

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Genética
PEDECIBA

Patrones de diferenciación en el complejo parásito-hospedador integrado por nematodos del género *Contracaecum* (Nematoda, Anisakidae) y peces anuales (Cyprinodontiformes, Rivulidae) de Uruguay.



Lic. Cecilia Delgado

Orientadora: Dra. Graciela García

Tribunal:

Dra. Susana González (Presidente)

Dr. Fernando Pérez Miles (Vocal)

Dra. Jenny Saldaña(Vocal)

Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias, UDELAR.

2014

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Graciela García por todo el apoyo y la formación académica brindada desde el primer momento.

A la Mag. Odile Volonterio y al Prof. Rodrigo Ponce de León de la Sección Zoología de Invertebrados por la constante ayuda y dedicación brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A Verónica Gutiérrez, Néstor Ríos y Cristhian Clavijo por su colaboración en mi formación y por el tiempo compartido dentro del laboratorio.

A Alejandro Duarte y Sebastián Serra (Sección Zoología de Vertebrados), Nicolás Papa (Sección Biología Celular) y Carlos Passos (Sección Etología) por los ejemplares donados.

Al Dr. Juan Manuel Caspeta-Mandujano de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (México) por los aportes realizados y la bibliografía proporcionada.

A los miembros del tribunal por sus valiosos aportes y sugerencias.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el financiamiento de este trabajo.

A mi hijo, familiares y amigos por todo el apoyo incondicional que me han brindado en todo momento y por hacer posible la culminación de esta etapa.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	I
Índice general.....	II
Índice de Tablas.....	IV
Índice de Figuras.....	VI
RESUMEN.....	VII
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes generales.....	1
1.1.1 Co-evolución en complejo parásito-hospedador.....	1
1.1.2 Estudios moleculares en complejos de parásitos-hospedadores.....	2
1.2 Antecedentes específicos.....	4
1.2.1 Características de los rivúlidos como especies hospedadoras.....	4
1.2.2 Nematodos parásitos en rivúlidos.....	6
1.2.3 Ciclo de vida de <i>Contracaecum</i>	7
2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	9
3 OBJETIVOS.....	10
3.1 Objetivo general.....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1 Estrategia de muestreo.....	11
4.2 Procesamiento y fijación de los ejemplares.....	12
4.3 Análisis taxonómico de los Nematoda hallados en las muestras.....	13
4.4 Estadística descriptiva.....	13
4.5 Análisis de sistemática molecular.....	14
4.5.1 Extracción de ADN genómico de los nematodos.....	14
4.5.2 Extracción de ADN genómico de los rivúlidos.....	14
4.5.3 Amplificación del ADNr de nematodos.....	15
4.5.4 Amplificación del ADNmt de nematodos.....	16
4.5.5 Amplificación del ADNmt de hospedadores.....	16
4.5.6 Análisis de secuencias.....	17
4.6 Análisis de datos de las secuencias de parásitos.....	18
4.6.1 Análisis de polimorfismos en el set de datos.....	18
4.6.2 Niveles de saturación de los marcadores.....	18
4.6.3 Test de Neutralidad.....	19
4.6.4 Modelo de evolución molecular.....	20
4.6.5 Análisis filogenéticos de los Nematoda.....	21

4.6.6	Análisis filogenéticos de los rivúlidos.....	24
4.6.7	Análisis de poblaciones.....	25
4.6.8	Análisis de demografía histórica.....	27
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Distribución de los parásitos.....	29
5.2	Análisis taxonómico de los Nematoda hallados en las muestras.....	30
5.3	Estadística descriptiva.....	33
5.4	Análisis de sistemática molecular.....	34
5.4.1	Análisis de secuencias.....	34
5.5	Análisis de datos de las secuencias de parásitos.....	35
5.5.1	Análisis de polimorfismos en el set de datos para ambas especies.....	35
5.5.2	Niveles de saturación de los marcadores.....	38
5.5.3	Análisis de polimorfismo a nivel de aminoácidos para cox-1.....	40
5.5.4	Análisis de distancias pareadas de los Nematoda.....	40
5.5.5	Análisis filogenéticos de los Nematoda.....	41
5.5.5.1	<i>Reconstrucción filogenética con métodos no basados en modelos de evolución molecular.....</i>	<i>41</i>
5.5.5.2	<i>Reconstrucción filogenética con métodos basados en modelos de evolución molecular.....</i>	<i>43</i>
5.5.6	Contrastación filogenética del complejo parásito-hospedador.....	47
5.5.7	Análisis de genética poblacional en las especies de parásitos.....	50
5.5.8	Análisis de demografía histórica.....	55
5.5.8.1	<i>Test de Neutralidad.....</i>	<i>55</i>
5.5.8.2	<i>Análisis de “Mismatch distribution”.....</i>	<i>55</i>
5.5.8.3	<i>Hipótesis de aislamiento por distancia.....</i>	<i>56</i>
6	DISCUSIÓN.....	58
6.1	Distribución del complejo parásito-hospedador.....	58
6.2	Análisis taxonómico de los Nematoda hallados en las muestras.....	58
6.3	Análisis de variabilidad a nivel molecular de los Nematodos.....	59
6.4	Divergencia genética de las especies de <i>Contracaecum</i>.....	60
6.5	Relaciones filogenéticas.....	61
6.6	Análisis de genética poblacional.....	62
6.7	Análisis de demografía histórica.....	64
6.8	Contrastación entre filogenias del complejo parásito-hospedador.....	64
7	CONCLUSIONES.....	66
8	PERSPECTIVAS.....	68
9	BIBLIOGRAFÍA.....	69
10	ANEXO.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de ADN <i>via</i> PCR.....	16
Tabla 2. Datos de infección por nematodos del género <i>Contracaecum</i> en peces del género <i>Austrolebias</i> y <i>Cynopoecilus</i> del Uruguay.....	33
Tabla 3. Distribución del número de namatodos del género <i>Contracaecum</i> en función del sexo de sus hospedadores (Rivulidae).....	34
Tabla 4. Distribución del número de namatodos del género <i>Contracaecum</i> en función del estadio de ontogenia de sus hospedadores (Rivulidae).....	34
Tabla 5. Detalle del nº de catálogo, las especies de parásitos, sus hospederos y sus respectivas localidades, así como los datos de secuencias obtenidos por muestra....	35
Tabla 6. Composición nucleotídica de las especies de <i>Contracaecum</i> de Uruguay según la posición del codón.....	36
Tabla 7. Variabilidad genética a nivel de ADN de los parásitos <i>Contracaecum</i> de rivúlidos de Uruguay. Se analizan ambas especies en conjunto y por separado para ambos marcadores.....	37
Tabla 8. Análisis de polimorfismo a nivel de aminoácidos para cox-1 en <i>Contracaecum sp.</i>	40
Tabla 9. Distancias pareadas corregidas medidas en % según el modelo de K ₂ P entre y dentro de los grupos de <i>Contracaecum</i> : Gp1, <i>C. sp. 1</i> ; Gp2, <i>C. sp. 2</i> y Gp3, especies de <i>Contracaecum</i> del GenBank.....	41
Tabla 10. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en <i>Contracaecum sp.</i> para ITS según las 3 hipótesis de agrupamiento planteadas. H1, 4 grupos: Lagunas Negra (LN), Merín (LM), Castillos (LC) y Cuenca del Océano Atlántico (COA); H2, 3 grupos: LN+LC, LM y COA; H3, 2 grupos: LC+LN y LM+COA. Únicamente los valores de Φ_{ST} fueron significativos.....	53
Tabla 11. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en <i>Contracaecum sp.</i> para cox-1 según las 3 hipótesis de agrupamiento planteadas. H1, 4 grupos: Lagunas Negra (LN), Merín (LM), Castillos (LC) y Cuenca del Océano Atlántico (COA); H2, 3 grupos: LN+LC, LM y COA; H3, 2 grupos: LC+LN y LM+COA. Únicamente los valores de Φ_{ST} fueron significativos.....	53

Tabla 12. Debajo de la diagonal valores de F_{ST} pareados entre las localidades de colecta de *Contracaecum sp.* con ITSs. En azul, por encima de la diagonal Número de migrantes por generación. En negrita los valores significativos.....54

Tabla 13. Debajo de la diagonal valores de F_{ST} pareados entre las localidades de colecta de *Contracaecum sp.* con cox-1. En azul, por encima de la diagonal Número de migrantes por generación. En negrita los valores significativos.....54

ANEXO

Tabla 1. Número de acceso del GenBank de las secuencias de nematodos utilizados en los análisis filogenéticos.....80

Tabla 2. Número de acceso del GenBank de las secuencias de cyt-b de rivúlidos utilizados en los análisis filogenéticos.....81

Tabla 3. Detalle de los haplotipos de *Contracaecum* de Uruguay.....82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a. Ciclo de vida de peces anuales; b. Charcos estacionales de rivúldos del Uruguay...	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Contracaecum</i> sp. en charcos estacionales de Uruguay.....	8
Figura 3. Mapa de Uruguay ubicando las zonas de colecta. Se indican especies hospedadoras y especie de <i>Contracaecum</i> obtenidas (círculo y triángulo), así como sus respectivas localidades en código de colores de acuerdo a la especie de hospedador.....	12
Figura 4. Especies de rivúldos de Uruguay donde se encontraron parásitos. a. <i>A. charrua</i> ; b. <i>A. wolterstorffi</i> ; c. <i>A. cheradophylus</i> ; d. <i>A. viarius</i> ; e. <i>A. reicherti</i> ; f. <i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	29
Figura 5. Anatomía de <i>Contracaecum</i> sp. 1. a. Anatomía externa de <i>Contracaecum</i> sp. 1 alojado en <i>Cynopoecilus melanotaenia</i> ; b. Extremo anterior. Escala 20µm; c. Extremo posterior. Escala 20µm; d. Región anterior del cuerpo. Escala 100µm. Referencias: a, ano; an, anillo nervioso; av, apéndice ventricular; ce, cutícula estriada; ci, ciego intestinal; dl, diente larval; e, esófago; ga, glándulas anexas; la, labio; mu, mucrón; ve, ventrículo.....	31
Figura 6. Anatomía de <i>Contracaecum</i> sp. 2. a. Extremo anterior. Escala 50µm; b. Extremo posterior. Escala 100µm; c. Región anterior del cuerpo. Escala 100µm. Referencias: an, ano; av, apéndice ventricular; ce, cutícula estriada; ci, ciego intestinal; dl, diente larval; es, esófago; la, labio; mu, mucrón; pe, poro excretor; ve, ventrículo.....	32
Figura 7. a. Observación macroscópica de <i>Contracaecum</i> sp. 1 en hígado de <i>A. charrúa</i> ; b. Diferenciación de tamaños de larvas de <i>Contracaecum</i> sp. 1 a la derecha y <i>Contracaecum</i> sp. 2 a la izquierda. Escala: 500µm.....	33
Figura 8. Análisis de saturación de los genes ITSs y cox-1 en <i>Contracaecum</i> . Se muestran gráficos de saturación de la distancia según el modelo K ₂ P de las transiciones (ts) y las transversiones (tv), en función en de las distancias no corregidas (distancia-p). En las últimas 2 gráficas se detalla saturación discriminando entre las dos primeras posiciones del codón y la tercera con el gen cox-1.....	39
Figura 9. Árbol filogenético consenso obtenido entre 100 árboles más parsimoniosos de 1175 pasos, a partir de secuencias de ITS ₁ e ITS ₂ de nematodos parásitos. Correspondencia de los grupos: Gp1, C. sp. 1; Gp2, C. sp. 2 y Gp3, especies de <i>Contracaecum</i> del GenBank.	41
Figura 10. Árbol filogenético consenso obtenido entre 100 árboles más parsimoniosos de 895 pasos, a partir de secuencias de cox-1 de nematodos parásitos. Correspondencia de los grupos: Gp1, C. sp. 1; Gp2, C. sp. 2 y Gp3, especies de <i>Contracaecum</i> del GenBank.....	42
Figura 11. Árbol filogenético obtenido con el método de Neighbour joining (NJ) a partir de secuencias de ITS ₁ e ITS ₂ de nematodos parásitos.....	43

Figura 12. Árbol filogenético obtenido con el método de Neighbour joining (NJ) a partir de secuencias de cox-1 de nematodos parásitos.....	44
Figura 13. Árbol filogenético obtenido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) utilizando el modelo de evolución HKY85, a partir de secuencias ITS ₁ e ITS ₂ de nematodos parásitos.....	45
Figura 14. Árbol filogenético obtenido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) utilizando el modelo de evolución GTR+G, a partir de secuencias de cox-1 de nematodos parásitos.....	45
Figura 15. Reconstrucción filogenética a partir de Inferencia Bayesiana utilizando el modelo de evolución HKY85, a partir de secuencias ITS ₁ e ITS ₂ de nematodos parásitos.....	46
Figura 16. Reconstrucción filogenética a partir de Inferencia Bayesiana utilizando el modelo de evolución GTR+G a partir de secuencias de cox-1 de nematodos parásitos. Se muestran tiempos de divergencia obtenidos en el BEAST en una escala de tiempos geológicos.....	47
Figura 17. Contratación de filogenias del complejo parásito-hospedador. A la derecha, árbol invertido de los parásitos con cox-1; a la izquierda, árbol de rivúlidos con cyt-b. Ambas reconstrucciones se obtuvieron con el método de Inferencia Bayesiana en el BEAST v1.6.1. Se resalta con celeste a <i>C. sp. 2</i> y con rosado a <i>C. sp. 1</i> . Las flechas señalan las especies de rivúlidos parasitadas por cada una de estas especies.....	49
Figura 18. Red de haplotipos de <i>Contracaecum</i> de Uruguay con ITSs. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos y su color indica las localidades de colecta. Cada línea entre los haplotipos corresponde a un único paso mutacional, en caso contrario se indica con un número. Los especímenes que integran cada haplotipo se detallan en la Tabla 3 del anexo.....	51
Figura 19. Red de haplotipos de <i>Contracaecum</i> de Uruguay con cox-1. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos y su color indica las localidades de colecta. Cada línea entre los haplotipos corresponde a un único paso mutacional, en caso contrario se indica con un número. Los nodos rojos representan haplotipos alternativos. Los especímenes que integran cada haplotipo se detallan en la Tabla 3 del anexo.....	52
Figura 20. Distribución de diferencias pareadas para <i>Contracaecum sp.</i> Las líneas continuas representan la distribución esperada bajo un modelo nulo de expansión poblacional, mientras que las punteadas los valores observados.....	56
Figura 21. Gráficas de relación entre las distancias genéticas (según el estadístico F_{ST}) y las distancias geográficas (medidas en Km) en <i>Contracaecum sp.</i> a. utilizando el gen nuclear ribosomal (ITS ₁ -ITS ₂); Mantel test: $r = 0.091$, $g = 0.611$. b. con el gen mitocondrial (cox-1); Mantel test: $r = 0.083$, $g = 0.489$	57

RESUMEN

Uno de los tipos de co-evolución más estudiados es el vínculo parásito-hospedador. Las asociaciones parásito-hospedador pueden ser explicadas por una interacción histórica entre adecuación ecológica, oscilación y pulsos taxonómicos. Los mayores episodios de cambios ambientales parecen ser el principal motor tanto para la persistencia como para la diversificación de los sistemas hospederos-parásitos, creando oportunidades para el cambio de hospedador durante períodos de expansión geográfica y permitiendo co-evolución y co-especiación en períodos de aislamiento geográfico. En los últimos años se ha destacado la importancia de la biología molecular en la determinación de especies parásitas, principalmente de aquellas de importancia en la salud humana. Los peces de varias especies de rivúlidos, principalmente especies del género *Austrolebias* y *Cynopoecilus melanotaenia* constituyen hospedadores intermediarios para los estadios larvales (L3) de nematodos parásitos pertenecientes al género *Contracaecum*. El objetivo del presente trabajo es determinar los patrones de diferenciación de este complejo parásito-hospedador del litoral Este. La distribución de *Contracaecum* parece estar restringida a las especies de rivúlidos del Este de Uruguay, dado que no se registraron rivúlidos parasitados en el Oeste y Noreste del país. Mediante la realización de análisis filogenéticos utilizando marcadores moleculares nucleares (regiones de espaciadores internos de los genes ribosomales, ITS₁ e ITS₂) y secuencias mitocondriales (citocromo oxidasa 1), se determinó la existencia de 2 linajes genéticos distintos de *Contracaecum* que constituyen 2 grupos monofiléticos bien soportados. Al incorporar secuencias de otras especies del mismo género y nematodos cercanamente emparentados del GenBank el género *Contracaecum* se muestra parafilético. Con el marcador ITSs se observa que *C. sp. 1* se encuentra más emparentado con otras especies del mismo género que con sus congéneras de Uruguay (*C. sp. 2*). Uno de los linajes más frecuentemente encontrado parasita diferentes especies simpátricas y sintópicas de rivúlidos. Sin embargo el linaje más divergente de *Contracaecum* se ha encontrado en cierta población de *A. charrua* y *A. viarius* en el Dpto. de Rocha y en otra especie altamente reaccionada, *A. reicherti*, del Dpto. de Treinta y Tres. Los análisis poblacionales con ITSs muestran poblaciones bien

estructuradas y aisladas entre sí, mientras que los análisis con cox-1 muestran ciertos niveles de flujo génico retrospectivo entre algunas de las poblaciones de ambas especies. Es posible la existencia de co-evolución en la medida en que la filogenia de los parásitos y de las especies de hospederos parecen ser concordantes evidenciando que las especies de parásitos se diversifican al mismo tiempo que los hipotéticos ancestros de los complejos de hospedadores durante el Plioceno.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

1.1.1 Co-evolución en complejo parásito-hospedador

El término “Co-evolución” hace referencia a la evolución recíproca entre especies que interactúan a través de dos posibles mecanismos: la co-especiación, lo cual implica procesos de macroevolución ligados a la diversificación en linajes asociados de parásitos-hospedador y la co-adaptación, referida a procesos de microevolución ejemplificados por los fenómenos de “carrera armamentista” y adaptación recíproca (Hoberg y Brooks, 2008). La co-evolución también podría implicar la evolución de polimorfismos y selección direccional, así como patrones en la filogenia además de la evolución de la especificidad por el hospedador o de la especialización por la presa (Thompson, 1994).

Uno de los tipos de co-evolución más estudiados es el vínculo parásito-hospedador. Las asociaciones parásito-hospedador pueden ser explicadas por una interacción histórica entre adecuación ecológica, oscilación y pulsos taxonómicos. Los mayores episodios de cambios ambientales parecen ser el principal motor tanto para la persistencia como para la diversificación de los sistemas hospederos-parásitos, creando oportunidades para el cambio de hospedador durante períodos de expansión geográfica y permitiendo co-evolución y co-especiación en períodos de aislamiento geográfico (Hoberg y Brooks, 2008).

Parásitos con un ciclo de vida indirecto pueden ser rastreados en forma predecible a través de diferentes niveles tróficos, dado que su ciclo depende de la estructura de las cadenas alimenticias, y por ello los cambios de hospedador están más restringidos. En cambio en parásitos con ciclo de vida directo, el cambio de hospedador es función de la estructura ecológica, la oportunidad y la proximidad (Hoberg y Brooks, 2008).

La asociación parásito-hospedador posibilita a su vez por ejemplo, utilizar a los parásitos para inferir las filogenias de sus hospedadores (Rohde, 1982). La evolución “tardía” de los parásitos, dada por su simple estructura morfológica, hace que éstos no tengan cambios evolutivos tan importantes como los de sus hospedadores. Esto

implica que parásitos emparentados tienen mayor similitud que sus hospedadores emparentados, lo que facilita el trazado de la filogenia de estos últimos.

Por otra parte, los parásitos pueden variar entre hospedadores de diferentes áreas geográficas, lo que permite distinguir poblaciones de hospedadores. Parásitos terrestres, dulceacuícolas y ectocomensales han sido utilizados para localizar el lugar de origen y la dispersión de sus hospedadores, y para proponer hipótesis biogeográficas (Rohde, 1982). Un ejemplo de esto último lo constituye el estudio de las rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de la Región Neotropical. Debido a sus adaptaciones, se pensó por mucho tiempo que su antecesor habría migrado desde el Océano Atlántico al Amazonas durante la ingresión marina del Plioceno. Sin embargo, a partir de un cladograma basado en las relaciones filogenéticas de los helmintos parásitos de Potamotrygonidae, se llegó a la conclusión de que el grupo se originó a partir de una invasión marina desde el Océano Pacífico asociada a la orogenia Andina en el Mioceno medio (Brooks et al. 1981; Brooks y McLennan, 1991).

Un segundo ejemplo es el difundido uso de los parásitos como “marcadores biológicos” de stocks de peces por parte de las industrias pesqueras, un uso posible dada la alta especificidad de las interacciones con sus hospedadores. Se utilizan principalmente en especies que presentan alto valor comercial como por ejemplo, la merluza (*Merluccius merluccius*), el jurel (*Trachurus trachurus*), el pez espada (*Xiphias gladius*) (Mattiucci, 2006) y el salmón (*Salmo salar*) (Kuusela et al. 2009).

1.1.2 Estudios moleculares en complejos de parásitos-hospedadores

En las últimas décadas la sistemática molecular ha utilizado diferentes tipos de marcadores de ADN permitiendo incrementar la eficacia en la determinación de especies crípticas de parásitos a través de la construcción de filogenias de los parásitos y su contrastación con aquella de las especies hospedadoras (Klimpel et al. 2007).

Estos estudios han incluido marcadores tales como secuencias de genes mitocondriales así como las regiones espaciadoras transcritas internas (ITSs) de los genes ribosomales (D’Amelio et al. 2012; Nadler y Hudspeth, 2000; Nadler et al. 2005).

Los genes nucleares utilizados en estudios filogeográficos suelen tener algunas limitaciones: dificultad para aislar los haplotipos de ADN, elegir una región genómica

que acumule cambios de forma rápida, el gran tiempo de coalescencia existente entre las secuencias y el potencial de evolución reticulada debido a la recombinación intragénica (Presa et al. 2002). En particular, los marcadores nucleares del tipo de los espaciadores internos transcritos de los genes ribosomales (ITS₁ e ITS₂), son familias repetidas en tándem, cuya variación dentro de las especies y las poblaciones tiende a homogeneizarse por mecanismos de crossing-over desigual y conversión génica, mientras que su divergencia se maximiza entre ellas. Los genes ADN_r recombinan y son biparentales, por lo que pueden relevar flujo génico reciente y eventos de hibridación. Estos marcadores han sido usados en estudios filogenéticos de especies cercanamente emparentadas, principalmente enfocados en resolver relaciones interespecíficas dentro de un mismo género (Presa et al. 2002).

Los marcadores nucleares del tipo de los espaciadores internos transcritos de los genes ribosomales (ITS₁ e ITS₂) han permitido la discriminación de filogenias y especies crípticas, dado que en comparación con otros genes nucleares, dichas regiones están sujetas a cambios moderados y rápidos de evolución molecular.

También han sido utilizadas para diferenciar entre especies de nematodos cercanamente emparentadas, entre ellos nematodos del género *Contracaecum* (Hasan et al. 2008; Klimpel et al. 2007).

Por otro lado, los genomas mitocondriales presentan herencia matrilineal (punto de crítica de los mismos, dado que representan solo una perspectiva en la historia evolutiva de las especies de reproducción sexuada), están exentos de eventos de recombinación y muestran tasas de evolución 10 veces mayor a la de los genomas nucleares (Awise, 1991, 2004). Esto se podría explicar porque el ADN_{mt} no está asociado a proteínas tipo histonas como el ADN_n, por lo que está expuesto a la acción de los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo. Además, los sistemas genéticos de reparación del ADN_{mt} son menos eficientes que los nucleares. La herencia uniparental y haploide de estos genomas (ADN_{mt}) resulta en una reducción del tamaño efectivo poblacional, potenciando el efecto de la deriva génica y de la diferenciación genética en poblaciones y filogenias aislados por cierto tiempo (Awise, 1991). Los estudios de ADN_{mt} muestran señales de eventos genómicos tales como flujo génico, migración, eventos de cuellos de botella, especiación, hibridación, entre

otros, por lo que es muy útil para dilucidar eventos genéticos históricos (Hasan et al. 2008).

Los estudios filogeográficos en base a este tipo de marcadores han permitido comprender además patrones de diferenciación de los parásitos en relación a aquellos de las especies hospederas. De hecho la filogeografía (Avice, 1991, 2004) consiste en el análisis de la distribución espacial de los linajes génicos para reconstruir la historia evolutiva y demográfica de una determinada especie, caracterizando su variabilidad genética dentro de una o más poblaciones. En base a la información contenida en las moléculas de ADN, se pueden explorar preguntas y problemas en ecología y evolución, e interpretar la extensión y el modo en que los procesos demográficos históricos han dejado marcas evolutivas en la distribución geográfica actual de los caracteres moleculares tanto en los parásitos como en las especies hospedadoras.

