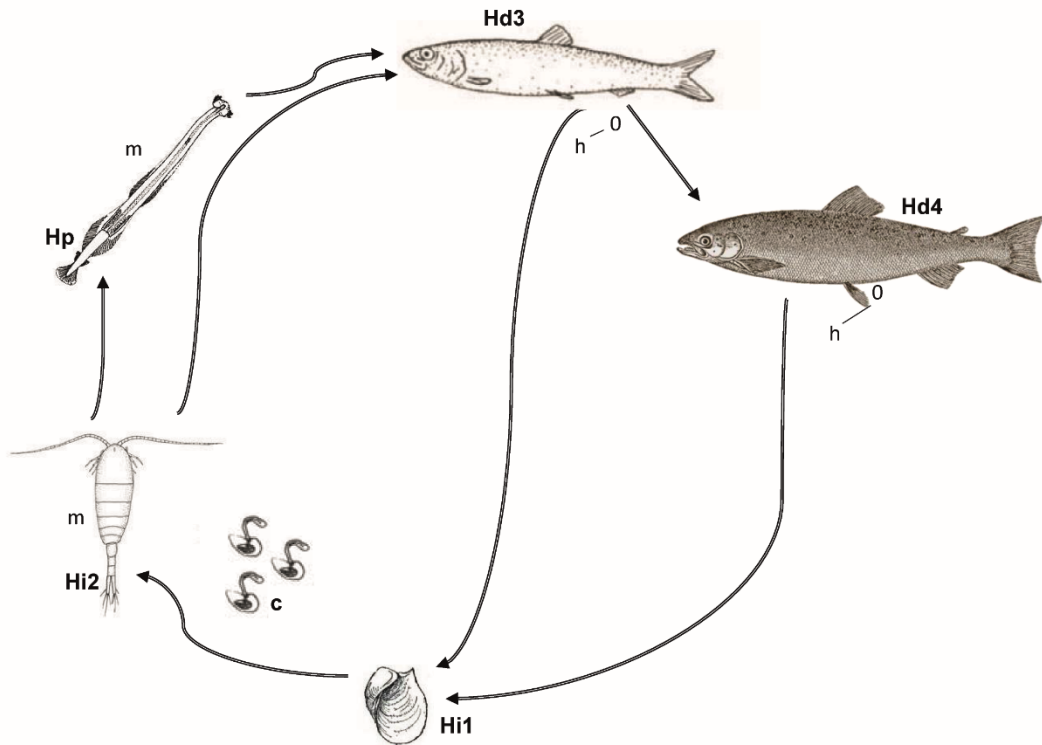


Figura 1. Ciclo de vida de *Hemiurus luehei sensu* K oie (1990b). *Philine denticulata* es el primer hospedero intermediario (Hi1). Los copépodos calanoides actúan como segundos hospederos intermediarios (Hi2). *Sagitta* sp. participa como hospedero paraténico (Hp) y los peces clupeidos y salmónidos actúan como hospederos definitivos (Hd3 y Hd4). c: cercaria cistocerca, h: huevo, m: metacercaria. Imagen tomada y modificada de K oie (1990b).

1.4. Los cefalópodos y su papel dentro de los ciclos de vida de los trematodos

Los cefalópodos (i.e., calamares, nautilus, pulpos y sepias) desempeñan un papel importante dentro de la red trófica al actuar como depredadores de crustáceos, peces y caracoles (Nigmatullin y Shukhgalter 1990). De manera paralela, cumplen un papel fundamental en los ciclos de vida parasitarios puesto que suelen infectarse de helmintos (e.g., acantocéfalos, nematodos y platelmintos) al ingerir caracoles, crustáceos y peces (Nigmatullin y Shukhgalter 1990; Nigmatullin et al. 2009; Lunaschi 2017). Con base en estudios desarrollados en las preferencias alimentarias de algunos cefalópodos (e.g., *Ommastrephes bartramii* (Lesueur, 1821) y *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835)), distintos autores han inferido procesos de infección parasitaria entre cefalópodos y grupos de trematodos (incluyendo Hemiuridae) asociados a la ingesta incidental de presas infestadas como parte de su alimento (Nigmatullin y Shukhgalter 1990; Shukhgalter y Nigmatullin 2001; Markaida 2006; Nigmatullin et al. 2009; Armendáriz-Villegas et al. 2014). Este proceso de ingestión incidental ha sugerido que la cadena alimentaria (transmisión pasiva) es uno de los principales factores que repercute en la infección parasitaria en los cefalópodos (Pascual et al. 1995).

Overstreet y Hochberg (1975), Vidal y Haimovici (1999) y Guillén-Hernández et al. (2018) han señalado que los cefalópodos actúan como los segundos y terceros hospederos intermediarios de trematodos larvales. Hochberg (1990) ha llegado a considerar a los cefalópodos como hospederos paraténicos, debido a que cada vez que se alimentan de presas infectadas (e.g., bivalvos y artrópodos) con larvas de trematodos, estas se acumulan y las retienen en su tracto digestivo sin desarrollarse a etapas subsecuentes.

1.5. Los trematodos en cefalópodos: Hemiuridae

Los cefalópodos han sido reconocidos como hospederos intermediarios o paraténicos de trematodos (Roumbedakis et al. 2018). En los últimos 40 años, se han documentado 20 registros de especies de trematodos en 30 especies de hospederos cefalópodos (Overstreet y Hochberg 1975; Hochberg 1990; Roumbedakis et al. 2018),

principalmente, representados por Hemiuridae y Didymozoidae (Overstreet y Hochberg 1975; Hochberg 1990; Nigmatullin y Shukhgalter 1990; Shukhgalter y Nigmatullin 2001; Nigmatullin et al. 2009; Guillén-Hernández et al. 2018; Pascual et al. 2019).

La familia Hemiuridae es un grupo de trematodos de amplia distribución geográfica (e.g., en la Gran Barrera de Coral de Australia y en los océanos Índico, Atlántico y Pacífico Oriental), y han sido registrados en estado larvario como parásitos del tracto digestivo de hospederos invertebrados como bivalvos, crustáceos, gasterópodos y cefalópodos; mientras que en su estado adulto se han registrado parasitando el estómago y pulmón de peces teleósteos y serpientes marinas (Coil y Kuntz 1960; Sandars 1961; Overstreet y Hochberg 1975; Gibson y Bray 1986; Hochberg 1990; Bray 1991; Køie 1992,1995; Gibson 2002; Morsy et al. 2012; Abdel-Ghaffar et al. 2013, 2015; Bao et al. 2015; Bray et al. 2016).

En el Golfo de México, se han registrado aproximadamente 30 taxa de trematodos de la familia Hemiuridae en peces teleósteos (Overstreet et al. 2009), mientras que en el Golfo de California solo tres registros de estos parásitos han sido documentados también en teleósteos (Villarreal-Lizárraga 1995; Monrroy-Escamilla 2005). En contraste, los registros de Hemiuridae en cefalópodos en México se restringen a solo dos taxa: *Elytrophallus* sp., en el pulpo *Japetella heathi* (Berry, 1911) en el Golfo de California, y *Lecithochirium* sp., en el pulpo *Octopus maya* Voss y Solís, 1966 en la Península de Yucatán (Overstreet y Hochberg 1975; Shukhgalter y Nigmatullin 2001; Nigmatullin et al. 2009; Guillén-Hernández et al. 2018; Roubledakis et al. 2018; Pascual et al. 2019). Estos dos registros (e.g., *Elytrophallus* sp. y *Lecithochirium* sp. en cefalópodos) demuestran la carencia de estudios acerca de parásitos de la familia Hemiuridae en México. Sin embargo, la carencia de estudios de Hemiuridae en cefalópodos a nivel global es aún mayor ya que, a la fecha, solo ocho registros han sido publicados para este grupo de parásitos (Tabla 1).

Tabla 1. Registros de parásitos de la familia Hemiuridae en cefalópodos.

PARÁSITO	HOSPEDERO	SITIO DE INFECCIÓN	LOCALIDAD	REFERENCIAS
<i>Elytrophallus</i> sp. (?)	<i>Japetella heathi</i>	Estómago	Golfo de California (México)	Overstreet y Hochberg (1975)
<i>Dinurus barbata</i>	<i>Argonauta nouryi</i>	Cavidad del manto	Océano Pacífico Tropical Oriental	Hochberg (1990)
<i>Lecithochirium</i> sp. (Estado inmaduro)	<i>Octopus maorum</i>	Estómago	Océano Pacífico del Sur Oriental (Nueva Zelanda)	Overstreet y Hochberg (1975)
<i>Lecithochirium microstomum</i>	<i>Lolliguncula brevis</i>	Estómago y ciego	Golfo de México (Misisipi, USA)	Overstreet y Hochberg (1975)
Digeneo inmaduro no identificado	<i>Rossia sublaevis</i>	-----	Newfoundland, Canadá (Bahía Hermitage)	Overstreet y Hochberg (1975)
Digeneo maduro no identificado	<i>Rossia molleri</i>	-----	Territorio Franklin, Canadá (Isla Victoria)	Overstreet y Hochberg (1975)
<i>Lecithochirium</i> sp. (inmaduro)	<i>Octopus maya</i>	Branquias	Costas de Yucatán (México)	Guillén-Hernández et al. (2018)
<i>Lecithochirium</i> sp. (Estado adulto)	<i>Octopus vulgaris</i>	-----	Noreste del Atlántico (España)	Pascual et al. (2019)

1.6. Biología e importancia comercial de *Octopus bimaculatus* Verril, 1883

Los moluscos son los invertebrados más numerosos después de los artrópodos, e incluyen diversos grupos dentro de los cuáles uno de los más importantes por su interés económico y ecológico son los pulpos (Brusca y Brusca 2003; Hernández-Sánchez y Jesus-Navarrete 2010; Alejo-Plata et al. 2012). Los pulpos son un grupo de invertebrados cefalópodos pertenecientes al orden Octopoda, que se caracterizan por tener 8 brazos circumorales sin tentáculos y dos estructuras quitinosas conocidas como estiletos (vestigio de una concha reducida) localizadas entre los ctenidios (Roper et al. 1995; Ortiz y Ré 2014). Los pulpos son un importante recurso pesquero a nivel mundial. México representa la tercera posición con capturas de 34,000 toneladas al año (ton/año) y el estado de Yucatán es el principal productor de pulpo en el país (Alejo-Plata et al. 2012; Globefish 2015). En el Pacífico mexicano, la pesca de pulpo es desarrollada en litorales de nueve estados; Baja California, Baja California Sur, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca y Sonora (SAGARPA 2018). Baja California (BC) es uno de los principales estados de captura comercial de pulpo, con 155 ton/año, contribuyendo así con un 0.6% de la producción pesquera nacional según el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca de México (2013). En BC la zona de pesca con el mayor número de capturas registradas se ubica en Bahía de Los Ángeles, región costera geográficamente localizada al Oeste del poblado de Punta Prieta y al Este de la Isla Ángel de la Guarda, en el Golfo de California (SEMARNAT 2007; Armendáriz-Villegas et al. 2014).

Octopus bimaculatus Verril, 1883 (pulpo café o pulpo de dos manchas) es una especie nativa y de importancia comercial en el estado de BC (López-Peraza et al. 2017; SAGARPA 2018). Se distribuye desde Santa Bárbara, California (USA) hasta La Paz, Baja California Sur (BCS) en el Océano Pacífico, y desde Puerto Peñasco (Sonora) y San Felipe (BC) hasta Bahía de La Paz (BCS) en el Golfo de California (Armendáriz-Villegas et al. 2014; López-Peraza et al. 2017). *Octopus bimaculatus* habita en las costas rocosas intermareales y submareales (Jereb et al. 2014). Una de sus características morfológicas peculiares es la presencia de un par de ocelos (manchas de ojos falsos) conformados cada uno por un anillo azul iridiscente con

aparición de una cadena con eslabones rotos (Figura 2). Ambos ocelos se encuentran ubicados en posiciones laterales de la cabeza entre la base del segundo y tercer par de brazos (Hochberg 1980; Castellanos-Martínez 2008); presentan un brazo hectocotilizado (el derecho del tercer par) armado de 134 a 157 ventosas (O'Brien et al. 2018). Cada par de brazos presenta dos líneas armados cada uno de 200 a 320 ventosas (Jereb et al. 2014). Los huevos miden de 2 a 4 milímetros (mm) de longitud y al eclosionar surgen paralarvas planctónicas que duran de 2 a 3 meses en alcanzar la fase juvenil (Jereb et al. 2014).

Junto con *Octopus hubbsorum* Berry 1953, *O. bimaculatus* es una de las especies de interés para la captura comercial en el Golfo de California y una de las que sustenta la actividad pesquera en BC (Alejo-Plata y Cerdaneres-Ladrón de Guevara 2002; Armendáriz-Villegas et al. 2014). *Octopus bimaculatus* presenta una buena talla para las actividades pesqueras ribereñas de Bahía de Los Ángeles; e.g., talla mínima de captura de 124 mm (machos) y 143 mm (hembras) de la Longitud del Manto Dorsal (LMD) (Castellanos-Martínez 2008; SAGARPA 2018). Debido a la buena talla, consumo y comercialización en la región, *O. bimaculatus* es una especie que ha interesado a distintos grupos de investigación para estudiar su biología, distribución, estacionalidad, hábitos alimentarios, etología, ontogenia y tasa de crecimiento (e.g., Ambrose 1982; López-Rocha et al. 2012; Armendáriz-Villegas et al. 2014; López-Peraza et al. 2014).

