

Biológicas  
402  
T.D

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
TESIS DOCTORAL**



**ESTUDIO DE LA FILOGENIA Y BIOGEOGRAFÍA DE LA  
FAMILIA CAMPULIDAE ODHNER, 1926  
(TREMATODA: DIGENEA)**

por

**Mercedes Fernández Martínez**

Directores

**Juan Antonio Raga Esteve  
Amparo Latorre Castillo**



Valencia, mayo 1996

UMI Number: U607677

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607677

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES

o Biológicas.

Nº Registre 8992

DATA 31.5.96

SIGNATURA

402.T.D

Nº LIBIS: j 20476097

30 ms.

**A José, porque esta tesis es tanto suya como mía,  
a mis sobrinos Fernando, José Luis y el futuro Guillermo**



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

D. Juan Antonio Raga Esteve, Profesor Titular del Departamento de Biología Animal y D<sup>a</sup> Amparo Latorre Castillo, Profesora Titular del Departamento de Genética, de la Universitat de València,

**CERTIFICAN:**

que D<sup>a</sup> Mercedes Fernández Martínez ha realizado la Tesis Doctoral titulada "Estudio de la filogenia y biogeografía de la familia Campulidae Odhner, 1926 (Trematoda: Digenea)", bajo nuestra dirección, en el Departamento de Biología Animal de la Universitat de València.

Valencia, mayo de 1996

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, sweeping loop followed by several smaller, more intricate strokes.

Fdo.: D. J.A. Raga Esteve

A handwritten signature in black ink, featuring a large, sweeping loop followed by several smaller, more intricate strokes.

Fdo: D<sup>a</sup> A. Latorre Castillo



## AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento va dirigido, muy sinceramente, hacia Juan Antonio Raga Esteve, mi director de tesis. Gracias, Toni, por hacer que este trabajo y otras muchas más cosas sean posibles; por las palabras de ánimo y el apoyo que me has ofrecido, tanto en los buenos como en los malos momentos. Y gracias por hacer que todo esto tenga una continuidad, y espero que por mucho tiempo.

Quiero que quede patente mi agradecimiento a Amparo Latorre Castillo, mi codirectora de tesis, por la constante ayuda profesional y moral a lo largo de todo el trabajo. Gracias por hacer que los graves problemas no lo parecieran tanto.

No tengo palabras para agradecer a mi compañero Javi Aznar por la ayuda que, desinteresadamente, me ha prestado. Creo que soy muy afortunada al estar trabajando con él, no sólo por su brillantez profesional sino como persona (de esas que ya no quedan muchas por ahí). También le agradezco a su mujer, Ana, el haberme "prestado a su marido", en el buen sentido de la palabra, y le pido disculpas, por habérselo "robado" en una gran cantidad de ocasiones. Muchísimas gracias a Celia, Noemí y Jesús por haber llevado tan bien la tortura de encargarse de la bibliografía, en cuya elaboración también colaboraron Vanda, Vicky, Paco y Angel. Gracias igualmente a Jesús por la ayuda en la elaboración de mapas y a Vicky por la ayuda con los artículos en alemán y por el ánimo y masajes proporcionados en los momentos necesarios. Muchas gracias a Javi B. por haberme echado una mano cuando ha hecho falta y su interés por el desarrollo de la tesis. Le agradezco a Juan Antonio Balbuena la ayuda prestada en la realización de mapas y por la revisión del resumen en inglés. También le agradezco el haber aceptado ser miembro del tribunal que juzgará esta tesis. Quiero manifestar mi gratitud hacia personas que en algún momento estuvieron trabajando con nosotros, especialmente a mis tocayas Merche 2 y Merche 3. Quiero también manifestar mi agradecimiento a mi amiga y compañera, la doctora Tapia, por su interés sobre mi trabajo y continuo apoyo, pues ella ya sabe un rato de todo esto. Gracias igualmente a Chaty, Carmen, Raquel, Soelvi, Oscar, Luis y Valeria, Concha y Sebastián, por el interés mostrado a lo largo de todo este tiempo de trabajo. Gracias también a los compañeros de otros laboratorios de Biología Animal por el interés mostrado por mi trabajo.

No quiero olvidar a ninguno de mis compañeros del Departamento de Genética. Gracias Eladio por la enorme ayuda prestada con los análisis de las secuencias y por haber sido el primero con el que aprendí algo de genética, aunque fuese machacando moscas. Muchísimas gracias a Vicky, Celia, Rafa, Pepe, Carmen, Alma, David y Toni, de los que he aprendido un montón en el laboratorio, aparte de ayudarme en todo lo que hizo falta y con los que me lo he pasado muy bien. Gracias también a Roeland por los consejos y recomendaciones a la hora de trabajar. Una mención especial va para mis ex-colaboradoras, Clara y Eva, que me ayudaron enormemente en el laboratorio. Gracias igualmente al resto de colaboradores. Igualmente, quiero agradecer a la gente de otros laboratorios la ayuda prestada en todo momento, especialmente a Pilar, del laboratorio de Bioquímica y a los P. También quiero dar las gracias a Amparo Querol por "prestarme" su laboratorio durante varios días, en la fase final de experimentación. Gracias también a Fede, José Carlos y Carmen por toda la ayuda prestada en lo que respecta a material de laboratorio. Gracias también a Ana por la preocupación constante sobre la marcha de mi trabajo, y a Fernando y Andrés por resolverme algún problema cuando lo solicité. Muchas gracias a Cristina y a Vera por la ayuda con los artículos en ruso.



Estoy muy agradecida a Ana, Plinio, Roser, compañeros del Departamento de Geología por hacer lo imposible para conseguir la información que necesitaba y a José Esteban por la ayuda en el manejo del scanner.

Agradezco también a Alicia Soto por el mes que me dedicó por entero durante mi estancia en el Natural History Museum de Londres. Gracias también al Dr. D. Rollinson por acogerme en su laboratorio durante aquella época y durante los próximos seis meses y por aceptar ser miembro del tribunal de esta tesis. Igualmente agradezco al Dr. D. Gibson por la aclaración de dudas y aporte de información, así como por aceptar ser miembro del tribunal. Gracias igualmente a la Dra Measures, Dr. Bray, Dr. B. Perrin y R. LeDuck toda la información y aclaraciones proporcionadas a lo largo del último tramo de la tesis.

Varios investigadores nos proporcionaron parte del material empleado en este trabajo, por lo que les estoy muy agradecida: Dr. L. Margolis, Dr. M.D. Daliley Dr. M. Yurakno.

Gracias al Dr. Vicente Roca y Dr. Andrés Moya por aceptar ser miembros del tribunal.

Agradezco sinceramente a Jose Antonio Ramos la ayuda prestada en cuanto a fotocopias, encuadernación, etc. y a las Isabeles por resolverme los problemas que han ido surgiendo, aunque las visitas a la secretaría eran una excusa para charlar un rato con ellas.

Este trabajo ha sido posible gracias también a la persona que me ha acompañado durante muchos años, José, mi marido. Muchísimas gracias por la paciencia mostrada todo este tiempo y por cuidarme tan bien en los momentos peores. Gracias porque además de soportar el ambiente de fin de tesis, te ha tocado responsabilizarte de las tareas domésticas, además de hacer una gran parte de las figuras. Si era afortunada al tener compañeros excepcionales, no o soy menos en el plano afectivo. Gracias Jose otra vez.

Gracias a todos mis amigos que se han preocupado de una u otra manera de mi trabajo y que han compartido, en cierto modo, mis problemas y han hecho olvidarme de los problemas en muchas ocasiones. Gracias especialmente a Maite, con la que espero compartir, espero que por lo menos cinco veces más los años que nos conocemos, otras muchas más cosas.

Muchas gracias a mis padres y hermanos por la preocupación y el apoyo constante desde que empecé a estudiar y porque sé puedo estar tranquila de que siempre los voy a tener ahí, para echarme una mano en lo que haga falta. Gracias también a mi familia política por los ánimos e interés demostrado en todo momento.

Con las prisas y los nervios de última hora, seguro que se me ha olvidado dar las gracias a alguien, pero espero que me sepan disculpar.

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca doctoral concedida por la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana.

# ÍNDICE

## SUMMARY i-ii

## 1. SISTEMÁTICA DE LA FAMILIA CAMPULIDAE 1

### 1.1. Sistemática de la familia Campulidae 2

1.1.1. Diagnósis de la familia 2

1.1.2. *Incertae sedis* 6

1.1.3. Sinonimias: subfamilias y géneros 6

### 1.2. Revisión histórica sobre el estatus y relaciones taxonómicas de la familia Campulidae 8

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 12

### 2.1. Planteamiento del problema 13

2.1.1. Criterio de autoridad 13

2.1.2. Criterios taxonómicos 13

2.1.3. Condiciones de los vermes 15

### 2.2. Justificación del trabajo 15

2.2.1. Relaciones filogenéticas 15

2.2.2. Método comparativo en biología 16

### 2.3. Objetivos 16

## 3. FILOGENIA MOLECULAR DE LA FAMILIA CAMPULIDAE 18

### 3.1. Reconstrucción de filogenias moleculares: empleo del ADN mitocondrial (mtDNA) 19

3.1.1. Características del mtDNA 19

3.1.2. Variabilidad del mtDNA 20

a) Sustituciones nucleotídicas 20

a.1) Transiciones y transversiones 20

a.2) Sustituciones sinónimas y no sinónimas 22

b) Inserciones deleciones y reordenaciones génicas 22

3.1.3. El mtDNA como marcador evolutivo 22

3.1.4. Obtención de filogenias moleculares: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Secuenciación 23

## **3.2. Materiales y métodos 24**

- 3.2.1. Especies de digénidos 24**
- 3.2.2. Extracción del DNA total 24**
- 3.2.3. Amplificación del mtDNA 26**
- 3.2.4. Clonación del mtDNA 31**
- 3.2.5. Secuenciación del mtDNA 34**
- 3.2.6. Análisis de secuencias 35**

### **I. Consideraciones previas 35**

- a) Grupos analizados 35**
- b) Elección de los taxones de referencia externa o "outgroups" 35**
- c) Ponderación 37**

### **II. Alineamiento de las secuencias 38**

### **III. Traducción de los nucleótidos en aminoácidos 38**

### **IV. Sustituciones nucleotídicas 38**

- a) Transiciones y transversiones 38**
- b) Sustituciones sinónimas y no sinónimas 38**

### **V. Detección de señal filogenética 39**

### **VI. Estacionaridad 40**

## **3.2.7. Métodos de inferencia filogenética 41**

### **a) Métodos basados en distancias 42**

- a.1) Cálculo de distancias 42**
- a.2) UPGMA, vecino más próximo y evolución mínima 42**
- a.3) Fiabilidad de los árboles 43**

### **b) Métodos basados en caracteres: parsimonia, máxima verosimilitud e invariantes de Lake 43**

- b.1) Parsimonia 43**
- b.2) Máxima verosimilitud 44**
- b.3) Método de los invariantes de Lake 44**

## **3.3. Resultados 48**

- 3.3.1. Extracción y amplificación por PCR 48**
- 3.3.2. Clonación 50**
- 3.3.3. Secuenciación 50**
- 3.3.4. Análisis de las secuencias 50**

### **I. Alineamiento de las secuencias 50**

- a) Secuencia del tRNA<sup>Leu</sup>+NADH3 50**
- b) Secuencia del gen de la NADH3 54**
- c) Secuencias aminoacídicas 57**

### **II. Composición nucleotídica 57**

### **III. Sustituciones nucleotídicas 60**

IV. Detección de señal filogenética 65

V. Estacionaridad 65

### 3.3.5. Inferencia filogenética 65

a) Inferencia de la filogenia a partir de matrices de distancias: método del vecino más próximo 65

a.1) Resultados con el grupo 1 (G1) 67

a.2) Resultados con el grupo 2 (G2) 69

a.3) Resultados globales según el método del vecino más próximo, basado en distancias 69

b) Inferencia de la filogenia a partir de caracteres 72

b.1) Parsimonia 72

b.1.1) Resultados con el grupo 1 (G1) 72

b.1.2) Resultados con el grupo 2 (G2) 74

b.1.3) Resultados del Test de Templeton 74

b.1.4) Resultados globales obtenidos por el método de Parsimonia 77

b.2) Máxima verosimilitud 77

b.2.1) Resultados con el grupo 1 (G1) 78

b.2.2) Resultados con el grupo 2 (G2) 80

b.2.3) Resultados globales con el método de Máxima Verosimilitud 80

b.3.) Método de los invariantes de Lake 81

c) Resultados globales según los cuatro métodos aplicados 82

### 3.3.6. Filogenia molecular versus taxonomía tradicional de la familia Campulidae 83

## 3.4. Discusión 84

3.4.1. Composición nucleotídica 84

3.4.2. Saturación 84

3.4.3. Filogenia molecular y taxonómica 85

I. Apreciaciones generales 85

II. Morfología 85

III. Moléculas 87

IV. Incongruencia entre moléculas y morfología 88

V. Establecimiento de taxones en la familia Campulidae 89

VI. *Nasitrema globicephalae*: ¿nasitremátido o campúlido? 91

## 4. BIOGEOGRAFÍA DE LA FAMILIA CAMPULIDAE 92

### 4.1. Introducción 93

4.1.1. Asociación por descendencia y por colonización 93

|   |     |
|---|-----|
| 4.1.2. Biogeografía   | 94  |
| 4.2. Material y métodos   | 95  |
| 4.2.1. Especies morfológicas de la familia Campulidae y sus problemas en un estudio biogeográfico | 95  |
| 4.2.2. Rangos geográficos y de hospedadores de los campúlidos                                     | 96  |
| 4.2.3. Filogenia y biogeografía histórica de los hospedadores definitivos                         | 98  |
| 4.2.4. Filogenia de cetáceos y pinnípedos   | 98  |
| (I) Filogenia de cetáceos   | 98  |
| (II) Filogenia de pinnípedos  | 103 |
| 4.3. Resultados   | 105 |
| 4.3.1. Resultados generales   | 105 |
| (I) Análisis parasitológicos en cetáceos, pinnípedos y nutria marina                              | 105 |
| (II) Análisis parasitológicos en diferentes regiones geográficas                                  | 111 |
| 4.3.2. Género <i>Lecithodesmus</i>  | 112 |
| 4.3.3. Género <i>Hunterotrema</i>   | 117 |
| 4.3.4. Género <i>Hadwenius</i>  | 118 |
| 4.3.5. Género <i>Nasitrema</i>  | 127 |
| 4.3.6. Género <i>Zalophotrema</i>   | 134 |
| 4.3.7. Género <i>Campula</i>  | 139 |
| 4.3.8. Género <i>Oschmarinella</i>  | 146 |
| 4.3.9. Género <i>Orthosplanchnus</i>  | 148 |
| 4.4. Discusión  | 159 |
| 5. ORIGEN DE LA FAMILIA CAMPULIDAE  | 177 |
| 5.1. Morfología   | 178 |
| 5.2. Probabilidad de los sucesos  | 179 |
| 5.3. Microhábitat   | 183 |
| 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES   | 185 |
| 7. APÉNDICE   | 190 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA   | 193 |

## **SUMMARY**



## SYSTEMATICS OF THE FAMILY CAMPULIDAE

The family Campulidae is composed of hermaphroditic digeneans from marine mammals (cetaceans, pinnipeds and the sea otter). They inhabit the digestive tract of their hosts, except members of subfamily Hunterotrematinae, which are found in the lungs of the Amazon River dolphin, *Inia geoffrensis*. At present, the Campulidae is formed by seven genera grouped in four subfamilies (Yamaguti, 1971; Skrjabin, 1976; Adams and Rausch, 1989): *Campula* Cobbold, 1858 and *Zalophotrema* Stunkard et Alvey, 1929 (subfamily Campulinae Stunkard et Alvey, 1929), *Lecithodesmus* Braun, 1902 (subfamily Lecithodesminae Yamaguti, 1958), *Orthosplanchnus* Odhner, 1905, *Hadwenius* Price, 1932 and *Oschmarinella* Skrjabin, 1947 (subfamily Orthosplanchninae Yamaguti, 1958) and *Hunterotrema* McIntosh, 1960 (subfamily Hunterotrematinae). Table 1 (pag. 3) lists the 34 campulid species.

The main morphological characters used in for subfamily and genus separation are the following: presence or absence of lateral diverticula in intestinal caeca, presence or absence of spines in cirrus and metraterm and the distribution and shape of the vitellaria (Table 2, pag. 5).

The taxonomy of the Campulidae, mainly based on morphological adult traits, is rather confused and there have been many transferences, synonyms (see Table 3, pag. 7), etc., among taxa. Moreover, the relationships between campulids and other families are unclear. The family Nasitremitidae, composed of digeneans from the pterigoid sinuses of odontocetes, is currently regarded as very close to the Campulidae. In fact, it was considered as a subfamily of the latter (Ozaki, 1935). The campulids have also been related to the Fasciolidae, formed by parasites of herbivorous mammals (ruminants), and the Acanthocolpidae, which includes intestinal fish parasites. Appy (1974) suggested that the excretory system of *Nasitrema gondo* Yamaguti, 1951 was more similar to that of *Fasciola hepatica* L., 1758 than that of the campulid *Zalophotrema hepaticum* Stunkard et Alvey, 1929. However, the excretory system of the latter seemed similar to that of the Dicrocoeliidae, whose species occur in vertebrates.

## JUSTIFICATION AND OBJECTIVES

### **a) Exposition of the problems**

Several factors lead to the confusion in the taxonomy of the family Campulidae as explained below:

#### **a.1) Authority criterion**

The taxonomy has been established under arbitrary criteria. Authors give different weights to the same features without explaining the reasons why a given character has more taxonomic value than other, so the investigator decides the taxonomic value of each character (authority criterion). The need for a more objective taxonomy led in the 60's to a new and more rigorous area of systematics: numerical taxonomy or phenetics. At the same time, W. Henning contributed to modern systematics by (i) emphasizing the phylogenetic reconstruction from sinapomorphies (derived and shared characters) and (ii) proposing a methodology of phylogenetic analysis based on this principle (Quicke, 1993). The use of cladistics is greatly increasing as the number of publications in the last years demonstrates. There are several methods based on cladistic principles to reconstruct phylogenies, but the more widely employed is parsimony, where the best hypothesis about relationships, based on a given data set, is the one which considers the fewest evolutionary changes.

#### **a.2) Taxonomic criteria**

As mentioned above, the taxonomy of campulids is mainly based on morphological and/or morphometrical adult features. This is probably because nothing is known on life cycles as they occur in the marine environment, and particularly in pelagic waters. In this context, there is not an unanimous agreement on which characters are more reliable for phylogenetical reconstruction: those from the larval stages or from the adults. Advocates for larval-stage characters argue that adult features are unreliable as they often result from convergent evolution. Conversely, the adult-character school consider larval traits as convergent. Brooks et al. (1985) carried out a cladistic study of the Digenea using both types of characters, concluding that larval and adult traits indicate the same phylogenetic relationships. Independently of

the type of characters used, the inference of phylogenetic relationships illustrates the problem of homoplasy identification.

### **a.3) Specimen conditions**

Several factors complicate taxonomic studies of campulids based on morphological characters. First, material in good condition is scarce, which often results in ambiguous and incomplete descriptions of the species. One of the reasons for this is that parasites are very often collected several hours after the host's death, which may result in degenerative changes. Adams and Rausch (1989) suggested a sequential loss of tegumental, metraternal and cirral spines in the Campulidae, spination being of taxonomic value for generic diagnosis. Gibson (1979) noted the need of using fresh material for taxonomical purposes.

### **b) Justification of the study**

#### **b.1) Phylogenetic relationships**

In view of the problems explained above, we tried to cast some light on the phylogenetic relationships of the family Campulidae using a different methodology, based in the analysis of DNA sequences. No fresh specimens are needed for the molecular technique used (PCR, see below), thus overcoming at least the problem posed in item 2.1.3. In addition, the authority criterion (see 2.1.1.) has no sense in a molecular study, since the different approaches to sequence analysis are based in cladistic principles (parsimony) or phenetics (UPGMA). Other methods, as Neighbor-joining, do not exactly fit to any of these two principles (Li y Graur, 1991). In molecular phylogeny, a better classification of methods would be distinguished between distance and character-state approaches (see below).

#### **b.2) The comparative method in biology**

Well-founded phylogenetic hypotheses can be used to generate predictions about the evolution of many biological systems from biochemical and physiological to behavioural studies (Quicke, 1993). All this would integrate a part of comparative biology, which studies the diversity of organisms and the explanation of this diversity

(Wiley, 1981). Systematics is one part of comparative biology, in such a way that the investigator is interested in estimating the pattern of organismal diversity from which the historical course of evolution may be inferred. Therefore, the interest in obtaining a phylogenetic tree rests not only in determining the relationships among taxa, but in their use as a tool to deepen in the processes that come out beyond a simple topology. In this study, one of the interests of obtaining a phylogeny deals with the investigation of parasite-host association patterns from prediction of coevolution or colonization events.

### **c) Objectives**

The aims of this study are the following:

a) To cast some light on the phylogenetic relationships among genera of the family Campulidae by studying a mitochondrial gene.

b) To contribute to the knowledge of the phylogenetic relationships between the Campulidae and other digenean groups. In addition, I will try to clarify whether the family Nasitremitidae is or not an independent sister group of the family Campulidae. On the other hand, we will attempt to cast some light on the problem of the origin of Campulidae, investigating the relationships of this family respect to Fasciolidae and Acanthocolpidae.

c) To explore the processes which could have led to the association between campulids and their hosts. Alternative preliminary hypotheses for coevolution and colonization will be evaluated based on the consistence, or not, of host and parasite phylogenies, and biogeographic information.

# MOLECULAR PHYLOGENY OF THE FAMILY CAMPULIDAE

## 1. Reconstruction of molecular phylogenies: use of mitochondrial DNA (mtDNA)

### Characteristics of mtDNA

Metazoan mtDNA has structural characteristics different from other genic systems:

1. Compact disposition of genes, with few or no intergenic sequences.
2. No introns in structural genes (protein-coding and RNA-specifying genes).
3. Disperse distribution of tRNAs among the rest of genes.
4. Concentration of regulatory sequences at the control region.

Other important feature is the great simplicity of the metabolism enzymes in contrast to that of the nuclear genome. Nuclear DNA repair involves complex enzymatic systems, not found in mtDNA. This repair deficiency has been related to the high rate of change in mtDNA (nucleotide substitution rate). Other characteristics of mtDNA are the maternal inheritance and the absence of recombination (Brown, 1985; Avise, 1986; Moritz et al., 1987; Simon, 1991). All of this makes mtDNA a simple genic system of easy extraction and manipulation and of great simplicity (small size, no introns, etc.).

### Variability of mtDNA

Three types of phenomena are responsible for mtDNA variability: nucleotide substitutions, insertions-deletions and genic reordenations (inversions and transpositions).

## a) Nucleotide substitutions

### a.1) Transitions and transversions

Nucleotide substitutions are the main responsible for mtDNA variability and consist in the replacement of one nucleotide by another. Transitions are the replacement of a purine (Adenine (A) or Guanine (G)) or pyrimidine (Thymine (T) or Cytosine (C)) by other purine or pyrimidine, respectively. Transversions are substitutions between purine and pyrimidine. There are two types of transitions, from A to G (or vice versa) and from T to C (or vice versa). Transversions are from A to T (or vice versa), from A to C (or vice versa), from T to G (or vice versa) or from C to G (or vice versa) (see Fig. 1, pag. 21).

In mtDNA, transitions occur more frequently than transversions, but only in closely related species (Brown et al., 1982; DeSalle et al., 1987). If taxa are distant in time, the succession of multiple transitions and the accumulation of transversions, which erase transitional differences, can eliminate this transitional bias (see Table 4, pag. 21) (DeSalle et al., 1987). Regions with high levels of substitutions are called saturated (Simon, 1991). According to Aquadro et al. (1984), the diminution in transition proportion as divergence increases is a consequence of transitions masked by transversions.

### a.2) Synonymous and non synonymous substitutions

A synonymous (or silent) substitution occurs when the replacement of one nucleotide by another does not change the amino acid, otherwise we have a non synonymous (missense) substitution. The silent substitution rate is higher than that of non synonymous substitution because a change in an amino acid can produce an unfavourable variation in the protein. Generally, a substitution at second codon position changes always the amino acid, while a fraction of substitutions at first and specially at third codon positions are synonymous:  $\cong 5\%$  for first position and  $\cong 72\%$  for third position (Nei and Gojobori, 1986).

## **b) Insertions, deletions and genic reordenations**

Insertions are the addition of one or more nucleotides in the sequence and deletions are the loss of one or more nucleotides. Inversions are the 180° rotation of a DNA segment and transposition are the movement of sequences from a part of the chromosome to another. The frequency of these phenomena is much lower than that of substitutions.

## **mtDNA as evolutive marker**

The high degree of polymorphism, together with maternal inheritance, make the mtDNA a suitable molecule to reconstruct evolutive relationships between species. This offers new and broad perspectives to determinate phylogenetic relationships because the latter are not masked by recombination. Moreover, the use of mtDNA sequences in the resolution of phylogenies allows to know the evolutive dynamics of the mitochondrial genome and its implication as molecular marker with phylogenetic purposes. However, we have to consider the effect of several factors when inferring phylogenies as variation of substitution rates intra- and inter-taxa, structural and functional constrictions, saturation by multiple substitutions, nucleotide composition bias, altered patterns of nucleotide substitutions, etc. (Moritz et al., 1987; Simon, 1991).

## **Obtaining molecular phylogenies: Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing**

PCR is a fast and advantageous method of DNA amplification (Mullis et al., 1986), because (i) a rapid selection, isolation and amplification of DNA regions from a small amount of tissue, using oligonucleotides or primers is feasible (Simon, 1991); and (ii) non fresh samples (frozen, preserved in different solutions, etc.) can be amplified (Pääbo, 1989; Rogers et al., 1990). By sequencing, the total characterisation of nucleotides of the amplified DNA fragment is possible. After sequencing, we can quantitatively estimate the nucleotide divergence among compared mtDNAs.

These techniques have been used in this study to obtain the phylogeny of the family Campulidae. More detailed information will be given in the next section.

## **2. Materials and methods**

### **Digenean species**

Table 5 (pag. 25) lists the 20 species of which mtDNA was sequenced. 15 species belong to the Campulidae, 2 to the Nasitremitidae, 1 to the Fasciolidae, 1 to the Dicrocoeliidae and 1 to the Acanthocolpidae. *F. hepatica* (Fasciolidae) sequence was obtained from Genbank (access number M93388). From the total of sequenced species, only 7, plus *F. hepatica*, were used in the analysis because of some problems which will be explained in the Results section (item 3.3.): five campulids *Campula oblonga*, *Zalophotrema atlanticum*, *Hadwenius tursionis*, *Orthosplanchnus fraterculus* and *Oschmarinella mascomai*, one nasitrematid *Nasitrema globicephalae* and one dicrocoelid *Dicrocoelium dendriticum*.

### **Extraction of total DNA**

Total DNA was extracted following Lumb et al.'s (1993) protocol, with some variations. We used one specimen, or just a fragment if the worm was large. The protocol is based on leaving the sample (in 70% alcohol) for two days in alcohol of less concentration and subsequent immersion T.E. 1x for 24 hours. Then, the sample homogenised in a buffer with T.E. 1x K proteinase (0,2 mg/ml) and 1% Triton X100. The mix is incubated at 37°C for 4 or 5 hours. Then, DNA is phenol-chloroform extracted (Sambrook et al., 1989) and finally, resuspended in T.E. 1x.

### **mtDNA amplification**

The Polymerase Chain Reaction (PCR) requires the use of oligonucleotides or primers with a homologous sequence to the regions limiting the mtDNA to amplify. In this study, we used two primer pairs, which limited the gene of the subunit 3 of the nicotinamide-adenine-dinucleotide dehydrogenase (NADH3) from the respiratory chain (see Fig. 2, pag. 26). Partial tRNA of the isoleucine and complete tRNA of the leucine were amplified as well. Both tRNAs flanked the 5' extreme of the NADH3 gene (Fig. 2).

The first pair of primers were designed from the NADH3 sequence of *F. hepatica* (see Garey and Wolstenholme, 1989). We selected this gene for two reasons: first, it is a mitochondrial gene, having the advantages discussed in item 3.1.. Moreover, other subunits of this gene have been employed to reconstruct the phylogeny of the *obscura* group of *Drosophila* (Barrio et al., 1994). Second, of the supposedly related species to campulids, *F. hepatica* is the only species where the partial sequence of mtDNA is known, including the NADH3.

Both primers have 25 base pairs and their sequences are the following:

1. Direct (PDF): 5'-GCGTTAGCAGGATCCTGTGATATAG-3' (Durviz, S.A.)
2. Reverse (PRF): 5'-CCAAAGCTTAAATCATCGTTAGCAG-3' (Durviz, S.A.).

The first oligonucleotide corresponds to positions 1263 to 1287 of the *F. hepatica* NADH3 sequence and the second to positions 1767 to 1791. the total length of the amplified fragment was 480 base pairs. Underlined are the restriction sites for the *Bam*HI enzyme in the first primer and for the *Hind*III enzyme for the second primer. Thus, it is possible to clone the PCR products as we shall explain below.

Since results were difficult to obtain with the first pair of primers, the possibility that the homology between primers and DNA was unsuitable for amplification was considered. For this reason, two new primers (PDC-PRC) were designed from two previous sequences, obtained with the first pair of oligonucleotides (*C. oblonga* and *O. mascoma*). Their sequences are the following:

1. Direct (PDC): 5'-CTACTAGTGAGATTGATCT(T/C)CGTCGGT-3' (Pharmacia).
2. Revers (PRC): 5'-CTACTAGTCCCACTCAAC(G/A)TAACC(T/C)T-3' (Pharmacia).

The total length of the amplified fragment was 468 base pairs. Underlined are the restriction sites for *Spe*I enzyme.

PCR protocol was from Kwiatowski et al. (1991), slightly modified. See Table 6 (pag. 28) for reagents and concentrations of PCR reaction. The basic steps of PCR reaction are:

DNA denaturalisation for 5 minutes at 95°C, before adding the polymerase (this improves the reaction efficiency). Then, the 50 PCR cycles start following three basic steps (see Fig. 3, pag. 29): dissociation of the two DNA strands for 1 min. at 95°C; annealing, primer join to the homologous sequences of DNA target due to a rapid decrease of temperature to 45°C for 2 min.; extension of the new DNA chain at 72°C for 1-2 minutes. A final step at 72°C for 5 min. was added to eliminate inespecific unions. Negative controls (without DNA) were used to detect DNA contamination.

We used additional methods to obtain cleaner PCR products as the Hot-start method (Chou et al., 1992) and Heat-Soaked PCR (Ruano et al., 1992). Both consist in a total denaturalisation of DNA and avoiding the union of primers and DNA before the reaction starts.

Despite the advantages of PCR, DNA amplification was difficult in our case due, among other reasons, to the poor condition of the samples. Worms were collected from hosts dead for several hours or one or more days. Sometimes, viscera were frozen for further examination. Parasites were preserved in 70% alcohol, 10% formaline or glycerine-alcohol. During these processes, DNA can be seriously damaged, rendering difficult its amplification.

### **mtDNA cloning**

Amplified mtDNA with the first set of primers (PDF-PRF) was digested with *Bam*HI and *Hind*III. The fragment was visualised in a low melting point agarose. The fragment was cut from the agarose and melted at 65°C to clone it. pUC18 and pUC19 (Boehringer M.) clonation vectors were also digested with the above enzymes. Ligation with T4 ligase was carried out at 19°C between 15 and 16 hours. The ligation mix was transformed in DH5- $\alpha$  *Escherichia coli* competent cells. Recombinant plasmids were selected in LB+ampicilin plates and white colonies, with plasmid and insert, were grown in LB liquid (see Fig. 4, pag. 32). Recombinant plasmids were extracted by

alkaline lysis of Birnboim and Doly (Sambrook et al., 1989) and characterised by restriction to determine if inserts had the size expected.

DNA from *D. dendriticum* was amplified by combination of two set of primers (PDC-PRF). Therefore, the fragment was digested with *SpeI* and *HindIII* and clonation vector pUC18 with *XbaI* and *HindIII*.

Amplified fragments with the second set of primers (PDC-PRC) were digested with *SpeI* to increase cloning efficiency (E. Barrio, com. pers.) (see Fig. 5 a, b, c and d, pag. 33). Primers have restriction sites to *SpeI* (G/CTAGC), which has few targets in different genomes. Moreover, it is compatible with the restriction site of *XbaI* (T/CTAGA) in clonation vectors. The PCR fragment was digested with *SpeI* (Fig. 5a). Then, the fragment digested with *SpeI* and vector-digested with *XbaI* were ligated with T4 ligase. The union of the fragment ends and vector created a mix sequence not recognised by the *XbaI* present in the reaction (Fig. 5b). If the vector religates (Fig. 5c), *XbaI* linearises it (Fig. 5d), facilitating again the introduction of the insert in the vector.

### **mtDNA sequencing**

We used Sanger method, modified by Mierendorf and Pfeffer (1987), using radioactive sulphur as marker. The following oligonucleotides were used as initiators:

1. Universal primer d5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (Pharmacia).
2. Reverse primer d5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (M13/pUC, Boehringer M.).
3. Direct primer d5'-CGAAAGGGGGATGTGCTGCAA-3' (Pharmacia) designed at -40 nucleotides from *EcoRI* restriction site of pUC19.
4. Reverse primer d5'-ACACTTTATGCTTCCGGC-3'.

Sequencing samples were run in 8% polyacrilamide with 8M urea as denaturalising agent and TBE1x buffer. The samples run for 2-3 hrs at 2500V for short

runs and up to 5-5½ hrs at 2500V for long runs. The partial DNA sequence for *Z. atlanticum* was obtained by an automatic ABI sequencer.

## **Analysis of sequences**

### **I. Previous considerations**

#### **a) Groups analysed**

We considered two groups:

-Group 1 (G1): formed by the sequences of *F. hepatica*, *D. dendriticum*, the nasitrematid, *N. globicephalae*, and five campulids: *Z. atlanticum*, *O. mascomai*, *O. fraterculus*, *C. oblonga* and *H. tursionis*.

-Group 2 (G2): formed by the five campulids, *F. hepatica* and *D. dendriticum*.

The relationships between all the species of the different families studied (G1) and, between the campulid species were studied (G2).

#### **b) Choosing the outgroup**

This is a very important task, to such an extent that part of the mistakes in phylogenetic reconstruction are caused by using of inappropriate outgroups. The outgroup must neither be too distant nor too close from the taxa studied. To obtain the right topology and minimise homoplasies, the sister group of the ingroup must be selected. However, it is advisable to use more than one outgroup, because as the sister group is selected from morphological data, it is possible that a single outgroup cannot properly identify its position relative to the ingroup (Maddison et al., 1984). With only an outgroup, homoplasies can hide synapomorphies (derived and shared characters) (Smith, 1994). The choice of more outgroups can be performed in two ways: by adding more taxa to the sister group of the ingroup, or by adding representatives of more distantly related groups. The first option seems more appropriate, but sometimes the sister group has not extant members or it is not

possible to sequence them. In this case, the second option becomes the only one (Smith, 1994).

In this study, *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum* were used as outgroups. We employed *F. hepatica* because it belongs to a family presumably related to the campulids, to the extent that campulids and fasciolids might be sister groups (see chapter 5 on the origin of the family Campulidae). In addition, the sequence of the NADH3 gene of this species was known (Garey and Wolstenholme, 1989). A representative of the Acanthocolpidae, *Stephanostomum baccatum*, was also considered as an alternative sister group, because the acanthocolpids have also been related to the campulids (see chapter 5). However, DNA amplification of the acanthocolpid species was not successful despite multiple attempts. As Smith (1994) suggested, we tried to use as second outgroup another fasciolid, *Fasciolopsis buski*, but again it was impossible to obtain its sequence (Table 5, pag. 25). Finally, we employed a species supposedly more distant to the campulids than the fasciolids, *D. dendriticum* (Table 5). The choice of this second outgroup is relevant given Appy's (1974) suggestion relating the campulids with the dicrocoelids (see item 1 above).

### c) Weighting

In several of the methods employed, we considered the different codon positions in the coding sequence (NADH3), i.e. only the first and second position on one hand, and only the third codon position on the other hand. We also considered, on one hand, transitions and transversions together and, on the other hand, only transversions. The purpose of weighting codon positions and transversions is to emphasise positions and substitutions which are conservative in DNA sequences (Hillis et al., 1993; Miyamoto et al., 1994). Conservative sites and substitutions are the best indicators of phylogenetic history because parallel mutations and retromutations are less likely there. The first and second codon positions are characterised by a slower evolution rate than the third positions. Similarly, transversions accumulate at a slower rate than transitions (see point 3.1.2.).

## **II. Sequence alignment**

We used CLUSTAL V (Higgins and Sharp, 1988) to align nucleotide and amino acid sequences. Provided that the nature of the sequences was different, i.e., a tRNA leucine gene, a NADH3 gen and a small intergenic zone (see results below), we did two alignments: first, all the sequenced region (tRNA+NADH3) and, second, only the NADH3 gene. Only tRNA sequence was not aligned because of its short length.

## **III. Translation of nucleotides in amino acids**

The program GCG (University of Wisconsin) and mtDNA code of *F. hepatica* (Garey and Wolstenholme, 1989; Ohama et al., 1990) were used (see Table 7, pag. 39).

## **IV. Nucleotide substitutions**

### **a) Transitions and transversions**

The number of transitions and transversions were calculated with MEGA v 1.01 (Kumar et al., 1993).

### **b) Synonymous and nonsynonymous substitutions**

The proportion of synonymous and nonsynonymous substitutions per site were calculated according to Nei and Gojobori (1986) method with DISTANCE v 3.0 (López-Bueno and González-Candelas, 1992).

## **V. Phylogenetic signal**

Prior to the reconstruction of a phylogeny, it is advisable to detect the presence of the phylogenetic signal, i.e., whether the data brings information on the phylogenetic relationships among taxa (Hillis and Huelsenbeck, 1992; Hillis et al., 1993). The parameters that indicate the presence of phylogenetic signal were calculated with PAUP v 3.1 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) (Swofford, 1985) and are the following: a) number of most parsimonious trees (minimise the number of mutational

steps); b) number of mutational steps to the next most parsimonious tree and c) the  $g_1$  value of the tree length distribution. The statistic  $g_1$  is a measure of the distribution asymmetry (Sokal and Rohlf, 1981). The value of  $g_1$  is 0 for a symmetric distribution,  $g_1 < 0$  if the distribution is skewed to the left and  $g_1 > 0$  if to the right. Correlated character occur when  $g_1 < 0$  and this is expected the phylogenetic signal occurs (the correlation is the result of a shared history, Hillis et al., 1993). The tree length distributions and  $g_1$  value were calculated first considering transversions and transitions together and second only transversions.

## **VI. Stationarity**

Other important aspect is the stationarity. Saccone et al. (1993) give the following example to illustrate this property. Let us consider three extant species, B, C and D and their ancestor A (Fig. 6, pag. 41). If the three species are under the same mutational pressure and the common time of divergence is not too long, the average base frequencies  $q_i$  ( $i = A, C, G, T$ ), are expected to be the same within statistical fluctuations in the homologous genes at equivalent positions (i.e., first, second or third codon positions in protein coding genes). This condition is known as stationarity. But if one of the species, D, for instance, is subject to directional mutation pressures other than those acting along the lineages leading to B and C, we expect the stationarity for sequence D to be lost. Therefore, the number of base substitutions between B and D or C and D will be different from those between B and C. Stationarity was confirmed by PHYLIP v. 3.41 (Felsenstein, 1990).

## **Methods of phylogenetic inference**

Methods of phylogenetic analyses can be divided in character-state methods and distance methods. The latter transform nucleotide variability in a distance value, while the former (e.g. parsimony) are based in phylogenetic informative positions. A site is informative when there are, at least, two different types of nucleotides in a particular position, and each is represented, at least, in two of the sequences (Li and Graur, 1991). In this study, both types were employed.

## a) Distance methods

### a.1) Calculation of distances

We applied Kimura 2 parameters distance as it assumes a different substitution rate for transitions and transversions. This method also assumes that nucleotide frequencies are 0.25 for each, which was not met by the data. For this reason, we also utilised algorithms which consider this condition: Tamura, Tamura-Nei and Tajima-Nei distances. The first and third algorithm take the base compositional bias into account. Tamura-Nei method considers different transitional substitution rates between purines (A and G) and between pyrimidines (T and C). Calculations were made with MEGA v 1.01.

### a.2) Distance methods

There are several distance methods, such as UPGMA, Neighbor-joining and Minimum evolution. We employed one of the most common methods, Neighbor-joining, which allows the use of unequal evolution rates and calculations are very simple. Tree reconstruction was made using MEGA v 1.01.

a.3) Tree reliability. We applied the bootstrap technique to evaluate the reliability of the trees (Felsenstein, 1985). A total of 1,000 replications were made for the results being statistically reliable (Hedges, 1992). The values at the tree nodes were significant when a group appeared more than 70% of the times (Hillis and Bull, 1993).

## b) Methods based in character-states: parsimony, maximum likelihood and Lake's invariants

b.1) Parsimony. This method selects the most parsimonious tree. We used Fitch's parsimony, which assumes that every character (nucleotide) is able to transform directly in any other state with the same probability.

b.2) Maximum likelihood. It is the most general statistic method to infer phylogenies. Supposing that we have an evolutive model (M) and data (D)

(nucleotides), the likelihood of a tree (T) is the probability of the observed data (D) to have occurred (Felsenstein, 1988). The method consists in proposing hypotheses and test them from the empirical nucleotide frequencies and different rates between transitions and transversions (Ts/Tv), to obtain the maximum likelihood tree.

b.3) Lake's invariants or evolutive parsimony. This method permits the elimination of the effect of homoplasies in parsimony-based phylogenetic reconstructions. Groups of four sequences are analysed, only the nucleotide positions in which two sequences have purines and the other two, pyrimidines being considered. The rationale of this method is that if this distribution results from a parallel change, it is equally probable that the resultant base pair is equal or different (e.i., two pyrimidines could change to two adenines or two guanines with the same probability that they could be change to one adenine and one guanine). But if the change is produced by a single informative apomorphic event, the resultant bases should be the same. The method considers which of the three possible unrooted trees of four taxa is supported by a particular distribution of transversions. The three unrooted topologies with four sequences (1, 2, 3 and 4) are: ((1, 2), (3, 4)), ((1, 3), (2, 4)) and ((1, 4), (2, 3)) (Fig. 7, pag. 45). If a convergence event occurs (parallel transversions), the total number of transversions which originates similar nucleotides must be approximately the same to that which originates different nucleotides. Counting both types of transversions (those that originate the same nucleotides and those that originate different nucleotides), the difference must be zero. But if transversions are informative the difference between both types of transversion will differ from zero. A Chi square test is applied to establish whether the difference is significantly different from zero, but if the number of transversions is small, it is advisable to use the binomial distribution test (Holmquist et al., 1988).

Parsimony is the commonest method based on character-state because of its simplicity, the easy interpretation of the results, the capacity to predict ancestral characters and mutational steps in each branch, the availability of efficient programs for calculation and the flexibility in weighting (Hillis et al., 1993). We applied this method using PAUP v 3.1. In parsimony, characters are considered independent; therefore it is possible to analyse sequences from different genic regions (Swofford and Olsen, 1990). We analysed, on one hand, the partial sequence of the leucine tRNA together with the coding gene (tRNA+NADH3) and, on the other hand, only the

NADH3 sequence. Templeton test for predefined topologies was used to compare every topology with the most parsimonious tree and bootstrap, to test the reliability of the trees. DNAPARS program from PHYLIP v 3.5 were employed.

DNAML program from PHYLIP v 3.5 was used to find the maximum likelihood tree. The analyses were made with the coding sequence NADH3 and with sequence of tRNA+NADH3, as independence of the character is assumed in this method.

Lakes' invariants were applied in cases where the relationships were not clarified by other methods. PHYLIP v 3.5 was used for calculations.

### **3. Results**

#### **Extraction and PCR amplification**

The main problem with PCR was the contamination of DNA between samples, because of the use of partially degraded material. This is why of the 20 species sequenced (Table 5, pag. 25), only seven were free of contamination (see Table 8, pag. 48). The question is to manipulate the DNA as little as possible during extraction and preparation of PCR reaction. Once this problem was detected, we used new material for sample homogenisation. Filter tips and different pipettes for PCR and DNA handling were employed. The similarity in sequences of *Oschmarinella mascomai* and *Orthosplanchnus fraterculus* lead us to consider the contamination problem, but the DNA of these species were amplified, cloned and sequenced three times.

In Table 8 (pag. 48), the combination of the two set of primers used to amplify the species used in the phylogenetic analysis is shown. Many attempts to amplify the DNA from the campulid species *Lecithodesmus goliath* and *Hunterotrema macrosoma* and the acanthocolpid *Stephanostomum baccatum* were not successful.

#### **Cloning**

The first set of primers showed unfortunately a restriction site for *HindIII*. It was possible to clone some species with this set of primers from partially digested DNA. The second pair of primers did not show any problem.

## **Sequencing**

Table 9 (pag. 51) shows the total number of nucleotides sequenced, only considering the species used in this study and if each strand had been read only once. However, both DNA strands were read more than twice in each species.

## **Analysis of sequences**

### **I. Sequence alignment**

#### **a) tRNA<sup>Leu</sup>+NADH3 sequence**

Fig. 9 (pag. 52 and 53) shows the alignment of tRNA<sup>Leu</sup> and the NADH3 coding sequence for the 8 species used in this study.

#### **b) NADH3 coding sequence**

Fig. 10 (pag. 55 and 56) shows the alignment of the NADH3 coding sequence by codons. A total of 363 nucleotide positions were aligned.

#### **c) Amino acid sequences**

Only in *F. hepatica* and *D. dendriticum* amino acid sequences Metionine (ATG) appeared as initiation codon. However, in campulid and nasitrematid sequences, a Valine (GTG) was the initiation codon (see alignments of Figs. 10 and 11). This codon has been described occasionally (Garey y Wolstenholme, 1989). The NADH1 coding sequence of *F. hepatica* has also this initiation codon (Garey y Wolstenholme, 1989). One important explanation is that reverse primer PRC coincided with the final part of the gene, containing then the stop codon. In the analyses we included this reverse primer to complete translation of the gene in species amplified with the second set of primers (Table 8).

A total of 121 amino acid positions were aligned (Fig. 11, pag. 58).

## II. Nucleotide composition

In Table 10 (pag. 59) the total and per codon position nucleotide frequencies (in %) in the NADH3 coding sequence are shown.

Summarising, the sequences presented a high content in thymine, which globally formed 50% of the nucleotides. Guanine was present with a total percentage of near 30%. The total composition of thymine+guanine was of 77,4%, being at 3rd codon position of 86,6%. The three codon positions were greatly represented by thymine. Guanine appeared with higher frequency at 3rd codon position. It is worth noting that adenine and, specially cytosine appeared in low proportion.

Table 11 (pag. 60) shows the nucleotide frequency in the tRNA+NADH3 sequence. The results were comparable to those obtained with NADH3 coding sequence.

## III. Nucleotide substitutions

Table 12 (pag. 61) shows the total transitions and transversions in the NADH3 coding sequence, between pairs of species. Among campulids (*Z. atlanticum*, *H. tursionis*, *O. fraterculus*, *O. mascomai* and *C. oblonga*), the number of transitions were higher than transversions, representing between a 60% and a 100% of the nucleotide substitutions. The same was observed with *N. globicephalae* (family Nasitrematidae) with respect to the campulids. When comparing *F. hepatica* and *D. dendriticum* sequences with the rest of species, we observe that the number of transversions was higher than transitions. Transversions represented between 57% and 70% of the nucleotide substitutions. Only four transitions and no transversions between *O. fraterculus* and *O. mascomai* occurred.

As shown in Table 13 (pag. 61), there was no dominance of any of the two transition types. Regarding transversions, data of Tables 14 and 15 (pag. 61) suggest that T-G transversions occur in higher number than C-G, A-T and A-C transversions.

Similar results were obtained with the tRNA+NDH3 sequence (Tables 16, 17, 18 and 19, pag. 63).

Fig. 12 (pag. 64) shows the transition variation percent with respect to the nucleotide divergence for each pair of species in the NADH3 coding sequence, according to Kimura 2 parameters method. We observe a decrease of the transition proportions as the nucleotide divergence is increasing, indicating the existence of transitional saturation (see introduction of this section).

Table 20 (pag. 64) displays the synonymous and nonsynonymous substitutions per site, according to the Nei and Gojobori (1986) method. It is apparent that silent (synonymous) substitutions are in higher proportion than nonsynonymous.

#### **IV. Detection of phylogenetic signal**

The data exhibited phylogenetic signal.

#### **V. Stationarity**

Stationarity was also present in the data.

#### **Phylogenetic inference**

##### **a) Phylogenetic inference from matrix distances: Neighbor-joining method**

The results were similar with all the algorithms but we will only show those obtained with Kimura 2 parameters, because the results are as consistent as those of the more complex algorithms (Hillis et al., 1993; Kumar et al., 1993).

We performed the analyses considering the type of substitutions (transitions and transversions, Ts+Tv, and only transversions, Tv) and codon positions (the three positions, 1st and 2nd, and only 3rd position). Tables 21, 22, 23 and 24 (pag. 66) show the values of nucleotide divergence. Table 21 shows the distances considering the three codon positions; Table 22 considering the two first positions; Table 23 with only the 3rd base and Table 24, considering only Tv.

Fig. 13 (pag. 68) shows unrooted trees topologies for G1 with this method, considering (A) transitions and transversions together and the three codon positions, (B) the two first codon positions, (c) only the 3rd codon position and (D) only transversions. In Fig. 14 (pag. 70) shows the same results but for G2. Numbers at nodes indicates the bootstrap values.

### Global results

I. Independently of the assumption considered for the phylogenetic analysis (Transitions+Transversions, only transversions, the three codon positions, 1st and 2nd codon position, 3rd codon position) and the group studied (G1 or G2), it appeared a solid relationship between the campulids *O. mascomai* and *O. fraterculus*. The reliability of this relationship was supported in practically 100% of the times (see topologies 13 and 14).

II. Similarly, it seems that there is a close relationships among *C. oblonga* and the pair *O. mascomai* and *O. fraterculus*, although in G1, only when considering the two first codon positions and only transversions, the reliability of this relationships was significant (Figs. 13B and D, respectively). In G2, we saw that only when considering the 3rd codon position, the bootstrap value for this clade was not significant (Fig. 14C).

III. The situation of the nasitrematid, *N. globicephalae*, was nor clearly established, as it was indicated by the low bootstrap values and the polytomy observed in the topologies of the Fig. 13A, B, C and D. The union of *N. globicephalae* to *C. oblonga*, *O. mascomai* and *O. fraterculus* was supported in 69% (almost significant ), considering transitions and transversions (Fig. 13A). Excluding *N. globicephalae* from the analysis (G2), the relative position of the rest of species was the same as when this species was included (G1), except when the two first codon positions are considered (Fig. 14B). However, it is worth noting that bootstrap proportions which supported the relationship among *Z. atlanticum* and the trio *C. oblonga*, *O. mascomai* and *O. fraterculus* were higher when the nasitrematid was excluded from the analysis, although these proportions were not significant (Figs. 14A, C and D). Taking into account 1st and 2nd codon positions, the relationship between *Z. atlanticum* and the rest of species was not perfectly defined, both in G1 and G2. In G1, the node that joined *Z. atlanticum* with the rest of species disappeared, and in G2 this species

formed a clade with *H. tursionis* in a low percentage of cases (Figs. 13B and 14B, respectively).

IV. *H. tursionis* was the campulid with the most external location in all the topologies, except in tree of Fig. 14B, where it formed a clade with *Z. atlanticum*. Only when considering the 3rd codon base, this location was not supported significantly (Figs. 13C and 14C).

V. Globally, it seems that excluding *N. globicephalae* from the analyses and only considering transversions we obtained best results in the bootstrap proportions (Fig. 14D).

#### b) Phylogenetic inference from characters

##### b.1) Parsimony

We made the analysis considering the type of substitution (transitions and transversions together, and only transversions, Tv). We also considered the tRNA+NADH3 and only the NADH3 coding sequence. Figs. 15, 16 (pag. 73), 17, 18, 19 (pag. 75), 20, 21, 22 (pag. 76) show the unrooted tree topology under different assumptions. Numbers at nodes indicates the bootstrap values.

#### Global results

I. In all the topologies, the relationships between *O. mascomai* and *O. fraterculus* was supported between 98,5 and 100% of the cases.

II. The majority of the trees showed an association between *Z. atlanticum* and *H. tursionis*, being the bootstrap proportions not significant (Figs. 15A and B, 16, 19B and 20B). When transversions are considered, this clade disappeared, both in G1 and G2 and with both sequences (tRNA+NADH3 and NADH3) (Figs. 17, 18, 21 and 22). The same occurred with one of the two topologies obtained with both sequences in G2, considering transitions+transversions (Figs. 19A and 20A). In all the topologies, the union of *H. tursionis* to the rest of campulids was supported in 100% of the cases.

However, the union of *Z. atlanticum* to the rest of the species was not significant, except when considering only transversions in G2, with both types of sequences.

III. In all the topologies obtained with G1, the relationship of *N. globicephalae* with the rest of species was not perfectly defined and exhibited low bootstrap proportions.

IV. The trio *C. oblonga*, *O. mascomai* and *O. fraterculus* was supported in most the topologies (Figs. 15B, 17, 18, 19A and B, 20A and B, 21 and 22). When considering only the transversions, this clade was significantly consistent (Figs. 17, 18, 21 and 22). This relationship was also supported when considering transitions+transversions with the NADH3 coding sequence in G2 (Figs. 19A and 19B), and almost significant in the same case, but with the sequence of the tRNA+NADH3 (Figs. 20A and 20B).

V. It seems that when considering only transversions and excluding *N. globicephalae*, we obtained better bootstrap proportions than when considering transitions+transversions.

#### Results with Templeton test

The results obtained from the application of Templeton test (not shown) indicated that most trees were not significantly different from the most parsimonious tree. This supported the species relationships displayed in the most parsimonious tree. However, other combinations of species in other topologies were possible, what is in agreement with the low bootstrap values.

#### b.2) Maximum likelihood

The analyses were made with the NADH3 coding sequence and the tRNA+NADH3 sequence. Figs. 23, 24, 25 26 (pag. 79), 27 (pag. 81) show the unrooted topologies obtained with this method.

#### Global results

I. Campulids *O. mascomai* and *O. fraterculus* appeared in all the topologies forming a clade.

II. Except when considering transitions+transversions in the NADH3 coding sequence (Fig. 23), *C. oblonga* formed a clade with the above pair of species.

III. The location of *N. globicephalae* was not perfectly defined under different evolutive models.

IV. *H. tursionis* was the campulid of more external position in all the topologies.

V. The same topology was obtained for the G2 under the different assumptions (maximum likelihood tree with  $Ts/Tv=1,2$ ;  $Ts/Tv=0$ ;  $Ts/Tv\geq 4$ ) (Fig. 27).

VI. The tree obtained when assuming a model where the transitions rate was higher than transversions ( $Ts/Tv \geq 4$ ) was the same as that obtained considering only transversions ( $Ts/Tv = 0$ ) in both groups and with both types of sequence (Figs. 25, 26 and 27).

### b.3) Lake's invariants

Since the position of *N. globicephalae* respect to campulids was not perfectly defined with none of the above methods, we applied Lake's invariants. All the possible quartets with *N. globicephalae* were used. Only one topology, with the tRNA+NADH3 sequence, was considered correct by this method (Fig. 28C, pag. 82), in such a way that the difference between both kinds of transversions (see material and methods of this section) was different significantly from zero. In such topology, *H. tursionis* formed a clade with *D. dendriticum*, and *Z. atlanticum* with *N. globicephalae* (Fig. 28C). From this relationships it might be concluded that *H. tursionis* appears in a basal location with respect to the rest of species and *N. globicephalae* is close to *Z. atlanticum*. Some of the methods also related *Z. atlanticum* and *H. tursionis*, but this clade is not supported by Lakes' invariants.

### c) Global results with the four methods

As we have seen, not all the methods used in this study provided a common topology, showing some unclear relationships. However, the majority suggested a



relationship between *C. oblonga* and the pair *O. fraterculus*-*O. mascomai*. In some cases, *Z. atlanticum* formed a clade with the above trio and, in other cases, with *H. tursionis*. The latter appear in all the trees as the most external species. We also can point out that the relationships among the species were more conflicting when *N. globicephalae* was in the analyses.

As we could observe some degree of transitional saturation (Fig. 12, pag. 64), we considered the phylogenies obtained when only transversions were considered and because the reliability of the trees was supported by significant bootstrap proportions (more than 70%). The topology of the consensus tree used for the second part of this study is shown in Fig. 29 (pag. 83).

### **Molecular phylogeny versus traditional taxonomy of the family Campulidae**

Only two campulid subfamilies are represented in this phylogeny, Campulinae and Orthosplanchninae, there being some inconsistency with traditional taxonomy. The subfamily Orthosplanchninae is formed by the genera *Hadwenius*, *Orthosplanchnus* and *Oschmarinella*. However, the consensus tree topology reveals that the last two form a clade, but *Hadwenius* is in basal position and does not share a common ancestor with the others. Likewise, the genera of the subfamily Campulinae, *Campula* y *Zalophotrema*, do not share a common ancestor, forming a paraphyletic group.

Since no method established the position of *N. globicephalae* with respect to the campulids, its situation in the consensus molecular phylogeny has been indicated by a dashed line. However, irrespective of the method employed, it is beyond any doubt that the species should be included within the Campulidae.