1.2 Antecedentes específicos

1.2.1 Características de los rivúlidos como especies hospedadoras

Las especies de peces anuales pertenecientes a la Familia Rivulidae habitan en charcos estacionales, donde cada generación completa su desarrollo en aproximadamente cinco meses (Fig. 1), dependiendo de las condiciones ambientales (Wourms, 1967). En los meses desde mayo- octubre (temporada de lluvias) los adultos desovan en aguas temporales huevos muy resistentes, que pueden sobrevivir enterrados en el sustrato durante períodos prolongados de sequía (octubre-marzo) bajo condiciones adversas en un estado de latencia que incluye por lo menos de 1 a 3 diapausas. En dicho estado los embriones detienen su desarrollo y disminuyen su actividad metabólica, permaneciendo así hasta la próxima temporada de lluvias. En este período se produce la eclosión del embrión tras recibir estímulos como la rehidratación y ciertas temperaturas y aparecen los alevines que comenzarán un nuevo ciclo (Lopes et al. 2004; Wourms, 1967, 1972). Las adaptaciones para la supervivencia en estos ambientes extremos incluyen un elaborado comportamiento de cortejo que culmina en la deposición de huevos resistentes a la sequía y la existencia de un fenómeno único en los vertebrados consistente en un desarrollo embrionario con estados de diapausa (Wourms, 1967). Estas características lo hacen un modelo excelente para estudios de especiación, hipótesis biogeográficas, evolución y en especial de co-

evolución. Como consecuencia de lo anterior, se cuenta con abundantes estudios filogenéticos con datos morfológicos, análisis cromosómicos, filogenias moleculares y estudios filogeográficos en estos taxa (Amato, 1986; Costa, 2006; García et al. 1993, 2000, 2001, 2002, 2009 y García, 2006; Loureiro and De Sá 1996; Loureiro et al. 2011; Vaz-Ferreira y Sierra 1973).

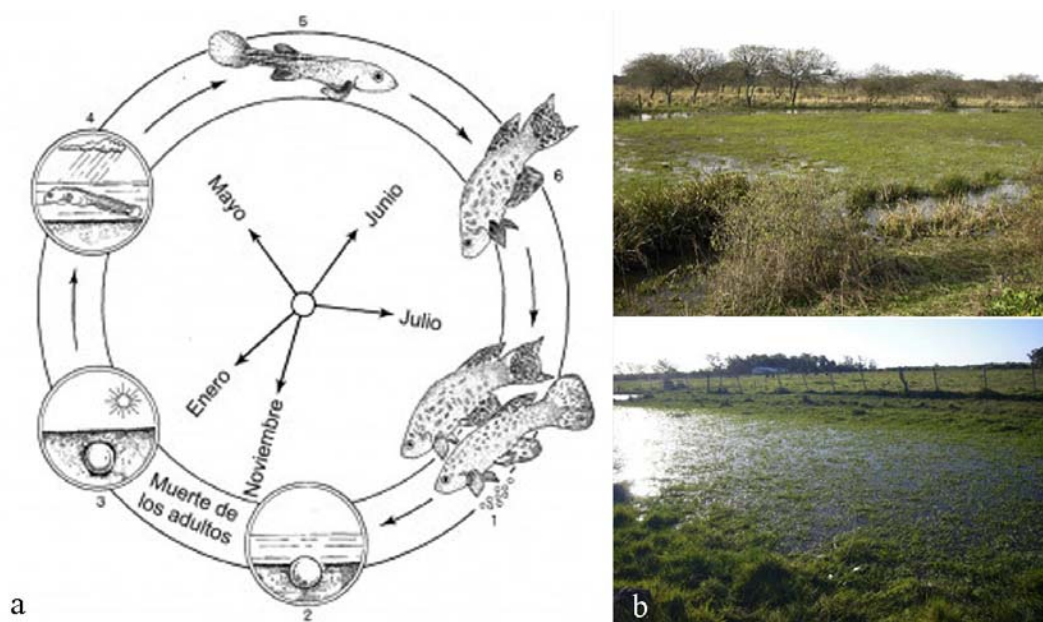


Figura 1. a. Ciclo de vida de peces anuales; **b.** Charcos estacionales de rivúldos del Uruguay.

Si bien la taxonomía de *Austrolebias* ha sido muy controvertida a nivel genérico dado que diferentes autores proponen distintos agrupamientos, análisis filogenéticos más recientes basados en morfología (Costa, 2006) y secuencias de ADN (García et al. 2002) han sido congruentes en la integración de los clados conformando complejos de especies dentro del género. En el análisis cladístico basado en caracteres morfológicos, su taxonomía y biogeografía, Costa (2006) considera que las especies de *Austrolebias* conforman un grupo monofilético. El análisis filogenético (García et al. 2002) con genes mitocondriales (citocromo b y genes ribosomales 12S y 16S) también apoya la monofilia de *Austrolebias* y además arroja los mismos complejos de especies, con buen soporte estadístico, que Costa (2006). Esto es confirmado además por datos cromosómicos (García et al. 2001, García 2006). Sin embargo en ninguno de los dos trabajos se encontró apoyo estadísticamente significativo en los nodos basales para las

relaciones entre los complejos de especies lo cual ha llevado a sostener la hipótesis de especiación explosiva y múltiple en algunos complejos dentro de este género (García, 2006). Utilizando el reloj molecular se propuso que la diferenciación de linajes en *Austrolebias* se produjo en diferentes pulsos de cladogénesis. El evento más reciente se estima sucedió hace aproximadamente 1-3 Ma, en el Plioceno-Pleistoceno tardío y los eventos cladogenéticos más basales hace 5-7 Ma, desde el Mioceno. Sin embargo, esta calibración puede ser incierta debido a la falta de registros fósiles en este grupo (García et al. 2002). Dado que en la región costera Atlántica de “Bañados del Este” se ha producido una mayor diversificación de clados se ha propuesto que en la misma ha ocurrido un “hot-spot” de especiación para el género *Austrolebias* (García et al. 2002).

1.2.2 Nematodos parásitos en rivúlidos

Los nematodos representan uno de los grupos más diversos de parásitos. El Phylum tiene aproximadamente 256 familias y más de 40.000 especies, convirtiéndolo en uno de los grupos más diversos de invertebrados (Klimpel et al. 2007). Dentro de este Phylum, la superfamilia Ascaridoidea contiene 52 géneros cuyas especies parasitan principalmente el tracto digestivo de vertebrados. Muchas de estas especies son de gran importancia médica y veterinaria, así como también significativas desde el punto de vista económico (Mattiucci y Nascetti, 2008). Un ejemplo de esto lo constituyen los nematodos parásitos pertenecientes a la Familia Anisakidae, que son de gran importancia para el hombre por causar enfermedades zoonóticas conocidas comúnmente como “Anisakidosis”, las cuales se adquieren por el consumo de pescado crudo o muy poco cocido (Mattiucci et al. 2011). Los géneros más importantes en estas infecciones son *Anisakis* y *Pseudoterranova*, pero *Contracaecum* también presenta algunas especies con potencial infeccioso (Mattiucci y Nascetti, 2008; Pardo et al. 2007). Dado que los estadios infectivos de estos parásitos en el hombre son las larvas, se destaca la importancia del uso de la biología molecular para la identificación de las especies en estos estadios, que no es posible únicamente con el estudio morfológico clásico (Mattiucci y Nascetti, 2008). Según las claves sistemáticas de Hartwich (1974), la identificación de las especies pertenecientes a la Familia Anisakidae se basa principalmente en los caracteres morfológicos referentes al sistema excretor, al tracto digestivo y caracteres sexuales que solo se pueden determinar en individuos adultos,

como ser el número y distribución de papilas caudales del macho o la posición de la vulva en las hembras. Estos caracteres de importancia taxonómica tan restringidos, provocan que la determinación a nivel específico sea muy compleja. Al incorporar técnicas moleculares, se ha podido demostrar que las características estructurales aportadas por las claves taxonómicas no son del todo confiables en la identificación de especies (Mattiucci y Nascetti, 2008). A partir del uso de marcadores moleculares se incrementó el número de especies de anisákidos y se determinaron especies gemelas (“sibling species”) muy similares morfológicamente pero que desde el punto de vista del concepto biológico de especie constituyen especies distintas dado que se encuentran aisladas reproductivamente.

1.2.3 Ciclo de vida de *Contracaecum*

Los peces de varias especies del género *Austrolebias* y *Cynopoecilus melanotaenia* constituyen hospedadores intermediarios para nematodos parásitos pertenecientes al género *Contracaecum*, ya que revisando ejemplares de peces pertenecientes a la Colección de la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias, se encontraron larvas L3 de este género principalmente en hígado y cavidad abdominal de los individuos analizados. Las larvas L1 y L2 de especies de este último género de parásitos han sido reportadas en una gran variedad de invertebrados como por ejemplo gasterópodos, cefalópodos, poliquetos, copépodos, decápodos, equinodermos y quetognatos (Anderson, 2000). En particular, gasterópodos, copépodos y otros invertebrados cohabitan las mismas masas de aguas temporales y son parte de la dieta de peces del género *Austrolebias* y *C. melanotaenia*.

Los hospedadores definitivos de las especies del género *Contracaecum* son aves piscívoras y mamíferos asociados al agua dulce, salobre y marina (Mattiucci y Nascetti, 2008). Los parásitos habitan el estómago y consumen la comida ingerida por sus hospedadores (Amato et al. 2006). Cuando no se alimentan se adhieren a las paredes del estómago de estos. Los huevos no embrionados, redondos u ovalados, de cáscara delgada son depositados por las hembras en el estómago y salen con las heces del hospedador definitivo. En el agua, el embrión comienza su desarrollo hacia el primer estadio larval (L1) dentro del huevo. La larva muda hacia su segundo estadio larval (L2), la cual presenta un diente cuticular ventral a la abertura oral, un ventrículo y un

delicado apéndice ventricular. En este estadio se retiene la cutícula de la L1, formando una vaina. La larva eclosiona con la ayuda del diente larval en el agua y es ingerida por hospedadores invertebrados, especialmente copépodos, penetran al hemocèle donde crecen mucho o poco, dependiendo de las especies. Peces, predadores de invertebrados constituyen un segundo hospedador intermediario de *Contracaecum*, en éstos las larvas penetran la barrera digestiva hasta llegar a la cavidad visceral donde alcanzan su tercer estadio (L3) que crece sustancialmente. La larva puede pasar de un pez (hospedador intermediario) a otro por predación y reinvasión de tejidos en el nuevo hospedador (Anderson, 2000). Finalmente estos peces son ingeridos por el hospedador definitivo donde las larvas mudan 2 veces hasta alcanzar la etapa adulta (Fig. 2).

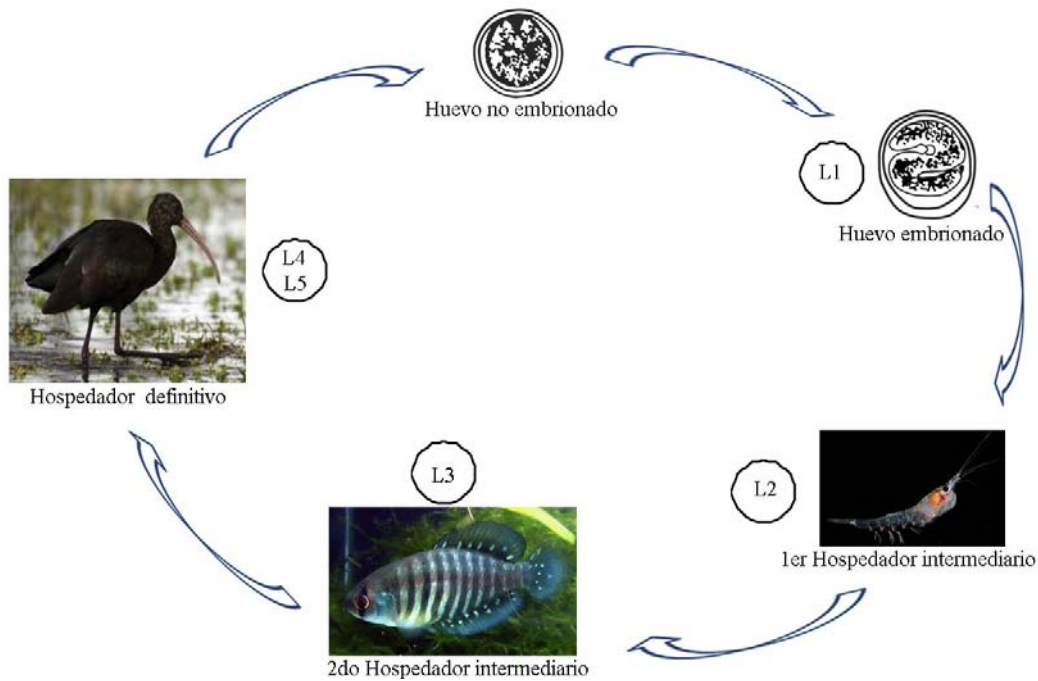


Figura 2. Ciclo de vida de *Contracaecum sp.* en charcos estacionales de Uruguay.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. Mediante abordajes filogeográficos que involucran al complejo parásito-hospedador *Contracaecum* vs. especies de Rivulidae de la región costera Atlántica en Uruguay, se pretende acceder a los patrones de diferenciación de los linajes de parásitos para evaluar la hipótesis evolutiva propuesta por Hoberg y Brooks (2008).
2. Se pondrá a prueba si los procesos de cladogénesis y diferenciación de los linajes o especies de *Contracaecum* hallados son congruentes con aquellos descritos para el género *Austrolebias*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar los patrones de diferenciación de parásitos nematodos del género *Contracaecum* vs. especies de peces anuales del género *Austrolebias* y *Cynopoecilus melanotaenia* como hospedadores intermediarios.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia, distribución, prevalencia e intensidad de parásitos del género *Contracaecum* en especies de rivúlidos del litoral Oeste, Este y Noreste de Uruguay.
2. Determinar la presencia de distintos tipos linajes y/o especies de *Contracaecum* mediante el uso de marcadores moleculares nucleares y mitocondriales.
3. Realizar análisis filogeográficos en base a marcadores moleculares para determinar formas de diferenciación de los linajes de parásitos respecto al de sus hospedadores.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia de muestreo

Los ejemplares de *Austrolebias* sp. y *Cynopoecilus melanotaenia* utilizados en este trabajo se obtuvieron a partir del muestreo realizado en 3 campañas de recolección durante la estación de lluvias, momento en que los charcos están desarrollados (junio-setiembre), en los años 2010 al 2012. Dichos muestreos se realizaron en charcos correspondientes al litoral Este, en los Departamentos de Rocha y Treinta y Tres (Fig. 3). El método de captura utilizando fueron calderines de tamaño mediano. El esfuerzo de muestreo fue más exhaustivo en la región Este de Uruguay dado que se ha evidenciado la existencia de un “hot-spot” de especiación para el género *Austrolebias* en dicha región. También se examinaron peces provenientes del Norte (Bella Unión y Salto), Noreste y Centro de Uruguay (Durazno, Sarandí del Yi, Tacuarembó y Cerro Largo) que fueron donados por integrantes de otros grupos de investigación de la Facultad de Ciencias que trabajan con peces anuales. Se incluyeron además ejemplares depositados en la Colección de la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias.

Los ejemplares colectados fueron trasladados hasta la Facultad en bidones con agua de los charcos, con el fin de minimizar el estrés causado. Una vez en Facultad, los peces fueron colocados en peceras en el Laboratorio de acuarios de FC hasta sacrificarlos.

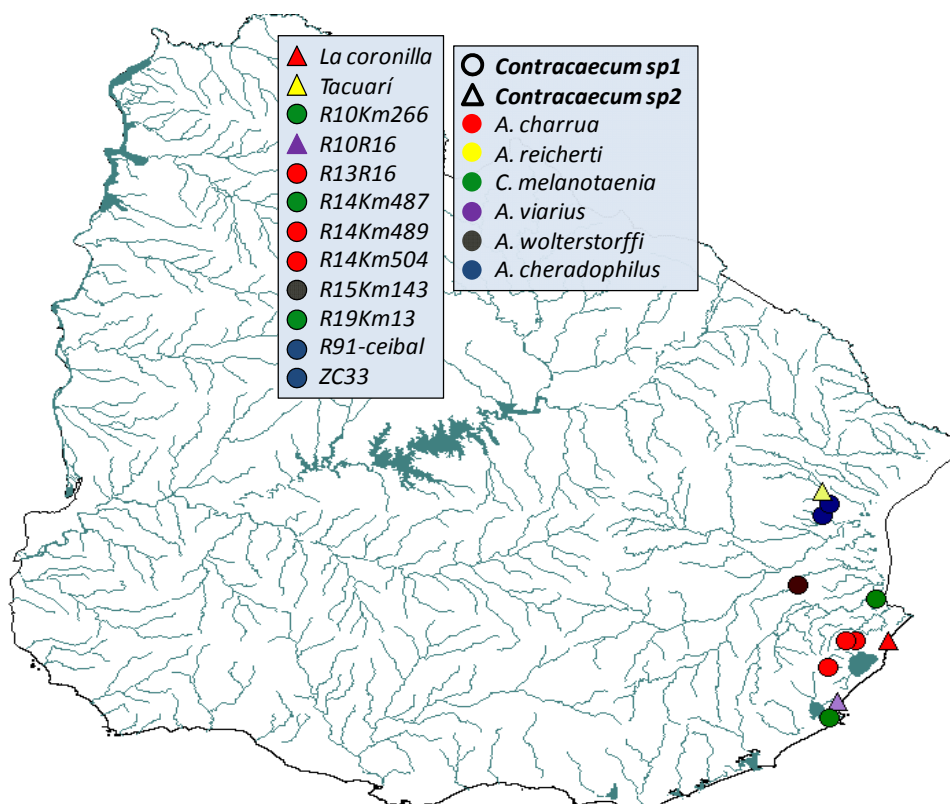


Figura 3. Mapa de Uruguay ubicando las zonas de colecta. Se indican especies hospedadoras y especie de *Contracaecum* obtenidas (círculo y triángulo), así como sus respectivas localidades en código de colores de acuerdo a la especie de hospedador

4.2 Procesamiento y fijación de los ejemplares

El procesamiento de los peces se basó en el protocolo de experimentación N° 241000-001186-12 aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA). Los ejemplares fueron anestesiados con 2-fenoxietanol al 3% (Ross y Ross, 2008) y fijados en ETOH 95%. Luego fueron disecados con el fin de extraer los parásitos vivos. Para cada espécimen de parásito, se seccionaron las partes anterior y posterior del cuerpo, las cuales se fijaron y aclararon en lactofenol siguiendo la metodología estándar (Langeron, 1913) para análisis morfológicos. La parte restante se fijó en ETOH 70% para estudios genéticos.

Los ejemplares de rivúlidos obtenidos se determinaron taxonómicamente, se sexaron y se le tomaron muestras de tejidos (músculo e hígado) para análisis moleculares. Posteriormente fueron ingresados a la Colección de la Sección Genética Evolutiva.

4.3 Análisis taxonómico de los Nematoda hallados en las muestras

Para la determinación taxonómica de los nematodos se utilizaron las siguientes claves a nivel de género y de especie: Hartwich (1974), Masi Pallares et al. (1990), Moravec (1998), Vicente et al. (1985), Vicente y Magalhães Pinto (1999) y Yamaguti (1961).

Los especímenes fueron lavados con agua y aclarados con lactofenol con el fin poder visualizar estructuras internas. Se hicieron montajes *in toto* y de cabezas y colas; en este último caso la sección media del cuerpo fue utilizada para extracción de ADN con el objetivo de tener una correlación entre morfología y secuencias. Los especímenes *in toto* fueron fotografiados y dibujados con cámara clara en un microscopio Olympus BX-50. Las medidas se tomaron al microscopio con ayuda de la cámara clara y se indican en μm .

4.4 Estadística descriptiva

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con la información existente en el catálogo de la Colección de Genética Evolutiva, con el fin de utilizar una mayor cantidad de datos. Los descriptores estadísticos utilizados para estudiar la relación parásito-hospedador fueron:

Prevalencia: número de hospedadores infectados con uno o más individuos de una especie (o grupo taxonómico determinado) de parásitos, dividido el número de hospedadores examinados para dicha especie de parásito (Bush et al. 1997);

Intensidad de Infección: número de individuos de una especie o categoría taxonómica de un parásito dado (*Contracaecum*, en este caso) presentes en un hospedador en particular (especies de rivúlidos) (Bush et al. 1997);

Intensidad media: intensidad promedio de una especie o grupo taxonómico de parásito, en función de todos los miembros infectados de la especie de hospedador. Por tanto, es el número total de parásitos encontrados en una muestra dividido el número de hospedadores infectados con dicho parásito (Bush et al. 1997).

4.5 Análisis de sistemática molecular

4.5.1 Extracción de ADN genómico de los nematodos

Para la extracción de ADN genómico de las especies parásitas se utilizó el protocolo de Holmes-Bonner (1973) utilizado en Pontes et al. (2005). Para dicha extracción se utilizaron nematodos enteros (en el caso de los parásitos muy pequeños de menos de 1 cm) y la parte media del nematodo (en los individuos más grandes). Las larvas fueron pasadas de ETOH 70% a un mortero donde se congelaron y descongelaron repetidas veces (4 o 5) con Nitrógeno líquido. Posteriormente la larva se introdujo en un eppendorf (previamente rotulado) 1.5mL y se pulverizó utilizando un embolo. A dicho eppendorf se le agregó 100µl de solución Holmes-Bonner (7M Urea, 100mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 350mM NaCl, 2% SDS) moliendo hasta la completa homogenización. Se le agregó 100µL de alcohol fenol-cloroformo isoamílico (50: 49: 1) y se agitó manualmente por 10min. Luego se centrifugó por 10min a 13000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un nuevo eppendorf 1.5mL. Se le agregó 100µl de cloroformo, se centrifugó nuevamente por 5min a 13000rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo eppendorf 1.5mL. Esto último se repitió una vez más y al nuevo eppendorf 1.5mL se le agregó 200µl de isopropanol y se lo dejó a -20°C durante 2 días. Pasado ese tiempo se centrifugó por 20min a 13000rpm y se descartó el sobrenadante. Se agregó 200µL de etanol 70% y se centrifugó por 5min a 6000rpm. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar colocando el eppendorf 1.5mL en estufa a 55°C. Finalmente el pellet fue resuspendido en 95µL de TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8) más 5µL de RNasa A (10mg/mL) y guardado en freezer a -20°C.

4.5.2 Extracción de ADN genómico de los rivúlidos.

En el caso de las especies hospederas, se realizaron las extracciones a partir del hígado utilizando el protocolo de Medrano et al. (1990) con la puesta a punto realizada en el laboratorio de Genética Evolutiva (García et al. 2002, García 2006). El mismo consistió en una extracción sin fenol cloroformo como se detalla a continuación: se lavó 20mg de tejido 2 veces con 1mL de buffer STE 1X pH 8 frío (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8 y 100mM NaCl). Luego de sacar el buffer, se homogeneizó el tejido con un émbolo y se le agregó 550µL de buffer de lisis pH 8 (50mM Tris-HCl pH 8, 50mM EDTA pH 8, 1% SDS, 100mM NaCl) y 11µL de Proteinasa K (10mg/mL). Se terminó de

homogeneizar completamente el tejido y se dejó incubando toda la noche en una estufa a 55°C. Antes de finalizar la incubación se agregó 6µL de RNAsa A (10mg/mL) y se incubó 2 horas en la estufa a 55°C. Transcurrido dicho tiempo se centrifugó 10min a 12000rpm, se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf de 1.5mL y se le agregó 350µL de NaCl 5M. Se centrifugó nuevamente 30min a 12000rpm a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se le agregó el doble de volumen de ETOH absoluto frío. El tubo se agitó lentamente para que la interfase con el ETOH se mezclara paulatinamente y se pudiera visualizar el precipitado de ADN. Se dejó precipitar por 72 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó por 30min a 12000rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet resultante 2 veces con 1mL de ETOH 70%, centrifugando 5min a 6000rpm descartando el sobrenadante en cada lavado. El pellet se secó en una estufa a 55°C y se resuspendió posteriormente en 50µL de buffer TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8). Finalmente se incubaron las muestras en un baño a 65°C por 20min y se guardaron en freezer a -20°C.

4.5.3 Amplificación del ADNr de nematodos

La amplificación *in vitro* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de una región de 1105 pb de ADN nuclear, incluyendo los espaciadores transcritos internos ribosomales (ITS₁ e ITS₂) y la subunidad 5.8S, se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos universales detallados en la Tabla 1. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 20µL por tubo, conteniendo 10µL de kit Pyrostart Fast PCR Master Mix (2X) (Fermentas), 0.5µM de cada oligonucleótido y 4ng/µL de ADN molde. Las condiciones de PCR empleadas fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 1min., seguidos de 34 ciclos de: 95°C por 1seg. (desnaturalización), 55°C por 7seg. (pegado “annealing”) y 72°C por 32seg. (extensión); culminando con una extensión final de 72°C durante 10min.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de ADN *vía* PCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Cita	Gen
#93	5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3'	Nadler et al. 2005	ITS ₁ e ITS ₂ ; 5.8S
#94	5'-TTAGTTTCTTTCTCCGCT-3'		
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al. 1994	Cox-1
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'		
CB3-H	5'-GGCAAATAGGAARTATCATTC-3'	Palumbi et al. 1991	Cyt-b
Gludg-L	5'-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG-3'		

4.5.4 Amplificación del ADNmt de nematodos

Un fragmento de aproximadamente 644 pb del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa 1 (cox-1) fue amplificado *vía* PCR utilizando oligonucleótidos ADN específicos (Tabla 1). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 20µL por tubo, con las siguientes concentraciones finales: 1X Buffer de enzima, 2.0mM de MgCl₂, 0.014% BSA (1%), 0.2mM de dNTPs, 0.5U de enzima Taq Polimerasa de ADN (Invitrogen), 0.25µM de cada oligonucleótido y 4ng/µL de ADN molde. Las condiciones de PCR empleadas fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3min., seguidos de 4 ciclos de: 94°C por 1min. (desnaturalización), 42°C por 1min. (pegado “annealing”) y 72°C por 1min. (extensión); seguidos de 29 ciclos de: 94°C por 1min. (desnaturalización), 50°C por 1min. (pegado “annealing”) y 72°C por 1min. (extensión), culminando con una extensión final de 72°C durante 7min.