A pesar de su importancia comercial, los estudios sobre *O. bimaculatus* realizados en Bahía de Los Ángeles solo han sido enfocados en su explotación pesquera, dejando de lado las cuestiones parasitarias y su estado de salud, tema primordial para cualquier producto de actividad comercial y de consumo humano (e.g., Pascual et al. 1996; Pascual et al. 2007; Guillén-Hernández et al. 2018; Martínez-Aquino et al. 2019; Pascual et al. 2019). Recientemente se registró un micro-depredador como “parásito” de *O. bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, *Stibarobdella moorei* (Oka, 1910) (López-Peraza et al. 2017). Sin embargo, no se han realizado estudios parasitológicos para conocer qué, cuántas y cuáles especies de helmintos parasitan a *O. bimaculatus* en Bahía de Los Ángeles, y si estos pudieran o no causar

alguna parasitosis tanto para el producto pesquero (e.g., pulpos o peces de la región), como para el consumo accidental en el hombre (enfermedades zoonóticas).

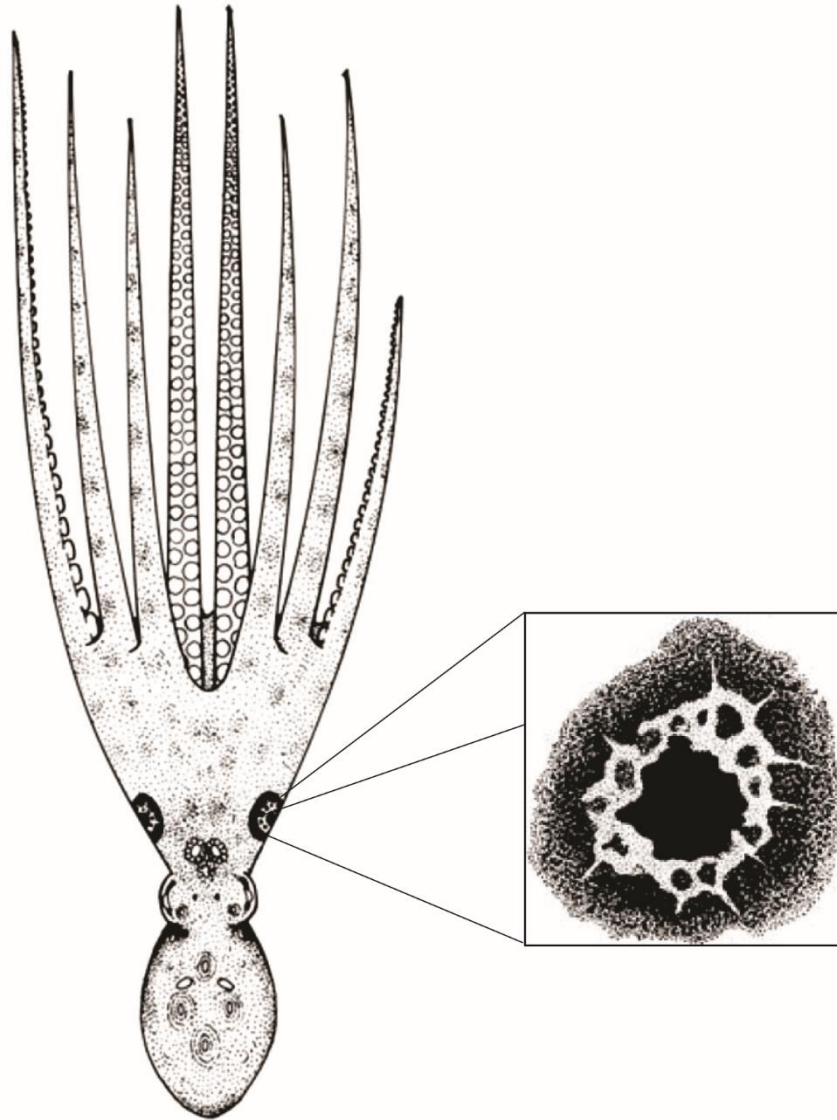


Figura 2. Vista dorsal del pulpo *Octopus bimaculatus*, mostrando los ocelos laterales con apariencia de una cadena con eslabones rotos. Tomado y modificado de Jereb et al. (2014).

2. JUSTIFICACIÓN

La mayor parte de las descripciones taxonómicas de helmintos se basan únicamente en la morfología de especímenes en estado adulto, como es el caso de las claves dicotómicas para trematodos (e.g., Manter 1947; Yamaguti 1971; Gibson y Bray 1979, 1986; Bray et al. 1993; Gibson 2002). Frente a este reto, es necesario generar una nueva fuente de información, combinando datos morfológicos y moleculares (e.g., secuencias de DNA), que permitan vincular las formas de estadios adultos con sus formas larvarias (Blasco-Costa y Poulin 2017; Leiva et al. 2017; Martínez-Aquino et al. 2017). En este sentido, explorar – por vez primera – la parasitofauna de *O. bimaculatus*, permitirá analizar su diversidad de trematodos y saber simultáneamente si existen formas larvarias de especies Hemiuridae, y contrastar esta información con los registros previos de otras partes del mundo. Así, debido a la importancia comercial y al completo desconocimiento de su fauna parasitaria, *O. bimaculatus* es un excelente modelo para abordar en 3 temáticas el estudio de larvas de trematodos pertenecientes a la familia Hemiuridae:

- a) Sistemática Molecular y morfometría, para identificar taxonómicamente a trematodos de la familia Hemiuridae que presente *O. bimaculatus*.
- b) Parámetros de infección parasitaria, para conocer cuál es la abundancia y prevalencia de trematodos de la familia Hemiuridae en *O. bimaculatus*.
- c) Ciclos de vida, combinando la información de abundancia y prevalencia con la determinación taxonómica (morfológica y molecular), para inferir si *O. bimaculatus* pudiera actuar o no como hospedero intermediario o paraténico de trematodos de la familia Hemiuridae en la región de estudio.

Por tanto, para abordar estas temáticas, en el presente estudio se planteó la siguiente hipótesis y objetivos (general y particulares):

3. HIPÓTESIS

Octopus bimaculatus de Bahía de Los Ángeles es infectado por trematodos de la familia Hemiuridae en estado larvario.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Realizar un estudio de sistemática molecular, combinado con la caracterización morfológica de trematodos de la familia Hemiuridae que infectan a *Octopus bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, Baja California, México.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Describir los caracteres morfológicos de trematodos de la familia Hemiuridae de *Octopus bimaculatus* mediante análisis morfométricos.
- 2) Estimar los parámetros de infección parasitaria (prevalencia y abundancia) de trematodos de la familia Hemiuridae de *Octopus bimaculatus*.
- 3) Generar secuencias de DNA del gen 28S (DNAr) de trematodos de la familia Hemiuridae de *Octopus bimaculatus* para ser analizadas a través de métodos filogenéticos e inferir hipótesis de ecología evolutiva.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de pulpos

Se realizaron seis muestreos en Bahía de Los Ángeles ($28^{\circ}57'00.0''\text{N}$; $113^{\circ}31'12.0''\text{W}$) en los meses de junio de 2018, y enero, marzo, abril, mayo y junio de 2019 (Figura 3). Los ejemplares de *O. bimaculatus* fueron recolectados por pescadores locales mediante el uso de trampas empleadas en la pesca artesanal (Figura 4). El número de pulpos adquiridos en cada muestreo dependió de la disponibilidad del recurso al momento por parte de los pescadores. Una vez recolectados los pulpos, estos fueron almacenados en neveras (asegurando así evitar su deterioro biológico) para su transporte al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) campus Ensenada, para su posterior disección e inspección parasitológica.

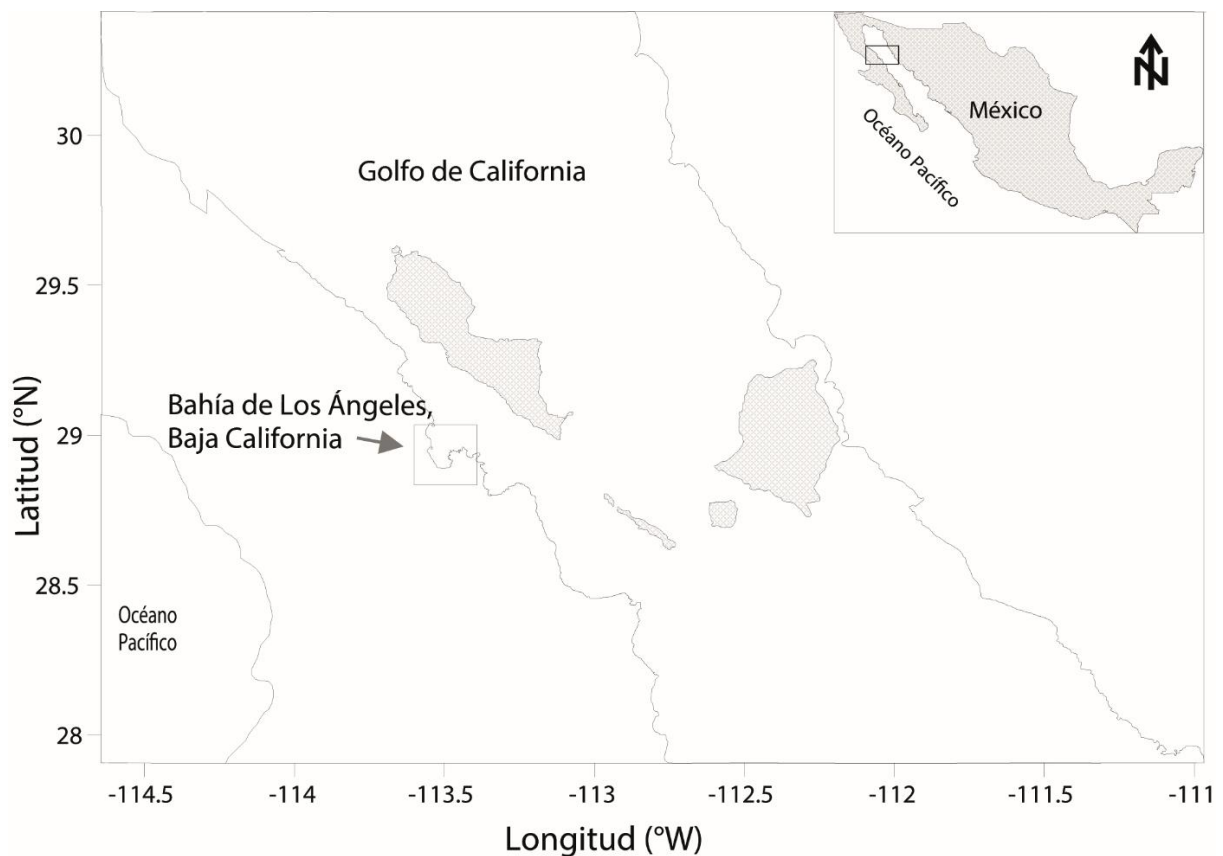


Figura 3. Localización del área de estudio: Bahía de Los Ángeles, Baja California, México.

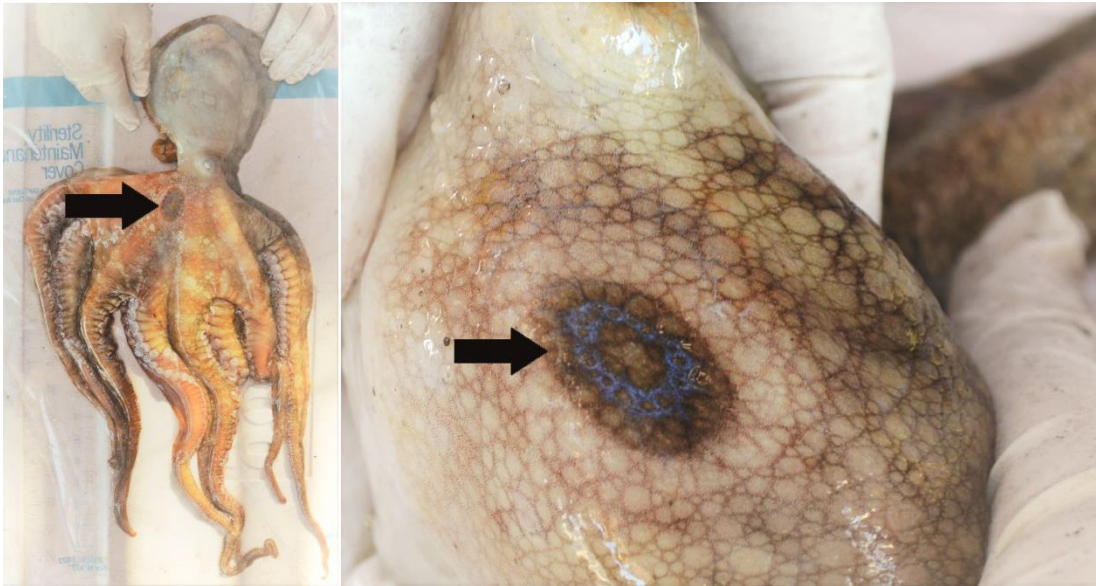


Figura 4. *Octopus bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, Baja California, México. Las flechas en negro señalan los ocelos conformados por un anillo azul iridiscente y con apariencia de una cadena con eslabones rotos. (Fotografías de Jorge Fernández Sánchez Solís).