## **4. Discussion**

### **Nucleotide composition**

We observed a high percentage of thymine and guanine (Tables 10 and 11). This compositional bias has been observed in other organisms, as *Ascaris suum*, which mitochondrial genes presented a high frequency of codons finishing in guanine or thymine (Wolstenholme et al., 1987). However, the reasons for these compositional

biases are unknown (Simon, 1991). In tRNAs of *Fasciola hepatica* mtDNA, Garey and Wolstenholme (1989) observed a high content of G·T pairs. It seems that there is a negative energy associated to G·U pairs in the secondary structure of RNA (Freier et al., 1987), which contributes to the stability of the molecule. In mitochondrial genes of *F. hepatica*, Garey and Wolstenholme (1989) noted a high frequency of codons finishing in guanine and thymine (88,6%).

## **Saturation**

As observed in Fig. 12, the percentage of transitions decreases as the nucleotide divergence between pairs of species increases. As we said before, the number of transitions between species less divergent is higher than the number of transversions (Brown et al., 1982; DeSalle et al., 1987). However, two distant species will show a high number of transversions. Depending on the weight we give to different types of substitutions, the phylogenetic inference is not the same. This saturation effect was also revealed by the Maximum likelihood method, when we obtained the same topology assuming a transitions/transversions rate  $\geq 4$  and a transitions/transversions rate =0. In the first case, we are assuming that transitions occur at higher frequency than transversions, which implies a strong transition saturation. In the second case, we are assuming that only transversions occur, which might indicate that transitions are masked by transversions, due to saturation.

## **Molecular phylogeny and taxonomy**

### **I. General appreciations**

With the development of molecular techniques the controversy arose. The problem is to decide what kind of information is better to infer phylogenies, molecular or morphological data (Avice, 1994). Hillis and Dixon (1989) proposed an approach between molecules and morphology to have a global vision of the phylogeny.

### **II. Morphology**

As we have already explained, the taxonomy of the family Campulidae has been based on arbitrary criteria. This is because many characters are not known (only adult

stage, nothing is known of life cycles, behaviour, etc.). The constructional analysis of an organism (Seilacher, 1970) is an important previous step to know which characters are of taxonomic value (De Renzi, 1982, 1986). In this way, which characters are important phylogenetically can be distinguished from those resulting from adaptations or growth and construction processes. We only know one study on campulid species where these aspects have been addressed (Fernández et al., 1995). The lack of this analysis often originates circular reasoning as: character X implies the belonging to taxon Y, and, therefore, belonging to taxon Y implies possessing character X. This means that is up to the investigator to erect taxa from features subjectively assumed as important. Fernández et al. (1995) demonstrated that many of the biometric characters commonly employed in the taxonomy of campulids showed great variation ranges, even within the same species from the same host species and same locality; in other occasions, part of the diagnosis might be based on invalid premises, as the use ratios between variables with allometric relations.

A constant phylogeny should be based on taxonomic characters exhaustively evaluated. In this way, we could avoid the selection of homoplasies which do not denote relationship. Traditional taxonomic studies do not proceed in this way, the case of the Campulidae not being an exception. Therefore, the lack of studies on the validity of the characters used in the taxonomy of Campulidae, pose the possibility to employ other alternative methodologies.

### **III. Molecules**

Just as morphological ones, molecular phylogenies suffer the problem of homoplasies, because the nucleotide substitution is limited to four possible alternative states. The obtaining of the correct topology by parsimony can be complicated by several factors (Larson et al., 1992): 1) saturation of variable sites, 2) different amount of change along branches, 3) bias of compositional bases.

The excess of homoplasy can be avoided by weighting the conservative regions (functional domains of proteins) or transversions, as they accumulate at a lower rate than transitions (Hillis et al., 1993). As we saw, weighting was applied in all the methods used in this work.

#### **IV. Inconsistency between molecules and morphology**

Patterson et al. (1993) proposed several factors that would lead to inconsistency between the phylogenies obtained from molecular and morphological data:

1. Sampling is more problematic in obtaining molecular data. The investigator has to use limited samples, in such a way that the use of one or two species as representatives of a large taxon could originate a wrong interpretation of the results. By contrast, traditional taxonomists base their studies on a larger number of species. It is also important to consider potential human errors in collecting or assessing the data.

2. Usually, different methods provide different results, therefore the data must be transformed, which could increase the possibility that the results do not reflect the reality.

3. Other important problem is the homoplasy present in both types of data, molecular and morphological.

4. The last problem refers to the evaluation of homologies. Different interpretations of the homologies could result in different trees for the same taxa.

According to Hillis and Dixon (1989), the integration of the information provided by morphology and molecules is necessary.

#### **V. Establishment of taxa in the family Campulidae**

Salvador et al. (1996) performed a study on the taxonomy of the family Campulidae, using a multivariate analysis with morphometric data. The results partially conformed with the traditional taxonomy. The separation of subfamilies was based on the following characters: vitellaria extension, width and body length ratio and width of oral sucker. However, according to these authors, the limits between the subfamilies Campulinae and Orthosplanchninae could not be definitively established from morphometric variables. Salvador et al. (1996) work was novel and used a high number of characters simultaneously. Nevertheless, it suffers from the same problems

explained above: it was not a previous evaluation of the validity of the morphological traits, which were, moreover, those normally used in the taxonomy of campulids. Therefore, we are not sure that we are using characters that reflect relationship.

The arbitrariness of the systematics of the Campulidae based exclusively on morphological characters, might confuse the interpretation of the results of the molecular phylogeny, because the degree of subjectivity in the establishment of the genera is difficult to assess. For instance, biogeographic and specificity data of the genus *Zalophotrema* might challenge its status as an independent genus (see discussion of next section). This means that in molecular phylogeny we could be comparing species from the same genera. A related problem is that in molecular phylogeny we have not used the type species of the genera in all the cases, since this depended on the availability of specimens (part of it was borrowed from some institutions; see Table 5). This would add a component of additional error because, besides one can argue that if a genus has entity by itself (as *Zalophotrema*, see discussion of next section), it could be argued if a non-type species inside a genus really shows the characters that were described for the type species.

Results obtained in this study do not agree with what it is established by the traditional taxonomy of Campulidae. The division of the family Campulidae in subfamilies, at least considering Orthosplanchninae and Campulinae, seems artificial. Genera of the subfamily Orthosplanchninae, *Hadwenius*, *Orthosplanchnus* and *Oschmarinella*, do not form a monophyletic clade according to the molecular phylogeny. Moreover, the subfamily Campulinae has a paraphyletic origin, which also invalidates the grouping of genera *Campula* and *Zalophotrema* in a subfamily.

We think that an exhaustive revision of the characters used in the diagnosis of the subfamilies and genera of the family Campulidae is needed.

#### **VI. *Nasitrema globicephalae*: nasitrematid or campulid?**

As we explained in section 1, the status of the family Nasitrematidae is not clearly established. It has been a member of Fasciolidae (Ozaki, 1935) and Campulidae (Skrjabin, 1970). Nowadays, it is considered as a very close family of Campulidae (Brooks et al., 1985, 1989).

Ozaki (1935) was the first to note the great morphological similarity between the Campulidae and Nasitrematidae. However, some discrepancies led him to include the former into the Fasciolidae, with subfamily rank (Nasitrematinae). Similarly, Yamaguti (1971) noted the resemblance between campulids and Nasitrematids. The morphological differences between adults of these two groups are the absence of cirrus pouch and anterior intestinal caeca in Nasitrematidae. In some cases, the absence or presence of features has not been considered as a reason to establish new taxa. For instance, campulids of the genera *Hunterotrema* lack anterior caeca, showing at oesophagus level two lateral pouches (McIntosh, 1960; Dailey, 1971). Besides, one of its species, *H. macrosoma*, was described without body spines (Dailey, 1971). Since the family and genera diagnosis of campulids includes the presence of body spines, this author proposed that the absence of spines should be considered as a typical trait of the family as well. The inclusion of *H. macrosoma* in the family Campulidae was then justified. In this situation, the raising of a new family to harbour this species was not proposed, in spite of the absence of body spines and anterior caeca.

We think that a revision of the characters used to differentiate both families is needed. It is possible that the presence or absence of anterior caeca or cirrus pouch is not a valid criterion to establish differences at family level. In future molecular and morphological work we shall try to exactly define the location of *Nasitrema*, including in the analysis the only species of the other subfamily of nasitrematids, *Cetitrema foliiformis*.

## BIOGEOGRAPHY OF THE FAMILY CAMPULIDAE

The aim of this part of the study was to obtain patterns of specificity and geographical distribution of the Campulidae genera to compare them with previous host/parasite phylogenetic data. Thus, an extensive bibliographic survey of helminthological studies of cetaceans, pinnipeds, and the sea otter was carried out. Finally, we propose preliminary hypotheses about the major events involved in the origin and diversification of the campulid genera.

### a) major data biases

i) The distribution of helminth studies of marine mammals is clearly biased, there being good data sets from developed countries mainly. Information from North America, Europe, Russia, the Arctic, Australia and Japan, and recent data from South America was available. More sketchy information was obtained from the Antarctic, and very little, or nothing, from most of the Indian Ocean and African Atlantic waters. Consequently, host species endemic of areas rarely surveyed are underrepresented in the data sets (e.g., species of the genera *Sousa*, *Orcaella* and *Monachus*). By other reasons (scarcity, pelagic habits), parasites of some other host taxa remain also very little known (e.g., family Ziphiidae). Overall, we had acceptable parasitological data from about 32 of the 39 genera, and about 50 of the 79 species of cetaceans (Table 25, pag. 106-108) ; and 12 of the 18 genera and 20 of the 34 species of pinnipeds (Table 26, pag. 109-110). We consider these data to be valid enough to highlight the major hypothetical events explaining the present-day distribution of each campulid genus in both, hosts and geographical areas.

ii) There are rather subjective criteria to erect Campulidae species when based upon morphological traits. Since taxonomic investigations on parasites commonly follow those of their hosts, host systematics tend to 'trail' to some extent that of their parasites. For instance, some authors tend to consider specimens from new host species as new species as well, although they exhibit light differences with already known related species. The same differences might be attributed to intraspecific variation (e.g., due to host effects) if the specimens were found in a previously known host species. In this study, we accepted the validity of all the species as originally recorded, but we discussed the status of some of

them whenever authors used weak arguments to erect new species, particularly if there were clear inconsistencies with biogeographical and/or phylogenetic evidences (see below).

b) A priori problems

i) There is a logical asymmetry regarding presence vs. absence data. The actual distribution of a given parasite is shaped, not only by the set of localities where the parasite has been found, but also by those where not. Thus, new research in areas or host species with no previous records may always offer new positive data about parasite distributions, specially when past information is fragmentary. This is specially true in the case of some genera, i.e., *Oschmarinella*.

ii) Cladograms of all Campulidae species are not available. Most of the current research about historical ecology is dependent upon well corroborated cladograms of hosts and parasites. Indeed, they provide an independent evidence to be contrasted with biogeographical and ecological data. Obviously, the relevance of any cladogram is related to the question being asked. In this study, we were aware that cladograms would have been best used by analysing all species within each genus of Campulidae. Since species are the lowest units with an independent evolutionary fate, the phylogenetic information of all Campulidae species would have offer much more historic resolution, allowing for more specific questions and answers (see, for example, Hoberg, 1992). Nevertheless, it was possible to pose many major problems, and specific hypothesis, regarding the origin and diversification of each Campulidae genus.

iii) There are some discrepancies concerning host phylogenies. The cladograms of both cetaceans and pinnipeds have been elucidated at the genus level in most groups, although some inconsistencies appear when a consensus tree from different approaches is attempted. In the case of cetaceans. Milikovitch (1994, 1995) provided molecular data suggesting that the Physeteroidea is a the sister group of the Mysticeti (Fig. 32, pag. 101) hence challenging the classic morphological view of sperm whales as being odontocetes. Likewise, the taxonomic position of the Ziphiodea is uncertain. Finally, freshwater dolphins have been alternatively considered as monophyletic (superfamily Platanistoidea) or polyphyletic (superfamilies Platanistoidea, Lipotoidea and Inioidea). In pinnipeds, authors do not agree whether these carnivores constitute a monophyletic or polyphyletic group, although the first option seems to prevail now. Other points of disagreement are (i) the monophyletic

origin and the tribal division of the subfamily Monachinae (fam. Phocidae); (ii) the generic status of *Pusa*, *Pagophilus* and *Histriophoca* (fam. Phocidae). As we shall show, most of these problems do not affect much the conclusions of this study.

iv) Our analysis is focused upon the relationship between parasites and definitive hosts. Although being often a common approach in many studies, this may be biased in some way. For example, the intermediate and paratenic hosts may have played an important role in the origin and diversification of any given parasite taxon. Sometimes, it is possible to evaluate the general importance of each host group upon the history of the parasites, but any complete study would require a careful scrutiny of the hosts involved in all life cycle stages (by using suitable information about their phylogeny, historic biogeography, etc.). Unfortunately, nothing about intermediate or paratenic hosts of campulids is known.

### **Lecithodesmus**

(See Table 27, pag. 113, Figs. 36, pag. 114, Fig. 37, pag. 116)

Number of species: 4 (*L. goliath*, *L. petrowi*, *L. spinosus* and *L. nipponicus*).

Site of infection: Liver (presumably, hepatic ducts).

Species with doubtful status: *L. nipponicus*. It is the only *Lecithodesmus* species infecting odontocetes; the remainder occur in mysticetes. Few morphological features allow to distinguish it from other *Lecithodesmus* spp. There is a single record of this species of few specimens in two host species from which more parasitological evidence is available (*Globicephala macrorhynchus*, *Stenella longirostris*). We hypothesise that *L. nipponicus* might be a *Lecithodesmus* species from mysticetes, which has exceptionally infected these two odontocete species.

Patterns and processes: *Lecithodesmus* spp. seem to infect almost exclusively mysticetes; however, species of this genus seem more common in the Balaenopteridae (specially in *Balaenoptera* species). Besides, there are not specific species in other Mysticeti families (Balaenidae, Eschrichtiidae). No other campulids infect baleen whales. Since we do not know the position of *Lecithodesmus* in the Campulidae molecular tree, two alternative evolutionary scenarios are probable: (i) *Lecithodesmus* is the basal genus in the tree, the

ancestor of *Lecithodesmus* having coevolved with the Mysticeti; (ii) Balaenopterids (or, more precisely, *Balaenoptera*) captured hepatic campulids from Delphinoidea (Delphinidae?, Phocoenidae?), given that all these families have contemporary origins and favour the same habitats within the host. According to this view, the occurrence of *Lecithodesmus* in other mysticetes could be explained by a later expansion of the genus into other whales through food webs. A second pattern (apparently unbiased) is the higher occurrence of *Lecithodesmus* in Northern Hemisphere.

### **Hunterotrema**

(See Table 28, pag. 117)

Number of species: 2 (*H. caballeroi*, *H. macrosoma*).

Site of infection: Lungs (particularly, bronchi).

Species with doubtful status: *H. macrosoma*. Its morphological differences with respect to *H. caballeroi* seem to be small to allow for a separate specific status.

Patterns and processes: *Hunterotrema* spp. only occur in *Inia geoffrensis* (fam. Iniidae). We do not know the position of *Hunterotrema* in the molecular tree of Campulidae. Assuming that *Hunterotrema* is actually a campulid genus (this will be checked in the future), a unique coevolutionary process might be involved in its origin. According to the paleontological data, the ancestors of Iniioidea colonised freshwater habitats, the descendent species being confined to these habitats through the subsequent evolutionary history of the group.

### **Hadwenius**

(See Table 29, pag. 121, Fig. 38, pag. 122, Fig. 39, pag. 126)

Number of species: 8 (*H. tursionis*, *H. seymouri*, *H. delamurei*, *H. pontoporiae*, *H. nipponicus*, *H. subtilis*, *H. mironovi*, *H. elongatus*).

Site of infection: Intestine, mainly the anterior duodenum. Other locations seem to be accidental, or simply wrong.

Species with doubtful status: *H. elongatus*. There are only two records of this species. Besides, Hafeezullah (1986) considered *H. elongatus* to be very similar to his specimens of *H. tursionis*, obtained from the same host species. *H. elongatus* is morphometrically similar to *H. tursionis*.

Patterns and processes: *Hadwenius* is the most extended genus within the Campulidae. Species of *Hadwenius* parasitise all odontocete families studied for parasites, except Iniidae, Ziphiidae and Physeteridae (i.e., there are representatives of this genus in the infraorder Delphinida). *Hadwenius* also shows the higher quantity of infected host species, the higher level of diversification, and the higher geographical range within the Campulidae. These patterns suggest a great antiquity (as supported by the consensus molecular tree), assuming easy opportunities to extent among diverse dolphin groups. Indeed, this seems to be a common theme in the extension and diversification of the campulids of dolphins and porpoises (see below).

It is very difficult to elucidate to which host group *Hadwenius* associated first, since (i) *H. pontoporiae* might be either a coevolutionary product associated to the divergence of Inioidea (family Pontoporiidae), or the product of a secondary colonisation event from *Hadwenius* of Delphinoidea; (ii) according to the data available, it is not possible to ascertain to which family of Delphinoidea (i.e., Monodontidae, Delphinidae, Phocoenidae) *Hadwenius* shows a stronger association. Anyway, *Hadwenius* have successfully established in the remainder families, probably through secondary host switching.

### **Nasitrema**

(See Table 30, pag. 128, 129, Fig. 40, pag. 129, Fig. 41, pag. 132)

Number of species: The current taxonomy is very confused, and a distinction at species level is not usually given in most helminthological analyses from the literature.

Site of infection: Pterigoid sinuses; accidentally, in brain and lungs.

Species with doubtful status: -

Patterns and processes: *Nasitrema* spp. have been found exclusively in the Delphinidae and Phocoenidae. However, there are no clear patterns of specificity within these groups. By contrast, a well-defined geographic range can be observed. In fact, several authors have recognised endemic areas for the transmission of this parasite. Overall, *Nasitrema* occurs mainly in the Indopacific Ocean (particularly off the American coasts), never exceeding 40°N-40°S. The parasite also appears in the Gulf of Mexico and the Atlantic coast of USA, and is clearly missing in the North West Atlantic and Mediterranean. *Nasitrema* spp. can apparently infect and mature in any Delphinidae or Phocoenidae species, within the geographical areas defined above. In fact, the same host species may be free of parasites or not depending of the locality. These evidences strongly suggests that *Nasitrema* originated in some ancestor of Delphinoidea, probably in the Eastern Pacific. The genus dispersed later to other Indopacific areas and the Western Atlantic, but never reached the Eastern Atlantic. Ecological or historical factors related to intermediate hosts may be behind this geographical pattern.

### ***Zalophotrema***

(See Table 31, pag. 134, Fig. 42, pag. 138)

Number of species: 5 (*Z. hepaticum*, *Z. lubimowi*, *Z. pacificum*, *Z. atlanticum*, *Z. curilense*).

Site of infection: Hepatopancreatic ducts.

Species with doubtful status: *Z. curilense*. There is a single record of this species, in the sperm whale (*Physeter catodon*). This is an unusual host species, according to the host group usually infected by *Zalophotrema*. Moreover, the type locality is far from the range of the rest of species. By now, we interpret the record in the sperm whale as an exceptional infection. Much more additional material is needed in order to cast light upon this little known species.

Patterns and processes: *Zalophotrema* spp. parasitise two distinctive host taxa, otariids and dolphins of the genus *Stenella*, in specific geographical areas. *Z. hepaticum* is found in two North Western American otariids, *Zalophus californianus* and *Eumetopias jubatus*, and ranges from California to the Galapagos Islands; *Z. pacificum* occur in *S. attenuata* and *S. longirostris* within the Indopacific area; *Z. atlanticum* appears in *S. coeruleoalba* in the

Eastern Atlantic and Mediterranean. Finally, *Z. lubimowi* has been described only in captive specimens of *Otaria byronia*. Since species of *Zalophotrema* are found very occasionally in other hosts, they can be viewed as ecologically facultative or unsuitable. According to the position of *Zalophotrema* in the phylogenetic tree of Campulidae, the main question is whether the ancestor of *Zalophotrema* was primarily associated (i) to the ancestor of *Stenella* or (ii) that of *Zalophus* (in this case, following an initial host switching from campulids of odontocetes). Although there is not a definitive answer, option (i) seems more parsimonious. Another interesting pattern is that, at the moment, *Zalophotrema* is missing in the endemic Atlantic *Stenella* species, *S. clymene* and *S. frontalis*. The current hypothesis concerning speciation patterns of *Stenella* spp. states that these two species are older than the rest. In conclusion, we have a campulid genus presumably diversified in some species of *Stenella*, and captured later by a sea lion species. However, the more recent genus *Campula* is much more extended among dolphins and porpoises than *Zalophotrema* (see below). This inconsistency merits a closer look in the future. What taxonomic status should have *Zalophotrema*? Might *Zalophotrema* be congeneric with *Campula*, showing just egg shape differences?

### *Campula*

(See Table 32, pag. 140, Fig. 43, pag. 141, Fig. 44, pag. 144)

Number of species: 5 (*C. oblonga*, *C. folium*, *C. delphini*, *C. palliata*, *C. rochebruni*).

Site of infection: Hepatopancreatic ducts

Species of doubtful status: *C. folium*. Only there is a record of this species, in *Neophocaena phocaenoides*. Besides, in the original description, Ozaki (1935) recognised that only slight morphometrical differences (corresponding to the size of the testes and body width) could distinguish *C. folium* from *C. oblonga*, the other species of phocoenids. In fact, Yamaguti (1942) considered the species as doubtful because these differences could be simply due to cover glass pressure.

Patterns and processes: *Campula* is restricted to the families Phocoenidae and Delphinidae, and exhibits a world-wide distribution. However, in the latter family, the genus is missing in the subfamily Globicephalinae, in most Cephalorhynchinae, and in some basal genera of

Delphininae. *C. oblonga* is almost exclusively found in Phocoenidae; *Phocoena phocoena* and *Phocoenoides dalli* seem the main hosts. Indeed, the range of *C. oblonga* follows that of these species (particularly of *P. phocoena*). *C. delphini*, *C. palliata* and *C. rochebruni* are characteristic of delphinids of the genera *Delphinus*, *Tursiops* and *Stenella*, which seem to have a monophyletic origin. We propose two alternative scenarios for explaining the overall pattern: (i) *Campula* originates in some phocoenid ancestor (*Phocoena*?) and passed to dolphins via colonisation; or (ii) the opposite process. The higher degree of diversification in dolphins perhaps may indicate a longer association with them.

### **Oschmarinella**

(See Table 33, pag. 146, Fig. 45, pag. 147, Fig. 46, pag. 149)

Number of species: 3 (*O. sobolevi*, *O. laevicaecum* and *O. mascomai*).

Site of infection: hepatopancreatic ducts

Species with doubtful status: *O. mascomai*. Only slight differences can distinguish it from *Campula* spp. In fact, *O. mascomai* closely resembles *C. rochebruni*, and, therefore, its current status is doubtful (J.A. Raga, pers. comm.).

Patterns and processes: This genus shows a extremely incongruent distribution, appearing in the ziphiids *Hyperoodon ampullatus* and *Berardius bairdi* (*O. sobolevi*) as well as in the delphinids *L. acutus* and *Stenella longirostris* (*O. laevicaecum*). Overall, there are very few records of this genus. A complete revision of this genus becomes necessary in the future.

### **Orthosplanchnus**

(See Table 3, pag. 151, Fig. 47, pag. 152, Fig. 48, pag. 154, Fig. 49, pag. 15, Fig. 50, pag. 156)

Number of species: 7 (*O. arcticus*, *O. fraterculus*, *O. rossicus*, *O. oculatus*, *O. pygmaeus*, *O. albamarinus*, *O. antarcticus*).

Site of infection: Hepatopancreatic ducts. Some species have been found in the intestine, although this seems to be a post-mortem location.

Species with doubtful status: *O. pygmaeus*, *O. albamarinus*, *O. antarcticus*. *O. pygmaeus* was described from a single specimen found in a grey whale (*Eschritius robustus*) in the Bering Sea. Later, there have been several records of a very few specimens of this parasite infecting some seal species from the same area. Adams (1988) considered *O. pygmaeus* to be morphometrically very similar to *O. oculatus*, a typical parasite of walrus (*Odobenus rosmarus*) restricted to the Bering area. This comment make sense to the hitherto exceptional occurrence of *O. pygmaeus*, assuming that this species is actually *O. oculatus* which have colonised ecologically facultative (or unsuitable) hosts in the Bering area. There are a few records of *O. albamarinus*, always in odontocete hosts (*Globicephala melas*, *Delphinapterus leucas*). Adams and Rausch (1989) expressed some doubts about the generic status of this species; Salvador et al. (1995) found it to be morphometrically closer to *Oschmarinella* than *Orthosplanchnus*; D.I. Gibson (pers. comm.) seems to have transferred it finally to *Oschmarinella*. *O. antarcticus* appears to belong to the genus *Orthosplanchnus* just on the basis of the finding of a spine and a basal disc in the metraterm of a single specimen (Adams and Rausch 1989). The presence of such a spines is the only character that allows to separate *Orthosplanchnus* and *Hadwenius*. *O. antarcticus* would exhibit an extremely relict distribution: in fact, it is the only *Orthosplanchnus* species occurring in Antarctic waters, the remainder being restricted to the Arctic. Moreover, there are only two records of *O. antarcticus*, both in the intestine of *Leptonichotes weddelli*, but not in other Antarctic pinnipeds. In our opinion, these observations demand an extremely unparsimonious history in order to account for the current distribution of *O. antarcticus*, which seems practically untenable. We recommend a careful revision of the generic status of *O. antarcticus*.

Patterns and processes: Except for *O. antarcticus*, all *Orthosplanchnus* species are restricted to Arctic and Subarctic waters, where they are mainly associated with *Erignathus barbatus* and *O. rosmarus*. However, *O. fraterculus* also occurs frequently in the sea otter (*Enhydra lutris*). Much of the ecological extension of *Orthosplanchnus* spp. might be due to the shared feeding upon benthic invertebrates of these three common definitive hosts. In general, *Orthosplanchnus* may occur in many other seals, but the parasite has not speciated in any of them; these species could act rather as facultative hosts. The geographic distribution of *Orthosplanchnus* spp. follows basically that of their main definitive hosts.

There are two major biogeographical patterns which surprisingly resembles to those of the cestodes genus *Anophryocephalus* (family Tetrabothriidae), whose phylogeny and historical biogeography is very well known (see Hoberg and Adams, 1992; Hoberg, 1992; Hoberg, 1995). Both genera have nearly identical geographical ranges, and most of their diversification is concentrated in the Bering-North Pacific area. Apparently, the origin of the *Orthosplanchnus*-pinniped association is young, and comes from the colonisation from campulids of dolphins or porpoises in the Atlantic Basin. The subsequent diversification might be related to the isolation-expansion cycles of host and/or parasite populations during the late Pliocene and Pleistocene glaciations, similarly as for *Anophryocephalus*.

From a viewpoint of host/parasite relationships, three major elements can be roughly recognised in the history of the Campulidae and marine mammals (See Fig. 51, pag. 174):

a) The campulid fauna of baleen whales have diverged, and eventually become independent to that of other marine mammals. Whatever the particular origin of *Lecithodesmus* (see above) is, extant baleen whales only show this campulid genus, and, perhaps more importantly, no other. The quite dramatic change in feeding habits between baleen whales and dolphins perhaps prevented more faunal exchanges of this particular digenean family along the subsequent history of these host groups. Therefore, only helminth exchanges between baleen whale species, in adequate contexts, are expected. Host physiological divergence between Odontocetes and Mysticetes, which may enhance parasite specificity, would be much less probable to explain the pattern, since there has been host captures among more distant taxa, such as seals and dolphins.

b) *Hunterotrema* is a coevolved unit which have become historically isolated from the rest of potential hosts. Consequently, only present-day sympatric dolphins (i.e., *Sotalia fluviatilis*) would expected to share *Hunterotrema* (but not data about helminths of freshwater *Sotalia* exist).

c) The campulid fauna of dolphins, porpoises and pinnipeds seems originated from an intricate history of coevolution and colonisation events, at several phylogenetic scales. Several authors (e.g., Brooks, 1979; Hoberg, 1987) have argued that host switching is an stochastic process, but dependent upon a long history of host-parasite interactions. These interactions are linked to the food webs, which seems to allow contacts among a diverse array of host of different phylogenetic origin (i.e., dolphins, porpoises and seals). Assuming

that the physiological distance is not a major obstacle for colonisation (and colonisation is, in fact, a common issue in the development of parasite faunas in marine homeotherms, including marine birds and mammals), it is expected that campulids may extend, and eventually speciate outside of their coevolved units. This might explain why dolphins and porpoises share much of the campulid genera, and why some campulids have passed to pinnipeds, at least twice.

## ORIGIN OF THE FAMILY CAMPULIDAE

Traditionally, campulids have been related to the families Fasciolidae, formed by terrestrial ruminant parasites, and Acanthocolpidae, composed of fish parasites. The only studies where the relationships of these three groups have been assessed are those of Brooks et al. (1985, 1989). We will try to discuss the evidence for and against the two alternative hypotheses on the origin of the family Campulidae: common origin with Fasciolidae, which implies an association by descent, and a common origin with Acanthocolpidae, which implies a host switching phenomenon.

### Morphology

The relationship between the Campulidae and the Fasciolidae was established from the similarity of some morphological traits. Brooks et al. (1985) defined the campulids as Fascioloidea with triangular egg section, dendritic testis, vitellaria extending along the body, acetabulum in the anterior third of the body and no external seminal vesicle. In fact, the only differences between both families are: anterior intestinal caeca present in campulids, absent in fasciolids; branched caeca and excretory vesicle present in fasciolids, absent in campulids; and triangular egg section in campulids and circular in fasciolids. These differences had been considered by different authors important enough to maintain the two families independently, or to group them even in the same family (see, e.g., Stunkard and Alvey, 1930).

Considering the Acanthocolpidae, Brooks et al. (1989) pointed out that the characters common with the Campulidae are: (1) ocellate cercaria, character not present in the Echinostomatiformes, the group where the campulids were initially included, with the fasciolids (Brooks et al., 1985), (2) spiny large cirrus, (3) metraterm with spines, (4) long prepharynx and (5) terminal or subterminal oral sucker. Item (1) is the most conflicting character. First, the presence of eyespots is not always indicated in the same larval stage by the authors: sometimes, it is noted that the miracidium has eyespots and in other occasions, the cercaria. It seems that it is a variable character in the different larval stages. In some cases, eyespots are lost; in others cases, they are retained as a scattered pigment in the adult and, in some cases, eyespots are intact in the adult (R. Bray, com. pers.). For instance, Cheng (1976) recorded the presence of eyespots in the miracidium of *Fasciola*

*hepatica*, a character not mentioned by Brooks et al. (1989) in the cercaria of Echinostomatiformes. Second, it seems that there is not an agreement about the presence of eyespots in campulids. Cable (1974) indicated the existence of an ocellate putative cercaria of *Orthosplanchnus fraterculus* and Appy (1974) found eyespots in the miracidium of *Nasitrema*, but Dailey (1985) did not in the miracidium of *Campula rochebruni*. Since larval characters are not very well known and precise, at least in campulids, we think that, at the moment, it is not wise to use them to establish relationships among these groups.

### **Probability of the events**

#### **Coevolution**

a) Arguments favouring the probability of a coevolutionary origin of campulids are the following:

(i) Sister groups. This hypothesis arises from the fact that arthyodactils and cetaceans seem to be sister groups, and that fasciolids parasitise arthyodactils, while campulids parasitise marine mammals, being cetaceans the primary group.

Paleontological, morphological, biochemical and genetic studies support the relationship between arthyodactils and cetaceans (Barnes, 1990; Graur and Higgins, 1994; Milinkovitch, 1992). The suborder Archaeocetes, the most primitive fossil cetaceans (Barnes, 1984), developed from mesonychid condylarths (Morales, 1990). These terrestrial ungulates were carnivorous (Lavocat, 1961; Morales, 1990), in fact and it has been suggested that they fed on molluscs (Lavocat, 1961), which could facilitate the adaptation of the life cycle of campulids (or their ancestors) to the marine environment.

(ii) Freshwater intermediate host forms. Transition of cetacean ancestors from land to sea supposed an important modification mainly concerning their physiology and morphology. However, it has been found intermediate fossil forms of cetaceans which presented a progressive modification of structures (Gingerich et al., 1994; Gould, 1994; Thewissen et al., 1994). Moreover, it seems that before inhabiting the marine environment, cetaceans probably lived in rivers, as indicated by fossils (for example, *Pakicetus* which was found in fluvial sediments). Therefore, the transit from one environment to another was not as radical as to prevent a coevolutionary process.

Brooks and McLennan (1993b) illustrate an example of coevolution in the family Potamotrygonidae, composed of freshwater elasmobranchs (stringrays). The species of this family are distributed in rivers of South America (Amazon, Orinoco, Maracaibo, Paraná and Magdalena). After a historical study about freshwater stringrays and their parasites, the authors concluded that most of the parasites were introduced to freshwater with the stringrays ancestors. Molluscs or arthropods are intermediate host, whose marine ancestors would penetrate in neotropical freshwater with Potamotrygonidae ancestors.

(b) Arguments against the probability of campulids origin by coevolution are the following:

(i) Parasite extinctions. Delyamure (1955) suggested that the host transit from land to sea might have produced the extinction of most of their helminths, because parasites could not adapt their life cycles to the new environment. Pelagic system would be a barrier preventing the dispersion of land parasites (Hoberg, 1987). It seems that this factor has been of great importance on the helminth communities structure in some cetaceans (Balbuena and Raga, 1993; Aznar et al., 1994).

(ii) Life cycles. The main problem for parasites surviving the transit from land to sea was to find adequate intermediate hosts to complete the life cycle.

### **Host switching**

The argument favouring the probability of campulids origin by host switching is the following:

(i) High frequency exposure of the parasite from prey. It is possible that cetaceans became infected in their new environment with other helminth species, specially from fish (Delyamure, 1955). Colonization is controlled by estocastic mechanisms, but it depends upon a long-term predictability in the predator/prey relationships (see Hoberg, 1987). In addition, the colonization of a new host can occur rapidly (Holmes y Price, 1980).

Acanthocolpids comprise parasites whose life cycles include marine gastropods as intermediate hosts, and fishes as definitive hosts. A common origin for acanthocolpids and

campulids must imply that trematodes whose cycle ended in fishes had to extend it to mammal hosts. This is not necessarily exceptional. A sound example of how a host extension has had a great evolutive success is the case of digeneans. Being primitively parasites of molluscs, they were able of infecting a vertebrate host as these hosts fed on molluscs harbouring adult parasites (Gibson, 1987). In such situation, the selective pressure would have produced the extension of the surviving period of the parasite and, therefore, the permanence of eggs in the new host, which would become latera definitive host. In the same vein, one of the obvious cases of host switching in marine homeotherms are that of cestodes of the family Tetrabothriidae. This monophyletic group, widely distributed among pinnipeds and cetaceans, associated by colonization from elasmobranch tapeworms (Hoberg, 1987, see above). The distribution of some of their genera suggests that host switching has been a fundamental process in the radiation of the family in seabirds, cetaceans and pinnipeds (Hoberg, 1987). This process would have operated trough trophic guild associations between elasmobranchs and homeotherm mammals.

b) The argument against the probability of campulids origin by host switching is the following:

#### Physiologic and phylogenetic distance between hosts

According to Freeland (1983) the greater the phylogenetic (=physiological) distance between two hosts, the less probable the colonisation between their parasites. In fact, Balbuena and Raga (1993) suggested that isolation of cetaceans in the marine environment restricted the possibility of new infections from helminths compatible with the mammal host physiology.

#### Microhabitat

According to Hoberg and Lichtenfels (1994), helminth phylogeny could provide information respect to evolution of the habitat selection within the host. De Queiroz and Wimberger (1993) established that behavioural characters (for example, a predecible habitat selection) could be used to infer phylogenies, because these characters are not expected to show more convergence than morphological ones. As we observed in the phylogeny of genera of Campulidae (Fig. 51, pag. 174), *Lecithodesmus* would be the basal genus of campulids. If true, we could state that the liver is the ancestral campulid habitat

(plesiomorphic character), and it has been inherited from an hepatic ancestor, as in some fasciolid groups (Fig. 52, pag. 184). This character is preserved in five genera (*Lecithodesmus*, *Zalophotrema*, *Campula*, *Oschmarinella* and *Orthosplanchnus*). However, the habitat selection behaviour of the other three genera (*Hadwenius*, *Hunterotrema* and *Nasitrema*) would be apomorphic, hence suggesting an important potential to colonize new habitats. Perhaps this is not surprising since, in the putative sister group of campulids (family Fasciolidae) there are groups that have colonized lungs and intestine as well; even the same genus can parasitise liver and lungs (Yamaguti, 1971). Perhaps this potentiality was latent in the ancestor. On the other hand, if we assume that *Lecithodesmus* was secondarily captured (see Discussion), the basal genus of campulids should be now *Hunterotrema* (Fig. 52), whose habitat coincides with that of genus *Fascioides* (family Fasciolidae).

Under the alternative hypothesis, we assume that an ancestor of acanthocolpids colonized a cetacean host. In this case, it is much difficult to explain how the parasite could have changed the typical intestinal ancestral habitat of all Acanthocolpidae species, to an hepatic (or even pulmonar!) habitat. Helminth migration pathways within the host rely upon a very specific set of fixed action patters which are triggered by very specific physico-chemical signals (Sukhdeo, 1990; Adamson and Cairn, 1994). It could be argued that the phylogenetic distance between fishes and mammals was an important obstacle to the initial modification of these migratoriy pathways. Moreover, host switching from acanthocolpids would constitute a less parsimonious process, because it would imply a higher number of habitat changes.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

A phylogenetic and biogeographical study of the family Campulidae (Digenea) has been carried out. We obtained a molecular phylogenetic partial tree of five of the seven valid genera, by using the mitochondrial NADH3 gene of the following species: *Hadwenius tursionis*, *Zalophotrema atlanticum*, *Campula oblonga*, *Oschmarinella mascomai* and *Orthosplanchnus fraterculus*. The current division in subfamilies was examined in light of the inferences made from the molecular phylogenetic tree. Besides, we included a further species, *Nasitrema globicephalae*, to ascertain the relationship between the families Campulidae and Nasitrematidae. *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* were used as outgroups. Finally, the phylogenetic information was combined with biogeographical patterns of each campulid genus, in order to offer preliminary hypotheses about the origin and subsequent fate of the campulid-host associations. The conclusions of this study are the following:

1. The consensus molecular tree of the five campulid species evidenced the following basal-terminal arrangement: *Hadwenius tursionis*, *Zalophotrema atlanticum*, *Campula oblonga*, *Oschmarinella mascomai* and *Orthosplanchnus fraterculus*. The position of *Nasitrema globicephalae* was not successfully resolved, although this species was situated closer to *H. tursionis* or *Z. atlanticum* than the remainder.
2. According to the molecular tree, the current campulid subfamilies Orthosplanchninae (which includes the genera *Orthosplanchnus*, *Oschmarinella* y *Hadwenius*) and Campulinae (which includes *Campula* and *Zalophotrema*) are not natural.
3. *Nasitrema globicephalae* is situated within the Campulidae molecular clade. Therefore, the genus *Nasitrema* should be transferred to the family Campulidae.
4. Two possible scenarios might account for the origin of the *Lecithodesmus*: a coevolutionary process with the ancestor of Mysticeti or host-switching from hepatic campulids of odontocetes to the Balaenopteridae (particularly, the genus *Balaenoptera*).

5. The host/parasite specificity and biogeographical data available suggest that the genus *Hunterotrema* originated and coevolved with the family Iniidae. However, a careful taxonomic revision of the genus is necessary.
6. *Hadwenius* is the most extended and diversified genus within the Campulidae: it exhibits a world-wide distribution, and occurs in a number of odontocete families (Pontoporiidae, Monodontidae, Phocoenidae and Delphinidae). These features suggest a long period of host-parasite interactions, with many potential host captures among different odontocete groups. At the moment, it is not possible to ascertain the original odontocete group to which *Hadwenius* associated.
7. *Nasitrema* species are restricted to the families Phocoenidae and Delphinidae, occurring in many species without a clear pattern of host specificity. However, *Nasitrema* species show a distinct geographic distribution. The genus seems endemic of the Western Pacific area, and is absent in the North West Atlantic and Mediterranean basins. Apparently, this pattern might be the outcome of two factors: (i) the putative centre of origin of *Nasitrema* might be located in the West Pacific, and (ii) the ecologic/historical interaction of these parasites with their intermediate hosts and/or the physicochemical conditions in the oceans would have limited parasite dispersion.
8. *Zalophotrema* parasitises two distinct, specific host taxa, otariids (mainly *Zalophus californianus*), and delphinids (particularly, three *Stenella* species). This evidence affords to assume a host switching from one group to the other. Assuming that *Stenella* spp. are the primary hosts of *Zalophotrema*, this association is not expected to be a coevolutionary product.
9. *Campula* is restricted to families Phocoenidae and Delphinidae, where it occurs particularly in the genera *Phocoena* and *Phocaenoides* (Phocoenidae), and *Delphinus*, *Stenella* and *Tursiops* (Delphinidae). We propose that *Campula* coevolved with either of these two groups, appearing in the other via host capture. However, the data available hamper to know how the process actually operated.
10. The taxonomic status of *Oschmarinella mascomai* seems uncertain, so that its actual position in the molecular tree might be misleading to infer relationships with

other campulid genera. Besides, the scarcity of records of *Oschmarinella* makes even more difficult to propose any historical hypothesis. We consider that the status of *Oschmarinella* should be reviewed.

11. *Orthosplanchnus* appears almost exclusively in pinnipeds and the sea otter. We hypothesise that it originated from hepatic campulids of odontocetes via host switching. Host capture may have taken place either in the ancestor of Odobenidae + Phocidae (becoming subsequently lost in Monachinae), or in the ancestor of Phocidae or Odobenidae, later extending to the other group and the sea otter through food webs. Global patterns about parasite specificity and geography, as well as previous well-documented information about other sympatric helminths of seals led to the conclusion that the origin of *Orthosplanchnus* might be located in Northern Atlantic seals. Later, the genus would 'track' host expansion through the Arctic, Bering, and finally, Subarctic Pacific.
12. Overall, three processes seem to have led to the present-day observed campulid distribution: Mysticeti exhibits a particular, isolated campulid fauna, sharing very few elements with the rest of cetaceans. This may be a consequence of the early diet divergence of this group, hampering potential campulid exchanges with other cetaceans. *Hunterotrema* coevolved, and became isolated in the Iniidae due to the exclusive habitat favoured by this host group. Finally, dolphins, porpoises and pinnipeds have been involved into a long history of coevolution and exchange of campulids. The comparative richer campulid fauna in these groups ought much to the basic sharing of food resources.
13. The origin of the family Campulidae is uncertain, and there is not definitive answer to this question at present. By now, we conclude that: (i) morphological criteria do not permit to ascertain whether the Campulidae is the sister group of the Fasciolidae (thus suggesting a terrestrial origin from digeneans of arthyodactils) or Acanthocolpidae (thus suggesting a colonisation from fish digeneans); (ii) coevolution and host switching are theoretically equally probable, according to many diverse data available and (iii) current habitat selection of campulid species is more parsimonious with the hypothesis of coevolution. Moreover, the use of *Fasciola* as an outgroup have produced a congruent phylogeny of the family Campulidae.

# 1. SISTEMÁTICA DE LA FAMILIA CAMPULIDAE





## 1.1. SISTEMÁTICA DE LA FAMILIA CAMPULIDAE

La familia Campulidae Odhner, 1926 está compuesta por trematodos digenéticos que parasitan de forma mayoritaria a los cetáceos, aunque también posee representantes en pinnípedos y nutrias marinas (Delyamure, 1955; Dailey, 1985; Raga, 1992, 1994). Las especies de esta familia habitan en el sistema digestivo de sus hospedadores (intestino delgado, conductos hepatopancreáticos y páncreas); salvo los miembros de la subfamilia Hunterotrematinae Yamaguti, 1971, típica de los pulmones del delfín del Amazonas, *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817) (Dailey y Brownell, 1972).

### 1.1.1. Diagnosis de la familia

Siguiendo la sistemática de Yamaguti (1971) y teniendo en cuenta las revisiones realizadas sobre esta familia (Skrjabin, 1976; Adams y Rausch, 1989), podemos considerar actualmente 7 géneros válidos dentro de la familia Campulidae, repartidos en cuatro subfamilias: *Campula* Cobbold, 1858 y *Zalophotrema* Stunkard et Alvey, 1929 (subfamilia Campulinae Stunkard et Alvey, 1929), *Lecithodesmus* Braun, 1902 (subfamilia Lecithodesminae Yamaguti, 1958), *Orthosplanchnus* Odhner, 1905, *Hadwenius* Price, 1932 y *Oschmarinella* Skrjabin, 1947 (subfamilia Orthosplanchninae Yamaguti, 1958) y *Hunterotrema* McIntosh, 1960 (subfamilia Hunterotrematinae). En la Tabla 1 se muestran las 34 especies de campúlidos aceptadas actualmente como válidas.

Según la sistemática de Yamaguti (1971), los rasgos que caracterizan la familia Campulidae son los siguientes: la presencia de espinas corporales; ventosa oral y acetábulo, cuyas dimensiones relativas varían dependiendo de las subfamilias; el acetábulo suele situarse en el tercio anterior del cuerpo; poseen prefaringe corta o conspicua y faringe; el esófago puede ser corto, muy corto, o prácticamente ausente, generalmente es simple, pero en la subfamilia Hunterotrematinae presenta un par de divertículos laterales; los testículos están situados en tándem, en la parte posterior del cuerpo; la bolsa del cirro puede o no extenderse posteriormente al acetábulo; el poro genital es preacetabular; el ovario presenta una posición pretesticular; pueden presentar receptáculo seminal o no; el útero presenta una serie de circunvoluciones y se sitúa entre el ovario y el poro genital; los huevos son, generalmente, de sección triangular.

Tabla 1. Especies de la familia Campulidae. En paréntesis se indican las subfamilias.

Table 1. Species of the family Campulidae. Subfamilies are indicated in parentheses.

| Géneros (Genera)                              | Especies (Species)   | Géneros                                    | Especies  |
|---|--|--|---|
| <i>Orthosplanchnus</i><br>(Orthosplanchninae) | <i>O. arcticus</i> Odhner, 1905<br><i>O. rossicus</i> (Skrjabin, 1915)<br><i>O. antarcticus</i> Kurochkin et Nikol'skii, 1972<br><i>O. pygmaeus</i> Yurakhno, 1967<br><i>O. fraterculus</i> Odhner, 1905<br><i>O. albamannus</i> Treschev, 1968<br><i>O. oculus</i> Yurakhno, 1969   | <i>Lecithodesmus</i><br>(Lecithodesminae)  | <i>L. goliath</i> van Beneden, 1858<br><i>L. spinosus</i> Margolis et Pike, 1955<br><i>L. petrowi</i> Skrjabin, 1970<br><i>L. nipponicus</i> Yamaguti, 1942   |
| <i>Hadwenius</i><br>(Orthosplanchninae)       | <i>H. seymouri</i> Price, 1932<br><i>H. tursionis</i> (Marchi, 1873)<br><i>H. nipponicus</i> Yamaguti, 1951<br><i>H. subtilus</i> (Skrjabin, 1951)<br><i>H. mironovus</i> (Krotov et Delyamure, 1952)<br><i>H. delamurei</i> (Raga et Balbuena, 1988)<br><i>H. elongatus</i> (Ozaki, 1935)<br><i>H. pontoponae</i> Raga, Aznar, Balbuena et Dailey, 1994 | <i>Hunterotrema</i><br>(Hunterotrematinae) | <i>H. caballeroi</i> McIntosh, 1960<br><i>H. macrosoma</i> Dailey, 1971   |
|   |  | <i>Campula</i><br>(Campulinae)             | <i>C. oblonga</i> Cobbold, 1858<br><i>C. delphini</i> (Poirier, 1886)<br><i>C. palliata</i> (Loos, 1885)<br><i>C. rochebruni</i> (Poirier, 1886)<br><i>C. folium</i> (Ozaki, 1935)  |
|   |  | <i>Zalophotrema</i><br>(Campulinae)        | <i>Z. hepaticum</i> Stunkard et Alvey, 1929<br><i>Z. pacificum</i> Dailey et Perrin, 1973<br><i>Z. curilensis</i> Delyamure, 1956<br><i>Z. lubimowi</i> Petrov et Chertkova, 1963<br><i>Z. atlanticum</i> Abril, Balbuena et Raga, 1989 |
| <i>Oschmannella</i><br>(Orthosplanchninae)    | <i>O. sobolevi</i> Skrjabin, 1947<br><i>O. laevicaecum</i> (Yamaguti, 1942)<br><i>O. mascomai</i> Raga, 1986   |  |   |

Los caracteres morfológicos que se han utilizado preponderantemente para la separación de subfamilias y géneros son exclusivamente del estado adulto: la presencia o ausencia de divertículos laterales en los ciegos intestinales, presencia o ausencia de espinas en las estructuras genitales (cirro y metratermo) y la distribución y forma de las glándulas vitelógenas (Tabla 2).

Tabla 2. Caracteres diferenciadores de los géneros de la familia Campulidae. \* presencia del carácter, - ausencia del carácter; ? no aparece el carácter en las descripciones.

| Subfamilias                          |  |   |   |                                      |                     |  |                                     |
|--------------------------------------|--|---|---|--------------------------------------|---------------------|--|-------------------------------------|
| Caracteres                           | Orthosplanchninae  |   |   | Campulinae                           |                     | Lecithodesminae  | Hunterotrematinae                   |
|                                      | <i>Orthosplanchnus</i>   | <i>Hadwenius</i>  | <i>Oschmarinella</i>  | <i>Campula</i>                       | <i>Zalophotrema</i> | <i>Lecithodesmus</i>   | <i>Hunterotrema</i>                 |
| espinas cirro                        | +  | +   | -   | -                                    | -                   | -  | -                                   |
| espinas metratermo                   | +  | -   | ?   | -                                    | -                   | -  | -                                   |
| divertículos esófago                 | -  |   |   | -                                    |                     | -  | +                                   |
| divertículos anteriores              | +  |   |   | +                                    |                     | +  | -                                   |
| divertículos laterales               | -  |   |   | +                                    |                     | +  | -                                   |
| testículos                           | lobulados y enteros  |   |   | lobulados y enteros                  | lobulados           | ramificados y enteros  | enteros                             |
| ovario                               | entero   |   |   | entero                               | indentado           | lobulado y entero  | entero                              |
| sección huevos                       | triangular   |   |   | triangular                           | circular            | triangular   | ?                                   |
| extensión y forma de las vitelógenas | vitelaria profusa, arracimada, desde el final caudal al acetábulo o más allá | vitelaria dendrítica, no se extiende anteriormente más allá de testículos | vitelaria a lo largo de los ciegos, cubriendo en parte los testículos | campos laterales por todo el cuerpo  |                     | foliculos cuadrangulares dorsal y ventralmente, desde la faringe hasta la extremidad posterior | bandas laterales posteriormente     |
| hábitat                              | conductos biliares de mamíferos marinos; ocasionalmente intestino            | intestino cetáceos  | conductos biliares de mamíferos marinos                               | conductos biliares mamíferos marinos |                     | conductos biliares de cetáceos   | pulmones de <i>Inia geoffrensis</i> |

4



Table 2. Distinctive characters of genera of family Campulidae. \*: character present, -: character absent, ?: the character is not found in the description.

| Subfamilies            |  |   |   |  |                     |  |   |
|------------------------|--|---|---|--|---------------------|--|---|
| Characters             | Orthosplanchninae  |   |   | Campulinae   |                     | Lecithodesminae  | Hunterotrematinae                               |
|                        | <i>Orthosplanchnus</i>   | <i>Hadwenius</i>                              | <i>Oschmarinella</i>                                    | <i>Campula</i>   | <i>Zalophotrema</i> | <i>Lecithodesmus</i>   | <i>Hunterotrema</i>                             |
| cirrus spines          | +  | +   | -   | -  | -                   | -  | -   |
| metraterm spines       | +  | -   | ?   | -  | -                   | -  | -   |
| oesophagus diverticula | -  |   |   | -  | -                   | -  | +   |
| anterior diverticula   | +  |   |   | +  | +                   | +  | -   |
| lateral diverticula    | -  |   |   | +  | +                   | +  | -   |
| testis                 | lobed or entire  |   |   | lobed or entire  | lobed               | branched or entire   | entire  |
| ovary                  | entire   |   |   | entire   | indented            | lobed and entire   | entire  |
| eggs section shape     | triangular   |   |   | triangular   | circular            | triangular   | ?   |
| vitellaria             | profuse, clustered, extending from the caudal region to the acetabulum or beyond | dendritic, extending anteriorly to the testis | extending along the ceca, covering partially the testis | disposed in lateral fields covering fully the body                     |                     | dorsal and ventrally cuadrangular folicles extending from the pharynx to the posterior extremity | disposed in lateral bands extending posteriorly |
| habitat                | bile ducts of seals and sea otters; occasionally cetaceans                       | intestine of odontocetes                      | bile ducts of odontocetes                               | bile ducts of dolphins, porpoises and otariids ( <i>Zalophotrema</i> ) |                     | bile ducts of whales   | lungs of <i>Inia geoffrensis</i>                |

51

### 1.1.2. Incertae sedis

La situación de la especie *Orthosplanchnus sudarikovi* Treschev, 1966 es incierta (Adams y Rausch, 1989). La descripción de esta especie se basó en un solo espécimen (Treschev, 1966) el cual presentaba caracteres compatibles con su ubicación en *Orthosplanchnus*, pero los ciegos presentaban tres pares de divertículos anteriores. Además, difería de *Orthosplanchnus* en el tipo de espinas que presentaba en el cirro y en la ausencia de espinas en el metratermo.

Otra especie considerada por Adams y Rausch (1989) de posición incierta es *Campula gondo* Yamaguti, 1942, debido a que difiere bastante de sus congéneres en lo que respecta a la longitud corporal, situación relativa de las ventosas y presencia de bolsa faríngea. Además, en la descripción original, Yamaguti (1942) no mencionó nada respecto a la presencia o no de espinas en cirro y metratermo.

Al realizar la sinonimia entre los géneros *Leucaesiella* Krotov et Delyamure, 1952 y *Hadwenius* (según Adams y Rausch, 1989), la especie *L. arctica*, Delyamure et Kleinenberg, 1958 no es válida hasta que no se realice una revisión que confirme su estatus (Raga et al., 1994b).

En cuanto a la especie que aparece en Yamaguti (1971) como *Odhneriella oserkoi* Delyamure, 1956, se trata de un emplazamiento erróneo del nematodo *Otophocaenurus oserkoi* Skrjabin, 1942 (según Adams y Rausch, 1989). Por lo tanto, debe ser considerado como un *nomen nudum* (Raga y Balbuena, 1988).

### 1.1.3. Sinonimias: subfamilias y géneros

En 1915, Skrjabin estableció el género *Odhneriella* a partir de ejemplares de la especie *Odhneriella rossica* Skrjabin, 1915. Inicialmente, esta especie se describió sin ciegos intestinales anteriores, pero la revisión de nuevo material (Skrjabin y Schulz, 1935, en Skrjabin, 1944) reveló la presencia de los mismos. Más tarde, Skrjabin (1944) comprobó que, efectivamente, los especímenes originales también estaban dotados de divertículos anteriores. En este mismo trabajo, Skrjabin estableció la sinonimia entre *Odhneriella* y *Hadwenius*, apoyada posteriormente por otros autores (Treschev, 1978), transfiriendo así la única especie existente de *Hadwenius*, *H. seymouri* Price, 1932, al género *Odhneriella*.

Según Skrjabin (1944), si Price (1932) estableció el género *Hadwenius* a partir de la presencia de ciegos intestinales anteriores, sin divertículos laterales, no habría justificación para mantener *Odhneriella* y *Hadwenius* como géneros distintos. Sin embargo, según Adams y Rausch (1989), este hecho debería haber sido suficiente para transferir *Odhneriella* a *Orthosplanchnus*, que también carece de divertículos en los ciegos anteriores. Finalmente, Adams y Rausch (1989) transfirieron *O. rossica* al género *Orthosplanchnus*, por lo que Odhneriellinae pasó a ser sinónimo de Orthosplanchninae. La sinonimia se fundamentó en la presencia de espinas en el cirro y en el metratermo en los ejemplares de la especie tipo del género *Odhneriella*, espinas que aparecen igualmente en *Orthosplanchnus* (Tabla 3).

Tabla 3. Cuadro resumen de las sinonimias establecidas en los géneros de la familia Campulidae.

Table 3. Summary of the synonymies established for the genera of Campulidae.

| Nombre Actual          | Sinónimo           | Datos adicionales                                  |
|------------------------|--------------------|--|
| <i>Hadwenius</i>       | <i>Leucasiella</i> |  |
|                        | <i>Synthesium</i>  | Subfamilia Synthesiinae queda invalidada           |
| <i>Orthosplanchnus</i> | <i>Odhneriella</i> | Subfamilia Orthosplanchninae = sin. Odhneriellinae |

En su Systema Helminthum, Yamaguti (1958) estableció la sinonimia entre los géneros *Leucasiella* y *Hadwenius*, pero sin razones explícitas. Según Treschev (1978), al no poseer Yamaguti datos completos del género *Leucasiella*, lo consideró como sinónimo de *Hadwenius*. Sin embargo, Treschev (1978) aceptó el género *Leucasiella*, diferenciándolo de *Hadwenius* y *Odhneriella* por la ausencia de un cirro armado y por la diferente forma y extensión de las vitelógenas. Treschev (1978) transfirió la especie *Leucasiella subtila* al género *Odhneriella* por poseer espinas en el cirro.

Adams y Rausch (1989) establecieron la sinonimia entre los géneros *Leucasiella* y *Hadwenius* (Tabla 3). En principio, *Leucasiella* se caracterizaba por la ausencia de espinas, tanto en el cirro como en el metratermo (Krotov y Delyamure, 1952). Sin embargo, Adams y Rausch (1989) examinaron varios ejemplares de la especie tipo, *L. mironovi* Krotov et Delyamure, 1952, evidenciando la presencia de un cirro armado. Por este motivo aceptaron

la sinonimia establecida por Yamaguti (1958), sin previa explicación, entre *Leucasiella* y *Hadwenius*. Estos autores transfirieron, además, la especie *Orthosplanchnus elongatus* al género *Hadwenius* por la ausencia de espinas en el metratermo, quedando como *Hadwenius elongatus* (Ozaki, 1935).