4.5.5 Amplificación del ADNmt de hospedadores

Para la amplificación de un segmento de 900 pb del gen mitocondrial citocromo b (cyt-b) se utilizaron oligonucleótidos universales (Tabla 1). La mix de PCR final consistió en 20µL por tubo, con las siguientes concentraciones finales: 1X Buffer de enzima, 1.5mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 0.5U de enzima Taq Polimerasa de ADN (Invitrogen), 0.3µM de cada oligonucleótido y 4ng/µL de ADN molde. Las condiciones de PCR utilizadas son las mismas que las que se detallan en el punto 4.5.4 para cox-1 de nematodos.

Para todos los marcadores se incluyeron controles negativos en todas las reacciones. Estas se llevaron a cabo en un termociclador automático PTC-100 (MJ-Research, INC.).

Para verificar la calidad de las extracciones de ADN, así como también la de los productos de PCR obtenidos, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa (ICN Biomedicals Inc.) al 1% con TAE 1X pH 7,5-7,8 (TAE 50X (1L): 242g de Tris-base, 57,1mL de ácido acético glacial y 100mL de 0,5M EDTA pH 8). Se utilizó bromuro de etidio (10mg/mL) a una concentración de 5µL/100mL de buffer. La siembra consistió en 5µL de producto a analizar con 2µL de buffer de corrida (0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF y 30% Glicerol en agua). Con el fin de estimar la concentración de ADN de las muestras y el tamaño de las bandas se sembró 3µL de marcador de peso molecular ("1kb Ladder", Invitrogen) con 2µL de buffer de corrida. La corrida se llevó a cabo en buffer TAE 1X pH 7,5, con una intensidad de 80V durante 40 minutos. Las soluciones fueron preparadas según Sambrook et al. (1989).

Los fragmentos amplificados se secuenciaron con los oligonucleótidos LCO1490 y #93 para *cox-1* e ITS₁-ITS₂, respectivamente en el caso de los nematodos y con Gludg-L para *cyt-b* de los peces; utilizando un servicio de secuenciación automático comercial Perkin-Elmer ABI Prism 377 (MACROGEN, Seoul, Korea).

4.5.6 Análisis de secuencias

Las secuencias fueron editadas manualmente en el explorador de alineamientos del programa MEGA 5.1 (Tamura et al. 2011) y posteriormente alineadas con el programa de alineamiento Clustal X (Thompson et al. 1997) con los valores de penalidad fijados por defecto en dicho programa para el comienzo y la extensión de los gaps. Las secuencias de ADN mitocondrial (*cox-1* y *cyt-b*) fueron traducidas a proteínas con el fin de verificar que no hubieran codones stop presentes dentro del fragmento amplificado.

4.6 Análisis de datos de las secuencias de parásitos

4.6.1 Análisis de polimorfismos en el set de datos

Se estimaron las frecuencias nucleotídicas, los sitios variables y los sitios filogenéticamente informativos (PI) utilizando el programa MEGA 5.1 y los sitios segregantes de la muestra (S) con el DnaSP v5.10 (Librado y Rozas, 2009). Los niveles de variabilidad genética se midieron con el número de haplotipos, la diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) según Nei (1987) en el programa DnaSP v5.10.

Para el caso del gen mitocondrial (*cox-1*), se estudió la variabilidad también a nivel de aminoácidos, por lo que se tradujo la secuencia de ADN con el código genético adecuado (mitocondrial invertebrado) en el MEGA 5.1. Con el mismo programa se analizaron la cantidad de aminoácidos existentes, los sitios variables y los sitios filogenéticamente informativos.

Se estimaron en el MEGA 5.1 las distancias pareadas corregidas de las secuencias utilizando el modelo de Kimura 2 parámetros (K_2P). Este modelo formulado por Kimura (1980), incluye un parámetro para transiciones (α) y otro para las transversiones (β). En este modelo cada nucleótido tiene una tasa de sustitución transicional (α) por unidad de tiempo y dos tasas de sustitución transversional (β) por unidad de tiempo.

$$S = (1 - \alpha - 2\beta)$$

Se estimó además, el coeficiente r , que indica la razón de transiciones (T_s) en función de las transversiones (T_v).

4.6.2 Niveles de saturación de los marcadores

Para evaluar los niveles de saturación en ambos marcadores se construyeron gráficos de saturación mutacional calculando las distancias genéticas sin corregir (p -distance) en función de las distancias según el modelo de K_2P en el programa MEGA 5.1. Se compararon las transiciones y las transversiones para la primera, segunda y tercera posición del codón.

Por otra parte, se calculó la relación entre las sustituciones no sinónimas (K_A) y las sinónimas (K_S). Las primeras corresponden a mutaciones nucleotídicas que generan cambios en los aminoácidos codificados y las segundas son las mutaciones que no

cambian el aminoácido. Dichos valores se calculan en el DnaSP v5.10 y en el KaKs_Calculator 2.0 (Wang et al. 2010). Si la relación K_A/K_S es mayor a 1 podría estar indicando selección positiva, mientras que si es menor a 1 selección purificadora y si es el valor es 1, se trata de cambios neutrales.

4.6.3 Test de Neutralidad

Para evaluar si las secuencias analizadas son consistentes con un modelo de evolución neutral se implementó el test de Tajima (Tajima, 1989) y el test de Fu (Fu, 1997) en el programa ARLEQUIN v3.11 (Excoffier et al. 2005). La teoría neutral de evolución molecular planteada por Kimura (1968) predice que a nivel molecular la mayoría de los cambios evolutivos y mucha de la variabilidad dentro de las especies no son causados por selección positiva de alelos ventajosos ni por selección balanceadora; sino que se deben a la deriva genética al azar de los alelos mutantes que son seleccionados de manera neutral o casi neutral (Wen-Hsiung y Graur, 1991).

Ambos test de neutralidad utilizados emplean el parámetro poblacional θ , el cual se define como $\theta=4N_e\mu$ para locus autosómicos (genes nucleares) y $\theta=2N_e\mu$ para locus haploides como los mitocondriales, en donde N_e corresponde al número efectivo de la población y μ , es la tasa de mutación neutral por secuencia y por generación (Fu, 1997).

El test de Tajima asume el modelo de alelos infinitos (donde todo alelo ó estado de carácter en términos filogenéticos surge una única vez por mutación), en ausencia de recombinación. La fórmula de Tajima es la siguiente:

$$D = \frac{\pi - S/a_1}{\sqrt{e_1 S + e_2 S(S-1)}}$$

En donde π es el número promedio de diferencias pareadas en los datos y S es el número de sitios segregantes. Se examina, entonces, la relación entre el número promedio de diferencias pareadas en los datos ($\theta\pi$) y el número de sitios segregantes, denominado S o k (θk):

$$D = \theta\pi - \theta k$$

Bajo el supuesto de neutralidad ambos parámetros son iguales. Un valor de D negativo estaría reflejando expansión demográfica y/o una barrida selectiva o delección en contra de mutaciones levemente deletéreas; sin embargo un valor de D positivo indicaría selección balanceadora o población en equilibrio.

El test de Fu (F_s) (Fu, 1997) que también se basa en el modelo de alelos infinitos, sugiere estimar la probabilidad ($\hat{S}$) de observar una muestra con un número de alelos igual o menor al valor observado bajo la asunción de una población selectivamente neutra. Utiliza el número promedio de diferencias pareadas ($\theta\pi$).

$$F_s = \ln \left(\frac{\hat{S}}{1 - \hat{S}} \right)$$

Valores negativos de F_s indican un exceso en el número de alelos, como el que se esperaría de una reciente expansión poblacional o a partir de un fenómeno de “hitchhiking”. Este fenómeno es el proceso por el cual un alelo puede incrementar su frecuencia por estar ligado a un gen que está siendo seleccionado positivamente. Para detectar estos fenómenos el test de Fu es más sensible que el D de Tajima. Por el contrario, valores positivos de F_s son evidencia de una deficiencia de alelos, lo que correspondería de recientes cuellos de botella poblacionales o selección sobredominante.

La significancia de ambos estadísticos (D y F_s) se calcula mediante generación de muestreos al azar utilizando simulación del coalescente, bajo un modelo de neutralidad y una población en equilibrio.

4.6.4 Modelo de evolución molecular

Se determinó el modelo óptimo de evolución molecular mediante el programa Modeltest 3.7 (Posada y Crandall, 1998), basado en el criterio de información Akaike (AIC) (Akaike, 1974). El modelo obtenido para cox-1 fue GTR+G (Rodríguez et al. 1990; Tavaré, 1986) por sus siglas en inglés “general time reversible”. Este modelo permite a los 4 nucleótidos estar presentes a distintas frecuencias; asume una matriz de sustitución simétrica, por lo que las bases cambian entre sí con la misma tasa; mientras que cada par de sustitución nucleotídica tiene una diferente tasa (Hillis et al. 1996; Li,

1997). El parámetro G, indica que existe una tasa de distribución gama (G) que varía entre los sitios en una secuencia. Incorpora 6 tasas de sustitución distintas y asigna un vector de frecuencia (π) a cada una.

En cuanto a las regiones de espaciadores transcritos internos (ITSs), el modelo seleccionado por el modelo AIC fue TVM+I por su sigla en inglés “transversional substitution model”, que consiste en frecuencias de bases variables, tasas de transversión variables e igual tasa de transición. Sin embargo, dado que uno de los programas de análisis filogenéticos utilizado (BEAST) no admiten dicho modelo, se utilizó el HKY85 (Hasegawa et al. 1985). Este modelo fue elegido según el criterio hLTRs, por su siglas en inglés “hierarchical likelihood ratio tests” (Huelsenbeck y Crandall, 1997); dado que es un modelo anidado más simple que tiene características del TVM; encontrándose en un nivel superior de la comparación bifurcada que lleva al modelo TVM. El HKY85, es un modelo que admite que todos los nucleótidos estén presentes a distintas frecuencias y que las transversiones y las transiciones ocurran a diferentes tasas.

Se determinó también el modelo óptimo de evolución para el gen mitocondrial citocromo b (cyt-b) de los hospedadores según el modelo AIC, que resultó ser HKY+I+G (Hasegawa et al. 1985).

4.6.5 Análisis filogenéticos de los Nematoda

En ambos set de datos, para realizar los análisis filogenéticos se incluyeron secuencias de *Contracaecum* depositadas en el GenBank (Tabla 1 Anexo), con el fin de compararlas con las obtenidas en el presente trabajo y chequear posible coespecificidad con alguna de ellas. Se utilizaron también secuencias del Orden Ascaridida, de la Familia Anisakidae (*Anisakis simplex*) y Ascarididae (*Ascaris lumbricoides*) obtenidas del GenBank como grupos externos para ambos marcadores (Tabla 1 Anexo).

La reconstrucción filogenética de las secuencias mencionadas, se llevó a cabo utilizando métodos basados en modelos de evolución molecular: distancia (Unión de Vecinos ó Neighbour joining, NJ), Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB) y por otro lado métodos no basados en modelos de evolución molecular: Máxima

Parsimonia (MP). Los métodos de inferencia filogenética, extraen la máxima cantidad de información a partir de los datos de secuencias; se pueden combinar con el conocimiento previo de los patrones de evolución de las secuencias, y utilizan parámetros cuyos valores no son conocidos *a priori*.

El método de Neighbour joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) es un método basado en el principio de evolución mínima, el cual utiliza matrices de distancias corregidas según el modelo K₂P (Kimura, 1980). Es simple y relativamente rápido; pero es criticado por el hecho de que las diferencias observadas en las secuencias pueden no reflejar la realidad, acercando artificialmente secuencias (Holder y Lewis, 2003). Para realizar el mismo se utilizó el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002).

El método de MP, utiliza un criterio óptimo de búsqueda heurística, seleccionando aquellos árboles que minimicen el número de pasos evolutivos (Nei y Kumar, 2000). No tiene requerimientos acerca de cómo funciona la evolución, por lo que no hay que explicitar un modelo de cambio evolutivo. Este análisis se realizó en el programa PAUP 4.0b10, utilizando una búsqueda heurística de 100 réplicas con una estrategia de “rotura y reconexión” de ramas (TBR, por su sigla en inglés “tree bisection reconnection”); lo que consiste en dividir el árbol en dos subárboles dividiendo una rama entre dos nodos. Los dos subárboles son conectados eligiendo una rama de cada uno. Se comprueban así todas las posibles divisiones y conexiones, hasta lograr la más parsimoniosa.

Para ambos análisis (NJ y MP) se evaluó el grado de apoyo de los nodos de los clados obtenidos mediante un test de “bootstrap” no paramétrico (Felsenstein, 1985) con 500 réplicas. Únicamente los valores mayores a 80 % fueron considerados soporte robusto para los clados (Hillis y Bull, 1993).

El método de ML realizado con el programa PAUP, examina qué tan bien un árbol explica los datos observados, mediante el cálculo de la probabilidad de los datos dado un modelo de evolución determinado. El árbol que implica la más alta probabilidad de haber generado los datos observados es el de máxima verosimilitud. La robustez de los nodos fue determinada luego de 100 réplicas implementadas en el programa PhyML 3.0 (<http://atgc.lirmm.fr/phyml>), según el algoritmo desarrollado por Guindon et al.

(2010). En este análisis se implementó el algoritmo de búsqueda NNI (por su sigla en inglés: “nearest neighbour interchange”), similar al TBR descrito previamente para MP.

Los análisis filogenéticos reconstruidos a partir de Inferencia Bayesiana, se llevaron a cabo en el programa BEAST v1.6.1 (Drummond y Rambaut, 2007) por su sigla en inglés “bayesian evolutionary analysis sampling trees”. El mismo consiste en especificar un modelo y una distribución de los datos *a priori*. Utiliza una Cadena de Markov por el método de Monte Carlo (MCMC). La hipótesis óptima es aquella que maximiza la probabilidad posterior, la cual es proporcional a la probabilidad multiplicada por la probabilidad *a priori* de esa hipótesis (Holder y Lewis, 2003). La inferencia bayesiana utiliza modelos de sustitución, la teoría del coalescente para recrear las topologías, tiempos de divergencia, tamaños poblacionales, etc; por lo que en algunos aspectos es más complejo que otros programas de análisis filogenéticos.

Para el gen de la citocromo oxidasa (cox-1), se seteó en el programa BEAUti (en inglés: “bayesian evolutionary analysis utility”), un largo de cadena de 12.000.000 generaciones, muestreando cada 200 árboles. Se utilizó el proceso de especiación de Yule (el cual asume una tasa de especiación constante para cada linaje), con un modelo de coalescente bajo un tamaño de población constante y un “uncorrelated relaxed clock” (que incorpora tasas de sustitución entre los linajes) bajo un modelo de distribución “LogNormal” con una tasa de sustitución por sitio por millón de años de 0.038 como fue estimada por Molnar et al. (2011) para el nematodo *Pristionchus pacificus* (Diplogasterida, Neodiplogasteridae).

Para el gen nuclear de los espaciadores internos (ITS₁ e ITS₂) se utilizó largo de cadena de 15.000.000 generaciones, muestreando cada 1000 árboles. Se utilizó el proceso de especiación de Yule, con un modelo de coalescente bajo un tamaño de población constante y un “uncorrelated relaxed clock” bajo un modelo de distribución exponencial.

Para ambos marcadores, se calcularon las probabilidades posteriores de los nodos del consenso de 7500 árboles, luego de “burn in” 2500 árboles en el TreeAnnotator v1.6.1 (Rambaut y Drummond, 2009); con lo que se analizan únicamente los valores donde las cadenas se vuelven más estacionarias. El tamaño efectivo de las muestras (ESS, en

inglés Effective Sample Sizes) visualizado en el TRACER v1.5.1 (Rambaut y Drummond, 2009) fue por encima de los 200, como se recomienda en el manual del BEAST (Drummond y Rambaut, 2007) la visualización de los árboles se llevó a cabo en el Fig Tree v 1.3.1 (Drummond y Rambaut, 2007).

Todos los métodos tienen sus ventajas y desventajas, por lo que en el presente trabajo se utilizaron todos con el fin de buscar una reconstrucción filogenética óptima y que esté apoyada por diversos de análisis.

4.6.6 Análisis filogenéticos de los rivúlidos

Para realizar los análisis filogenéticos de las especies hospedadoras se utilizaron secuencias del gen mitocondrial citocromo b (cyt-b). Se presenta el número de acceso de las secuencias ingresadas en la base de datos del GenBank (Tabla 2 Anexo).

Se utilizó el método de Inferencia Bayesiana detallado anteriormente para las especies parásitas, con un largo de cadena de 10.000.000 generaciones, muestreando cada 1000 árboles. Se utilizó el proceso de especiación de Yule, con un modelo de coalescente bajo un tamaño de población constante y un “uncorrelated relaxed clock” bajo un modelo de distribución “LogNormal” y una tasa de sustitución convencional por sitio por millón de años de 0.02 (Brown et al. 1979), ajustada para ectotermos por Avise (1994). Se calcularon las probabilidades posteriores de los nodos del consenso de 7500 árboles, luego de “burn in” 2500 árboles en el TreeAnnotator v1.6.1. El tamaño efectivo de las muestras (ESS) visualizado en el TRACER v1.5. fue por encima de los 200 y la visualización de los árboles se realizó en el Fig Tree v 1.3.1.

4.6.7 Análisis de poblaciones

El patrón de estructura genética poblacional del set de datos, se infirió mediante el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) llevado a cabo en el programa ARLEQUIN v3.11. La significancia de los componentes de covarianza asociados a los niveles de estructura genética (entre individuos, entre poblaciones, dentro de grupo de poblaciones y entre los grupos) es corroborada utilizando procedimientos de permutaciones no paramétricas (Excoffier et al. 1992). El programa utiliza una matriz de distancias Euclidianas para construir una matriz de diferencias alélicas entre los haplotipos. La significancia de las mismas se analizó mediante un análisis con 1000 permutaciones. Los haplotipos se definieron previamente con el programa DnaSP v5.10 utilizando únicamente los sitios parsimoniosamente informativos de las secuencias (Tabla 3 Anexo). Los grupos se definen *a priori* según las hipótesis que se deseen testear. En este caso, en primer lugar se estudió la estructuración dentro de cada taxón *C. sp. 1* y *C. sp. 2*, con el fin de ver en qué medida dicha estructuración se relaciona con la estructuración de los taxones respecto a las cuencas. En el caso de *C. sp. 2* no se pudo llevar a cabo el AMOVA, dado que 2 de de sus poblaciones están integrados por un único individuo cada una con un solo haplotipo.

Se realizaron varios diseños para las permutaciones de varianza y se detallan 3 hipótesis de agrupamiento en base a una agrupación por cuencas que consistieron en:

Hipótesis 1: 4 grupos (uno por cuenca), Lagunas Negra (LN), Laguna Merín (LM), Laguna Castillos (LC) y Cuenca del Océano Atlántico (COA)

Hipótesis 2: 3 grupos, LN+LC, LM y COA.

Hipótesis 3: 2 grupos, LC+LN y LM+COA

La hipótesis de agrupamiento que mejor describe la estructura poblacional es aquella que maximiza la varianza entre los grupos (Φ_{CT}) y minimiza la heterogeneidad dentro de las poblaciones (Φ_{ST}).

Con los haplotipos mencionados anteriormente se construyó una red de haplotipos utilizando el programa NETWORK 4.6.1.1 (Bandelt et al. 1999).

Al mismo tiempo el programa evalúa hipótesis de flujo génico y aislamiento entre poblaciones dentro de las especies, utilizando el contenido alélico de los haplotipos y

sus frecuencias mediante los estadísticos Phi (Φ), análogos a los estadísticos F de Wright (1951). Con el fin de evaluar la estructuración poblacional y estimar el valor indirecto de flujo génico entre las poblaciones, se utilizaron análogos a los estadísticos F de Wright (1951), mediante la siguiente fórmula:

$$F_{STi} = \frac{\frac{1}{n} \left[\frac{1}{P-1} SSD(AP) - \frac{1}{n_i} \frac{N}{N-P} SSD(WP_i) \right]}{\sigma_T^2}$$

Donde n es el número de copias del haplotipo en la población- i , N es la frecuencia de haplotipos, P es el número total de poblaciones, $SSD (AP)$ es la suma de los cuadrados de las desviaciones entre las poblaciones y $SSD (WP)$ es la suma de los cuadrados de las desviaciones dentro de las poblaciones.

Los niveles de flujo génico determinan hasta qué grado cada población de una especie se comporta como una unidad evolutiva independiente (Slatkin, 1994). Para estimar dicho parámetro se utiliza el modelo de islas, el cual considera que después de cierto tiempo un grupo de poblaciones llega a un equilibrio dinámico entre la deriva génica (elimina variación genética) y el flujo génico (incrementa variación genética). Por tanto el flujo génico para genes nucleares diploides se estima: $Nm \approx (1-F_{ST})/4$, donde N corresponde al tamaño poblacional y m a la tasa de migración. Si Nm es mayor de 1, la deriva génica es despreciable y el flujo génico hace que todas poblaciones evolucionen de manera cohesiva como un conjunto; en cambio si es menor de 1, la deriva génica juega un papel importante (Wright, 1951). Los análisis mencionados anteriormente se realizaron con el programa ARLEQUIN v3.11.

4.6.8 Análisis de demografía histórica

Se realizaron análisis de “Mismatch distribution” en el programa ARLEQUIN v3.11, es decir se estudió la distribución en el número de diferencias pareadas entre los haplotipos, con el fin de analizar la historia demográfica de ambas especies de *Contracaecum*. El mencionado análisis se basa en la comparación de las frecuencias observadas de diferencias nucleotídicas pareadas entre los individuos contra las frecuencias que se esperaría bajo un modelo demográfico de expansión poblacional (Rogers y Harpending, 1992). Se analizó la suma de los cuadrados de las desviaciones (SSD, por su sigla en inglés) entre la distribución observada y la esperada, mediante un análisis de “bootstrap” de 100 permutaciones. Valores significativos de SSD $P(SSD) < 0.05$, rechazan la hipótesis de expansión poblacional. Además, se calculó el índice de desigualdad de Harpending (r) (Harpending, 1994) para la distribución observada de la siguiente manera:

$$r = \sum_{i=1}^{d+1} (x_i - x_{i-1})^2$$

donde, x_i es la frecuencia de haplotipos que difieren en i posiciones y d es el número máximo de diferencias observadas. Valores altos de dicho índice ($r > 0.04$) indican que los datos no se ajustan a un modelo de expansión poblacional (Harpending et al. 1993, 1994).

El análisis de “mismatch distribution” también se realizó con el programa DnaSP v5.10, dado que éste muestra representaciones gráficas de los valores observados y esperados para poblaciones estacionarias y en expansión. Poblaciones que se encuentran en un equilibrio demográfico, muestran patrones de distribución multimodales; en cambio, poblaciones que han sufrido una reciente expansión poseen generalmente patrones unimodales (Rogers y Harpending, 1992).

Este programa también calcula el estadístico Ramos-Onsins and Rozas (R_2) (Ramos-Onsins y Rozas, 2002), el cual se basa en la diferencia entre el número de mutaciones “singletons” y el promedio de diferencias nucleotídicas. Se define de la siguiente manera,

$$R_2 = \frac{\left(\sum_{i=1}^n \left(U_i - \frac{k}{2} \right)^2 / n \right)^{1/2}}{S}$$

donde, n es el tamaño de la muestra, S es el número total de sitios segregantes, k es el número promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias y U_i es el número de mutaciones “singletons” en la secuencia i . Valores bajos de R^2 se esperan para poblaciones que han sufrido expansión demográfica.

Para determinar si las especies estudiadas siguen un modelo de aislamiento por distancia, o sea que existe una correlación entre las distancias geográficas (medidas en Kilómetros) y las distancias genéticas (estadístico F_{ST}) entre los distintos pares de poblaciones se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967). El mismo se llevó a cabo en el programa “Mantel Non-parametric Test Calculator 2.0” (Liedloff, 1999). Utiliza una correlación de Pearson con un coeficiente (r) que oscila entre -1 y 1, representando una fuerte correlación negativa y positiva, respectivamente. La significancia del coeficiente de Mantel obtenido se calculó utilizando 100 permutaciones al azar en el mismo programa

5. RESULTADOS

5.1 Distribución de los parásitos

A partir de la recolección realizada de peces del género *Austrolebias* y *Cynopoecilus melanotaenia* se obtuvieron 2 especies de parásitos pertenecientes al género *Contracaecum* en los departamentos de Rocha y Treinta y Tres.

Las especies de peces parasitadas fueron: *A. charrua*, *A. wolterstorffi*, *A. cheradophilus*, *A. viarius*, *A. reicherti* y *Cynopoecilus melanotaenia* (Fig. 4).