5.2. Disección

Los pulpos fueron medidos individualmente con una cinta métrica (± 0.1 cm) para el registro de la LMD, y posteriormente pesados con una Balanza Granataria Ohaus (± 0.1 g). Los sexos de cada individuo se identificaron mediante la observación directa de sus gónadas (Anexo 1). Después, cada pulpo fue disectado en posición ventral, se extrajeron los órganos diana del aparato digestivo (i.e., buche, ciego, esófago e intestino) y se examinaron para la búsqueda de trematodos. Los trematodos recolectados fueron almacenados en una caja de Petri con solución salina al 0.65% y fijados para los estudios morfológicos y moleculares (ver detalles más adelante) (Abdel-Ghaffar et al. 2013; Martínez-Aquino et al. 2019).

5.3. Estudio morfológico

Para los estudios morfológicos, los hemiuridos (Hemiuridae) se fijaron en formalina al 4%. Posteriormente, se aplicó la técnica de tinción Carmín clorhídrico que consistió en lavar al espécimen por 24 horas en OH-70%, para después teñir con carmín clorhídrico durante 24 horas, o hasta encontrar la coloración adecuada de la

muestra (Vidal-Martínez et al. 2001; Anexo 2). Los especímenes sobreteñidos se aclararon aplicando alcohol acidulado hasta observar un contraste adecuado (e.g., translucidez de los órganos internos). Después de la tinción, cada ejemplar se deshidrató a través de una serie gradual de alcoholes (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), seguida del aclaramiento de las muestras con diversas concentraciones graduales de aceite de clavo (AC) (10%, 50%, 90% y 100%), y posteriormente montados en Bálsamo de Canadá para las preparaciones de muestras permanentes. El estudio morfométrico (desarrollado en el Laboratorio de Biología Evolutiva de Parásitos de la Facultad de Ciencias, UABC-Ensenada) fue dado en micrómetros (μm), con el valor promedio en la descripción y entre paréntesis los mínimos y máximos. Algunos ejemplares fueron microfotografiados y dibujados digitalmente. La identificación taxonómica de los ejemplares trematodos fue realizada siguiendo las claves dicotómicas de hemiuridos de Gibson y Bray (1979), (1986), Bray et al. (1993) y Gibson (2002).

5.4. Técnicas de biología molecular

Para el análisis molecular, los parásitos fueron lavados con agua destilada y fijados individualmente en tubos *ependorf* con etanol absoluto (OH-100%). Posteriormente, se realizó la extracción de DNA mediante el Kit comercial DNeasy® Blood & Tissue, QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron digeridas con proteínasa K durante 3 hrs. El DNA obtenido fue amplificado mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) con oligonucleótidos del gen 28S DNAr, *forward* 391 5' -AGC GGA GGA AAA GAA ACTA A- 3' (Nadler y Hudspeth 1998) y *reverse* 536 5' -CAG CTA TCC TGA GGG AAA C- 3' (García-Varela y Nadler 2005) a un volumen total de reacción de 45 μL conteniendo: 24.5 μL de agua libre de nucleasas, 2 μL de cada oligonucleótido respectivo, 4 μL de DNA extraído y 12.5 μL de la solución Master Mix (ProMega), la cual está compuesta por Taq polimerasa, Buffer (pH 8.5), 3 mM de MgCl_2 y 400 μM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP). La mezcla fue sometida bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 94°C por 5 min, 35 ciclos de amplificación (94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min) y finalmente un

ciclo de una elongación final de 72°C por 10 min. Posteriormente, los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos en GelRed, usando buffer TAE 1X como amortiguador de la reacción y un marcador de peso molecular de 1000 pb (ProMega). Las bandas obtenidas en el gel fueron visualizadas para su corroboración en un fotodocumentador de luz UV (Bio Doc-It2 315 Imaging System UVP, Cambridge, UK). Por último, los productos de PCR de amplificación fueron enviados a Genewiz South Plainfield, NJ, USA (<https://www.genewiz.com/>) para su secuenciación, aplicando oligonucleótidos internos adicionales (*forward* 504 5' -CGT CTT GAA ACA CGG ACT AAG G- 3 [García-Varela y Nadler 2005]; *reverse* 503 5' -CC TTG GTC CGT GTT TCA AGA CG- 3 [Stock et al. 2001]).

5.5. Alineamiento y análisis filogenético molecular

Las secuencias obtenidas de *forward* y *reverse* fueron ensambladas y editadas para la obtención de secuencias consenso en cada individuo a través del software Geneious Pro v 5.1.7. (Drummond et al. 2010). De cuatro individuos diferentes de hemiuridos, se obtuvieron cuatro secuencias parciales del gen 28S de tres tamaños distintos: dos de 1234 pares de bases (pb), una de 809 pb y otra de 1249 pb. Todas las secuencias idénticas en sus segmentos alineados. Para el análisis filogenético, se construyó una base de datos con representantes de la familia Hemiuridae, siguiendo a Bao et al. (2015), Atopkin et al. (2017) y Sokolov et al. (2019). Para ello, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas disponibles en la base de datos del GenBank NCBI (Altschul et al. 1997). En total, se analizaron 17 secuencias: 14 pertenecientes a Hemiuridae representando a 12 taxa y 3 secuencias adicionales referentes a *Bunocotyle progenetica* Markowski 1936 (Bunocotylidae), *Lecithaster gibbosus* (Rudolphi, 1802) (Lecithasteridae) y *Merlucciotrema praeclarum* (Manter, 1934) (“Lecithasteridae”) como grupos externos siguiendo a Sokolov et al. (2019) (Tabla 2). El alineamiento múltiple de las secuencias fue realizado con el programa MAFFT v 1.0. (Kato y Standley 2016) a través de una interfase en la plataforma de Geneious. Se utilizó el programa Gblocks v 0.91b (Castresana 2000) para excluir regiones ambiguas en el alineamiento.

Para seleccionar el modelo evolutivo que se ajustara a los datos se usó el programa jModelTest v 2.1.3 (Darriba et al. 2012) mediante el Criterio de Información Bayesiano (BIC, por sus siglas en inglés *Bayesian Information Criterion*). El modelo que mejor se ajustó a la tasa de sustitución de nucleótidos de los datos de secuencias parciales del gen 28S fue TIM3+G (Posada 2008), el cual pertenece a la familia GTR con diferentes tasas de variación (Arenas 2015). Seguidamente, se realizó la reconstrucción del árbol filogenético mediante Inferencia Bayesiana usando el programa MrBayes v 3.2.2 (Ronquist et al. 2012) con los siguientes parámetros: *Nst* 6; ajuste del modelo a 6 tipos de parámetros, *tasa gamma*; distribución gamma para zonas de secuencias con mayor probabilidad de sustitución, *ngammacat* 4; número de categorías discretas utilizadas para una aproximación gamma. La reconstrucción se realizó usando el algoritmo de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC), con 4 corridas en paralelo por 2×10^6 generaciones, con un diagnóstico para cada 1000 generaciones, el cual es el apropiado para análisis de datos mayores a 10 terminales (Ronquist et al. 2012).

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). El árbol de consenso de mayoría obtenido fue visualizado y editado en el programa FigTree v 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Finalmente, se estimó la distancia genética en el software MEGA X v 10.1 (Kumar et al. 2018), usando el algoritmo de *p-distance*, mediante el método de Bootstrap, con los parámetros de 500 réplicas y con una tasa de sustitución nucleotídica uniforme (transiciones y transversiones).

Tabla 2. Lista de especies de la familia Hemiuridae con secuencias parciales del gen 28S disponibles en el GenBank y usadas en el análisis filogenético de este estudio. Grupos externos (*). Familia sin caracterizar (☉) y subfamilia sin caracterizar (§) siguiendo a Bao et al. (2015), Atopkin et al. (2017) y Sokolov et al. (2019).

ESPECIE	HOSPEDERO	NÚMERO DE ACCESO (28S); GENBANK	VOUCHERS	REFERENCIA
<i>Aphanurus mugilus</i> (Aphanurinae)	<i>Moolgarda (Osteomugil) engeli</i> (Mugilidae)	LT607807	-----	Atopkin et al. 2017
<i>Dinurus longisinus</i> (Dinurinae)	<i>Coryphaena hippurus</i> (Coryphaenidae)	AY222202	BMNH1996.8.19.4-5	Olson et al. 2003
<i>Lecithocladium excisum</i> (Elytrophalinae)	<i>Caesio cuning</i> (Caesionidae)	AY222203	-----	Olson et al. 2003
<i>Hemiurus appendiculatus</i> (Hemiurinae)	<i>Alosa alosa</i> (Clupeidae)	KR349118	-----	Bao et al. 2015
<i>Hemiurus luehei</i> (§) (Hemiurinae)	<i>Ophidion rochei</i> (Ophidiidae)	MH628316	-----	Sokolov et al. 2019
<i>Lecithochirium caesionis</i> (Lecithochiriinae)	<i>Caesio cuning</i> (Caesionidae)	AY222200	-----	Olson et al. 2003
<i>Lecithochirium floridense</i> (Lecithochiriinae)	<i>Syacium papillosum</i> (Paralichthyidae)	MK558793	CNHE11081	Vidal-Martínez et al. 2019
<i>Lecithochirium floridense</i> (Lecithochiriinae)	<i>Pterois volitans</i> (Scorpaenidae)	KU527428-29	1254615-8	Claxton et al. 2017
<i>Lecithochirium microstomum</i> (Lecithochiriinae)	<i>Trichiurus lepturus</i> (Trichiuridae)	KC985235	GCRL06513	Calhoun et al. 2013
<i>Brachyphallus crenatus</i> (§)	<i>Salvelinus leucomaenis</i> (Salmonidae)	MH628299	-----	Sokolov et al. 2019
<i>Plerurus digitatus</i> (Plerurinae)	<i>Scomberomorus commerson</i> (Scombridae)	AY222201	-----	Olson et al. 2003
<i>Dinosoma synaphobranchi</i> (§)	<i>Antimora microlepis</i> (Moridae)	MH628302	AM14.1, AM11, AM3	Sokolov et al. 2019
<i>Pulmovermis cyanovitellosus</i> (Pulmoverminae)	<i>Laticauda semifasciata</i> (Elapidae)	MH628314	NSMT-PI6348	Sokolov et al. 2019
<i>Bunocotyle progenetica</i> (Bunocotylidae) *	<i>Hydrobia (Peringia) ulvae</i> (Hydrobiidae)	DQ354365	-----	Pankov et al. 2006
<i>Lecithaster gibbosus</i> (Lecithasteridae) *	<i>Merlangius merlangus</i> (Gadidae)	AY222199	-----	Olson et al. 2003
<i>Merlucciotrema praeclarum</i> (☉) *	<i>Cataetyx laticeps</i> (Bythitidae)	AY222204	BMNH1995.7.25.4-7	Olson et al. 2003

5.6. Parámetros de infección parasitaria y análisis estadístico

Para caracterizar la infección de los hemiuridos recolectados en *O. bimaculatus* durante los 6 meses de muestreo, se calcularon los siguientes parámetros de infección conforme a Bush et al. (1997):

- 1) Prevalencia (P): número de hospederos infectados por una especie de parásito determinada entre el número total de hospederos de la muestra por 100 (los valores se expresan en porcentaje).

$$P: \frac{\text{No. Hospederos infectados}}{\text{No. Hospederos de la muestra}} \times 100$$

- 2) Abundancia media (AM): número de individuos de una especie de parásito determinada entre el número total de hospederos de la muestra.

$$AM: \frac{\text{No. Total de parásitos}}{\text{No. Hospederos de la muestra}}$$

- 3) Intensidad media (IM): número de individuos de una especie de parásito determinada entre el número total hospederos infectados de la muestra.

$$IM: \frac{\text{No. Total de parásitos}}{\text{No. Hospederos infectados}}$$

Para estimar si existe efecto o no del sexo de *O. bimaculatus* sobre la abundancia de *Lecithochirium sp.* se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización morfológica de *Lecithochirium* sp. en fase inmadura

Clasificación taxonómica siguiendo a Gibson (2002) y WoRMS (2020).