En cuanto a la subfamilia Synthesiinae Yamaguti, 1958, Skrjabin (1976) argumentó que no existían razones sólidas para su mantenimiento. Su único representante, la especie *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873), parecía carecer de ciegos intestinales sin divertículos anteriores (Marchi, 1873; Poirier, 1886), distinguiéndose así del resto de los campúlidos. Sin embargo, Delyamure y Serdyukov (1966) detectaron la presencia de un par de divertículos intestinales anteriores. Fernández et al. (1994) corroboraron este hecho, por lo que transfirieron *S. tursionis* al género *Hadwenius*, bajo la nueva combinación de *Hadwenius tursionis*. De este modo, *H. tursionis* se incluyó dentro de la subfamilia Orthosplanchninae, desapareciendo la subfamilia Synthesiinae (Tabla 3). Un estudio reciente, basado en un análisis discriminante de caracteres morfométricos de varias especies de la familia Campulidae, apoya la inclusión de *Synthesium tursionis* en el género *Hadwenius* (Salvador et al., 1995).

El resto de géneros que componen la familia Campulidae se ha mantenido estable a lo largo del tiempo.

## 1.2. REVISIÓN HISTÓRICA SOBRE EL ESTATUS Y RELACIONES TAXONÓMICAS DE LA FAMILIA CAMPULIDAE

El primer autor que consideró la particularidad de estos digénidos de mamíferos marinos fue Odhner que, en 1905, creó la subfamilia Brachycladiinae Odhner, 1905, dentro de la familia Fasciolidae Railliet, 1895, para incluir los géneros *Brachycladium* Loos, 1899 (considerado sinónimo de *Campula* Cobbold, 1858), *Lecithodesmus* Braun, 1902 y *Orthosplanchnus* Odhner, 1905. Los representantes de estos géneros tenían la particularidad de parasitar mamíferos marinos. Posteriormente, en 1926, este mismo autor consideró que este hecho era suficiente para que tales géneros constituyeran una familia distinta, Campulidae. Sin embargo, Odhner no especificó las diferencias entre la nueva familia y los fasciólidos.

La falta de diferencias morfológicas claras entre Fasciolidae y Campulidae llevó a Stunkard y Alvey (1930) a considerar que los campúlidos y fasciólidos pertenecían a la misma familia. Por esta razón, volvieron a establecer la subfamilia Campulinae dentro de la familia Fasciolidae. Esta nueva subfamilia estaba formada ahora por los géneros *Campula*, *Lecithodesmus*, *Orthosplanchnus*, *Zalophotrema* Stunkard et Alvey, 1930 y *Synthesium* Stunkard et Alvey, 1930.

En la misma línea, Price (1932), en su revisión sobre los digénidos parásitos de mamíferos marinos, consideró las familias Brachycladiidae Faust, 1929 y Campulidae como sinónimos de Fasciolidae. Este autor aceptó la subfamilia Campulinae propuesta por Stunkard y Alvey (1930) y la consideró formada por 7 géneros. A los 5 citados anteriormente se añadieron *Odhneriella* y un género nuevo, *Hadwenius*.

En 1948, Skrjabin (citado en Skrjabin, 1976) propuso que la subfamilia Campulinae fuera considerada de nuevo como familia, estando formada, además, por dos subfamilias: Campulinae y Nasitrematinae Ozaki, 1935. El género *Nasitrema* Ozaki, 1935 fue descrito por primera vez por Ozaki (1935), a partir de material hallado en la cavidad nasal del cetáceo *Neophocaena phocaenoides* (Cuvier, 1829). Ozaki (1935) los identificó como fasciólidos, puesto que parasitaban mamíferos marinos y la forma de los huevos era idéntica a los de la entonces subfamilia Campulinae. Sin embargo, excluyó a los nasitremátinos de Campulinae por carecer de ciegos anteriores, y de Fasciolinae Stiles et Hassall, 1898 por no presentar ramificaciones en los ciegos ni en la vesícula excretora. También advirtió cierta similitud en algunos aspectos con otra de las subfamilias de fasciólidos, Fascioloopsinae Odhner, 1910 pero prefirió erigir una nueva subfamilia, Nasitrematinae Ozaki, 1935. Sin embargo, Yamaguti (1951) elevó la subfamilia Nasitrematinae al rango de familia, puesto que, según su criterio, no podía ser incluida en ninguna de las dos familias con las que se la había relacionado, Fasciolidae y Campulidae. No podía tratarse de fasciólidos por la ausencia de bolsa del cirro y por las diferentes características de los huevos. Estos son de sección circular y sin engrosamiento en el polo posterior en fasciólidos, mientras que en nasitremátidos son de sección triangular y de cubierta gruesa. Tampoco parecía oportuno situar a los nasitremátidos dentro de los campúlidos, por la ausencia de ciegos anteriores y de la bolsa del cirro, así como por las diferencias en el sistema excretor.

Delyamure (1955) aceptó el estatus de familia para los campúlidos, incluyendo dos géneros más: *Leucasiella* y *Oschmarinella*.

Poco tiempo después, Yamaguti (1958) realizó el primer intento sistemático dentro de la familia Campulidae, estableciendo cinco subfamilias: Campulinae (que comprendía los géneros *Campula* y *Zalophotrema*), Lecithodesminae (con *Lecithodesmus*), Odhneriellinae (formada por *Odhneriella* y *Hadwenius*), Orthosplanchninae (con *Orthosplanchnus* y *Oschmarinella*) y Synthesiinae (que incluía *Synthesium*). En 1971, Yamaguti añadió una subfamilia más a las cinco anteriores, Hunterotrematinae, para albergar a los digénidos del género *Hunterotrema*, parásitos de los pulmones del cetáceo odontoceto *Inia geoffrensis*.

Beverley-Burton (1972) reconoció también el estatus de los campúlidos como familia, aunque manteniendo una estrecha relación con los Fasciolidae. Según esta autora, los representantes de ambas familias tenían una anatomía similar y, además, parasitaban el hígado de sus hospedadores, si bien este último rasgo no es definitorio porque otras familias no relacionadas en absoluto con los campúlidos (Dicrocoeliidae (Looss, 1899) Odhner, 1910 y Opistorchiidae Braun, 1901) también parasitaban el hígado.

Hasta ese momento, la taxonomía de los campúlidos se había basado fundamentalmente en la morfología del adulto. Nuevos datos de otros estados del ciclo vital iban a cuestionar las relaciones filogenéticas tradicionalmente aceptadas. Nahas y Cable (1964) discutieron la posibilidad de que el nuevo suborden Acanthocolpiata Nahas et Cable, 1964, erigido por ellos para albergar a los Acanthocolpidae Lühe, 1906 (parásitos de peces), podría incluir a los Campulidae. Uno de los caracteres distintivos de los Acanthocolpiata era que la cercaria es biocelada, al igual que la cercaria putativa del campúlido *Orthosplanchnus fraterculus* Odhner, 1905 (véase Cable, 1974). La cercaria de los fasciólidos, por contra, carecía de manchas oculares. A falta de más detalles sobre los ciclos de vida de los campúlidos, Beverley-Burton (1972) consideró especulativas las relaciones de éstos con otros grupos.

Skrjabin (1970) describió la especie *Cetitrema foliiformis* Skrjabin, 1970, cuyos miembros parasitaban al cetáceo misticeto *Balaenoptera edeni* Anderson, 1878. Para albergar a esta nueva especie creó la subfamilia Cetitrematinae Skrjabin, 1970, dentro de la familia Campulidae, formada por las subfamilias Campulinae y Nasitrematinae, según este autor. En una revisión posterior, Skrjabin (1976) intentó establecer con más claridad las

relaciones entre campúlidos y nasitremátidos. La especie *C. foliiformis* compartía, según este autor, características de los Campulidae y Nasitrematidae, considerándolo como el eslabón que unía a los campúlidos y nasitremátidos. Skrjabin (1976) estableció entonces la superfamilia Campuloidea Skrjabin, 1976 para englobar a ambas familias.

Con el advenimiento de la metodología cladista, las relaciones filogenéticas de la familia Campulidae con otros grupos han sufrido constantes cambios. La familia Nasitrematidae ha quedado como un grupo incluido dentro de la familia Campulidae (Brooks et al., 1985, 1989), pero su relación exacta con los campúlidos no ha sido estudiada.

Por una parte, en un estudio cladístico sobre la filogenia de los trematodos (Brooks et al., 1985), se reforzó la estrecha relación entre las familias Campulidae y Fasciolidae, considerándolas como grupos hermanos, dentro de los Echinostomatiformes La Rue, 1957. Sin embargo, posteriormente, Brooks et al. (1989) trasladaron a los Campulidae de los Fascioloidea al suborden Acanthocolpata, idea ya sugerida anteriormente (Nahas y Cable, 1964; Cable, 1974;). Según Brooks et al. (1989), la hipótesis de Cable está apoyada por cinco caracteres derivados: (1) presencia de manchas oculares en el cuerpo de campúlidos adultos, lo cual sugiere la presencia de cercarias con manchas oculares, condición que no se cumple en los echinostomatiformes, (2) un gran cirro espinoso, (3) metratermo espinoso, (4) prefaringe larga y (5) ventosa oral terminal o subterminal. Estos autores consideraron que los caracteres 2-5 son sinapomórficos (es decir, derivados y compartidos) para los Campulidae y Acanthocolpidae. Por tanto, los campúlidos serían Acanthocolpoidea con testículos altamente lobulados o dendríticos y huevos de sección triangular. Sin embargo, Dailey (1985) no encontró manchas en el miracidio de *Campula rochebruni* (Poirier, 1886). Según Caballero (1952), la similitud morfológica entre los representantes del género *Pleorchis* Railliet, 1896 (familia Acanthocolpidae) y los campúlidos es completamente superficial.

Para complicar más la situación, Appy (1974) había sugerido que el sistema excretor de *Nasitrema gondo* Yamaguti, 1951 era más parecido al de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 que al del campúlido *Zalophotrema hepaticum* Stunkard et Alvey, 1929. Sin embargo, el sistema excretor de esta última especie parecía similar al de los representantes de la familia Dicrocoeliidae, digénidos parásitos de vertebrados.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## **2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De todo lo expuesto en el capítulo anterior puede deducirse que las relaciones entre los distintos géneros de la familia Campulidae y las relaciones filogenéticas de esta familia resultan todavía confusas y controvertidas. Varios factores justifican claramente esta situación.

### **2.1.1. Criterio de autoridad**

Parte de la confusión en la que se encuentra sumida la taxonomía de la familia Campulidae es debida al empleo del criterio de autoridad. El problema radica en que distintos autores dan diferente peso a los mismos caracteres, sin explicitar los motivos de por qué un carácter es considerado más válido que otro a nivel taxonómico. En numerosas ocasiones, la subjetividad del investigador es la que decide la validez taxonómica de un carácter y, en la mayoría de casos, estos caracteres se utilizan porque tradicionalmente se ha venido haciendo así. Quicke (1993) apunta hacia el empleo de criterios más objetivos, por ejemplo, a la hora de determinar si un espécimen pertenece o no a un nuevo taxón, qué relaciones existen entre los miembros de un grupo de taxones, o dónde debe situarse las líneas divisorias entre taxones de rango elevado. A comienzos de los 60, la necesidad de una taxonomía más objetiva dió lugar al nacimiento de una nueva y más rigurosa área de la sistemática: la taxonomía numérica o fenética. Casi al mismo tiempo, W. Henning contribuía de forma muy importante a la sistemática moderna (i) al enfatizar que la reconstrucción filogenética podía basarse únicamente en caracteres derivados compartidos (sinapomorfias), y (ii) al proporcionar una metodología para el análisis filogenético basado en este principio (Quicke, 1993). Esta metodología es la que se denomina cladismo o sistemática filogenética, cuyo empleo va siendo cada vez más común, como lo demuestran la gran cantidad de publicaciones aparecidas en los últimos años. Existen varios métodos basados en principios cladistas para reconstruir filogenias, pero el más utilizado es el de parsimonia, según el cual, la mejor hipótesis sobre las relaciones filogenéticas es aquella en la que se requiere el menor número de cambios evolutivos.

### **2.1.2. Criterios taxonómicos**

Prácticamente toda la taxonomía de los campúlidos se basa en caracteres morfológicos y/o morfométricos del adulto. Ello se debe al total desconocimiento de los

ciclos vitales (Raga y Balbuena, 1988). El hecho de que todo el ciclo vital se desarrolle en el océano, frecuentemente en el medio pelágico, contribuye a este desconocimiento. Además, no existe acuerdo sobre qué caracteres son más fiables para reconstruir filogenias, los de las fases larvianas o la de los adultos. Así, Cable (1974) consideró que las clasificaciones deberían basarse en caracteres larvianos, especialmente los de la cercaria. De acuerdo con esto, los caracteres derivados de la forma adulta no serían buenos indicadores de la filogenia, debido a que pueden darse por evolución convergente. Los caracteres larvianos serían recapitulaciones de formas adultas ancestrales, siendo más estables filogenéticamente. Por contra, Gibson (1981) sugirió que serían precisamente los caracteres de la cercaria los que aparecían por convergencia. En este caso, los caracteres de las formas larvianas no serían recapitulaciones, sino adaptaciones secundarias a la vida parasitaria, por lo que su fiabilidad como indicadores filogenéticos sería dudosa. Con el fin de resolver la controversia existente en torno a la elección de caracteres larvianos o de adultos para inferir la filogenia, Brooks et al. (1985) realizaron un análisis cladístico de los Digenea basado en ambos tipos de caracteres. No se detectaron incongruencias entre las inferencias filogenéticas basadas sólo en caracteres de adulto y las basadas sólo en caracteres larvianos, por lo que se llegó a la conclusión de que las larvas no parecen ser recapitulaciones de formas adultas ancestrales. Por lo demás, la idea de recapitulación es un error conceptual, puesto que se trata de un caso especial de heterocronía (De Renzi, 1986). Según Brooks y McLennan (1993a), a raíz del trabajo de Brooks et al. (1985), consideraron que los caracteres larvianos y del adulto indican las mismas relaciones filogenéticas, por lo que la información procedente de ambos tipos de fuente es necesaria para la construcción de filogenias consistentes. Estos mismos autores sugieren que, puesto que las diferentes manifestaciones fenotípicas dependen del genotipo, y dado que las relaciones de parentesco residen en último término en dicho genotipo, no hay motivo para sospechar que los rasgos de un determinado estado larviano reflejan mejor las relaciones filéticas que los del adulto, o viceversa. La capacidad de responder a determinadas presiones selectivas está limitada por la historia filogenética del organismo, por lo que las adaptaciones deben ser evaluadas dentro de un contexto filogenético (Brooks y McLennan, 1993a).

Por otro lado, independientemente del tipo de caracteres empleados, la inferencia de relaciones filogenéticas está sujeta al problema del reconocimiento de las homoplasias (caracteres que no indican parentesco), es decir, de cómo distinguirlas de las homologías. Un ejemplo lo encontramos en los trabajos de Brooks et al. (1985, 1989)). Estos autores,

consideraron, en principio, que los campúlidos estaban más cercanos a fasciólidos (Brooks et al., 1985). Pero al incluir más caracteres, detectaron ciertas homoplasias (la morfología de los testículos), por lo que los Campulidae se trasladaron posteriormente junto a los acantocólpidos.

### **2.1.3. Condiciones de los vermes**

Existen varios factores que dificultan el estudio taxonómico de los campúlidos utilizando caracteres morfológicos. En primer lugar, hay una gran escasez de material en condiciones aceptables para que se conserven íntegros los rasgos morfológicos relevantes. Esto conlleva a que las descripciones sean, a menudo, ambiguas e incompletas. La causa principal de este problema es que la recolección de los parásitos se realiza, frecuentemente, varias horas después de la muerte del hospedador, por lo que pueden acaecer cambios degenerativos en los helmintos. Además, el gran tamaño que pueden alcanzar los hospedadores dificulta en gran medida la recolección de los helmintos. Según Adams y Rausch (1989), estos cambios se manifiestan principalmente por la pérdida secuencial de las espinas del tegumento, metratermo y cirro. Dado que estos caracteres tienen importancia en la identificación a nivel genérico, la utilización de material en mal estado puede conducir a determinaciones erróneas. De acuerdo con esto, Gibson (1979) señaló que el empleo de material que no esté en buenas condiciones (congelado, etc.) es de escaso valor cuando se pretenden realizar estudios taxonómicos basados en caracteres morfológicos.

## **2.2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

### **2.2.1. Relaciones filogenéticas**

Ante la problemática planteada, en el presente trabajo hemos intentado aclarar las relaciones filogenéticas de la familia Campulidae mediante una metodología distinta a la tradicional, basada en el estudio de las secuencias del DNA. Una de las técnicas moleculares empleada en el presente trabajo (amplificación del DNA por PCR, véanse los apartados 3.1. y 3.2.3.) no requiere el empleo de material fresco, por lo que, en principio, no nos encontramos con el problema planteado en el punto 2.1.3., respecto a las condiciones de los vermes. El criterio de autoridad no tiene ningún sentido en el estudio de secuencias moleculares, puesto que las distintas aproximaciones al análisis de las secuencias se basan

en principios cladistas (como la parsimonia) o fenéticos (como el UPGMA) (véase punto 2.1.1.). Otros métodos, como el del vecino más próximo (o neighbour-joining), no se ajustan exactamente a ninguno de los dos principios (Li y Graur, 1991). Por ello, los métodos empleados para inferir una filogenia molecular se agrupan, como se verá en el apartado 3.2.7., en métodos basados en distancias y basados en caracteres.

### **2.2.2. Método comparativo en biología**

Hipótesis filogenéticas sólidamente fundadas pueden utilizarse para generar predicciones acerca de la evolución de muchos sistemas biológicos, a partir de estudios bioquímicos y fisiológicos, e incluso comportamentales (Quicke, 1993). Todo ello formaría parte del área de la biología comparativa, que estudia la diversidad de los organismos y las causas de dicha diversidad (Wiley, 1981). La sistemática se incluye dentro de este área de la biología, de forma que el investigador está interesado en averiguar el patrón que da lugar a la diversidad de organismos y a partir del cual podría inferirse el curso histórico de la evolución. Por lo tanto, el interés en obtener una filogenia no estriba únicamente en determinar qué taxones están más o menos relacionados entre sí, sino que puede utilizarse como una herramienta para intentar profundizar en los procesos que trascienden más allá de lo que es una simple topología. En nuestro caso, se trataría de investigar los patrones de asociación parásito-hospedador a partir de la predicción de procesos coevolutivos o de colonización, como se verá en el apartado 4.1.1.

### **2.3. OBJETIVOS**

Tres fueron los objetivos que nos propusimos al iniciar esta Tesis Doctoral:

a) Esclarecer las relaciones filogenéticas entre los géneros que componen la familia Campulidae mediante el estudio de un gen mitocondrial.

b) Aportar más información sobre las relaciones filogenéticas de la familia Campulidae y otros grupos. Por un lado, se trata de aclarar si la familia Nasitrematidae es o no un grupo hermano independiente de la familia Campulidae. Por otro lado, se intenta arrojar luz sobre el problema del origen de los campúlidos, investigando las relaciones de esta familia respecto a fasciólidos y acantocólpidos.

c) Establecer, en la medida de lo posible, los patrones que han llevado a la asociación entre los campúlidos y sus correspondientes hospedadores. Hipótesis alternativas de coevolución y colonización serán evaluadas a partir de la existencia o no de la congruencia al comparar las filogenias del hospedador y parásito, y mediante la información proporcionada por la biogeografía.



### **3. FILOGENIA MOLECULAR DE LA FAMILIA CAMPULIDAE**



### 3.1. RECONSTRUCCIÓN DE FILOGENIAS MOLECULARES: EMPLEO DEL ADN MITOCONDRIAL (mtDNA)

#### 3.1.1. Características del mtDNA

En metazoos, el genoma mitocondrial se compone de una molécula de DNA de doble cadena, circular y cerrada covalentemente, con secuencias que, salvo raras excepciones, son de copia única. Esta molécula presenta variación en tamaño, tanto inter como intraespecíficamente (de 14.2 a 19.5 kb), pero no en cuanto al contenido de genes (Brown, 1985). El genoma mitocondrial presenta genes que codifican para trece proteínas que corresponden a subunidades de complejos enzimáticos implicados en la cadena de transporte electrónico y síntesis de ATP: subunidades I y III del complejo citocromo-oxidasa, apoenzima del citocromo b, subunidades 6 y 8 del complejo ATP sintetasa mitocondrial y subunidades 1-6 del complejo NAD-deshidrogenasa), dos RNAs ribosómicos (rRNA 12s y 16s) y 22 RNAs de transferencia (tRNA).

El mtDNA de metazoos presenta una serie de características estructurales que lo diferencian de cualquier otro sistema génico:

1. Disposición compacta de los genes, con escasa presencia de secuencias intergénicas, e incluso total ausencia.
2. Ausencia de intrones en los genes estructurales (genes codificadores de proteínas y genes especificadores de RNA).
3. Distribución dispersa de los tRNA entre el resto de genes.
4. Concentración de las secuencias reguladoras en una única región del genoma: la región control.

Otras características destacables del mtDNA son su gran simplificación en cuanto al conjunto de enzimas implicados en su metabolismo, en comparación con el del genoma nuclear. La replicación del mtDNA de animales se inicia independientemente en cada una de las cadenas complementarias y procede de forma continua, pero asimétricamente respecto al tiempo de iniciación para cada cadena (Clayton, 1982). En el genoma nuclear o

en el procariótico, la replicación es discontinua, simétrica y bidireccional. Para reparar el DNA nuclear, existen complejos sistemas enzimáticos que no se han encontrado en el mtDNA. Esta deficiencia en los mecanismos de reparación se ha relacionado con la alta tasa de cambio encontrada en el mtDNA (tasa de sustitución nucleotídica). Otra peculiaridad del mtDNA de metazoos es el modo de herencia estrictamente materna, así como la ausencia de recombinación entre moléculas (Brown, 1985; Avise, 1986; Moritz et al., 1987; Simon, 1991). Todo ello hace del mtDNA un sistema genético más simple que el DNA nuclear, de fácil extracción y manipulación, y gran simplicidad (tamaño pequeño, ausencia de intrones, etc.). Finalmente, el código genético difiere ligeramente del universal, necesitando menos tRNAs para leer todos los codones con sentido. La significación de los codones difiere también entre taxones, por lo que no existe un código genético mitocondrial común. Ello requiere un conocimiento del significado de los codones en cada sistema para poder llevar a cabo una correcta traducción a aminoácidos.

### **3.1.2. Variabilidad del mtDNA**

Debido a la uniformidad de tamaño del mtDNA, a su contenido génico y a su importante papel en el metabolismo celular, se esperaba que la variabilidad del mtDNA fuera mínima. Sin embargo, en contra de esta expectativa, la variabilidad del mtDNA es bastante elevada (Brown, 1985). La tasa a la que evoluciona el mtDNA es distinta a la del nuclear y en algunos casos, como en vertebrados, es 10 veces mayor que la del nuclear (Brown, 1985).

Dicha variabilidad viene determinada por tres tipos de fenómenos: sustituciones nucleotídicas, inserciones-delecciones y reordenaciones génicas (inversiones y transposiciones).

#### **a) Sustituciones nucleotídicas**

##### **a.1) Transiciones y transversiones**

Las sustituciones implican el reemplazamiento de un nucleótido por otro, siendo las responsables principales de la variabilidad en el mtDNA. Un tipo de sustitución es la transición, es decir, una purina, Adenina (A) o Guanina (G), o pirimidina, Timina (T) o Citosina (C), es reemplazada por otra purina o pirimidina, respectivamente. Cuando una

purina es sustituida por una pirimidina o viceversa, tenemos una mutación por transversión. Podemos distinguir dos tipos de transición, la de A a G (o viceversa) y la de T a C (o viceversa). En cuanto a las transversiones, éstas pueden ocurrir al sustituir A por T (o viceversa), A por C (o viceversa), T por G (o viceversa) o C por G (o viceversa) (Fig. 1).

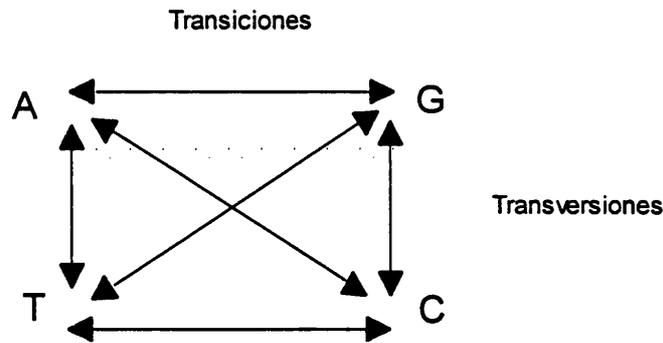


Figura 1. Esquema de las sustituciones nucleotídicas por transición y transversión. Las transiciones son sustituciones entre las purinas A (Adenina) y G (Guanina) o entre las pirimidinas C (Citosina) y T (Timina). Las transversiones son sustituciones entre una purina y una pirimidina.

Figure 1. Diagram of transition and transversion nucleotide substitutions.

Las transiciones ocurren con una frecuencia mucho más alta que las transversiones en el mtDNA, pero esto sólo ocurre entre especies estrechamente relacionadas (Brown et al., 1982; DeSalle et al., 1987). Si los taxones están alejados en el tiempo, la sucesión de múltiples transiciones y la acumulación de transversiones, las cuales borran las diferencias transicionales, pueden eliminar este sesgo transicional (Tabla 4) (DeSalle et al., 1987). Las regiones con niveles muy elevados de sustitución se dice que están saturadas (Simon, 1991).

Tabla 4. Efecto de pares de mutaciones sobre el registro de transiciones y transversiones (tomado de DeSalle et al., 1987).

Table 4. Effect of mutation pairs on the record of transitions and transversions (from DeSalle et al., 1987).

| Número y tipos de mutación  | Ejemplos      | Diferencias detectadas   |
|-----------------------------|---------------|--------------------------|
| Dos transiciones            | C → T → C     | Ninguna                  |
| Dos transversiones          | C → G → C o T | Ninguna o una transición |
| Transición más transversión | C → T → G o A | Una transversión         |

Según Aquadro et al. (1984), la disminución en la proporción de transiciones conforme aumenta la divergencia nucleotídica es una consecuencia del enmascaramiento de estas transiciones por parte de las transversiones.

#### a.2) Sustituciones sinónimas y no sinónimas

En regiones codificantes de proteínas podemos reconocer otros dos tipos de sustitución: sinónimas (o silenciosas) y no sinónimas (o reemplazantes). En el primer caso, el reemplazamiento de un nucleótido por otro no da lugar a un cambio de aminoácido, mientras que el segundo tipo sí. La tasa de sustituciones silenciosas (sinónimas) es mucho más elevada que la de las no sinónimas, puesto que una sustitución de un aminoácido por otro podría dar lugar a un cambio desfavorable en la proteína. Generalmente, una sustitución en la segunda posición del codón da lugar siempre a cambio de aminoácido, mientras que una fracción de las sustituciones en la primera y, especialmente, en la tercera base son sinónimas:  $\cong 5\%$  para la primera posición y  $\cong 72\%$  para la tercera posición, bajo el supuesto de equivalencia en las frecuencias nucleotídicas y de que las sustituciones se producen al azar (Nei y Gojobori, 1986).

#### b) Inserciones, deleciones y reordenaciones génicas

Las inserciones implican la adición de uno o más nucleótidos en la secuencia, mientras que las deleciones indican la pérdida de uno o más nucleótidos en el DNA. Este tipo de fenómenos ocurren con una frecuencia cinco veces menor que la de las sustituciones. Finalmente, las inversiones y transposiciones son fenómenos muy raros (de 100 a 1000 veces menor que el resto de cambios) y sólo se ha observado al comparar la distribución de los genes entre los phyla animales (Brown, 1985). Las inversiones consisten en la rotación de  $180^\circ$  de un segmento de DNA de cadena doble, formado por dos o más pares de bases. La transposición consiste en el movimiento de secuencias génicas de una localización cromosómica a otra.

#### **3.1.3. El mtDNA como marcador evolutivo**

El alto grado de polimorfismo del genoma mitocondrial, junto con el particular modo de herencia, permite la reconstrucción de relaciones evolutivas entre especies. Ello ofrece nuevas y amplias perspectivas en la determinación de relaciones filogenéticas, puesto que

no están enmascaradas por la recombinación. Además, el empleo de las secuencias del mtDNA en la resolución de filogenias ha permitido determinar la dinámica evolutiva del genoma mitocondrial y sus implicaciones en su utilización con fines filogenéticos. No obstante, el empleo del mtDNA como marcador genético ha de considerarse con cierta precaución, puesto que hay que tener en cuenta el efecto de ciertos factores sobre las reconstrucciones filogenéticas y que son de gran importancia a la hora de determinar la fiabilidad de las mismas. Algunos de ellos son la variación de las tasas de sustitución entre taxones y dentro de ellos, las constricciones estructurales y funcionales, la saturación por sustituciones múltiples, el sesgo en la composición nucleotídica, los patrones alterados de sustitución nucleotídica, etc. (Moritz et al., 1987; Simon, 1991).

#### **3.1.4. Obtención de filogenias moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Secuenciación**

El rápido y gran desarrollo de las técnicas moleculares han permitido el empleo de las secuencias de DNA para establecer relaciones filogenéticas entre taxones (Simon, 1991). La Reacción en Cadena de la Polimerasa es un método rápido de amplificación del DNA (Mullis et al., 1986), cuya principal ventaja es la de permitir una rápida selección, aislamiento y amplificación de regiones del DNA de interés a partir de pequeñas cantidades de tejido, siempre que se disponga de "primers" o cebadores flanqueando la región a amplificar (Simon, 1991). Otra de las ventajas de la PCR es la posibilidad de amplificar muestras que no son frescas, como material conservado en diferentes soluciones (alcohol, formol, etc.), tejidos que han sido congelados, liofilizados, etc. (Pääbo, 1989; Rogers et al., 1990). Una vez amplificado el DNA, es posible la caracterización completa de los nucleótidos que lo componen por medio de la secuenciación. Tras la secuenciación, se pueden obtener estimas cuantitativas de la divergencia entre las secuencias nucleotídicas comparadas.

Estas novedosas metodologías son las que se han empleado en el presente estudio para obtener la filogenia de la familia Campulidae. En el siguiente apartado, se verán con más detalle en qué consisten.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Especies de digénidos

Inicialmente, en el análisis filogenético molecular se procedió al estudio de 20 especies de digénidos. En la Tabla 5 se exponen los nombres de las especies cuyo mtDNA se secuenció. 15 especies pertenecen a la familia Campulidae, 2 a la familia Nasitremitidae, 1 a Fasciolidae, 1 a Dicrocoeliidae y 1 a Acanthocolpidae. La secuencia de *F. hepatica* (Fasciolidae) se tomó de la base de datos del Genbank (nº de acceso M93388). Del total de especies secuenciadas, únicamente 7, junto con *F. hepatica*, fueron introducidas en el análisis debido a una serie de problemas que se explicarán en el apartado de resultados: cinco campúlidos *Campula oblonga*, *Zalophotrema atlanticum*, *Hadwenius tursionis*, *Orthosplanchnus fraterculus*, *Oschmarinella mascomai*, el nasitremátido *Nasitrema globicephalae* y el dicrocélido *Dicrocoelium dendriticum*.

### 3.2.2. Extracción del DNA total

La extracción del DNA se realizó siguiendo el protocolo de Lumb et al. (1993), con ligeras modificaciones. Para ello, se utilizó un único individuo, o incluso un fragmento si se trataba de un verme de gran tamaño. El protocolo se basa, fundamentalmente, en los siguientes pasos:

1. Si el verme está conservado en etanol 70%, se deja en uno de gradación menor durante un día y después se pasa a tampón T.E. 1x (Tris 10mM y EDTA 1mM, pH 8.0) durante otras 24 horas más. Si se hallaban conservados en otra solución, se pasaban directamente a T.E. 1x.
2. Después se procede a la homogeneización del individuo en un tampón que contiene T.E. 1x, proteinasa K (0,2 mg/ml) y Tritón X100 1%. El volumen del tampón dependía del tamaño del verme.
3. Se incuba la mezcla a 37°C durante 4 ó 5 horas. Puede añadirse de nuevo proteinasa K a mitad de la digestión.
4. Posteriormente, se lleva a cabo una extracción fenol-cloroformo (Sambrook et al., 1989).
5. Finalmente, el DNA se resuspende en un volumen variable de T.E. 1x, dependiendo del tamaño del verme.

Filogenia molecular de Campulidae

Tabla 5. Se indican las especies secuenciadas en el presente trabajo, el hospedador, microhábitat y localidad en la que se encontraron los parásitos. Origen: hace referencia a la persona y/o entidad de donde procede el material. DBAUV: Dept. Biol. Animal de la Univ. de València; NHM: Natural History Museum (Londres) (Drs D.I. Gibson y R. Bray); CSULB: California State Univ., Long Beach (Prof. M.D. Dailey); PBS: Pacific Biological Station, Nanaimo, Canadá (Prof. L. Margolis); SSU: Simferopol State Univ. (Prof. M. Yurakhno); CABIP: Commonwealth Agricultural Bureaux, Institute of Parasitology (Dra A. Jones). (\*): conservado en alcohol glicerina 5 %; (+): en fluido de Lavdowsky o A.F.A. (alcohol, formol al 40 % y ácido acético); (\*\*): en alcohol 100 %. El resto en alcohol 70 %. A. D.: ampolla duodenal, C. B. : conductos biliares, C. H.: conductos hepáticos, I: intestino, P: pulmones, S. P.: senos pterigoideos.

Table 5. Host, locality, microhabitat and source material of the Campulidae species sequenced in this study. Note that (\*): specimens preserved in 5 % glycerin-alcohol; (+): in Lavdowsky fluid or A.F.A.; (\*\*): in 100% alcohol. The rest in 70% alcohol. Microhabitat abbreviations: A. D., duodenal ampulla, C. B. , bile ducts, C. H., hepatic ducts, I, intestine, P, lungas, S. P., pterigoid sinuses. See above for abbreviations of source material.

| Especies                                    | Hospedador                      | Localidad geográfica             | Localización en el hospedador | Origen                            |
|---|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Familia Campulidae</b>                   |                                 |                                  |                               |                                   |
| <b>Subfamilia Campulinae</b>                |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Campula oblonga</i>                      | <i>Phocoena phocoena</i>        | Dinamarca (Atlántico N.)         | C. H.                         | DBAUV                             |
| <i>C. rochebruni</i>                        | <i>Stenella coeruleoalba</i>    | Suráfrica (Atlántico S.)         | C. H.                         | NHM                               |
| <i>Zalophotrema pacificum</i> (+)           | <i>S. coeruleoalba</i>          | Pacífico E.                      | C. P.                         | CSULB                             |
| <i>Z. atlanticum</i>                        | <i>S. coeruleoalba</i>          | Mediterráneo occidental          | C. H.                         | DBAUV                             |
| <b>Subfamilia Lecithodesminae</b>           |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Lecithodesmus goliath</i> (*)            | <i>Balaenoptera physalus</i>    | Columbia Británica (Pacífico E.) | C. B.                         | PBS                               |
| <i>L. petrowi</i>                           | <i>B. edeni</i>                 | Indico                           | C. H.                         | SSU                               |
| <b>Subfamilia Hunterotrematinae</b>         |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Hunterotrema macrosoma</i>               | <i>Inia geoffrensis</i>         | Amazonas                         | P.                            | CSULB                             |
| <b>Subfamilia Orthosplanchninae</b>         |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Hadwenius tursionis</i>                  | <i>Tursiops truncatus</i>       | Mediterráneo                     | I.                            | DBAUV                             |
| <i>H. delamurei</i>                         | <i>Globicephala melas</i>       | Islas Feroe (Atlántico N.)       | I.                            | DBAUV                             |
| <i>H. subtilis</i>                          | <i>G. melas</i>                 | Islas Feroe (Atlántico N.)       | I.                            | DBAUV                             |
| <i>H. nipponicus</i> (*)                    | <i>P. phocoena</i>              | British Columbia (Pacífico N.)   | A. D.                         | PBS                               |
| <i>Oschmarinella mascomai</i>               | <i>S. coeruleoalba</i>          | Mediterráneo occidental          | C. H.                         | DBAUV                             |
| <i>Orthosplanchnus arcticus</i>             | <i>Erignathus barbatus</i>      | Mar de Ojotsk (Pacífico O.)      | C. B.                         | SSU                               |
| <i>O. oculus</i>                            | <i>Odobenus rosmarus</i>        | Mar de Bering (Pacífico N.)      | I.                            | SSU                               |
| <i>O. fraterculus</i>                       | <i>Enhydra lutris</i>           | Isla de Amchitka (Alaska)        | C. B.                         | PBS                               |
| <b>Familia Nasitremitidae</b>               |                                 |                                  |                               |                                   |
| <b>Subfamilia Nasitremitinae</b>            |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Nasitrema globicephalae</i>              | <i>Cephalorhynchus eutropia</i> | Chile                            | S. P.                         | L. Brieua (Univ. Austral) (Chile) |
| <b>Subfamilia Cetitremitinae</b>            |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Cetitrema foliiformis</i>                | <i>B. edeni</i>                 | Indico N.O.                      | C. H.                         | SSU                               |
| <b>Familia Dicrocoeliidae</b>               |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i>             | <i>Ovis aries</i>               | Teruel (España)                  | C. H.                         | DBAUV                             |
| <b>Familia Fasciolidae</b>                  |                                 |                                  |                               |                                   |
| <b>Subfamilia Fasciolinae</b>               |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Fasciola hepatica</i>                    |                                 |                                  |                               | Genbank , nº de acceso M93388     |
| <b>Subfamilia Fasciolopsinae</b>            |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Fasciolopsis buski</i> (Lankester, 1857) | <i>Sus scrofa</i>               | Hungría                          | C. H.                         | CABIP                             |
| <b>Familia Acanthocolpidae</b>              |                                 |                                  |                               |                                   |
| <b>Subfamilia Stephanostominae</b>          |                                 |                                  |                               |                                   |
| <i>Stephanostomum bacatum</i> (**)          | <i>Myoxocephalus scorpius</i>   | Escocia                          | I.                            | NHM                               |



### 3.2.3. Amplificación del mtDNA

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) requiere el uso de unos fragmentos de DNA, denominados "primers" u oligonucleótidos, que flanquean la región que se quiere amplificar. La secuencia de estos primers debe ser homóloga o bastante similar a la de los segmentos de la muestra de mtDNA que limita la región que va a ser amplificada. Si no se conoce la secuencia de la porción de DNA que se va a amplificar, deben elegirse unos primers basados en secuencias de parientes próximos a la especie en cuestión. A la hora de diseñar los primers, se deben tener en cuenta diferentes parámetros, como el grado de divergencia entre las secuencias de los primers y el mtDNA a amplificar, la proporción de G-C, la naturaleza de los codones y uso de los mismos (según el código genético), la formación de estructuras secundarias, la temperatura de hibridación, etc.

En el presente estudio se emplearon dos pares de primers, los cuales flanqueaban el gen de la subunidad 3 de la nicotinamida-adenina-dinucleótido deshidrogenasa (NADH3) de la cadena respiratoria (Fig. 2). La NADH-Deshidrogenasa es el mayor de los complejos enzimáticos respiratorios, de unos 800 KDa, constituido por más de 22 cadenas polipeptídicas. De ellas, 7 componentes de la fracción hidrofóbica están codificadas en el genoma mitocondrial (del NADH1 al NADH6 y el NADH4L). También se amplificó parcialmente el tRNA de la isoleucina y todo el tRNA de la leucina. Ambos tRNAs flanquean el extremo 5' del gen en el orden mencionado (Fig. 2).

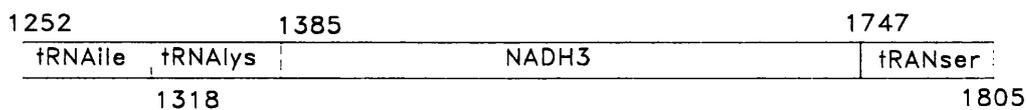


Figura 2. Esquema del gen de la NADH3 de *Fasciola hepatica* y de los tRNAs de la isoleucina, lisina y serina. Los números indican las posiciones de inicio y terminación del gen y de los tRNAs.

Figure 2. Diagram of *Fasciola hepatica* NADH3 gene and isoleucine, lysine and serine tRNAs. Numbers indicate the initial and end positions of the gene and tRNAs.

El primer par de oligonucleótidos se diseñó con el programa PRIMER a partir de la secuencia de la NADH3 del trematodo *F. hepatica* (véase Garey y Wolstenholme, 1989). Se empleó este gen por dos motivos: en primer lugar, se trata de un gen mitocondrial, cuyas ventajas ya fueron expuestas en el apartado 3.1., además de que otras subunidades de

este gen han sido empleadas para reconstruir la filogenia de las especies del grupo *obscura* de *Drosophila* (Barrio et al., 1994). En segundo lugar, *F. hepatica* es la única especie, de las supuestamente relacionadas con los campúlidos, de la que se conoce la secuencia parcial del mtDNA, en donde se incluye la NADH3.

Ambos primers constan de 25 pares de bases, y las secuencias son las siguientes:

1. Directo (PDF): 5'-GCGTTAGCAGGATCCTGTGATATAG-3' (Durviz, S.A.)

2. Reverso (PRF): 5'-CCAAAGCITAAATCATCGTTAGCAG-3' (Durviz, S.A.).

El primer oligonucleótido corresponde a las posiciones 1263 a 1287 de la secuencia de *F. hepatica* y el segundo a las posiciones 1767 a 1791. La longitud total del fragmento amplificado fue de 480 pares de bases. Subrayados aparecen los puntos de corte para el enzima *Bam*HI en el primer oligonucleótido y para el enzima *Hind*III en el segundo. De esta manera, es posible clonar los productos obtenidos por la PCR, como se explicará más adelante.

Dada la dificultad de obtener amplificados con el primer par de primers, nos planteamos la posibilidad de que no existiese la homología necesaria entre los primers y el DNA. Este es el motivo por el que se diseñaron otros dos primers (PDC-PRC) a partir de dos secuencias previas, obtenidas con el primer par de oligonucleótidos (*C. oblonga* y *O. mascomai*). Sus secuencias se exponen a continuación:

1. Directo (PDC): 5'-CTACTAGTGAGATTGATCT(T/C)CGTCGGT-3' (Farmacia).

2. Reverso (PRC): 5'-CTACTAGTCCCACTCAAC(G/A)TAACC(T/C)T-3' (Farmacia).

El primer directo presenta una posición degenerada (T/C) y el reverso, dos (G/A, T/C). La longitud total del fragmento amplificado fue de 468 pares de bases. Los puntos de corte para el enzima *Spe*I aparecen subrayados en ambos oligonucleótidos (véase más adelante la explicación sobre clonación).

Cuando se dispuso del nuevo juego de primers se ensayaron todas las combinaciones posibles en las reacciones de amplificación: PDF-PRF, PDC-PRC, PDF-PRC, PDC-PRF.

El protocolo seguido para amplificar el gen de la NADH3 fue el de Kwiatowski et al. (1991), ligeramente modificado. En la Tabla 6 se indica los reactivos necesarios para la amplificación, así como sus concentraciones.

Tabla 6. Reactivos empleados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). CI: concentración inicial, V: volumen de agua que hay que añadir, CF: concentración final, MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio, dNTPs: nucleótidos.

Table 6. Reactives of the Polymerase Chain Reaction (PCR). CI: initial concentration, V: water volume to add, CF: final concentration, MgCl<sub>2</sub>: Magnesium chloride, dNTPs: nucleotides.

| Reactivos                               | CI                   | V (µl)              | CF       |
|---|----------------------|---------------------|----------|
| <b>Agua destilada (distilled water)</b> | -                    | hasta 50 (until 50) | -        |
| <b>Primer 1</b>                         | 15µM                 | 2.0                 | 0.6µM    |
| <b>Primer 2</b>                         | 15µM                 | 2.0                 | 0.6µM    |
| <b>Tampón de PCR (PCR buffer)</b>       | 10x                  | 5.0                 | 1x       |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>                 | 25mM                 | 4.0                 | 2mM      |
| <b>dNTPs</b>                            | 1mM (cada uno, each) | 5.0                 | 0.1mM    |
| <b>Taq polimerasa</b>                   | 5u/µl                | 0.5                 | 0.05u/µl |
| <b>DNA</b>                              | -                    | 2.5                 | -        |

La amplificación se llevó a cabo en los termocicladores Intelligent Heating Block 2024 y GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). La reacción estándar se compone de los siguientes pasos:

Primero tiene lugar la desnaturalización del DNA durante 5 minutos a 95°C, antes de añadir la polimerasa. Esta desnaturalización, previa al primer ciclo de la PCR, mejora la eficiencia de la reacción (si se añade la *Taq* DNA polimerasa después de este paso, se prolonga la vida de la misma). A continuación comienzan los 50 ciclos de la PCR, cada uno de los cuales se compone de tres etapas (Fig. 3):

1. Una vez que se añade el enzima, continúa la disociación de las dos cadenas del DNA durante 1 minuto a 95°C.

2. En el siguiente paso tiene lugar la unión de cada primer con una de las dos cadenas separadas (hibridación o "annealing"), de manera que la extensión desde el extremo 3' es dirigida hacia el otro extremo. Esto se produce con un descenso rápido de la

temperatura hasta 45°C durante 2 minutos. El exceso de primer asegura su unión al DNA. Cuanto más baja sea la temperatura, menos específica será la unión de los primers al DNA. La temperatura puede variarse en función de la mayor o menor homología de los primers con la secuencia problema.

3. El último paso consiste en la extensión de la nueva cadena de DNA. Ello se consigue a 72°C durante 1-2 minutos, que es la temperatura de máxima eficiencia de la *Taq* DNA polimerasa.

También puede realizarse un último ciclo con las mismas temperaturas y tiempos que los anteriores, excepto en el último paso, en el cual se mantienen los 72°C durante 5 minutos. Con ello se eliminan las posibles uniones inespecíficas que hayan tenido lugar durante la amplificación.

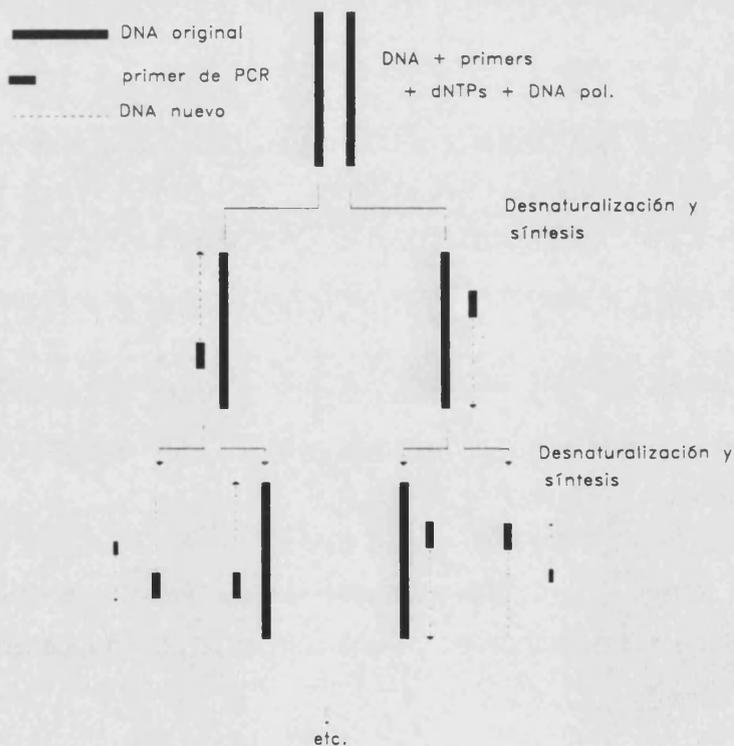


Figura 3. Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En primer lugar, el DNA es desnaturalizado; después, los primers se unen a las zonas homólogas de cada una de las cadenas y se produce la extensión de las mismas en cada ciclo de la PCR (véase en el texto para más detalles).

Figure 3. Diagram of the Polimerase Chain Reaction (PCR). First, the DNA is denaturalized; second, primers join the homologue regions of each chain and the extension of them starts in every cycle of the PCR (see text for details).

Generalmente, al visualizar los amplificadores en un gel de agarosa pueden observarse restos de primers, incluso llegan a formarse dímeros de primers (amplificados de tamaño pequeño que se originan al unirse los primers entre sí). Existen métodos que permiten la obtención de productos de PCR más limpios, como el denominado "Hot-start" (Chou et al., 1992) y "Heat-Soaked PCR" (Ruano et al., 1992). En el método de "Hot Start", el DNA y los primers se mezclan y se mantienen a una temperatura que está por encima del umbral en el que ambos se unen. Se añaden todos los reactivos de la PCR, excepto la *Taq* DNA polimerasa. Antes de comenzar el primer ciclo de amplificación se añade esta enzima, una vez que el resto de reactivos están a una temperatura de 95-100°C. El amplificado aparece más limpio puesto que no han tenido lugar hibridaciones inespecíficas de los primers con el DNA. La duración de las tres etapas que componen cada ciclo de la PCR puede ser la misma que en el proceso estándar, aunque también funciona con tiempos de hibridación y extensión de 30 segundos cada uno. En nuestro caso se incluyó, además, un último paso a 72 °C durante 10 minutos para tratar de eliminar cualquier unión inespecífica de los primers.

El método de "Heat-Soaked" consiste en provocar una total desnaturalización del DNA, favoreciendo así la unión completa de los primers con el DNA. Ello se consigue mezclando, por una parte, 2 µl de DNA con 88 µl de agua esterilizada y desionizada. El DNA junto con el agua se desnaturalizan a 95°C durante 30'. Por otro lado se mezclan el resto de reactivos en un volumen de 10 µl, con las concentraciones adecuadas, puesto que luego se mezclarán con los 90 µl anteriores. El resto de pasos es similar al estándar, pero con tiempos de hibridación y extensión más reducidos (30 segundos cada uno). También se incluyó un último paso a 72 °C durante 10 minutos.

En todos los ensayos se pusieron controles negativos (sin DNA) con el fin de detectar si había una posible contaminación de DNA en alguno de los reactivos utilizados para la amplificación.

A pesar de las ventajas del uso de la PCR, en nuestro caso la amplificación del DNA fue un proceso difícil debido, entre otras razones, al estado de conservación de las muestras. En ninguno de los casos se trató de vermes vivos, puesto que se recolectaron de hospedadores que estaban ya varias horas (en el mejor de los casos) e incluso uno o más días muertos. A este hecho hay que añadir que muchas veces las vísceras se congelaron

para un posterior examen y los parásitos se conservaron en alcohol 70%, formol 10% o alcohol-glicerina. En este largo proceso, el DNA puede verse dañado seriamente, por lo que las condiciones no son óptimas para realizar la amplificación del DNA, suponiendo que el proceso de extracción no ha fallado en ninguna de sus etapas.

#### 3.2.4. Clonación del mtDNA

El mtDNA amplificado con el primer juego de primers (PDF-PRF) se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (ambas de Boehringer Mannheim). El fragmento se visualizó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Boehringer M.) al 0,8% en tampón TBE 0.5x (Tris-borato 0,5x: 0,045M, ácido bórico y EDTA 0,001M) con bromuro de etidio. Este fragmento se cortó del gel y se fundió a 65°C para realizar la clonación. Como marcador de tamaño se empleó el VI de Boehringer M. (pBR328/*Bgl*I+pBR328/*Hin*fI), de fragmentos con pesos moleculares conocidos.

Los vectores de clonación, el pUC18 y pUC19 (Boehringer M.), fueron digeridos a su vez con estas mismas enzimas. Una vez eliminados los enzimas por fenolización (Sambrook et al., 1989), se llevó a cabo la ligación con ligasa de T4 (Boehringer M.). La incubación se realizó a 19°C entre 15 y 16 horas.

La mezcla de ligación se transformó con células competentes de la cepa DH5- $\alpha$  de *Escherichia coli* obtenidas por dos métodos: el del CaCl<sub>2</sub> y el de RbCl (Sambrook et al., 1989). Los transformantes fueron seleccionados en placas de LB con ampicilina, y las colonias blancas portadoras del plásmido y el inserto, crecidas en medio líquido (Fig. 4). Los plásmidos recombinantes se extrajeron mediante la técnica de lisis alcalina de Birnboim y Doly (Sambrook et al., 1989), y caracterizados mediante restricción para determinar si los insertos correspondían a los fragmentos de mtDNA del tamaño esperado.

En una de las especies, *D. dendriticum*, el DNA se amplificó mediante la combinación de los dos juegos de primers (PDC-PRF), por lo que el fragmento fue digerido con *Spe*I (Boehringer M.) y *Hind*III, mientras que el pUC18 empleado para la clonación se digirió con *Xba*I (Boehringer M.) y *Hind*III.

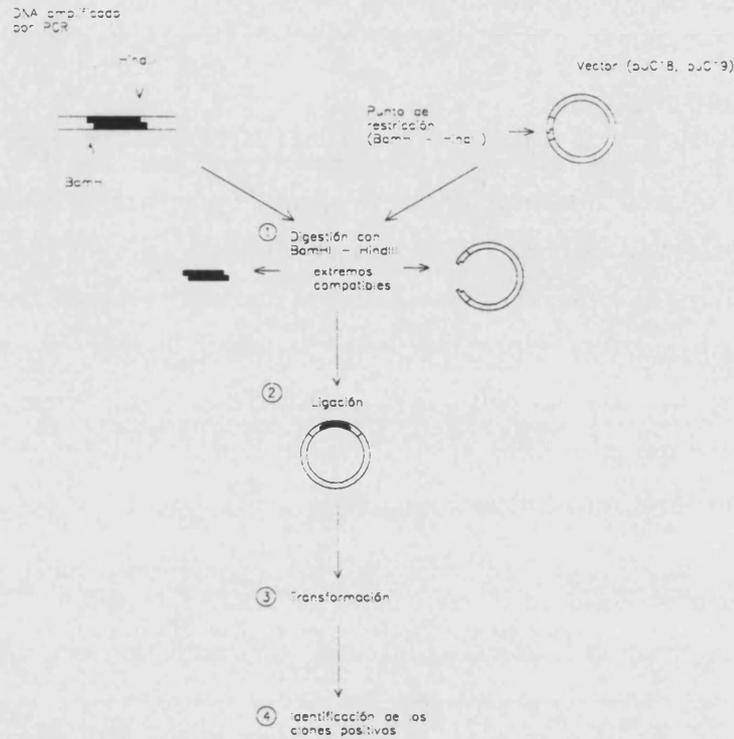


Figura 4. Esquema de clonación mediante el empleo de enzimas de restricción. (1) Digestión del fragmento amplificado y de los vectores con BamHI - HindIII, (2) unión de los dos DNAs digeridos mediante ligasa, (3) introducción de los plásmidos con el inserto en las bacterias mediante transformación, (4) identificación de los recombinantes con inserto al crecer las bacterias en un medio con Ampicilina.

Figure 4. Cloning with of restrition enzymes. (1) Digestion of the amplified fragment and vectors with BamHI - HindIII, (2) union of the two digested DNAs with ligase, (3) introduction of the plasmids with the insert in the bacteria by transformation, (4) identification of the recombinants with insert by their ability to grow in presence of ampicillin.

En el caso de los fragmentos amplificados con el segundo par de primers (PDC-PRC), se digirió con *SpeI* para aumentar la eficiencia de clonación (E. Barrio, com. pers.) (Fig. 5a, b, c y d).

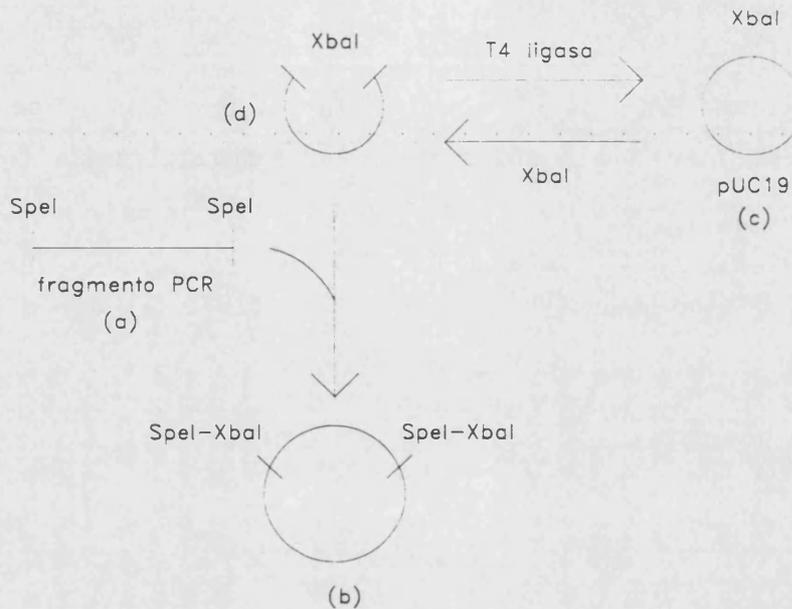


Figura 5. Clonación mediante el uso de enzimas compatibles (E. Barrio, com. pers.). (a) digestión del fragmento de PCR con *SpeI*, (b) los extremos del fragmento de PCR digerido con *SpeI* se unen los del vector, digerido con *XbaI*, de forma que esta unión no es reconocida por el *XbaI* presente en la reacción, (c) cuando el vector religa, el enzima vuelve a linearizarlo (d).

Figure 5. Cloning with compatible enzymes (E. Barrio, pers. com.). (a) PCR fragment digestion with *SpeI*, (b) the ends of the PCR fragment digested with *SpeI* join with those of the vector, digested with *XbaI*. This union is not recognized by the *XbaI* in the reaction, (c) the enzyme relineralizes the vector when it religates (d).