La distribución de *Contracaecum* parece estar restringida a las especies de rivúlidos del Este de Uruguay, dado que no se registraron rivúlidos parasitados en el Oeste y Noreste del país. Según los resultados obtenidos las dos especies de *Contracaecum* mencionadas no coexisten en los mismos charcos, pero sí parasitan las mismas especies de peces hospedadores como por ejemplo *Austrolebias charrua*. Sin embargo, no podemos descartar aún que estas especies de parásitos cohabiten en las otras especies hospederas analizadas; dado que el esfuerzo de muestreo fue mucho mayor en *A. charrua* que en las otras especies mencionadas.

Las larvas de los diferentes linajes de parásitos se hígado y la cavidad abdominal de sus hospedadores respectivamente. Se obtuvieron un total de 101 larvas provenientes de 62 individuos hospedadores.

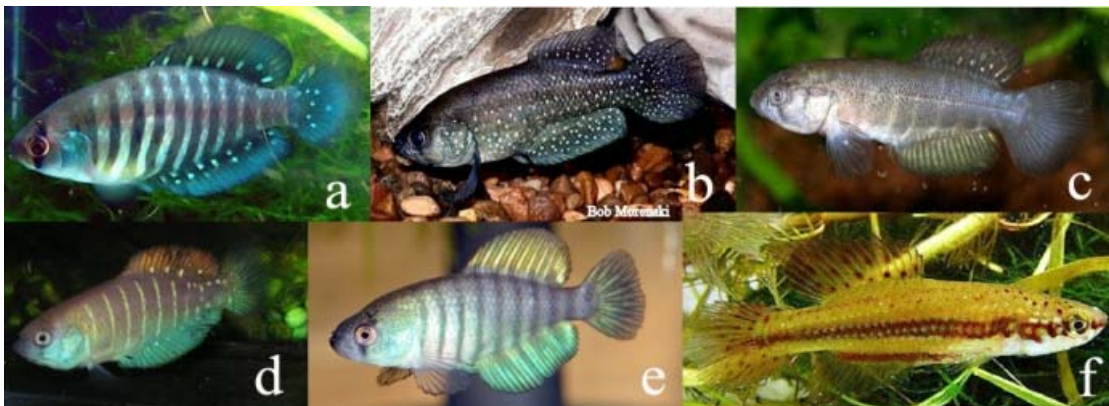


Figura 4. Especies de rivúlidos de Uruguay donde se encontraron parásitos. **a.** *A. charrua*; **b.** *A. wolterstorffi*; **c.** *A. cheradophilus*; **d.** *A. viarius*; **e.** *A. reicherti*; **f.** *Cynopoecilus melanotaenia*.

5.2 Análisis taxonómico de los Nematoda hallados en las muestras

El análisis morfológico de los parásitos obtenidos en especies de rivúlidos del Uruguay indica que los mismos pertenecen al género *Contracaecum*. No fue posible el diagnóstico a nivel de especie por tratarse de larvas (L3) y no presentar los órganos reproductores completamente desarrollados, los cuales constituyen un carácter determinante en todas las claves de identificación a nivel de especie.

Las larvas se clasificaron en tipo II según Vidal Martínez et al. (2002), con un estado de desarrollo L3. Las características observadas en el material fueron las siguientes: color blanquecino a ocre (Fig. 5a), cutícula con costillas longitudinales y surcos transversales más acentuados hacia los extremos. Extremo anterior redondeado, boca con 3 labios, uno dorsal y dos ventrolaterales; anillo nervioso en la porción anterior del esófago (Fig. 5b). Ciego intestinal largo, dirigido hacia el extremo anterior próximo al anillo nervioso y el poro excretor ubicado en la base de un diente larval. Ano en posición ventral y presencia de 3 glándulas anexas anterior a éste (Fig. 5c; 6b). Ventrículo muy pequeño que continúa con un apéndice ventricular corto dirigido hacia atrás (Fig. 5d; 6c). Cola cónica en el extremo posterior, que finaliza en un mucrón.

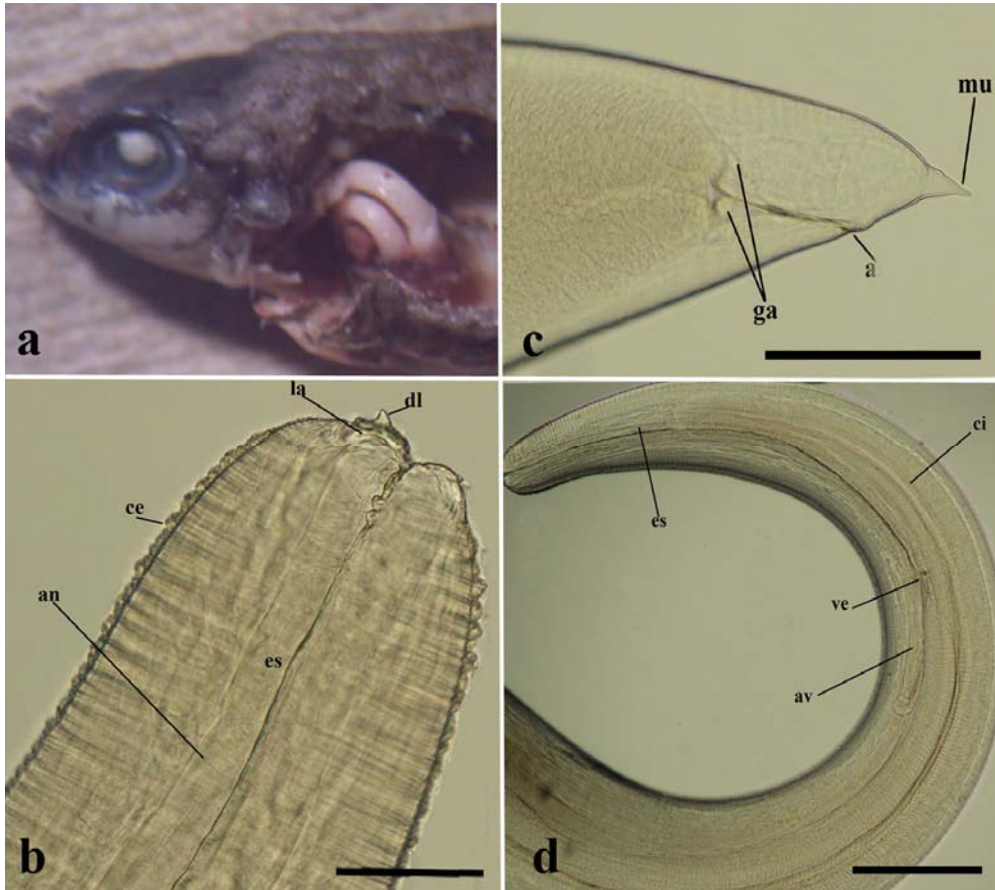


Figura 5. Anatomía de *Contracaecum* sp. 1. **a.** Anatomía externa de *Contracaecum* sp. 1 alojado en *Cynopoecilus melanotaenia*; **b.** Extremo anterior. Escala 20µm; **c.** Extremo posterior. Escala 20µm; **d.** Región anterior del cuerpo. Escala 100µm. Referencias: a, ano; an, anillo nervioso; av, apéndice ventricular; ce, cutícula estriada; ci, ciego intestinal; dl, diente larval; es, esófago; ga, glándulas anexas; la, labio; mu, mucrón; ve, ventrículo.

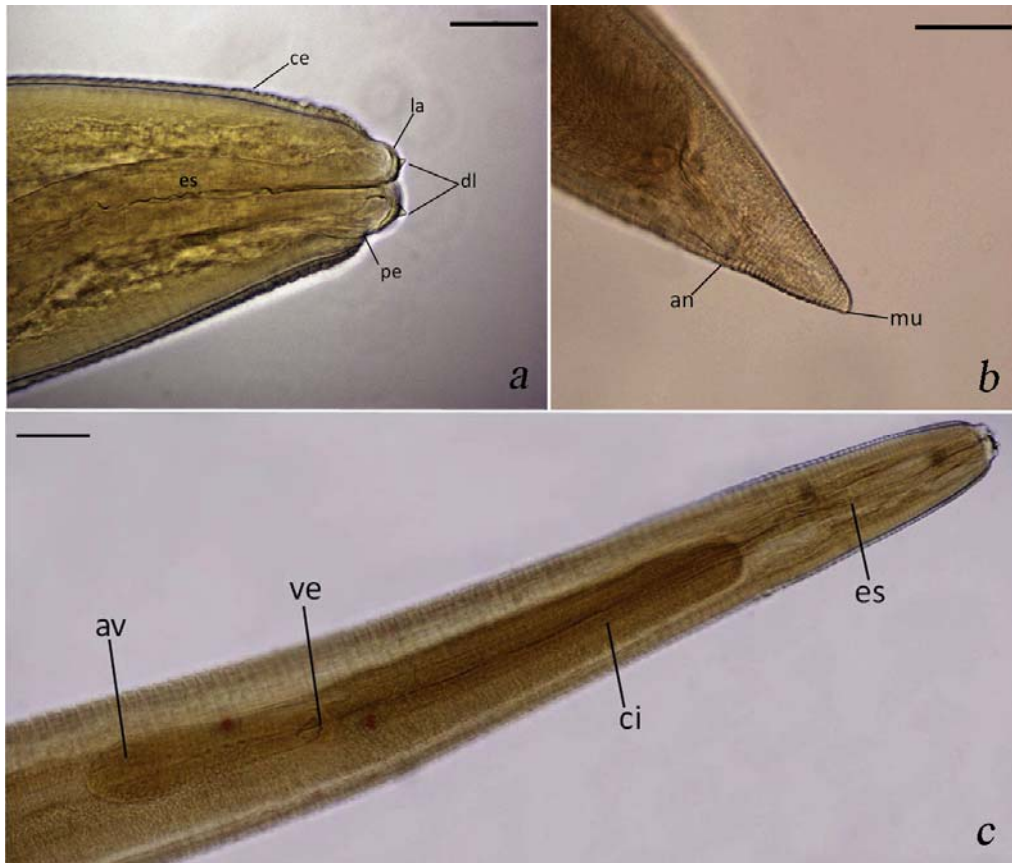


Figura 6. Anatomía de *Contracaecum* sp. 2. **a.** Extremo anterior. Escala 50µm; **b.** Extremo posterior. Escala 100µm; **c.** Región anterior del cuerpo. Escala 100µm. Referencias: an, ano; av, apéndice ventricular; ce, cutícula estriada; ci, ciego intestinal; dl, diente larval; es, esófago; la, labio; mu, mucrón; pe, poro excretor; ve, ventrículo.

Entre los especímenes hallados se pueden distinguir morfológicamente 2 morfotipos, que se han denominado: *Contracaecum* sp. 1 y *Contracaecum* sp. 2. Hay una diferencia importante en el tamaño, siendo *C. sp. 1* mucho más grande (2-3cm) respecto a *C. sp. 2* que no supera los 0.5cm de longitud total (Fig. 7b). Al microscopio, también se pudo determinar que *C. sp. 1* presenta en el extremo anterior un diente larval único entre los labios ventrolaterales (Fig. 5b); mientras que *C. sp. 2* presenta 2 dientes larvales (Fig. 6a); así mismo en el extremo posterior de *C. sp. 1* se observa un mucrón más grande que el de *C. sp. 2* (Fig. 5c; 6b). Por otra parte, esta última especie presenta estriaciones longitudinales en los anillos, que están ausentes en la cutícula de *C. sp. 1*. Estas especies se diferencian en la ubicación del hospedador, encontrándose una tendencia de *C. sp. 1* por encontrarse enrollado en espiral en el hígado (Fig. 7a) y *C. sp. 2* en la cavidad abdominal.

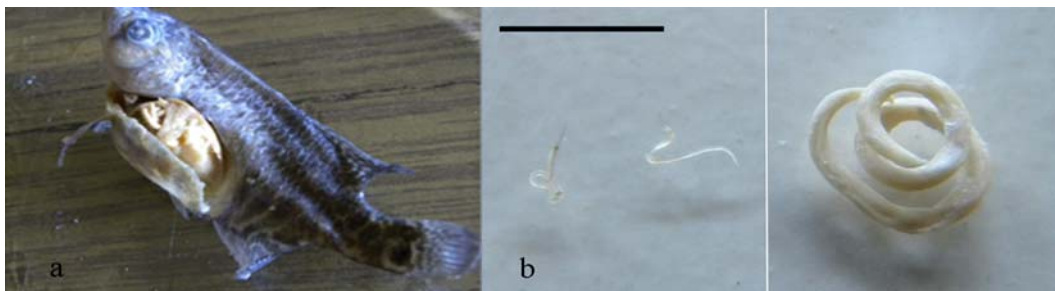


Figura 7. a. Observación macroscópica de *Contracaecum* sp. 1 en hígado de *A. charrua*; **b.** Diferenciación de tamaños de larvas de *Contracaecum* sp. 1 a la derecha y *Contracaecum* sp. 2 a la izquierda. Escala: 500µm.

5.3 Estadística descriptiva

Se analizaron un total de 585 peces pertenecientes a 6 especies de rivúlidos del Este del país, encontrándose un total de 101 parásitos en 62 peces infectados. Se calculó la prevalencia y la intensidad de Infección para cada especie de pez (Tabla 2). Se determinó el porcentaje de infección según el sexo del hospedador (Tabla 3) y según el estadio de ontogenia de los mismos (Tabla 4); resultando que la mayoría de los peces infectados son machos y en estadios adultos. Estos últimos resultados se basan principalmente en la especie *A. charrua*, que fue la mejor representada en la base de datos (Tabla 2).

Tabla 2. Datos de infección por nematodos del género *Contracaecum* en peces del género *Austrolebias* y *Cynopoecilus* del Uruguay

Especie	Nº peces	Peces infectados	Prevalencia %	Intensidad de Infección	Mínimo infección	Máximo Infección	Intensidad media
<i>Austrolebias charrua</i>	424	46	11	78	1	8	1,7
<i>Austrolebias cheradophilus</i>	13	2	15	4	1	3	2,0
<i>Austrolebias viarius</i>	74	3	4	4	1	2	1,3
<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	60	9	15	10	1	2	1,1
<i>Austrolebias reicherti</i>	8	1	13	2	2	2	2,0
<i>Austrolebias wolterstorffi</i>	6	1	17	3	3	3	3,0
Total / promedio	585	62	12	101	1,5	3,3	1,9

Tabla 3. Distribución del número de nematodos del género *Contracaecum* en función del sexo de sus hospedadores (Rivulidae).

Distribución por sexo hospedador	Nº parásitos
sin determinar	5
Machos	64
Hembras	32

Tabla 4. Distribución del número de nematodos del género *Contracaecum* en función del estadio de ontogenia de sus hospedadores (Rivulidae).

Ontogenia hospedador	Nº parásitos
Juvenil	7
Adulto	71
Senil	23

5.4 Análisis de sistemática molecular

5.4.1 Análisis de secuencias

Se obtuvo un total de 31 secuencias mitocondriales del gen de *cox-1* y 32 secuencias nucleares de ITSs pertenecientes a dos taxa de *Contracaecum* parasitando peces rivúlidos como hospedadores intermediarios en Uruguay (Tabla 5).

Tabla 5. Detalle del nº de catálogo, las especies de parásitos, sus hospederos y sus respectivas localidades, así como los datos de secuencias obtenidos por muestra.

Parásito	Especie Parásito	Especie Hospedero	Localidad	Secuencia ITSs	Secuencia Cox1
Pa1	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R13 Empalme R16	si	si
Pa2	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R13 Empalme R16	si	si
Pa3	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R13 Empalme R16	si	no
Pa4	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R13 Empalme R16	si	si
Pa5	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R13 Empalme R16	si	no
Pa6	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R13 Empalme R16	si	no
Pa13	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R14 Km489	no	si
Pa19	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R14 Km489	si	si
Pa23	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R13 Empalme R16	si	si
Pa17	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R13 Empalme R16	si	si
Pa15	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias wolterstorffi</i>	R15 Km143	si	si
Pa18	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	R14 Km487	si	si
Pa9	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	R10	si	si
Pa10	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	R10	si	si
Pa21	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	R19 Km 13	si	no
Pa20	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	R19 Km13	si	si
Pa22	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	R19 Km13	si	si
Pa27	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R14 Km504	si	si
Pa28	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R14 Km504	no	si
Pa29	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R14 Km504	si	si
Pa25	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias cheradophilus</i>	R91 CH1001 "ceibal"	si	si
Pa26	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias cheradophilus</i>	Zona Contacto "33"	si	si
Pa51	<i>Contracaecum sp.1</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	R14 Km506	si	si
Pa32	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa42	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa34	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	no	si
Pa46	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa47	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa37	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	no	si
Pa38	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa39	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa44	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa31	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa53	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias charrua</i>	"La Coronilla"	si	si
Pa24	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias reicherti</i>	"tacuarí"	si	si
Pa16	<i>Contracaecum sp.2</i>	<i>Austrolebias viarius</i>	R10 y R16	si	no

5.5 Análisis de datos de las secuencias de parásitos

5.5.1 Análisis de polimorfismos en el set de datos para ambas especies

La frecuencia de bases de las secuencias analizadas, varía considerablemente según el marcador utilizado. Para el gen mitocondrial cox-1, ambas especies de *Contracaecum* presentan un alto contenido de bases A-T (62% en promedio), con un sesgo importante (43%) hacia la Timina. Sin embargo, con el gen nuclear (ITSs) el contenido A-T es de un 51% y las bases están en proporciones muy similares (Tabla 6).

Tabla 6. Composición nucleotídica de las especies de *Contracaecum* de Uruguay según la posición del codón.

	Total					Primera posición					Segunda posición					Tercera posición				
	T	C	A	G	A+T	T	C	A	G	A+T	T	C	A	G	A+T	T	C	A	G	A+T
Cox-1	43	15	19	23	62	45	12	19	24	64	38	17	24	21	62	46	16	14	24	60
<i>Contracaecum</i> sp. 1	41	16	19	24	61	43	13	19	25	61	38	17	24	21	62	44	17	15	24	59
<i>Contracaecum</i> sp. 2	45	13	19	23	64	48	10	21	21	69	37	16	25	21	62	49	14	12	25	61
ITS	27	23	24	26	51	28	22	24	26	52	24	25	24	26	49	29	21	23	27	52
<i>Contracaecum</i> sp. 1	27	23	24	26	51	28	22	24	26	52	24	25	25	26	49	30	21	22	27	52
<i>Contracaecum</i> sp. 2	26	23	24	27	50	28	23	23	26	51	24	25	24	27	48	27	21	25	27	52

A partir de los alineamientos y siendo corroborado con los análisis morfológicos, se determinaron 2 grupos de secuencias, correspondientes a 2 especies del género *Contracaecum* (*C. sp. 1* y *C. sp. 2*). Dada la divergencia existente entre estos 2 grupos de secuencias, los análisis de polimorfismo de ADN, se llevaron a cabo tomando todo el set de datos en conjunto y tomando cada especie de *Contracaecum* por separado.

En la tabla 7 se presentan todos los parámetros de polimorfismos analizados. Los mismos muestran que el gen *cox-1* posee mayor variabilidad en todos los parámetros analizados que los ITSs. Mientras que la diversidad haplotípica del gen *cox-1* es muy cercana a 1 y similar en las 2 especies de *Contracaecum*, para la región ITS dicha diversidad es más baja en *C. sp. 1* respecto a *C. sp. 2*. Para el gen nuclear la diversidad genética medida por estos parámetros en estas especies es muy baja, observándose muy poca variabilidad entre las secuencias analizadas.

En lo referente a las tasas de transiciones y transversiones (Ts:Tv), en *Contracaecum* sp. 2 para ambos marcadores las transiciones superan a las transversiones en una relación de 3,4 a 1 respectivamente. En cambio, *Contracaecum* sp. 1 muestra un exceso de transversiones respecto a transiciones en una relación bastante elevada (Tabla 7). Esto podría estar indicando que el grupo de secuencias de *C. sp. 1* en ambos marcadores se encuentran saturados.

Tabla 7. Variabilidad genética a nivel de ADN de los parásitos *Contracaecum* de rivúlidos de Uruguay. Se analizan ambas especies en conjunto y por separado para ambos marcadores

	Nº pares bases (pb)	Sitios variables		Sitios Filogenéticamente Informativos (PI)		S		Nº Haplotipos		Diversidad Haplótica (SD)		Diversidad nucleotídica (π) SD		Distancia Kimura 2p (Tv+Ts)		D (Tajima)		Fs		r (transition/transversion)	
		C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2
ITS	1105	161		130		8		8		0,655 (0,082)		0,0580 (0,007)		0,064		2,714		24,804		0,278	
		C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2
		39	9	5	3	7	2	4	4	0,271 (0,124)	0,673 (0,123)	0,00089 (0,00047)	0,00091 (0,00023)	0,001	0,028	-2,131	-0,749	-0,875	-1,211	0,167	3,41
Cox1	644	162		113		33		20		0,968 (0,015)		0,0886 (0,008)		0,101		1,156		3,923		1,85	
		C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2	C.sp1	C.sp2
		79	14	16	13	46	1	13	10	0,953 (0,031)	0,97 (0,044)	0,015 (0,007)	0,0094 (0,00081)	0,016	0,009	-2,17	1,185	-1,985	-3,029	0,53	3,435

5.5.2 Niveles de saturación de los marcadores

Dada la diferencias existentes en la relación de ts:tv para las dos especies estudiadas, se muestran los gráficos de saturación por marcador para ambas especies por separado.

En la figura 8 se observa en todos los casos un solapamiento de los dos tipos de cambios (transiciones y transversiones) a distancias muy bajas. En el gen nuclear, a partir de una distancia aproximada de un 0.2% en *Contracaecum* sp. 1 la acumulación de transversiones superan ampliamente a las transiciones; mientras que en *C. sp. 2* a una distancia genética de 0.25% las transiciones superan a las transversiones.

Para el caso del gen mitocondrial, en *Contracaecum* sp. 1 la acumulación de transversiones supera a las transiciones a una distancia de 2%; mientras que en *C. sp. 2* las transiciones superan a las transversiones a una distancia genética de 0.8%. Cuando se discrimina por la posición del codón, se observa que para *C. sp. 1* los cambios en la primer y segunda posición del codón comparados con la tercera son similares a bajas distancias genéticas. Cuando se supera el 8% de divergencia los cambios en la tercera posición superan a los de primer y segunda. En el caso de *C. sp. 2* las diferencias entre los cambios en primer y segunda posición respecto a los de tercera posición del codón comienzan a divergencias muy bajas.

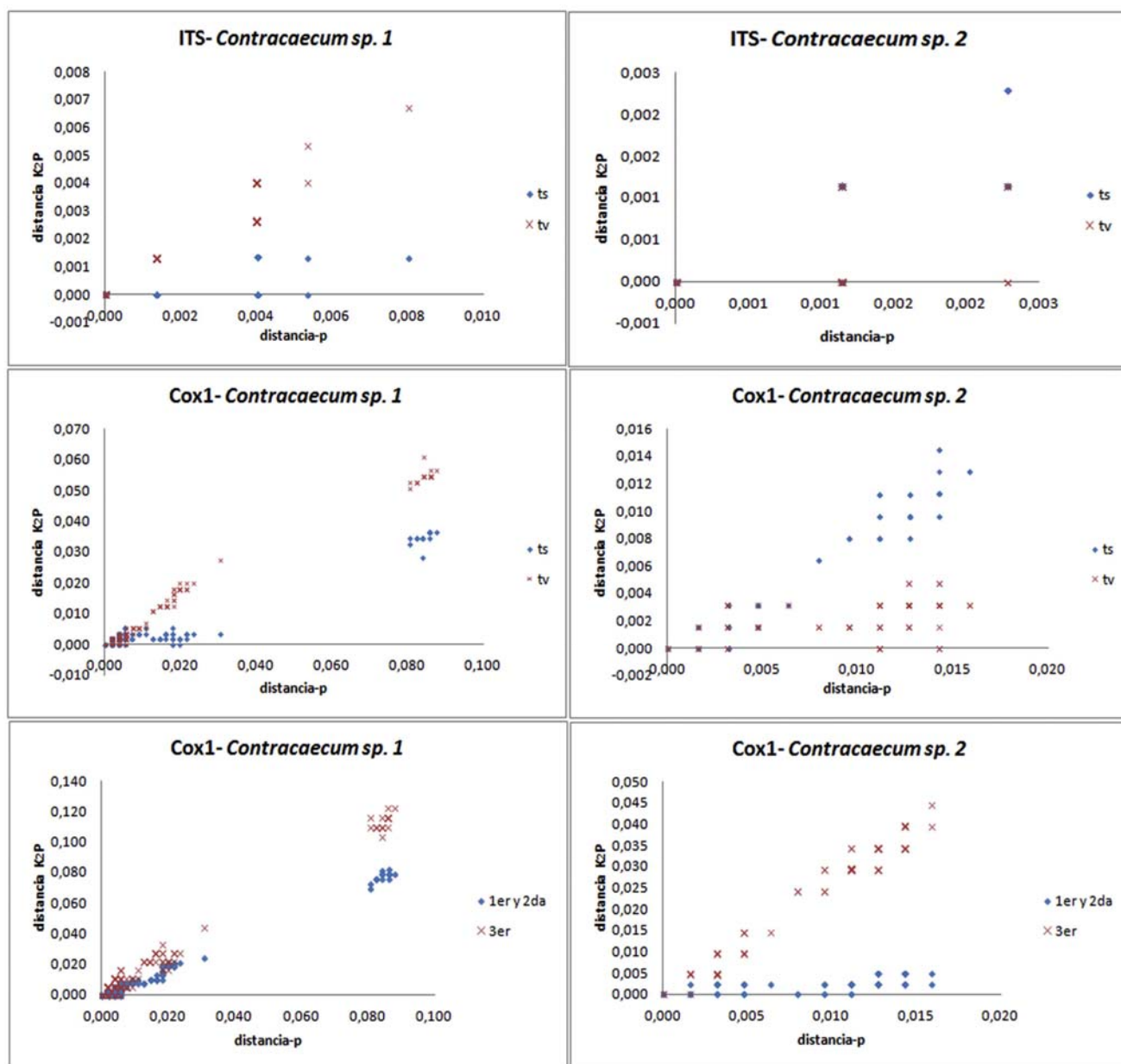


Figura 8. Análisis de saturación de los genes ITS y Cox-1 en *Contracaecum*. Se muestran gráficos de saturación de la distancia según el modelo K₂P de las transiciones (ts) y las transversiones (tv), en función de las distancias no corregidas (distancia-p). En las últimas 2 gráficas se detalla saturación discriminando entre las dos primeras posiciones del codón y la tercera con el gen cox-1.