Clase: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclase: Digenea Carus, 1863

Orden: Plagiorchiida La Rue, 1957

Superfamilia: Hemiuroidea Looss, 1899

Familia: Hemiuridae Looss, 1899

Subfamilia: Lecithochiriinae Lühe, 1901

Género: *Lecithochirium* Lühe, 1901

Lecithochirium sp. (Figura 5)

La caracterización morfológica y sus medidas fueron realizadas con base en 22 ejemplares inmaduros. Cuerpo elongado, redondeado en la parte anterior y trunca por la parte posterior. Cuerpo total (soma) con 919 (750–1128.6) de largo y 299.3 (185–410) de ancho. Ecsoma obtuso y parcialmente retraído con 100 (67.5–122.5) de largo y 78.3 (70–90) de ancho. Ventosa oral subterminal, musculosa, semicircular u ovalada, con 134.8 (187.5–210) de largo y 138.6 (101.3–162.5) de ancho. Tegumento liso sin espinas. Ventosa ventral musculosa en posición ligeramente preecuatorial con 226.1 (139.5–290) de largo y 242.3 (177.5–300) de ancho. Dimensión de la ventosa ventral casi del doble a la ventosa oral, con proporción de 1:1.64 (intervalo de 1:1.47 a 1:1.86). La distancia entre la ventosa oral y la ventosa ventral es de 185.4 (117.5–246.25), representando un 20% de la longitud total. Prefaringe ausente. Faringe doliforme y prominente con 57.9 (47.5–72.5) de largo y 61.4 (52.5–65) de ancho. Poro genital en la parte posterior al ciego intestinal y anterior al esófago corto. El poro genital conectado al saco del sinus (poco distinguible) y a la vesícula seminal sacular (poco distinguible). Dos testículos ovales, irregulares, ligeramente simétricos y oblicuos (posición media entre la horizontal), ubicados debajo de la ventosa ventral de modo lateral. Testículo derecho de 23.3 (20–25) de largo y 25 (20–27.5) de ancho, testículo

izquierdo de 25.8 (22.5–27.5) de largo y 25 (20–27.5) de ancho. Ovario semiesférico, ubicado en la parte posterior de la línea media ecuatorial del cuerpo y posttesticular, 23.8 (20–27.5) de largo y 32.5 (25–40) de ancho. Dos glándulas vitelógenas con bordes ovales irregulares y sobrepuestas entre ellas. Poro somático ubicado en la región posterior del cuerpo, con 148.5 (42.5–290) de largo y 153 (107.5–180) de ancho. Ciego extendido hasta la parte posterior del cuerpo y terminando antes de llegar al ecsoma. Bifurcación cecal antes de la ventosa ventral. Vesícula excretora aparentemente en forma de “Y”.

Comentarios. - Los ejemplares recolectados en el presente estudio fueron en su totalidad especímenes en estadio inmaduro. Por tanto, algunos órganos aún no han completado su desarrollo, e.g., glándulas vitelógenas aparentemente con lóbulos ovales (el número de lóbulos es difuso), testículos de tamaño reducido (posiblemente por su inmadurez) y otros caracteres (útero, el metratermo, el poro excretor y el ducto hermafrodita), con distinción inconspicua que obstaculizan una determinación taxonómica específica.

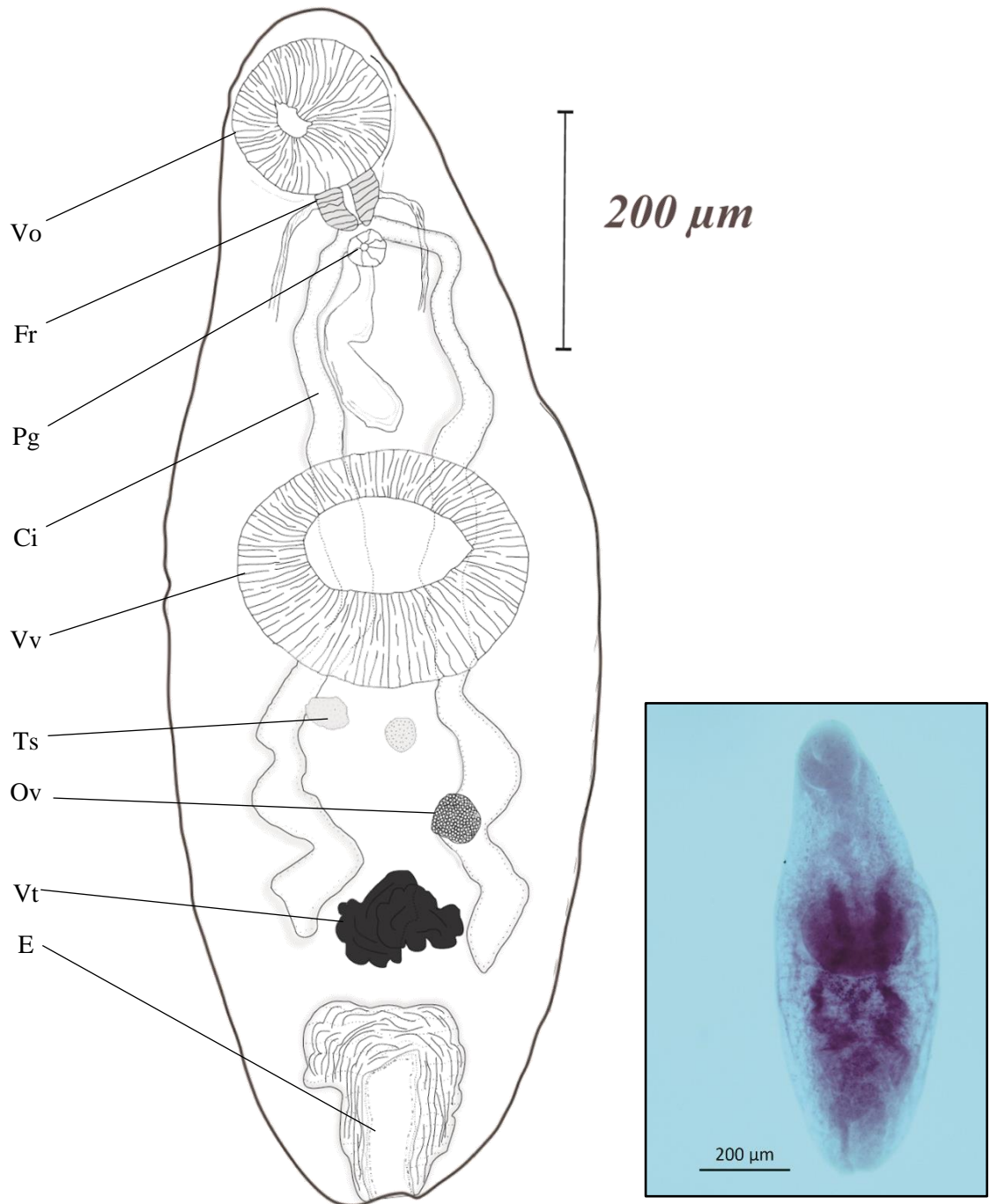


Figura 5. Vista ventral de *Lecithochirium* sp. con el ecsoma invaginado (Laminilla #H36P28). Ventosa oral (Vo); Faringe (Fr); Poro genital (Pg); Ciego Intestinal (Ci); Ventosa ventral (Vv); Testículos (Ts); Ovario (Ov); Vitelógenas (Vt); Ecsoma retraído (E). Dibujo realizado a un aumento de 10X. Fotografía tomada con el software ZEN lite, Blue edition (Zeiss).

6.2. Parámetros de la infección de *Lecithochirium* sp.

En total, se recolectaron 39 *O. bimaculatus* (23 machos y 16 hembras; entre 5 y 13 por mes muestreado) con una LMD promedio de 145.51 ± 21.78 (110 min–200 máx) mm y peso promedio de 1035.50 ± 382.99 (476.50 min–1,656 máx) gr. De estos pulpos, 7 (18%) estuvieron infectados por *Lecithochirium* sp., con un número total de 100 hemiuridos larvales recolectados y una intensidad promedio de $14.29 (\pm 12.08)$ (Tabla 3). Enero fue el mes en que se recolectó el mayor número de pulpos (13). Mayo fue el mes con el mayor número de hospederos infectados (4) y el mayor número de especímenes parásitos recolectados (53 ejemplares). En marzo se registró el hospedero con la mayor abundancia parasitaria (35 individuos). En enero y mayo se registraron los hospederos de menor abundancia (2 individuos en cada caso) (Anexo 1). Además, los valores en la abundancia de *Lecithochirium* sp. en los pulpos machos y hembras no presentaron diferencias significativas ($W= 0.190, P > 0.05$).

Tabla 3. Parámetros de infección parasitaria de *Lecithochirium* sp. de *Octopus bimaculatus*. \pm = Desviación estándar; Pd= Pulpos disectados; Pi = Pulpos infectados; P (%) = Prevalencia; IM = Intensidad media; AM = Abundancia media.

MUESTREO	Pd	Pi	P (%)	IM	AM
Junio 2018	5	0	---	---	---
Enero 2019	13	1	8%	2	0.15 ± 0.55
Marzo 2019	6	2	33%	22.5 ± 17.68	7.50 ± 14.05
Abril 2019	5	0	---	---	---
Mayo 2019	5	4	80%	13.25 ± 9.54	10.60 ± 10.16
Junio 2019	5	0	---	---	---
Total	39	7	18%	14.29 ± 12.08	2.56 ± 7.34

6.3. Reconstrucción filogenética

De las 18 secuencias de Hemiuridae usadas para la reconstrucción filogenética, cuatro provienen del buche de *O. bimaculatus* (i.e., *Lecithochirium* sp., obtenidas en este estudio), 13 hemiuridos asociados al estómago e intestino de peces teleósteos, y una del pulmón de la serpiente marina *Laticauda semifasciata* (Reinwardt, 1837) (Squamata: Elapidae). En total, 21 secuencias del gen 28S (incluyendo grupos externos) fueron analizadas para explorar las relaciones filogenéticas de Hemiuridae, descubriendo dos Clados Mayores:

1) Clado Mayor I, que incluye a las especies del género *Lecithochirium* (Lecithochiriinae), junto con *Pulmovermis cyanovitellosus* Coil y Kuntz, 1960 (Pulmoverminae) y a *H. luehei* (Hemiurinae), pero sin soporte estadístico en el nodo que agrupa a *H. luehei*.

2) Clado Mayor II, que muestra las relaciones filogenéticas de *Plerurus digitatus* (Looss, 1899) Looss, 1907 [Plerurinae], *B. crenatus*, *Dinosoma synaphobranchi* (Yamaguti, 1938), *Hemiurus appendiculatus* (Rudolphi, 1802) [Hemiurinae], *Aphanurus mugilus* Tang, 1981 [Aphanurinae], *L. excisum* [Elytrophallinae], *Dinurus longisinus* Looss, 1907 [Dinurinae], pero sin soporte estadístico en el nodo que agrupa a *P. digitatus* (Figura 6).

Con base en los análisis filogenéticos, se descubrió que las muestras se incorporan en el Clado Mayor I, dentro de la subfamilia parafilética Lecithochiriinae. De manera paralela, se detectó que los cuatro hemiuridos inmaduros de *Lecithochirium* sp. (parásitos de *O. bimaculatus*), forman un grupo monofilético con un valor de soporte estadístico alto (PP = 1). El clado de *Lecithochirium* sp. es hermano de *P. cyanovitellosus* (Pulmoverminae), con un soporte estadístico alto (PP > 0.95); mientras que *H. luehei* (Hemiurinae) es el grupo hermano de *Lecithochirium* sp. y *P. cyanovitellosus*, pero sin soporte estadístico. A su vez, el árbol filogenético muestra que las especies del Golfo de México – *L. microstomum* y *Lecithochirium floridense* (Manter, 1934) – son grupos hermanos; mientras que la especie de la Isla Heron (Australia) – *Lecithochirium caesionis* Yamaguti, 1942 – es la especie hermana de los

clados ((*H. luehei* (*P. cyanovitellosus* + *Lecithochirium* sp.)), (*L. microstomum* + *L. floridense*)).

La distancia genética calculada por el análisis de *p-distances* para las especies de la familia Hemiuridae (excluyendo los grupos externos), señaló que *Lecithochirium* sp. presenta una distancia genética de 3.06% con *P. cyanovitellosus*, seguida de las especies *L. floridense* (4.11%), *H. luehei* (4.91%), *L. microstomum* (5.43%) y *L. caesionis* (5.84%) (Anexo 3).