Estos primers se diseñaron de la siguiente manera: se introdujo un sitio de restricción *SpeI* (G/CTAGC), enzima que posee muy pocas dianas en distintos genomas y que tampoco se encuentra en las regiones a amplificar. Además, es compatible con el sitio reconocido por *XbaI* (T/CTAGA), presente en los vectores empleados para clonar. El fragmento amplificado por la PCR se digirió con *SpeI*, que reconoce las dianas introducidas en los oligonucleótidos empleados para la amplificación (Fig. 5a), y que son compatibles con el sitio *XbaI* del vector digerido. Posteriormente, se procedió a la ligación del fragmento *SpeI* con el vector digerido con *XbaI*, en presencia de ligasa de T4 y del enzima *XbaI*. Al

unirse los extremos del fragmento y del vector, se generó una secuencia mixta que no es reconocida por el *Xba*I presente en la reacción (Fig. 5b). Si es el vector el que religa (Fig. 5c), el enzima *Xba*I lo lineariza (Fig. 5d), con lo que se posibilita de nuevo la introducción del inserto en el vector. Con esta metodología se consiguió un ligero aumento en la eficacia de la clonación.

### 3.2.5. Secuenciación del mtDNA

La secuenciación se llevó a cabo mediante el método de Sanger de terminación por didesoxinucleótidos, modificado para la secuenciación directa de DNA plasmídico desnaturalizado (Mierendorf y Pfeffer, 1987). Para ello se empleó la T7 DNA polimerasa ("T7 sequencing kit" de Pharmacia LKB ref. 27-1682-01) y, para el marcaje radiactivo, ( $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ )dATP $\alpha$ S (Amersham).

En la reacción se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como iniciadores:

1. El oligonucleótido universal d5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' ("universal primer" de Pharmacia).
2. El oligonucleótido reverso d5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (M13/pUC "reverse primer" de Boehringer M.).
3. El oligonucleótido directo d5'-CGAAAGGGGATGTGCTGCAA-3', iniciador sintético (Pharmacia) diseñado a -40 nucleótidos del sitio *Eco*RI del pUC19. Este iniciador permite secuenciar todo el polilinker del pUC18.
4. El oligonucleótido reverso d5'-ACACTTTATGCTTCCGGC-3', que, al igual que el anterior, permite secuenciar todo el polilinker del pUC18.

Las muestras de secuenciación se corrieron en geles de poliacrilamida al 8%, en presencia de urea 8M como agente desnaturalizante, y tampón TBE 1x. Los geles se corrieron en cubetas Macrophor (Pharmacia LKB) y Bio-Rad durante 2-3h a 2500V para carreras cortas y hasta 5h-5h 30' a 2500V para carreras largas. Sólo en el caso de la especie *Z. atlanticum* se obtuvo parte de la secuencia mediante un secuenciador

automático ABI (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, Secció de Secueñciació, Universitat de València).

### **3.2.6. Análisis de secueñcias**

El soporte informático para el análisis de las secueñcias fue proporcionado por el Servicio de Bioinformática y de los Departamentos de Biología Animal y Genética de la Universitat de València.

#### **I. Consideraciones previas**

##### **a) Grupos analizados**

Para el tratamiento de las secueñcias consideramos dos grupos:

-Grupo 1 (G1): compuesto por las secueñcias de las especies *F. hepatica*, *D. dendriticum*, el nasitremátido, *N. globicephalae* y cinco campúlidos, *Z. atlanticum*, *O. mascomai*, *O. fraterculus*, *C. oblonga* y *H. tursionis*.

-Grupo 2 (G2): formado por los cinco campúlidos, *F. hepatica* y *D. dendriticum*.

La razón por la que se hicieron los dos grupos fue ver, por un lado, las relaciones entre las especies de las diferentes familias estudiadas (G1) y, por otro, ver las relaciones entre las especies estudiadas de la familia Campulidae (G2).

##### **b) Elección de los taxones de referencia externa o "outgroups"**

La elección de los taxones de referencia externa es una decisión muy importante, hasta el punto de que parte de los errores en la reconstrucción de filogenias se produce por el empleo de outgroups no apropiados. Los problemas surgen cuando se utilizan especies de referencia externa demasiado alejadas del grupo en cuestión (o "ingroup"), dando lugar a inferencias incorrectas de la filogenia (Smith, 1994). Ello es debido a que las posiciones variables en outgroups distantes pueden no ser detectadas, debido a los múltiples y sucesivos cambios en sitios homólogos (dando lugar a homoplasias; ver discusión de esta sección), de forma que su secueñcia puede resultar similar, por azar, a la de algún miembro

del ingroup. Generalmente, la especie (o especies) de referencia externa presenta la rama más larga, por lo que tenderá a agruparse con la rama más larga del ingroup (Smith, 1994). Swofford y Olsen (1990) propusieron que el empleo de varios outgroups, al menos en parsimonia, tiende a dividir la rama más larga del árbol, disminuyendo así la tendencia de atracción entre las ramas más largas. Según estos mismos autores, la adición de outgroups demasiado cercanos o demasiado distantes al taxón en estudio puede conducir a la obtención de filogenias falsas.

En principio, para obtener la topología correcta y minimizar las homoplasias, debe elegirse como outgroup el grupo hermano del taxón en cuestión. Esto minimiza la longitud total de tiempo en que las secuencias del ingroup y outgroup han divergido (Smith, 1994). Sin embargo, al elegirse el grupo hermano a partir de datos morfológicos, es posible que un solo outgroup no pueda identificar correctamente su posición con respecto al ingroup (Maddison et al., 1984). Ello es debido a que con un único outgroup, las homoplasias pueden ocultar cualquier indicación de sinapomorfias (caracteres derivados compartidos) (Smith, 1994). Una forma de solucionar este problema es la adición de más outgroups, la cual puede hacerse de dos formas: añadiendo más taxones al grupo hermano más cercano al ingroup, o añadiendo representantes de grupos relacionados más distantemente. Ambas opciones mejoran las posibilidades de obtener la filogenia correcta, pero por distintos métodos. Parece ser que la primera posibilidad es la más correcta, puesto que la adición de miembros de otros clados no disminuye la longitud de la rama que conduce a cualquiera de los outgroups. Sin embargo, en ocasiones, el grupo hermano no posee otros miembros actuales o son difíciles de obtener mediante secuenciación. En estos casos, la única alternativa es añadir secuencias de taxones más alejados del ingroup que la primera secuencia outgroup (Smith, 1994). La precaución que se ha de tomar es la de seleccionar sitios o ponderar determinadas sustituciones, como se verá en el siguiente apartado. Wiley (1981) demostró que el uso de un segundo outgroup puede dar lugar a resultados completamente distintos a los obtenidos con una sola especie de referencia externa.

En el presente trabajo, las especies *Fasciola hepatica* y *Dicrocoelium dendriticum* se emplearon como especies de referencia externa. Dos motivos nos llevaron a la elección de *F. hepatica* como outgroup: en primer lugar, pertenece a una familia que, tradicionalmente, ha sido considerada muy cercana a los campúlidos, de forma que, incluso podrían ser grupos hermanos (véase capítulo 5, sobre el origen de la familia Campulidae). En segundo lugar, se conoce la secuencia parcial de su mtDNA, en donde se incluye la secuencia del

gen de la NADH3 (Garey y Wolstenholme, 1989). Nos planteamos el empleo de un segundo outgroup que estuviera cercano a *F. hepatica* (según las recomendaciones de Smith, 1994). Sin embargo, la secuencia de *Fasciolopsis buski*, de la familia Fasciolidae (Tabla 5), no pudo emplearse por problemas de contaminación de las muestras (véanse resultados de esta sección). El representante de la familia Acanthocolpidae, familia con la que campúlidos han sido también relacionados en ocasiones y que podría, alternativamente, constituir el grupo hermano de Campulidae (véase capítulo 5), *Stephanostomum baccatum*, presentó el mismo problema de contaminación (Tabla 5). Intentos posteriores de amplificación del gen de la NADH3 del acantocólpido fracasaron (como se explicará en el apartado de resultados de este capítulo). Siguiendo, pues, las recomendaciones de Smith (1994), se escogió como outgroup adicional la secuencia de una especie más alejada de campúlidos de lo que lo están los fasciólidos, *D. dendriticum* (Tabla 5). La elección de este outgroup es interesante a raíz de la sugerencia hecha por Appy (1974) respecto a campúlidos y dicrocélidos (véase apartado 1.2.).

### c) Ponderación

En alguno de los métodos de reconstrucción filogenética (que se indicarán más adelante) se tuvieron en cuenta las diferentes posiciones del codón de la secuencia codificante (NADH3), es decir, por un lado, sólo la primera y la segunda y, por otro, solamente la tercera posición. También se consideraron, por una parte, las transiciones y transversiones en conjunto y, por otra, sólo las transversiones. El propósito de dar un mayor peso a las primeras y segundas posiciones y a las transversiones es enfatizar las posiciones y sustituciones conservativas en las secuencias de DNA (Hillis et al., 1993; Miyamoto et al., 1994). Las posiciones de codón y sustituciones más conservadas son los mejores indicadores de la historia filogenética porque hay menor probabilidad de que sufran mutaciones paralelas y retromutaciones. Las primeras y segundas posiciones se caracterizan por una tasa de evolución más lenta que las terceras. De forma análoga, las transversiones se acumulan a una tasa más lenta que las transiciones (véase introducción de esta sección 3.1.2.).

## II. Alineamiento de las secuencias

Se utilizó el programa CLUSTAL V (Higgins y Sharp, 1988) para el alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. Dada la naturaleza distinta de las secuencias, un gen que codifica para el tRNA de la leucina, un gen que codifica para la NADH3 y una pequeña zona intergénica, se realizaron dos tipos de alineamiento. Por un lado, se alineó toda la región secuenciada y, por otro lado, sólo el gen de la NADH3. La secuencia del tRNA no fue alineada puesto que su longitud resultó bastante pequeña como para proporcionar información por sí misma.

## III. Traducción de nucleótidos en aminoácidos

Para traducir la secuencia nucleotídica a aminoácidos se empleó el programa comercial GCG (Universidad de Winsconsin). La traducción se llevó cabo mediante el código del mtDNA de *F. hepatica* (Garey y Wolstenholme, 1989; Ohama et al., 1990) (Tabla 7).

## IV. Sustituciones nucleotídicas

### a) Transiciones y transversiones

El número de transiciones y transversiones se calculó mediante el programa MEGA v 1.01 (Kumar et al., 1993).

### b) Sustituciones sinónimas y no sinónimas

La proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas por sitio se calculó según el método de Nei y Gojobori (1986), gracias al programa DISTANCE v 3.0 (López-Bueno y González-Candelas, 1992).

Tabla 7. Codones empleados en el mtDNA de *Fasciola hepatica*. Ala (A): Alanina, Arg (R): Arginina, Asn (N): Asparagina, Asp (D): Acido aspártico, Cys (C): Cisteina, Gln (Q): Glutamina, Glu (E): Acido glutámico, Gly (G): Glicina, His (H): Histidina, Ile (I): Isoleucina, Leu (L): Leucina, Lys (K): Lisina, Met (M): Metionina, Phe (F): Fenilalanina, Pro (P): Prolina, Ser (S): Serina, Ter: Codón de terminación, Thr (T): Treonina, Trp (W): Triptófano, Tyr (Y): Tirosina, Val (V): Valina.

Table 7. Codons of *Fasciola hepatica* mtDNA. See aminoacid names above.

|            |     |            |     |            |     |            |     |
|------------|-----|------------|-----|------------|-----|------------|-----|
| <b>Phe</b> | TTT | <b>Ser</b> | TCT | <b>Tyr</b> | TAT | <b>Cys</b> | TGT |
|            | TTC |            | TCC |            | TAC |            | TGC |
| <b>Leu</b> | CTT |            | TCA | <b>Ter</b> | TAA | <b>Trp</b> | TGA |
|            | CTC |            | TC  |            | TAG |            | TGG |
|            | CTA |            | AGT | <b>His</b> | CAT | <b>Arg</b> | CGT |
|            | CT  |            | AG  |            | CAC |            | GCG |
|            | G   |            | C   |            |     |            |     |
|            | TTA |            | AG  | <b>Gln</b> | CAA |            | CGA |
|            |     |            | A   |            |     |            |     |
|            | TTG |            | AG  |            | CAG |            | CGG |
|            |     |            | G   |            |     |            |     |
| <b>Ile</b> | ATT | <b>Pro</b> | CCT | <b>Asn</b> | AAT | <b>Ala</b> | GCT |
|            | ATC |            | CC  |            | AAC |            | GCC |
|            |     |            | C   |            |     |            |     |
| <b>Met</b> | ATA |            | CC  |            | AAA |            | GCA |
|            |     |            | A   |            |     |            |     |
|            | ATG |            | CC  | <b>Lys</b> | AAG |            | GCG |
|            |     |            | G   |            |     |            |     |
| <b>Val</b> | GTT | <b>Thr</b> | ACT | <b>Asp</b> | GAT | <b>Gly</b> | GGT |
|            | GT  |            | AC  |            | GAC |            | GGC |
|            | C   |            | C   |            |     |            |     |
|            | GTA |            | ACA | <b>Glu</b> | GAA |            | GGA |
|            |     |            |     |            |     |            |     |
|            | GT  |            | AC  |            | GAG |            | GGG |
|            | G   |            | G   |            |     |            |     |

## V. Detección de señal filogenética

Algunos autores recomiendan que previamente a la reconstrucción de la filogenia de un grupo, debe detectarse la presencia de señal filogenética, es decir, si los datos aportan información sobre las relaciones filogenéticas entre los taxones (Hillis y Huelsenbeck, 1992; Hillis et al., 1993). Utilizando la opción de búsqueda exhaustiva del programa PAUP v 3.1 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) (Swofford, 1985), que analiza todas las posibles topologías de árboles para un determinado número de caracteres y taxones, se calculó una serie de parámetros que nos indican la presencia o no de señal filogenética. Estos son: a) el número de árboles más parsimónicos, que son aquellos que requieren el mínimo número

de pasos mutacionales (es decir, minimiza el número de transformaciones de los caracteres). El número mínimo de pasos mutacionales entre dos árboles es de 0; b) el número de pasos mutacionales hasta el siguiente árbol más parsimónico y c) el valor de  $g_1$  de la distribución de las longitudes de los árboles. El estadístico  $g_1$  es una medida de la asimetría de una distribución (Sokal y Rohlf, 1981). Para una distribución perfectamente simétrica,  $g_1=0$ , si es asimétrica hacia la izquierda,  $g_1<0$ , y si está desviada hacia la derecha,  $g_1>0$ .

La forma de la distribución de la longitud de los árboles que resultaron del análisis por parsimonia fue empleada para detectar la presencia de señal filogenética (Hillis y Huelsenbeck, 1992). Si la distribución se desvía intensamente hacia la izquierda ( $g_1<0$ ), indica la presencia de caracteres correlacionados, lo cual es esperable si hay señal filogenética (la correlación es el resultado de la historia compartida por los taxones, Hillis et al., 1993). Hay casos en que las tasas de cambio entre los nodos de un árbol filogenético son lo suficientemente elevadas como para aleatorizar el estado de los caracteres (nucleótidos en nuestro caso) con respecto a la historia filogenética (Hillis y Huelsenbeck, 1992).

Las distribuciones de las longitudes de los árboles obtenidos por parsimonia y el valor de  $g_1$  se calcularon considerando tranversiones y transiciones juntas y, por otra parte, sólo las tranversiones. Existen tablas de los valores críticos de estadístico  $g_1$  para un número determinado de taxones y caracteres (Hillis y Huelsenbeck, 1992). Cuando el valor de  $g_1$  es menor que el de las tablas, indica que los caracteres están significativamente más estructurados que si fuesen al azar.

## VI. Estacionaridad

Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es la estacionaridad. Para aclarar este concepto, pondremos el siguiente ejemplo (Saccone et al., 1993): consideremos tres especies, B, C y D y su ancestro A (Fig. 6). Si las tres especies están sometidas a la misma presión de mutación y el tiempo de divergencia no es muy grande, lo esperable es que la media de las frecuencias de cada base  $q_i$  ( $i= A, C, G, T$ ) sea la misma en los genes homólogos en posiciones equivalentes (es decir, primera, segunda o tercera posición del codón en genes que codifican proteínas). Esta condición se denomina estacionaridad. Pero

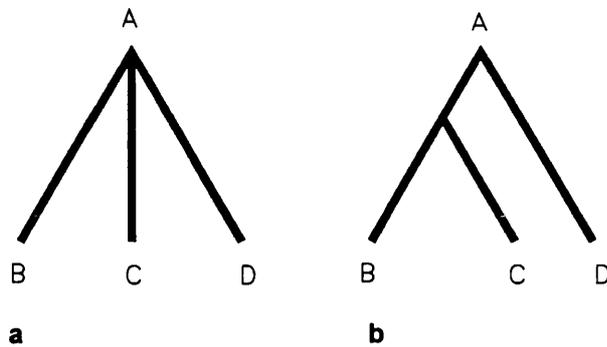


Figura 6. Árboles filogenéticos: (a) las tres especies B, C y D están a la misma distancia de su ancestro, (b) filogenia errónea debido a la ausencia de estacionaridad en la composición de bases para la especie D (tomado de Saccone et al., 1993).

Figure 6. Phylogenetic trees: (a) three species B, C and D are at the same distance from their ancestor, (b) wrong phylogeny because of the lack of stationarity in base composition of species D (from Saccone et al., 1993).

si una de las especies, por ejemplo D, está sometida a presiones de mutación diferentes a las que actúan sobre el resto de especies, es muy posible que se pierda la estacionaridad en esta secuencia. Por tanto, el número de sustituciones nucleotídicas entre B y D o C y D será diferente de las existentes entre B y C. Aquellos métodos que no tienen en cuenta la composición de bases en una secuencia pueden dar lugar a resultados erróneos (Saccone et al., 1993). El cálculo de la estacionaridad se realizó gracias al programa PHYLIP v. 3.41 (Felsenstein, 1990).

### 3.2.7. Métodos de inferencia filogenética

El primer aspecto que se debe tener en cuenta a la hora de elegir un método de inferencia filogenética es decidir qué suposiciones y modelos van a aceptarse. Si los patrones reales de sustitución nucleotídica no cumplen los requisitos del modelo elegido se puede llegar a resultados erróneos. Existen numerosos métodos alternativos para inferir filogenias, no aplicables solamente a secuencias nucleotídicas. Los análisis filogenéticos de secuencias pueden llevarse a cabo mediante el estudio de caracteres discretos (los mismos nucleótidos) o realizando comparaciones entre pares de secuencias (mediante distancias). La elección de un tipo de método u otro depende de los supuestos que estemos dispuestos a aceptar. Por una parte, los métodos basados en distancias transforman la variabilidad de nucleótidos de las secuencias en un valor de distancia. Los métodos basados en caracteres

(parsimonia, por ejemplo) se basan solamente en posiciones filogenéticamente informativas. Un sitio es informativo cuando hay, al menos, dos tipos diferentes de nucleótidos en una posición determinada, cada uno de los cuales está representado, al menos, en dos de las secuencias estudiadas (Li y Graur, 1991).

En el presente estudio se emplearon los dos tipos de inferencia de filogenias.

a) Métodos basados en distancias

a.1) Cálculo de distancias

Existen varios algoritmos para calcular las divergencias nucleotídicas entre pares de secuencias (Kumar et al., 1993). Algunos de los algoritmos suponen tasas iguales de sustitución para las transiciones y transversiones (como el de Jukes y Cantor), supuesto, por otra parte, poco realista. Por este motivo, se aplicó el método de Kimura de 2 parámetros, ya que asume una tasa distinta de sustitución para las transiciones y las transversiones, lo cual se aproxima más a lo que ocurre en la realidad. Este método asume, además, que las frecuencias de los nucleótidos es de 0.25 para cada uno de ellos, lo cual no ocurría en nuestro caso. Por ello, también se aplicaron algoritmos que tuvieron en cuenta esta condición: la distancia de Tamura, la de Tamura-Nei y la de Tajima-Nei. El primer y tercer algoritmo tiene en cuenta el sesgo composicional en las frecuencias de nucleótidos. El de Tamura-Nei considera tasas de sustitución transicional distintas entre purinas (A y G) y entre pirimidinas (T y C). El programa empleado para todos estos cálculos fue el MEGA v 1.01.

a.2) UPGMA, vecino más próximo y evolución mínima

Dentro de los métodos basados en distancias, los más usuales son:

UPGMA y método del vecino más próximo (Neighbor-joining). Estos métodos proporcionan una sola topología y no se usa un criterio de optimización para seleccionar el árbol. La optimización es una cantidad objetiva que mide la conformidad de los datos originales a un árbol. El método de UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic mean; método de agrupación no ponderada por parejas, utilizando la media aritmética) asume que la tasa de sustitución de nucleótidos es la misma para todos los

linajes, de forma que se da una relación aproximadamente lineal entre la distancia evolutiva y tiempo de divergencia. En el caso del vecino más próximo, el algoritmo que emplea consiste en construir, en cada paso del análisis, matrices de distancias transformadas a partir de la matriz original, de manera que la divergencia entre cada par de taxones se ajusta a partir de la divergencia promedio de los dos taxones al resto.

Evolución mínima. Otros métodos sí que emplean criterio de optimización, comparando topologías alternativas y seleccionando un árbol definitivo. El método de evolución mínima (Minimum evolution) es una versión exhaustiva del método del vecino más próximo. El procedimiento básico de este método es obtener en primer lugar el árbol por este último método y entonces buscar, de entre todos los árboles estrechamente relacionados con el árbol neighbor-joining, aquél que presenta el valor mínimo de la suma de las longitudes de las ramas (S) (Rzhetsky y Nei, 1992).

Muchas moléculas no funcionan siguiendo exactamente el reloj molecular. Por este motivo, el uso del método del vecino más próximo está más extendido porque permite manejar tasas de evolución desiguales y por la simplicidad de su cálculo. Este fue el método de distancias empleado en el presente trabajo. La reconstrucción de los árboles se realizó con el programa MEGA v 1.01.

a.3) Fiabilidad de los árboles. La fiabilidad de los árboles se comprobó mediante el procedimiento de remuestreo "bootstrap" (Felsenstein, 1985). Se hicieron un total de 1000 remuestreos en cada caso con el fin de que los resultados fueran estadísticamente fiables (Hedges, 1992). Los valores obtenidos se representan en los nodos de los árboles, considerándose como significativos aquellos que superan el 70% (Hillis y Bull, 1993).

b) Métodos basados en caracteres: parsimonia, máxima verosimilitud e invariantes de Lake

Los tres tipos de métodos basados en caracteres más utilizados son los siguientes:

b.1) Parsimonia. Este método permite la elección del árbol más parsimónico, es decir, aquél que requiere el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias entre los taxones. Cada nucleótido es considerado como un carácter independiente con cuatro estados posibles (G, A, T, C). Este método minimiza el número de sustituciones nucleotídicas necesarias para relacionar dos secuencias. La minimización

de la longitud del árbol implica una menor cantidad de homoplasias (pasos extras, como reversiones, paralelismos y convergencias). A menudo, se pueden obtener árboles de diferente topología que son igualmente parsimónicos.

Existen diferentes algoritmos para calcular el árbol más parsimónico, dependiendo de cómo ocurre la transformación de los caracteres. Los más conocidos son los siguientes:

1. El criterio de Wagner considera que los cambios pueden ser reversibles. Una modificación del criterio de Wagner es la denominada parsimonia de Fitch, en la que cualquier carácter es capaz de transformarse directamente en cualquier otro estado con igual probabilidad.

2. El criterio de parsimonia de Dollo considera que cada estado de un carácter sólo se origina una vez durante la evolución, permitiendo múltiples reversiones a la condición ancestral.

3. El criterio de parsimonia de Camin-Sokal, en la que todo cambio evolutivo es irreversible.

La parsimonia de Fitch es considerada como una de las más apropiadas para secuencias de nucleótidos (Kumar et al., 1993). Este método asume que los cambios evolutivos pueden suceder entre cualquier par de los cuatro nucleótidos.

b.2) Máxima verosimilitud. El método de Máxima Verosimilitud es el más general de los métodos estadísticos para inferir filogenias. Suponiendo que tenemos un modelo evolutivo (M) y unos datos (D) (nucleótidos, por ejemplo), la verosimilitud de un árbol (T) es la probabilidad de que los datos observados (D) hayan ocurrido (Felsenstein, 1988). El método consiste en proponer una serie de hipótesis e ir probándolas a partir de las frecuencias empíricas de nucleótidos y diferentes razones entre transiciones y transversiones ( $Ts/Tv$ ), hasta obtener el árbol máximo verosímil.

b.3) Método de los invariantes de Lake o método de parsimonia evolutiva. Permite eliminar el efecto de las homoplasias en las reconstrucciones filogenéticas basadas en parsimonia. El método de parsimonia evolutiva o de los invariantes de Lake considera sólo las transversiones, pero de manera diferente a como lo hace la parsimonia de transversión.

Se restringe a analizar grupos de cuatro secuencias y, además, considera sólo las posiciones nucleotídicas en las que dos secuencias presentan purinas y las otras dos pirimidinas. La idea de este método es que si esta distribución procede de un cambio paralelo, entonces es igualmente probable que el nuevo par de bases resultante sea idéntico o diferente (es decir, dos pirimidinas podrían igualmente cambiar a dos adeninas o dos guaninas de la misma forma que podrían cambiar a una adenina y a una guanina). Pero si el cambio es debido a un solo evento informativo apomórfico, las bases resultantes deberán ser entonces las mismas. El método considera cuál de los tres posibles árboles sin raíz de cuatro taxones es apoyado por una particular distribución de transversiones. Las tres posibles topologías sin raíz con cuatro secuencias (1, 2, 3 y 4) son: ((1,2),(3,4)), ((1,3),(2,4)) y ((1,4),(2,3)) (Fig. 7). Debido a que este proceso distingue entre diferentes purinas y pirimidinas, utiliza más información que la parsimonia de transversión (Swofford y Olsen, 1990). Sin embargo, el valor del método de Lake es limitado por la frecuencia relativa de las sustituciones por transición. Si éstas son demasiado frecuentes, probablemente enmascararán los cambios informativos (Quicke, 1993).

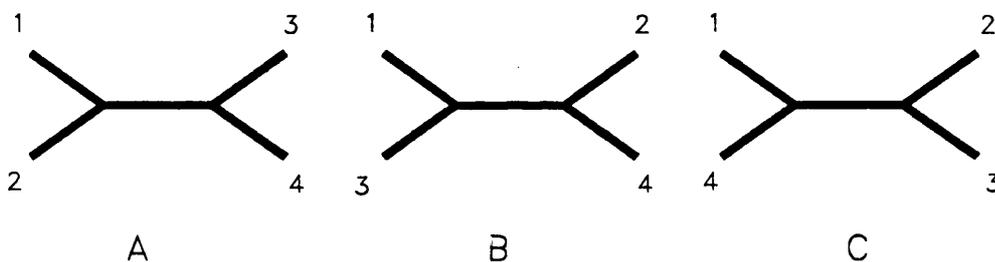


Figura 7. Tres posibles topologías sin raíz para cuatro taxones.

Figure 7. Three possible unrooted topologies for four taxa.

El método de los invariantes se basa en lo siguiente. Si se ha producido un proceso convergente (transversiones paralelas), el número total de transversiones que dan lugar a nucleótidos similares debe ser aproximadamente igual al que origina nucleótidos diferentes. Contando los dos tipos de transversiones (las que dan nucleótidos iguales y las que dan diferentes), su diferencia debe ser cero. Pero si las transversiones son informativas, es decir, que responden a una única mutación, la diferencia entre los dos tipos de transversión será distinta de cero. Entonces, contando los dos tipos de transversiones en las tres

topologías posibles con cuatro secuencias, la que sea correcta presentará una diferencia distinta de cero. Esto significa que las transversiones que dan lugar a nucleótidos idénticos (transversiones informativas) son mayores que las que dan a nucleótidos diferentes (transversiones paralelas). Para decidir si esta diferencia difiere significativamente de cero, se realiza el test de Ji cuadrado, pero cuando el número de transversiones es pequeño, es recomendable emplear el test de distribución binomial (Holmquist et al., 1988).

De los métodos basados en caracteres, el de parsimonia es el más comúnmente empleado, debido a su simplicidad, la fácil interpretación de los resultados, la capacidad de predecir caracteres ancestrales y pasos mutacionales de cada rama, la disponibilidad de programas eficientes para su cálculo y la flexibilidad en la asignación de mayor peso a determinados fenómenos, como las transversiones (Hillis et al., 1993). Este método fue aplicado a nuestros datos mediante el programa PAUP v 3.1 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony; Análisis Filogenético Empleando Parsimonia) (Swofford, 1985).

Cuando el número de taxones es pequeño (menos de 10), es posible examinar todas las topologías mediante una búsqueda exhaustiva y determinar cuál es el árbol más parsimónico. Dado que en nuestro caso el número de taxones no superaba la decena, fue posible escoger esta opción.

En el método de parsimonia los caracteres se consideran como independientes, por lo que pueden analizarse conjuntamente las secuencias de diferentes regiones génicas (Swofford y Olsen, 1990). Por ello, se analizaron conjuntamente la secuencia parcial del tRNA de la leucina con la secuencia del gen codificante (tRNA+NADH3), por un lado, y sólo la secuencia codificante NADH3, por otro.

El programa DNAPARS, del paquete PHYLIP v 3.5, permite aplicar un test estadístico para árboles predefinidos, el test de Templeton, que compara cada uno de los árboles con el más parsimónico. Se basa en el empleo de la media y la varianza de la diferencia de pasos entre los árboles. Parte de la hipótesis de que la suma del número de sustituciones en cada árbol es la misma, es decir, que el número medio de sustituciones es el mismo (Felsenstein, 1988).

Al igual que los árboles obtenidos mediante el método basado en distancias, se evaluó la fiabilidad del árbol o árboles parsimónicos mediante remuestreo o bootstrap. El programa PAUP, tras el remuestreo, presenta un árbol consenso según la regla de la mayoría (majority-rule consensus). Este árbol se compone de los grupos que han aparecido en el 50% de los remuestreos.

A la hora de reconstruir filogenias, es recomendable el uso de parsimonia de transversión debido a la saturación por transiciones convergentes entre especies divergentes, dada la mayor tasa de transiciones que transversiones en los genomas mitocondriales (DeSalle, 1992; Liu y Beckenbach, 1992). Así, los cuatro posibles estados (G, A, T, C) de cada carácter (posición nucleotídica) se redujeron a dos estados (purina o pirimidina). Gracias al programa PAUP v 3.1 (Swofford, 1985) fue posible utilizar este tipo de parsimonia.

Igualmente, se aplicó el método de Máxima Verosimilitud, pues plantea el análisis filogenético desde un punto de vista estadístico. Asume ciertos supuestos que no tienen por qué cumplirse, como independencia de posiciones, igual probabilidad de sustitución para todos los reemplazamientos nucleotídicos, etc.), pero pueden obtenerse topologías bastante fiables (Hasegawa y Yano, 1984). Se empleó el programa DNAML del paquete PHYLIP v 3.5 para determinar la mejor topología que explicara el modelo y las longitudes de las ramas como número esperado de sustituciones (no el real) y los límites de confianza para las longitudes de las mismas. Al suponer independencia de las posiciones, se realizaron los análisis con la secuencia codificante NADH3, por un lado, y con la secuencia del tRNA+NADH3, por otro.

El método de los invariantes de Lake se utilizó en aquellos casos en los que las relaciones entre determinadas especies no quedaron claras con los otros métodos aplicados. Para ello se empleó el programa PHILIP v 3.5 (Felsenstein, 1990).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Extracción y amplificación por PCR

Uno de los problemas con el que nos encontramos al emplear la PCR fue el de la contaminación del DNA entre distintas muestras, debido, en parte, al empleo de muestras parcialmente degradadas. Cualquier molécula de DNA de una muestra en mejor estado que otra, puede llegar a crear un importante problema de contaminación. Por este motivo, de las 20 especies secuenciadas en un principio (Tabla 5), sólo en siete se pudo eliminar el problema de la contaminación (Tabla 8). La cuestión es intentar manipular lo menos posible el DNA durante su extracción y durante la preparación de las reacciones de amplificación. Una vez detectado el problema, se emplearon varillas de vidrio nuevas y no reutilizables para la homogeneización de la muestra. Por otra parte, en lugar de puntas de pipeta normales se utilizaron puntas con filtro, debido a que al manipular reactivos, DNA, etc., con la pipeta, puede crearse un aerosol que las contamina. Además, para preparar las mezclas para las reacciones de amplificación se usaron pipetas distintas a las que se emplearon para manejar DNA. En el caso de las especies *Oschmarinella mascomai* y *Orthosplanchnus fraterculus*, la similitud entre las dos secuencias hizo pensar en el problema de la contaminación. Sin embargo, cada una de las especies se amplificó, clonó y secuenció tres veces para comprobar que no se trataba de contaminación.

Tabla 8. Combinación de primers utilizados para amplificar las especies consideradas en el análisis filogenético. PDF-PRF: primers directo y reverso diseñados a partir de la secuencia de la NADH3 de *Fasciola hepatica*, PDC-PRC: primers directo y reverso diseñados a partir de la secuencias de campúlidos.

Table 8. Combination of primers used to amplify the species employed for the phylogenetic analyses. PDF-PRF: direct and reverse primers designed from *Fasciola hepatica* NADH3 sequence, PDC-PRC: direct and reverse primers designed from campulid sequences.

| Especies                           | PDF-PRF | PDC-PRC | PDC-PRF | PDF-PRC |
|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| <i>Zalophotrema atlanticum</i>     |         | X       |         |         |
| <i>Campula oblonga</i>             | X       |         |         |         |
| <i>Hadwenius tursionis</i>         |         | X       |         |         |
| <i>Oschmarinella mascomai</i>      | X       | X       |         |         |
| <i>Orthosplanchnus fraterculus</i> | X       | X       |         |         |
| <i>Nasitrema globicephalae</i>     | X       |         |         |         |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i>    |         |         | X       |         |

En la Tabla 8 viene reflejada la combinación de los dos juegos de primers con los que se amplificaron las especies empleadas en el análisis filogenético (recordemos que la secuencia de *F. hepatica* se obtuvo de la base de datos). Con el primer juego de primers (PDF-PRF), diseñados a partir de la secuencia del gen de la NADH3 de *F. hepatica*, fue posible amplificar cuatro especies (*C. oblonga*, *O. fraterculus*, *O. mascomai* y *N. globicephalae*). En los intentos posteriores de amplificación no se obtuvieron resultados positivos. Además, los primers se unían entre ellos, observándose en el gel de agarosa una mancha, y no bandas bien definidas. Esto parece ser normal una vez que los primers han sido congelados y descongelados varias veces. La solución propuesta para estos casos es desnaturalizar los primers a 95°C durante 5 minutos y congelar inmediatamente en N2 líquido (P.N. Hengen, com. pers.). A pesar de ello, no se consiguieron resultados favorables. Según se observa en la Tabla 8, dos de las especies estudiadas (*O. mascomai* y *O. fraterculus*), fueron amplificadas con los dos juegos de primers (PDF-PDF y PDC-PRC), pero se empleó la secuencia que se obtuvo en último término con la combinación de primers PDC-PRC. Una de las especies, *D. dendriticum*, se amplificó con la combinación de primers PDC-PRIF y el resto con el nuevo juego de primers (Tabla 8). El par de primers PDF-PRC no amplificó el DNA de ninguna de las especies. En la Fig. 8 se muestra un ejemplo de amplificación del gen de la NADH3 por PCR.

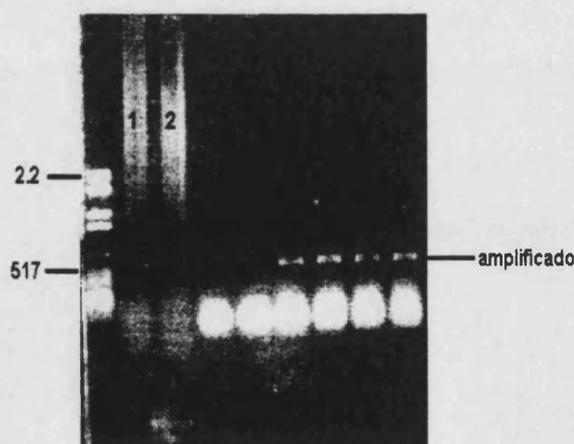


Figura 8. Resultados de la amplificación del gen de la NADH3 por PCR de algunas de las muestras empleadas en el presente estudio. Se utilizó el marcador VI. Obsérvense los amplificados de las carreras 1,2, 5, 6, 7 y 8.

Figure 8. Results of the amplification of the NADH3 by PCR form some of the samples used in this work. The size of two fragments of the VI marker are shown. See the amplifications in lanes 1,2, 5, 6, 7 and 8.

En el caso de los campúlidos *Lecithodesmus goliath* y *Hunterotrema macrosoma* y del acantocólpido *Stephanostomum baccatum* se realizaron, sin éxito, numerosos intentos de amplificación del DNA.

### **3.3.2. Clonación**

Al visualizar los fragmentos amplificados con los primers PDF-PRF, previamente digeridos con *Bam*HI-*Hind*III, se observaron dos bandas muy próximas entre sí. La secuencia de la mayor de ellas correspondió a la NADH3. El motivo de la aparición de dos bandas fue que el DNA amplificado tenía, desafortunadamente, un punto de corte para el enzima *Hind*III (que era también el que aparecía en el primer reverso PRF) y el fragmento mayor correspondía a una digestión parcial y por ello fue posible clonarlo. Efectivamente, en la secuencia pudo observarse la diana para este enzima, que al comparar con la secuencia de *F. hepatica* se vio que era debida a una sustitución nucleotídica. Con el segundo par de primers (PDC-PRC) no se detectó ningún problema de este tipo, dadas las características de los mismos (véase apartado 3.2.4.).

### **3.3.3. Secuenciación**

En la Tabla 9 se indica el número total de nucleótidos secuenciados, considerando sólo las especies empleadas en la reconstrucción filogenética y como si hubieran sido leídas cada cadena una sola vez. No obstante, las dos cadenas de DNA fueron leídas más de dos veces en todas las secuencias.

### **3.3.4. Análisis de las secuencias**

#### **I. Alineamiento de las secuencias**

##### **a) Secuencia del tRNA<sup>Leu</sup>+NADH3**

En la Fig. 9 se muestra el alineamiento del tRNA de la leucina y la secuencia codificante de la NADH3 para las ocho especies empleadas en este estudio. En las secuencias de los campúlidos y del nasitremátido obtuvimos dos bases extra entre el tRNA y el comienzo de la NADH3, en las posiciones 66 y 67, que no aparecieron en *F.*

*hepatica* y *D. dendriticum*. Por el momento, no podemos afirmar si se trata de parte del tRNA de la leucina o es una zona intergénica. Por otro lado, señalaremos que el

Tabla 9. Número total de nucleótidos secuenciados, considerando solamente las especies incluidas en el análisis filogenético (véanse Resultados de esta sección).

Table 9. Total number of sequenced nucleotides of the species valid for the phylogenetic analysis (see Results of this section).

| Especies  | zonas secuenciadas<br>(sequenced zones)                       |       |
|---|---|-------|
|   | tRNA <sup>Leu</sup> +zona<br>intergénica<br>(intergenic zone) | NADH3 |
| <i>Zalophotrema atlanticum</i>                  | 76  | 354   |
| <i>Campula oblonga</i>                          | 104   | 357   |
| <i>Hadwenius tursionis</i>                      | 77  | 354   |
| <i>Oschmarinella mascomai</i>                   | 75  | 354   |
| <i>Orthosplanchnus fraterculus</i>              | 75  | 354   |
| <i>Nasitrema globicephalae</i>                  | 96  | 357   |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i>                 | 77  | 360   |
| <b>Total de nucleótidos secuenciados: 3.094</b> |   |       |

alineamiento de la secuencia del tRNA<sup>Leu</sup> entrañó cierta dificultad, dado que la porción anterior, que osciló entre 9 y 41 bases, según la especie, presentó una secuencia nucleotídica muy dispar en cada una de las especies, tanto en longitud como en composición. Por este motivo, y para evitar la distorsión en el alineamiento en el resto de la secuencia, se eliminó este fragmento. Por tanto, el resto del alineamiento se realizó con un número de nucleótidos que oscilaba, según la especie, entre 56 y 63. Esta porción alineada del tRNA se unió posteriormente a la de la NADH3.

El alineamiento de las ocho secuencias del tRNA+NADH3 dio lugar a un total de 430 posiciones nucleotídicas, de las que 243 presentaron nucleótidos diferentes en las secuencias estudiadas (56,5% de variabilidad). De estas posiciones variables, 97 fueron filogenéticamente informativas (39,9%). Cuando comparamos la secuencia del tRNA+NADH3 sólo entre las especies de la familia Campulidae, las posiciones variables disminuyeron considerablemente (112 posiciones, 21,2%), de las que 44 fueron informativas filogenéticamente (39,3%). En el alineamiento de los miembros de la familia Campulidae con el nasitremátido, *N. globicephalae*, se obtuvieron igualmente un número variable de posiciones bastante bajo (135, 31,4%; 55 informativas, 40,7%), si lo comparamos con el obtenido al alinear todas las especies. La secuencia que

Figura 9. Alineamiento de las secuencias del tRNA+NADH3 de las ocho especies empleadas en el presente trabajo.  
 Figure 9. Alignment of the tRNA+NADH3 sequences of the eight species employed in the present study.

|                                    |            |            |             |            |            |            |            |
|------------------------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>Fasciola hepatica</i>           | GGTAGCTTAA | -GATT--AAA | GTTTGGGAATT | CTTACTTCTA | AGATATCTGG | TTTGGATTCT | TCAGG--ATG |
| <i>Campula oblonga</i>             | AA.....    | TCG..GA... | .C..T.G...  | .....C...  | G...G.--A  | ....AC.... | CTC..AGG.. |
| <i>Zalophotrema atlanticum</i>     | A.....     | TTGG.....  | .CC.T.G...  | .....C...  | G...G.-T-  | ....AC.... | CTC.-AGG.. |
| <i>Hadwenius tursionis</i>         | .....      | TTTG.....  | .C..T.G...  | .....C.A.  | G...G.-C-- | ....AC.... | CTC.AAGG.. |
| <i>Orthosplanchnus fraterculus</i> | A.....     | TTG.....   | .C..T.G...  | .....CG.G  | G...G.--   | ....AC.... | .C..AGG..  |
| <i>Oschmarinella mascomai</i>      | A.....     | TTG.....   | .C..T.G...  | .....C..G  | G...G.--   | ....AC.... | .C..AGG..  |
| <i>Nasitrema globicephalae</i>     | A.....     | TA.G.....  | .C..T.G...  | .....C..G  | G...G.--A  | ....ACC... | CTC..AGG.. |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i>    | .....      | TTG--..... | ..T.GG..    | ...G.CC.A. | G.T.G.---  | ...TACC-.G | .TG.T..... |
| <i>F. hepatica</i>                 | ---TTGTTT  | TTGCTGTTTT | GGGGTTGTTG  | TTTTTTTTGA | TTTTTTTTTT | GGTTTTGGTT | TTTCATGCTT |
| <i>C. oblonga</i>                  | TTT...A..C | ..T..TG... | T..T---...  | ....GG.TG  | .C.....G.. | .....T..C  | ..C.G.A.G. |
| <i>Z. atlanticum</i>               | TTT...A.G. | ..T..TG... | TA.T---...  | ....GG.TG  | .....      | ....CT...  | .....G.    |
| <i>H. tursionis</i>                | TTT...GC.. | ..T..TGC.. | C..T---C.A  | ...GGGA.TG | .....      | .....G     | .....G.    |
| <i>O. fraterculus</i>              | TTT..AG..C | ..T.CTG... | ...T---...  | ....AG.T.  | ....C.GA.  | .....T...  | .....AGG.  |
| <i>O. mascomai</i>                 | TTT..AG..C | ..T.CTG... | ...T---...  | ....AG.T.  | ....C.GA.  | .....T...  | .....GG.   |
| <i>N. globicephalae</i>            | TTT..AG... | ..T.CTG... | TTTC---...  | ..C..GG.CG | ....C....  | A....T...  | .....G.    |
| <i>D. dendriticum</i>              | ...G.TG.AG | .C...TG.A. | T.CT..T..A  | .AC.CG..TC | ....CC.GA. | TC...GT..C | .ACTT..G.. |
| <i>F. hepatica</i>                 | TTTTGTGGAA | TTTAGATTTG | GGGATT---T  | TTTCTGGTGA | ACGTTCTTGG | GTTAGTTCTT | TTGAGTGTGG |
| <i>C. oblonga</i>                  | ..C.T...G  | ..CG..G.G. | .CTTC....   | .A.....TT  | ...G.....  | ..G.....   | .....      |
| <i>Z. atlanticum</i>               | ...T.....  | ..CT..G.G. | TTTTCG....  | .G.....TT  | ...G.....  | ..GG.G.... | .....      |
| <i>H. tursionis</i>                | ..C.T..... | ..CT..G.GA | TCTGG....   | .GC.G..ATT | G....G...  | .....      | .....      |
| <i>O. fraterculus</i>              | ..C.T...G  | ..CG..G.G. | .CTT.C....  | .G..G..CTT | G..G.....  | ..G.....   | .....      |
| <i>O. mascomai</i>                 | ..C.T...G  | ..CG..G.G. | .CTT.C....  | .G..G..TT  | G..G.....  | ..G.....   | .....      |
| <i>N. globicephalae</i>            | ..G.T...G  | ..CG..C.G. | TTTTCG....  | .G....GCT  | G.....     | .....C.    | .....      |
| <i>D. dendriticum</i>              | ...A.CTC.  | .G.G...CG. | A....AGGA   | A...A...C  | T..GGTG..A | A..TC.AT.. | A.....     |

*F. hepatica* GTTTTTGTCT CAGCGTGTGA CTGAGAATTA TTTTAGGTAT ACTTATTTTA TTCTTTTGGT GTTTTTTGTG  
*C. oblonga* .....CT..G TG...G.... .....T... .....C. ..T.G..... T.....T  
*Z. atlanticum* .....T..G TG...G.... C.....C... .....C. ..T.G..... T.....T  
*H. tursionis* .....AG.G .....T.AG T.....C.....T..C .....CT.G..... T.....T  
*O. fraterculus* .....T..G TG...G.... .....C.....G ..T.G..... T.....T  
*O. mascomai* .....T..G TG...G.C... .....C.....G ..T.G..... T.....T  
*N. globicephalae* T...C.T... ..A..GT..G TG...G.... C..C..T... ..C.....G ..T.G..... T..C.....T  
*D. dendriticum* C.A.A...TG GGT...CAT. T.T.T..AA. G...G.AG.. .....C... A.T.G..... T...A...T

*F. hepatica* GTTTTTGATC TTGAGGTTTC TTTATTGTTG AAAATGCCTC TTCAGGGGGT GTTGTATAAG AAATTTTTTA  
*C. oblonga* ..G.....T .G...A.... .C.C..... ..T....G. .G.....C.. ....TC... ..T..GGGGT  
*Z. atlanticum* ..G.....T .G..... ..G..... ..T....CT .G..... ..T.... ..GGGGT  
*H. tursionis* A.C.....T .G...A.... ..G..... ..T....T .G.....C.. T...T.... ..GGG.T  
*O. fraterculus* ..G..C...T .A...A.A.. .C.T..... ..T....GT .A..A..T.. ....T.... ..T..GAGGT  
*O. mascomai* ..G..C...T .A...A.A.. .C.T..... ..T....GT .A..A..T.. ....T.... ..T..GAGGT  
*N. globicephalae* A.C.....T .G...A.... .C.TC..C.T ..T....T .G..A..C.. .C.A.T.... ..T..GGG.T  
*D. dendriticum* A.....G .G..... ..C.TG.... ..T..A...T .GG..... T.GA..... .GT..GAGAT

*F. hepatica* GGTATTTGTT TTTTTTGGTT TTGTTAGGTA TTGGGTTTTT GGTAGAGGTT CGCCGAGGTT ATGTTGTTG  
*C. oblonga* AT..CC.... .....C.. ..C.TA.GT .G..T..AG ...T....G A.GAAG.... ..GAG..  
*Z. atlanticum* AT..... ..C.C C..C.TA.GT .A..T..AG TT.T....G A.GAA..... .C...GAG..  
*H. tursionis* .T..... ..T.. C.CC.CA.GG .A..T..AG A.CT....G A.GAA..... ..T..GAG..  
*O. fraterculus* AT..CC.... .....C.. ..C.TA.GT .G..T..CAG ...T....G A.GAAG.... ..GAG..  
*O. mascomai* AT..CC.... .....C.. ..C.TA.GT .G..T..CAG ...T....G A.GAAG.... .C...GAG..  
*N. globicephalae* .T..CC.... C.....T.G ..AC.TA.GT .G..T..AG ...T..A..C A.GAAG.... ..GAG..  
*D. dendriticum* .T.T.G.TCA C...C..C.A A..C...CGG CG..T..A.A CT.T...A.. ..TAAG..A. ..A.AA....

*F. hepatica* AGCTTATTAG  
*C. oblonga* ..G.....  
*Z. atlanticum* G.AC----  
*H. tursionis* G.AC----  
*O. fraterculus* G.AC----  
*O. mascomai* G.AC----  
*N. globicephalae* G.G.....  
*D. dendriticum* ..GG.T...A

originó una mayor número de posiciones nucleotídicas variables fue la de *D. dendriticum*, puesto que cuando alineamos la secuencia de *F. hepatica* con las de los campúlidos, la variabilidad se observó en un 38,3% de las posiciones, mientras que el alineamiento de *D. dendriticum* con campúlidos dió lugar a un incremento de la variación hasta un 47,7%. El alineamiento de las secuencias de los miembros de la familia Campulidae junto con *F. hepatica* y *D. dendriticum* originó 235 sitios variables (54,7%), siendo 90 de ellos informativos (38,3%). Considerando sólo las transversiones, aparecieron un total de 52 posiciones informativas de un total de 430 (12%). Sin *N. globicephalae* en el alineamiento, se presentaron 46 sitios informativos (10,7%).

#### b) Secuencia del gen de la NADH3

En la Fig. 10 se muestra el alineamiento de la secuencia codificante del gen NADH3 por codones en cada una de las especies estudiadas. Se alinearon un total de 363 posiciones nucleotídicas. En la especie *F. hepatica* se observó la delección de seis nucleótidos, en *D. dendriticum* de tres y en el resto de especies de nueve nucleótidos. En el alineamiento de todas las especies, 212 posiciones mostraron nucleótidos distintos (58,4% de variabilidad), de los que 88 resultaron informativos (41,5%). De las posiciones variables, 70 correspondieron a las primeras posiciones del codón (siendo informativas 29 de ellas), 43 a la segunda posición (9 informativas) y 99 a la tercera posición (50 informativas). Al alinear solamente las especies de campúlidos, del total de 363 posiciones, 98 dieron lugar a diferencias en los nucleótidos (27%), siendo el 40,8% de ellas informativas. De las posiciones variables, 29 ocurrieron en la primera posición del codón (12 de ellas fueron informativas), 11 en la segunda (3 informativas) y 58 en la tercera posición (25 informativas). En el alineamiento de la secuencia codificante de los campúlidos y el nasitremátido, 120 de las posiciones (33%) resultaron variables, siendo un 42,5% informativas. En 34 primeras posiciones del codón se encontraron diferencias nucleotídicas, de las que 14 resultaron informativas. Doce de las variaciones ocurrieron en la segunda posición del codón (6 informativas) y 74 en la tercera posición (31 informativas). Al igual que explicábamos en el apartado anterior, cuando alineamos campúlidos y *F. hepatica*, el porcentaje de posiciones variables fue del 38,8%, mientras que en el alineamiento de *D. dendriticum* con campúlidos, la variabilidad llegó al 51,1%. El alineamiento de las secuencias de los miembros de la familia Campulidae junto con *F. hepatica* y *D. dendriticum* originó 204

Figura 10. Alineamiento de las secuencias del gen de la NADH3 de las ocho especies empleadas en el presente trabajo.

Figure 10. Alignment of the NADH3 gene of the eight species employed in this study.

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <i>F. hepatica</i>      | ATG --- TTG TTT TTT GCT GTT TTG GGG TTG TTG TTT TTT TTG ATT TTT TTT TTG GTT      |
| <i>C. oblonga</i>       | G.. TTT ... A.. C.. T.. TG. ..T ..T --- ... ..G G.T G.C ... ..G ... ..           |
| <i>Z. atlanticum</i>    | G.. TTT ... A.G ... T.. TG. ..T A.T --- ... ..G G.T G.. ... ..                   |
| <i>H. tursionis</i>     | G.. TTT ... GC. ... T.. TGC ..C ..T --- C.A ... GGG A.T G.. ... ..               |
| <i>O. fraterculus</i>   | G.. TTT ..A G.. C.. T.C TG. ... ..T --- ... ..A G.T ... ..C.G A.. ...            |
| <i>O. mascomai</i>      | G.. TTT ..A G.. C.. T.C TG. ... ..T --- ... ..A G.T ... ..C.G A.. ...            |
| <i>N. globicephalae</i> | G.. TTT ..A G.. ... T.C TG. ..T TTC --- ... ..C ..G G.C G.. ... C.. ..A ...      |
| <i>D. dendriticum</i>   | ... ..G.T G.A G.C ... TG. A.T .CT ..T ..A .AC .CG ..T C.. ..C C.G A.T C..        |
|                         |  |
| <i>F. hepatica</i>      | TTG GTT TTT CAT GCT TTT TTG TGG AAT TTA GAT TTG GGG ATT --- TTT TCT GGT GAA      |
| <i>C. oblonga</i>       | ..T ..C ..C .G. A.G ... C.T ... .G. .CG ..G .G. .CT TC. ... ..A ... ..TT.        |
| <i>Z. atlanticum</i>    | .CT ... ..G ... ..T ... ..CT ..G .G. TTT TCG ... ..G ... ..TT.                   |
| <i>H. tursionis</i>     | ... ..G ... ..G ... C.T ... ..CT ..G .GA TCT GG. ... ..G C.G ..A TTG             |
| <i>O. fraterculus</i>   | ..T ... ..AGG ... C.T ... .G. .CG ..G .G. .CT T.C ... ..G ..G ..C TTG            |
| <i>O. mascomai</i>      | ..T ... ..GG ... C.T ... .G. .CG ..G .G. .CT T.C ... ..G ..G ... TTG             |
| <i>N. globicephalae</i> | ..T ... ..G ... G.T ... .G. .CG ..C .G. TTT TCG ... ..G ... ..G CTG              |
| <i>D. dendriticum</i>   | .GT ..C .AC TT. .G. ... ..A .CT C.. G.G ... CG. A.. ... AGG AA. ... A.. .CT      |
|                         |  |
| <i>F. hepatica</i>      | CGT TCT TGG GTT AGT TCT TTT GAG TGT GGG TTT TTG TCT CAG CGT GTG ACT GAG AAT      |
| <i>C. oblonga</i>       | ..G ... ..C T.. GTG ... G..      |
| <i>Z. atlanticum</i>    | ..G ... ..G G.G ... ..G ... ..G ... ..G ... ..G ... ..G ... ..T.. GTG ... G..    |
| <i>H. tursionis</i>     | ... ..G ... ..G ... ..G ... ..G ... ..G ... ..G ... ..A G.G ... ..T.A GT. ... .. |
| <i>O. fraterculus</i>   | ..G ... ..T.. GTG ... G..        |
| <i>O. mascomai</i>      | ..G ... ..T.. GTG ... G.C        |
| <i>N. globicephalae</i> | ... ..G ... ..C ... ..T ... C.T ... ..A ..G T.. GTG ... G..                      |
| <i>D. dendriticum</i>   | ..G GTG ..A A.. TC. AT. .A. ... ..C .A. A.. .TG GGT ... CAT .T. T.T ..A          |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <i>F. hepatica</i>      | TAT TTT AGG TAT ACT TAT TTT ATT CTT TTG GTG TTT TTT GTG GTT TTT GAT CTT GAG |
| <i>C. oblonga</i>       | ... ..T ... ..C ... T.G ... ..T ... ..T ..G ... .. T.G ...                  |
| <i>Z. atlanticum</i>    | ..C ... ..C ... ..C ... T.G ... ..T ... ..T ..G ... .. T.G ...              |
| <i>H. tursionis</i>     | ..C ... ..T ..C ... ..C T.G ... ..T ... ..T A.C ... .. T.G ...              |
| <i>O. fraterculus</i>   | ... ..C ... ..G.. T.G ... ..T ... ..T ..G ..C ... T.A ...                   |
| <i>O. mascomai</i>      | ... ..C ... ..G.. T.G ... ..T ... ..T ..G ..C ... T.A ...                   |
| <i>N. globicephalae</i> | ..C ..C ..T ... ..C ... ..G.. T.G ... ..T ..C ... ..T A.C ... .. T.G ...    |
| <i>D. dendriticum</i>   | A.G ... G.A G.. ... ..C.. .A. T.G ... ..T ... .A. ..T A.. ... .. G.G ...    |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <i>F. hepatica</i>      | GTT TCT TTA TTG TTG AAA ATG CCT CTT CAG GGG GTG TTG TAT AAG AAA TTT TTT AGG |
| <i>C. oblonga</i>       | A.. ... C.C ... ..T ... ..G ..G ... ..C ... ..TC ... ..T ..G GGG TAT        |
| <i>Z. atlanticum</i>    | ... ..G ... ..T ... ..C T.G ... ... ..T. ... ..G GGG TAT                    |
| <i>H. tursionis</i>     | A.. ... ..G ... ..T ... ..T.G ... ..C ..T ... ..T. ... ..G GG. T.T          |
| <i>O. fraterculus</i>   | A.A ... C.T ... ..T ... ..G T.A ..A ..T ... ..T. ... ..T ..G AGG TAT        |
| <i>O. mascomai</i>      | A.A ... C.T ... ..T ... ..G T.A ..A ..T ... ..T. ... ..T ..G AGG TAT        |
| <i>N. globicephalae</i> | A.. ... C.T C.. C.T ..T ... ..T.G ..A ..C ... C.A ..T. ... ..T ..G GG. T.T  |
| <i>D. dendriticum</i>   | ... ..C.T G.. ... ..T ..A ... T.G G.. ... ..T .GA ... ..GT ..G AGA T.T      |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <i>F. hepatica</i>      | TAT TTG TTT TTT TTG GTT TTG TTA GGT ATT GGG TTT TTG GTA GAG GTT CGC CGA GGT |
| <i>C. oblonga</i>       | ..C C.. ... ..C.. ... C.T A.G T.G ..T ... AG. ..T ... ..G A.G AAG ...       |
| <i>Z. atlanticum</i>    | ... ..C.C C.. C.T A.G T.A ..T ... AGT T.T ... ..G A.G AA. ...               |
| <i>H. tursionis</i>     | ... ..T.. C.C C.C A.G G.A ..T ... AGA .CT ... ..G A.G AA. ...               |
| <i>O. fraterculus</i>   | ..C C.. ... ..C.. ... C.T A.G T.G ..T ..C AG. ..T ... ..G A.G AAG ...       |
| <i>O. mascomai</i>      | ..C C.. ... ..C.. ... C.T A.G T.G ..T ..C AG. ..T ... ..G A.G AAG ...       |
| <i>N. globicephalae</i> | ..C C.. ..C ... ..T.G ..A C.T A.G T.G ..T ... AG. ..T ..A ..C A.G AAG ...   |
| <i>D. dendriticum</i>   | .T. G.T CAC ... C.. C.A A.. C.. .CG GCG ..T ..A .AC T.T ... A.. ..T AAG ..A |

|                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| <i>F. hepatica</i>      | TAT GTT CGT TGA GCT TAT TAG |
| <i>C. oblonga</i>       | ... ..GAG ... .G. ... ..    |
| <i>Z. atlanticum</i>    | ..C ... GAG ..G .AC --- ... |
| <i>H. tursionis</i>     | ... T.. GAG ..G .AC --- ... |
| <i>O. fraterculus</i>   | ... ..GAG ..G .AC --- ...   |
| <i>O. mascomai</i>      | ..C ... GAG ..G .AC --- ... |
| <i>N. globicephalae</i> | ... ..GAG ..G .G. ... ..    |
| <i>D. dendriticum</i>   | ... A.A A.. ... .GG .T. ..A |

sitios variables (56,2%), siendo 84 de ellos informativos (41,2%). 68 sitios variables aparecieron en la primera posición del codón (28 informativos), 43 en la segunda (9 informativos) y 93 en la tercera (47 informativos).