5.5.3 Análisis de polimorfismo a nivel de aminoácidos para cox-1

A partir de la traducción de las secuencias obtenidas usando del código genético de invertebrados, se obtuvieron un total de 210 aminoácidos para el fragmento analizado. La especie de *Contracaecum* sp. 1 presentó una cantidad elevada (10 veces más) de sitios variables en comparación con *Contracaecum* sp. 2 que sólo presentó 3 de estos sitios. Con los sitios filogenéticamente informativos (PI) sucedió algo parecido pero con una diferencia mucho menor, *C. sp. 1* presentó el doble (6) de sitios (PI) que la otra especie en estudio (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de polimorfismo a nivel de aminoácidos para cox-1 en *Contracaecum* sp.

	Aminoácidos	Sitios Variables		Sitios Filogenéticamente Informativos	
Cox1	210	48		24	
		<i>C. sp 1</i>	<i>C. sp 2</i>	<i>C. sp 1</i>	<i>C. sp 2</i>
		31	3	6	3

En lo referente a la relación entre las sustituciones no sinónimas (K_A) y las sinónimas (K_S), tanto para *C. sp. 1* como *C. sp. 2* dicha relación K_A/K_S fue siempre menor a 1 lo que indicaría que estas especies están bajo selección purificadora.

5.5.4 Análisis de distancias pareadas de los Nematoda

En la tabla 9 se muestran las distancias pareadas según el modelo K_2P entre y dentro de los grupos con los marcadores moleculares ITS y cox-1 respectivamente. Se presentan los rangos de los valores de divergencias medidos en % y los grupos seleccionados se detallan en las figuras 9 y 10. En términos generales el gen de la cox-1 muestra una divergencia genética mayor que con la región de los espaciadores internos ITSs. Con ambos marcadores *C. sp. 1* (Grupo 1) muestra una divergencia intragrupo mayor que *C. sp. 2* (Grupo 2). Con respecto a la divergencia entre los grupos, *C. sp. 2* presenta menor divergencia con las especies de *Contracaecum* del GenBank (Grupo 3) que con la otra especie de *Contracaecum* de Uruguay (*C. sp. 1*). Sin embargo existe un pequeño solapamiento de los rangos.

Tabla 9. Distancias pareadas corregidas medidas en % según el modelo de K₂P entre y dentro de los grupos de *Contracaecum*: Gp1, *C. sp. 1*; Gp2, *C. sp. 2* y Gp3, especies de *Contracaecum* del GenBank.

ITS	Gp 1	Gp 2	Gp 3	cox-1	Gp 1	Gp 2	Gp 3
Gp 1	0 - 0.8	-	-	Gp 1	0 - 2.6	-	-
Gp 2	11 - 12	0 - 0.3	-	Gp 2	19 - 22	0 - 1.7	-
Gp 3	14 - 17	10 - 13	0.6 - 12	Gp 3	15 - 34	14 - 20	16 - 26

5.5.5 Análisis filogenéticos de los Nematoda

5.5.5.1 Reconstrucción filogenética con métodos no basados en modelos de evolución molecular

En la figura 9 y 10, se muestran los árboles consenso obtenidos a partir del método de Máxima Parsimonia (MP) con ITSs y cox-1 respectivamente. En los mismos se hace referencia a los grupos utilizados para los análisis de distancias pareadas dentro y entre grupos detallados anteriormente (Tabla 9). Se muestran únicamente los valores de “bootstrap” mayores a 80 %.

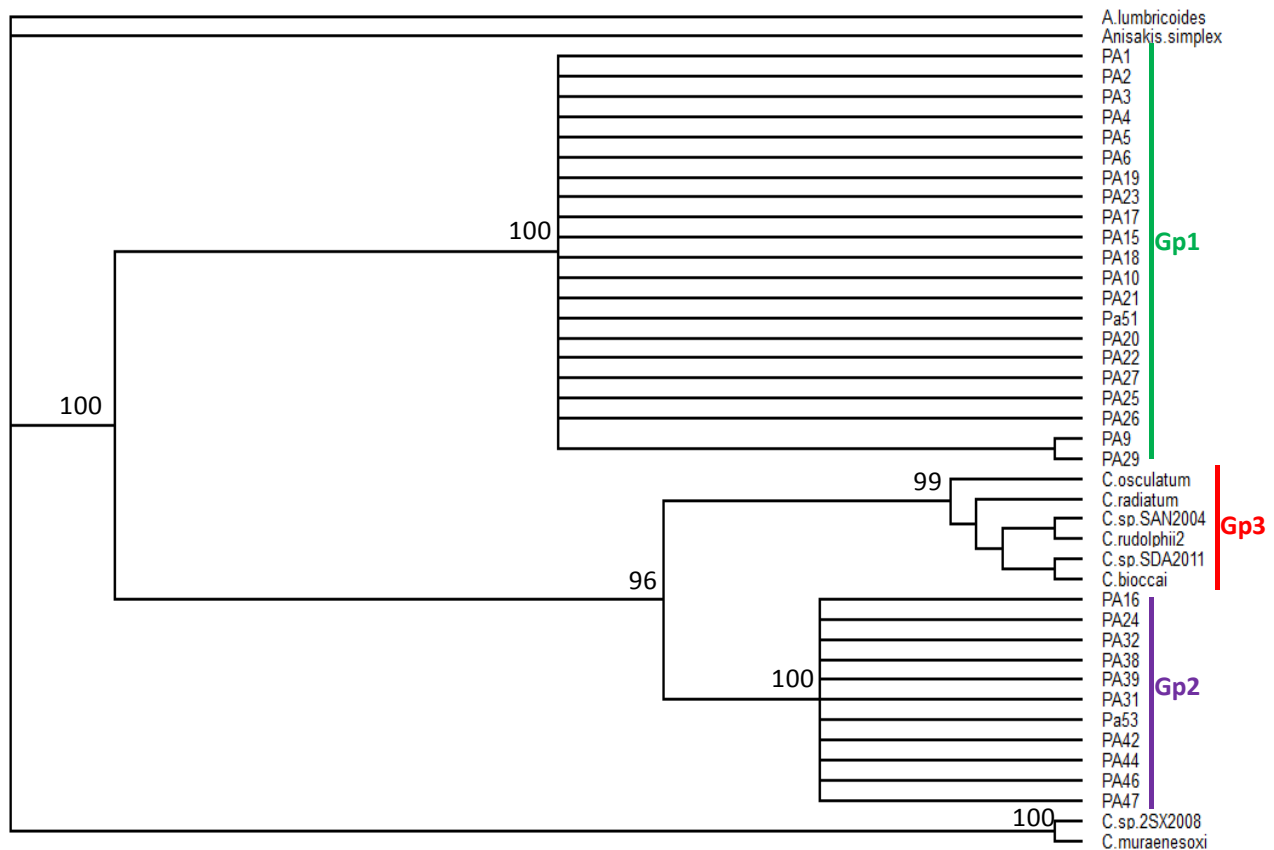


Figura 9. Árbol filogenético consenso obtenido entre 100 árboles más parsimoniosos de 1175 pasos, a partir de secuencias de ITS₁ e ITS₂ de nematodos parásitos. Correspondencia de los grupos: Gp1, *C. sp. 1*; Gp2, *C. sp. 2* y Gp3, especies de *Contracaecum* del GenBank.

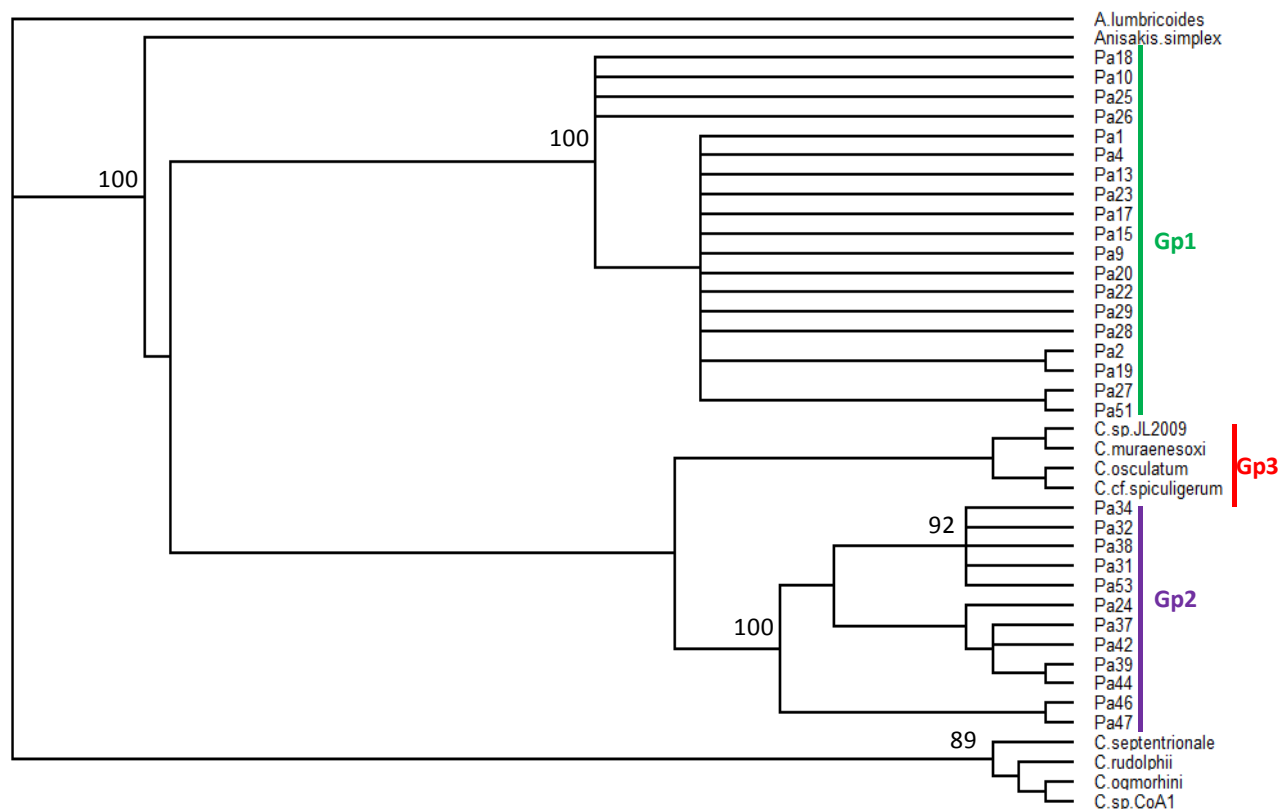


Figura 10. Árbol filogenético consenso obtenido entre 100 árboles más parsimoniosos de 895 pasos, a partir de secuencias de cox-1 de nematodos parásitos. Correspondencia de los grupos: Gp1, *C. sp. 1*; Gp2, *C. sp. 2* y Gp3, especies de *Contracaecum* del GenBank.

Ambas reconstrucciones filogenéticas indican que las especies *Contracaecum sp. 1* y *Contracaecum sp. 2* de Uruguay constituyen 2 grupos monofiléticos bien soportados. En el caso del árbol obtenido con cox-1, estos 2 clados mencionados anteriormente, junto con secuencias de otras especies de *Contracaecum* obtenidas del Genbank permiten inferir que este género es parafilético, dado que quedan incorporados a una politomía basal junto con otra especie de la misma familia *Anisakis simplex* (Anisakidae). Se observa también un clado con buen soporte incluyendo secuencias de otras 4 especies de *Contracaecum* también obtenidas del Genbank, que quedan por fuera del clado mayor descrito anteriormente. Este último clado colapsa basalmente junto a otra especie que pertenece a otra superfamilia (Ascarididae), *Ascaris lumbricoides* utilizada como grupo externo, pero sin soporte estadístico. Dentro del clado de *C. sp. 2* se observa un subclado bien soportado que corresponde a 5

individuos del hospedador *A. charrua* provenientes de “La Coronilla” (Fig. 10), que no se puede evidenciar en el árbol en base a ITSs (Fig. 9).

5.5.5.2 Reconstrucción filogenética con métodos basados en modelos de evolución molecular.

En la figura 11 y 12, se muestran los árboles filogenéticos obtenidos a partir del método de Neighbour joining (NJ) utilizando el modelo de distancias corregidas K₂P con ITSs y cox-1 respectivamente. Se muestran únicamente los valores de “bootstrap” mayores a 80%. Las topologías obtenidas son similares a las descritas para cox-1. La única diferencia observada es que en el caso de los ITSs con éste método se resuelve mejor la relación de *Anisakis simplex* con respecto a los grandes clados de *Contracaecum sp.* y las relaciones dentro del clado de algunas de las especies de *Contracaecum* del GenBank están mejor definidas, con buen soporte estadístico.

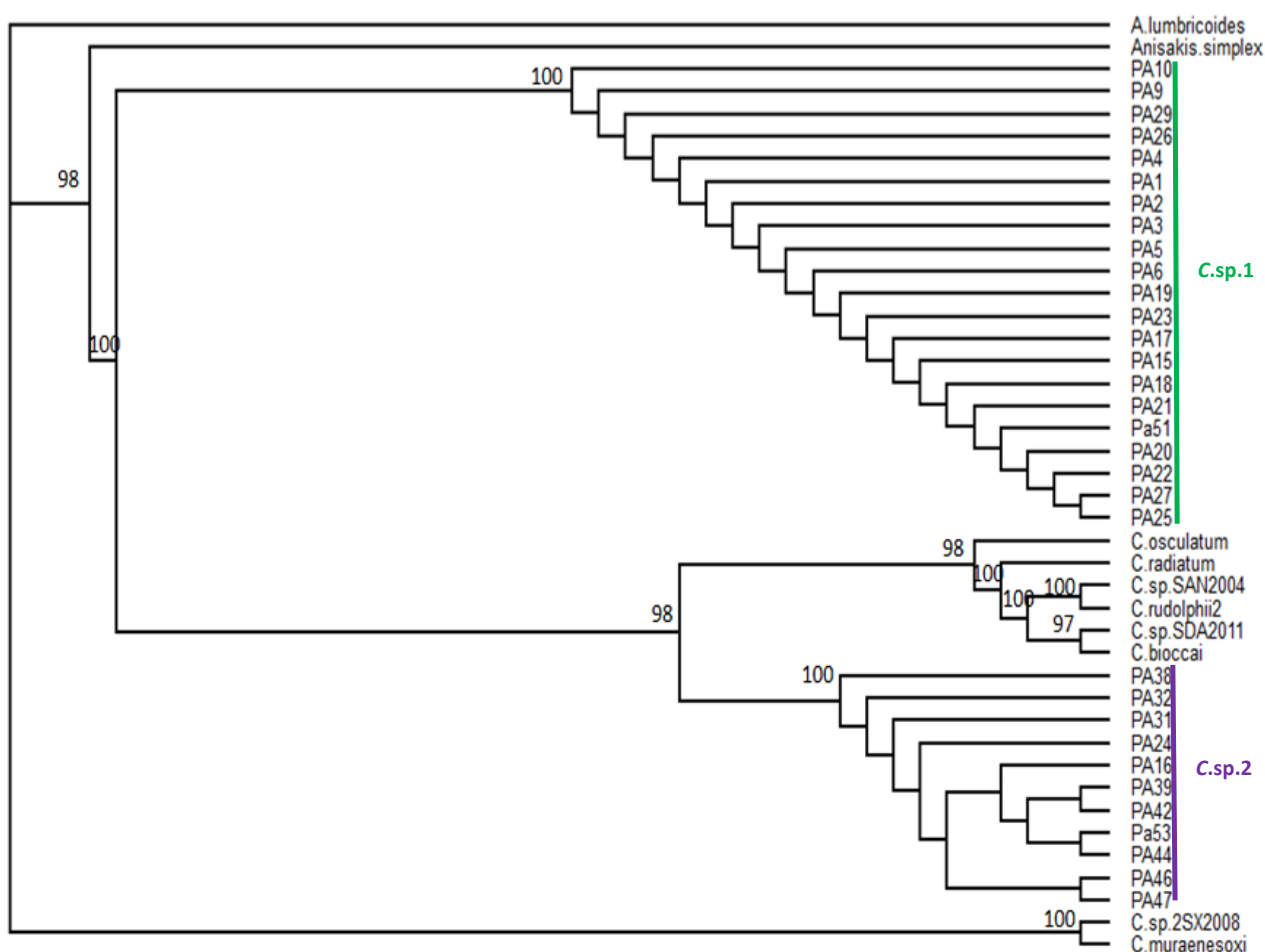


Figura 11. Arbol filogenético obtenido con el método de Neighbour joining (NJ), a partir de secuencias de ITS₁ e ITS₂ de nematodos parásitos.

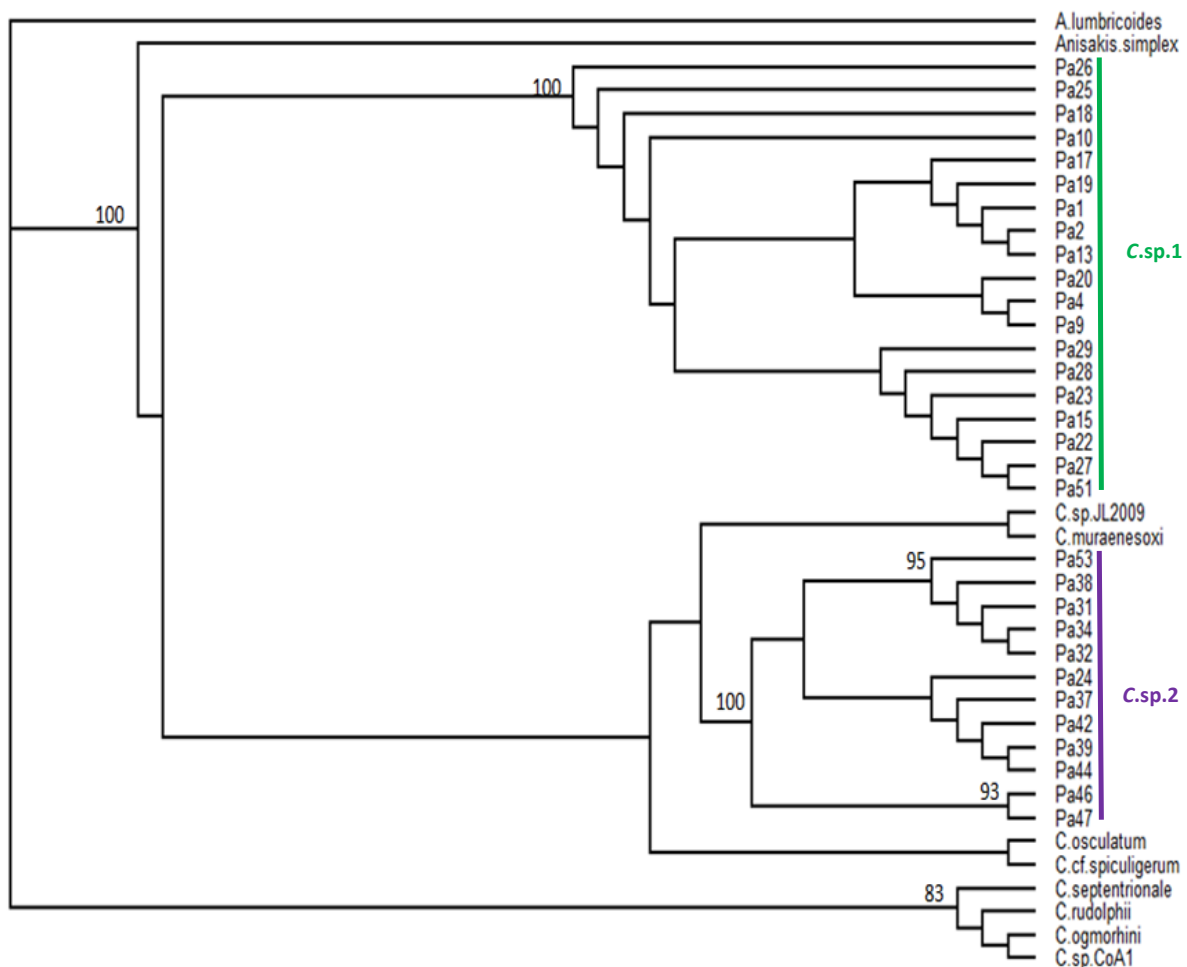


Figura 12. Arbol filogenético obtenido con el metodo de Neighbour joining (NJ), a partir de secuencias de cox-1 de nematodos parásitos.

Con el método de reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) se obtuvieron topologías concordantes con las descritas anteriormente para ambos marcadores (Figs. 13 y 14).



Figura 13. Árbol filogenético obtenido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) utilizando el modelo de evolución HKY85, a partir de secuencias ITS₁ e ITS₂ de nematodos parásitos.

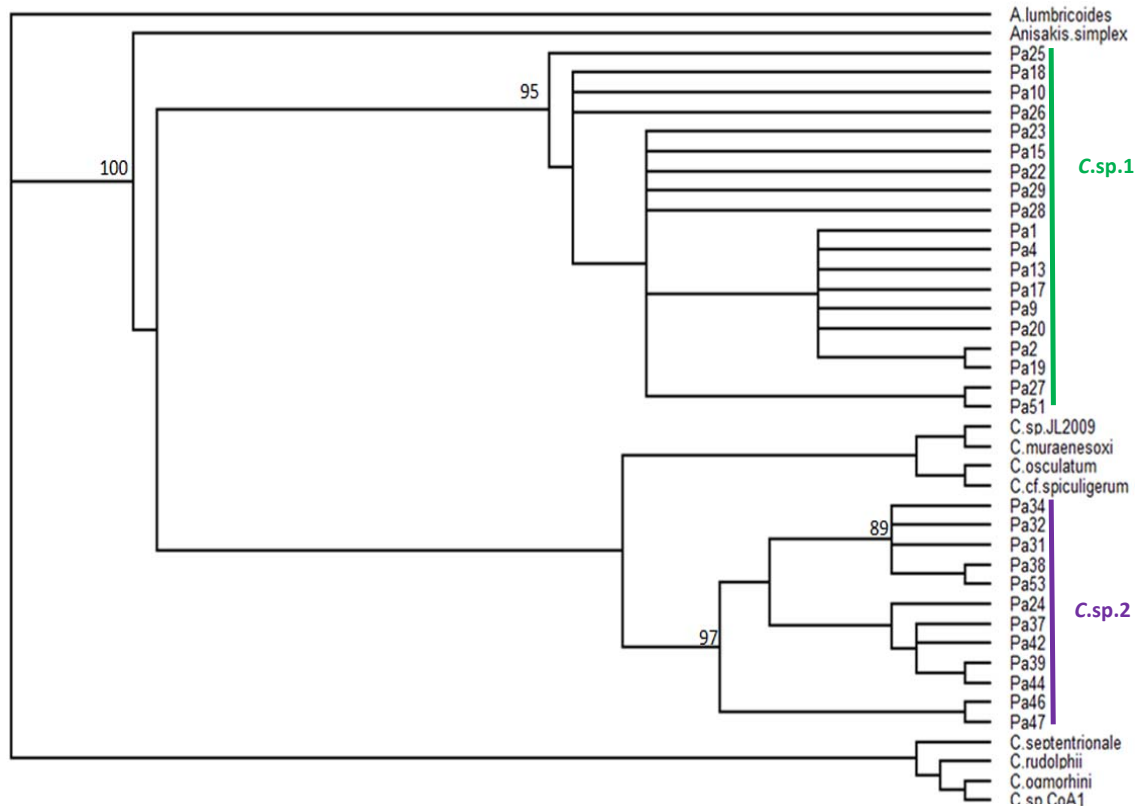


Figura 14. Árbol filogenético obtenido con el método de Máxima Verosimilitud (ML) utilizando el modelo de evolución GTR+G, a partir de secuencias de cox-1 de nematodos parásitos.

Los análisis de Inferencia Bayesiana para ambos marcadores se presentan en las figuras 15 y 16. Se muestran las referencias geográficas de donde se obtuvieron los especímenes de las especies de *Contracaecum* de Uruguay, donde se puede evidenciar que no hay patrones definidos entre la relación de parentesco entre los individuos y sus respectivas localidades geográficas.