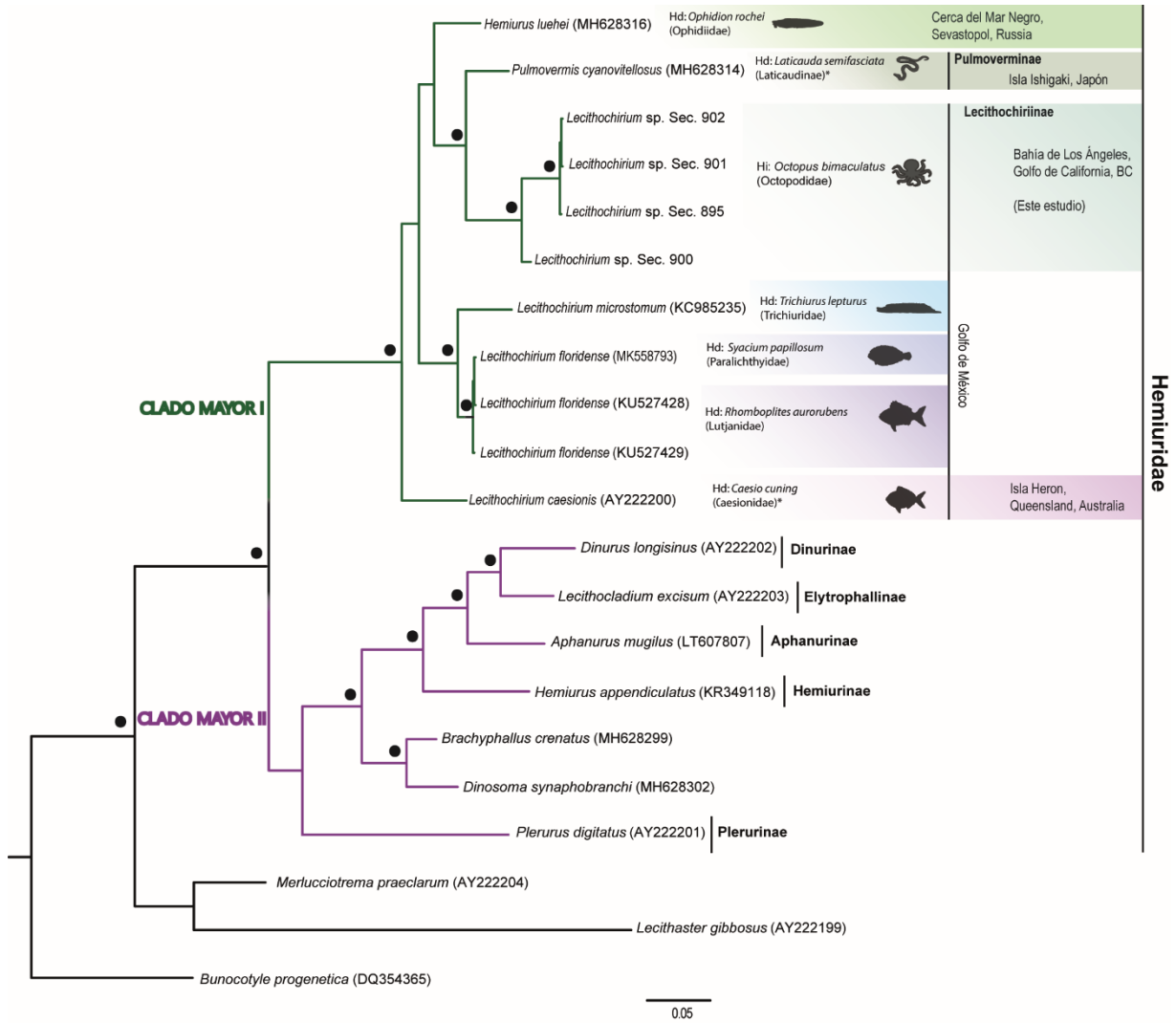


Figura 6. Árbol filogenético obtenido por Inferencia Bayesiana a partir de secuencias parciales del gen 28S para especies de la familia Hemiuridae. Los círculos negros sobre los nodos indican la probabilidad posterior (PP \geq 0.95). La barra representa la distancia de sustitución nucleotídica. Hi: Hospedero intermediario. Hd: Hospedero definitivo. (*): Especificidad hospedatoria.

7. DISCUSIÓN

7.1. Determinación taxonómica de gusanos inmaduros *Lecithochirium* sp.

La taxonomía e identificación de las especies de *Lecithochirium* ha sido compleja debido al alto polimorfismo morfológico intra e interespecífico, aunado a una escasa o nula información de sus formas larvianas, lo que imposibilita la comparación entre sus formas larvianas, inmaduras y adultas (e.g., Jousson et al. 1999; Abdel-Ghaffar et al. 2015; Blasco-Costa Poulin 2017; Leiva et al. 2017). Todos los especímenes de *Lecithochirium* sp. obtenidos en este estudio fueron encontrados en fase inmadura, con ausencia de huevos y con caracteres sexuales poco desarrollados; e.g., saco del sinus, ovarios, vesícula seminal y testículos. Por esta razón, solo fue posible identificar los especímenes a nivel de género (ver discusión más adelante).

La mayoría de las especies del género *Lecithochirium* han sido registradas en peces teleósteos como parásitos eurixenos (e.g., *L. floridense* y *L. microstomum*) (e.g., Manter 1947; Bray 1991; Bray et al. 1993; Timi et al. 1999; Overstreet et al. 2009; Liu et al. 2010; Bullard et al. 2011; Florencia et al. 2011; Morsy et al. 2012; Calhoun et al. 2013; Claxton et al. 2017). Sin embargo, algunas de sus especies han mostrado patrones de especificidad hospedatoria, e.g., *Lecithochirium genypteri* Manter, 1954 y *L. caesionis* (Coil y Kuntz 1960; Bray 1991; Bray et al. 1993; Gibson 2002).

En peces teleósteos del Golfo de California se han registrado dos especies de *Lecithochirium* en fase adulta: *Lecithochirium ostichthydis* Yamaguti, 1970 (en la Isla San Esteban, Sonora) y *Lecithochirium magnaporum* Manter, 1940 (en El saladito, Bahía de la Paz, BCS) (Villarreal-Lizárraga 1995; Monrroy-Escamilla 2005). Debido a que en este estudio los ejemplares de *Lecithochirium* se encontraron en etapa inmadura, no fue posible vincular su morfotipo con alguna de las dos especies registradas en el Golfo de California. Aun así, siguiendo los criterios taxonómicos de distintos autores (i.e., Gibson y Bray 1979, 1986; Bray et al. 1993; Gibson 2002; Bartoli y Gibson 2007; Abdel-Ghaffar et al. 2015), se identificó tentativamente a los especímenes como pertenecientes al género *Lecithochirium* con base en los siguientes caracteres morfológicos: 1) Presencia de un ecsoma desarrollado; 2)

Vesícula seminal sacular; 3) Dos glándulas vitelógenas con bordes irregulares y sobrepuestas (con tendencia a formar lóbulos ovales); 4) Presencia de dos testículos simétricos ubicados lateralmente por debajo de la ventosa ventral; 5) Prefaringe ausente; 6) Presencia de un poro genital localizado entre la ventosa ventral y la faringe, cerca de la bifurcación cecal.

Es importante mencionar que *L. ostichthydis* (registrado como adulto en el estómago de una morena, *Gymnothorax* sp.) (Monrroy-Escamilla 2005), y las muestras aquí diagnosticadas como *Lecithochirium* sp. (infectando el buche de *O. bimaculatus* en estadio inmaduro), comparten algunas características morfológicas, además de las de pertenecer al mismo género, e.g., 1) un par de testículos ovoides, simétricos y ligeramente oblicuos, localizados lateralmente por debajo de la ventosa ventral, 2) poro genital ubicada a la altura del borde posterior de la faringe y por arriba de la ventosa ventral y 3) vesícula seminal sacular ubicada en la parte anterior de la ventosa ventral. En este contexto, Ambrose (1988) registro a la morena de California – *Gymnotorax mordax* (Ayres, 1859) – cohabitando en una misma grieta marina con pulpos hembra de *O. bimaculatus* incubando huevos en la Isla de Santa Catalina, California (USA). Ambrose (1988) no observo evidencia de depredación de pulpos *O. bimaculatus* (hembras) por parte de *G. mordax*; sin embargo, sugirió la posibilidad de la interacción depredador (*G. mordax*) – presa (*O. bimaculatus*). Por su parte, Hofmeister y Voss (2017) señalaron que *G. mordax* es un depredador nocturno de pulpos *O. bimaculatus* en la Isla Santa Catalina, California. Además, *G. mordax* es considerada una especie demersal que habita en zonas rocosas a profundidades de 40 metros por debajo del nivel del mar (hábitat similar a *O. bimaculatus*) (Ambrose 1982; Eschmeyer et al. 1983; Hofmeister y Voss 2017). De igual manera, se conoce que las hembras de *O. bimaculatus*, al momento de la puesta de huevos, son vulnerables a la depredación ante el gasto energético que representa el cuidado de sus huevos, e.g., por falta de alimentación y movimientos aletargados (Armendáriz-Villegas et al. 2014; López-Peraza et al. 2014). Ante estas posibles evidencias de depredador–presa, sería interesante explorar la posibilidad de vincular los parásitos de *Lecithochirium* sp. de *O. bimaculatus* (presente estudio) con los de las morenas del género *Gymnotorax* en

Bahía de Los Ángeles, para corroborar o no a la morena como el hospedero definitivo de los hallazgos en pulpo.

7.2. Parámetros de infección de *Lecithochirium* sp.

Overstreet y Hochberg (1975) y Hochberg (1990), con base en valores bajos de prevalencia (< 10%) registrados entre Cephalopoda–Hemiuridae (e.g., *L. microstomum* como parásito del calamar *Lolliguncula brevis* (Blainville, 1823) y *Elytrophallus* sp. como parásito del pulpo *J. heathi*), sugirieron que los hemiuridos son parásitos accidentales de los cefalópodos. En contraste, en el presente trabajo se encontraron mayores valores de prevalencia (18%). Por tanto, se sugiere que *Lecithochirium* sp. puede ser una especie parásita común de *O. bimaculatus*. Asimismo, con base en los valores de prevalencia observados en este estudio, se infiere que *O. bimaculatus* puede ser un hospedero intermediario o paraténico para *Lecithochirium* sp.

Distintas fases larvianas (e.g., cercaría y metacercaria) y estadios inmaduros de Hemiuridae han sido registrados en invertebrados como crustáceos y bivalvos, lo que ha llevado a considerarlos por los distintos autores como sus hospederos intermediarios (e.g., Overstreet y Hochberg 1975; Hochberg 1990; Køie 1992,1995; Bao et al. 2015). Armendáriz-Villegas et al. (2014) registraron en Bahía de Los Ángeles una preferencia alimentaria (consumidores especialistas) de machos y hembras de *O. bimaculatus* por crustáceos (e.g., Portunidae y Xanthoidea) y bivalvos (e.g., Glycymeridae, Pectinidae y Veneridae). En este estudio, no se encontraron abundancias ni valores de prevalencia de *Lecithochirum* sp. asociados a los sexos de los hospederos infectados; dos hembras con 35 y 19 especímenes parásitos, respecto a cinco machos con valores de abundancia de 23, 10, 9, 2 y 2 especímenes parásitos. Sin embargo, con base en las observaciones realizadas durante las disecciones parasitológicas de los órganos internos de *O. bimaculatus* (ciego, buche, esófago e intestino), se logró detectar crustáceos no identificados como parte de su dieta. Madhavi (1968) y Hochberg (1990) han documentado que los crustáceos (e.g., copépodos del género *Paracalanus* y *Calanus*) sirven como segundos hospederos intermediarios de metacercarias de didymozoides. Køie (1992) ha señalado que los copépodos calanoides son segundos hospederos intermediarios de metacercarias de

B. crenatus, respectivamente. Por tanto, es posible inferir que algunos crustáceos residentes de Bahía de Los Ángeles sean utilizados como segundos o terceros hospederos intermediarios de *Lecithochirium* sp.

7.3. Relaciones filogenéticas

La topología del árbol filogenético de la familia Hemiuridae fue similar a la obtenida previamente por Pankov et al. (2006), Bao et al. (2015), Atopkin et al. (2017) y Sokolov et al. (2019). Tres especies del género *Lecithochirium* (*L. floridense*, *L. microstomum* y *L. caesionis*), representadas por cinco secuencias parciales del gen 28S disponibles en GenBank, más cuatro secuencias parciales del mismo gen, obtenidas de gusanos inmaduros *Lecithochirium* sp. (presente estudio), fueron analizadas para poner a prueba la monofilia de las especies del género *Lecithochirium*. Además, 12 secuencias representando a 10 especies de Hemiuridae incluidas en 7 subfamilias, fueron incluidas en el análisis. Así, se descubrieron dos clados mayores: **1) Clado Mayor I**, con representantes de Lecithochiriinae, Pulmoverminae y Hemiurinae. **2) Clado Mayor II**, con representantes de Aphanurinae, Dinurinae, Elytrophallinae, Hemiurinae y Plerurinae. Las subfamilias fueron clasificadas siguiendo los criterios taxonómicos de Gibson (2002), Bao et al. (2015), Atopkin et al. (2017) y Sokolov et al. (2019). Los datos aportados en esta investigación se ubican en el Clado Mayor I; por tanto, su estructura interna se discute a continuación.

Clado Mayor I: En este clado se observa que *L. caesionis*, distribuido en las costas de la Isla Heron, Australia (Olson et al. 2003), es el grupo hermano del clado representado por 2 sub-clados; (*L. microstomum* + *L. floridense*) y (*H. luehei* (*P. cyanovitellosus* + *Lecithochirium* sp.)). Las especies que se distribuyen en aguas del Golfo de México (*L. microstomum* y *L. floridense*) forman un clado (Claxton et al. 2017; Calhoun et al. 2013; Vidal-Martínez et al. 2019); mientras que las muestras obtenidas de *Lecithochirium* sp., hasta el momento, están restringidas al Golfo de California. Por tanto, con base en las relaciones filogenéticas de *Lecithochirium* spp., es posible inferir que cada especie podría presentar un patrón biogeográfico alopátrico, asociado a los mares en los que se distribuyen. Para el sub-clado de (*H. luehei* (*P. cyanovitellosus* + *Lecithochirium* sp.)), el nodo de *H. luehei* no presentó soporte estadístico. La relación

entre *H. luehei* (Hemiurinae) con taxa incluidos en dos subfamilias distintas (e.g., *P. cyanovitellosus* (Pulmoverminae) + *Lecithochirium* sp. (Lecithochiriinae) puede representar un problema de determinación taxonómica. Por ejemplo, Sokolov et al. (2019) lamentablemente no proporcionaron ejemplares de depósito (e.g., paragenofilos) en colecciones biológicas como evidencia morfológica para vincularla con su secuencia MH628316 asociada a *H. luehei*. Los ejemplares paragenofilos (i.e., ejemplares de parásitos de la misma especie que el material usado para la generación de datos moleculares, recolectado desde el mismo sitio de infección y hospedero), son un vínculo esencial entre los datos de secuencias de DNA y los taxa, proporcionando un medio para verificar y confirmar el estatus taxonómico de las especies parásitas (Pleijel et al. 2008). Por tanto, aquí se señala que es necesaria una futura revisión morfológica de las muestras de *H. luehei* (MH628316) del Mar Negro, Sevastopol, Rusia, para apoyar futuras relaciones filogenéticas que utilicen esta fuente de datos.