### c) Secuencias aminoacídicas

En la traducción de los nucleótidos a aminoácidos, sólo en las especies *F. hepatica* y *D. dendriticum* apareció la metionina (ATG) como codón de inicio para el gen de la NADH3. Sin embargo, en el caso de las especies de campúlidos secuenciadas y el nasitremátido se consideró el codón GTG (Valina) como codón de inicio (véanse los alineamientos de las Figs. 10 y 11), que ha sido descrito ocasionalmente como tal (Garey y Wolstenholme, 1989). La secuencia del gen que codifica para la NADH1 de *F. hepatica* tiene igualmente como codón de inicio una Valina (GTG) (Garey y Wolstenholme, 1989). Otra aclaración importante es que el primer reverso PRC coincidía con la parte final del gen, por lo que contenía el codón de parada de la traducción de la proteína. En los análisis se incluyó el primer reverso para que la traducción del gen fuera completa en aquellas especies amplificadas con el segundo juego de primers (Tabla 8).

Se alinearon un total de 121 posiciones aminoacídicas (Fig. 11). En el caso de *F. hepatica*, la delección de seis nucleótidos condujo a la desaparición de los aminoácidos número 2 y 34. En la secuencia de *D. dendriticum*, se observó la pérdida del aminoácido número 2. En el resto de especies, se produjo la pérdida de los aminoácidos de las posiciones 10, 34. Sólo en las cuatro especies de campúlidos que se amplificaron con los primers PDC y PRC desapareció el aminoácido 120.

## II. Composición nucleotídica

En la Tabla 10 se indica la frecuencia total (en %) con la que apareció cada nucleótido en la secuencia codificante NADH3 en cada una de las especies estudiadas, así como la frecuencia de cada una de las bases según la posición en el codón (1ª, 2ª y 3ª).

Globalmente, destacó el alto porcentaje de timina (T) (50%). Además, esta base apareció con un porcentaje similar en las tres posiciones del codón, con la

Figura 11. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la NADH3 (véase la Tabla 7 para los nombres de los aminoácidos).

Figure 11. Alignment of the aminoacid secence of the NADH3 (see Table 7 for aminoacid names).

|                         |            |            |            |            |            |            |            |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>F. hepatica</i>      | M-LFFAVLGL | LFFLIFFLVL | VFHAFLNLD  | LGI-FSGERS | WVSSFECGFL | SQRVTENYFS | YTYFILLVFF |
| <i>C. oblonga</i>       | VF.ILSCF.- | ..LVV.L..F | ..RT...SSE | WAS.L..L.. | .....      | ..LV.D...  | .....      |
| <i>Z. atlanticum</i>    | VF.M.SCFS- | ..LVV....S | .....F..SE | WFS.L..L.. | ..G.....   | ..LV.D...  | .....      |
| <i>H. tursionis</i>     | VF.A.SCF.- | ..GIV..... | .....SE    | WSG.LP.L.. | .....      | A..LV..... | .....      |
| <i>O. fraterculus</i>   | VF.VLSC..- | ..LV..LM.F | ...S...SSE | WAF.L..L.. | .....      | ..LV.D...  | ...V.....  |
| <i>O. mascomai</i>      | VF.VLSC..- | ..LV..LM.F | ...G...SSE | WAF.L..L.. | .....      | ..LV.D...  | ...V.....  |
| <i>N. globicephalae</i> | VF.V.SCFF- | ..LVV.L..F | .....V.SS  | WFS.L..L.. | .....      | ..LV.D...  | ...V.....  |
| <i>D. dendriticum</i>   | ..VVV.CIAF | .YSFL.LILC | .YFG..SHV  | RS.SN.SA.V | .I.IY...YM | LG.HIY.K.G | D..LN...Y  |

|                         |            |            |            |            |            |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>F. hepatica</i>      | VVFDLEVSLL | LNMPLOGVLY | KNFFSYLFFL | VLLGIGFLVE | VRRGYVRWAY |
| <i>C. oblonga</i>       | .....I...  | .....F     | ..LGY..... | L..SL..S.. | .SK...E.G. |
| <i>Z. atlanticum</i>    | .....      | .....F     | ..LGY..... | L..SL..SF. | .SN...E.D- |
| <i>H. tursionis</i>     | .I....I... | .....F     | ..LGC..... | F..SV..SA. | .SN..FE.D- |
| <i>O. fraterculus</i>   | .....M...  | .....F     | ..LSY..... | L..SL..S.. | .SK...E.D- |
| <i>O. mascomai</i>      | .....M...  | .....F     | ..LSY..... | L..SL..S.. | .SK...E.D- |
| <i>N. globicephalae</i> | .I....I... | .....F     | ..LGC..... | L..SL..S.. | .SK...E.G. |
| <i>D. dendriticum</i>   | .I..V...V  | .....E..W. | .SLSCFVH.. | LM.AA.LYF. | I.K..MS.GF |

Tabla 10. Frecuencias nucleotídicas totales y por codones de la secuencia del gen NADH3, para cada una de las especies empleadas en el presente trabajo.

Table 10. Total and per codons nucleotide frequencies of the NADH3 gene of the eight species used in this work.

| Especies                           | Frecuencias nucleotídicas |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------------------------|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                    | A                         | T    | C    | G    | A1   | T1   | C1   | G1   |
| <i>Zalophotrema atlanticum</i>     | 11,9                      | 51,7 | 7,9  | 28,5 | 11,9 | 54,2 | 7,6  | 26,3 |
| <i>Hadwenius tursionis</i>         | 13,8                      | 49,4 | 9,6  | 27,1 | 14,4 | 49,2 | 9,3  | 27,1 |
| <i>Orthosplanchnus fraterculus</i> | 13,0                      | 49,4 | 8,8  | 28,8 | 14,4 | 48,3 | 11,0 | 26,3 |
| <i>Oschmarinella mascomai</i>      | 12,7                      | 49,2 | 9,0  | 29,1 | 13,6 | 48,3 | 11,0 | 27,1 |
| <i>Campula oblonga</i>             | 11,5                      | 50,1 | 9,5  | 28,9 | 13,4 | 49,6 | 10,9 | 26,1 |
| <i>Nasitrema globicephalae</i>     | 12,0                      | 50,7 | 11,5 | 25,8 | 11,8 | 48,7 | 12,6 | 26,9 |
| <i>Fasciola hepatica</i>           | 13,4                      | 53,8 | 6,7  | 26,1 | 13,4 | 49,6 | 10,1 | 26,9 |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i>    | 19,7                      | 45,6 | 10,0 | 24,7 | 22,5 | 36,7 | 13,3 | 27,5 |
| <b>TOTAL</b>                       | 13,5                      | 50,0 | 9,1  | 27,4 | 14,4 | 48,1 | 10,7 | 26,8 |
|                                    | A2                        | T2   | C2   | G2   | A3   | T3   | C3   | G3   |
| <i>Z. atlanticum</i>               | 20,3                      | 52,5 | 10,2 | 16,9 | 3,4  | 48,3 | 5,9  | 42,4 |
| <i>H. tursionis</i>                | 19,5                      | 50,0 | 11,0 | 19,5 | 7,6  | 49,2 | 8,5  | 34,7 |
| <i>O. fraterculus</i>              | 19,5                      | 53,4 | 8,5  | 18,6 | 5,1  | 46,6 | 6,8  | 41,5 |
| <i>O. mascomai</i>                 | 19,5                      | 53,4 | 8,5  | 18,6 | 5,1  | 45,8 | 7,6  | 41,5 |
| <i>C. oblonga</i>                  | 18,5                      | 52,1 | 10,1 | 19,3 | 2,5  | 48,7 | 7,6  | 41,2 |
| <i>N. globicephalae</i>            | 18,5                      | 53,8 | 9,2  | 18,5 | 5,9  | 49,6 | 12,6 | 31,9 |
| <i>F. hepatica</i>                 | 19,3                      | 54,6 | 9,2  | 16,8 | 7,6  | 57,1 | 0,8  | 34,5 |
| <i>D. dendriticum</i>              | 23,3                      | 45,8 | 10,0 | 20,8 | 13,3 | 54,2 | 6,7  | 25,8 |
| <b>TOTAL</b>                       | 19,8                      | 51,9 | 9,6  | 18,7 | 6,3  | 49,9 | 7,1  | 36,1 |

excepción de *D. dendriticum*, en la que la presencia de T en la primera posición del codón fue menor respecto a las otras especies (36,7%). El contenido total de guanina (G) se aproximó al 30%. Sin embargo, cuando consideramos la tercera posición del codón en todas las especies, excepto en *D. dendriticum*, el porcentaje de G aumentó con respecto a las otras dos posiciones (de un 26,1-27,1% en la primera posición y un 16,8-19,3% en la segunda, pasó a un 34,5-42,4%). En *D. dendriticum*, el porcentaje de G en tercera posición fue del 25,8%. En general, el nucleótido que apareció con menor frecuencia fue la citosina (C) (9,1%). Lo más destacable fue el descenso del porcentaje de C en la tercera posición del codón en *F. hepatica*, en donde casi no aparecieron citosinas (0,8%). El contenido global de adenina (A) aumentó ligeramente en la segunda posición del codón (de 13,5% a 19,8%). En *D. dendriticum*, se observó

un contenido más alto de A con respecto al resto de especies, tanto global como en las diferentes posiciones del codón (Tabla 10).

En resumen, puede decirse que las secuencias analizadas presentaron un alto contenido en T, que, globalmente, constituyó el 50% de los nucleótidos. Después, la G se presentó con un porcentaje total también bastante alto (cerca del 30%). El contenido global de T+G fue del 77,4%, siendo en la tercera posición del 86,6%. Las tres posiciones del codón estuvieron representadas mayoritariamente por T. G apareció con mayor frecuencia en la tercera posición del codón que en la primera y segunda. Destacó también el bajo contenido en A y, especialmente, de C.

En la Tabla 11, se muestra la frecuencia de cada nucleótido en la secuencia del tRNA+NADH3, para cada una de las especies. Los resultados fueron equiparables a los obtenidos con la secuencia codificante, NADH3.

Tabla 11. Frecuencias nucleotídicas totales de la secuencia del tRNA+NADH3 de las especies empleadas en el presente trabajo.

Table 11. Total nucleotide frequencies of tRNA+NADH3 sequence of the species used in this work.

| Especies                | Frecuencias nucleotídicas |             |             |             |
|-------------------------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                         | A                         | T           | C           | G           |
| <i>Z. atlanticum</i>    | 13,2                      | 50,0        | 9,4         | 27,4        |
| <i>H. tursionis</i>     | 15,1                      | 47,8        | 10,8        | 26,2        |
| <i>O. fraterculus</i>   | 13,9                      | 48,2        | 9,6         | 28,3        |
| <i>O. mascomai</i>      | 13,7                      | 48,0        | 10,1        | 28,3        |
| <i>C. oblonga</i>       | 13,5                      | 48,3        | 10,7        | 27,5        |
| <i>N. globicephalae</i> | 13,8                      | 48,5        | 12,4        | 25,4        |
| <i>F. hepatica</i>      | 15,3                      | 51,8        | 7,4         | 25,5        |
| <i>D. dendriticum</i>   | 19,2                      | 44,7        | 10,8        | 25,2        |
| <b>TOTAL</b>            | <b>14,7</b>               | <b>48,4</b> | <b>10,1</b> | <b>26,7</b> |

### III. Sustituciones nucleotídicas

En la matriz de la Tabla 12 se muestran el total de transiciones y transversiones en las secuencias del gen de la NADH3, entre pares de especies. Como se observa, entre las especies de la familia Campulidae (*Z. atlanticum*, *H. tursionis*, *O. fraterculus*, *O. mascomai* y *C. oblonga*) el número de transiciones fue

## Filogenia molecular de Campulidae

Tabla 12. Matriz de sustituciones nucleotídicas en la secuencia de la NADH3, entre pares de especies. Transiciones debajo de la diagonal y transversiones por encima de la diagonal. ZA: *Zalophotrema atlanticum*, HT: *Hadwenius tursionis*, OF: *Orthosplanchnus fraterculus*, OM: *Oschmarinella mascomai*, NG: *Nasitrema globicephalae*, FH: *Fasciola hepatica*, DD: *Dicrocoelium dendriticum*.

Table 12. Matrix of transition (lower diagonal) and transversion (upper diagonal) substitutions for the NADH3, between pairs of species. See above species abbreviations.

|    | ZA | HT | OF | OM | CO | NG | FH | DD  |
|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| ZA | -  | 28 | 20 | 19 | 13 | 25 | 68 | 93  |
| HT | 34 | -  | 33 | 32 | 29 | 32 | 69 | 100 |
| OF | 39 | 49 | -  | 1  | 6  | 27 | 68 | 94  |
| OM | 37 | 50 | 4  | -  | 5  | 26 | 67 | 93  |
| CO | 33 | 47 | 37 | 39 | -  | 21 | 64 | 93  |
| NG | 48 | 53 | 41 | 42 | 46 | -  | 67 | 97  |
| FH | 38 | 46 | 44 | 44 | 43 | 61 | -  | 108 |
| DD | 63 | 60 | 65 | 64 | 64 | 69 | 55 | -   |

Tabla 13. Matriz de transiciones AG, debajo de la diagonal, y TC, encima de la diagonal, entre pares de especies, en la secuencia codificante NADH3 (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 13. Matrix of AG (lower diagonal), and TC transitions (upper diagonal), between pairs of species, for the NADH3 (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA | HT | OF | OM | CO | NG | FH | DD |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ZA | -  | 18 | 18 | 17 | 19 | 26 | 15 | 26 |
| HT | 13 | -  | 22 | 24 | 23 | 30 | 18 | 30 |
| OF | 17 | 21 | -  | 3  | 18 | 23 | 18 | 25 |
| OM | 16 | 20 | 1  | -  | 19 | 25 | 19 | 25 |
| CO | 11 | 19 | 14 | 15 | -  | 26 | 17 | 27 |
| NG | 18 | 18 | 14 | 13 | 16 | -  | 26 | 34 |
| FH | 12 | 18 | 17 | 16 | 14 | 22 | -  | 23 |
| DD | 30 | 25 | 33 | 32 | 28 | 27 | 20 | -  |

Tabla 14. Matriz de transversiones AT, debajo de la diagonal, y AC, encima de la diagonal, entre pares de especies, en la secuencia codificante NADH3 (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 14. Matrix of AT (lower diagonal) and AC (upper diagonal) transversions, between pairs of species, for the NADH3 (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA | HT | OF | OM | CO | NG | FH | DD |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ZA | -  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 5  |
| HT | 2  | -  | 1  | 0  | 0  | 1  | 4  | 5  |
| OF | 3  | 3  | -  | 0  | 0  | 0  | 3  | 5  |
| OM | 3  | 4  | 0  | -  | 0  | 0  | 3  | 6  |
| CO | 1  | 2  | 2  | 2  | -  | 0  | 3  | 2  |
| NG | 2  | 2  | 2  | 2  | 0  | -  | 2  | 3  |
| FH | 12 | 10 | 17 | 17 | 12 | 11 | -  | 5  |
| DD | 29 | 35 | 30 | 29 | 33 | 35 | 35 | -  |

Tabla 15. Matriz de transversiones TG, debajo de la diagonal y CG, encima de la diagonal, entre pares de especies, en la secuencia codificante (ver tabla 12 para las abreviaturas).

Table 15. Matrix of TG (lower diagonal) and CG (upper diagonal) transversions, between pairs of species, for the NADH3 (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA | HT | OF | OM | CO | NG | FH | DD |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ZA | -  | 4  | 3  | 3  | 3  | 5  | 4  | 13 |
| HT | 20 | -  | 4  | 4  | 5  | 4  | 6  | 17 |
| OF | 11 | 21 | -  | 0  | 1  | 7  | 6  | 13 |
| OM | 11 | 21 | 0  | -  | 1  | 6  | 6  | 13 |
| CO | 8  | 19 | 2  | 2  | -  | 5  | 6  | 15 |
| NG | 16 | 22 | 15 | 16 | 14 | -  | 7  | 14 |
| FH | 43 | 42 | 37 | 37 | 39 | 43 | -  | 14 |
| DD | 41 | 37 | 39 | 39 | 37 | 38 | 46 | -  |

mayor que el de transversiones, suponiendo entre un 60% y un 100% de las sustituciones nucleotídicas. Lo mismo ocurre con la especie *N. globicephalae* (familia Nasitrematidae) con respecto a los miembros de la familia Campulidae.

Sin embargo, cuando comparamos las secuencias de *F. hepatica* y *D. dendriticum* con el resto, vemos que el número de transversiones superó el de transiciones. También se observó este hecho al comparar entre sí las secuencias de las dos especies anteriores. En estos casos, las transversiones supusieron entre un 57% y un 70% de las sustituciones nucleotídicas.

Es de destacar que entre los campúlidos *O. fraterculus* y *O. mascomai* sólo aparecieron cuatro transiciones y ninguna transversión. También cabe señalar que del resto de campúlidos secuenciados, sólo *C. oblonga* es el que presentó menor número de transiciones y transversiones con respecto a *O. fraterculus* y *O. mascomai* (Tabla 11).

De acuerdo con la matriz de la Tabla 13, no se observó predominio de un tipo de transición sobre otro. Respecto a las transversiones, las Tablas 14 y 15 presentan el número de cada uno de los cuatro tipos de transversiones que explicamos anteriormente, entre pares de especies. Dichas tablas sugieren que las transversiones T-G ocurrieron en mayor número que las C-G, A-T y A-C.

Resultados similares se obtuvieron con la secuencia completa con el tRNA+NDH3 (Tablas 16, 17, 18 y 19).

En la gráfica de la Fig. 12 se representó la variación del porcentaje de transiciones con respecto a la divergencia nucleotídica, para cada par de especies en la secuencia codificante, según el método de Kimura de 2 parámetros. Puede observarse una disminución de la proporción de transiciones conforme aumenta la divergencia nucleotídica, indicando la existencia de saturación transicional (véase la introducción de esta sección).

## Filogenia molecular de Campulidae

Tabla 16. Matriz de sustituciones nucleotídicas entre pares de especies en la secuencia del tRNA+NADH3. Transiciones debajo de la diagonal y transversiones por encima de la diagonal (ver Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 16. Matrix of transition (lower diagonal) and transversion (upper diagonal) substitutions for the tRNA+NADH3 sequence, between pairs of species. See above species abbreviations (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA | HT | OF | OM | CO | NG | FH | DD  |
|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| ZA | -  | 26 | 17 | 17 | 12 | 23 | 62 | 88  |
| HT | 31 | -  | 29 | 29 | 26 | 29 | 62 | 94  |
| OF | 35 | 43 | -  | 0  | 5  | 24 | 63 | 87  |
| OM | 33 | 44 | 4  | -  | 5  | 24 | 63 | 87  |
| CO | 30 | 42 | 32 | 34 | -  | 19 | 60 | 87  |
| NG | 44 | 48 | 37 | 38 | 42 | -  | 63 | 90  |
| FH | 27 | 36 | 35 | 35 | 31 | 48 | -  | 100 |
| DD | 56 | 55 | 58 | 57 | 55 | 61 | 43 | -   |

Tabla 17. Matriz de transiciones AG, debajo de la diagonal, y TC, encima de la diagonal, entre pares de especies, en la secuencia del tRNA+NADH3 (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 17. Matrix of AG (lower diagonal), and TC transitions (upper diagonal), between pairs of species, for the tRNA+NADH3 sequence (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA | HT | OF | OM | CO | NG | FH | DD |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ZA | -  | 20 | 21 | 20 | 21 | 28 | 20 | 30 |
| HT | 14 | -  | 25 | 27 | 25 | 32 | 23 | 33 |
| OF | 18 | 24 | -  | 3  | 21 | 26 | 20 | 28 |
| OM | 17 | 23 | 1  | -  | 22 | 28 | 21 | 28 |
| CO | 12 | 22 | 16 | 17 | -  | 27 | 21 | 31 |
| NG | 20 | 21 | 15 | 14 | 19 | -  | 31 | 36 |
| FH | 18 | 23 | 24 | 23 | 22 | 30 | -  | 27 |
| DD | 33 | 27 | 37 | 36 | 33 | 33 | 28 | -  |

Tabla 18. Matriz de transversiones AT, debajo de la diagonal, y AC, encima de la diagonal, entre pares de especies, en la secuencia del tRNA+NADH3 (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 18. Matrix of AT (lower diagonal) and AC (upper diagonal) transversions, between pairs of species, for the tRNA+NADH3 (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA | HT | OF | OM | CO | NG | FH | DD |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ZA | -  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 5  | 5  |
| HT | 3  | -  | 1  | 0  | 0  | 1  | 6  | 5  |
| OF | 3  | 4  | -  | 0  | 0  | 0  | 5  | 5  |
| OM | 3  | 5  | 0  | -  | 0  | 0  | 5  | 6  |
| CO | 1  | 3  | 2  | 2  | -  | 1  | 5  | 2  |
| NG | 3  | 5  | 3  | 3  | 0  | -  | 4  | 3  |
| FH | 12 | 12 | 17 | 17 | 12 | 11 | -  | 6  |
| DD | 31 | 37 | 32 | 31 | 35 | 38 | 37 | -  |

Tabla 19. Matriz de transversiones TG, debajo de la diagonal y CG, encima de la diagonal, entre pares de especies, en la secuencia del tRNA+NADH3 (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 19. Matrix of TG (lower diagonal) and CG (upper diagonal) transversions, between pairs of species, for the tRNA+NADH3 sequence (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA | HT | OF | OM | CO | NG | FH | DD |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ZA | -  | 4  | 4  | 3  | 3  | 5  | 4  | 14 |
| HT | 21 | -  | 5  | 4  | 5  | 4  | 6  | 18 |
| OF | 13 | 23 | -  | 1  | 2  | 8  | 7  | 15 |
| OM | 13 | 23 | 0  | -  | 1  | 6  | 6  | 14 |
| CO | 9  | 21 | 2  | 2  | -  | 5  | 7  | 16 |
| NG | 17 | 22 | 16 | 17 | 15 | -  | 7  | 15 |
| FH | 47 | 45 | 39 | 39 | 40 | 45 | -  | 14 |
| DD | 43 | 40 | 42 | 42 | 40 | 41 | 51 | -  |

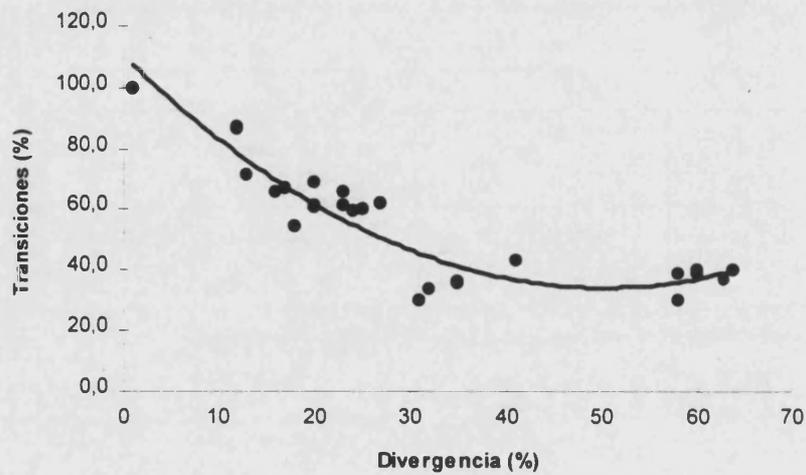


Figura 12. Divergencia nucleotídica entre pares de especie según el método de Kimura de 2 parámetros (en %) frente al porcentaje de transiciones entre pares de especies. Al aumentar la divergencia se observa una disminución de las transiciones.

Figure 12. Nucleotide divergence (by Kimura 2 parameters method) (in %) against the percentage of transitions, between pairs of species. As divergence increases, the transitions decrease.

En la Tabla 20 se indican las sustituciones sinónimas y no sinónimas por sitio, según el método de Nei y Gojobori (1986). Es fácil comprobar que las sustituciones silenciosas tuvieron lugar en mayor proporción que las no sinónimas.

Tabla 20. Matriz de sustituciones sinónimas por sitio debajo de la diagonal y no sinónimas encima de la diagonal, entre pares de especies (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 20. Matrix of synonymous (lower diagonal) and nonsynonymous (upper diagonal) substitutions per site between pairs of campulid species (see Tabla 12 for abbreviations).

|    | ZA   | HT   | OF   | OM   | CO   | NG   | FH   | DD   |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ZA | -    | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.06 | 0.08 | 0.24 | 0.50 |
| HT | 0.63 | -    | 0.12 | 0.12 | 0.11 | 0.11 | 0.23 | 0.50 |
| OF | 0.51 | 0.90 | -    | 0.04 | 0.04 | 0.08 | 0.23 | 0.47 |
| OM | 0.48 | 0.99 | 0.04 | -    | 0.04 | 0.08 | 0.23 | 0.47 |
| CO | 0.42 | 0.88 | 0.43 | 0.45 | -    | 0.07 | 0.23 | 0.49 |
| NG | 1.16 | 1.34 | 0.80 | 0.88 | 0.97 | -    | 0.25 | 0.48 |
| FH | 0.63 | 1.00 | 1.00 | 1.05 | 0.73 | 1.36 | -    | 0.47 |
| DD | 0.98 | 1.23 | 1.22 | 1.22 | 0.92 | 1.60 | 1.11 | -    |

#### IV. Detección de señal filogenética

Todas las distribuciones revelaron una asimetría hacia la izquierda en los dos grupos de análisis, siendo el valor de  $g_1 < 0$ . Ello significa que los datos están significativamente más estructurados que si fuesen al azar, por lo que aportan información sobre las relaciones filogenéticas entre los taxones estudiados.

#### V. Estacionaridad

Este requisito se cumplió en todas las especies y en todas las posiciones del codón. Únicamente la primera posición del codón en *D. dendriticum* pareció presentar una composición distinta al resto de especies, lo cual no impidió el cumplimiento de esta condición.

#### 3.3.5. Inferencia filogenética

Comprobada la presencia de señal filogenética y estacionaridad en las secuencias en cuestión, se procedió a la reconstrucción de la filogenia de las especies.

##### a) Inferencia de la filogenia a partir de matrices de distancias: Método del vecino más próximo

Dada la similitud de los resultados obtenidos con los distintos algoritmos para calcular divergencias nucleotídicas, únicamente se muestran los obtenidos con el método de Kimura de 2 parámetros, pues la estima de las divergencias nucleotídicas según este algoritmo son tan consistentes como la realizada por los algoritmos más complejos (Hillis et al., 1993; Kumar et al., 1993).

Se realizaron los análisis teniendo en cuenta el tipo de sustitución (transiciones y transversiones, Ts+Tv, y sólo transversiones, Tv) y posición de los codones (las tres posiciones, la 1ª y la 2ª, y sólo la 3ª). Las Tablas 21, 22, 23 y 24 muestran los valores de divergencia nucleotídica, según el algoritmo de Kimura de 2 parámetros. La Tabla 21 contiene las distancias considerando las tres posiciones del codón, la Tabla 22

Tabla 21. Distancias según el algoritmo de Kimura de 2 parámetros, para las tres posiciones del codón, bajo la diagonal. Encima de la diagonal, las varianzas de las distancias (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 21. Kimura 2 parameters distances for the three codon positions (lower diagonal) and their variances (upper diagonal) (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA    | HT    | OF    | OM    | CO    | NG    | FH    | DD   |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| ZA | -     | 0.03  | 0.02  | 0.02  | 0.02  | 0.03  | 0.04  | 0.06 |
| HT | 0.184 | -     | 0.03  | 0.03  | 0.03  | 0.03  | 0.04  | 0.06 |
| OF | 0.168 | 0.244 | -     | 0.006 | 0.02  | 0.03  | 0.04  | 0.06 |
| OM | 0.160 | 0.248 | 0.012 | -     | 0.02  | 0.03  | 0.04  | 0.06 |
| CO | 0.133 | 0.228 | 0.117 | 0.124 | -     | 0.03  | 0.04  | 0.06 |
| NG | 0.225 | 0.265 | 0.201 | 0.204 | 0.202 | -     | 0.04  | 0.06 |
| FH | 0.310 | 0.349 | 0.349 | 0.349 | 0.318 | 0.413 | -     | 0.06 |
| DD | 0.600 | 0.627 | 0.603 | 0.596 | 0.577 | 0.636 | 0.576 | -    |

Tabla 22. Distancias según el algoritmo de Kimura de 2 parámetros, para las posiciones primera y segunda del codón bajo la diagonal. Por encima de la diagonal, las varianzas de las distancias. (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 22. Kimura 2 parameters distances for the first and second codon position (lower diagonal) and their variances (upper diagonal) (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA    | HT    | OF    | OM    | CO    | NG    | FH    | DD   |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| ZA | -     | 0.02  | 0.02  | 0.02  | 0.02  | 0.02  | 0.03  | 0.06 |
| HT | 0.111 | -     | 0.03  | 0.03  | 0.03  | 0.03  | 0.04  | 0.07 |
| OF | 0.102 | 0.137 | -     | 0.004 | 0.02  | 0.02  | 0.04  | 0.06 |
| OM | 0.097 | 0.132 | 0.004 | -     | 0.02  | 0.02  | 0.04  | 0.06 |
| CO | 0.078 | 0.127 | 0.049 | 0.054 | -     | 0.02  | 0.04  | 0.07 |
| NG | 0.108 | 0.137 | 0.097 | 0.092 | 0.092 | -     | 0.04  | 0.06 |
| FH | 0.217 | 0.246 | 0.235 | 0.229 | 0.223 | 0.265 | -     | 0.06 |
| DD | 0.508 | 0.541 | 0.492 | 0.483 | 0.535 | 0.524 | 0.472 | -    |

Tabla 23. Distancias según el algoritmo de Kimura de 2 parámetros, para la tercera posición del codón bajo la diagonal. Por encima de la diagonal, las varianzas de las distancias (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 23. Kimura 2 parameters distances for the third codon position (lower diagonal) and their variances (upper diagonal) (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA    | HT    | OF    | OM    | CO    | NG    | FH    | DD   |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| ZA | -     | 0.07  | 0.06  | 0.06  | 0.06  | 0.10  | 0.10  | 0.14 |
| HT | 0.356 | -     | 0.10  | 0.11  | 0.09  | 0.12  | 0.10  | 0.14 |
| OF | 0.320 | 0.523 | -     | 0.015 | 0.06  | 0.09  | 0.11  | 0.15 |
| OM | 0.306 | 0.565 | 0.026 | -     | 0.07  | 0.09  | 0.12  | 0.15 |
| CO | 0.256 | 0.488 | 0.285 | 0.299 | -     | 0.10  | 0.10  | 0.11 |
| NG | 0.523 | 0.635 | 0.469 | 0.507 | 0.499 | -     | 0.14  | 0.16 |
| FH | 0.592 | 0.615 | 0.668 | 0.677 | 0.568 | 0.842 | -     | 0.15 |
| DD | 0.811 | 0.837 | 0.892 | 0.893 | 0.674 | 0.931 | 0.844 | -    |

Tabla 24. Distancias según el algoritmo de Kimura de 2 parámetros, sólo las transversiones, bajo la diagonal. Por encima de la diagonal, las varianzas de las distancias. (véase Tabla 12 para las abreviaturas).

Table 24. Kimura 2 parameters distances for transversions (lower diagonal) and their variances (upper diagonal) (see Table 12 for abbreviations).

|    | ZA    | HT    | OF    | OM    | CO    | NG    | FH    | DD   |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| ZA | -     | 0.02  | 0.01  | 0.01  | 0.01  | 0.02  | 0.03  | 0.05 |
| HT | 0.080 | -     | 0.02  | 0.02  | 0.02  | 0.02  | 0.03  | 0.05 |
| OF | 0.051 | 0.090 | -     | 0.000 | 0.007 | 0.02  | 0.03  | 0.05 |
| OM | 0.051 | 0.090 | 0.000 | -     | 0.007 | 0.02  | 0.03  | 0.05 |
| CO | 0.035 | 0.080 | 0.015 | 0.015 | -     | 0.01  | 0.03  | 0.05 |
| NG | 0.070 | 0.090 | 0.074 | 0.074 | 0.057 | -     | 0.03  | 0.05 |
| FH | 0.218 | 0.218 | 0.222 | 0.222 | 0.209 | 0.222 | -     | 0.05 |
| DD | 0.348 | 0.384 | 0.342 | 0.342 | 0.337 | 0.354 | 0.409 | -    |

muestra las distancias considerando las dos primeras posiciones del codón, la Tabla 23 sólo con la 3ª base y la Tabla 24, tomando en cuenta las Tv.

#### a.1) Resultados con el grupo 1 (G1)

La Figura 13A muestra la topología obtenida cuando consideramos las Ts+Tv. La relación entre *O. mascomai* y *O. fraterculus* fue la más clara, puesto que aparecieron unidas en el 100% de los casos. El valor de bootstrap que apoya el trío *C. oblonga*, *O. mascomai* y *O. fraterculus* fue del 60. La unión de *N. globicephalae* con el trío anterior estuvo al límite de la significación (69%). La fiabilidad de la rama que une *Z. atlanticum* al resto de especies resultó ser baja (menos del 50%). La relación de *H. tursionis* con el resto de especies apareció refrendada en el 99% de los remuestreos.

La topología obtenida cuando se consideraron las dos posiciones del codón resultó similar a la anterior (Fig. 13B), pero con algunas diferencias claras. Por un lado, la unión de *C. oblonga* al par *O. fraterculus*-*O. mascomai* resultó significativa (71%). La significación del nodo que une *N. globicephalae* al trío anterior disminuyó (pasó del 69% al 59%). Por otra parte, no queda resuelto el nodo que unía a *Z. atlanticum* al resto de especies (en la topología anterior presentó una significación muy baja, del 49%).

La fiabilidad de las ramas de la topología obtenida con la tercera base del codón, sólo apareció altamente significativa en la unión de *O. mascomai* y *O. fraterculus* (Fig. 13C). El resto presentó valores de remuestreo realmente bajos (entre 25 y 50%). La topología fue similar a la 13A, pero en este caso *N. globicephalae* formó un clado con *O. fraterculus* y *O. mascomai*.

Cuando consideramos sólo las transversiones, *Z. atlanticum* se une al clado formado por *C. oblonga*, *O. mascomai* y *O. fraterculus*, pero con una significación baja (59%). La unión de *N. globicephalae* con los cuatro taxones anteriores no queda resuelta (Fig. 13D). Sin embargo, la unión de *C. oblonga* a *O. mascomai* y *O. fraterculus* resultó altamente significativa (97%) si la comparamos con la obtenida considerando las Ts+Tv y las dos primeras posiciones del codón (Fig. 13A y B, respectivamente).

Filogenia y biogeografía de Campulidae

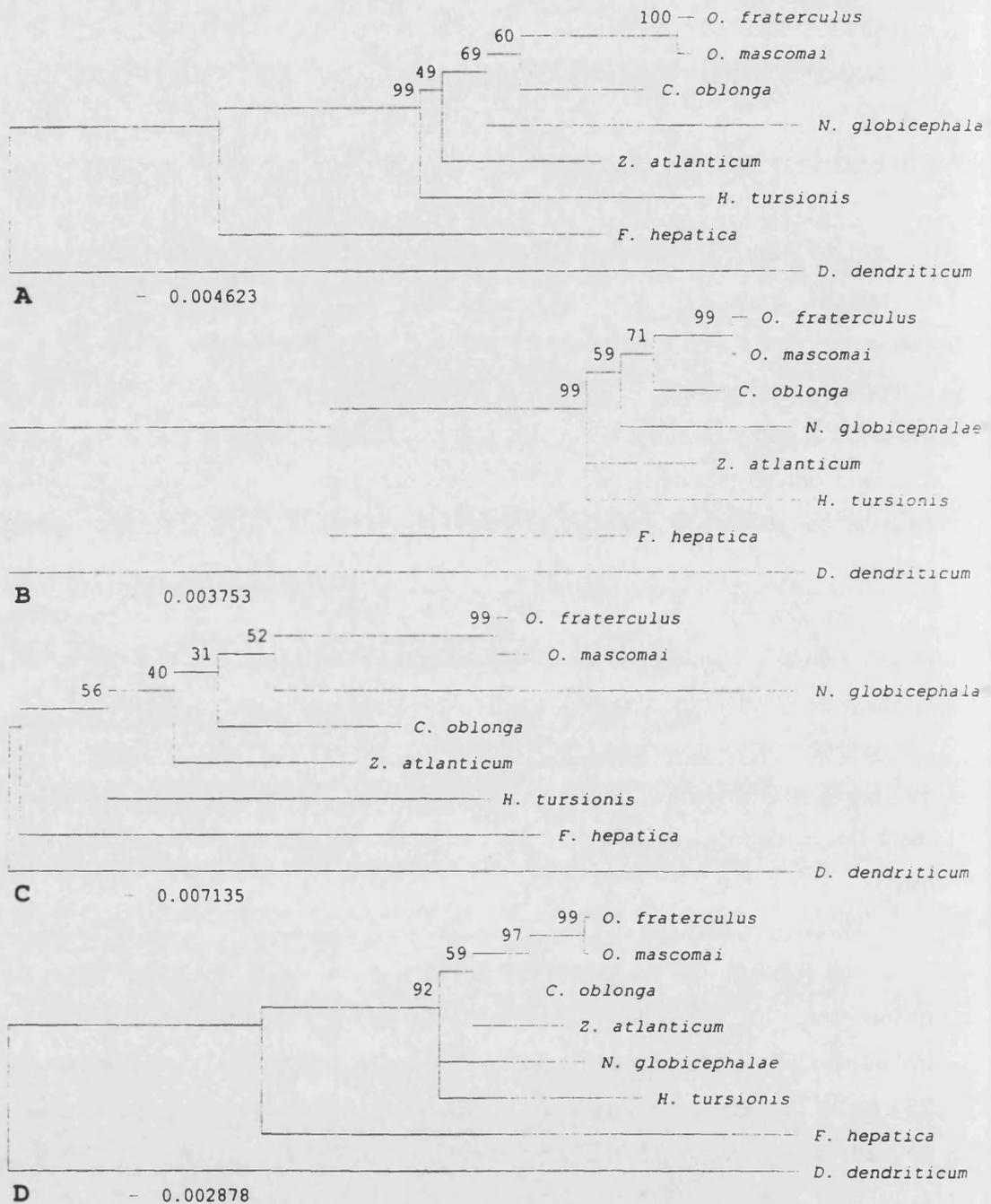


Figura 13. Árboles filogenéticos sin raíz obtenidos mediante el método del vecino más próximo (distancias de Kimura 2 parámetros) con las 8 secuencias empleadas en este trabajo (G1). A: considerando transiciones y transversiones a la vez y las tres posiciones del codón, B: dos primeras posiciones, C: sólo la tercera, D: sólo transversiones. En los nodos se indican los valores de bootstrap. Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figure 13. Unrooted phylogenetic trees obtained by the neighbor-joining method (distances by Kimura 2 parámetros) with the 8 sequences used in this work (G1). A: by considering transitions and transversions and the three codon positions, B: 1st and 2nd codon positions, C: 3rd codon position, D: only transversions. Bootstrap values are indicated at nodes. See species names in Table 10.

a.2) Resultados con el grupo 2 (G2)

Al analizar los campúlidos junto con *F. hepatica* y *D. dendriticum*, resultó la misma topología en todos los supuestos, excepto cuando se consideraron las dos primeras posiciones del codón (Ts+Tv, 3ª posición del codón, Tv) (Figs. 14A, C y D, respectivamente). En todos los casos, destacó la clara relación entre las especies *O. mascomai* y *O. fraterculus*, apoyada en prácticamente el 100% de los casos. El trío formado por *C. oblonga* y las dos especies anteriores resultó altamente significativo bajo todos los supuestos, excepto cuando se consideró la tercera posición del codón (52%, Fig. 14C).

Una relación que apareció en baja proporción en el remuestreo por bootstrap fue la de *Z. atlanticum* con *C. oblonga*, *O. mascomai* y *O. fraterculus* (Figs. 14A, C y D). En la topología obtenida teniendo en cuenta las dos primeras posiciones del codón, las especies *Z. atlanticum* y *H. tursionis* formaron un clado, pero sólo en el 38% de los remuestreos (Fig. 14B). La unión de *H. tursionis* con respecto al resto de especies de la familia Campulidae estuvo refrendada prácticamente en el 100% de los remuestreos en todas las topologías, excepto las que resultaron al considerar las dos primeras posiciones del codón (Fig. 14B) y sólo la 3ª posición (Fig. 14C).

a.3) Resultados globales según el método del vecino más próximo, basado en distancias

I. Independientemente de los supuestos considerados para el análisis filogenético (Ts+Tv, Tv, tres posiciones, 1ª y 2ª posición del codón, 3ª posición del codón) y del grupo de especies considerado (G1 o G2), apareció una sólida relación entre las especies de campúlidos *O. mascomai* y *O. fraterculus*. La fiabilidad de esta relación estuvo firmemente apoyada por unos valores de remuestreo de prácticamente el 100%.

II. Igualmente, parece existir una relación estrecha entre las especies *C. oblonga* y el par *O. mascomai* y *O. fraterculus*, aunque en el G1, sólo al considerar las dos primeras posiciones del codón y las Tv, la fiabilidad de esta relación fue significativa (Figs. 13B y D, respectivamente). En el G2, veíamos que sólo al tener en

## Filogenia y biogeografía de Campulidae

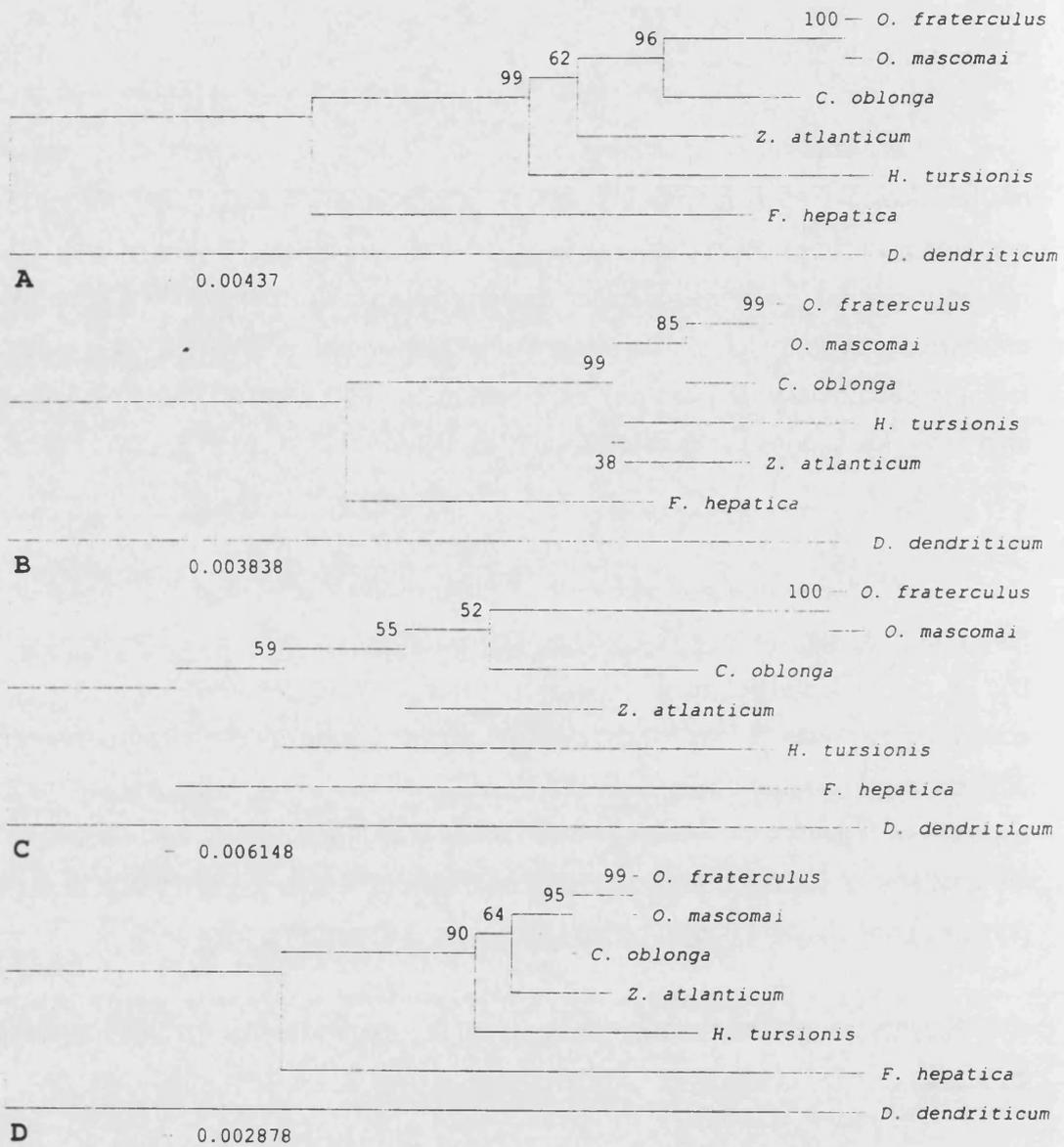


Figura 14. Árboles filogenéticos sin raíz obtenidos mediante el método del vecino más próximo (distancias de Kimura 2 parámetros) con 7 de las 8 secuencias empleadas en este trabajo (G2). A: considerando transiciones y transversiones a la vez y las tres posiciones del codón, B: dos primeras posiciones, C: sólo la tercera, D: sólo transversiones. En los nodos se indican los valores de bootstrap. Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figure 14. Unrooted phylogenetic trees obtained by the neighbor-joining method (distances by Kimura 2 parámetros) with 7 of the 8 sequences used in this work (G2). A: by considering transitions and transversions and the three codon positions, B: 1st and 2nd codon positions, C: 3rd codon position, D: only transversions. Bootstrap values are indicated at nodes. See species names in Table 10.

cuenta la 3ª posición del codón, el valor obtenido por bootstrap para este clado no resultó significativo (Fig. 14C).

III. La posición del nasitremátido, *N. globicephalae*, no quedó claramente establecida, como lo indican los bajos valores de bootstrap y la politomía observada en las topologías correspondientes (Figs. 13A, B, C y D). La unión de *N. globicephalae* al trío *C. oblonga*, *O. mascomai* y *O. fraterculus* fue la única que presentó una fiabilidad más elevada, cercana a la significatividad (69%); al tener en cuenta las Ts+Tv. Al excluir *N. globicephalae* del análisis (G2), la posición relativa de las especies restantes fue la misma que cuando esta especie se incluyó en análisis (G1), excepto al tener en cuenta las dos primeras posiciones del codón (Fig. 14B). Sin embargo, hay que destacar que las proporciones de remuestreo que apoyan la relación entre *Z. atlanticum* y el trío *C. oblonga*, *O. mascomai* y *O. fraterculus* fueron más elevadas cuando se excluyó el nasitremátido del análisis, aunque sin llegar a ser significativas (Figs. 14A, C y D). Teniendo en cuenta las posiciones primera y segunda del codón, la relación de *Z. atlanticum* con el resto de especies no quedó perfectamente definida, tanto en el G1 como en el G2. En el primer caso, desapareció el nodo que la unía al resto de especies y en el segundo, constituyó un clado junto a *H. tursionis* en un porcentaje muy bajo (Figs. 13B y 14B, respectivamente).

IV. La especie *H. tursionis* apareció en todas las topologías como el campúlido de posición más externa, salvo en la topología en donde apareció junto a *Z. atlanticum* (Fig. 14B). Sólo cuando se consideró la tercera base del codón, esta posición no estuvo refrendada significativamente (Figs. 13C y 14C).

V. Globalmente, parece ser que al excluir *N. globicephalae* del análisis y considerando sólo las Tv se obtuvieron mejores resultados en las proporciones del remuestreo (Fig. 14D).

b) Inferencia de la filogenia a partir de caracteres

## b.1) Parsimonia

Se realizaron los análisis teniendo en cuenta el tipo de sustitución (transiciones y transversiones, Ts+Tv, y sólo transversiones, Tv). También se realizaron los análisis con la secuencia del tRNA+NADH3 y sólo con la secuencia codificante NADH3.

b.1.1) Resultados con el grupo 1 (G1)

Con el método de búsqueda exhaustiva se analizaron 10.395 topologías. Con la secuencia codificante y teniendo en cuenta las Ts+Tv, se obtuvieron dos árboles equiparsimónicos, con 344 pasos mutacionales (Figs. 15A y B). La fiabilidad del nodo que unió los campúlidos *O. fraterculus* y *O. mascomai* en ambas topologías fue del 100%. En uno de los árboles (Fig. 15B), el trío formado por *C. oblonga*, y el par anterior resultó poco significativo (42%), al igual que la unión de *N. globicephalae* a esas tres especies (55,4%). En la topología 15A, fue la especie *N. globicephalae* la que apareció unida al par *O. fraterculus*-*O. mascomai*, pero sólo en el 38,7% de los remuestreos. *C. oblonga* apareció junto al trío anterior en un 55,4% de las veces. En ambos árboles, *Z. atlanticum* y *H. tursionis* formaron un clado, pero sólo en un 59,5% de los casos. Con la secuencia del tRNA+NADH3 y considerando Ts+Tv, se obtuvo un sólo árbol máximo parsimónico, con 388 pasos mutacionales (Fig 16). La topología coincidió con una de las obtenidas con la secuencia codificante (Fig. 15A), siendo igualmente poco significativos todos los nodos, excepto el que unió *O. mascomai* y *O. fraterculus*.

Considerando únicamente las transversiones (parsimonia de transversión) en la secuencia codificante NADH3, se obtuvo un sólo árbol más parsimónico, con 171 pasos mutacionales (Fig. 17). El par *O. mascomai*-*O. fraterculus* volvió a aparecer con un nivel de sinificación muy elevado (99,6%). *C. oblonga* se unió al dúo anterior en un 94,1% de los casos. En este árbol, *Z. atlanticum* no formó un clado con *H. tursionis*. La primera especie se unió al trío *C. oblonga*, *O. fraterculus*, *O. mascomai* en un 63,5% de los remuestreos. *N. globicephalae* se unió al cuarteto anterior en el 53,2% de los casos y *H. tursionis* apareció como la especie de campúlido más externa en el 99,5% de los remuestreos. Los resultados con la secuencia del tRNA+NADH3 fueron

Filogenia molecular de Campulidae

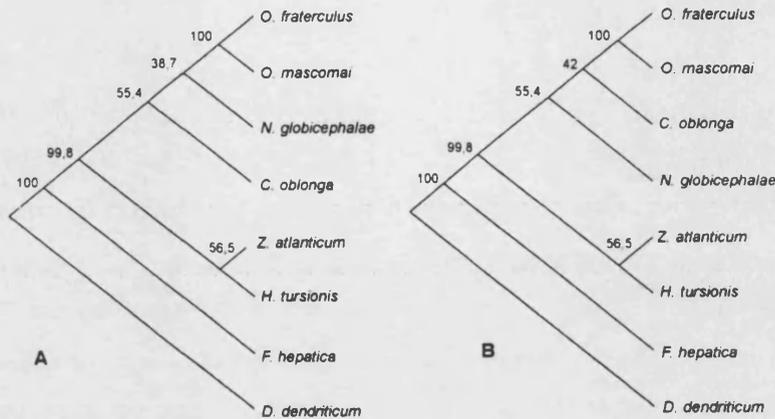


Figura 15 (A) y (B). Árboles filogenéticos equiparsimónicos para el grupo 1 (G1) con la secuencia codificante NADH3, considerando las transiciones y transversiones a la vez. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que la agrupación aparece al realizar el análisis de remuestreo por "bootstrap". Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figure 15 (A) and (B). Equiparsimonic phylogenetic trees for the group 1 (G1) using the coding sequence of the NADH3 gene, by considering transitions and transversions. Numbers indicate the percentage of replications where the agrupation appears in the bootstrap. See species names in Table 10.

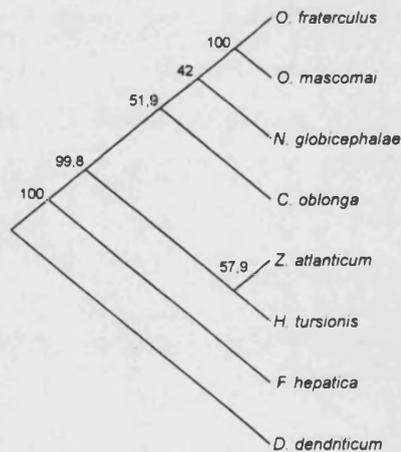


Figura 16. Árbol filogenético para el G1 con la secuencia del tRNA+NADH3, obtenido por parsimonia, considerando las transiciones y transversiones a la vez. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que la agrupación aparece al realizar el análisis de remuestreo por "bootstrap". Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figure 16. Phylogenetic tree for the group 1 (G1), obtained by parsimony using the sequence of the tRNA+NADH3, by considering transitions and transversions. Numbers indicate the percentage of replications where the agrupation appears in the bootstrap. See species names in Table 10.

similares (Fig. 18), obteniéndose un árbol máximo parsimónico de 187 pasos mutacionales.

#### b.1.2) Resultados con el grupo 2 (G2)

Con la secuencia codificante NADH3 y considerando las Ts+Tv, se obtuvieron 2 árboles más parsimónicos, con 301 pasos mutacionales (Figs. 19A y B), del total de 945 posibles topologías con 7 especies. En las dos topologías, *O. mascomai* y *O. fraterculus* formaron un clado el 100% de las veces. *C. oblonga* se unió significativamente con el par *O. mascomai* y *O. fraterculus* en un 73% de los remuestreos. En uno de los árboles (Fig. 19B), *Z. atlanticum* y *H. tursionis* forman un clado en el 53,2% de las veces. En el otro (Fig. 19A), *Z. atlanticum* se unió al trío *C. oblonga*, *O. fraterculus*, *O. mascomai* únicamente en el 41,8% de los remuestreos. *H. tursionis* apareció en el 99,9% de las veces como el campúlido de posición más externa. Cuando se analizó la secuencia completa (tRNA+NADH3), se obtuvieron dos topologías idénticas a las anteriores, disminuyendo ligeramente la significación del nodo que unió *C. oblonga* al par *O. fraterculus*, *O. mascomai* (Fig. 20A y B).

Considerando sólo las transversiones en la secuencia codificante NADH3, se obtuvo un árbol máximo parsimónico con 157 pasos (Fig. 21), que resultó idéntico a los obtenidos considerando Ts+Tv, tanto con la secuencia codificante como con el tRNA+NADH3 (Figs. 19A y 20A, respectivamente). En esta topología, todos los nodos resultaron altamente significativos. Al analizar la secuencia de tRNA+NADH3 se obtuvieron resultados similares (Fig. 22), con un árbol máximo parsimónico de 172 pasos mutacionales.

#### b.1.3) Resultados del Test de Templeton

Los resultados de aplicar el test de Templeton, no mostrados, indicaron que la mayoría de los árboles no significativamente distintos del más parsimónico apoyaban las relaciones que aparecieron entre las diferentes especies en este árbol más parsimónico. No obstante, en otros árboles fueron posibles otras combinaciones, lo cual corroboró los valores bajos de remuestreo.