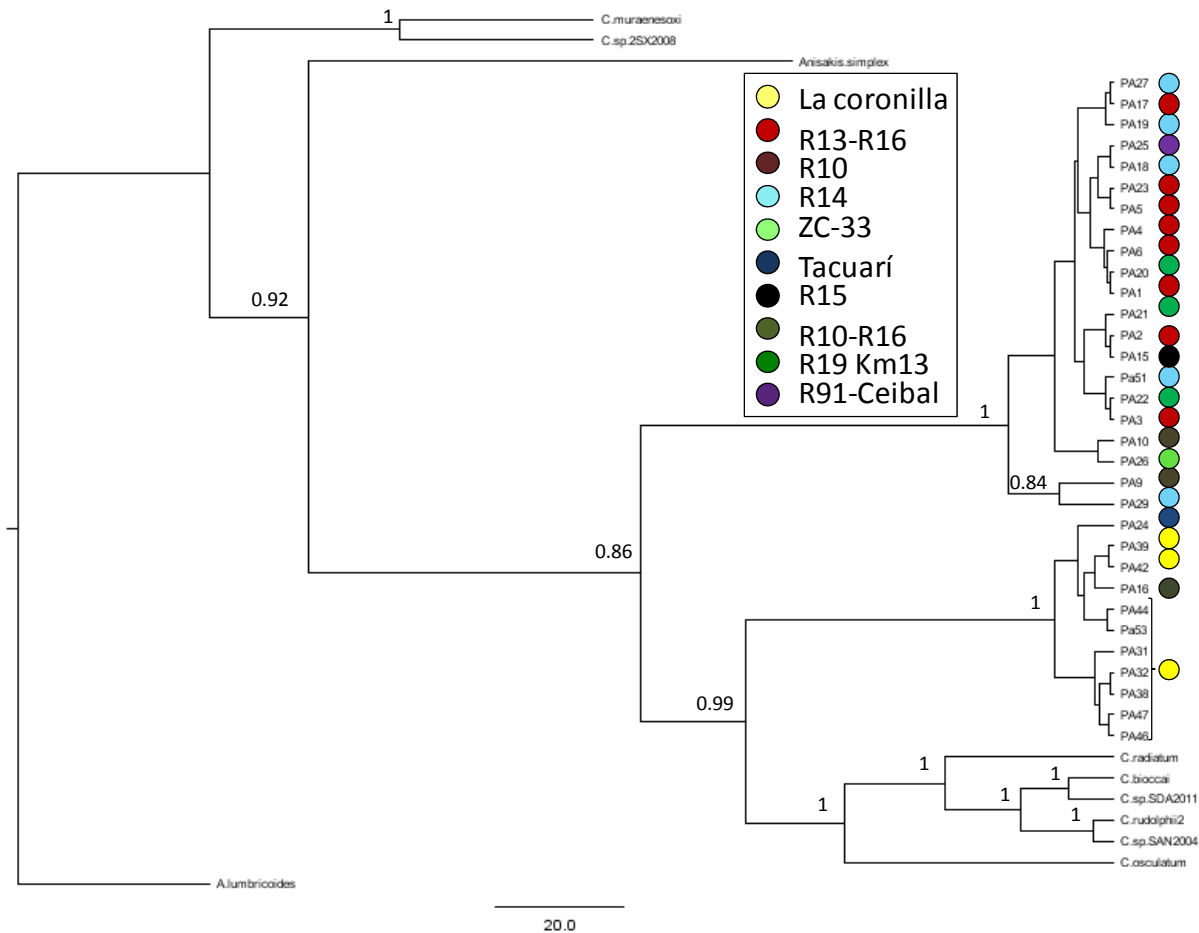


Figura 15. Reconstrucción filogenética a partir de Inferencia Bayesiana utilizando el modelo de evolución HKY85, a partir de secuencias ITS₁ e ITS₂ de nematodos parásitos.

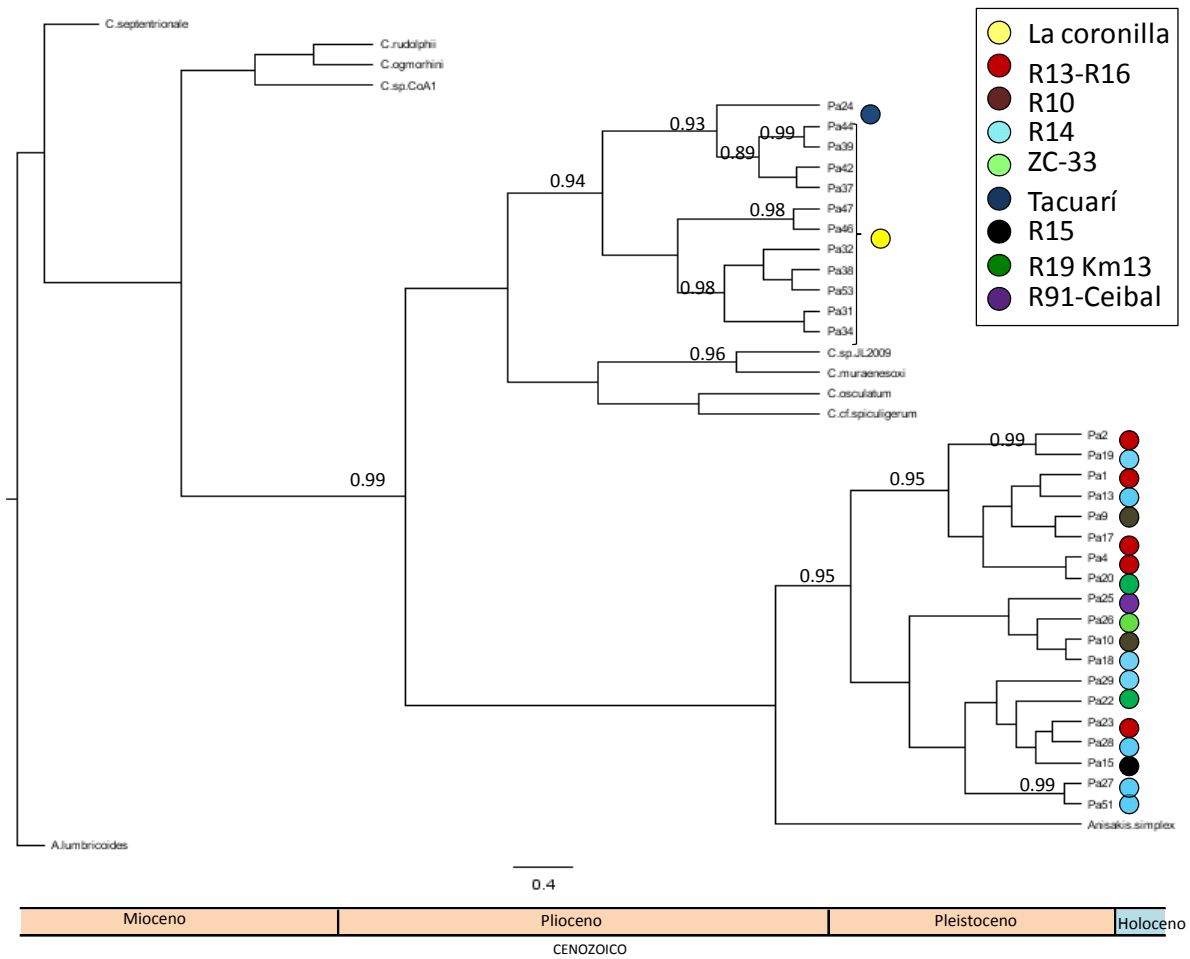


Figura 16. Reconstrucción filogenética a partir de Inferencia Bayesiana utilizando el modelo de evolución GTR+G a partir de secuencias de *cox-1* de nematodos parásitos. Se muestran tiempos de divergencia obtenidos en el BEAST en una escala de tiempos geológicos.

5.5.6 Contrastación filogenética del complejo parásito-hospedador.

La reconstrucción filogenética de los rivúlidos obtenida con el gen mitocondrial *cyt-b*, muestra la agrupación de estas especies en distintos complejos con muy buen soporte (Fig. 17 izquierda). En la misma se observa un clado menor de diferenciación más basal (Mioceno medio) compuesto por el complejo *alexandri* y un clado mayor derivado más reciente (durante el Plioceno) integrado por el resto de los complejos. A la derecha de la figura se muestra el árbol invertido de los parásitos con el método de Inferencia Bayesiana obtenido con el BEAST v1.6.1 para *cox-1* que se presenta con mayor detalle en la figura 16. A fines de facilitar la contrastación de ambas filogenias, se resaltan con colores las dos especies de *Contracecum* donde el celeste corresponde a *C. sp. 2* y el

rosado a *C. sp. 1*. De la misma manera y mediante flechas se señalan las especies de rivúlidos parasitadas por cada una de las especies.

A partir de los tiempos de divergencia obtenidos mediante las calibraciones del reloj molecular para ambos integrantes del complejo parásito-hospedador, inferimos que los eventos de especiación de los parásitos son coincidentes con la separación de los distintos complejos de especies de los hospedadores durante el Plioceno, aún cuando los eventos de cladogénesis dentro de cada uno de los complejos de *Austrolebias* ocurren en el Pleistoceno (Fig. 17).

Al contrastar ambas filogenias, se puede ver que ambos linajes de parásitos sufren diferentes episodios de invasión en especies de los distintos complejos e incluso en una misma especie como ocurre en *A. charrua*.

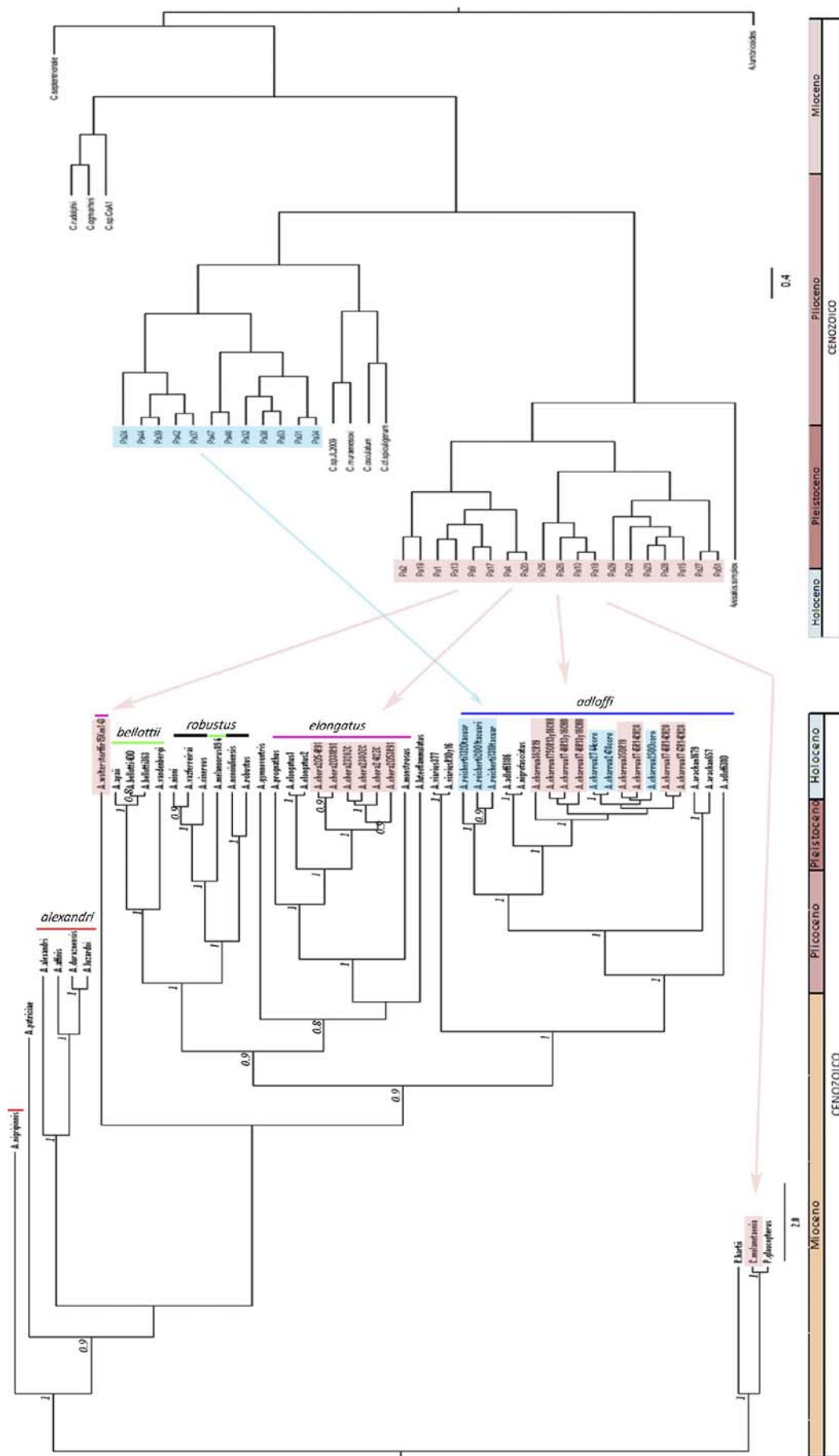


Figura 17. Contraste de filogenias del complejo parásito-hospedador. A la derecha, árbol invertido de los parásitos con cox-1; a la izquierda, árbol de rivulidos con cyt-b. Ambas reconstrucciones se obtuvieron con el método de Inferencia Bayesiana en el BEAST v1.6.1. Se resalta con celeste a *C. sp. 2* y con rosado a *C. sp. 1*. Las flechas señalan las especies de rivulidos parasitadas por cada una de estas especies.

5.5.7 Análisis de genética poblacional en las especies de parásitos

Las secuencias nucleares (ITSs) muestran un número muy bajo de haplotipos (4) tanto para *Contracaecum* sp. 1 como para *Contracaecum* sp. 2, lo que se corresponde a pocos sitios parsimoniosamente informativos dada la baja variabilidad entre las secuencias analizadas. Por otra parte con el gen mitocondrial (cox-1) se obtuvieron un número mayor de haplotipos 13 y 10 para *C. sp. 1* y *C. sp. 2* respectivamente (Tabla 7, pág. 37). Estos números son bastante parecidos a la cantidad de secuencias analizadas con dicho marcador (19, para *C. sp. 1* y 12, para *C. sp. 2*), por lo que cada secuencia constituye prácticamente a un haplotipo.

La red de haplotipos construida para *Contracaecum* sp. está conformado por los 8 y 20 haplotipos encontrados para ITSs (Fig. 18) y cox-1 (Fig. 19) respectivamente. En ambos casos se observan 2 grupos bien delimitados, correspondientes a las 2 especies de *Contracaecum*, que se encuentran separados entre sí por una gran cantidad de pasos mutacionales. Para la región nuclear de los ITSs, el haplotipo más frecuente es el H1 que corresponde a *C. sp. 1* y está formado por todas las localidades de procedencia de los especímenes, salvo R10 que constituyen 2 haplotipos independientes separados del precedente por 3 pasos mutacionales (Fig. 18).

En el caso de cox-1 se observan varios haplotipos ancestrales que determinan posibles “links” alternativos y reticulaciones entre los haplotipos existentes. Es llamativo que el haplotipo 2 (H2) correspondiente a una población de *C. sp. 1* localizada en R13R16 sea altamente divergente (separado por 43 pasos mutacionales) del resto de la población (Fig. 19). El individuo que representa dicho haplotipo, se encontraba coexistiendo en el mismo hospedador con otros especímenes de *C. sp. 1*, por lo que en dicho charco estarían coexistiendo en el mismo individuo distintos linajes genéticos con divergencias profundas dentro de la misma especie de parásito.

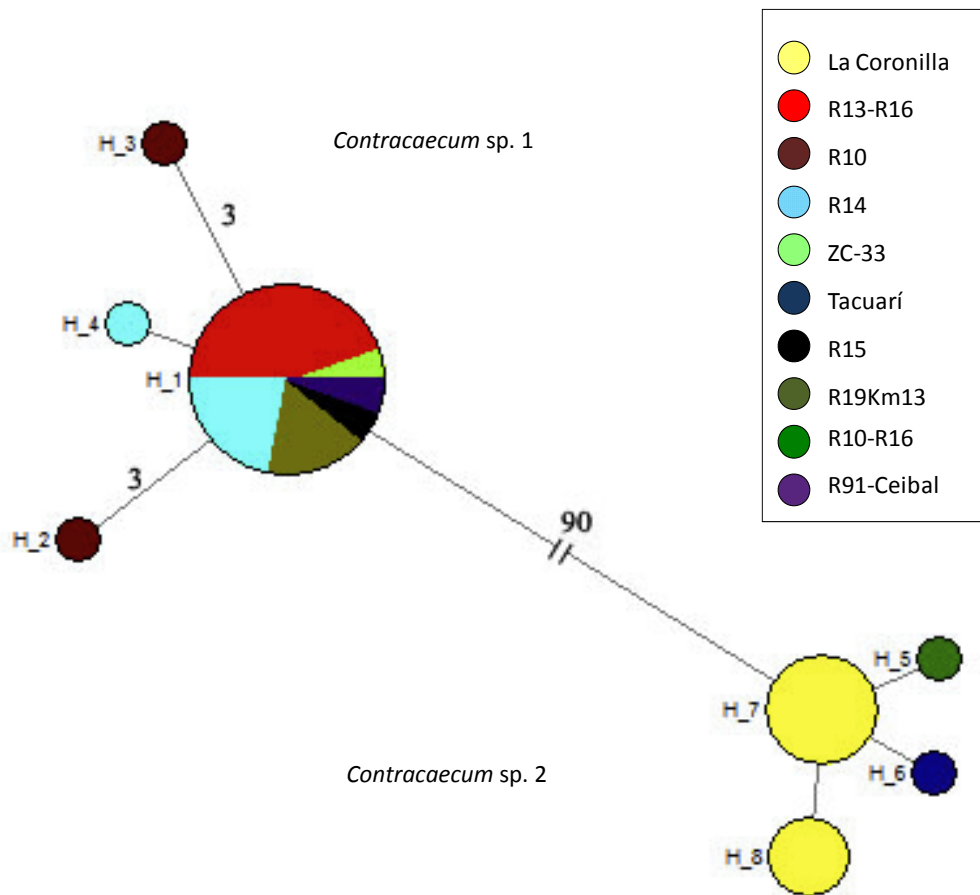


Figura 18. Red de haplotipos de *Contracaecum* de Uruguay con ITSs. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos y su color indica las localidades de colecta. Cada línea entre los haplotipos corresponde a un único paso mutacional, en caso contrario se indica con un número. Los especímenes que integran cada haplotipo se detallan en la Tabla 3 del anexo.

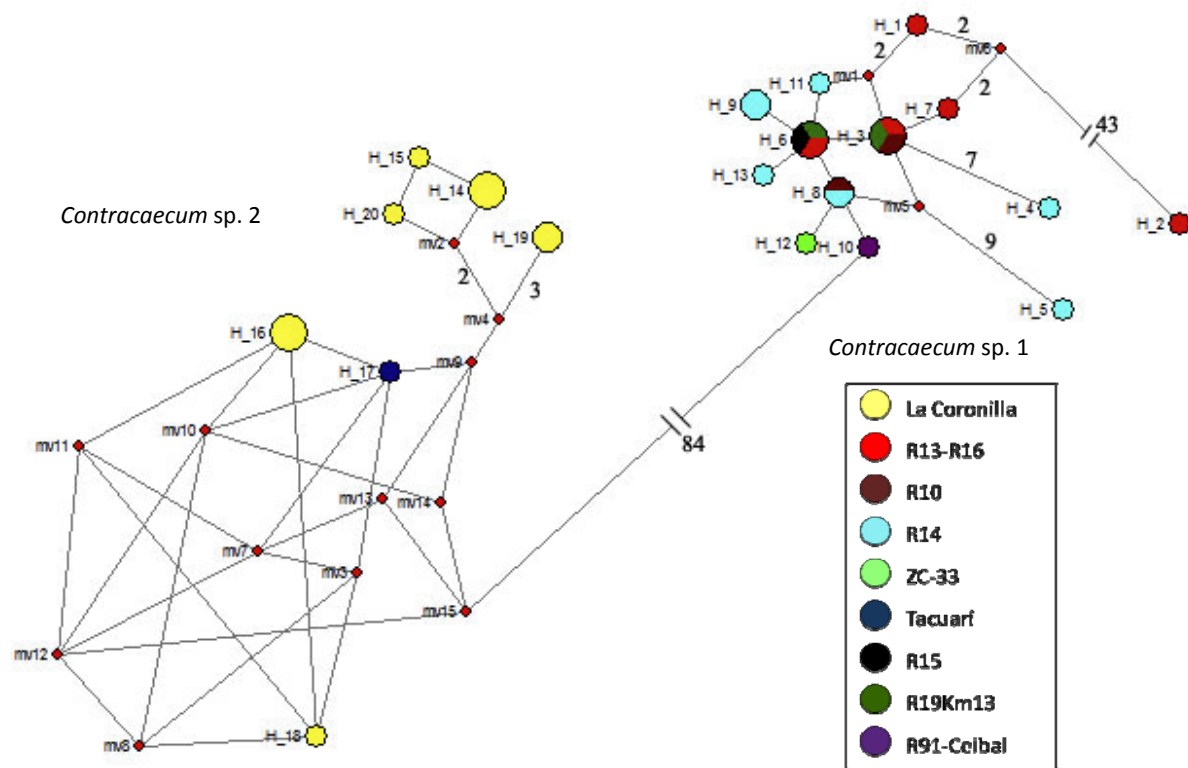


Figura 19. Red de haplotipos de *Contracaecum* de Uruguay con cox-1. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos y su color indica las localidades de colecta. Cada línea entre los haplotipos corresponde a un único paso mutacional, en caso contrario se indica con un número. Los nodos rojos representan haplotipos alternativos. Los especímenes que integran cada haplotipo se detallan en la Tabla 3 del anexo.

Los análisis de Varianza Molecular (AMOVA) detallados en las tablas 10 y 11 indican que la hipótesis que mejor se ajusta al set de datos en ambos marcadores es la Hipótesis 2 definiendo 3 grupos: por un lado la Laguna Negra junto con la Laguna Castillos, la Laguna Merín y por último, la Cuenca del Océano Atlántico. Dicha hipótesis maximiza los valores de Φ_{CT} (0.62 y 0.51 para ITS y cox-1 respectivamente). Con éste último marcador el resto de las hipótesis maximiza el porcentaje de variación dentro de las poblaciones; mientras que para los ITSs el mayor porcentaje de variación se atribuye a la variación entre poblaciones dentro de los grupos (salvo hipótesis 1).

Tabla 10. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en *Contracaecum sp.* para ITS según las 3 hipótesis de agrupamiento planteadas. H1, 4 grupos: Lagunas Negra (LN), Merín (LM), Castillos (LC) y Cuenca del Océano Atlántico (COA); H2, 3 grupos: LN+LC, LM y COA; H3, 2 grupos: LC+LN y LM+COA. Únicamente los valores de Φ_{ST} fueron significativos.

Hipótesis	Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadístico Φ
H1	Entre grupos	3	292,81	10,70 Va	44,25	$\Phi_{CT}=0,44$
	Entre poblaciones dentro de grupos	5	80,53	2,38 Vb	9,84	$\Phi_{SC}=0,17$
	Dentro de poblaciones	22	244,39	11,10 Vc	45,91	$\Phi_{ST}=0,99$
H2	Entre grupos	2	291,91	13,10 Va	51,71	$\Phi_{CT}=0,51$
	Entre poblaciones dentro de grupos	6	81,42	1,12 Vb	4,45	$\Phi_{SC}=0,09$
	Dentro de poblaciones	22	244,39	11,10 Vc	43,84	$\Phi_{ST}=0,56$
H3	Entre grupos	1	185,98	8,79 Va	33,77	$\Phi_{CT}=0,33$
	Entre poblaciones dentro de grupos	7	187,36	6,14 Vb	23,59	$\Phi_{SC}=0,36$
	Dentro de poblaciones	22	244,39	11,10 Vc	42,65	$\Phi_{ST}=0,57$

Tabla 11. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en *Contracaecum sp.* para cox-1 según las 3 hipótesis de agrupamiento planteadas. H1, 4 grupos: Lagunas Negra (LN), Merín (LM), Castillos (LC) y Cuenca del Océano Atlántico (COA); H2, 3 grupos: LN+LC, LM y COA; H3, 2 grupos: LC+LN y LM+COA. Únicamente los valores de Φ_{ST} fueron significativos.