La relación detectada en el presente trabajo de *P. cyanovitellosus* (Pulmoverminae) + *Lecithochirium* sp. (Lecithochiriinae), presenta un nodo con alto valor de soporte estadístico (PP > 0.95). Aun cuando las secuencias de *Lecithochirium* sp. proceden de organismos inmaduros, se ha reconocido que los estadios inmaduros (i.e., metacercarias no enquistadas o adultos inmaduros) tendrían los mismos caracteres morfológicos al estado adulto, salvo que los estadios inmaduros no presentarían caracteres sexuales desarrollados y prominentes (Galaktionov y Dobrovolskij 2003; Lunaschi 2017). Por tanto, se esperaría que los especímenes inmaduros de *Lecithochirium* sp. de este estudio pudieran tener rasgos morfológicos de especies de *Lecithochirium* adultos residentes del Golfo de California (e.g., *L. ostichthydis* o *L. magnaporum*) (Villarreal-Lizárraga 1995; Monrroy-Escamilla 2005). Por esta razón, siguiendo a Coil y Kuntz (1960), Sandars (1961), Gibson y Bray (1979) y Gibson (2002), se detectaron claras diferencias morfológicas entre *P. cyanovitellosus* (en estadio adulto) y *Lecithochirium* sp. (en estadio inmaduro) que son importantes mencionar a continuación.

Pulmovermis cyanovitellosus (un parásito del pulmón de serpientes marinas) y *Lecithochirium* sp. (un parásito del buche de *O. bimaculatus*), se diferencian por la

longitud del cuerpo, e.g., *P. cyanovitellosus* posee un cuerpo extremadamente alargado en contraste con *Lecithochirium* sp. (17 mm vs 919 μm ; 18:1). *Lecithochirium* sp. presenta un esófago corto, carácter ausente en *P. cyanovitellosus*. *Pulmovermis cyanovitellosus* dispone de un ecsoma reducido (casi imperceptible), en cambio *Lecithochirium* sp. tiene un ecsoma desarrollado (retraído o parcialmente evaginado). *Pulmovermis cyanovitellosus* cuenta con dos testículos en tándem y simétricos, muy distante de la ventosa ventral y ubicados por debajo de la línea media ecuatorial de su cuerpo, mientras que *Lecithochirium* sp. presenta los dos testículos simétricos y ligeramente oblicuos, localizados lateralmente por debajo de la ventosa ventral. El ovario en ambas especies se encuentra en disposición postesticular, ocasionalmente dividido en lóbulos (dorsal y ventral) para *P. cyanovitellosus* y semiesférico en *Lecithochirium* sp. La vesícula seminal tiene forma sacular para *Lecithochirium* sp. y tubular para *P. cyanovitellosus*.

La distancia genética entre las especies relacionadas de *P. cyanovitellosus* y *Lecithochirium* sp. fue de 3.06%, lo que concuerda con lo previamente registrado para otros grupos de Hemiuridae; e.g., 2.99% entre *A. mugilus* (Aphanurinae) y *D. longisinus* (Dinurinae), 2.99% entre *A. mugilus* y *L. excisum* (Elytrphallinae) (Atopkin et al. 2017). Es importante señalar que la secuencia de *P. cyanovitellosus* (MH628314) presenta como hospedero definitivo a la serpiente marina *L. semifasciata* y proviene de la Isla Ishigaki, Japón (Sokolov et al. 2019). Las secuencias de *Lecithochirium* sp. generadas en este estudio, son las primeras en analizarse sobre un contexto filogenético, representando a cefalópodos como hospederos intermediarios/paraténicos desde el Golfo de California. Por tanto, resalta la necesidad de conocer cuál es el hospedero definitivo para las muestras de *Lecithochirium* sp. aquí analizadas, para esclarecer sus relaciones filogenéticas dentro de Hemiuridae.

7.4. Distancias genéticas

Los valores de distancia genética interespecífica en *Lecithochirium* oscilaron entre 4.11–5.84%. Respecto a otras especies pertenecientes a otros géneros y subfamilias, las muestras de *Lecithochirium* sp. presentaron valores con intervalos de distancia genética de 3.06–14.98%, e.g., 3.06% con *P. cyanovitellosus*

(Pulmoverminae), 12.93% con *P. digitatus* (Plerurinae) y 14.98% para *H. appendiculatus* (Hemiurinae). Los valores de las distancias genéticas obtenidos en este estudio resultaron similares a los obtenidos por Atopkin et al. (2017). Sin embargo, debido a los distantes intervalos observados entre las subfamilias de Hemiuridae, es necesario generar más datos genéticos provenientes de distintos grupos de Hemiuridae para evitar una posible sobreestimación causada por la carencia de información.

En efecto, las muestras identificadas con base en datos morfológicos corresponden al género *Lecithochirium*. Además, respecto a los análisis moleculares se obtuvo que *Lecithochirium* sp. es hermano de *P. cyanovitellosus*. Por tanto, se puede señalar que el género *Lecithochirium* y la subfamilia Lecithochiriinae son grupos parafiléticos. No obstante, se requieren más estudios que generen nuevos datos de secuencias de DNA (del mismo gen 28S) para especies de *Lecithochirium* y de la subfamilia Lecithochiriinae, incluyendo evidencia morfológica que valide la identidad de cada secuencia/especie, con el fin de obtener una mayor resolución para apoyar o contrastar las inferencias filogenéticas aquí descubiertas.

8. CONCLUSIONES

Octopus bimaculatus es infectado por trematodos de la familia Hemiuridae en estadio inmaduro, lo que puede ser evidencia de la participación del parásito en la compleja red trófica de organismos marinos de Bahía de los Ángeles.

Los datos morfológicos y moleculares apoyan que los especímenes analizados pertenecen al género *Lecithochirium* y que su grupo hermano es *P. cyanovitellosus*.

El presente trabajo representa el primer registro de formas inmaduras de *Lecithochirium* sp. en *O. bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles.

Los valores de prevalencia observados en este estudio sugieren que *O. bimaculatus* podría ser un hospedero intermediario o paraténico para *Lecithochirium* sp.

9. PERSPECTIVAS

Ampliar el tamaño de muestra y los meses de estudio, inclusive desarrollar un trabajo interanual (3 años mínimo) para esclarecer la relación trófica de las presas de *O. bimaculatus* con *Lecithochirium* sp., con la finalidad de determinar su dinámica alimentaria monocíclica para descubrir a los primeros hospederos intermediarios de *Lecithochirium* sp.

Realizar un muestreo preliminar desde la zona intermareal a 50 metros por debajo del nivel del mar (Armendáriz-Villegas et al. 2014) en Bahía de Los Ángeles, para la recolecta de peces teleósteos que habiten en dicha zona (adaptación similar a *O. bimaculatus*), y poder con ello, efectuar una previa revisión parasitológica en la búsqueda del (los) hospedero (s) definitivo (s).

10. REFERENCIAS

Abdel-Ghaffar F, Abdel-Gaber R, Abdel-Rahman B, Morsy K, Al Quraishy S, Saleh R, Mehlhorn H (2015) Molecular characterization and new geographical record of *Lecithochirium priacanthi* (Digenea: Hemiuridae) infecting the moontail bullseye fish *Priacanthus hamrur* (Perciformes: Priacanthidae) from the Red Sea, Egypt. *Parasitology Research* 114:4471–4477. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4690-x>

Abdel-Ghaffar F, Bashtar AR, Mehlhorn H, Abdel-Gaber R, Saleh R (2013) Morphological and molecular characterization of *Lecithochirium grandiporum* (Digenea: Hemiuridae) infecting the European eel *Anguilla anguilla* as a new host record in Egypt. *Parasitology Research* 112:3243–3250. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3502-4>

Aguirre-Macedo ML, May-Tec AL, Martínez-Aquino A, Cremonte F, Martorelli SR (2016) Diversity of helminth parasites in aquatic invertebrate hosts in Latin America: how much do we know? *Journal of Helminthology* 91:137–149. <https://doi.org/10.1017/S0022149X16000547>

Alejo-Plata C, Cerdenares-Ladrón de Guevara G (2002) Caracterización de la pesca de pulpo (Cephalopoda: Octópoda) en las costas de Oaxaca, México. Memorias del I Foro Científico de Pesca Ribereña. 17-18 de octubre. INP- CRIP. Guaymas, Sonora

Alejo-Plata C, García-Guillén R, Herrera-Galindo J (2012) Paralarvas y juveniles de *Octopus bimaculatus* (Cephalopoda: Octopodidae) en el Pacífico sur de México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 47:359–365. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572012000200019>

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389–3402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Ambrose RF (1982) Shelter Utilization by the Molluscan Cephalopod *Octopus bimaculatus*. *Marine Ecology Progress Series* 7:67–73. <https://doi.org/10.3354/meps007067>

Ambrose RF (1988) Population dynamics of *Octopus bimaculatus*: influence of life history patterns, synchronous reproduction and recruitment. *Malacologia* 29:23–29.

Arenas M (2015) Trends in substitution models of molecular evolution. *Frontier in Genetics* 6:319. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00319>

Armendáriz-Villegas EJ, Ceballos-Vázquez BP, Markaida U, Abitia-Cárdenas A, Medina-López MA, Arellano-Martínez M (2014) Diet of *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 (Cephalopoda: Octopodidae) in Bahía De Los Ángeles, Gulf of California. *Journal of Shellfish Research* 33:305–314. <https://doi.org/10.2983/035.033.0129>

Atopkin DM, Besprozvannykh VV, Beloded AY, Ngoc HD, Ha NV, Tang NV (2017) Phylogenetic relationships of Hemiuridae (Digenea: Hemiuroidea) with new morphometric and molecular data of *Aphanurus mugilis* Tang, 1981 (Aphanurinae) from mullet fish of Vietnam. *Parasitology International* 66:824–830. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.09.009>

Bao M, Roura A, Mota M, Nachón DJ, Antunes C, Cobo F, MacKenzie K, Pascual S (2015) Macroparasites of allis shad (*Alosa alosa*) and twaite shad (*Alosa fallax*) of the Western Iberian Peninsula Rivers: ecological, phylogenetic and zoonotic insights. *Parasitology Research* 114:3721–3739. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4601-1>

Bartoli P, Gibson DI (2007) The status of *Lecithochirium grandiporum* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Hemiuridae), a rarely reported and poorly known species from the Mediterranean moray eel *Muraena helena* L. in the Western Mediterranean. *Systematic parasitology* 68:183–194. <https://doi.org/10.1007/s11230-007-9095-5>

Blasco-Costa I, Cutmore SC, Miller TL, Nolan MJ (2016) Molecular approaches to trematode systematics: ‘best practice’ and implications for future study. *Systematic Parasitology* 93:295–306. <https://doi.org/10.1007/s11230-016-9631-2>

Blasco-Costa I, Poulin R (2017) Parasite life-cycle studies: a plea to resurrect an old parasitological tradition. *Journal of Helminthology* 91:647–656. <https://doi.org/10.1017/S0022149X16000924>

Bray RA (1991) Hemiuridae (Digenea) from marine fishes of the southern Indian Ocean: Genus *Lecithochirium* Lühe, 1901 (Lecithochiriinae). *Systematic Parasitology* 18:193–219. <https://doi.org/10.1007/BF00009360>

Bray RA, Cribb TH, Barker SC (1993) Hemiuridae (Digenea) from marine fishes of the Great Barrier Reef, Queensland, Australia. *Systematic Parasitology* 25:37–62. <https://doi.org/10.1007/BF00017000>

Bray RA, Diaz PE, Cribb TH (2016) Knowledge of marine fish trematodes of Atlantic and Eastern Pacific Oceans *Systematic Parasitology* 93:223–235. <http://doi.org/10.1007/s11230-016-9629-9>

Brusca RC, Brusca GJ (2003) *Invertebrates* 2 ed. Sinauer Associates, Massachusetts, pp 936

Bullard SA, Barse AM, Curran SS, Morris JA Jr. (2011) First Record of a Digenean from Invasive Lionfish, *Pterois* cf. *volitans* (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) in the Northwestern Atlantic Ocean. *Journal of Parasitology* 97:833–837. <https://doi.org/10.1645/GE-2746.1>