Filogenia molecular de Campulidae

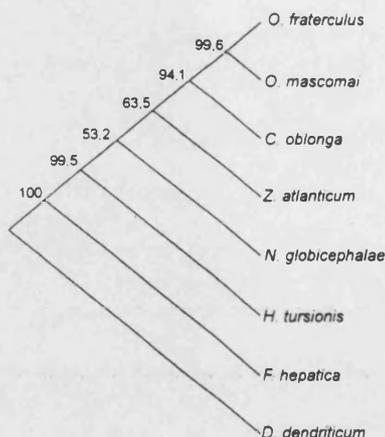


Fig. 17

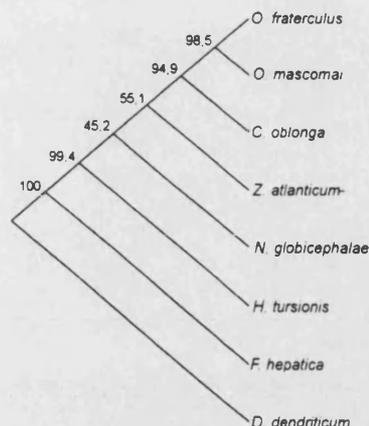


Fig. 18

Figuras 17 y 18. Árboles filogenéticos para el G1, con la secuencia codificante NADH3 (Fig. 17) y con la secuencia del tRNA+NADH3 (Fig. 18) obtenidos por parsimonia, considerando solamente las transversiones. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que la agrupación aparece al realizar el análisis de remuestreo por "bootstrap". Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figures 17 and 18. Phylogenetic trees for the G1, obtained by parsimony using the coding sequence of the NADH3 gene (Fig. 17) and the tRNA+NADH3 (Fig. 18), by considering only transversions. Numbers indicate the percentage of replications where the agrupation appears in the bootstrap. See species names in Table 10.

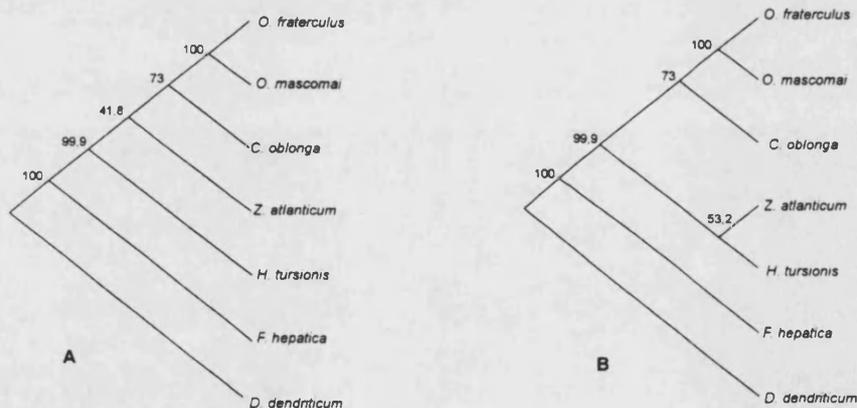


Figura 19 (A) y (B). Árboles filogenéticos equiparsimónicos para el G2 con la secuencia codificante NADH3, considerando las transiciones y transversiones a la vez. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que la agrupación aparece al realizar el análisis de remuestreo por "bootstrap". Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figure 19 (A) and (B). Equiparsimonous phylogenetic trees for the group 2 (G1) using the coding sequence of the NADH3 gene, considering transitions and transversions. Numbers indicate the percentage of replications where the agrupation appears in the bootstrap. See species names in Table 10.



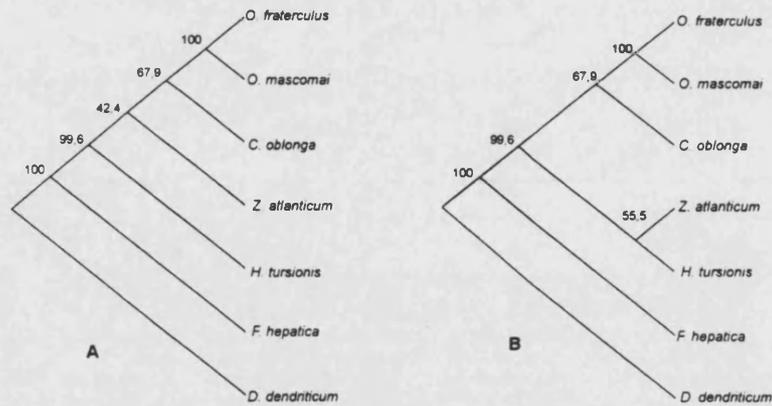


Figura 20 (A) y (B). Árboles filogenéticos equiparsimónicos para el grupo 2 (G2) con la secuencia del tRNA+NADH3, considerando las transiciones y transversiones a la vez. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que la agrupación aparece al realizar el análisis de remuestreo por "bootstrap". Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figure 20 (A) and (B). Equiparsimonic phylogenetic trees for group 2 (G2) using the sequence of the tRNA+NADH3, by considering transitions and transversions. Numbers indicate the percentage of replications where the agrupation appears in the bootstrap. See species names in Table 10.

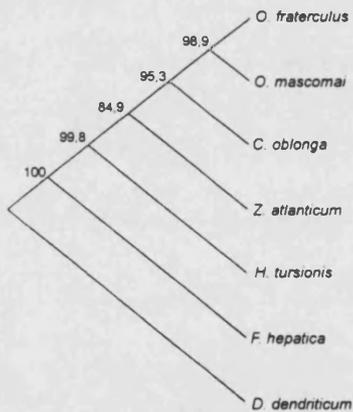


Fig. 21

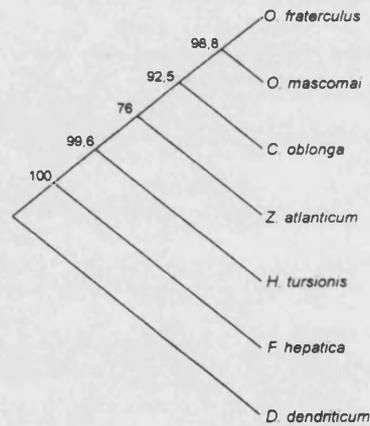


Fig. 22

Figuras 21 y 22. Árboles filogenéticos para el G2 obtenidos por parsimonia con la secuencia codificante NADH3 (Fig. 21) y con la secuencia del tRNA+NADH3 (Fig. 22), considerando sólo las transversiones. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en las que la agrupación aparece al realizar el análisis de remuestreo por "bootstrap". Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figures 21 and 22. Phylogenetic trees for the G2 obtained by parsimony using the coding sequence of the NADH3 gene (Fig. 21) and the sequence of the tRNA+NADH3 (Fig. 22), by considering only transversions. Numbers indicate the percentage of replications where the agrupation appears in the bootstrap. See species names in Table 10.

**b.1.4) Resultados globales obtenidos por el método de Parsimonia**

I. En todas las topologías, la relación entre el par *O. mascomai* y *O. fraterculus* se vió apoyada entre el 98,5 y el 100% de los remuestreos.

II. La mayoría de los árboles obtenidos por este método mostraron una asociación entre las especies *Z. atlanticum* y *H. tursionis*, siendo las proporciones de remuestreo poco significativas (Figs. 15A y B, 16, 19B y 20B). Cuando se tuvieron en cuenta las transversiones, este clado desapareció, tanto en el G1 como en el G2 y con ambos tipos de secuencia (Figs. 17, 18, 21 y 22). Lo mismo sucedió con una de las dos topologías obtenidas con la secuencia codificante y la del tRNA+NADH3 en el G2, considerando Ts+Tv (Figs. 19A y 20A). En todas estas topologías, la unión de *H. tursionis* al resto de campúlidos estuvo refrendada en el 100% de los casos. Sin embargo, la de *Z. atlanticum* con respecto al resto de especies no fue significativa, salvo al considerar las transversiones en el G2, con ambos tipos de secuencia.

III. En todas las topologías obtenidas con G1, la relación de la especie *N. globicephalae* con las demás no quedó definida, además de estar apoyada, en todas ellas, por unas proporciones de bootstrap muy bajas.

IV. En gran parte de las topologías, se vió apoyado el trío formado por *C. oblonga*, *O. mascomai* y *O. fraterculus* (Figs. 15B, 17, 18, 19A y B, 20A y B, 21 y 22). Cuando consideramos las Tv, esta relación estuvo refrendada significativamente (Figs. 17, 18, 21 y 22). También lo estuvo al considerar Ts+Tv con la secuencia codificante del G2 (Figs. 19A y 19B) y cerca del límite de significatividad en este mismo caso, pero con la secuencia del tRNA+NADH3 (Figs. 20A y 20B).

V. Parece ser que cuando consideramos sólo las transversiones y excluyendo a *N. globicephalae*, se obtuvo una mayor fiabilidad de las ramas que cuando tenemos en cuenta las Ts+Tv.

**b.2) Máxima verosimilitud**

Se realizaron los análisis teniendo en cuenta la secuencia codificante, NADH3, y la secuencia completa, tRNA+NADH3.

b.2.1) Resultados con el grupo 1 (G1)

La máxima verosimilitud se obtuvo con las siguientes frecuencias nucleotídicas en la secuencia codificante: A 13,5%, C 9,1%, G 27,4%, T 50%, y una razón de Ts/Tv de 1,2.

En la topología máximo verosímil, el par *O. mascomai* y *O. fraterculus* formaron un clado, al cual se unió *N. globicephalae*. A las tres especies anteriores se unió *C. oblonga* y a estas cuatro, *Z. atlanticum*. *H. tursionis* apareció como la especie de campúlido más externa (Fig. 23).

Cuando aplicamos este método a toda la secuencia (tRNA+NADH3), el árbol máximo verosímil se obtuvo con las siguientes proporciones de nucleótidos: A 14,7%, C 10,1%, G 26,8%, T 48,4%, y una razón de Ts/Tv de 1,3.

Esta topología fue similar a la obtenida con la secuencia codificante, pero con las posiciones de *N. globicephalae* y *C. oblonga* invertidas. Es decir, en este caso, *C. oblonga* se unió al par *O. mascomai*-*O. fraterculus* y *N. globicephalae* a este trío (Fig. 24).

Al tener en cuenta sólo las transversiones (Ts/Tv = 0) por un lado y, por otro, una tasa de Ts/Tv = 4, en la secuencia codificante, resultó la misma topología (Figs. 25 y 26). La diferencia principal con la topología que se obtuvo considerando Ts+Tv (Fig. 23) estribó en la ubicación de *N. globicephalae*. En las Figs. 25 y 26, el par *O. mascomai* y *O. fraterculus* formó una tríada con *C. oblonga*. La especie *Z. atlanticum* apareció unida a este grupo y *N. globicephalae* a este cuarteto. *H. tursionis* volvió a constituir la base del árbol (sin tener en cuenta las especies de referencia externa, *F. hepatica* y *D. dendriticum*). Se obtuvo este mismo resultado con la secuencia completa del tRNA+NADH3 (árboles no mostrados).

## Filogenia molecular de Campulidae

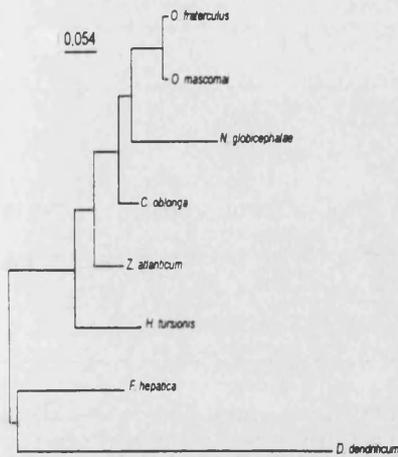


Fig. 23

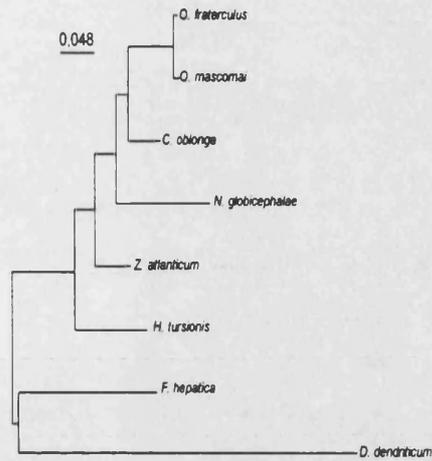


Fig. 24

Figuras 23 y 24. Árboles máximo verosimiles para el G1 con la secuencia codificante NADH3, con una tasa de  $Ts/Tv = 1,2$  (Fig. 23), y con la secuencia del tRNA+NADH3, con una tasa de  $Ts/Tv = 1,3$  (Fig. 24). Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figures 23 and 24. Maximum likelihood trees for the G1 using the coding sequence of the NADH3 gene, with a rate  $Ts/Tv = 1,2$  (Fig. 23), and the sequence of the tRNA+NADH3, with a rate of  $Ts/Tv = 1,3$  (Fig. 24). See species names in Table 10.

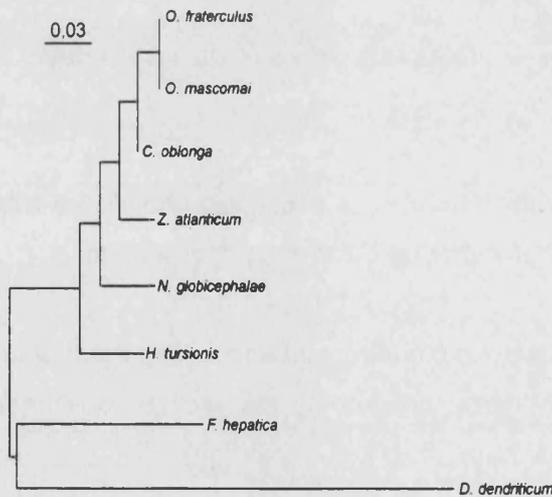


Fig. 25

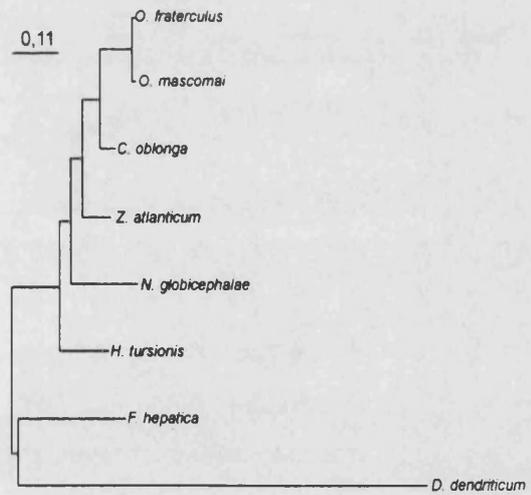


Fig. 26

Figuras 25 y 26. Árboles máximo verosimiles para el G1 con la secuencia codificante NADH3, con una tasa de  $Ts/Tv = 0$  (Fig. 25) y  $Ts/Tv = 4$  (Fig. 26). Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figures 25 and 26. Maximum likelihood trees for the G1 using the coding sequence of the NADH3 gene, with a rate  $Ts/Tv = 0$  (Fig. 25) and  $Ts/Tv = 4$  (Fig. 26). See species names in Table 10.

**b.2.2) Resultados con el grupo 2 (G2)**

Las frecuencias nucleotídicas que dieron lugar al árbol máximo verosímil con la secuencia codificante fueron: A 13,7%, C 8,8%, G 27,6%, T 49,9%, y la razón de Ts/Tv fue de 1,2.

La topología obtenida considerando sólo las transversiones ( $Ts/Tv = 0$ ) y modelos con valores altos de Ts/Tv (árboles no mostrados) resultó igual a la topología máximo verosímil (Fig. 27). Los resultados con la secuencia del tRNA+NADH3 fueron iguales a los obtenidos con la secuencia codificante (árboles no mostrados). En dicha topología, *O. fraterculus* y *O. mascomai* constituyeron un clado, uniéndose a *C. oblonga*. Este trío apareció junto a *Z. atlanticum*. *H. tursionis* apareció de nuevo como el campúlido de posición más externa (véase Fig. 27).

**b.2.3) Resultados globales con el método de Máxima Verosimilitud**

- I. Los campúlidos *O. mascomai* y *O. fraterculus* aparecieron en todas las topologías formando un clado.
- II. Excepto cuando consideramos las Ts+Tv en la secuencia codificante NADH3 (Fig. 23), en el resto de casos, *C. oblonga* formó un clado con el par anterior.
- III. La posición de *N. globicephalae* no quedó perfectamente delimitada como lo indican las diferentes posiciones que adquirió en los árboles que resultaron al proponer distintos modelos evolutivos.
- IV. *H. tursionis* apareció en todas las topologías como el campúlido de posición más externa con respecto al resto de miembros de la familia.
- V. El árbol que apareció al suponer un modelo en donde las transiciones superaban a las transversiones ( $Ts/Tv \geq 4$ ) fue idéntico al que resultó al considerar sólo las transversiones ( $Ts/Tv = 0$ ).

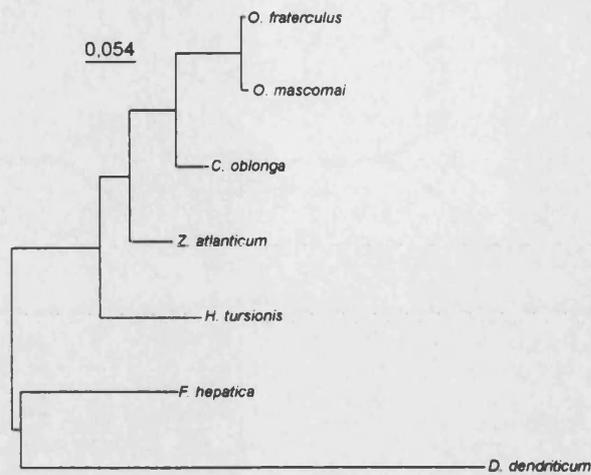


Figura 27. Árbol máximo verosímil para el G2 con la secuencia codificante NADH3, con una tasa de Ts/Tv= 1,2. Véanse los nombres de las especies en la Tabla 10.

Figure 27. Maximum likelihood tree for the G2 using the coding sequence NADH3, with a rate Ts/Tv= 1,2. See species names in Table 10.

### b.3) Método de los invariantes de Lake

Puesto que la posición de la especie *N. globicephalae* con respecto a los campúlidos no quedó perfectamente definida con ninguno de los métodos anteriores, se aplicó el de los invariantes de Lake. Para ello se formaron todos los cuartetos posibles que incluyeran la especie *N. globicephalae*. Solamente una topología, con la secuencia del tRNA+NADH3, fue considerada correcta por este método (Fig. 28C), de forma que la diferencia entre ambos tipos de transversiones (véase material y métodos de esta sección) fue significativamente distinta de cero. En dicha topología, *H. tursionis* forma un clado con *D. dendriticum* y *Z. atlanticum* con *N. globicephalae* (Fig. 28C). De estas relaciones podría concluirse que *H. tursionis* aparece en una posición más basal que el resto de especies y que *N. globicephalae* parece estar más cercana a *Z. atlanticum*. Algunos de los métodos también relacionaban *Z. atlanticum* y *H. tursionis*, clado que no apoyó el método de los invariantes cuando se ensayaron todos los cuartetos que incluían estas dos especies.

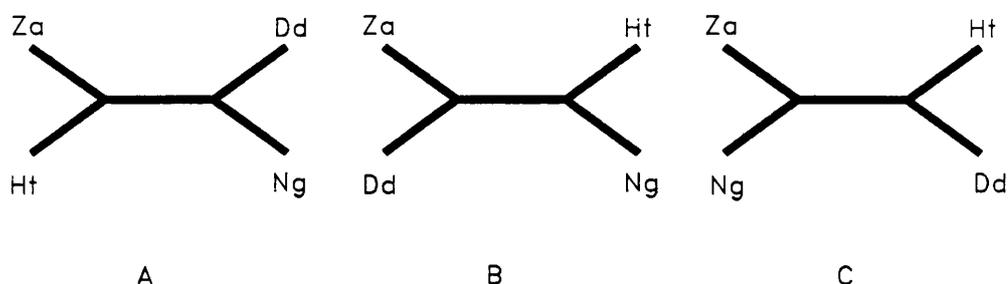


Figura 28. Tres posibles topologías sin raíz con las especies *Z. atlanticum*, *H. tursionis*, *N. globicephalae* y *D. dendriticum*. La topología C es considerada correcta según el método de los invariantes de Lake.

Figure 28. Three possible unrooted trees with the species *Z. atlanticum*, *H. tursionis*, *N. globicephalae* and *D. dendriticum*. Topology C is considered valid by the Lake's invariants methods.

### c) Resultados globales según los cuatro métodos aplicados

Como se ha podido observar, no todos los métodos empleados en este trabajo dieron lugar a una topología común, presentándose ciertas relaciones que no pudieron ser explicadas claramente. Sin embargo, la mayoría de ellos parecen sugerir una relación entre *C. oblonga* y el par *O. fraterculus*-*O. mascomai*. En algunos casos, *Z. atlanticum* apareció agrupada con el trío anterior y en otros casos con *H. tursionis*. Esta última apareció en todos los árboles como la especie más externa. Otro hecho que podemos destacar es que las relaciones entre las diferentes especies fueron más conflictivas cuando se incluyó en los análisis a *N. globicephalae*.

Dado que se observó cierto grado de saturación transicional (Fig. 12), se consideraron las filogenias obtenidas al tener en cuenta sólo las transversiones y cuya fiabilidad vino refrendada por valores de bootstrap superiores al 70%. La topología del árbol consenso que fue empleado en el presente trabajo se muestra en la Fig. 29.

### Filogenia molecular de Campulidae

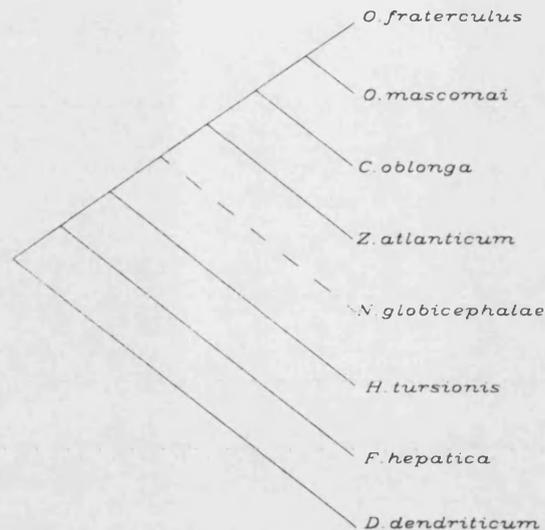


Figura 29. Filogenia molecular consenso de la familia Campulidae obtenida en el presente estudio. *D. dendriticum*: *Dicrocoelium dendriticum*, *F. hepatica*: *Fasciola hepatica*, *H. tursionis*: *Hadwenius tursionis*, *N. globicephalae*: *Nasitrema globicephalae*, *Z. atlanticum*: *Zalophotrema atlanticum*, *C. oblonga*: *Campula oblonga*, *O. mascomai*: *Oschmarinella mascomai*, *O. fraterculus*: *Orthosplanchnus fraterculus*. *F. hepatica* y *D. dendriticum* son las especies de referencia externa o "outgroups". La línea discontinua indica la posición inestable de *Nasitrema globicephalae*.

Figure 29. Consense molecular phylogeny of the family Campulidae obtained in this study. Discontinuous line indicates the unstable position of *Nasitrema globicephalae* in all the phylogenetic analyses.

#### 3.3.(6). Filogenia molecular versus taxonomía tradicional de la familia Campulidae

Sólo dos subfamilias están representadas en esta filogenia, Campulinae y Orthosplanchninae, observándose cierta incongruencia en lo que respecta a la taxonomía tradicional. La subfamilia Orthosplanchninae está compuesta por los géneros *Hadwenius*, *Orthosplanchnus* y *Oschmarinella*. Sin embargo, en la topología del árbol consenso (Fig. 29), los dos últimos géneros forman un clado, pero *Hadwenius* se presenta como la especie más basal, no compartiendo un ancestro común con los otros géneros. En el caso de los dos géneros representantes de la subfamilia Campulinae, *Campula* y *Zalophotrema*, tampoco comparten un ancestro común, formando una agrupación parafilética.

Por otra parte, puesto que ningún método establece claramente la posición de *N. globicephalae* respecto a los campúlidos, en la filogenia molecular consenso (Fig. 29) se ha representado con línea discontinua su situación en el árbol. Sin embargo, lo que sí que queda fuera de dudas es que, independientemente del método de

inferencia filogenética empleado, esta especie aparece incluida dentro de los campúlidos.

### 3.4. DISCUSIÓN

#### 3.4.1. Composición nucleotídica

En las especies estudiadas en el presente trabajo se observó un alto porcentaje de timina (T) y guanina (G), tanto globalmente como en la tercera posición del codón en la secuencia codificante (Tablas 10 y 11). Este sesgo composicional se ha observado en otros organismos, como *Ascaris suum*, en cuyos genes mitocondriales se detectó una alta frecuencia de codones terminados en G o T (Wolstenholme et al., 1987). Sin embargo, no se conocen con exactitud, las razones que motivan la aparición de estos sesgos en la composición nucleotídica (Simon, 1991). En los tRNAs del mtDNA de *Fasciola hepatica*, Garey y Wolstenholme (1989) observaron, igualmente, un elevado contenido de pares G·T. Este hecho parece estar justificado por la existencia de energía negativa libre asociada a los pares G·U en la estructura secundaria del RNA (Freier et al., 1987), lo cual contribuye a la estabilidad de la molécula. En el caso de los genes mitocondriales de esta misma especie, se observó que la frecuencia de codones terminados en G y T era muy elevada (88,6%) (Garey y Wolstenholme, 1989).

#### 3.4.2. Saturación

Como se observó en la Fig. 12, el porcentaje de transiciones disminuye al aumentar la divergencia nucleotídica entre los pares de especies estudiadas en este trabajo. Como ya se comentó, entre especies menos divergentes, el número de transiciones es mayor que el de transversiones (Brown et al., 1982; DeSalle et al., 1987). Sin embargo, dos especies que han divergido hace mucho tiempo, presentarán mayor número de transversiones. Según se tengan en cuenta ambos tipos de sustitución o se les dé más peso a las transversiones, la inferencia de la filogenia puede no ser la misma. Este fenómeno de saturación se reflejó igualmente en el método de Máxima Verosimilitud, cuando se obtuvo la misma topología al suponer una tasa transiciones/transversiones  $\geq 4$  y una tasa de transiciones/transversiones = 0. En el primer caso estamos suponiendo que las transiciones ocurren con una frecuencia

cuatro o más veces superior a las transversiones, lo que implica una fuerte saturación de las transiciones. En el segundo caso, se está suponiendo que sólo ocurren transversiones, lo cual podría indicar que las transiciones están enmascaradas por las transversiones, debido a la saturación.

### **3.4.3. Filogenia molecular y taxonómica**

#### **I. Apreciaciones generales**

Hasta hace poco tiempo, la morfología y la paleontología eran las únicas herramientas disponibles que proporcionaban la información necesaria para inferir filogenias. Con el advenimiento del cladismo, el papel de la paleontología en las reconstrucciones filogenéticas se vió amenazado, mientras que la morfología se ha visto eclipsada por el desarrollo espectacular de las técnicas moleculares (Smith y Littlewood, 1994). La controversia surgió cuando se planteó qué tipo de información reconstruía filogenias más fiables, las procedentes de datos moleculares o las provenientes de los estudios taxonómicos basados en la morfología (Avice, 1994). No obstante, la integración de filogenias morfológicas con datos paleontológicos permitirían una correcta evaluación de los métodos y supuestos bajo los que se establecen los análisis filogenéticos moleculares (Smith y Littlewood, 1994). Según Hillis y Dixon (1989): "un acercamiento entre moléculas y morfología no es sólo deseable, sino necesario para tener una visión de conjunto de la filogenia". Los datos moleculares han contribuído más significativamente en áreas en donde los datos morfológicos son deficientes o no se conoce registro fósil (Patterson et al., 1993; Smith y Littlewood, 1994). Hay casos en los que ni los datos morfológicos ni los moleculares pueden, por el momento, resolver los problemas de inferencia de parentesco entre taxones.

#### **II. Morfología**

Un problema muy importante que plantea el uso de caracteres morfológicos para la reconstrucción de filogenias es que se trabaja con taxones previamente definidos en base a caracteres taxonómicos. Si estos caracteres no han sido elegidos correctamente, la filogenia resultante será errónea (De Renzi, 1986). La elección de unos u otros caracteres morfológicos a la hora de realizar la diagnosis de los taxones

parece estar sujeta a un cierto grado de subjetividad, puesto que los mismos caracteres pueden ser válidos para agrupar o separar determinados taxones, dependiendo del investigador. En la introducción histórica sobre la taxonomía de la familia Campulidae se sugirió el carácter fuertemente arbitrario de las diversas ordenaciones que de este grupo han surgido a lo largo del tiempo. Parte de esta arbitrariedad es fruto del desconocimiento de muchos caracteres (morfológicos - sólo se conoce el estado adulto, ecológicos -por ejemplo, no se conoce el ciclo vital, etológicos, etc.), debido a las obvias dificultades de estudio. No obstante, pese a que prácticamente sólo se dispone de la morfología del adulto (y a veces ni siquiera en buenas condiciones), es probable que haya habido una aproximación taxonómica excesivamente nominalista. El análisis construccional de un organismo (Seilacher, 1970) es un paso previo necesario para poder reconocer caracteres de interés taxonómico (De Renzi, 1982, 1986). De este modo, podría identificarse qué caracteres tienen importancia filogenética, y cuáles son producto de adaptaciones o del crecimiento y la construcción del organismo. Dentro de la general escasez de estudios sobre morfología construccional en trematodos, sólo conocemos un único trabajo sobre una especie de Campulidae en el que se hayan tratado aspectos de este tipo (Fernández et al., 1995). La falta de este tipo de aproximaciones origina frecuentemente razonamientos circulares del tipo: el carácter X implica la pertenencia al taxón Y, por lo que pertenecer a Y equivale a poseer el carácter X. En definitiva, esto significa que se deja a criterio del investigador el crear taxones a partir de ciertos caracteres asumidos subjetivamente como importantes, lo que claramente ha ocurrido en la familia Campulidae. Fernández et al. (1995) demostraron que muchos de los caracteres usualmente utilizados en la taxonomía de los campúlidos exhibían rangos de variación muy grandes incluso dentro de una misma especie recolectada en la misma especie hospedadora y la misma localidad geográfica; otras veces parte de la diagnosis podía basarse en premisas simplemente inválidas, como utilizar ratios entre variables que exhibían relaciones alométricas.

Una filogenia robusta, establecida sobre bases sólidas será aquella elaborada con caracteres taxonómicos exhaustivamente evaluados, tanto desde el punto de vista de la morfología construccional como de la alometría. De esta forma, se está evitando la elección de homoplasias y de rasgos sin valor taxonómico como caracteres que reflejan parentesco. Los estudios taxonómicos tradicionales no suelen proceder así y el caso de la familia Campulidae no es una excepción. Por lo tanto, la falta de estudios

sobre la validez de los caracteres empleados en la taxonomía de la familia Campulidae, plantea la posibilidad de emplear otro tipo de metodologías alternativas, en las que no se planteen los problemas antes mencionados.

### III. Moléculas

Las secuencias moleculares proporcionan potencialmente una gran cantidad de información filogenética pero, al igual que las filogenias morfológicas, las moleculares también están sujetas a los problemas de homoplasia. Ello es debido a que la sustitución nucleotídica está limitada a cuatro posibles estados alternativos, y este problema se ve incrementado cuando la probabilidad de fijación de una mutación no está distribuida al azar. Varios son los factores que pueden dificultar la obtención de una topología correcta con datos moleculares mediante parsimonia (Larson et al., 1992): 1) saturación de los sitios variables, 2) cantidad de cambio significativamente distinta a lo largo de diferentes ramas, 3) desviación en la composición de bases en las diferentes ramas.

Según Wiley (1981), los datos procedentes del manejo del DNA, han de ser analizados con cautela y mediante métodos que sean bastante robustos ante los problemas de homoplasia. La parsimonia, que permite tasas de cambio desiguales, asume que la homoplasia ocurre a unos niveles que no interfieren con la inferencia filogenética (Hillis et al., 1993). Cuando más de un taxón está conectado al árbol por una rama excesivamente larga y las tasas de mutación son elevadas, es esperable que se obtenga un árbol parsimónico erróneo conforme añadimos más datos. Sin embargo, la inconsistencia bajo estas condiciones es una propiedad de muchos métodos de reconstrucción de árboles. El exceso de homoplasia puede ser evitado asignando mayor peso a zonas conservativas (como los dominios funcionales de las proteínas) o a los cambios nucleotídicos que se producen a una velocidad menor, es decir, las transversiones (Hillis et al., 1993). Según Smith y Littlewood (1994), conforme se añaden más taxones al estudio de una filogenia molecular, mayor es la posibilidad de identificar las homoplasias. En el presente trabajo, como ya se vió en el apartado correspondiente, en todos los métodos empleados se ponderó de distinta forma las transversiones y las transiciones, de forma que se intentó minimizar la presencia de homoplasias.

A diferencia de las filogenias morfológicas, los taxones empleados en la filogenia molecular no están caracterizados previamente por rasgos taxonómicos, sino por datos de secuencia de DNA. En esta situación, no haría falta un análisis inicial de los caracteres para saber si son informativos filogenéticamente o no, puesto que no están modelados por factores en el mismo sentido que los caracteres morfológicos. El análisis habría que hacerlo a la hora de elegir el gen que se quiere estudiar para saber si es el adecuado para los objetivos propuestos.

#### **IV. Incongruencia entre moléculas y morfología**

Un problema que surge al estudiar la filogenia de determinados grupos es la falta de acuerdo entre los resultados obtenidos con datos moleculares y los procedentes de datos morfológicos. Patterson et al. (1993) propusieron varios factores que explicarían las razones que dan a lugar a esta incongruencia:

1. En primer lugar, el muestreo es más problemático cuando se trata de obtener datos moleculares. El investigador está obligado a utilizar muestras limitadas, de forma que el empleo de una o dos especies como representantes de un gran taxón puede originar una interpretación falsa de los resultados. Por contra, los taxónomos tradicionales basan sus estudios en una gran cantidad de especies.

Por otra parte, hay que tener en cuenta los posibles errores humanos en el muestreo, adquisición o en la valoración de los datos.

2. Otros factores que pueden originar la falta de acuerdo entre las filogenias moleculares y morfológicas se relacionan con la obtención de árboles a partir de los datos. No es extraño que distintos métodos proporcionen diferentes resultados, por lo que es necesario moldear los datos, lo cual incrementa la posibilidad de que los resultados no reflejen la realidad.

3. Otro problema muy importante, comentado con anterioridad, es la homoplasia. Varios autores consideran que los datos moleculares no son la panacea para resolver las relaciones entre grupos complicados, puesto que los problemas de homoplasia se presentan tanto en los datos moleculares como en los morfológicos (Wiley, 1981; Patterson et al., 1993).

4. El último factor que citan Patterson et al. (1993) es el problema de la evaluación de las homologías. Diferentes interpretaciones de las homologías en un conjunto de datos puede dar lugar a árboles distintos para los mismos taxones.

Recordando las palabras de Hillis y Dixon (1989) es necesaria la integración de la información proporcionada por morfología y por las moléculas. En nuestro caso, ante la inexistencia de estudios que prueben la validez de los caracteres morfológicos empleados en la taxonomía de la familia Campulidae, y la aplicación del criterio de autoridad, comentado anteriormente, intentamos enfocar el estudio de las relaciones filogenéticas entre los miembros de la familia Campulidae desde el punto de vista molecular.

#### **V. Establecimiento de taxones en la familia Campulidae**

Salvador et al. (1996) realizaron un estudio sobre la taxonomía de la familia Campulidae, empleando un análisis morfométrico multivariante. Los resultados de dicho trabajo coinciden parcialmente con lo establecido por la taxonomía tradicional. La separación de las subfamilias se basó en los siguientes caracteres: extensión de las glándulas vitelógenas, la relación entre la anchura y la longitud corporal, y la anchura de la ventosa oral. Sin embargo, según estos autores, los límites entre algunas de las subfamilias, concretamente Campulinae y Orthosplanchninae, no pueden establecerse de forma definitiva sólo a partir de las variables morfométricas. Este trabajo es novedoso en el sentido de que emplea un análisis estadístico que permite el uso de gran número de caracteres a la vez. Sin embargo, adolece de los problemas comentados anteriormente: no se realizó una evaluación previa sobre la validez de los caracteres morfológicos, que, además, fueron los utilizados normalmente en la taxonomía de los campúlidos. Por tanto, no tenemos la certeza de estar empleando caracteres que reflejen, realmente, las relaciones de parentesco de los taxones en cuestión.

En su nivel más básico, la arbitrariedad de la sistemática de Campulidae basada exclusivamente en caracteres morfológicos podría confundir la interpretación de los resultados de la filogenia molecular, puesto que el grado de subjetividad en el establecimiento de los géneros es muy difícil de determinar. Así, por ejemplo, los datos

biogeográficos y sobre especificidad del género *Zalophotrema* podrían cuestionar su estatus como un género independiente (véase apartado 4.4.). Esto significa que en la filogenia molecular podríamos estar comparando especies dentro de un mismo género. Un problema relacionado es que en la filogenia molecular no se han empleado las especies tipo de los géneros en todos los casos, puesto que ello dependía de la disponibilidad del material (parte de éste fue donación de ciertas instituciones; véase la Tabla 5). Esto puede añadir un componente de error adicional, puesto que además de que se puede cuestionar si un género determinado tiene entidad como tal (como el caso de *Zalophotrema*, véase apartado 4.4.), también puede cuestionarse si una especie no-tipo dentro de un género exhibe *realmente* los caracteres que se describieron en la especie tipo. Por ejemplo, aunque pueda asumirse que *Oschmarinella* tiene entidad como género, actualmente no está claro que *O. mascomai* (la especie que fue escogida para representar el género en la filogenia molecular) sea en realidad un *Oschmarinella* (J.A. Raga, com. pers.) (véase apartado 4.4.).

Los resultados obtenidos en el presente estudio no coinciden con lo estructurado por la taxonomía tradicional. La subdivisión de la familia Campulidae en subfamilias, al menos en lo que respecta a Orthosplanchninae y Campulinae, parece ser artificial. Los géneros que constituyen la subfamilia Orthosplanchninae según la taxonomía tradicional, *Hadwenius*, *Orthosplanchnus* y *Oschmarinella*, no forman un grupo monofilético de acuerdo con la filogenia molecular obtenida en este trabajo. Por otro lado, según indican los resultados, la subfamilia Campulinae no tendría tampoco un origen monofilético, lo cual también invalida automáticamente la agrupación de los géneros *Campula* y *Zalophotrema* en una subfamilia.

Por todo ello, consideramos necesaria una revisión exhaustiva de los caracteres empleados en la diagnosis de las subfamilias y de los géneros de campúlidos. Además, la aplicación de metodologías alternativas podrían obviar el problema de la subjetividad a la hora de establecer la taxonomía de un grupo. Las reconstrucciones cladistas pueden resolver de forma más objetiva las relaciones de parentesco entre taxones.

## VI. *Nasitrema globicephalae*: ¿nasitremátido o campúlido?

Como ya se explicó en el capítulo de Taxonomía, el estatus de la familia Nasitrematidae no está perfectamente establecido, habiendo formado parte de los fasciólidos (Ozaki, 1935) y de los campúlidos (Skrjabin, 1970). Actualmente se considera como una familia estrechamente relacionada con estos últimos (Brooks et al., 1985, 1989).

La gran similitud morfológica entre los miembros de las familias Campulidae y Nasitrematidae es evidente, como ya constató Ozaki cuando, en 1935, describió la primera especie del género *Nasitrema*. Sin embargo, ciertas discrepancias en los caracteres morfológicos hicieron que se le incluyera en Fasciolidae, creando la nueva subfamilia Nasitrematinae. Igualmente, Yamaguti (1971), al establecer la diagnosis de la familia Nasitrematidae, comentó que presentaban cierto parecido con la morfología de los adultos de la familia Campulidae. Las diferencias morfológicas fundamentales entre campúlidos y nasitremátidos adultos son la ausencia de la bolsa del cirro y de ciegos intestinales anteriores en los miembros de la familia Nasitrematidae. En ciertos casos, la ausencia o presencia de caracteres no ha sido considerada suficiente, por parte del investigador, para establecer nuevos taxones. Por ejemplo, los campúlidos del género *Hunterotrema* se caracterizan por la ausencia de ciegos anteriores, presentando simplemente a nivel del esófago dos expansiones laterales (McIntosh, 1960; Dailey, 1971). Una de sus especies, *H. macrosoma*, fue descrita, además, sin espinas corporales (Dailey, 1971). Puesto que la diagnosis de los campúlidos a nivel de familia y género incluye la presencia de espinas corporales, este autor propuso que la ausencia de las mismas fuera considerada también un carácter propio de la familia. De esta forma se justificó la inclusión de *H. macrosoma* dentro de los Campulidae. En este caso no se planteó la erección de una nueva familia que incluyese a esta especie, a pesar de la ausencia de espinas corporales y ciegos anteriores.

Al igual que se comentó en el apartado anterior, es necesaria una revisión de los caracteres empleados para diferenciar ambas familias. Es posible que la presencia o ausencia de ciegos anteriores o de la bolsa del cirro en estos digénidos no sean un criterio válido para establecer diferencias a nivel de familia. En futuros trabajos de tipo molecular y taxonómico se intentará definir exactamente la ubicación de *Nasitrema*, incluyendo, además, el único representante de la otra subfamilia de nasitremátidos, *Cetitrema foliiformis*.



## **4. BIOGEOGRAFÍA DE LA FAMILIA CAMPULIDAE**



## 4.1. INTRODUCCIÓN

En el presente apartado hemos tratado de explorar, en la medida de lo posible, los patrones de asociación entre los campúlidos y sus correspondientes hospedadores definitivos desde el punto de vista de la especificidad y la distribución geográfica de los parásitos. A partir de dichos patrones se han planteado hipótesis alternativas de coevolución y colonización, que han sido evaluadas mediante una comparación directa de la congruencia de las filogenias del hospedador y parásito. Para ello, hemos incluido un apartado con las filogenias de los hospedadores.

A continuación, se desarrollarán algunos conceptos básicos necesarios para interpretar los resultados de esta sección.

### 4.1.1. Asociación por descendencia y asociación por colonización

La asociación entre dos especies se produce cuando existe una intensa interacción mutua, como son las relaciones parásito-hospedador, polinizador-planta, herbívoro-planta, etc. (Ronquist y Nylin, 1990).

Estas asociaciones pueden presentar dos tipos de patrones. En primer lugar, una especie parásita puede presentarse en una determinada región geográfica porque se desarrolló allí, o un parásito puede habitar un hospedador determinado porque los ancestros de ambos ya interactuaban en el pasado (Brooks y McLennan, 1993a). En cada caso, las especies han heredado esta asociación, de modo que lo esperable es que ambas presenten una historia filogenética común o que la historia filogenética del parásito será congruente con la historia geológica de la zona. Este tipo de interacción entre los parásitos y la geografía o entre los parásitos y sus hospedadores se denomina asociación por descendencia (Brooks y McLennan, 1991).

En el segundo tipo de patrón, dos o más especies pueden estar asociadas porque al menos una de las especies se originó en otro contexto y, posteriormente, se implicó en la nueva interacción por colonización de un hospedador o dispersión en un área geográfica. Es lo que se conoce como asociación por colonización (Brooks y McLennan, 1991) o "host switching" (literalmente cambio de hospedador, pero que también se conoce como captura de hospedador). Según Holmes y Price (1980), el proceso de captura de hospedador

consiste en la adaptación de un parásito a un nuevo hospedador (pudiendo especiar en el proceso), de forma que es posible que esta relación se convierta, posteriormente, en una asociación por descendencia al coevolucionar con el hospedador. Este fenómeno, según estos autores, ha tenido lugar en el pasado en numerosas ocasiones, reflejándose este hecho en las incongruencias entre las filogenias de los hospedadores y los parásitos. Según Hoberg y Adams (1992), los procesos de captura de hospedador se dan fundamentalmente en faunas delimitadas geográficamente y en hospedadores ecológicamente similares.

La sistemática filogenética ha sido, y sigue siendo, la herramienta empleada para evaluar los mecanismos coevolutivos y ecológico-históricos asociados con la organización y estructuración de la fauna helmíntica entre los hospedadores vertebrados (Brooks y McLennan, 1991; Hoberg y Adams, 1992). Autores como Brooks y Hoberg han desarrollado una gran cantidad de trabajos en este sentido (véase Tabla 2.1 en Brooks y McLennan, 1993a). Generalmente, estos estudios se han basado en sistemas coevolutivos arcaicos, pero también existen asociaciones relativamente recientes y estructuradas por colonización y cuya diversificación ha sido controlada principalmente por procesos ecológico-históricos.

#### **4.1.2. Biogeografía**

Wiley (1981) definió la biogeografía histórica como el estudio de la distribución de los organismos en el espacio a través del tiempo. Se podrían distinguir dos partes en esta disciplina: la biogeografía descriptiva y la interpretativa. La biogeografía descriptiva incluiría todo lo relativo a la documentación de los rangos geográficos de distribución de los taxones, mientras que la interpretativa sintetizaría estos datos en hipótesis y/o predicciones basadas en hipótesis. Dentro de esta última, Wiley (1981) distingue entre la biogeografía histórica y la biogeografía ecológica. La biogeografía histórica es el estudio de las distribuciones espacial y temporal de los organismos (generalmente a nivel de taxones), las cuales son explicadas en base a eventos históricos pasados. La biogeografía ecológica es el estudio de la dispersión de los organismos (generalmente a nivel de individuos o demes) y los mecanismos que mantienen o cambian esta dispersión.

La duración temporal de una asociación podría evaluarse con respecto a la distribución del hospedador y parásito, la biogeografía histórica de los hospedadores, y las características de la historia regional y geografía física (Hoberg y Adams, 1992). Estos

factores son fundamentales para el análisis de la biogeografía y evolución de la asociación parásito-hospedador. La congruencia en el patrón biogeográfico entre grupos de taxones no relacionados, es indicativo de la existencia de una causa primaria que determina la distribución conjunta de estos organismos (Hoberg, 1992). Una hipótesis de coevolución es corroborada por la congruencia entre las filogenias del parásito y el hospedador. Ello significaría que se trata de una asociación prolongada entre el hospedador y el parásito, existiendo un alto grado de coespeciación y coadaptación (Brooks y McLennan, 1991). Por otro lado, la incongruencia entre las filogenias se dará cuando tienen lugar procesos de colonización. Ello sería indicativo de (i) una similitud en la ecología de los hospedadores (normalmente, ello implica el uso de recursos tróficos similares), (ii) faunas geográficamente delimitadas, y (iii) asociaciones de duración temporal variable (Hoberg, 1992).

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Especies morfológicas de la familia Campulidae y sus problemas en un estudio biogeográfico

Las investigaciones sobre la sistemática de los parásitos generalmente son posteriores a los estudios sistemáticos sobre sus hospedadores, por lo que la taxonomía de los parásitos está especialmente sujeta a la influencia acrítica de investigaciones previas de sus hospedadores (Hafner y Nadler, 1990). Ello implica, entre otras cosas, que tendemos a ubicar los parásitos en taxones filogenéticamente más separados cuanto más separación encontramos en sus hospedadores. Este procedimiento puede ser tautológico en muchos casos. Por ejemplo, existe una cierta tendencia inconsciente a erigir nuevas especies de helmintos cuando se analiza material de un género conocido, si aparece en una nueva especie hospedadora. La razón es que si existen diferencias morfométricas con respecto a otras especies conocidas del mismo género, las diferencias tienden a tomarse en este caso como evidencia a favor de una nueva denominación específica; sin embargo, es probable que las mismas diferencias se asuman como parte de la variación intraspecífica de una especie ya conocida si los vermes se hallan en una especie hospedadora donde ya se había citado. Muchos casos de esta aparente "coespeciación" pueden ser producto de este procedimiento circular. Dailey (1975) estimó que esta práctica ha generado una cantidad artificialmente elevada de especies de helmintos en pinnípedos, muchas de las cuales serán probablemente sinonimizadas en el futuro. En el caso de los campúlidos, los datos morfométricos de Fernández et al. (1995) sobre *Hadwenius tursionis* sugieren que la variabilidad morfométrica

en esta especie puede ser mucho mayor de la que ha justificado la creación de nuevas especies dentro de Campulidae.

En definitiva, la situación taxonómica actual de la familia Campulidae exigió una decisión previa a cualquier análisis y discusión, y era la de aceptar como válidas todas las especies descritas y revisadas en los trabajos taxonómicos más recientes, así como reconocer que las identificaciones en los trabajos faunísticos eran correctas, fuesen o no discutidas e ilustradas. Asumiendo que todos los grupos se han examinado por una gran variedad de autores, creemos que no hemos introducido un sesgo direccional en nuestros análisis. En cualquier caso, todas las determinaciones estuvieron sujetas a revisión en la medida en que planteaban dudas razonables de identificación en el contexto de hipótesis históricas y/o filogenéticas concretas. En este sentido, las hipótesis se construyeron con toda la información disponible, intentando obtener las explicaciones más parsimoniosas posible. En cualquier explicación histórica, es lo máximo a lo que podemos aspirar (Brooks y McLennan, 1991).

#### **4.2.2. Rangos geográficos y de hospedadores de los campúlidos**

En este momento es imposible un análisis histórico detallado de las asociaciones entre campúlidos y sus hospedadores debido a la gran escasez de datos. Esto no es necesariamente un óbice para generar hipótesis sobre el origen y diversificación de Campulidae en líneas generales (véase, por ejemplo, el caso de los Spirorchidae en Platt, 1992).

Un problema importante en los registros biogeográficos es la asimetría lógica que existe entre los datos de presencia y los de ausencia. Un dato sobre presencia de un parásito en una especie hospedadora dentro de un área dada es incontrovertible, a menos que se dude de la identidad del parásito. Por el contrario, un dato sobre ausencia siempre puede estar sujeto a revisión, si se efectúan posteriores muestreos en subáreas diferentes, en diferentes épocas del año, en diferentes grupos de edad de los hospedadores, etc., que podrían dar resultados positivos. En este trabajo fuimos conscientes de dicha asimetría, otorgando, obviamente, mayor peso a los datos de presencia.

Otro problema importante es que los trabajos consultados son muy heterogéneos en cuanto a metodología, y no en todos se enumeran explícitamente los órganos analizados.

Esto es frecuentemente un reflejo de la asimetría citada arriba, puesto que se tiende a citar el órgano donde sí se han encontrado parásitos, pero no aquéllos con resultados negativos. En el Apéndice aparecen las referencias en las que se tuvo confianza suficiente de que los análisis habían sido completos. Sin embargo, existe mucha información dispersa adicional de especies que puede proporcionar evidencia importante para determinadas hipótesis. En este sentido, es necesario discutir el valor que otorgaremos a este tipo de información. Cuando los primeros análisis de ciertas especies hospedadoras son antiguos (en periodos donde las prospecciones parasitológicas eran muy generales, dada la filosofía descriptiva del momento) suele ser habitual que esta información se presente de forma secuencial a lo largo de años, o incluso décadas, máxime se si describen nuevas especies. En último término, el conjunto de publicaciones sobre los parásitos de la especie hospedadora x es muy probable que se refiera a todos los parásitos encontrados, y cabe inferir que si no se han descrito campúlidos, es que se analizaron los órganos adecuados y no se encontraron. Este criterio es muy relativo, y puede estar sujeto a diversos errores que evaluaremos convenientemente cuando proceda. En general, la confianza en este tipo de datos es mucho más pequeña -pero no despreciable- que la de la fuente base del Apéndice.

Por tanto, tras la revisión bibliográfica de las publicaciones disponibles en el Departamento de Biología Animal de la Universidad de Valencia, se seleccionaron los siguientes artículos: (i) aquéllos en los que se indicó expresamente el análisis de todas las vísceras, independientemente de que aparecieran o no campúlidos, en cetáceos, pinnípedos y la nutria marina, *Enhydra lutris*; (ii) aquéllos en los que no se indicó si se revisaron todos los órganos, pero consideramos que así había sido, puesto que se recolectaron otras especies de helmintos en diferentes órganos; (iii) aquéllos en los que se citó la presencia sólo de campúlidos, como revisiones a partir de material original, descripción de especies nuevas, etc.; (iv) sólo se utilizó la información de listados de especies de campúlidos en los casos en los que no fue posible obtener la fuente original.

Además de la presencia o ausencia de campúlidos en mamíferos marinos, se anotó el hábitat del parásito (site o location, según Margolis et al., 1982), los parámetros de infestación, como la prevalencia, abundancia e intensidad, la región geográfica en donde se encontraron los hospedadores (tanto si albergaban o no campúlidos) y ciertos aspectos de la biología y hábitat del hospedador.

#### **4.2.3. Filogenia y biogeografía histórica de los hospedadores definitivos**

Las filogenias de los hospedadores se obtuvieron, por una parte, a partir de los estudios osteológicos realizados por de Muizon (1987, 1988, 1991), Barnes (1984, 1985) y Barnes et al. (1985). Por otro lado, también se consideró la filogenia molecular establecida por Milinkovitch et al. (1994, 1995).

Los análisis sobre la biogeografía histórica de pinnípedos (Hoberg, 1992; Hoberg y Adams, 1992) y cetáceos (Gaskin, 1982; Barnes, 1984, 1985; Barnes et al., 1995; Cozzuol, 1992) fueron también empleados a la hora de elaborar hipótesis sobre la asociación entre campúlidos y mamíferos marinos.

#### **4.2.4. Filogenia de cetáceos y pinnípedos**

##### **(I) Filogenia de los cetáceos**

Existen distintas aproximaciones al estudio del origen y evolución de los cetáceos, así como diversas hipótesis sobre sus relaciones filogenéticas. Por un lado, Barnes (1984, 1985), Barnes et al. (1985) y de Muizon (1987, 1988, 1991) han basado sus estudios en caracteres morfológicos del cráneo, tanto de formas fósiles como actuales. Por otro lado, Milinkovitch et al. (1994, 1995) abordaron este tema desde el punto de vista de la evolución molecular.

El orden Cetacea es considerado generalmente como un grupo monofilético formado por los actuales subórdenes Odontoceti (cetáceos con dientes) y Mysticeti (ballenas) (Barnes et al., 1985). El primero incluye a los cachalotes (familias Physeteridae y Kogiidae), ballenatos (Ziphiidae), delfines de río (Platanistidae, Pontoporiidae, Lipotidae e Iniidae), narvales y belugas (Monodontidae), marsopas (Phocoenidae) y delfines (Delphinidae). Los misticetos están formados por tres familias: Balaenidae (ballenas), Balaenopteridae (rorcuales) y Eschrichtiidae (ballena gris). Algunos autores reconocen una cuarta familia, Neobalaenidae, que incluye una sola especie, la ballena enana (*Caperea marginata*).

Según de Muizon (1991), las familias Physeteridae y Kogiidae constituyen la superfamilia Physeteroidea, siendo ésta el grupo hermano de la superfamilia Ziphioidea.

Este autor agrupa a ambas superfamilias en el infraorden Physeterida (Fig. 30). Por contra, Barnes (1984) reconoció estas superfamilias pero sugirió un origen distinto para zífidos y para fisetéridos (Fig. 31).

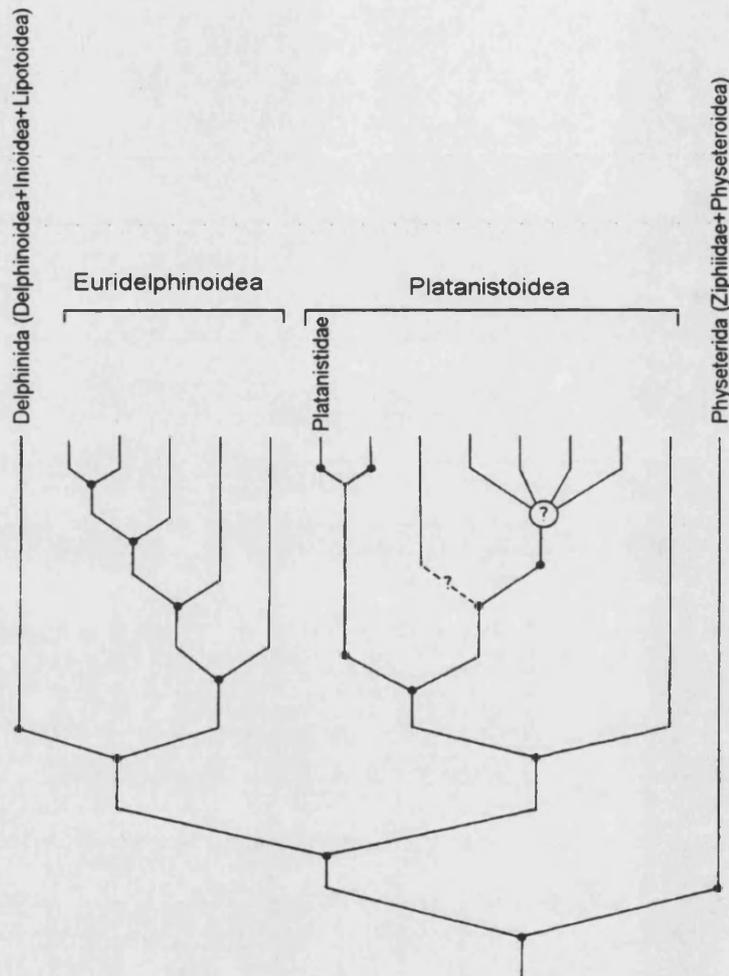


Figura 30. Relaciones entre los grandes grupos de odontocetos, según de Muizon (1991). Los nombres de los fósiles no se han indicado. Los Euridelphinoidea es el grupo hermano de Delphinida, y ambos de Platanistoidea.

Figure 30. Relationships of the major groups of odontocetes, according to de Muizon (1991). Fossil species names are not shown. Euridelphinoidea is the sister-group of infraorder Delphinida, and both of Platanistoidea.