Hipótesis	Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadístico Φ
H1	Entre grupos	3	513,26	15,88 Va	58,09	$\Phi_{CT}=0,58$
	Entre poblaciones dentro de grupos	6	137,14	11,36 Vb	41,58	$\Phi_{SC}=0,99$
	Dentro de poblaciones	22	2,00	0,09 Vc	0,33	$\Phi_{ST}=0,99$
H2	Entre grupos	2	488,88	18,44 Va	62,67	$\Phi_{CT}=0,62$
	Entre poblaciones dentro de grupos	7	161,51	10,89 Vb	37,02	$\Phi_{SC}=0,99$
	Dentro de poblaciones	22	2,00	0,09 Vc	0,31	$\Phi_{ST}=0,99$
H3	Entre grupos	1	228,09	6,07 Va	22,09	$\Phi_{CT}=0,22$
	Entre poblaciones dentro de grupos	8	422,312	21,34 Vb	77,58	$\Phi_{SC}=0,99$
	Dentro de poblaciones	22	2,00	0,09 Vc	0,33	$\Phi_{ST}=0,99$

Los niveles de estructuración poblacional mediante el cálculo de los valores de F_{ST} pareados y la estimación indirecta del número de migrantes entre las poblaciones se detallan en las tablas 12 y 13 para la región de ITSs y cox-1 respectivamente. Con ITSs se observa que las poblaciones de *Contracaecum sp.* 1 se encuentran absolutamente aisladas de las poblaciones de *C. sp.* 2, existiendo flujo génico entre las distintas poblaciones dentro de cada taxón (Tabla 12).

Tabla 12. Debajo de la diagonal valores de F_{ST} pareados entre las localidades de colecta de *Contracaecum sp.* con ITSs. En azul, por encima de la diagonal Número de migrantes por generación. En negrita valores significativos.

$F_{ST} \backslash Nm$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1- R13-R16	—	∞	0.000	∞	∞	∞	∞	0.000	∞	0.006
2- R14	0.000	—	0.000	∞	∞	∞	∞	0.000	∞	0.001
3- R10-16	1.000	1.000	—	0.000	0.000	0.000	0.000	∞	0.000	∞
4- R10	0.000	0.000	1.000	—	∞	∞	∞	0.000	∞	0.001
5- R15	0.000	0.000	1.000	0.000	—	∞	∞	0.000	∞	0.001
6- R19	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	—	∞	0.000	∞	0.001
7- ceibal	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	—	0.000	∞	0.001
8- Tacuarí	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	—	0.000	∞
9- ZC-33	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	—	0.001
10- La Coronilla	0.997	0.995	-0.500	0.995	0.994	0.995	0.994	-0.500	0.994	—

En el gen mitocondrial cox-1 se observa menos estructuración que con ITSs. En el caso de *C. sp. 2* una de sus 2 poblaciones (Tacuarí) tiene flujo génico únicamente con la otra población del mismo taxón (La Coronilla). Sin embargo esta última población de *C. sp. 2* muestra niveles bajos de flujo génico con poblaciones de *C. sp. 1* pertenecientes a la Laguna Merín, como ser R15, Ceibal y ZC-33. A su vez, éstas 3 poblaciones están aisladas entre sí, mientras que el resto de las poblaciones de *C. sp. 1* presentan flujo génico entre ellas (Tabla 13).

Tabla 13. Debajo de la diagonal valores de F_{ST} pareados entre las localidades de colecta de *Contracaecum sp.* con cox-1. En azul, encima de la diagonal Número de migrantes por generación. En negrita valores significativos.

$F_{ST} \backslash Nm$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1- R13R16	—	10.710	∞	0.050	∞	∞	∞	∞	0.390
2- R14	0.044	—	∞	0.020	∞	∞	∞	∞	0.330
3- R10	-0.180	-0.293	—	0.010	∞	∞	∞	∞	0.550
4- Tacuarí	0.901	0.949	0.977	—	0.000	0.000	0.000	0.000	∞
5- R15	-0.666	-0.882	-1.000	1.000	—	0.000	∞	0.000	0.900
6- ceibal	-0.216	-0.185	0.000	1.000	1.000	—	0.330	0.000	0.940
7- R19	-0.221	-0.273	-0.500	0.988	-1.000	0.600	—	0.330	0.540
8- ZC-33	-0.285	-0.185	0.000	1.000	1.000	1.000	0.600	—	0.880
9- La Coronilla	0.558	0.600	0.474	-0.559	0.356	0.347	0.478	0.361	—

5.5.8 Análisis de demografía histórica

5.5.8.1 Test de Neutralidad

En cuanto a los test de neutralidad si bien el test de Tajima para *Contracaecum* sp. 1 dio negativo y significativo para ambos marcadores, indicando un leve apartamiento de la neutralidad. Esto podría estar evidenciando eventos de expansión poblacional o alternativamente algún tipo de selección actuando en contra de algunos haplotipos; sin embargo el test de Fu no fue significativo, lo que no estaría apoyando alguna de estas hipótesis demográficas. Por el contrario para *Contracaecum* sp. 2 ambos test fueron no significativos (Tabla 7, pág. 37).

5.5.8.2 Análisis de “Mismatch distribution”

Los análisis de distribución de diferencias pareadas (“Mismatch distribution”) indican que para ambas especies se rechaza la hipótesis de expansión poblacional con los dos marcadores moleculares utilizados. Esto se evidencia en la figura 20 por la distribución multimodal de las gráficas (a excepción de la gráfica correspondiente a *C. sp. 2* con ITS, que tiende a ser unimodal) y los altos valores obtenidos del índice de desigualdad de Harpending (r) y el estadístico Ramos-Onsins and Rozas (R^2). Los valores del índice de desigualdad de Harpending y la suma de los cuadrados de las desviaciones (SSD) fueron no significativos ($P > 0.05$), por lo cual no podemos descartar la hipótesis de expansión poblacional.

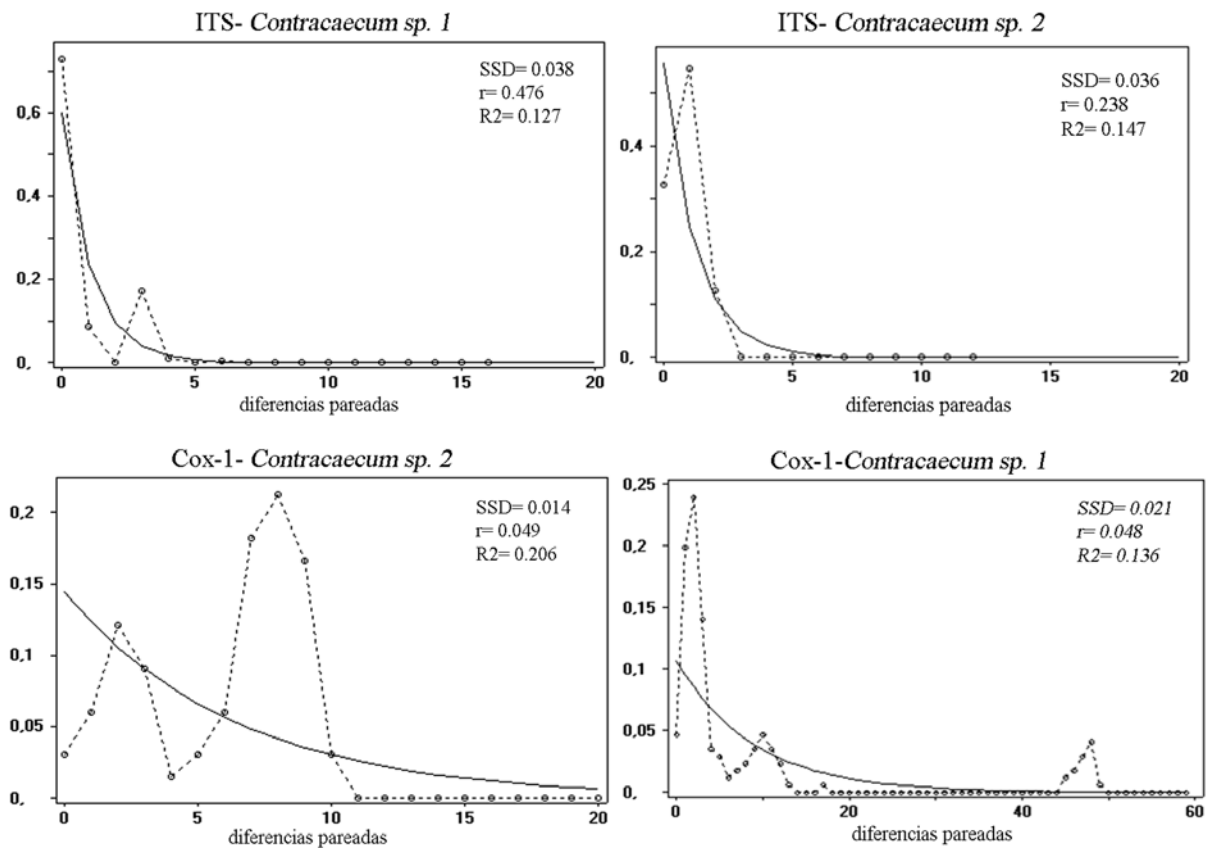


Figura 20. Distribución de diferencias pareadas para *Contracaecum sp.* Las líneas continuas representan la distribución esperada bajo un modelo nulo de expansión poblacional, mientras que las punteadas los valores observados.

5.5.8.3 Hipótesis de aislamiento por distancia

En cuanto a la hipótesis de aislamiento por distancia, en los gráficos de la figura 21 se observa una gran dispersión al comparar el aislamiento genético (distancia F_{ST}) con el geográfico (distancia Km), por lo que no existe correlación entre ambas distancias. Por otro lado el test de Mantel, corrobora lo anterior. Dado que el valor “g” obtenido en dicho análisis es menor que el valor crítico de 1.645 para un $P=0.005$ y que el valor del coeficiente de Mantel normalizado (r) es muy cercano a 0, se acepta la hipótesis nula de que no hay correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas y por lo tanto no hay aislamiento por distancia.

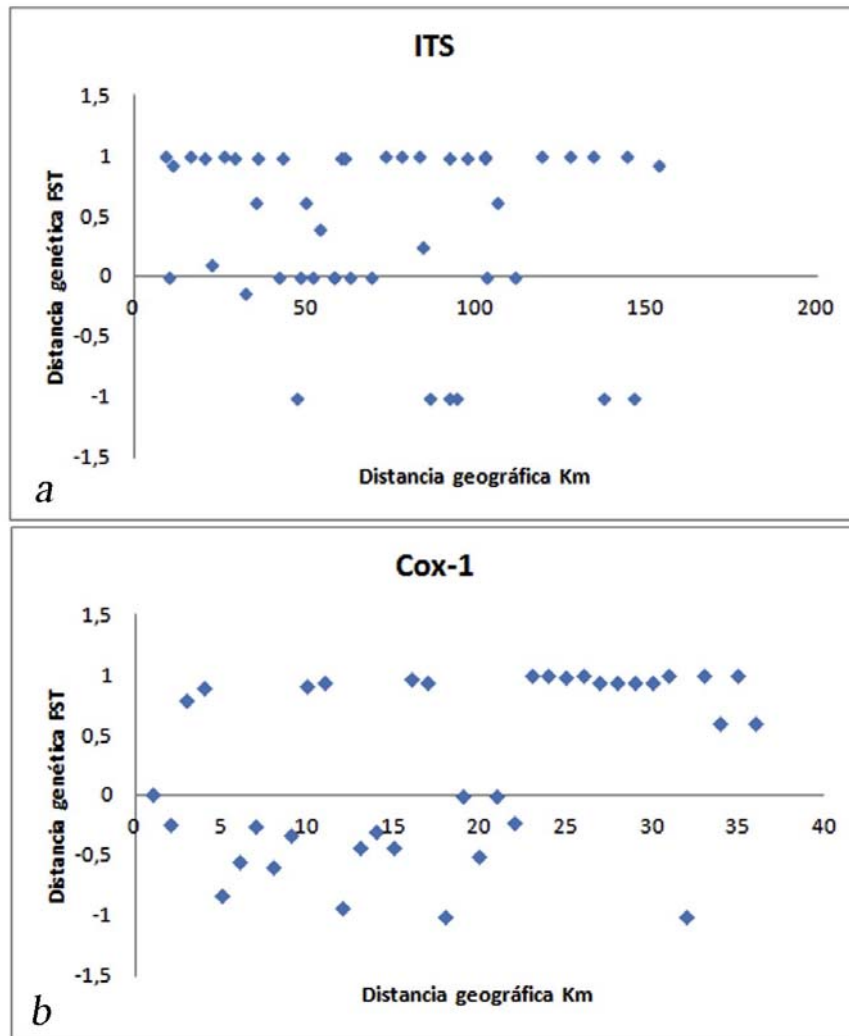


Figura 21. Gráficas de relación entre las distancias genéticas (según el estadístico F_{ST}) y las distancias geográficas (medidas en Km) en *Contracaecum sp.* a. utilizando el gen nuclear ribosomal (ITS₁-ITS₂); Mantel test: $r=0.091$, $g=0.611$. b. con el gen mitocondrial (cox-1); Mantel test: $r=0.083$, $g=0.489$.

6. DISCUSIÓN

6.1 Distribución del complejo parásito-hospedador

Las 2 especies de *Contracaecum* estudiadas en el presente trabajo se encuentran parasitando rivúlidos únicamente en la región Este del país. No existe hasta el momento registro de estos nematodos en las especies de *Austrolebias* de la región litoral oeste de Uruguay. Esto llama la atención dado que estos parásitos suelen ser generalistas y presentar una amplia distribución mundial (Bergmann and Motta, 2004).

6.2 Análisis taxonómico de los Nematoda hallados en las muestras

Las dos especies de parásitos fueron determinadas morfológica y molecularmente como pertenecientes al género *Contracaecum*. Sin embargo, *C. sp. 2* presenta dos dientes larvales, lo que no corresponde a la diagnosis del género (1 único diente larval). La presencia de un único diente larval es diagnóstica incluso a nivel de la Familia Anisakidae, por lo que habría que realizar una revisión de la diagnosis a nivel de género y/o Familia. No se encontró en la bibliografía ninguna especie de este grupo que presente 2 dientes larvales; así mismo esta podría ser una característica presente únicamente a nivel larval y que desaparezca en el adulto. A pesar de la presencia de dos dientes, la especie se determinó como perteneciente a *Contracaecum* por cumplir con la diagnosis del género en cuanto a otros caracteres morfológicos que tienen mayor peso en la taxonomía del taxón, como ser la anatomía de la porción anterior del sistema digestivo, que es única del género *Contracaecum*. Esta determinación fue además validada por los resultados del análisis molecular.

Los valores de prevalencia y la baja intensidad de Infección por parte de estos parásitos son similares a las encontradas por otros autores en nematodos (Holst et al. 1993).

6.3 Análisis de variabilidad a nivel molecular de los Nematodos

La frecuencia de bases de las secuencias analizadas de *Contracaecum* sp. 1 y *C. sp. 2* con el gen mitocondrial *cox-1*, muestran un alto contenido de A-T (>60%), valores similares a lo descrito para especies del complejo *C. osculatum* (Dzido et al. 2012) y *C. rudolphii* (Lin et al. 2012). En el caso de ITSs, el contenido A-T es de un 51% y las bases están en proporciones muy similares, lo cual es coincidente con lo planteado por Nadler et al. (2000) para el gen ribosomal 28S en *Contracaecum*.

Los resultados del análisis de polimorfismos muestran, como era de esperar por las características propias de cada marcador molecular, que el gen mitocondrial *cox-1* posee mucha más variabilidad que la región nuclear ribosomal ITSs. Esto se debe a que por su rápida tasa de evolución acumula mayor cantidad de cambios, generando más variabilidad en la secuencia de ADN. Esto se evidencia en varios aspectos (sitios variables, filogenéticamente informativos, haplotipos) pero mayoritariamente por los bajos valores de diversidad nucleotídica para ITSs en ambas especies ($\pi = 0.0009$). En el caso de *cox-1*, hay una pequeña diferencia en dichos valores para las dos especies, dado que *C. sp. 1* presenta más variabilidad que *C. sp. 2*. Esto podría deberse a que se analizaron mayor cantidad de secuencias para *C. sp. 1* (19) que para *C. sp. 2* (12), ó que dentro del linaje de *C. sp. 1* existan individuos muy divergentes como es el caso del haplotipo 2 como se visualiza en la red de haplotipos.

En cuanto a la relación entre Ts:Tv, con el gen mitocondrial *cox-1*, *C. sp. 2* presenta valores algo más bajos que lo observado por otros autores para otras especies del género (Dzido et al. 2012). No se han encontrado en la bibliografía valores similares a lo que ocurre con *C. sp. 1*, en el cual existen más transversiones que transiciones. Como la relación entre Ts:Tv es muy similar para ambos marcadores en esta especie, se puede inferir que los marcadores *cox-1* e ITSs poseen similares tasas de evolución lo cual también puede estar indicando diferente tasa de evolución de este taxón. El mismo posee tasas de evolución molecular mucho más rápidas que *C. sp. 2*, lo que se evidencia por la saturación en ambos marcadores. La selección para *C. sp. 1* está mucho más relajada en el tipo de cambio (transiciones y transversiones), así como

también a nivel de cambios aminoacídicos para el caso de la *cox-1*. Si bien está actuando también selección purificadora, la tasa de recambio aminoacídico es mucho mayor en esta especie que en *C. sp. 2*. Estos diferentes patrones de evolución molecular podrían estar relacionados al hábitat diferencial que estos parásitos ocupan en el hospedero. En este sentido, *C. sp. 1* se aloja en el hígado del hospedador, sitio con altos niveles de oxigenación, en contraste con la cavidad abdominal que constituye el hábitat de la otra especie. Si esta tendencia es corroborada en futuros análisis, este hecho podría estar indicando estrechos niveles de co-adaptación a nivel de evolución molecular en la L3, dependiendo del hábitat ocupado en el hospedador.

6.4 Divergencia genética de las especies de *Contracaecum*

La variación interespecífica observada con ambos marcadores se encuentra dentro del rango establecido para el Filo Nematoda (Blouin et al. 1998). En este caso la divergencia entre las especies fue, en todos los casos, mayor a un 10%, por lo que ambos marcadores son eficaces en discriminar entre estas dos especies de *Contracaecum*. Resultados similares de divergencia han sido encontrados en otras especies de *Contracaecum* (Mattiucci et al. 2008; Dzido et al. 2012).

Así mismo, la variación intraespecífica observada con ambos marcadores también es concordante con lo planteado para los nematodos (Blouin et al. 1998). Dado que la divergencia genética intraespecífica observada con *cox-1* (2% aproximadamente) es mucho mayor que ITSs (menor a 1%), se considera a este marcador mitocondrial mejor que el nuclear, para realizar análisis poblacionales y discriminar entre especies muy cercanamente emparentadas.

La mayor divergencia de secuencias dentro de *C. sp. 1* comparada a la existente en *C. sp. 2*, no se puede atribuir a los tiempos de divergencia evolutiva de ambas especies dado que *C. sp. 1* tiene una divergencia más reciente (fines del Pleistoceno) respecto a *C. sp. 2* (mediados del Plioceno).

Con respecto a la divergencia entre los grupos, llama la atención que *C. sp. 2* a pesar de tener un carácter tan diferente a todas las demás como ser la presencia de 2

dientes, de todas formas tiene menor divergencia con las secuencias del Genbank que en relación a la otra especie *C. sp. 1* de Uruguay.

6.5 Relaciones filogenéticas

Todas las reconstrucciones filogenéticas indican que las especies *Contracaecum* sp. 1 y *Contracaecum* sp. 2 de Uruguay constituyen 2 grupos monofiléticos bien soportados. Si bien, las reconstrucciones con ambos marcadores (cox-1 e ITSs) son concordantes, existen en ambos pequeñas particularidades. En el caso de los árboles obtenidos con cox-1, los dos clados mencionados anteriormente, junto con otras especies de *Contracaecum* muestran que este género es parafilético.

Con cox-1 también se observa (con algunos análisis) un clado con buen soporte con secuencias de otras 4 especies de *Contracaecum* obtenidas del Genbank, que quedan por fuera del clado mayor descrito anteriormente y que colapsan basalmente con el grupo externo (*Ascaris lumbricoides*), pero sin soporte estadístico. Estas especies de *Contracaecum* podrían haber sufrido una diferenciación muy basal con respecto a las otras especies de dicho género, pero con las altas tasas de evolución de la cox-1 no es posible recuperar las relaciones a este nivel taxonómico en relación a *A. lumbricoides*.

Este marcador mitocondrial, resuelve algunas relaciones dentro del clado de *C. sp. 2*, que no son evidenciadas con el marcador nuclear ribosomal ITSs, por lo que cox-1, por sus características de rápida evolución define mejor las relaciones de diferenciación más recientes.

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas con los ITSs indican que los individuos analizados de *C. sp. 1* constituyen grupos monofiléticos recíprocos con los individuos pertenecientes a *C. sp. 2* junto con otras especies de *Contracaecum* obtenidas del Genbank. El nodo que determina la monofilia recíproca tiene un buen soporte: 0.86, 95 y 100 obtenidos en IB, ML y MP respectivamente.

El clado de *C. sp. 2* de Uruguay aparece en todos los análisis como grupo hermano de otras especies de *Contracaecum* del Genbank; por lo que estaría más cercano filogenéticamente a estas últimas especies que con la otra especie del mismo género de Uruguay (*C. sp. 1*). Esta relación filogenética que no se podía observar con el

marcador cox-1, pero si es evidenciada por los valores de divergencia genética entre estos grupos como se menciona anteriormente.

Estos 2 grandes clados, quedan bien separados con buen soporte (salvo en el árbol de MP) del grupo externo más cercano (*Anisakis simplex*). Sin embargo, este marcador tampoco resuelve las relaciones filogenéticas más basales dado que no es claro la relación que tienen estos grupos con la otra especie utilizada como grupo externo *Ascaris lumbricoides*, así como también con otras dos especies de *Contracaecum* obtenidas del Genbank que quedan por fuera del resto de las especies pertenecientes a dicho género. Una posible explicación, es estas especies no pertenezcan efectivamente al género. Por precedencia la designación de *Contracaecum* quedaría asignada al clado mayor incluyendo a las especies de Uruguay, ya que el mismo incluye a *C. spiculigerum*, especie con la que se describe dicho género (Railliet y Henry, 1912). Otra explicación alternativa, es que si se corrobora que estas especies por fuera del clado mayor son efectivamente *Contracaecum*, éste género sería polifilético en el nodo más basal. Esto estaría de acuerdo con estudios previos en que la heterogeneidad y la polifilia del género *Contracaecum* fueron sugeridas a partir de estudios con alozimas (Mattiucci et al. 2008). Otros estudios sostienen que la monofilia de la Familia Anisakidae se ve alterada cuando se incluye el género *Contracaecum* (Nadler y Hudspeth, 2000). Para corroborar dichas relaciones sería necesario realizar análisis que incluyeran una mayor cantidad de taxa.

En cuanto a los análisis realizados, el de Inferencia Bayesiana con cox-1, resuelve subclados con buena probabilidad posterior de ocurrencia dentro de los clados principales de las especies de Uruguay, que no son evidenciados con los otros métodos utilizados: NJ, MP y ML. Sin embargo, al igual que con los métodos mencionados, la IB tampoco resuelve relaciones filogenéticas profundas, como ser la separación de *Anisakis simplex* con las especies de *Contracaecum* del Genbank.

6.6 Análisis de genética poblacional

La red de haplotipos para ambos marcadores muestra la existencia de dos taxa claramente diferenciados. Así mismo, los niveles de estructuración poblacional realizados con los ITSs mediante el cálculo de F_{ST} pareados y el número de migrantes entre las poblaciones, confirman la existencia de 2 especies distintas de *Contracaecum*

según el concepto biológico de especie, donde no hay flujo génico y por tanto existe aislamiento reproductivo.

Con el marcador mitocondrial (cox-1) no se observa una estructuración tan definida de las 2 especies, dado que existen ciertos niveles de flujo génico retrospectivo entre algunas de las poblaciones de ambas especies. De hecho la población de La Coronilla de *C. sp. 2* muestra evidencia de intercambio genético tanto con la otra población de la misma especie de parásito más hacia el norte (Tacuarí), así como niveles muy bajos de intercambio genético con poblaciones de la otra especie situadas próximas a la cuenca de la Laguna Merín. Esto es de suma importancia porque nos puede estar sugiriendo que durante la diferenciación de las dos especies de parásitos, existieron diferentes momentos en las distribuciones de los hospederos de las cuencas de la Laguna Merín, Negra y cuenca litoral Atlántica. Estos episodios pueden ser coincidentes con los eventos de dispersión del hospedero durante el Plioceno y Pleistoceno–post Pleistoceno, episodios que acompañan a los múltiples eventos transgresivos y regresivos en esta región durante esos periodos (Sprechman, 1980). La estructuración obtenida por el AMOVA podría ser coherente con los posibles escenarios demográficos planteados anteriormente. Por otro lado, dado que la única especie hasta el momento donde se han encontrado las dos especies de *Contracaecum* es *A. charrua* y es la única especie que actualmente habita en La Coronilla, inferimos que ancestros de esta especie en dicha localidad pudieron albergar a ambas especies de parásitos, dando lugar al cambio de hábitat o sitio en el hospedador y a posteriores procesos de diferenciación en el hospedero definitivo que permitieran el aislamiento reproductivo entre las especies incipientes de parásitos. Algunos autores incluso han mencionado que adaptaciones a diferentes órganos o tejidos dentro de un mismo hospedador podrían llevar al aislamiento reproductivo en un grupo de parásitos (Criscione, 2006).

6.7 Análisis de demografía histórica

Si bien existe un indicio de apartamiento de la neutralidad para *C. sp. 1* con ambos marcadores, los test realizados para verificar la misma, no son concordantes por lo que se descarta dicha hipótesis.