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms; margolis et al., Revisited. *The Journal of Parasitology* 83:575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>

Calhoun DM, Curran SS, Pulis EE, Provaznik JM, Franks JM (2013) *Hirudinella ventricosa* (Pallas, 1774) Baird, 1853 represents a species complex based on ribosomal DNA. *Systematic Parasitology* 86:197–208. <https://doi.org/10.1007/s11230-013-9439-2>

Castellanos-Martínez S (2008) Biología reproductiva del pulpo *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 en Bahía de Los Ángeles, Baja California, México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, pp 98

Castillo-Sánchez E (1996) Estructura de la Comunidad de Helmintos parásitos de *Paralichthys californicus* en el Estero de Punta Banda, Bahía de Todos Santos y Bahía

de San Quintín, Baja California, México. Tesis de Maestría. CICESE. Ensenada, Baja California, pp 68

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

Claxton AT, Fuehring AD, Andres MJ, Moncrief TD, Curran SS (2017) Parasites of the Vermilion Snapper, *Rhomboplites aurorubens* (Cuvier), from the Western Atlantic Ocean. *Comparative Parasitology* 84:1–14. <https://doi.org/10.1654/1525-2647-84.1.1>

Coil W, Kuntz RE (1960) Three New Genera of Trematodes from Pacific Sea Serpents, *Laticauda colubrina* and *L. semifasciata*. *Proceeding of The Helminthological Society of Washington* 27:145–150

Combes C (2001) *Parasitism: the ecology and evolution of intimate interactions*. Chicago, IL: University of Chicago Press

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) (2013) Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. pp 299. Disponible en <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca> (Accesado el 19/12/2019)

Cribb TH, Bott NJ, Bray RA, McNamara MKA, Miller TL, Nolan MJ, Cutmore SC (2014) Trematodes of the Great Barrier Reef, Australia: emerging patterns of diversity and richness in coral reef fishes. *International Journal for Parasitology* 44:929–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.002>

Cribb TH, Bray RA (2011) Trematode families and genera: have we found them all? *Trends in Parasitology* 27:149–154. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.008>

Cribb TH, Bray RA, Littlewood DTJ, Pichelin SP, Herniou EA (2001) The Digenea. In: Littlewood DTJ and Bray RA (eds). *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp 168–185

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

Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85:407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>

Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2010) Geneious v 5.1. Disponible en <http://www.geneious.com> (Accesado el 26/12/2019)

Eschmeyer WN, Herald ES, Hammann H (1983) A field guide to Pacific coast fishes of North America. Boston (MA, USA): Houghton Mifflin Company, pp 336

Florencia AM, Silvia GE, Carla SB, Noelia G, Melisa P, Javier M, Javier S, Román U, Daniel T (2011) Digeneos parásitos de *Porichthys porosissimus* (Teleostei: Batrachoididae) en el estuario de Bahía Blanca. *BioScriba* 4:26–37

Galaktionov KV, Dobrovolskij AA (2003) The biology and evolution of trematodes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp 592

García-Varela M, SA Nadler (2005) Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) Inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology* 91:1401–1409. <https://doi.org/10.1645/GE-523R.1>

Gibson DI (2002) Family Hemiuridae Looss, 1899. In Gibson DI, Jones A and Bray RA (eds). *Keys to the Trematoda*, vol. 1. Wallingford: CAB International, pp 305–340

Gibson DI, Bray RA (1979) The Hemiuroidea: terminology, systematics and evolution. *Bulletin of the British Museum (Natural History), (Zoology)* 36:35–146

Gibson DI, Bray RA (1986) The Hemiuridae (Digenea) of fishes from the north-east Atlantic. *Bulletin of the British Museum (Natural History), (Zoology Series)* 51:1–125

Globefish (2015) Octopus - May 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponible en <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/337014/> (Accesado el 13/09/2019)

Guillén-Hernández S, López-Struck A, González-Salas C, Aguirre-Macedo ML (2018) *Octopus maya* Parasites of the Yucatán Península, Mexico. I. Faunal Assemblages. Diseases of Aquatic Organisms 130:37–43. <https://doi.org/10.3354/dao03249>

Hernández-Sánchez A, Jesús-Navarrete A (2010) Parámetros de crecimiento, mortalidad y tasa de explotación del pulpo *Octopus maya* en Holbox, Quintana Roo, México. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45:415–421. <http://doi.org/10.4067/S0718-19572010000300006>

Hochberg FG (1990) Diseases of Mollusca: Cephalopoda (Diseases caused by protistans and metazoans). In: Kinne O (ed). Diseases of Marine Animals. Biologische Anstalt Helgoland, Germany, pp 47–200

Hochberg FG, Fields WG (1980) Cephalopoda: the squids and octopuses. En: Morris RH, Abbott DP and Haderlie EC (Eds). Intertidal invertebrates of California. Stanford Univ. Press. Stanford, California, pp 429–444

Hofmeister JKK, Voss KM (2017) Activity space and movement patterns of *Octopus bimaculatus* (Verrill, 1883) around Santa Catalina Island, California. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 486:344–351. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.10.024>

Jereb P, Roper CFE, Norman MD, Finn JK (2014) Cephalopods of the world: An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3. Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. Rome, FAO, pp 370. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/019/i3489e/i3489e.pdf> (Accesado el 24/01/2020)

Jousson O, Bartoli P, Pawlowski J (1999) Molecular identification of developmental stages in Opecoelidae (Digenea). International Journal for Parasitology 29:1853–1858. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00124-1)

Katoh K, Standley DM (2016) A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 32:1933–1942. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw108>

Køie M (1990a) Redescription of the Cercaria of *Lecithochirium rufoviride* (Rudolphi, 1819) Lühe, 1901 (Digenea, Hemiuridae) (= *Cercaria vaullegeardi* Pelseneer, 1906) 31:85–95. <https://doi.org/10.1080/00785326.1990.10430853>

Køie M (1990b) On the morphology and life-history of *Hemiurus luehei* Odhner, 1905 (Digenea: Hemiuridae). *Journal of Helminthology* 64:193–202. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00012165>

Køie M (1991) Aspects of the morphology and life cycle of *Lecithocladium excisum* (Digenea, Hemiuridae), a parasite of *Scomber* spp. *International Journal for Parasitology* 21:597–602. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90065-F](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90065-F)

Køie M (1992) Life cycle and structure of the fish digenean *Brachyphallus crenatus* (Hemiuridae). *Journal of Parasitology* 178:338–343. <https://doi.org/10.2307/3283485>

Køie M (1995) The life-cycle and biology of *Hemiurus communis* Odhner, 1905 (Digenea, Hemiuridae). *Parasite* 2:195–202. <https://doi.org/10.1051/parasite/199502s2195>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Leiva NV, López Z, González MT, Muñoz G (2017) Determining intermediate hosts for Opcoelidae and Microphallidae species (Platyhelminthes: Trematoda) in the Southeastern Pacific Coast, using molecular markers. *Journal of Parasitology* 103:132–137. <https://doi.org/10.1645/16-3>

Littlewood DTJ, Bray RA, Waeschenbach A (2015) Phylogenetic patterns of diversity in cestodes and trematodes. in: Morand S, Krasnov BB and Littlewood DTJ (Eds). *Parasite diversity and diversification: Evolutionary ecology meets phylogenetics*.

Cambridge, Cambridge University Press, pp 304–319.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139794749.020>

Liu SF, Peng WF, Gao P, Fu MJ, Wu HZ, Lu MK, Gao JQ, Xiao J (2010) Digenean parasites of Chinese marine fishes: a list of species, hosts and geographical distribution. *Systematic Parasitology* 75:1–52. <https://doi.org/10.1007/s11230-009-9211-9>

López-Caballero EJ, Pérez-Suárez G (1999) Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 26:45–56

López-Peraza DJ, Hernández-Rodríguez M, Barón-Sevilla B (2014) Ontogeny of the digestive system of the *Octopus bimaculatus* paralarvae (Verrill, 1883). *SpringerPlus* 3:1–10. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-22>

López-Peraza DJ, Hernández-Rodríguez M, Barón-Sevilla B, Buckle-Ramirez LF, Grano-Maldonado MI (2017) First record of *Stibarobdella moorei* (Annelida, Hirudinea, Piscicolidae) a marine leech parasitizing *Octopus bimaculatus* (Mollusca: Octopodidae) from the Mexican Pacific Coast. *Helminthologia* 54:322–329. <https://doi.org/10.1515/helm-2017-0044>

López-Rocha JA, Arellano-Martínez M, Ceballos-Vázquez BP, Velázquez-Abunader I, Castellanos-Martínez S, Torreblanca-Ramírez E (2012) Use of Length-Frequency Analysis for Growth Estimation of the California Two-Spotted Octopus *Octopus bimaculatus* Verrill 1883 of the Gulf of California. *Journal of Shellfish Research* 31:1173–1181. <https://doi.org/10.2983/035.031.0428>

Lunaschi LI (2017) Clase Trematoda. In: Drago FB (Coord.). *Macroparásitos: Diversidad y Biología*, Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP) pp 42–67. Disponible en <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/755#accordion-1> (Accesado el 15/09/2019)

Madhavi R (1968) A didymozoid metacercaria from the copepod. *Paracalanus aculeatus* Giesbrecht, from Bay of Bengal. *Journal of Parasitology* 54:629

Manter HW (1947) The digenetic trematodes of marine fishes of Tortugas, Florida. The American Midland Naturalist 38:257–416. <https://doi.org/10.2307/2421571>

Markaida U (2006) Food and feeding of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California and adjacent waters after the 1997–98 El Niño event. Fisheries Research 79:16–27. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.02.016>

Martínez M (1997) Sistemática Molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México 60:123–136. <https://doi.org/10.17129/botsci.1525>

Martínez-Aquino A, Chan-Martin AJ, García-Teh JG, Ceccarelli FS, Aguirre-Macedo ML (2019) Metacercariae of *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) in *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) from Mérida City, Yucatán, Mexico: a cointroduced parasite. BioInvasions Records 8:712–728. <https://doi.org/10.3391/bir.2019.8.3.29>

Martínez-Aquino A, García-Teh JG, Ceccarelli FS, Aguilar-Aguilar R, Vidal-Martínez VM, Aguirre-Macedo ML (2020) New morphological and molecular data for *Xystretrum solidum* (Gorgoderidae, Gorgoderinae) from *Sphoeroides testudineus* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) in Mexican waters. ZooKeys 925:141–161. <https://doi.org/10.3897/zookeys.925.49503>

Martínez-Aquino A, Vidal-Martínez VM, Aguirre-Macedo ML (2017) A molecular phylogenetic appraisal of the acanthostomines *Acanthostomum* and *Timoniella* and their position within Cryptogonimidae (Trematoda: Opisthorchioidea). PeerJ 5:e4158. <https://doi.org/10.7717/peerj.4158>

Matthews BF, Matthews RA (1988) The ecsoma in Hemiuridae (Digenea: Hemiuroidea): tegumental structure and function in the mesocercaria and the metacercaria of *Lecithochirium furcolabiatum* (Jones, 1933) Dawes, 1947. Journal of Helminthology 62:317–330. <https://doi.org/10.1017/S0022149X0001172X>

Monrroy-Escamilla M (2005) Estudios taxonomicos de algunos trematodos de peces del Golfo de California. Tesis de Licenciatura. UNAM. México, DF, pp 68

Morrone JJ (2000) Sistemática, biogeografía, evolución. Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio. Las Prensas de Ciencias. UNAM. México, DF, pp 124

Morsy K, Bashtar AR, Abdel-Ghaffar F, Baksh W (2012) First record of *Lecithochirium grandiporum* (Digenea: Hemiuridae) infecting the lizard fish *Saurida tumbil* from the Red Sea. *Parasitology Research* 111:2339–2344. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3111-7>

Nadler SA, Hudspeth DSS (1998) Ribosomal DNA and Phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): Implications for Morphological Evolution and Classification. *Molecular phylogenetics and evolution* 10:221–236. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0514>

Nadler SA, Pérez-Ponce de León G (2011) Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology* 138:1688–1709. <https://doi.org/10.1017/S003118201000168X>

Niewiadomska K, Pojmańska T (2011) Multiple strategies of digenean trematodes to complete their life cycles. *Wiadomooci Parazytologiczne* 57:233–241

Nigmatullin CM, Shchetinnikov AS, Shukhgalter OA (2009) On feeding and helminth fauna of neon flying squid *Ommastrephes bartramii* (Lesueur, 1821) (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the southeastern Pacific. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44:227–235. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572009000100023>

Nigmatullin CM, Shulgálter OA (1990) Helminthofauna y aspectos ecológicos de las relaciones parasitarias del calamar (*Illex argentinus*) en el atlántico sudoccidental. *Frente marino* 7:57–68

Nolan MJ, Cribb TH (2005) The Use and Implications of Ribosomal DNA Sequencing for the Discrimination of Digenean Species. *Advances in Parasitology* 60:101–163. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60002-4](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60002-4)

O'Brien CE, Ponte G, Fiorito G (2018) Octopus. Encyclopedia of Animal Behavior, no. May, pp 142–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90074-8>

Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA, Littlewood DTJ (2003) Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). International Journal for Parasitology 33:733–755. [http://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00049-3](http://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00049-3)