## Filogenia y biogeografía de Campulidae

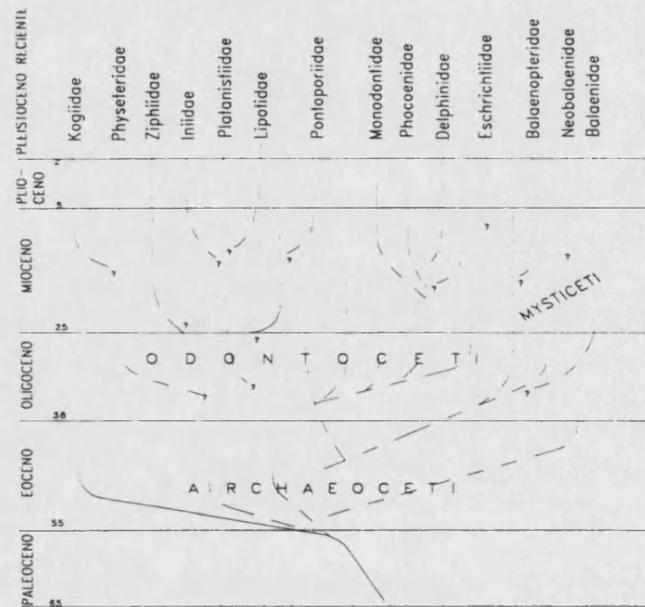


Figura 31. Filogenia de los cetáceos basada en caracteres del cráneo, según Barnes (1984) (modificado de Barnes, 1984). No se incluyen los nombres de las especies fósiles. Los números indican millones de años.

Figure 31. Cetacean phylogeny based on cranial morphology, according to Barnes (1984) (modified from Barnes, 1984). Names of fossils species are not included. Numbers indicate millions of years.

Por otra parte, los estudios moleculares de Milinkovitch et al. (1994) indicaron que: (i) la posición de los Ziphiidae era inestable, y su posición filogenética dependía del análisis empleado, por lo que estos autores han considerado que este aspecto de la filogenia de cetáceos todavía no está resuelto; (ii) las familias Physeteridae y Kogiidae son grupos hermanos, lo cual coincidía plenamente con lo establecido previamente usando datos morfológicos (Barnes et al., 1985); (iii) existe una relación de parentesco entre los fisetéridos y los misticetos, lo cual implica un origen parafilético de los odontocetos. Por contra, Arnason y Gullberg (1994) establecieron la filogenia molecular en la que misticetos y fisetéridos no se consideraban como grupos hermanos. No obstante, una revisión posterior de estos datos (Milinkovitch et al., 1995) corroboraron la conclusión (iii). Los resultados moleculares de Milinkovitch et al. (1995) también apoyaron firmemente el monofiletismo de los misticetos. La familia Balaenidae representaría el grupo basal de los misticetos, siendo las familias Eschrichtiidae y Balaenopteridae grupos hermanos (Fig. 32). Los resultados del trabajo de Klima (1995), basado en la morfogénesis de las fosas nasales de cetáceos, apoya igualmente la relación entre fisetéridos y misticetos y el monofiletismo de los misticetos.

## Biogeografía de Campulidae

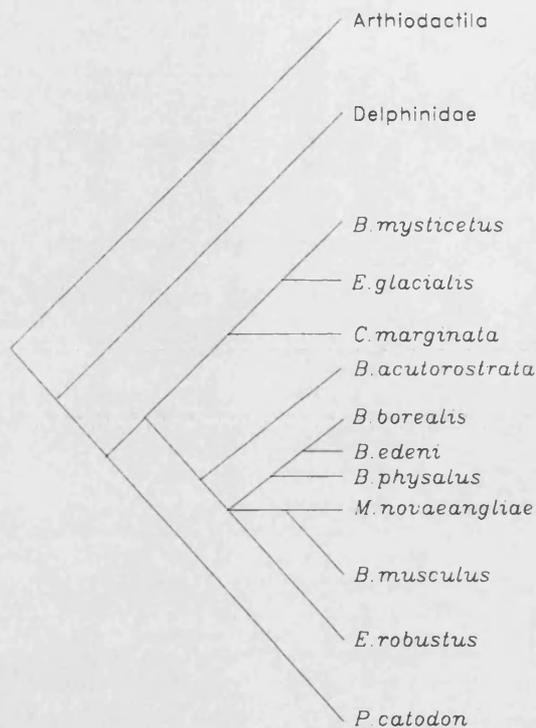


Figura 32. Filogenia molecular de las especies de misticetos *sensu* Milinkovitch et al. (1995). Familia Balaeenidae: *B. mysticetus*, *Balaenoptera mysticetus* y *E. glacialis*, *Eubalaena glacialis*; familia Neobalaenidae: *C. nmarginata*, *Caperea marginata*; familia Balaenopteridae: *B. acutorostrata*, *Balaenoptera acutorostrata*, *B. borealis*, *Balaenoptera borealis*, *B. edeni*, *Balaenoptera edeni*, *B. physalus*, *Balaenoptera physalus*, *M. novaeangliae*, *Megaptera novaeangliae* y *B. musculus*, *Balaenoptera musculus*; familia Eschrichtiidae: *E. robustus*, *Eschrichtius robustus*.

Figure 32. Molecular phylogeny of Mysticeti species, *sensu* Milinkovitch et al. (1995). See above families and species names of whales.

Milinkovitch et al. (1994) propusieron una nueva reordenación del orden Cetacea. La categoría taxonómica de los misticetos debería descender de su rango actual de suborden, dado que los grupos de organismos con el mismo rango taxonómico deben incluir un ancestro y todos sus descendientes. Por tanto, deberían considerarse tres superfamilias: Delphinoidea (formada por las familias Iniidae, Monodontidae, Delphinidae y Phocoenidae), Ziphiioidea y un grupo nuevo que comprendiese a los misticetos y a los fisetéridos. Vemos que estos autores no mencionan al resto de delfines de río, pues emplearon en su análisis la especie *Inia geoffrensis*, la cual incluyen en la superfamilia Platanistoidea (según Barnes et al., 1985, y no de Muizon, 1988).

Las relaciones entre los delfines de río (ínidos, pontopóridos y platanístidos) están asimismo sujetas a diferentes interpretaciones. Por una parte, Barnes et al. (1985) aceptaron la superfamilia Platanistoidea formada por las familias Pontoporiidae, Iniidae, Lipotidae y Platanistidae (Fig. 31). Sin embargo, de Muizon (1987) consideró un origen polifilético para los delfines de río. Este autor incluyó el género *Platanista* en la superfamilia Platanistoidea, mientras que los tres géneros restantes los consideró relacionados con la superfamilia Delphinoidea, integrando así el infraorden Delphinida (de Muizon, 1984) (Fig. 33). Así pues, el infraorden Delphinida estaría conformado por tres superfamilias: Delphinoidea, Inioidea y Lipotoidea. Inioidea contendría las familias Iniidae y Pontoporiidae.

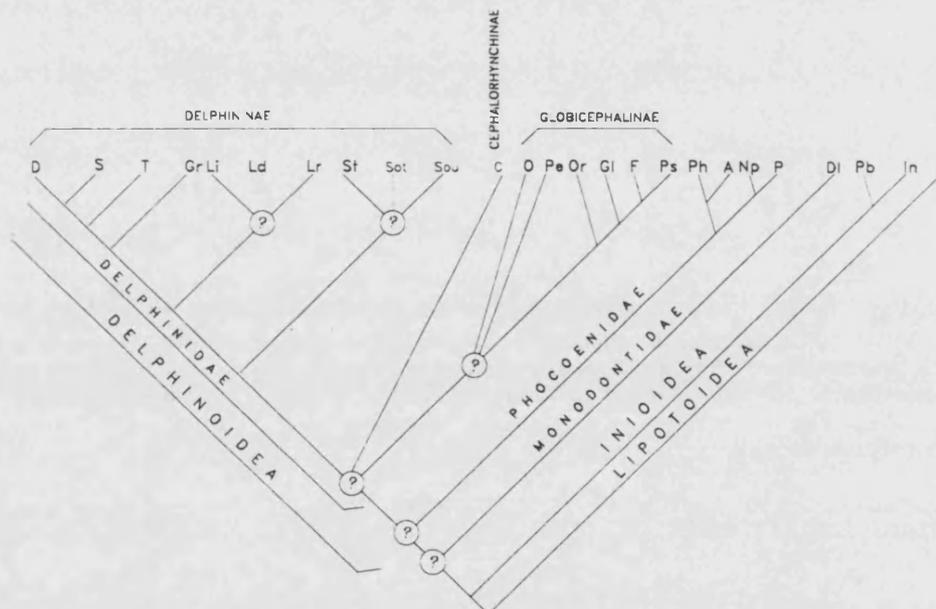


Figura 33. Filogenia del infraorden Delphinida, formada por las superfamilias Delphinoidea (familias Delphinidae, Phocoenidae y Monodontidae), Inioidea y Lipotoidea, basada en caracteres del cráneo (modificado de de Muizon, 1984, 1988). Delphininae, Cephalorhynchinae y Globicephalinae son las tres subfamilias de Delphinidae (de Muizon, 1988). Abreviaturas: A, *Australophocaena*, C, *Cephalorhynchus*, D, *Delphinus*, DI, *Delphinapterus*, F, *Feresa*, Gl, *Globicephala*, Gr, *Grampus*, In, *Inia*, L, *Lipotes*, Ld, *Lagenodelphis*, Li, *Lissodelphis*, Lr, *Lagenorhynchus*, Np, *Neophocaena*, O, *Orcaella*, Or, *Orcinus*, P, *Phocaena*, Pb, *Pontoporia*, Pe, *Peponocephala*, Ph, *Phocoenoides*, Ps, *Pseudorca*, S, *Stenella*, Sot, *Sotalia*, Sou, *Sousa*, St, *Steno*, T, *Tursiops*.

Figure 33. Phylogeny of infraorder Delphinida, based on cranial characters (modified from de Muizon, 1984, 1988). Delphininae, Cephalorhynchinae and Globicephalinae are the three subfamilies of Delphinidae (de Muizon, 1988). See above genera abbreviations.

La superfamilia Delphinoidea es un grupo monofilético formado por las familias Delphinidae, Monodontidae y Phocoenidae. La primera familia comprende, según de Muizon (1988), las subfamilias Delphininae, Cephalorhynchinae y Globicephalinae (Fig. 33).

Las relaciones filogenéticas entre las tres familias son ambiguas, como lo indican tanto las aproximaciones moleculares como las de tipo morfológico (de Muizon, 1988, Milinkovitch et al., 1994). Milinkovitch et al. (1994) hipotetizaron que los fenómenos que dieron lugar a los dos eventos de cladogénesis, y que produjeron la separación de las tres familias, ocurrió en un período de tiempo muy corto. El trabajo de Milinkovitch et al. (1994) también sugiere una relación que había sido ya propuesta a partir de los estudios osteológicos: Inioidea sería el grupo hermano de la superfamilia Delphinoidea (Fig. 33).

## (II) Filogenia de pinnípedos

El orden de los pinnípedos se compone de tres familias: Otariidae, Odobenidae y Phocidae. Este orden derivaría de carnívoros terrestres (úrsidos y mustélidos), procediendo los Odobenidae y Otariidae de úrsidos y los Phocidae de mustélidos (Barnes et al., 1985). No obstante, recientes estudios moleculares y morfológicos han sugerido un origen monofilético para estos mamíferos (véanse referencias en Hoberg y Adams, 1992). En este caso, los Otariidae constituirían el grupo basal con respecto a Odobenidae y Phocidae (Fig. 34).

A pesar de la discrepancia en cuanto al origen de los pinnípedos, sí que existe un general acuerdo en cuanto al monofilatismo de la familia Phocidae. Ésta se compone de las subfamilias Phocinae y Monachinae (King, 1983), las cuales constituyen grupos hermanos según de Muizon (1982). Sin embargo, otros estudios concluyen que la subfamilia Monachinae es de origen parafilético, siendo los Phocinae monofiléticos (Wyss, 1988). En esta última subfamilia no existe un acuerdo sobre las relaciones entre las tribus y géneros que la componen. Por un parte, King (1983) estableció tres tribus en Phocinae: las monotípicas Erignathini (con *Erignathus barbatus*) y Cystophorini (con *Cystophora cristata*), y la politípica Phocini (con los géneros *Phoca*, *Pusa*, *Halichoerus grypus*, *Pagophilus groenlandica* e *Histiophoca fasciata*). Por otro lado, de Muizon (1982) consideró *Erignathus barbatus* como la especie basal de los Phocinae. La tribu Phocini (*Halichoerus*, *Phoca* y *Pusa*) sería el grupo hermano de Cystophorini (que incluiría *Cystophora*, *Pagophilus* e *Histiophoca*) (Fig. 35). Por tanto, la aceptación del concepto de Phocini supone la existencia de una tribu de origen polifilético. Por contra, Wyss (1988) consideró los géneros

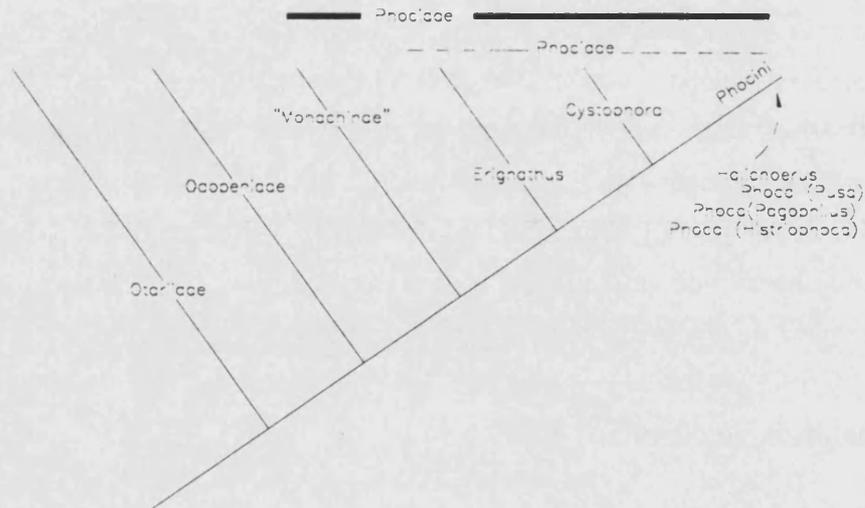


Figura 34. Cladograma de las relaciones filogenéticas entre los Pinnipedia (tomado de Hoberg y Adams, 1992). El grupo de los "Monachinae" no es considerado monofilético; *Cystophora* se presenta como el grupo hermano de la tribu monofilética Phocini, la cual incluye *Halichoerus* y los subgéneros de *Phoca*.

Figure 34. Cladogram of the phylogenetic relationships among Pinnipedia (from Hoberg and Adams, 1992). The group "Monachinae" is not considered monophyletic; *Cystophora* is presented as the sister group of the monophyletic tribe of Phocini, which includes *Halichoerus* and the subgenera of *Phoca*.

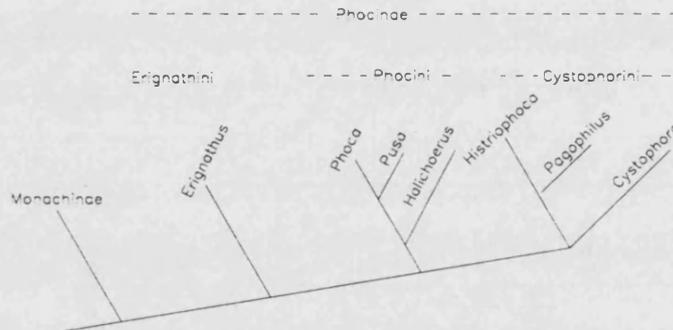


Figura 35. Cladograma en el que se presenta una hipótesis filogenética alternativa para la subfamilia Phocinae (tomado de Hoberg y Adams, 1992). Difiere de la hipótesis presentada en la figura 35 en que se reconoce la monofilia de los Monachinae, siendo el grupo hermano de los Phocinae. Esta filogenia difiere de otras aceptadas tradicionalmente en que las tribus Phocini y Cystophorini aparecen como grupos monofiléticos.

Figure 35. Cladogram showing the alternative phylogenetic hypothesis for the subfamily Phocinae (from Hoberg y Adams, 1992). It differs from the hypothesis presented in Figure 35 in the establishment of the monophyly of Monachinae, being the sister group of Phocinae. This phylogeny differs from others traditionally accepted, where the tribes Phocini and Cystophorini are monophyletic groups.

*Erignathus* y *Cystophora* como grupos basales, siendo este último el grupo hermano de la tribu monofilética Phocini (Fig. 34). Wyss (1988) asigna como género *Phoca*, los géneros *Histriophoca*, *Phagophilus* y *Pusa*. Según de Muizon (1982), la subfamilia Monachinae se

compone de las tribus Monachini (*Monachus*), Miroungini (*Mirounga*) y Lobodontini (*Lotbodon*, *Hydrurga*, *Leptonychotes* y *Ommatophoca*). King (1983) no reconoce la tribu Miroungini e incluye el género *Mirounga* en la tribu Lobodontini.

Dentro de la familia Otariidae, se ha postulado que Arcthocephalinae y Otariinae constituyen grupos hermanos (Berta y Deméré, 1986). La subfamilia Otariinae está formada por los géneros *Zalophus*, que constituiría el género basal, *Eumetopias*, *Neophoca*, *Phocarcos* y *Otaria*. Arcthocephalinae se compone de *Arcthocephalus* y *Callorhynchus*.

La familia Odobenidae es monotípica, siendo su único representante la morsa, *Odobenus rosmarus*.

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Resultados generales

##### (I) Análisis parasitológicos en cetáceos, pinnípedos y nutria marina

En las Tablas 25 y 26 aparecen todas las especies actualmente reconocidas de cetáceos y pinnípedos, indicando aquéllas en las que se han llevado a cabo estudios parasitológicos completos. En el caso de los cetáceos, existe información abundante en 5 de las 14 familias (Balaenopteridae, Eschrichtiidae, Delphinidae, Phocoenidae y Pontoporidae), aceptable en 5 (Balaenidae, Physeteridae, Kogiidae, Monodontidae, Iniidae), y no hay estudios en las familias Platanistidae, Lipotidae y Neobalaenidae (Tabla 25). Por último, la parasitofauna de la segunda familia más extensa dentro de los cetáceos (Ziphiidae) es también prácticamente desconocida: Sólo en 4 de las 18 especies descritas se ha hecho algún análisis, y todos, salvo uno, sobre un único ejemplar de hospedador. Aunque aparentemente a nivel de familia no parece un buen resultado, existe información parasitológica completa de al menos una especie en 32 (82 %) de los 39 géneros actuales de cetáceos. Los géneros donde no se tiene información, o es muy puntual, son *Caperea* (1 especie), *Monodon* (1 especie), *Orcaella* (1 especie), *Sousa* (3 especies), *Australophocaena* (1 especie), *Platanista* (2 especies) y *Lipotes* (1 especie). A nivel específico, el porcentaje anterior desciende considerablemente (existe evidencia sobre si hay o no campúlidos en 49 (62%) de las 79 especies actuales de cetáceos), pero esto no compromete un análisis preliminar sobre un estudio de estas características.

Tabla 25. Especies actuales de cetáceos. E: +/- indica si se han llevado a cabo o no estudios helmintológicos, C: +/- indica si se detectaron campúlidos o no, L1: Localidades en las que se ha detectado campúlidos, L2: Localidades en las que se sólo se encontraron helmintos no campúlidos. Los números indican las referencias de donde proceden los datos (véase Apéndice). \*: la referencia no indica la localidad, \*\*: especimen de delfinario. P: Pacífico, A: Atlántico, I: Indico, N: Norte, S: Sur, E: Este, O: Oeste.

Table 25. Extant species of the order Cetacea. E: +/- indicates whether or not helminthological studies have been conducted C: +/- indicates whether or not campulids were detected, L1: Localities where campulids were detected, L2: Localities where only non-campulid helminths were recorded. Numbers indicate the references where the data proceed (see Apendix). \*: information about locality was not given, \*\*: from captive hosts. P: Pacific, A: Atlantic, I: Indian Ocean, N: North, S: South, E: East, O: West.

| Mysticeti       | Especies  | E                                     | C                          | L1  | L2  |
|-----------------|---|---------------------------------------|----------------------------|---|---|
| Balaenidae      | <i>Eubalaena australis</i> Desmoulins, 1822     | +                                     | -                          |   | Isla de Georgia y Africa del Sur (A.S.)187, Islas Kuriles y Mar de Ojotsk (P.O.)193                       |
|                 | <i>E. glacialis</i> (Müller, 1776)              | -                                     |                            |   |   |
|                 | <i>Balaena mysticetus</i> L., 1758              | +                                     | +                          | Atlántico N.4,155,156, Mar de Ojotsk (P.O)27  | Alaska (Subártico)2   |
| Neobalaenidae   | <i>Caperea marginata</i> (Gray, 1846)           | -                                     |                            |   |   |
| Balaenopteridae | <i>Megaptera novaeangliae</i> (Borowaski, 1781) | +                                     | +                          | California (P.E.)103  | Isla de Georgia y Africa del Sur (A.S.)91, Antártico3   |
|                 | <i>Balaenoptera borealis</i> Lesson, 1828       | +                                     | +                          | Mar de Ojotsk (P.O)27, Atlántico N.153,155,156, Pacífico N.153, Pacífico E. 5,6,7, Antártico4,8   | Isla de Georgia y Africa del Sur (A.S.)14, Antártico8   |
|                 | <i>B. acutorostrata</i> Lacépède, 1804          | +                                     | +                          | Mar de Ojotsk (P.O)27, Atlántico N.155,156  | Atlántico. N. Boreal 11, Antártico8   |
|                 | <i>B. physalus</i> (L., 1758)                   | +                                     | +                          | Columbia Británica (P.E.)7, Mar de Ojotsk (P.O)27, Atlántico N.11,153, Pacífico N.153, Antártico4 | Antártico3, Estrecho de Dinamarca (Ártico)9   |
|                 | <i>B. edeni</i> Anderson, 1878                  | +                                     | +                          | Pacífico11, N.O.Indico.10   |   |
|                 | <i>B. musculus</i> (L., 1758)                   | +                                     | +                          | Atlántico N.11  | Quebec (Canadá)12, Antártico3   |
| Eschrichtiidae  | <i>Eschrichtius robustus</i> (Lilljeborg, 1861) | +                                     | +                          | Mar de los Chukchos (P.O.)13, California (P.E.)98   | Oregón (P.E.)77   |
| Odontoceti      | Especies  | E <td>C <td>L1 <td>L2</td> </td></td> | C <td>L1 <td>L2</td> </td> | L1 <td>L2</td>  | L2  |
| Physeteridae    | <i>Physeter catodon</i> L., 1758                | +                                     | +                          | Pacífico N.27, Mar de Ojotsk (P.O.)16   | Antártico3,8, Isla de Georgia y Africa del Sur (A.S.)1, Mediterráneo53, Canadá (Isla Principe Eduardo)191 |
|                 |   |                                       |                            |   |   |
| Kogiidae        | <i>Kogia breviceps</i> (de Blainville, 1838)    | +                                     | -                          |   | Tejas (A.O.)184   |
|                 | <i>Kogia simus</i> Owen, 1866                   | -                                     |                            |   |   |
| Ziphiidae       | <i>Berardius bairdii</i> Stejneger, 1883        | +                                     | +                          | Mar de Ojotsk (P.O.)27  |   |
|                 | <i>B. amuxii</i> Duvernoy, 1851                 | -                                     |                            |   |   |
|                 | <i>Tasmacetus sephardi</i> Oliver, 1937         | -                                     |                            |   |   |
|                 | <i>Ziphius cavirostris</i> G. Cuvier, 1937      | +                                     | -                          |   | Mediterráneo28,53,192   |
|                 | <i>Hyperoodon ampullatus</i> (Forster, 1770)    | +                                     | +                          | Pacífico29  |   |
|                 | <i>H. planifrons</i> Flower, 1882               | -                                     |                            |   |   |
|                 | <i>Mesoplodon pacificus</i> Longman, 1926       | -                                     |                            |   |   |

Continuación Tabla 25.

| Odontoceti                          | Especies  | E | C                             | L1   | L2                                       |
|-------------------------------------|---|---|-------------------------------|--|--|
| Ziphiidae                           | <i>M. hectori</i> (Gray, 1871)                          | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. mirus</i> True, 1913                              | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. europaeus</i> Gervais, 1855                       | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. ginkgodens</i> Nishiwaki et Kamiya, 1858          | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. grayi</i> von Haast, 1876                         | + | -                             |  | Argentina (A.O.)30                       |
|                                     | <i>M. stejnegeri</i> True, 1885                         | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. carlhubbsi</i> Moore, 1963                        | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. bowdoini</i> Andrews, 1908                        | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. layardii</i> (Gray, 1865)                         | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. bidens</i> (Sowerby, 1804)                        | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. densirostris</i> (de Blainville, 1817)            | - |                               |  |  |
|                                     | <i>M. peruvianus</i> Reyes, Mead et van Waerebeek, 1991 | - |                               |  |  |
| Monodontidae                        | <i>Monodon monoceros</i> L., 1758                       | - |                               |  |  |
|                                     | <i>Delphinapterus leucas</i> (Pallas, 1776)             | + | +                             | Pacífico O.154, Canadá18,21,22, Alaska19,20, Mar de Kara20,27, de Barents20,27, Blanco20,23,26,99, Kanin26, Pacífico O. (Mar de Ojotsk20,25,27, Sajalin24) | Canadá (Golfo de San Lorenzo) y Artico17 |
| Delphinidae                         | <i>Orcinus orca</i> (L., 1758)                          | + | +                             | Pacífico N.31, Dinamarca192  |  |
|                                     | <i>Orcaella brevirostris</i>                            | - |                               |  |  |
|                                     | <i>Pseudorca crassidens</i> (Owen, 1846)                | + | +                             | Florida (A.O.)32   |  |
|                                     | <i>Feresa attenuata</i> Gray, 1874                      | + | -                             |  | Florida (A.O.)33                         |
|                                     | <i>Peponocephala electra</i> (Gray, 1846)               | - |                               |  |  |
|                                     | <i>Globicephala melas</i> (Traill, 1809)                | + | +                             | Mediterráneo35, Feroe (A.N.)36, Terranova (A.O.)37   | Argentina (A.O.)30                       |
|                                     | <i>G. macrorhynchus</i> Gray, 1846                      | + | +                             | Japón (P.O.)38   | California (P.E.)39                      |
|                                     | <i>Sousa chinensis</i> (Osbeck, 1765)                   | - |                               |  |  |
|                                     | <i>S. teuszii</i> (Kukenthal, 1892)                     | - |                               |  |  |
|                                     | <i>S. plumbea</i> (G. Cuvier, 1829)                     | - |                               |  |  |
|                                     | <i>Steno bredanensis</i> (Lesson, 1828)                 | + | +                             | Golfo de Méjico40  | Oregón y Washington (P.E.)41             |
|                                     | <i>Sotalia fluviatilis</i> (Gervais, 1853)              | + | +                             | Amazonas150**  | Brasil (A.O.)42, Colombia (P.E.)43       |
|                                     | <i>Tursiops truncatus</i> (Montagu, 1821)               | + | +                             | (152,157)*, Oregón y California (P.E.)100, Florida (A.O.)32,46, Perú (P.E.)48, Mar Negro47, Mediterráneo49,190, Atlántico Central101, Nueva Zelanda175     | Mar Negro44, California (P.E.)45,63      |
|                                     | <i>Stenella frontalis</i> (G. Cuvier, 1829)             | + | +                             | Florida (A.O.)32   |  |
|                                     | <i>S. coeruleoalba</i> (Meyen, 1833)                    | + | +                             | Mediterráneo50,54,55, 56,57,102,201, Atlántico E.56, Pacífico E.100  | Pacífico E. (Oregón)77, California61,63  |
| <i>S. attenuata</i> (Gray, 1846)    | +   | + | Pacífico58, S. Africa59,195   |  |  |
| <i>S. longirostris</i> (Gray, 1828) | +   | + | Pacífico E.58, Japón (P.O.)38 |  |  |
| <i>S. clymene</i> (Gray, 1850)      | +   | - |                               | Golfo de Méjico202   |  |

Continuación Tabla 25.

| Odontoceti    | Especies   | E | C | L1   | L2   |
|---------------|--|---|---|--|--|
| Delphinidae   | <i>Delphinus delphis</i> L., 1758                          | + | + | Francia (A.E.)60, Mar Negro15,27, Atlántico15, Mediterráneo50, Pacífico E. (Perú92, Oregón100, California61,62,63,70, 100), Costas Británicas195   | Pacífico E. (Los Angeles39, Oregón77), Pakistán (I.)66 |
|               | <i>D. capensis</i> (Gray, 1828)                            | + | - |  | Perú (P.E.)65  |
|               | <i>Lagenorhynchus acutus</i> (Gray, 1828)                  | + | + | Maine (A.O.)67, Nueva Inglaterra69   |  |
|               | <i>L. albirostris</i> (Gray, 1846)                         | - |   |  |  |
|               | <i>L. obliquidens</i> Gill, 1865                           | + | + | California (P.E.)70  | Pacífico E. (California39,45,61,63,84,100, Oregón100)  |
|               | <i>L. obscurus</i> (Gray, 1828)                            | + | + | Argentina (A.O.)30   |  |
|               | <i>L. australis</i> (Peale, 1848)                          | - |   |  |  |
|               | <i>L. cruciger</i> (Quoy et Gaimard, 1824)                 | - |   |  |  |
|               | <i>Lagenodelphis hosey</i> Fraser, 1956                    | - |   |  |  |
|               | <i>Cephalorhynchus hectori</i> (van Beneden, 1881)         | + | + | Nueva Zelanda72  | Nueva Zelanda73  |
|               | <i>C. eutropia</i> (Gray, 1846)                            | + | + | Chile (P.E.)74,173   |  |
|               | <i>C. heavisidii</i> (Gray, 1828)                          | + | - |  | Namibia y S. Africa204                                 |
|               | <i>C. commersoni</i> (Lacépède, 1804)                      | + | - |  | Argentina (A.O.)30, 43,75                              |
|               | <i>Lissodelphis borealis</i> (Peale, 1848)                 | + | - |  | California (P.E.)39,61,63,84                           |
|               | <i>L. peronii</i> (Lacépède, 1804)                         | + | - |  | Pacífico E. (Perú y Chile)76                           |
|               | <i>Grampus griseus</i> (G. Cuvier, 1812)                   | + | + | Florida (A.O.)32   | Oregón (P.E.)77, Mediterráneo 53                       |
| Phocoenidae   | <i>Phocoena phocoena</i> (L., 1758)                        | + | + | Alaska (P.N.)132,126, Mar de Irlanda59, Dinamarca89, Holanda90,94, Inglaterra59, Mar Negro y de Azov15, Atlántico88,19, Pacífico canadiense88, Nueva Inglaterra (A.O.)69, Francia (A.E.)60, Washington (P.E.)64, Oregón (P.E.)77 |  |
|               | <i>P. sinus</i> Norris et McFarland, 1958                  | + | + | Sonora (P.E.)79  |  |
|               | <i>P. spinipinnis</i> Burmeister, 1865                     | + | + | Chile74, Perú205   | Argentina (A.O.)78                                     |
|               | <i>Neophocaena phocaenoides</i> (G. Cuvier, 1829)          | + | + | Mar de Arabia (I.)80, Japón (P.O.)81   | Pakistán (I.)66, Río Yangtze (China)82                 |
|               | <i>Australophocaena dioptrica</i> Lahille, 1912            | - |   |  |  |
|               | <i>Phocoenoides dalli</i> (True, 1885)                     | + | + | Islas Aleutianas (P.N.)83, California (P.E.)63,84,86,87,149, Mar del Japón (P.O.)85, Pacífico canadiense88   | California (P.E.)45                                    |
| Platanistidae | <i>Platanista gangetica</i> (Roxburgh, 1801)               | - |   |  |  |
|               | <i>P. minor</i> Owen, 1853                                 | - |   |  |  |
| Iniidae       | <i>Inia geoffrensis</i> (de Blainville, 1817)              | + | + | Amazonas46,95,96   |  |
| Pontoporiidae | <i>Pontoporia blainvillei</i> (Gervais et D'Orbigny, 1844) | + | + | A.O. (Argentina97, Uruguay196,197,198, 199)  |  |
| Lipotidae     | <i>Lipotes vexillifer</i> Miller, 1818                     | - |   |  |  |

En el caso de los pinnípedos, las tres familias Phocidae, Otariidae, Odobenidae han sido aceptablemente muestreadas (Tabla 26). Sin embargo, dentro de Phocidae, la subfamilia Monachinae está muy poco estudiada. Se conoce algo sobre la parasitofauna del género

Tabla 26. Especies de pinnípedos y la nutria marina. E: +/- indica si se han llevado a cabo o no estudios helmintológicos, C: +/- indica si se detectaron campúlidos o no, L1: Localidades en las que se ha detectado campúlidos, L2: Localidades en las que se encontraron helmintos no campúlidos. Los números indican las referencias de donde proceden los datos (véase Apéndice). \*: Zoo de Moscú, \*\*: la referencia no indica la localidad. P: Pacífico, A: Atlántico, N: Norte, E: Este, O: Oeste.

Table 26. E: Species of Pinnipedia and the sea otter. E: +/- indicates whether or not helminthological studies have been conducted C: +/- indicates whether or not campulid were detected, L1: Localities where campulids were detected, L2: Localities where only non-campulid helminths were recorded. Numbers indicate the references where the data proceed (see Appendix). \*: Moscow Zoo, \*\*: information about locality was not given. P: Pacific, A: Atlantic, N: North, E: East, O: West.

| Familias | Especies  | E | C | L1  | L2  |
|----------|---|---|---|---|---|
| Phocidae | <i>Phoca vitulina</i> L., 1758                            | + | + | Mar de Bering105, Mar de Barents (Artico)104, California203, 154**  | California (P.E.)39, Mar Wadden (A. N.)106, Islas Kuriles (P.O.)107, Canadá y Artico17            |
|          | <i>P. largha</i> Pallas, 1811                             | + | + | Mar de Bering115  | Mar de Bering108, Kuriles (P.O.)107   |
|          | <i>P. hispida</i> Schreber, 1775                          | + | + | Mar Blanco23,27, Artico (Mar de Kara27, Mar de Barents23,116, Mar de Groenlandia23) Anadir (Bering) y Estrecho de Bering169, Mar de los Chuckchos y Mar de Bering178, Isla de San Lorenzo (P.N.)132, Shantar (Mar de Ojotsk)180 | Canadá y Artico17, Alaska117, Mar Báltico118, Pacífico O. (entre Mar de Ojotsk y Mar de Japón)119 |
|          | <i>P. groenlandica</i> Erxleben, 1777                     | + | + | Mar Blanco27, Mar de Kara (Artico)27  | Canadá y Artico17   |
|          | <i>P. fasciata</i> Zimmerman, 1783                        | + | + | Mar de Bering120, 132   | Mar de Ojotsk (P.O.)121,122, Mar de Bering123   |
|          | <i>P. sibirica</i>  | + | - |   | Lago Baikal138  |
|          | <i>P. caspica</i> Gmelin, 1788                            | + | - |   | Mar Caspio143,144,145,147   |
|          | <i>Cistophora cristata</i> Erxleben, 1777                 | + | + | Artico (Mar Blanco, Mar de Groenlandia y Mar de Barents23)  | Artico (Mar de Groenlandia116, Artico)128   |
|          | <i>Erignathus barbatus</i> Erxleben, 1777                 | + | + | Artico (Alaska124, Groenlandia23, 126, Spitzbergen16,126, Mar de Barents23,125, Mar Blanco23,27,125, Mar de Bering105,125), Pacífico O. (Mar de Ojotsk)125,127, Canadá19  | Canadá y Artico17   |
|          | <i>Leptonichotes weddelli</i> Lesson, 1826                | + | + | Antártico52,130   |   |
|          | <i>Mirounga leonina</i> L., 1758                          | + | - |   | Nueva Zelanda137, Argentina (A.O.)30  |
|          | <i>M. angustirostris</i> Gill, 1866                       | + | + | 154**, California203  | California (P.E.)39,45  |
|          | <i>Halichoerus grypus</i> Fabricius, 1791                 | + | - |   | Islas Británicas (A.N.)139,140  |
|          | <i>Hydrurga leptonyx</i> Blainvillei, 1820                | + | - |   |   |
|          | <i>Lobodon carcinophagus</i> (Hombron et Jacquinot, 1842) | + | - |   |   |
|          | <i>Omatophoca rossi</i> Gray, 1844                        | - | - |   |   |
|          | <i>Monachus monachus</i> (Hermann, 1779)                  | - | - |   |   |
|          | <i>M. tropicalis</i> (Gray, 1850)                         | - | - |   |   |

Continuación Tabla 26.

| Familias           | Especies  | E | C | L1   | L2  |
|--------------------|---|---|---|--|---|
| Phocidae           | <i>M. schauinslandi</i><br>Matschie, 1905           | - |   |  |   |
| Odobenidae         | <i>Odobenus rosmarus</i><br>(L., 1758)              | + | + | Artico131, (Mar Blanco16,27), Alaska126,<br>Mar de los Chuckchos<br>(Bering)133,185,186, Mar de<br>Bering126,186, Pacifico N.68,<br>Spitzbergen155 |   |
| Otariidae          | <i>Neophoca cinerea</i><br>(Péron, 1816)            | + | - |  |   |
|                    | <i>Phocarcos hookeri</i><br>(Gray, 1844)            | - |   |  |   |
|                    | <i>Zalophus californianus</i> (Lesson,<br>1828)     | + | + | Pacifico E.100,110,111, 112,113,155  | Japón (P.O.)114, California<br>(P.E.)39,45,109                                  |
|                    | <i>Eumetopias jubatus</i><br>(Schreber, 1776)       | + | + | Pacifico E. (Oregón77), 100  | Alaska, Mar de Bering108,<br>California (P.E.)109                               |
|                    | <i>Callorhinus ursinus</i><br>(L., 1758)            | + | - |  | Alaska141, Pacifico O. (Islas<br>Pribilof142, Islas<br>Commander146, Japón148). |
|                    | <i>Arctocephalus australis</i> (Zimmerman,<br>1783) | + | - |  | Atlántico O.134,200   |
|                    | <i>A. tropicalis</i><br>(Gray, 1872)                | + | - |  | Argentina (A.O.)30  |
|                    | <i>A. forsteri</i><br>(Lesson, 1828)                | - |   |  |   |
|                    | <i>A. pusillus</i><br>(Schreber, 1776)              | - |   |  |   |
|                    | <i>A. gazella</i> (Peters,<br>1875)                 | - |   |  |   |
|                    | <i>A. galapagoensis</i><br>Heller, 1904             | + | + | 154**, Islas Galápagos203  |   |
|                    | <i>A. philippii</i> (Peters,<br>1866)               | - |   |  |   |
|                    | <i>A. townsendi</i><br>Merriam, 1897                | - |   |  |   |
|                    | <i>Otaria flavescens</i><br>(Shaw, 1800)            | + | + | Argentina (A.O.)30   | Atlántico O.134, Chile<br>(P.E.)135   |
|                    | <i>O. byronia</i>                                   | + | + | 161*   |   |
| Carnivora          |   |   |   |  |   |
| Familia Mustelidae | <i>Enhydra lutris</i> (L.,<br>1758)                 | + | + | Islas Aleutianas (P.O.)124,136, Isla del<br>Príncipe de Gales (Canadá)126  |   |

*Monachus* (Lauckner, 1985a) pero no se encontró ningún estudio con análisis taxativos de todos los órganos, probablemente por lo mermadas que se encuentran las poblaciones de las tres especies del género (una considerada extinta y dos en peligro de extinción). Respecto a los géneros antárticos, la información es también dispersa, salvo en el caso de *Leptonichotes weddelli* (Berverley-Burton, 1972). Entre los otáridos, el género *Arctocephalus* es comparativamente uno de los menos conocidos. De los 18 géneros de pinnípedos (aceptados en este trabajo), poseemos información aceptable de 12 (66,7%). De nuevo, este porcentaje disminuye a nivel específico (de las 34 especies, 20 (58.8%)).

La única especie de carnívoro netamente marina, la nutria marina (*Enhydra lutris*), ha sido relativamente bien estudiada.

## **(II) Análisis parasitológicos en diferentes regiones geográficas**

En líneas generales, existe un importante sesgo geográfico, puesto que la inmensa mayoría de estudios parasitológicos se han llevado a cabo en el Hemisferio Norte. En realidad, el reparto de los estudios refleja el grado de desarrollo económico y científico de los países. Existen buenas bases de datos en el Mediterráneo Occidental, el Pacífico Norte Oriental (de California a Alaska), la costa Atlántica Norteamericana, la región Ártica, y la región del Atlántico Norte Europeo. Datos más aislados existen en Japón y las costas asiáticas rusas. Información creciente se está obteniendo en toda Sudamérica, particularmente en las zonas de Perú, Chile, Argentina, Uruguay y Brasil. Por contra, la costa Atlántica de África y toda el área del Índico son zonas prácticamente vírgenes en cuanto a estudios sobre parásitos de mamíferos marinos. La región Antártica ha sido objeto de numerosas expediciones científicas desde principios de siglo, cuando se describió una gran cantidad de nuevas especies de helmintos en los mamíferos marinos de esta área (véanse algunas referencias en Lauckner, 1985a). En los últimos años, ha resurgido el interés por esta área de estudio (Zdzitowiecki, 1986, 1991). Sin embargo, existen muy pocos trabajos en donde se aborde el estudio integral de la parasitofauna de los mamíferos marinos antárticos.

En gran medida, la falta de información sobre determinadas especies de cetáceos y pinnípedos sólo refleja la falta de estudios en las áreas geográficas donde exclusiva, o mayormente se distribuyen.

A continuación, pasaremos a explicar con detalle los aspectos relacionados con la especificidad y distribución geográfica de las especies que componen cada uno de los géneros de la familia Campulidae (véase la Tabla 1, pg. 3, en donde se indican los géneros y especies válidas actualmente). En los casos en los que proceda, se realizará una pequeña discusión en relación a los dos aspectos citados anteriormente. Los supraíndices indican el número de la referencia utilizada en las Tablas (véase Apéndice).

#### 4.3.2. Género *Lecithodesmus*

##### Microhábitat

Todas las especies que constituyen este género parasitan los conductos hepáticos de sus hospedadores. Algunos trabajos no especifican exactamente la localización de los vermes, sino que, simplemente, indican el hígado como órgano infectado, sin explicitar si se encontraron en el parénquima de este órgano o en los conductos hepáticos.

##### Especificidad

Las especies de *Lecithodesmus* parasitan casi exclusivamente a misticetos. Tres de ellas, *L. goliath*, *L. spinosus* y *L. petrowi*, se han citado en ocho del total de nueve especies de misticetos de las que se tienen registros parasitológicos. *L. nipponicus* es la única especie de este género que parasita a odontocetos (Tabla 27). *L. goliath*, especie tipo del género, es la más extendida entre los misticetos, presentándose en las tres familias de las que se tienen estudios helmintológicos (Balaenidae, Balaenopteridae y Eschrichtiidae) (Tabla 27) (Fig. 36). Los datos recogidos en el presente trabajo indican que *L. spinosus* parasita exclusivamente a *Balaenoptera borealis* (Tabla 27). Con respecto a la cita de *L. spinosus* en Chile (Álvarez y Pefaur, 1970)<sup>5</sup> es necesario hacer una aclaración. En esta región, se denomina rorcual de Rudolphi a las especies *B. borealis* y *B. edeni*, por lo que no se puede saber realmente en cual de las dos encontraron estos autores *L. spinosus*. Ante esta incertidumbre, en la Tabla 27 la hemos asignado a *B. borealis*, pero sin descartar que se trate de *B. edeni*. La especie *L. petrowi* aparece únicamente en los balaenoptéridos *B. edeni* y *B. physalus* (Tabla 27) (Fig. 36).

Respecto a *Lecithodesmus nipponicus*, los caracteres morfológicos y morfométricos reseñados en la descripción original de la especie (Yamaguti, 1942) coinciden con los establecidos para la subfamilia monogénica Lecithodesminae, salvo la presencia de una bolsa prefaríngea, la cual no aparece en la diagnosis de la subfamilia (Yamaguti, 1971). Sin embargo, *L. nipponicus* se ha registrado una sola vez, y la descripción de la especie se basó en dos o tres vermes maduros que se obtuvieron de dos hospedadores, *Stenella longirostris* y *Globicephala macrorhynchus* (Yamaguti, 1942)<sup>38</sup> (Tabla 27). La cantidad mínima de citas de una especie descrita hace más de cincuenta años plantea dudas sobre

su estatus, máxime cuando se han efectuado bastantes más estudios en esos hospedadores (Tabla 25).

Tabla 27. Especies del género *Lecithodesmus*, hospedadores a los que parasita y localidades en donde se han encontrado la muestras. Los números corresponden a las referencias de donde proceden los datos (véase Apéndice). P: Pacífico, N: Norte, E: Este, O Oeste. \* la referencia no indica la localidad.

Table 27. Species of genus *Lecithodesmus*, with their hosts and localities. Numbers indicate the references in the Appendix. P: Pacific, N: North, E: East, O: West, \*: information about locality is not given.

| <i>Lecithodesmus</i>     | Hospedadores                     | Localidad  |
|--------------------------|----------------------------------|--|
| <i>L. goliath</i>        | <b>Balaenidae</b>                |  |
|                          | <i>Balaena mysticetus</i>        | Atlántico N. (4,155,156), Mar de Ojotsk (P.O.)27   |
|                          | <b>Balaenopteridae</b>           |  |
|                          | <i>Balaenoptera physalus</i>     | Columbia Británica (P. E.)7, Mar de Ojotsk (P.O.)27, Atlántico N.153, Pacífico N.4,153, Antártico4 |
|                          | <i>B. acutorostrata</i>          | 151*,164*, Mar de Ojotsk (P.O.)27, Atlántico N.4   |
|                          | <i>B. musculus</i>               | Atlántico N.11   |
|                          | <i>B. borealis</i>               | Antártico8,4, Mar de Ojotsk (P.O.)27, Atlántico N.4,153,155,156, Pacífico N.4,153                  |
| <i>L. spinosus</i>       | <b>Eschrichtidae</b>             |  |
|                          | <i>Echrichtius robustus</i>      | California (P.E.)98, Mar de los Chukchos (P.O.)13  |
| <i>L. petrowi</i>        | <b>Balaenopteridae</b>           |  |
|                          | <i>B. borealis</i>               | Pacífico E. (Méjico y California6, Chile5, Columbia Británica7)                                    |
| <i>L. nipponicus</i>     | <b>Balaenopteridae</b>           |  |
|                          | <i>B. edeni</i>                  | N.O. Indico10, Pacífico Tropical11   |
|                          | <i>B. physalus</i>               | Atlántico N. Boreal11  |
| <i>Lecithodesmus</i> sp. | <b>Delphinidae</b>               |  |
|                          | <i>Stenella longirostris</i>     | Japón (Pacífico O.)38  |
|                          | <i>Globicephala macrorhyncha</i> | Japón (Pacífico O.)38  |
| <i>Lecithodesmus</i> sp. | <b>Balaenopteridae</b>           |  |
|                          | <i>Megaptera novaeangliae</i>    | California (P.E.)103   |

Considerando que el efecto de la especie hospedadora puede producir variabilidad morfológica importante, es posible que *L. nipponicus* sea una especie de *Lecithodesmus* propia de misticetos que ha infestado excepcionalmente un odontoceto. Este tipo de fenómenos, en los que una especie hospedadora parece funcionar como un hospedador facultativo ecológico, o excepcional, se verá repetidamente en otros géneros dentro de Campulidae (véase, por ejemplo, el caso de *Zalophotrema curilensis*, *Campula folium*, *Orthosplanchnus pygmaeus*). En conclusión, consideraremos que las especies de *Lecithodesmus* tienen como hospedadores principales a los misticetos.

La información recogida en las Tablas 25 y 27 parece indicar que las especies de *Lecithodesmus* se han diversificado en la familia Balaenopteridae, particularmente en las

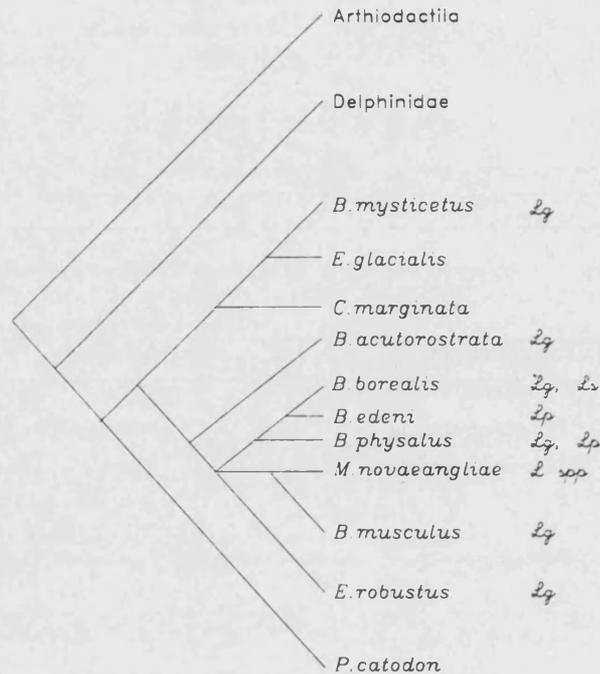


Figura 36. Filogenia molecular de las especies de misticetos según Milinkovitch et al. (1995). Se presentan las especies de *Lecithodesmus* en el hospedador correspondiente. Ver los nombres de las especies de misticetos en la Fig. 32. Lg: *Lecithodesmus goliath*, Lp: *L. petrowi*, Ls: *L. spinosus*, L spp: *Lecithodesmus* sp.

Figure 36. Molecular phylogeny of Mysticeti species, according to Milinkovitch et al. (1995). Occurrence of *Lecithodesmus* spp. in these hosts is superposed. See species names of misticetes in Fig. 32. See above abbreviations of *Lecithodesmus* species.

especies del género *Balaenoptera*. Todas las especies de esta familia se hallan parasitadas por representantes de *Lecithodesmus*. Además, algunos de los datos de prevalencia apoyan también esta idea. Margolis y Pike (1955)<sup>7</sup> encontraron *L. goliath* en el único ejemplar de *B. physalus* que analizaron (100%). Rice (1977)<sup>6</sup> citó *L. spinosus* en 107 *B. borealis* de un total de 284 (37,7%) y Margolis y Pike (1955)<sup>7</sup> en los dos ejemplares de *B. borealis* que examinaron (100%). Sólo en el caso de *B. borealis* en Chile (Álvarez y Pefaur, 1970)<sup>5</sup> se encontraron bajas prevalencias (2 de 273, 0,7%) En el otro género de Balaenopteridae, *Megaptera*, sólo el 0,7% (de un total de 150) de los ejemplares presentaron *Lecithodesmus* (Rice, 1963)<sup>103</sup>. En el caso de la familia Balaenidae, de las dos especies en las que se han realizado alguna vez análisis helmintológicos, sólo en una, *B. mysticetus*, se ha constatado la presencia de una especie de *Lecithodesmus*, *L. goliath*, no existiendo datos de prevalencias (Tabla 25). El único representante de la familia Eschrichtiidae se encuentra también parasitado por *L. goliath*, siendo ésta la única cita de *Lecithodesmus* en *Eschrichtius robustus*. Dos ejemplares de este cetáceo aparecieron infectados de un total de 139 necropsiados (1,4%) (Rice y Wolman, 1971)<sup>98</sup> (Tabla 27).

Por último, es importante señalar que ninguna de las especies de mysticetos se encuentra parasitada de forma importante por otros campúlidos (véase el caso excepcional de *Orthosplanchnus pymaeus* en *E. robustus*).

### Distribución geográfica

En todas las especies de Balaenopteridae se han realizado estudios helmintológicos tanto en el Hemisferio Norte como en el Sur, a excepción de *B. edeni*, de la que sólo se conocen dos estudios en el Hemisferio Norte (Fig. 37). Sin embargo, excepto en *B. physalus* y *B. borealis*, en el resto de balaenoptéridos se han detectado especies de *Lecithodesmus* sólo en el Hemisferio Norte. La cita de *L. goliath* en *B. physalus* en el Hemisferio Sur (Skrjabin, 1974)<sup>4</sup> no aporta datos de prevalencia y es la única cita que hemos registrado, por lo que deberá considerarse con cautela. A la vista de la información recogida, parece existir una mayor presencia de las especies de *Lecithodesmus* en el Hemisferio Norte que en el Sur (Fig. 37), aún teniendo en cuenta que tres de las diez especies de mysticetos de las que se tiene información parasitológica, se distribuyen sólo en el Hemisferio Norte (*Balaena mysticetus*, *Eubalaena glacialis* y *Eschrichtius robustus*). De 24 trabajos helmintológicos realizados en el Hemisferio Norte, 18 (75%) registraron la presencia de campúlidos de *Lecithodesmus* (Tablas 25 y 27), mientras que en el Hemisferio Sur, únicamente 3 de 14 (21,4%) (Tablas 25 y 27). También hay que señalar que las prevalencias de las especies de *Lecithodesmus* en los mysticetos del Hemisferio Norte resultaron bastante bajas, siendo el número de hospedadores examinados bastante elevado. Por ejemplo, en California (Pacífico Este) el 1,4% de *E. robustus* aparecieron parasitados por *Lecithodesmus* (Rice y Wolman, 1971)<sup>98</sup> (véase más arriba). Rice (1977)<sup>6</sup> encontró en Méjico *L. spinosus* en 107 individuos de *B. borealis* de un total de 284 (37,7%). Igualmente, Rice (1963)<sup>103</sup> encontró *Lecithodesmus* sp. en un solo espécimen de *Megaptera novaeangliae* de 150 ejemplares (0,7%), en California. Todas las citas de las especies de *Lecithodesmus* en el Hemisferio Norte se han dado en los océanos Pacífico y Atlántico. En el Ártico, el estudio parasitológico de 85 ejemplares de *B. physalus* y 5 de *B. mysticetus* no evidenciaron la presencia de especies de *Lecithodesmus* (Lambertsen, 1986<sup>9</sup> y Heckmann et al., 1987<sup>2</sup>, respectivamente).

El aceptable número de trabajos helmintológicos realizados en varias áreas del Hemisferio Sur, así como la gran cantidad de hospedadores examinados, parecen sugerir

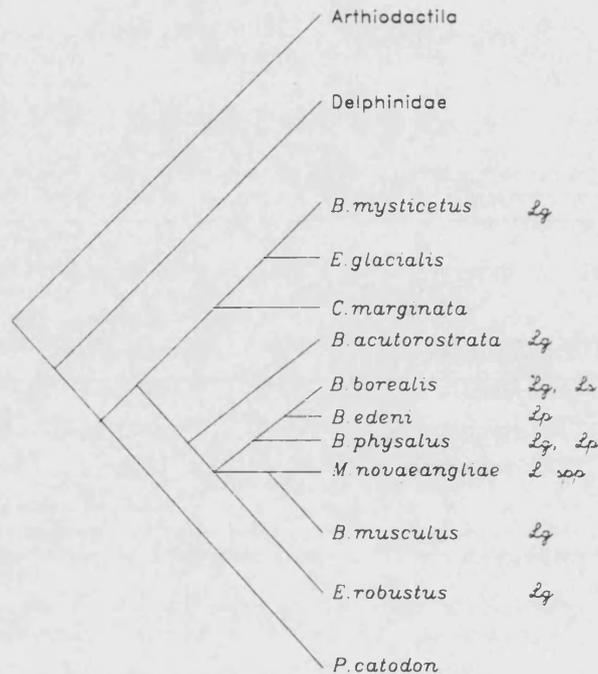


Figura 36. Filogenia molecular de las especies de misticetos según Milinkovitch et al. (1995). Se presentan las especies de *Lecithodesmus* en el hospedador correspondiente. Ver los nombres de las especies de misticetos en la Fig. 32. Lg: *Lecithodesmus goliath*, Lp: *L. petrowi*, Ls: *L. spinosus*, L spp: *Lecithodesmus* sp.

Figure 36. Molecular phylogeny of Mysticeti species, according to Milinkovitch et al. (1995). Occurrence of *Lecithodesmus* spp. in these hosts is superposed. See species names of misticetes in Fig. 32. See above abbreviations of *Lecithodesmus* species.

especies del género *Balaenoptera*. Todas las especies de esta familia se hallan parasitadas por representantes de *Lecithodesmus*. Además, algunos de los datos de prevalencia apoyan también esta idea. Margolis y Pike (1955)<sup>7</sup> encontraron *L. goliath* en el único ejemplar de *B. physalus* que analizaron (100%). Rice (1977)<sup>6</sup> citó *L. spinosus* en 107 *B. borealis* de un total de 284 (37,7%) y Margolis y Pike (1955)<sup>7</sup> en los dos ejemplares de *B. borealis* que examinaron (100%). Sólo en el caso de *B. borealis* en Chile (Álvarez y Pefaur, 1970)<sup>5</sup> se encontraron bajas prevalencias (2 de 273, 0,7%) En el otro género de Balaenopteridae, *Megaptera*, sólo el 0,7% (de un total de 150) de los ejemplares presentaron *Lecithodesmus* (Rice, 1963)<sup>103</sup>. En el caso de la familia Balaenidae, de las dos especies en las que se han realizado alguna vez análisis helmintológicos, sólo en una, *B. mysticetus*, se ha constatado la presencia de una especie de *Lecithodesmus*, *L. goliath*, no existiendo datos de prevalencias (Tabla 25). El único representante de la familia Eschrichtiidae se encuentra también parasitado por *L. goliath*, siendo ésta la única cita de *Lecithodesmus* en *Eschrichtius robustus*. Dos ejemplares de este cetáceo aparecieron infectados de un total de 139 necropsiados (1,4%) (Rice y Wolman, 1971)<sup>98</sup> (Tabla 27).

Por último, es importante señalar que ninguna de las especies de mysticetos se encuentra parasitada de forma importante por otros campúlidos (véase el caso excepcional de *Orthosplanchnus pymaeus* en *E. robustus*).