Las relaciones filogenéticas de las especies de *Contracaecum* de Uruguay obtenidas con ambos marcadores no guardan relación con su distribución geográfica; los parentescos observados son independientes de la proximidad de los charcos, rechazando la hipótesis de aislamiento por distancia. Esta hipótesis de independencia de las distancias geográficas y genéticas es corroborada por los análisis poblacionales y de demografía histórica. Esto podría deberse a dos razones. Por un lado, los charcos estacionales de los rivúridos se comportan como metapoblaciones dado que coalescen durante los períodos de grandes lluvias (García et al. 2004; García, 2006). Además, los peces anuales aprovechan conexiones fugaces o de muy poco profundas entre las masas de agua y el adulto posee la capacidad para permanecer cortos períodos fuera del agua y efectuar pequeños desplazamientos en la tierra (Vaz-Ferreira y Sierra, 1972). Por tanto, características fisiológicas y etológicas de los hospederos, regímenes de lluvia irregulares, sumado a una historia geológica compleja de estas regiones, con transgresiones marinas importantes durante el Pleistoceno, generarían una dinámica local caótica en los charcos, facilitando la persistencia de metapoblaciones (García et al. 2004; García, 2006).

Por otro lado, el hospedero definitivo de estos parásitos (aves piscívoras o mamíferos), tienen una amplia dispersión, lo que facilita el intercambio entre los charcos.

6.8 Contrastación entre filogenias del complejo parásito-hospedador.

La agrupación de los distintos complejos observada en la reconstrucción filogenética de los rivúridos a partir del gen mitocondrial *cyt-b*, es coincidente con lo planteado por García (2002) y Costa (2006).

A su vez al comparar las filogenias de los parásitos y la de sus respectivos hospedadores, no se puede descartar la hipótesis de co-evolución entre ambos, ya que el proceso de especiación de los parásitos y la de los hipotéticos ancestros en cada

complejo de especies de hospedadores son coincidentes en el tiempo y ocurren desde el Plioceno. Por otro lado, dentro de los diferentes complejos de *Austrolebias* ocurren procesos de especiación simultánea y múltiple durante el Pleistoceno (García, 2006). De tal forma que ambos linajes de parásitos sufren episodios de invasión en diferentes especies de los distintos complejos. *Contracaecum* sp. 1 a pesar de experimentar una diferenciación más reciente, coloniza diversas especies de *Austrolebias* pertenecientes a varios complejos mientras que *Contracaecum* sp. 2 a pesar de haber divergido más basalmente, sólo está presente en algunas especies pertenecientes al complejo *A. adloffi*.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se registraron larvas (L3) de dos especies de *Contracaecum* sp. parasitando con una baja intensidad rivúlidos del Este del país. Las mismas se determinaron morfológica y molecularmente como C. sp. 1 y C. sp. 2. Ambas especies resultaron diferentes a las secuencias de otras especies del género depositadas en la base de datos del GenBank.

Los análisis de variabilidad a nivel molecular muestran gran variabilidad y altas tasas de sustituciones con el marcador mitocondrial cox-1 principalmente en C. sp. 1, lo que se podría atribuir a la invasión de un habitat diferente de estos parásitos en el hospedero. Con ambos marcadores (ITSs y cox-1) la variación intraespecífica en ambas especies es menor a un 2%, mientras que la interespecífica es mayor al 10%.

Si bien las reconstrucciones filogenéticas indican que ambas especies de *Contracaecum* constituyen 2 grupos monofiléticos bien soportados, al incorporar secuencias de otras especies del mismo género y nematodos cercanamente emparentados del GenBank el género *Contracaecum* se muestra parafilético. Con el marcador ITSs se observa que C. sp. 1 se encuentra más emparentado con otras especies del mismo género que con la otra especie de Uruguay (C. sp. 2).

La red de haplotipos para ambos marcadores muestra la existencia de dos taxa claramente diferenciados. Si bien, los niveles de estructuración poblacional mediante el cálculo de F_{ST} pareados y el número de migrantes con ITSs confirman la existencia de dos especies distintas de *Contracaecum*, cox-1 muestra ciertos niveles de flujo génico retrospectivo entre algunas de las poblaciones de ambas especies. En este sentido, la región de La Coronilla se vuelve clave como posible hábitat de ancestros de *A. charrua* que pudieran haber dado lugar al cambio de hábitat en el hospedador.

Para ambas especies de *Contracaecum* y con los dos marcadores utilizados, se descarta la hipótesis de apartamiento de la neutralidad y aislamiento por distancia. Esta última se puede adjudicar a las características de los charcos donde habitan los hospedadores

que se comportan como metapoblaciones en los períodos de grandes lluvias y a la gran capacidad de dispersión que poseen los hospedadores definitivos de estos parásitos.

Los análisis realizados podrían estar apoyando la hipótesis de co-evolución del complejo parásito-hospedador entre especies de la familia Rivulidae y parásitos del género *Contracaecum*. La diferenciación de las especies de parásitos se produce casi simultáneamente a la separación de los hipotéticos ancestros de cada complejo de especies de hospedadores intermediarios durante el Plioceno. Por otro lado, los dos linajes de *Contracaecum* colonizan de manera diferente las especies dentro de cada uno de los complejos de *Austrolebias*.

8. PERSPECTIVAS

Para la determinación taxonómica de los parásitos a nivel de especie sería necesario estudiar los adultos que se encuentran en los hospedadores definitivos (cuervillo u otras aves piscívoras). Una alternativa sería completar el ciclo de vida de los parásitos de manera artificial utilizando aves de corral.

Con el fin de descartar la existencia de *Contracaecum* en las especies de *Austrolebias* del litoral oeste del país, se prevé el análisis de más ejemplares provenientes de dicha región.

Por otro lado, sería necesario continuar buscando parásitos en la región del centro y Este del país con el propósito de ampliar las localidades de registro y eventualmente de especies de *Austrolebias* parasitadas.

A nivel de la sistemática molecular, la utilización de marcadores moleculares con tasas evolutivas más conservadas (secuencias de varios genes nucleares) en las especies de parásitos podrían dilucidar la parafilia encontrada en el género *Contracaecum*, así como las relaciones basales entre especies y géneros de la Familia *Anisakidae* y en relación a otras especies de otros órdenes.

Con un mayor número de individuos de ambas especies de *Contracaecum* se podría realizar análisis poblacionales con *cox-1* y otros marcadores moleculares altamente variables (microsatélites o SNPs), que permitan inferir nuevas hipótesis biogeográficas en relación a los eventos de colonización y dispersión respecto a sus respectivos hospederos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control 19: 716-723.
- Amato, L.H. 1986. Seis especies nuevas del género *Cynolebias* Steindachner, 1876 de Uruguay y Paraguay (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo 1: 1-27.
- Amato, J.F.R., C.M. Monteiro, y S.B. Amato. 2006. *Contracaecum rudolphii* Hartwich (Nematoda, Anisakidae) from the Neotropical Cormorant, *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Aves, Phalacrocoracidae) in southern Brazil. Revista Brasileira de Zoologia 23(4): 1284-1289.
- Anderson, R.C. 2000. The Superfamily Ascaridoidea. En: Nematode Parasites of vertebrates. Their Development and Transmition. CABI Publishing. 650 p.
- Avice, J.C. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population findings on mitochondrial DNA. Annual Review of Genetics 25: 45-69.
- Avice, J.C. 1994. Molecular markers: natural history and evolution. New York: Chapman y Hall. Bernardi G, Powers DA. 1995. Phylogenetic.
- Avice, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Second Edition Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 684 p.
- Bandelt, H.J., P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37-48.
- Bergmann, G.T. y P.J. Motta. 2004. Infection by Anisakid Nematodes *Contracaecum* spp. in the Mayan Cichlid Fish '*Cichlasoma (Nandopsis)*' *urophthalmus* (Günther 1862). Journal of Parasitology 90(2): 405-407.

- Blouin, M.S., C.A. Yowell, C.H. Courtney y J.B. Dame. 1998. Substitution Bias, Rapid Saturation, and the Use of mtDNA for Nematode Systematics. *Molecular Biology and Evolution* 15(12): 1719-1727.
- Brooks, D.R., T.B. Thorson y M.A. Mayes. 1981. Freshwater stingrays and their helminth parasites: Testing hypotheses of evolution and coevolution. En: *Advances in cladistics. Proceedings of the Willi Henning Society*. Funk, V.A. y D.R. Brooks. New York Botanical Garden. New York, New York. 147-175.
- Brooks, D.J. y D. McLennan. 1991. Neotropical Freshwater Stingrays and Their Parasites: A Tale of two Oceans. En: *Parascript. Parasites and the Language of Evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington. 57-69.
- Brown, W.M., M. Jr. George y A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76: 1967-1971.
- Bush, A.O., K.D. Lafferty, J.M. Lotz y A.W. Shostak. 1997. Parasitology meets Ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. *Journal of Parasitology* 83(4): 575-583.
- Costa, W. 2006. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa* 1213: 1-162.
- Criscione, C.D. 2006. Chapter 2, The Influence of Parasite Ecology on the Genetic Structure of Parasite Populations. In: *Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes*. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in Molecular and Cellular Biology 84p.
- D' Amelio, S., S. Cavallero, N.O. Dronen, N.B. Barros y L. Paggi. 2012. Two new species of *Contracaecum* Railliet y Henry, 1912 (Nematoda: Anisakidae), *C. fagerholmi* n. sp. and *C. rudolphii* F from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* in the northern Gulf of Mexico. *Systematic Parasitology* 81: 1-16.
- Drummond, A.J. y A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by

- sampling trees. BMC Evolutionary Biology 7: 214.
- Dzido, J., A. Kijewska y J. Rokicki. 2012. Selected mitochondrial genes as species markers of the Arctic *Contracaecum osculatum complex*. Journal of Helminthology 86: 252-258.
- Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5): 294-299.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147(2): 915-925.
- García, G., E. Scvortzoff, M. Máspoli y R. Vaz Ferreira. 1993. Analysis of karyotypic Evolution in Natural Population of *Cynolebias* (Pisces: Cyprinodontiformes, Rivulidae) using banding techniques. Cytologia 58: 85-94.
- García, G., G. Wlasiuk y E.P. Lessa. 2000. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence and phylogenetic relationships in the annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Zoological Journal of the Linnean Society 129: 93-110.

- García, G., A.I. Lalanne, G. Aguirre y M. Cappeta. 2001. Chromosome evolution in the annual killfish genus *Cynolebias* and mitochondrial analysis. *Chromosome Research* 9: 437-448.
- García, G., F. Alvarez-Valin y N. Gomez. 2002. Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killfish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 49-59.
- García, G., S. Claramunt y A.I. Lalanne. 2004. Genetic differentiation among annual fishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a Biosphere Reserve site from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes* 70: 247-256.
- García, G. 2006. Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffi* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44(1): 75-87.
- García, G., M. Loureiro, N. Berois, M.J. Arezo, G. Casanova, G. Clivio y A. Olivera. 2009. Pattern of differentiation in the annual killfish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. *Biological Journal of the Linnean Society* 98(3): 620-235.
- Guindon, S., J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk y O. Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307-321.
- Harpending, H.C., S.T. Sherry, A.R. Rogers y M. Stoneking. 1993. The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology* 34: 483-496.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66: 591-600.

- Hartwich, G. 1974. Keys to the genera of the Ascaridoides. En: Anderson, R.C., Chabaud, A.G. y S. Willmott. (eds) (1974-1983). CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. Part 2: 1-15.
- Hasan, A., S. Suguri, C. Fujimoto, R. Itaki, M. Harada, M. Kawabata, H. Bugoro y B. Albino. 2008. Genetic diversity in two sibling species of the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes on Guadalcanal in the Solomon Islands. BMC Evolutionary Biology 8: 318.
- Hasegawa, M., H. Kishino y T. Yano. 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution 22(2): 160–174.
- Hillis, D.M. y J.J. Bull. 1993. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. Systematic Biology 42(2): 182-192.
- Hillis, D.M., C. Moritz y B.K. Mable. 1996. Molecular Systematics, 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Hoberg, E.P. y D.R. Brooks. 2008. A macroevolutionary mosaic: episodic host-switching, geographical colonization and diversification in complex host-parasite systems. Journal of Biogeography 35: 1533-1550.
- Holder, M. y P.O. Lewis. 2003. Phylogeny estimation: Traditional and bayesian approaches. Nature Reviews Genetics 4(4): 275-284.
- Holmes, D.S. y J. Bonner. 1973. Preparation, molecular weight, base composition, and secondary structure of giant nuclear ribonucleic acid. Biochemistry 12: 2330-2338.
- Holst, J.C., F. Nilsen, K. Hodneland y A. Nylund. 1993. Observations of the biology and parasites of postsmolt Atlantic salmon, *Salmo salar*, from the Norwegian sea. Journal of Fish Biology 42: 962-966.

- Huelsenbeck, J.P. y K.A. Crandall. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 437-466.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111-120.
- Klimpel, S., S. Kleinertz, H. Reinhold y S. Rückert. 2007. Genetic variability in *Hysterothylacium aduncum*, a raphidascarid nematode isolated from sprat (*Sprattus sprattus*) of different geographical areas of the northeastern Atlantic. *Parasitology Research* 101: 1425-1430.
- Kuusela, J., R. Holopainen, M. Meinila, P. Anttila, P. Koski, M. Ziętara, A. Veselov, C. Primmer y J. Lumme. 2009. Clonal structure of salmon parasite *Gyrodactylus salaris* on a coevolutionary gradient on Fennoscandian salmon (*Salmo salar*). *Annales Zoologici Fennici* 46: 21-33.
- Langeron, M. 1913. Précis de microscopie: technique, expérimentation, diagnostic. Masson, Paris. 1430p.
- Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland MA.
- Lin, R.Q., G.H. Liu, Y. Zhang, S. D'Amelio, D.H. Zhou, Z.G. Yuan, F.C. Zou, H.Q. Song y X.Q. Zhu. 2012. *Contracaecum rudolphii* B: gene content, arrangement and composition of its complete mitochondrial genome compared with *Anisakis simplex* s.l. *Experimental Parasitology* 130(2): 135-140.
- Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liedloff, A. 1999. Mantel nonparametric test calculator for Windows. Version 2.0. Distributed by the author, School of Natural Resource Science, Queensland University of Technology, Brisbane.

- Lopes, F., J.A. Desmarais y B.D. Murphy. 2004. Review: Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction* 128 669-678.
- Loureiro, M. y R. de Sá. 1996. External morphology of the chorion of the annual fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia* 1016-1022.
- Loureiro, M., A. Duarte y M. Zarucki. 2011. A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. *Neotropical Ichthyology* 9(2): 335-342.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Masi Pallares, R., J. Enríquez, C. Rebollo, S. Maciel, A. Rodríguez y T. Giménez. 1990. Nematodes de los vertebrados del Paraguay y otros parásitos del nuevo mundo. Editorial de la Facultad de Ciencias Médicas-Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción. 689p.
- Mattiucci, S. 2006. Parasites as biological tags in population studies of demersal and pelagic fish species. *Parassitologia* 48: 23-25.
- Mattiucci, S. y G. Nascetti. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology* 66: 47–148.
- Mattiucci, S., M. Paoletti, J. Olivero-Verbel, R. Baldiris, B. Arroyo-Salgado, L. Garbin, G. Navone y G. Nascetti. 2008. *Contracaecum bioccai* n. sp. from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. *Systematic Parasitology* 69: 101-121.
- Mattiucci, S., M. Paoletti, F. Borriani, M. Palumbo, R. Macarone Palmieri, V. Gomes, A. Casati y G. Nascetti. 2011. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infectious Diseases* 11: 82.

- Medrano, J.F., E. Aasen y L. Sharrow. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Molnar, R., G. Bartelmes, I. Dinkelacker, H. Witte y R. Sommer. 2011. Mutation Rates and Intraspecific Divergence of the Mitochondrial Genome of *Pristionchus pacificus*. *Molecular Biology Evolution* 28(8): 2317-2326.
- Moravec, F. 1998. Nematodes of freshwater fishes of the Neotropical region. Academia, Praha. 464p.
- Nadler, S. y D.S.S. Hudspeth. 2000. Phylogeny of the ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *Journal of Parasitology* 86(2): 380-393.
- Nadler, S.A., S. D'Amelio, H.P. Fagerholm, B. Berland y L. Paggi. 2000. Phylogenetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Host, 1932 (Nematoda: Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology* 121(4): 455-463.
- Nadler, S., S. D'Amelio, D. Murray, L. Paggi, S. Siu y J.A. Sakanari. 2005. Molecular Phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from Northern Pacific Marine Mammals. *Journal of Parasitology* 91(6): 1413-1429.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M. y S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. 333p.
- Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W.O. McMillan, L. Stice y G. Grabowski. 1991. The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. Hawaii, Honolulu.
- Pardo, C.S., K. Mejía, Y. Navarro y V. Atencio. 2007. Prevalencia y abundancia de *Contracaecum* sp. en rubio *Salminus affinis* en el Río Sinú y San Jorge: descripción morfológica. *Revista MVZ Córdoba* 12(1): 887-896.

- Pontes, T., S. D'Amelio, G. Costa y L. Paggi. 2005. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of madeira by a pcr-based approach, with evidence for a new species. *Journal of Parasitology* 91(6): 1430-1434.
- Posada, D. y K.A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Presa, P., B. Pardo, P. Martínez y L. Bernatchez. 2002. Phylogeographic Congruence Between mtDNA and rDNA ITS Markers in Brown Trout. *Molecular Biology Evolution* 19(12): 2161-2175.
- Railliet, A. y A. Henry. 1912. Quelques nématodes parasites des reptiles. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 5(4): 251-259.
- Rambaut, A. y A.J. Drummond. 2009. Tracer v.1.5. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos-Onsins, S.E. y J. Rozas. 2002. Statistical proprieties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19(12): 2092-2100.
- Rodriguez, F., J.L. Oliver, A. Marin y J.R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution, *Journal of Theoretical Biology* 142: 485-501.
- Rogers, A.R. y H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 552-569.
- Rohde, K. 1982. Capítulo 6: Host-Parasite Interactions. En: *Ecology of Marine Parasites*. University of Queensland Press, St Lucia. 72-103.
- Ross, L.G. y B. Ross. 2008. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Third Edition, Blackwell Publishing. 228 p.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. 2nd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure, en L.A. Real (ed.), Ecological genetics, Princeton University Press, Princeton 3-18.
- Sprechman, P. 1980. Paleoecología, paleogeografía y estratigrafía de la región costera del Uruguay durante el Neógeno y Cuaternario. Actas II Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía, y I Congreso Latinoamericano de Paleontología. Buenos Aires (3): 237–256.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123(3): 585-595.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
- Tavaré, S. 1986. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences (American Mathematical Society) 17: 57-86.
- Thompson, J. 1994. Specialization and Coevolution since the Evolutionary Synthesis. En: The Coevolutionary Process. The University of Chicago Press, Chicago 36-55.
- Thompson, J.D., T.J., Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25(24): 4876-4882.

- Vaz-ferreira, R. y B. Sierra, 1973. Caracteres etológicos genéricos y específicos en los peces del género *Cynolebias* Steindachner 1876. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay 2: 22-35.
- Vaz-Ferreira, R. y B. Sierra. 1972. Los géneros de Cyprinodontidae de aguas temporales sudamericanas. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay 2: 36-42.
- Vicente, J.J., H. de Oliveira Rodrigues y D. Corrêa Gomes. 1985. Nematóides do Brasil. 1ra Parte. Nematóides de peixes. Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro 25: 1-79.
- Vicente, J.J. y R. Magalhães Pinto. 1999. Nematóides do Brasil. Nematóides de peixes atualização: 1985-1998. Revista Brasileira de Zoologia 16: 561-610.
- Vidal Martínez, V.M, M.L. Aguirre, T. Scholz, D. González y E.F. Mendoza. 2002. Atlas de los helmintos parásitos de cíclidos de México. Instituto Politécnico Nacional. México 182p.
- Wang, D., Y. Zhang, Z. Zhang, J. Zhu y J. Yu. 2010. KaKs_Calculator 2.0: a toolkit incorporating gamma-series methods and sliding window strategies. Genomics Proteomics Bioinformatics 8(1): 77-80.
- Wen-Hsiung, L. y D. Graur. 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland Massachusetts. 285p.
- Wourms, J.P. 1967. Annual fishes. In: Wilt FW, Wessels NK, eds. Methods in developmental biology. New York: Thomas Y. Crowell, 123-137.
- Wourms, J.P. 1972. The Developmental Biology of Annual Fishes. Journal of Experimental Zoology 182: 389-414.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323-354.
- Yamaguti, S. 1961. Systema Helminthum III. The Nematodes of Vertebrates, Parts 1 and 2. Interscience Publishers, Inc., New York 1261p.

10. ANEXO

Tabla 1. Número de acceso del GenBank de las secuencias de nematodos utilizados en los análisis filogenéticos.

Especie	Número Acceso	Gen
<i>C. radiatum</i>	AY603529	ITS ₁ e ITS ₂
<i>C. muraenesoxi</i>	EU826125	ITS ₁ e ITS ₂
<i>C. osculatum</i>	AF411203	ITS ₁ e ITS ₂
<i>C. sp. SAN2004</i>	AY821753	ITS ₁ e ITS ₂
<i>C. bioccai</i>	JF424598	ITS ₁ e ITS ₂
<i>C. rudolphii</i> 2	JF424597	ITS ₁ e ITS ₂
<i>C. sp. 2SX2008</i>	FJ009683	ITS ₁ e ITS ₂
<i>C. sp. SDA2011</i>	JF424599	ITS ₁ e ITS ₂
<i>Anisakis simplex</i>	AY821736	ITS ₁ e ITS ₂
<i>Ascaris lumbricoides</i>	AB571295	ITS ₁ e ITS ₂
<i>C. sp. JL2009</i>	FJ907321	cox-1
<i>C. muraenesoxi</i>	FJ907320	cox-1
<i>C. osculatum</i>	JF711065	cox-1
<i>C. cf. spiculigerum</i>	U57031	cox-1
<i>C. septentrionale</i>	FJ866817	cox-1
<i>C. rudolphii</i>	FJ866816	cox-1
<i>C. ogmorhini</i>	AJ616898	cox-1
<i>C. sp. CoA1</i>	AJ290967	cox-1
<i>Anisakis simplex</i>	DQ994402	cox-1
<i>Ascaris lumbricoides</i>	AB591800	cox-1

Tabla 2. Número de acceso del GenBank de las secuencias de rivúlidos utilizados en los análisis filogenéticos.

Especie	Número Acceso	Especie	Número Acceso
<i>A. wolterstorffii</i>	AF245014	<i>A. luteoflammulatus</i>	AF245459
<i>A. viarius</i>	AF245456	<i>A. gymnoventris</i>	AF245463
<i>A. viarius</i>	AY724388	<i>A. apaii</i>	HQ149647
<i>A. charrua</i>	AY724390	<i>A. noniuliensis</i>	HQ149633
<i>A. charrua</i>	AY724391	<i>A. robustus</i>	HQ149634
<i>A. adloffii</i>	AF244443	<i>A. nigrofasciatus</i>	AY724407
<i>A. reicherti</i>	AY724393	<i>A. elongatus</i>	FJ826893
<i>A. reicherti</i>	AY724394	<i>A. elongatus</i>	FJ826892
<i>A. cinereus</i>	AF245005	<i>A. monstrosus</i>	FJ826895
<i>A. vazferreirae</i>	AF245015	<i>A. prognathus</i>	AF245458
<i>A. nioni</i>	AF245457	<i>A. bellotti</i>	AF245006
<i>A. vanderbergi</i>	FJ826901	<i>A. bellotti</i>	AF245007
<i>A. nigripinnis</i>	AF245013	<i>A. adloffii</i>	AF245009
<i>A. duraznensis</i>	AF245012	<i>A. melanoorus</i>	AY724373
<i>A. affinis</i>	AF245464	<i>A. arachan</i>	AF245466
<i>A. alexandri</i>	AF245011	<i>C. melanotaenia</i>	AF245465
<i>A. luzardoi</i>	FJ826894	<i>P. glaucopterus</i>	AF245468
<i>A. patriciae</i>	FJ862897	<i>R. hartii</i>	AY619635

Tabla 3. Detalle de los haplotipos de *Contracaecum* de Uruguay.

Especie	Individuo	Haplotipos	
		ITS	cox-1
<i>Contracaecum</i> sp. 1	Pa1	H1	H1
	Pa2	H1	H2
	Pa3	H1	-
	Pa4	H1	H3
	Pa5	H1	-
	Pa6	H1	-
	Pa9	H2	H3
	Pa10	H3	H8
	Pa13	-	H4
	Pa15	H1	H6
	Pa17	H1	H7
	Pa18	H1	H8
	Pa19	H1	H5
	Pa20	H1	H3
	Pa21	H1	-
	Pa22	H1	H6
	Pa23	H1	H6
	Pa25	H1	H10
	Pa26	H1	H12
	Pa27	H1	H9
	Pa28	-	H13
	Pa29	H4	H11
	Pa51	H1	H9
<i>Contracaecum</i> sp. 2	Pa16	H5	-
	Pa24	H6	H17
	Pa31	H7	H14
	Pa32	H7	H14
	Pa34	-	H14
	Pa37	-	H18
	Pa38	H7	H15
	Pa39	H8	H16
	Pa42	H8	H16
	Pa44	H8	H16
	Pa46	H7	H19
	Pa47	H7	H19
	Pa53	H7	H20