Ortiz N, Ré ME (2014) Cephalopoda. En: Calcagno JA (Ed). Los invertebrados marinos. Fundación de Historia Natural Felix Azara. Buenos Aires, Argentina, pp 173–191. Disponible en <https://fundacionazara.org.ar/los-invertebrados-marinos/> (Accesado el 05/08/2020)

Overstreet RM, Cook JO, Heard RW (2009) Trematoda (Platyhelminthes) of the Gulf of Mexico. In: Felder DL and Camp DK (Eds). Gulf of Mexico, Origins, Waters and Biota, vol 1. Texas A&M University Press, pp 419–486

Overstreet RM, Hochberg FG (1975) Digenetic Trematodes in Cephalopods. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 55:893–910. <https://doi.org/10.1017/S0025315400017781>

Padial JM, Miralles A, Riva I, Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. Frontiers in Zoology 7:16. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>

Pankov P, Webster BL, Blasco-Costa I, Gibson DI, Littlewood DTJ, Balbuena JA and Kostadinova A (2006) *Robinia aurata* n. g., n. sp. (Digenea: Hemiuridae) from the mugilid *Liza aurata* with a molecular confirmation of its position within the Hemiuroidea. Parasitology 133:217–227. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000126>

Pante E, Schoelinck C, Puillandre N (2015) From Integrative Taxonomy to Species Description: One Step Beyond. Systematic Biology 6:152–160. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syu083>

Parker GA, Ball MA, Chubb JC (2009) To grow or not to grow? Intermediate and paratenic hosts as helminth life cycle strategies. Journal of Theoretical Biology 260:460–473. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2009.01.016>

Pascual S, Abollo E, Mladineo I, Gestal C (2019) Metazoa and Related Diseases. In: Gestal C, Pascual S, Guerra Á, Fiorito G and Vieites J (Eds). Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods. Springer, Cham, pp 169–179. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11330-8_12

Pascual S, Gestal C, Estévez JM, Rodríguez H, Soto H, Abollo E, Arias C (1996) Parasites in Commercially-Exploited Cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain: An Updated Perspective. *Aquaculture* 142:1–10. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(96\)01254-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(96)01254-9)

Pascual S, Gonzales A, Guerra A (2007) Parasites and cephalopod fisheries uncertainty: towards a waterfall understanding. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 17:139–144. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-9021-y>

Pascual S, González A, Arias C, Guerra A (1995) Helminth infection in the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda, Ommastrephidae) off NW Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:71–75

Pérez-Ponce de León G, Hernández-Mena DI (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* 93:260–276. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000191>

Pleijel F, Jondelius U, Norlinder E, Nygren A, Oxelman B, Schander C, Sundberg P, Thollesson M (2008) Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48:369–371. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.03.024>

Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>

Poulin R, Cribb TH (2002) Trematode life cycles: short is sweet? *Trends in Parasitology* 18:176–183. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02262-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02262-6)

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian

phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Roper, CFE, Sweeney MJ, Hochberg FG (1995) Cefalópodos. En: Fischer W, Krupp F, Schneider W, Sommer C, Carpenter KE y Niem VH (Eds). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental, I, plantas e invertebrados. FAO, Roma, pp 305–353

Roumbedakis K, Drábková M, Tymi T, di Cristo C (2018) A Perspective Around Cephalopods and Their Parasites, and Suggestions on How to Increase Knowledge in the Field. *Frontiers in Physiology* 9:1573. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01573>

SAGARPA (2018) Carta Nacional Pesquera, Diario Oficial de la Federación. México, DF. Disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/334832/DOF_-_CNP_2017.pdf (Accesado el 31/10/2018)

Sanders DF (1961) Pulmoverminae n.subfam. (Trematoda: Digenea) for the genera *Pulmovermis* and *Hydrophitrema*. *Journal of Helminthology* 35:305–308. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00004685>

SEMARNAT (2007) Bahía de los Ángeles: recursos naturales y comunidad “Línea Base 2007. Danemann GD y Ezcurra E (eds). Instituto Nacional de Pesca, Pronatura Noroeste A.C.

Shukhgalter OA, Nigmatullin CM (2001) Parasitic helminths of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in open waters of the central east Pacific. *Fisheries Research* 54:95–110. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(01\)00374-5](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(01)00374-5)

Sokolov SG, Atopkin DM, Urabe M and Gordeev II (2019) Phylogenetic analysis of the superfamily Hemiuroidea (Platyhelminthes, Neodermata: Trematoda) based on partial 28S rDNA sequences. *Parasitology* 146:596–603. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001841>

Stock SP, Campbell JF, Nadler SA (2001) Phylogeny of *Steinernema travassos*, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* 87:877–889. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0877:POSTCS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0877:POSTCS]2.0.CO;2)

Stunkard HW (1980) The Morphology, Life History, and Systematic Relations of *Tubulovesicula pinguis* (Linton, 1940) Manter, 1947 (Trematoda: Hemiuridae). *Biological Bulletin* 159:737–751. <https://doi.org/10.2307/1540838>

Timi JT, Martorelli SR, Sardella NH (1999) Digenetic trematodes parasitic on *Engraulis anchoita* (Pisces: Engraulidae) from Argentina and Uruguay. *Folia Parasitologica* 46:132–138

Vidal EAG, Haimovici M (1999) Digestive tract parasites in rhynchoteuthion squid paralarvae, particularly in *Illex argentinus* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fishery Bulletin* 97:401–405

Vidal-Martínez VM, Aguirre-Macedo ML, Scholz T, González-Solís D, Mendoza-Franco E (2001) Atlas of the helminth parasites of cichlid fishes of Mexico. Praha, Academia, pp 166

Vidal-Martínez VM, Torres-Irineo E, Aguirre-Macedo M, Janovy J, Esch GW (2016) A century (1914–2014) of studies on marine fish parasites published in the *Journal of Parasitology*. In: Janovy J and Esch GW (Eds). *A Century of Parasitology: Discoveries, Ideas and Lessons Learned by Scientists Who Published in the Journal of Parasitology, 1914–2014*. Chichester: Wiley, pp 57–74

Vidal-Martínez VM, Velazquez-Abunader I, Centeno-Chale OA, May-Tec AL, Soler-Jimenez LC, Pech D, Marino-Tapia I, Enriquez C, Zapata-Perez O, Herrera-Silveira J, Hernandez-Mena DI, Herzka SZ, Uriel Ordonez-Lopez U, Aguirre-Macedo ML (2019) Metazoan parasite infracommunities of the dusky flounder (*Syacium papillosum*) as bioindicators of environmental conditions in the continental shelf of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Parasites Vectors* 12:1–18. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3524-6>

Villareal-Lizárraga A (1995) Descripción taxonómica de trematodos Platyhelminthes en peces de importancia comercial de la Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. UABCS, La Paz, Baja California Sur, pp 110

Wiley EO, Lieberman BS (2011) Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematics, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp 432. <https://doi.org/10.1002/9781118017883>

WoRMS Editorial Board (2020) World Register of Marine Species. Disponible en <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. <https://doi.org/10.14284/170> (Accesado el 29/03/2020)

Yamaguti S (1971) Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Tokyo: Keigaku publishing

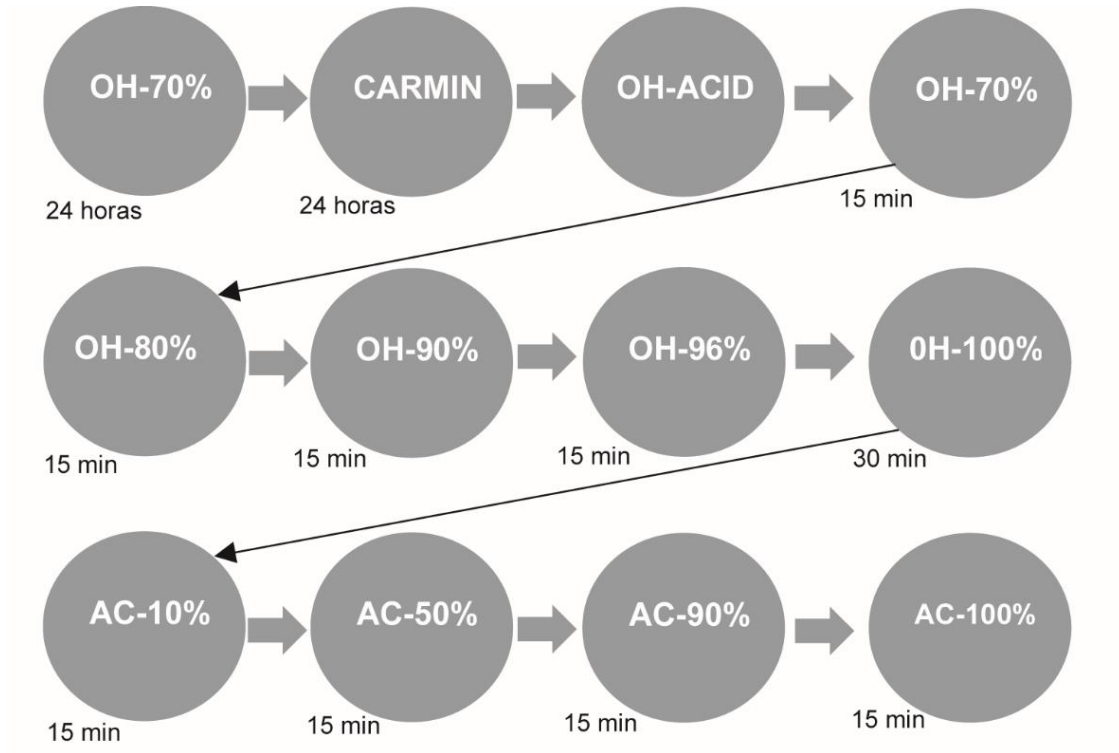
Yang Z, Rannala B (2012) Molecular phylogenetics: principles and practice. Nature Reviews Genetics volume 13:303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>

11. ANEXOS

Anexo 1. Morfometría de pulpos *Octopus bimaculatus* y registro de abundancias parasitarias por cada hospedero. LDM: Longitud Dorsal del Manto; PT: Peso Total; AP: Abundancia parasitaria.

Individuo	Mes	Macho	Hembra	LDM (mm)	PT (gr)	AP
1	Junio-2018	♂		140	1054.8	
2			♀	150	969.1	
3				160	1229.1	
4		♂		160	1555.5	
5			♀	170	1224.6	
6			♀	170	1630.4	
7			♂		130	930
8	Enero-2019	♂		130	792.6	
9		♂		110	580.6	
10			♀	110	531.4	
11			♀	130	598	
12			♀	140	1051.2	
13		♂		140	928.6	
14			♀	120	644.4	
15		♂		130	795	
16		♂		130	761.2	
17			♀	130	922.2	
18		♂		120	550.4	
19		Marzo-2019		♀	180	1540
20			♀	180	1510	35
21	♂			190	1617.3	
22	♂			200	1343.9	
23	♂			150	926.4	
24	♂			140	859.7	10
25	Abril-2019	♂		140	759	
26			♀	150	993	
27		♂		140	897.5	
28		♂		150	1056.6	
29		♂		150	762	
30	Mayo-2019	♂		150	925	9
31		♂		140	1119.9	2
32			♀	110	476.5	19
33		♂		120	697.3	23
34			♀	160	1220	
35	Junio-2019		♀	135	1517	
36			♀	140	1254	
37		♂		140	1098	
38		♂		170	1656	
39		♂		170	1600	

Anexo 2. Orden metodológico del proceso de tinción mediante Carmín clorhídrico.
OH = Etanol. ACID = Alcohol acidulado.



Anexo 3. Matriz de distancias genéticas calculada por el método de *p-distances* (valores en porcentaje) con secuencias del gen 28S obtenidas en el presente estudio (*), y de la base de datos del GenBank.

Taxas	*1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Lecithochirium</i> sp. *													
2. <i>Pulmovermis cyanovitellosus</i>	3.06												
3. <i>Lecithochirium floridense</i>	4.11	3.29											
4. <i>Hemiurus luehei</i>	4.91	4.06	0.68										
5. <i>Lecithochirium microstomum</i>	5.43	5.09	2.97	3.16									
6. <i>Lecithochirium caesionis</i>	5.84	5.20	3.34	4.26	4.23								
7. <i>Brachyphallus crenatus</i>	11.72	10.88	10.08	10.03	10.98	11.24							
8. <i>Dinosoma synaphobranchi</i>	12.47	11.68	10.88	10.60	11.68	11.86	2.99						
9. <i>Plerurus digitatus</i>	12.93	12.97	10.94	12.63	11.86	12.39	10.58	11.58					
10. <i>Aphanurus mugilus</i>	13.61	12.57	12.10	12.63	13.05	12.20	7.09	7.68	12.29				
11. <i>Lecithocladium excisum</i>	13.63	13.37	11.96	12.97	12.88	13.18	7.09	7.49	11.49	5.71			
12. <i>Dinurus longisinus</i>	13.80	13.67	11.86	13.08	12.42	12.09	8.18	8.98	11.68	6.48	5.65		
13. <i>Hemiurus appendiculatus</i>	14.98	14.65	13.19	14.48	14.15	12.95	7.46	8.48	12.47	5.33	6.95	7.91	