### Distribución geográfica

En todas las especies de Balaenopteridae se han realizado estudios helmintológicos tanto en el Hemisferio Norte como en el Sur, a excepción de *B. edeni*, de la que sólo se conocen dos estudios en el Hemisferio Norte (Fig. 37). Sin embargo, excepto en *B. physalus* y *B. borealis*, en el resto de balaenoptéridos se han detectado especies de *Lecithodesmus* sólo el Hemisferio Norte. La cita de *L. goliath* en *B. physalus* en el Hemisferio Sur (Skrjabin, 1974)<sup>4</sup> no aporta datos de prevalencia y es la única cita que hemos registrado, por lo que deberá considerarse con cautela. A la vista de la información recogida, parece existir una mayor presencia de las especies de *Lecithodesmus* en el Hemisferio Norte que en el Sur (Fig. 37), aún teniendo en cuenta que tres de las diez especies de mysticetos de las que se tiene información parasitológica, se distribuyen sólo en el Hemisferio Norte (*Balaena mysticetus*, *Eubalaena glacialis* y *Eschrichtius robustus*). De 24 trabajos helmintológicos realizados en el Hemisferio Norte, 18 (75%) registraron la presencia de campúlidos de *Lecithodesmus* (Tablas 25 y 27), mientras que en el Hemisferio Sur, únicamente 3 de 14 (21,4%) (Tablas 25 y 27). También hay que señalar que las prevalencias de las especies de *Lecithodesmus* en los mysticetos del Hemisferio Norte resultaron bastante bajas, siendo el número de hospedadores examinados bastante elevado. Por ejemplo, en California (Pacífico Este) el 1,4% de *E. robustus* aparecieron parasitados por *Lecithodesmus* (Rice y Wolman, 1971)<sup>98</sup> (véase más arriba). Rice (1977)<sup>6</sup> encontró en Méjico *L. spinosus* en 107 individuos de *B. borealis* de un total de 284 (37,7%). Igualmente, Rice (1963)<sup>103</sup> encontró *Lecithodesmus* sp. en un solo espécimen de *Megaptera novaeangliae* de 150 ejemplares (0,7%), en California. Todas las citas de las especies de *Lecithodesmus* en el Hemisferio Norte se han dado en los océanos Pacífico y Atlántico. En el Ártico, el estudio parasitológico de 85 ejemplares de *B. physalus* y 5 de *B. mysticetus* no evidenciaron la presencia de especies de *Lecithodesmus* (Lambertsen, 1986<sup>9</sup> y Heckmann et al., 1987<sup>2</sup>, respectivamente).

El aceptable número de trabajos helmintológicos realizados en varias áreas del Hemisferio Sur, así como la gran cantidad de hospedadores examinados, parecen sugerir

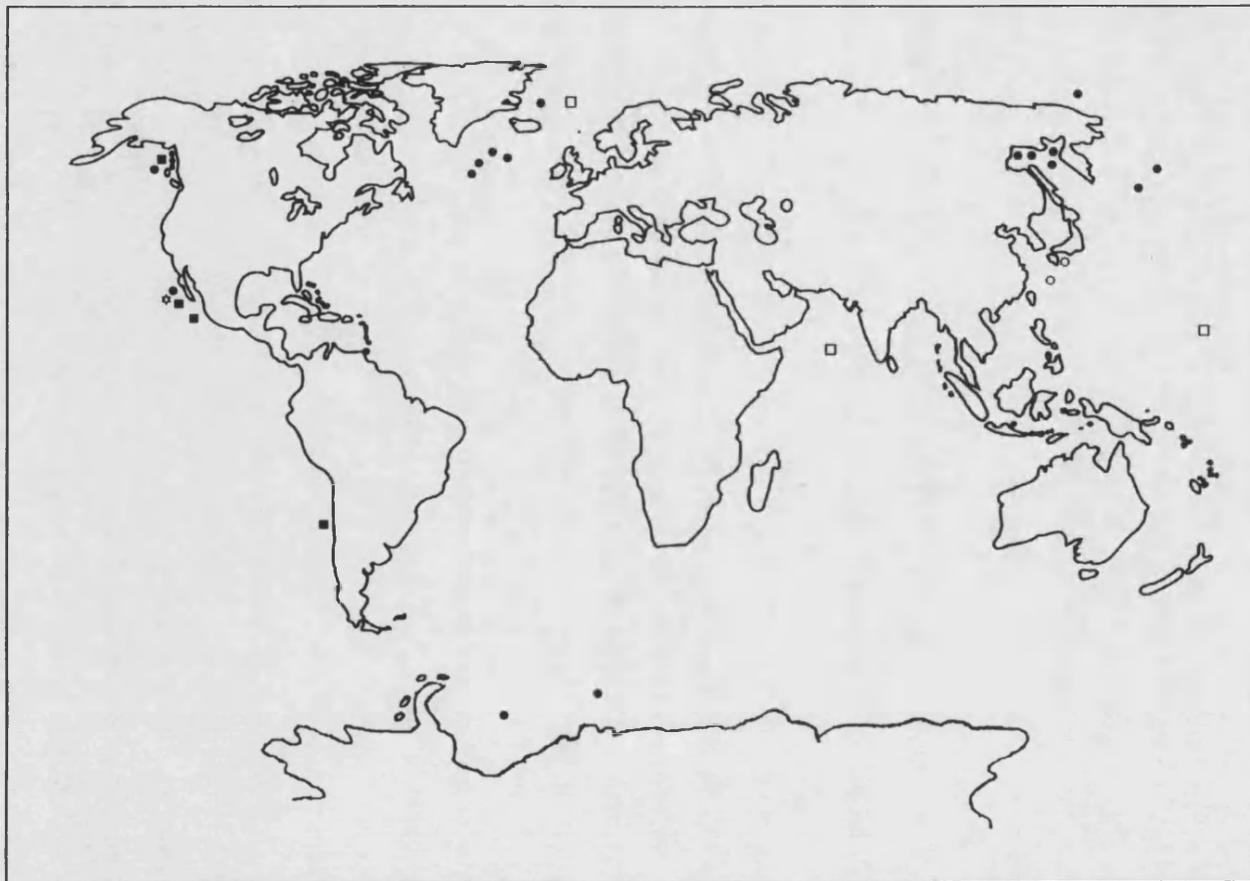


Figura 37. Distribución de las especies de *Lecithodesmus* (véase Tabla 27). (●) *L. goliath*, (■) *L. spinosus*, (□) *L. petrowi*, (○) *L. nipponicus*, (☆) *Lecithodesmus* sp.  
Figure 37. Scheme depicting the geographical distribution of *Lecithodesmus* species (see Table 27). See above symbols of *Lecithodesmus* species.

que las especies de *Lecithodesmus* son realmente escasas en esta región. Álvarez y Pefaur (1970)<sup>5</sup> estudiaron 273 ejemplares de *B. borealis* (o *B. edeni*; véase la aclaración más arriba) en Chile, encontrándose *L. spinosus* sólo en dos ballenas (0,7%). Dailey y Vogelbøin (1991)<sup>8</sup> examinaron 35 individuos de *B. borealis* y 106 de *B. acutorostrata* en el Antártico, en los que no se detectaron especies del género *Lecithodesmus*. Igualmente, Rees (1953)<sup>3</sup> no encontró campúlidos en *M. novaeangliae*, *B. physalus* y *B. musculus* en el Antártico (Tabla 27). En tres estudios de la zona del Atlántico Sur (Isla de Georgia y Sur de África) se necropsiaron 4 individuos de *E. australis* (Mathews, 1938c)<sup>187</sup>, 35 de *M. novaeangliae* (Mathews, 1937)<sup>91</sup> y 192 de *B. borealis* (Mathews, 1938b)<sup>14</sup>, no hallándose trematodos del género *Lecithodesmus* (Tabla 27).

#### 4.3.3. Género *Hunterotrema*

##### Microhábitat

Las dos especies descritas de este género, *Hunterotrema caballeroi* y *H. macrosoma*, se han localizado en los pulmones del delfín del Amazonas, *Inia geoffrensis*.

##### Especificidad

Las especies de *Hunterotrema* se han encontrado exclusivamente en *Inia geoffrensis* (Tabla 28). Dailey (1971b) estableció la diferenciación entre las dos especies en base a: (i) una mayor longitud corporal de *H. macrosoma* con respecto a *H. caballeroi*; (ii) la ausencia de espinas corporales en *H. macrosoma*, presentes en *H. caballeroi*; (iii) situación del porro genital, inmediatamente preacetabular en *H. caballeroi* y (iv) la bolsa del cirro no se extiende más de la mitad de su longitud posteriormente al acetábulo en *H. macrosoma*.

Tabla 28. Especies del género *Hunterotrema*, hospedadores a los que parasita y localidad de donde proceden las muestras. Los números indican las citas de donde se han obtenido los datos (véase Apéndice).

Table 28. Species of genus *Hunterotrema*, with their hosts and localities. Numbers indicate the references in the Appendix.

| <i>Hunterotrema</i>  | Hospedadores                       | Localidad                 |
|----------------------|------------------------------------|---------------------------|
| <i>H. caballeroi</i> | Iniidae<br><i>Inia geoffrensis</i> | Amazonas <sup>46,95</sup> |
| <i>H. macrosoma</i>  | Iniidae<br><i>I. geoffrensis</i>   | Amazonas <sup>96</sup>    |

En nuestra opinión, las diferencias propuestas por Dailey (1971) no son lo suficientemente consistentes como para establecer una especie nueva. En primer lugar, la mayor o menor longitud corporal puede ser reflejo simplemente de la variabilidad intraespecífica, como se demostró en *H. tursionis*, en donde el tamaño del verme más grande quintuplicaba el del más pequeño (Fernández et al., 1995). Por otro lado, las espinas corporales son las primeras que desaparecen, seguidas por las del metratermo y cirro, por lo que este carácter ha de tomarse con mucha cautela (Adams y Rausch, 1989). La diferencia en la extensión de la bolsa del cirro pudo ser debida al estado de contracción del verme. Aunque Dailey (1971) indicó que los vermes encontrados por Woodard et al. (1969)<sup>46</sup> correspondían a *H. macrosoma* y no a *H. caballeroi*, dada la gran longitud de los mismos, estos autores habían revisado cuidadosamente los especímenes (Zam et al., 1970), sin encontrar aparentemente diferencias suficientes como para erigir una nueva especie.

#### Distribución geográfica

Este hospedador se distribuye por las cuencas del Amazonas y del Orinoco. Los hospedadores parasitados por *Hunterotrema* procedían de dos localidades de Perú y Colombia (Tabla 28).

#### **4.3.4. Género *Hadwenius***

##### Microhábitat

Las especies del género *Hadwenius* son típicamente intestinales. Sin embargo, en ocasiones se ha citado la presencia de helmintos de este género en alguna de las tres cámaras del estómago (Dailey y Stroud, 1978<sup>77</sup>; van Waerebeek et al., 1990<sup>48</sup>; Measures et al., 1995<sup>22</sup>). Por otro lado, *H. elongatus* en *Pseudorca crassidens* se encontró en el conducto hepato-pancreático (Zam et al., 1971)<sup>32</sup>. Measures et al. (1995) citaron la presencia de *H. seymouri* en un gran número de *Delphinapterus leucas* del estuario de San Lorenzo, en Canadá. En la mayoría de hospedadores, los vermes se localizaron en el intestino, pero en otros se encontraron, además, en el estómago. En una ocasión, una pequeña cantidad de digénidos (6) se presentaron sólo en el estómago. Dado que prácticamente la totalidad de las especies de *Hadwenius* se han encontrado en el intestino, cabe la posibilidad de que la presencia de los vermes en otro hábitat sea puramente

accidental. La manipulación de las vísceras durante la necropsia de los hospedadores, o el simple desplazamiento de los vermes hacia otro emplazamiento una vez que el hospedador ha muerto, pueden ser las causas de este hecho. La presencia de *H. elongatus* en los conductos hepato-pancreáticos pudo haber ocurrido igualmente de forma accidental, puesto que no tenemos ninguna cita más sobre la aparición de *Hadwenius* en este hábitat.

### Especificidad

El género *Hadwenius* se compone de ocho especies que parasitan a cuatro familias de odontocetos: Delphinidae, Phocoenidae, Monodontidae y Pontoporiidae (Tabla 29) (Fig. 38).

*H. seymouri*, especie tipo del género, es exclusiva del monodóntido *D. leucas*. El gran número de citas, las altas prevalencias y abundancias de este helminto avalan esta especificidad. Las prevalencias, en donde se han indicado, fueron del 51,2% (20 belugas de 39, Treschev, 1978<sup>23</sup>), del 40% (4 de 10, Wazura et al., 1986<sup>21</sup>), 23% (3 de 13, Martineau et al., 1988<sup>18</sup>) y 60% (23 de 38, Measures et al., 1995<sup>22</sup>). En Measures et al. (1995), el máximo número de vermes encontrado fue de 1.910 en un sólo hospedador. En otros hospedadores, se presentaron desde un solo verme hasta más de 400 (Measures et al., 1995).

Otra especie de *Hadwenius* que muestra cierto grado de especificidad es *H. delamurei*. En este caso, existen solamente dos citas de esta especie en el delfínido *Globicephala melas* (Tabla 29). Los datos de prevalencia y abundancia de este helminto en el Mediterráneo no son muy elevados, siendo la prevalencia del 12,3% (2 hospedadores de 5) y la intensidad de 2 vermes por hospedador (Raga y Balbuena, 1988)<sup>35</sup>. La cita de las Islas Feroe (Atlántico Norte) indica, sin embargo, una prevalencia más elevada (40%), llegándose a encontrar hasta más de 3.000 helmintos en un mismo hospedador (Raga y Balbuena, 1993)<sup>36</sup>.

*Hadwenius pontoporiae* es el único campúlido que se ha encontrado hasta la fecha en un miembro de la familia Pontoporiidae, *Pontoporia blainvillei* (Raga et al., 1994b). Se analizaron 46 hospedadores con una prevalencia del 100% (Aznar et al., 1994)<sup>87</sup>. Además, el rango de intensidades osciló entre 4 y 3.330 vermes. En aguas uruguayas se realizaron estudios sobre *P. blainvillei* en los que no se detectaron estos helmintos (Schmidt y Dailey,

1971<sup>196</sup>; Brownell, 1981<sup>198</sup>, 1989<sup>199</sup>) debido, probablemente, a que sólo se analizaron los intestinos de tres delfines (Aznar et al., 1995). En el sur de Brasil no se detectó en 42 hospedadores (Santos et al., 1996).

*H. nipponicus* se ha citado exclusivamente en la familia Phocoenidae. Esta especie se describió por primera vez en *Phocoenoides dalli*, a partir de dos vermes adultos (Yamaguti, 1951)<sup>85</sup>, siendo ésta la única referencia en dicho hospedador. En la marsopa común, *Phocoena phocoena*, se ha hallado *H. nipponicus* en cuatro ocasiones, siendo los datos bastante imprecisos. Ching y Robinson (1959)<sup>64</sup> indicaron que encontraron cien vermes de esta especie en una marsopa. El resto de citas no revelan ningún dato respecto a la prevalencia y abundancia de *H. nipponicus* en *P. phocoena* y/o se basan en un solo hospedador (Dailey y Stroud, 1978<sup>77</sup>; Margolis y Arai, 1989<sup>88</sup>; Adams y Rausch, 1989<sup>126</sup>).

La especie *H. subtilis* se ha citado en una sola ocasión en cada uno de los hospedadores en los que se ha encontrado: dos delfínidos, *G. melas* y *Orcinus orca*, y un monodóntido, *D. leucas*. La descripción original de *H. subtilis* se realizó a partir de un solo verme que se encontró en una orca en las Islas Kuriles (Skrjabin, 1959)<sup>31</sup>. Las prevalencias indicadas para esta especie no superan el 25%, tanto en *G. melas* como en *D. leucas*, a pesar de que se habían analizado en cada caso un número bastante elevado de hospedadores (170 *G. melas*, Raga y Balbuena, 1993<sup>36</sup>; 39 *D. leucas*, Treschev, 1978<sup>23</sup>). Se han llegado a encontrar hasta más de 4.000 vermes de la especie *H. subtilis* en *G. melas* (abundancia de  $31,6 \pm 25,4$ , Raga y Balbuena, 1993). Treschev (1978) no ofreció los parámetros de infestación. Vemos que, al menos en *G. melas*, a pesar de la baja prevalencia, esta especie puede ejercer una fuerte parasitación sobre su hospedador.

En cuanto a *H. mironovi*, se han encontrado en *D. leucas* y *P. phocoena*. Delyamure (1964)<sup>20</sup> analizó 54 *D. leucas* en diversas expediciones a los mares subárticos de Barents y Kara y también en el Mar de Ojotsk. En *P. phocoena* se ha detectado este helminto una sola vez. No se tienen datos sobre la prevalencia y abundancia en ambos hospedadores.

*H. elongatus* se presenta en Delphinidae y Phocoenidae. Al igual que ocurría en *H. subtilis*, una sola cita avala la presencia de este parásito en cada uno de sus hospedadores. Gibson y Harris (1979)<sup>59</sup> citan esta especie en *Stenella attenuata* como *Orthosplanchnus* (?) *elongatus* (véase la discusión taxonómica más adelante). Ello se debe a que no siempre fue posible realizar una diagnosis adecuada de los vermes debido a su estado de

## Biogeografía de Campulidae

Tabla 29. Especies del género *Hadwenius*, hospedadores a los que parasita y localidad de donde proceden las muestras. Los números indican las referencias de donde se han obtenido los datos (véase Apéndice). A: Atlántico, P: Pacífico, I: Indico O: Oeste, N: Norte, S: Sur. \*: la referencia no indica la localidad.

Table 29. Species of genus *Hadwenius*, with their hosts and localities. Numbers indicate the references in the Appendix. A: Atlantic, P: Pacific, I: Indian Ocean, O: West, N: North, S: South. \*: information about locality was not given.

| <i>Hadwenius</i>      | Hospedadores                    | Localidad   |
|-----------------------|---------------------------------|---|
| <i>H. seymouri</i>    | <b>Monodontidae</b>             |   |
|                       | <i>Delphinapterus leucas</i>    | Pacífico O.131, Mar de Ojotsk 20,84 (P.O.), Alaska19,126, Ártico (Mar de Kara20, Mar de Barents20,84, Mar Blanco20,23,84), Canadá (Territorios del N.O.21, Estuario de S. Lorenzo18,22) |
| <i>H. nipponicus</i>  | <b>Phocoenidae</b>              |   |
|                       | <i>Phocoena phocoena</i>        | Washington (P.E.)64, Pacífico canadiense88, Oregón (P.E.)77, Alaska (P.N.)126   |
|                       | <i>P. dalli</i>                 | Mar de Japón (P.O.)85   |
| <i>H. subtilis</i>    | <b>Delphinidae</b>              |   |
|                       | <i>Globicephala melas</i>       | Islas Feroe (A.N.)36  |
|                       | <i>Orcinus orca</i>             | Islas Kuriles(P.O.)31   |
|                       | <b>Monodontidae</b>             |   |
|                       | <i>D. leucas</i>                | Mar Blanco23  |
| <i>H. mironovi</i>    | <b>Monodontidae</b>             |   |
|                       | <i>D. leucas</i>                | Mar de Ojotsk (P.O.)20,84, Sajalin (P.O.)20,24, Pacífico N.11, Atlántico N.126  |
|                       | <b>Phocoenidae</b>              |   |
|                       | <i>P. phocoena</i>              | Oregón (P.E.)77   |
| <i>H. delamurei</i>   | <b>Delphinidae</b>              |   |
|                       | <i>Globicephala melas</i>       | Mediterráneo O.35, Islas Feroe (A.N.)36   |
| <i>H. tursionis</i>   | <b>Delphinidae</b>              |   |
|                       | <i>Tursiops truncatus</i>       | (152,157)*, Mar Negro47, Perú48, Mediterráneo49, 190, Nueva Zelanda175  |
|                       | <i>Cephalorhynchus eutropia</i> | Chile (P.E.)74,173  |
|                       | <i>Delphinus delphis</i>        | Perú (P.E.)92   |
|                       | <i>Steno bredanensis</i>        | Golfo de Méjico40   |
|                       | <i>Grampus griseus</i>          | Florida (A.O.)32  |
|                       | <b>Phocoenidae</b>              |   |
|                       | <i>Phocoena spinnipinis</i>     | Pacífico E. (Chile74, Perú205)  |
|                       | <i>P. sinus</i>                 | Sonora (P.E.)79   |
|                       | <i>Neophocaena phocaenoides</i> | Mar de Arabia (I.)80  |
| <i>H. pontoporiae</i> | <b>Pontoporiidae</b>            |   |
|                       | <i>Pontoporia blainvillei</i>   | Argentina (A.O.)97  |
| <i>H. elongatus</i>   | <b>Delphinidae</b>              |   |
|                       | <i>Pseudorca crassidens</i>     | Florida32   |
|                       | <i>Stenella attenuata</i>       | S. Africa59   |
|                       | <b>Phocoenidae</b>              |   |
|                       | <i>N. phocaenoides</i>          | Mar de Japón (P.O.)81   |
| <i>Hadwenius</i> sp.  | <b>Delphinidae</b>              |   |
|                       | <i>O. orca</i>                  | Dinamarca192  |
|                       | <i>Lagenorhynchus obscurus</i>  | Argentina (A.O.)30  |



*tursionis*. Por todo ello, consideraremos, con reservas, la sinonimia entre *H. elongatus* y *H. tursionis*. En ese caso, existirían dos citas sobre la presencia de *H. tursionis* en *N. phocaenoides*, una en el Mar del Arabia y otra en el Mar del Japón (Ozaki, 1935<sup>81</sup>; Hafeezullah, 1986<sup>80</sup>). Por otro lado, aparecerían dos especies más de delfínidos que se encuentran parasitados por este helminto, *Pseudorca crassidens* y *Stenella attenuata*. Con ello se ampliaría el rango de extensión de *H. tursionis*, no sólo respecto a las especies a las que parasita, sino también a la distribución geográfica, puesto que la cita en *S. attenuata* procede de Sudáfrica (Gibson y Harris, 1979)<sup>59</sup>.

La especie *H. tursionis* se ha hallado en la familia Delphinidae y Phocoenidae, siendo la especie de *Hadwenius* que parasita a mayor número de especies de odontocetos (Tabla 29) (Fig. 38). Cinco especies de delfínidos y tres de la familia Phocoenidae sirven de hospedadores a este parásito. No podemos asegurar que *H. tursionis* presente una mayor especificidad por el delfínido *T. truncatus*, puesto que sobre él se han realizado un gran número de estudios con respecto al resto de delfínidos en los que se presenta, excepto en *D. delphis*. Sin embargo, observamos que en *T. truncatus*, *H. tursionis* se ha citado en 7 de 14 estudios, mientras que en *D. delphis*, sólo 1 de 16 indicó la presencia de este parásito. Además, este campúlido en *T. truncatus* presenta una distribución geográfica amplia, puesto que se ha encontrado en los mares Negro y Mediterráneo, Perú y Nueva Zelanda. Ambas evidencias podrían sugerir una gran especificidad de *H. tursionis* sobre *T. truncatus*. En otros odontocetos en los que se han realizado gran cantidad de estudios no se han encontrado vermes de esta especie, como *P. phocoena* y *S. coeruleoalba* (Tabla 25). En Perú se encontraron vermes de esta especie en un solo individuo de *T. truncatus* de 24 que se analizaron (van Waerebeek et al., 1990)<sup>48</sup>. Cinco de catorce *T. truncatus* varados en el Mediterráneo presentaron también *H. tursionis* (Raga et al., 1985<sup>49</sup>; Fernández et al., 1995<sup>190</sup>), uno de los cuales estaba infestado con más de 1.000 helmintos. En Nueva Zelanda se localizaron numerosos vermes de esta especie en el único *T. truncatus* analizado (Bowie, 1984)<sup>175</sup>. La prevalencia no es demasiado elevada pero, como hemos visto, se ha llegado a detectar una alta parasitación por parte esta especie.

En *Cephalorhynchus eutropia* se encontraron ejemplares de *H. tursionis* en dos ocasiones (Tabla 29). En una sólo se encontró un verme en un sólo hospedador y en la otra, un verme en un total de 23 hospedadores analizados (Figueroa, 1988<sup>173</sup>; Torres et al., 1992<sup>74</sup>, respectivamente). En el resto de hospedadores esta especie se ha localizado una vez (Tabla 29). En algunos de estos trabajos no se especifica el número de hospedadores

parasitados (Tantalean y Escalante, 1987)<sup>92</sup>, o no se analizaron todos los odontocetos que vararon (se revisaron 2 de los 15 individuos de *Steno bredanensis* que aparecieron, encontrándose 22 vermes, Forrester y Robertson, 1975<sup>40</sup>). En *G. griseus*, de los tres ejemplares necropsiados, sólo uno presentó este parásito. También se ha citado este helminto en varios ejemplares de *Delphinus delphis* en Perú. Ante la falta de datos sobre la prevalencia y abundancia de *H. tursionis* en *S. bredanensis*, *D. delphis* y *G. griseus* no podemos constatar si se trata de hospedadores facultativos. Sin embargo, sí que existen más estudios en estos tres odontocetos en diferentes regiones en los que no se menciona la parasitación por *H. tursionis* (Tabla 25).

La presencia de *H. tursionis* en la familia Phocoenidae se ha detectado una vez en tres de las cinco especies sobre las que tienen estudios parasitológicos (Tabla 29). En *Phocoena spinnipinis*, en Chile, se revisaron 18 hospedadores, encontrándose una prevalencia del 16,7%. En *P. sinus* y *Neophocaena phocaenoides* se registró la presencia de esta especie en un solo hospedador, encontrándose un pequeño número de vermes. El trabajo de Lamothe-Argumedo (1988)<sup>79</sup> constituye el único estudio helmintológico de *P. sinus* que conocemos.

En general, podemos decir que *Hadwenius* incluye tres especies que presentan un alto grado de especificidad. *H. seymouri* parasita exclusivamente a *D. leucas*, *H. delamurei* es específica de *G. melas* y *H. nipponicus* se presenta solamente en la familia Phocoenidae. El resto de especies son compartidas por dos o más familias, siendo *H. tursionis* la que parasita a un mayor número de odontocetos. Sin embargo, *H. tursionis* parece ser bastante específica de *T. truncatus*, dado el número de citas, las prevalencias y la distribución geográfica de esta especie de campúlido en dicho hospedador (Tabla 29). Las especies de odontocetos parasitados por *H. tursionis* no han registrado la presencia de otra especie de *Hadwenius*. Por otro lado, *D. leucas* se encuentra parasitado por tres especies de *Hadwenius*. Además de presentar una especie que le es exclusiva, *H. seymouri*, también se ve afectada por otras dos más, *H. mironovi*, la cual comparte con *P. phocoena*, y *H. subtilus*, que se presenta en *O. orca* y *G. melas*. En *P. phocoena* se han observado infecciones mixtas de *H. nipponicus* y *H. mironovi* (Dailey y Stroud, 1978)<sup>77</sup>.

Distribución geográfica

Se puede hablar de una distribución cosmopolita de las especies del género *Hadwenius*, puesto que, excepto en el Antártico, se reparten por los océanos Atlántico, Pacífico, Índico y Ártico (Fig. 39).

El principal responsable de este carácter cosmopolita del género es *H. tursionis*, ya que su rango de distribución se extiende desde Nueva Zelanda, pasando por el Océano Índico, los mares Negro y Mediterráneo, y las costas atlánticas y pacíficas americanas. Como ya se indicó (4.3.1.(II)), los estudios en la costa atlántica africana son nulos, a excepción de los estudios realizados en Sudáfrica. En la costa atlántica sudamericana, los estudios se han localizado fundamentalmente en localidades argentinas, en donde dos especies de *Hadwenius* fueron encontradas (*H. pontoporiae* en *P. blainvillei* y *Hadwenius* sp. en *L. obscurus*). No se tienen datos de esta especie ni en el Ártico ni en el Antártico (Tabla 29).

Tres de las especies de *Hadwenius* se localizan en hospedadores de distribución exclusiva en el Hemisferio Norte. Éstas son *H. seymouri*, *H. nipponicus* y *H. mironovi*. La presencia de *H. seymouri* se ha dado en todas las regiones por las que se distribuye su hospedador, *D. leucas*. Este cetáceo habita las aguas árticas o subárticas del globo, existiendo una pequeña población en el estuario de San Lorenzo, en Quebec (Canadá). La distribución del parásito se extiende desde el Mar de Ojotsk, en el Pacífico Norte, pasando por los mares subárticos de Barents, Kara y Blanco, hasta llegar a la parte ártica de Alaska. Los estudios sobre las belugas del estuario de San Lorenzo han revelado, igualmente, la presencia de *H. seymouri* (Tabla 29). Por contra, *H. mironovi* en *D. leucas* parece restringirse a la zona del Mar de Ojotsk, aunque se ha dado también en una beluga del Atlántico Norte (Adams y Rausch, 1989)<sup>126</sup>.

Los trabajos helmintológicos sobre *P. phocoena* son numerosos y se han realizado prácticamente en la mayoría de zonas por donde se distribuye este pequeño cetáceo (Tabla 25). Éstas son las aguas templadas y subárticas del Hemisferio Norte, encontrándose una población relegada en los mares Negro y Azov. No obstante, *H. nipponicus* se ha citado únicamente en las poblaciones norteamericanas de *P. phocoena*, incluyendo el Pacífico canadiense (Fig. 39). En *P. dalli*, *H. nipponicus* se ha registrado



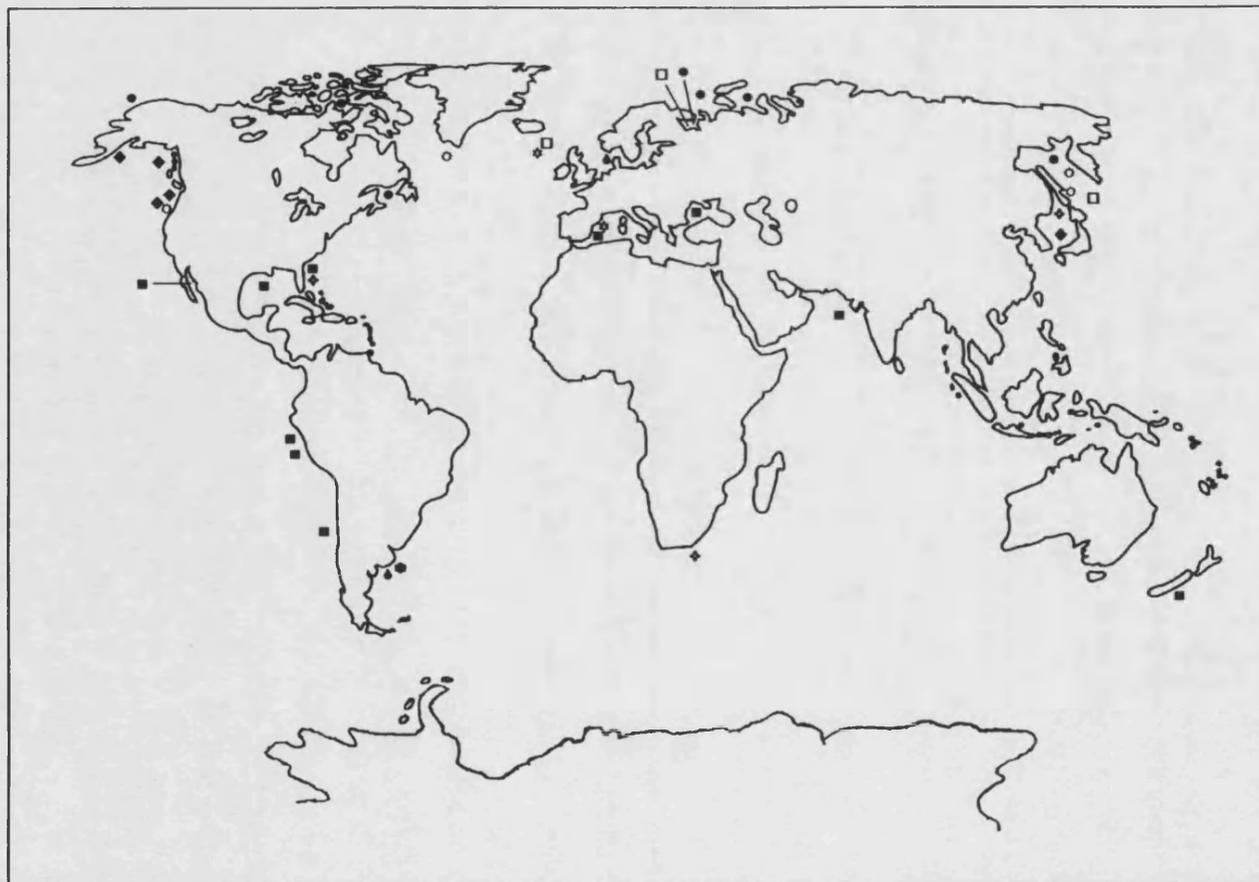


Figura 39. Distribución de las especies de *Hadwenius* (véase Tabla 29). (●) *H. seymouri*, (◆) *H. nipponicus*, (□) *H. subtilus*, (R) *H. mironovi*, (☆) *H. delamurei*, (■) *H. tursionis*, (\*) *H. pontoporiae*, (◆) *H. elongatus*, (◆) *Hadwenius* sp.

Figure 39. Scheme depicting the geographical distribution of *Hadwenius* species (see Table 29). See above symbols of *Hadwenius* species.

solamente en el Mar del Japón, aunque este hospedador se distribuye por todo el Pacífico Norte.

*IH. subtilis* se ha detectado sólo en el Hemisferio Norte, en las islas Feroe (Atlántico) y Kuriles (Pacífico) y el Mar Blanco (Subártico) (Fig. 39). El único estudio parasitológico sobre un solo hospedador de *G. melas* del Hemisferio Sur no constató la presencia de ningún campúlido (Reyes et al, 1992)<sup>30</sup>.

*IH. elongatus* se ha citado en la costa americana del Atlántico Oeste, Suráfrica y Mar del Japón.

#### 4.3.5. Género *Nasitrema*

##### Aclaración preliminar

La diferenciación entre especies de *Nasitrema* se basa en caracteres sutiles, y en gran medida arbitrarios (véase Yamaguti, 1951; Neiland et al., 1970; Appy, 1974). Esto hace que en la inmensa mayoría de trabajos parasitológicos donde se han encontrado representantes del género, éstos se han registrado como *Nasitrema* sp. Por tanto, en nuestro estudio se planteó un análisis a nivel genérico, sin entrar a concretar de qué especies se trataba en cada caso. Esto implica una pérdida sustancial de resolución, pero no interfiere en la apreciación de los patrones globales de especificidad y biogeografía.

##### Microhábitat

Las especies de este género parasitan los senos pterigoideos de sus hospedadores.

##### Especificidad

A gran escala, existe un claro patrón de especificidad del género, puesto que no se ha citado nunca en ningún mysticeto. Neiland et al. (1970) remarcaron precisamente este punto, atribuyendo la especificidad a las diferencias entre hábitos alimentarios entre ambos grupos de hospedadores. De forma similar a *Hadwenius* (Fig. 38), el género *Nasitrema* se ha registrado en un gran número de cetáceos; pero *Nasitrema* se presenta exclusivamente

en las familias Phocoenidae y Delphinidae (Tabla 30) (Fig. 40). Sin embargo, tampoco puede descartarse su presencia en otros grupos de odontocetos, puesto que en éstos se han efectuado pocos estudios en que se incluya el análisis de los senos pterigoideos.

Tabla 30. Hospedadores y localización de las especies del género *Nasitrema*. Se indican también las prevalencias y las referencias de donde proceden los datos (véase Apéndice).

Table 30. Host, locality, prevalence and reference (see Appendix) of *Nasitrema* spp. Prevalences are given as number of infected hosts/total number of hosts analysed. + indicates only presence.

| ZONA PACÍFICA E INDICA (INDO-PACIFIC REGION) |                              |             |            |
|--|------------------------------|-------------|------------|
| Hospedador                                   | Localización                 | Prevalencia | Referencia |
| <b>Phocoenidae</b>                           |                              |             |            |
| <i>Phocoenoides dalli</i>                    | 33°-34° N                    | 2/3         | 63         |
|  | Mar del Japón                | +           | 85         |
|  | Sur de California            | 3/4         | 87         |
| <i>Neophocaena phocaenoides</i>              | Mar del Japón                | +           | 85         |
|  | Costa de Japón               | +           | 81         |
|  | Batavia (East Indies)        | +           | 168        |
| <i>Phocoena spinnipinis</i>                  | Perú                         | +           | 205        |
| <b>Delphinidae</b>                           |                              |             |            |
| <i>Orcinus orca</i>                          | California                   | 1/3         | 168        |
| <i>Pseudorca crassidens</i>                  | 21° N                        | 1/1         | 168        |
|  | 33° (Japón)                  | 4/5         | 174        |
| <i>Peponocephala electra</i>                 | 31° N (Japón)                | +           | 189        |
| <i>Globicephala macrorhynchus</i>            | Mar del Japón                | +           | 85         |
|  | 32° N (California)           | 3/3         | 168        |
|  | Miyazaki (Japón) (31°-32°) N | +           | 189        |
| <i>Tursiops truncatus</i>                    | 33°-34° N                    | 0/1         | 63         |
|  | California                   | ½ y +       | 168        |
|  | Natal                        | +           | 59         |
|  | Australia                    | +           | 171        |
|  | 12°-13° S                    | 20/37       | 48         |
| <i>Stenella coeruleoalba</i>                 | Golfo Pérsico                | +           | 210        |
|  | 33°-34° N                    | 0/1         | 63         |
| <i>S. attenuata</i>                          | 7°-18° N                     | 1/3         | 100        |
|  | 22° N (California)           | 1/2         | 168        |
| <i>S. longirostris</i>                       | 7°-12° N (Pacífico Este)     | 6/7         | 100        |
|  | California                   | 0/2         | 168        |
| <i>Delphinus delphis</i>                     | 7°-12° N (Pacífico Este)     | 0/?         | 100        |
|  | 33°-34° N (California)       | 29/30       | 63         |
|  | Norte de Oregón              | 0/1         | 77         |
|  | 34° N (California)           | 7/7         | 70         |
|  | 34° N (California)           | 4/4         | 206        |
|  | 33°-34° N                    | 26/31       | 207        |
|  | Norte de Oregón              | 15/15       | 208        |
|  | 6° N                         | 87/104      | 176        |
|  | 22°-23° N                    | 14/16       | 209        |
|  | 25° N                        | 2/2         | 209        |
|  | 6°-9° N                      | 73/86       | 209        |
|  | 26° N                        | 1/5         | 168        |
|  | Pacífico Este                | 13/20       | 100        |
|  | Sur de California            | 24/37       | 87         |
| <i>D. capensis</i>                           | Perú                         | +           | 65         |
| <i>Lagenorhynchus obliquidens</i>            | 33°-34° N (California)       | 8/10        | 63         |
|  | 32°-37° N (California)       | 3/31        | 168        |
|  | 7°-14° N                     | 4/31        | 100        |
|  | Sur de California            | 9/12        | 87         |
| <i>L. obscurus</i>                           | Perú                         | +           | 179        |
| <i>Lissodelphis borealis</i>                 | 3°-34° N                     | 5/6         | 63         |
|  | 33° N                        | 1/2         | 168        |
|  | Sur de California            | 4/6         | 87         |
| <i>L. peronii</i>                            | 32°-33° S (Chile)            | 2/2         | 158        |

Continuación Tabla 30.

| ZONA ATLANTICA (ATLANTIC REGION)  |                                    |                       |            |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------|
| Hospedador                        | Localización                       | Prevalencia           | Referencia |
| <b>Delphinidae</b>                |                                    |                       |            |
| <i>Peponocephala electra</i>      | 39° S (Brasil)                     | + (en dos ejemplares) | 183        |
| <i>Feresa attenuata</i>           | 26°, 27°, 29° N                    | 3/3                   | 33         |
| <i>Globicephala melas</i>         | Tierra del Fuego (55° S)           | +                     | 182        |
| <i>Sotalia fluviatilis</i>        | Colombia                           | ++                    | 59         |
| <i>T. truncatus</i>               | Costa Atlántica Central de U.S.A.  | 11/20                 | 101        |
|                                   | Florida y Georgia (U.S.A.)         | 2/17                  | 32         |
|                                   | Bahamas                            | +                     | 59         |
|                                   | 21°-22° S (Brasil)                 | 1/4                   | 194        |
| <i>S. clymene</i>                 | 26°-28° N (Golfo de Méjico, Tejas) | 2/12                  | 202        |
| <i>S. coeruleoalba</i>            | 30° N (Florida)                    | 1/1                   | 51         |
| <i>Cephalorhynchus heavisidii</i> | Namibia                            | 1/20                  | 204        |

*Nasitrema* se ha citado en todos los géneros de focénidos y delfinidos, salvo *Grampus* y *Phocoena* (recordemos que no hay estudios en *Sousa*, *Orcaella*, *Australophocaena*). No obstante, en *Lagenodelphis hosei* sólo existen indicios de la presencia de *Nasitrema* a partir de huevos putativos (McCull y Obendorff, 1982)<sup>71</sup> y en *Cephalorhynchus heavisidii* se encontraron vermes en los senos pterigoideos, pero no se dió información sobre su identidad (Best y Abernethy, 1994)<sup>204</sup>. Aparentemente, los vermes son mayoritariamente maduros en todos los casos.

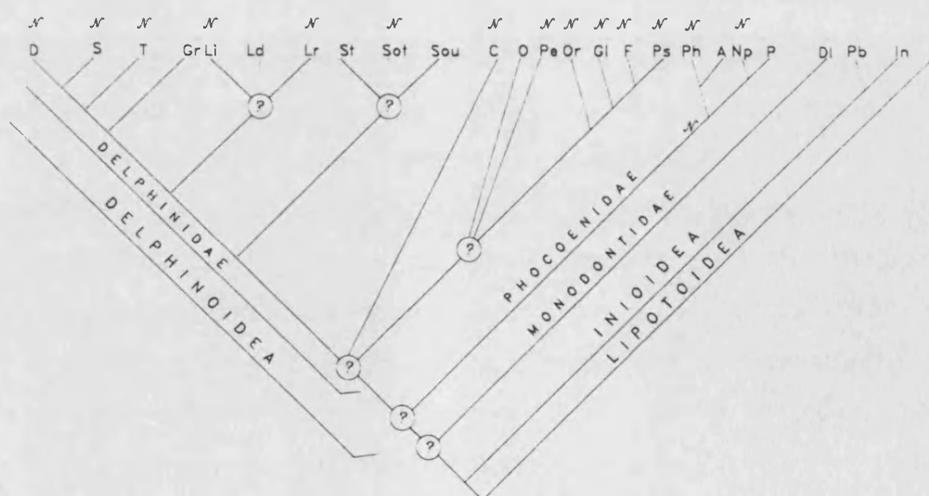


Figura 40. Presencia del género *Nasitrema* en los géneros del infraorden Delphinida (véase Tabla 30). Véanse las abreviaturas de los hospedadores en la Fig. 33. N, *Nasitrema*.

Figure 40. Occurrence of genus *Nasitrema* in their hosts (see Table 29). See abbreviations of host names in Fig. 33. N: *Nasitrema*

Las evidencias anteriores sugieren que el género *Nasitrema* no exhibe una especificidad marcada dentro de focénidos y delfínidos. Por ejemplo, especies de este género aparecen con prevalencias presumiblemente altas en Phocoenidae (*Phocoenoides dalli*, Dailey y Walker, 1978<sup>87</sup>; Cowan et al., 1986<sup>63</sup>), en Cephalorhynchinae (*Cephalorhynchus eutropia*; Brieva y Oporto, 1991<sup>172</sup>), en Globicephalinae (*Globicephala macrorhynchus*; Neiland et al., 1970<sup>168</sup>) y en Delphininae (por ejemplo, *Delphinus delphis*; Dailey, 1978; Walker et al., 1984<sup>209</sup>; Cowan et al., 1986<sup>63</sup>). Esta falta de especificidad contrasta con un patrón geográfico muy definido, como veremos en el siguiente punto.

### Distribución geográfica

El género *Nasitrema* aparece en regiones definidas donde la transmisión es alta, y de forma bastante independiente de la especie hospedadora implicada (dentro el rango de especificidad antes indicado). En términos generales, pueden distinguirse dos patrones geográficos (Fig.41):

a) Latitudinal. Todas las citas de *Nasitrema* se encuentran comprendidas entre 40°N y 40°S, salvo un registro en un único ejemplar de *Globicephala melas* en el Canal del Beagle, Tierra de Fuego (Argentina), alrededor de 55°S (Raga et al., 1994a). En consecuencia, es esperable que todas las especies de odontocetos analizadas en latitudes más altas carezcan de *Nasitrema* sp.

b) Longitudinal. El estado actual de información permite sugerir que *Nasitrema* es de carácter mayormente indopacífico (véase más abajo), donde muestra una distribución aparentemente muy amplia. Existen citas extremas de *Nasitrema* en *Tursiops truncatus* de Australia (Harris, 1982)<sup>171</sup> y el Golfo Pérsico (J.A. Raga y D. Robineau, datos no publicados)<sup>210</sup>, así como en *Stenella attenuata* en Natal (aprox. 28°S, Sudáfrica; Gibson y Harris, 1979). El resto de la región índica es prácticamente desconocido. La región del Atlántico Sudoccidental está bastante bien muestreada, y *Nasitrema* no se ha detectado hasta la fecha. Lo mismo puede decirse en el caso del Atlántico Norte Oriental, el Mediterráneo y el Ártico, donde los estudios sobre diferentes especies de odontocetos han sido bastante exhaustivos. Falta información casi absoluta sobre la costa atlántica africana, donde sólo se tienen datos de una infestación excepcional, no confirmada, de 2 ejemplares de *Nasitrema* en 1 de 20 *Cephalorhynchus heavisidii* analizados en Namibia (Best y Abernethy, 1994)<sup>204</sup>.

A grandes rasgos, pueden reconocerse hasta la fecha al menos 4 regiones donde la infestación de *Nasitrema* es frecuente o muy frecuente (Fig. 41):

1) Región del Pacífico Oriental, Norte y Central. Incluye las costas de México y Centroamérica, y, especialmente, California. Se han registrado infestaciones altas en la gran mayoría de especies analizadas de esta área para las que se disponía de tamaños muestrales apreciables: *Delphinus delphis*, *Lagenorhynchus obliquidens*, *Lissodephus borealis*, *Stenella attenuata*, *Globicephala macrorhynchus*, *Phocoenoides dalli* (véase Neiland et al., 1970<sup>168</sup>; Ridgway y Dailey, 1972<sup>70</sup>; Appy, 1974<sup>206</sup>; Dailey, 1978<sup>207</sup>; Dailey y Stroud, 1978<sup>77</sup>; Dailey y Walker, 1978<sup>87</sup>; Ridgway, 1979<sup>208</sup>; Walker y Cowan, 1981<sup>176</sup>; Dailey y Otto, 1982<sup>100</sup>; Walker et al., 1984<sup>209</sup>; Cowan et al., 1986<sup>63</sup>). Es muy probable que hacia el sur esta región continúe con la que hemos reconocido como región 2; sin embargo, existen indicios de que *Nasitrema* se hace ya escaso en las costas de Oregón, y desaparece más al norte. Así, en Oregón no se encuentra en *Steno bredanensis* (42°N, Ferrero, 1994<sup>41</sup>), *Delphinus delphis*, *Stenella coeruleoalba* ni *Grampus griseus* (Dailey y Stroud, 1978)<sup>77</sup>; tampoco se ha registrado en *Phocoena phocoena* del Pacífico canadiense (Margolis y Arai, 1989)<sup>88</sup>.

2) Región del Pacífico Oriental Meridional. Incluye el área de Perú y el Norte de Chile. Esta zona parece constituir un importante centro endémico de *Nasitrema*, como lo es en el Norte la zona de California. En Perú, se han encontrado prevalencias e intensidades altas o muy altas en *Tursiops truncatus* (Van Waerebeek et al., 1990)<sup>48</sup>, *Delphinus capensis* (Alfaro et al., 1994)<sup>65</sup> y *Lagenorhynchus obscurus* (Van Waerebeek et al., 1993)<sup>179</sup>. En Chile, vermes de este género son relativamente comunes en *Cephalorhynchus eutropia* (Brieva y Oporto, 1991)<sup>172</sup>. Como se comentó anteriormente, no es probable que esta región muestre un límite septentrional, pero sí meridional. *Nasitrema* no se ha encontrado en *Phocoena spinnipinis* de Chile (L. Brieva, Com. pers.), pero sí en Perú (Reyes y Van Waerebeek, 1995)<sup>205</sup>. El área de ausencia de *Nasitrema* se continuaría por el resto del Cono Sur (por ejemplo, aparentemente, no se ha encontrado en *Australophocaena dioptrica* en Tierra del Fuego, Goodall y Schiavini, 1995; J.A. Raga, datos no publicados), y se continuaría con la zona atlántica sudoccidental, ya que no se ha encontrado en Argentina, en *Phocoena spinnipinis* (Corcuera et al., 1995), *Lagenorhynchus obscurus* y *Delphinus delphis* (J.A. Raga, datos no publicados); ni en *Pontoporia blainvillei* (Aznar et al., 1994),

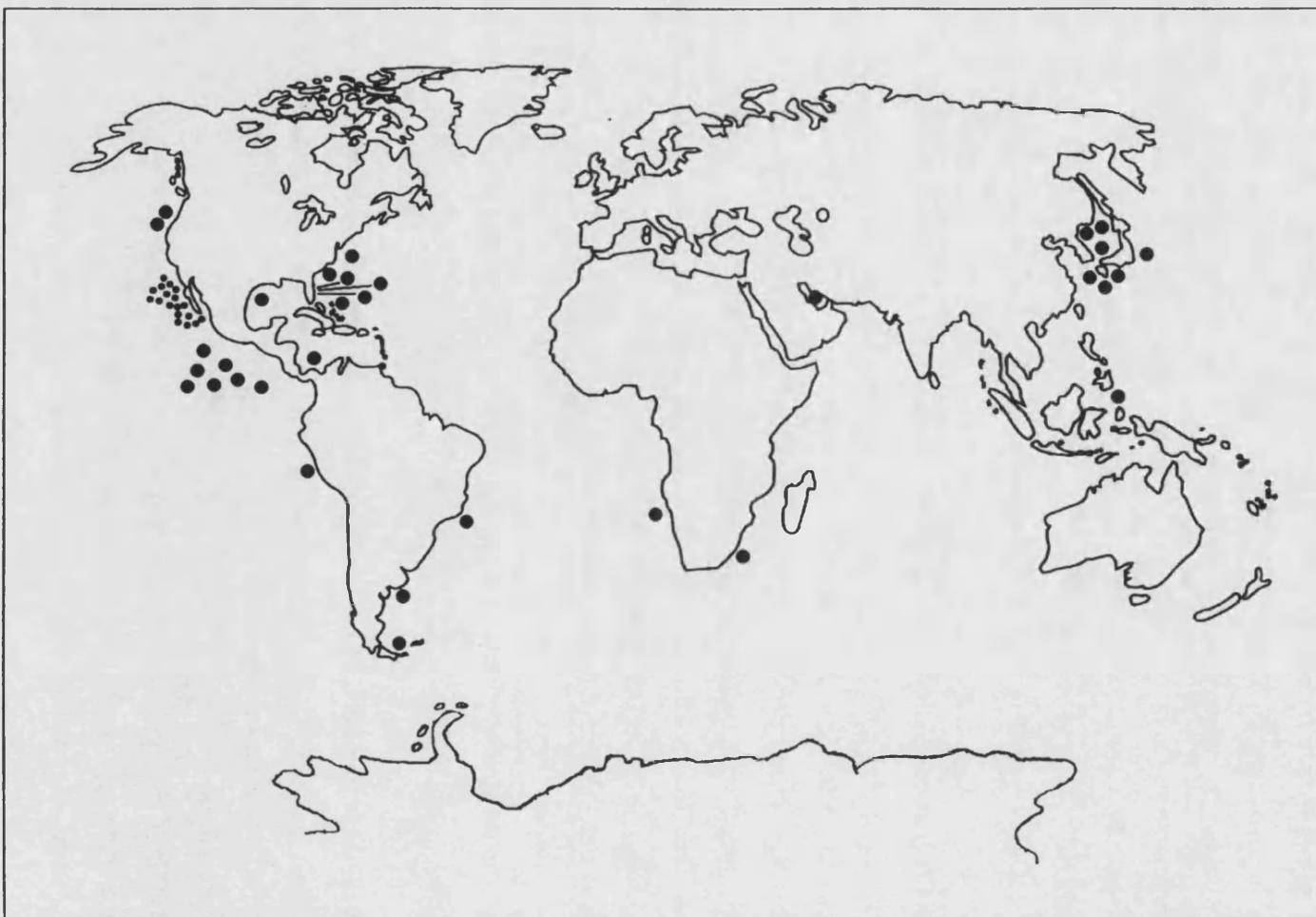


Figura 41. Distribución geográfica de *Nasitrema* spp. (véase Tabla 30).

Figure 41. Scheme depicting the geographical distribution of *Nasitrema* species (see Table 30).

aunque aquí la especificidad podría jugar un papel importante; tampoco en *Sotalia fluviatilis* de la zona sur de Brasil (Santos et al., 1996).

3) Región del Pacífico Occidental. Incluye las costas del sur de Japón. No hay estudios exhaustivos en esta área. El único trabajo en que se puede constatar que se analizó más de un hospedador es el de Morimitsu et al. (1987)<sup>174</sup>, donde *Nasitrema* apareció en 4 de 5 ejemplares de *Pseudorca crassidens* analizados. No obstante, vermes de este género se han detectado además en *Phocoenoides dalli* (Yamaguti, 1951)<sup>85</sup>, *Neophocaena phocaenoides* (Ozaki, 1935<sup>81</sup>; Yamaguti, 1951) y *Globicephala macrorhynchus* (Yamaguti, 1951; Morimitsu et al., 1986<sup>189</sup>). El límite septentrional de esta región viene definido por la ausencia probable de *Nasitrema* en *Phocoenoides dalli* de las Aleutianas (Conlongue et al., 1985). No está claro si tiene un límite meridional, o la región continúa hacia el Indico ininterrumpidamente.

4) Golfo de México y regiones adyacentes. Además del Golfo, incluye la región atlántica del sur de EE.UU, y la zona norte de Sudamérica, hasta la mitad de Brasil. Aunque hay una pléyade de especies donde se ha registrado *Nasitrema*, las infestaciones son de ligeras a moderadas. Así, por ejemplo, Mead y Potter (1990)<sup>101</sup> encontraron *Nasitrema* sp. en 11 de 20 *Tursiops truncatus* analizados en la costa sur de EE.UU., pero señalan que siempre con intensidades ligeras, lejos de las halladas en la zona de California. En la zona del Golfo de México, *Nasitrema* se ha citado en *Stenella clymene* (sólo 2 de 12 delfines, Jefferson, 1995<sup>202</sup>), *Feresa attenuata* (3 de 3, Forrester et al., 1980<sup>33</sup>), *Tursiops truncatus* (Gibson y Harris, 1979<sup>59</sup>; Zam et al., 1971<sup>32</sup>), *Sotalia fluviatilis* (Gibson y Harris, 1979)<sup>59</sup>, *Stenella coeruleoalba* (O'Shea et al., 1991)<sup>211</sup>, y quizá, *Steno bredanensis* (O'Shea et al., 1991). En la región del norte de Brasil sólo hay dos citas: Da Silva et al. (1987)<sup>183</sup> encontraron *Nasitrema* en dos ejemplares de *Peponocephala electra* (39°S) que manifestaban evidentes síntomas de enfermedad en un varamiento masivo; Santos et al. (1996)<sup>194</sup> detectaron vermes del género en 1 de 4 *Tursiops truncatus* analizados (21-22°S).

El límite septentrional de *Nasitrema* en la costa de EE.UU. viene sugerido por la ausencia de éste género en *Lagenorhynchus acutus* en Maine (Geraci et al., 1978), y en *Phocoena phocoena* u otros delfines de New England (Geraci y St. Aubin, 1979). En el sur, *Nasitrema* se hace rara en la zona central y sur de Brasil, y no se ha citado en Argentina (véase más arriba).

#### 4.3.6. Género *Zalophotrema*

##### Microhábitat

Todas las especies de este género parasitan los conductos hepático-pancreáticos de sus hospedadores.

##### Especificidad

Hasta la fecha cabe distinguir dos grupos bien diferenciados de hospedadores del género *Zalophotrema*. El primer grupo está compuesto por dos especies que parasitan pinnípedos: *Z. hepaticum* y *Z. lubimowi* (Tabla 31).

Tabla 31. Especies del género *Zalophotrema*, hospedadores a los que parasita y localidades de donde proceden las muestras. Los números indican las citas de donde se han obtenido los datos (véase Apéndice). \*: la referencia no indica la localidad, \*\*: la referencia no indica la localidad, +: Zoo de Moscú, ++ delfinario en California, \*\*delfin cautivo. P: Pacífico, A: Atlántico, E: Este.

Table 31. Species of *Zalophotrema*, with their hosts and localities of the samples. Numbers indicate the references in the Appendix. \*: information about locality was not given, +: Moscow Zoo, ++: delphinarium in California, \*\*delfin cautivo. P: Pacific, A: Atlantic, E: East.

| <i>Zalophotrema</i>    | Hospedadores   | Localidad                                      |
|------------------------|--|--|
| <i>Z. hepaticum</i>    | Delphinidae (C)<br><i>Tursiops truncatus</i>         | 163++  |
|                        | Otariidae (P)<br><i>Zalophus californianus</i>       | 19*,159*, California (P.E.100,111,112,113,165) |
|                        | <i>Eumetopias jubatus</i>                            | Pacífico E. (Oregón77, California100)          |
|                        | <i>Arctocephalus galapagoensis</i>                   | 154*, Islas Galápagos203                       |
|                        | Phocidae (P)<br><i>Phoca vitulina</i>                | 154*, California203                            |
|                        | <i>Mirounga angustirostris</i>                       | 154*, California203                            |
|                        | <i>Z. pacificum</i>                                  | Delphinidae (C)<br><i>Stenella attenuata</i>   |
| <i>S. longirostris</i> |  | Pacífico E.58,100                              |
| <i>S. coeruleoalba</i> |  | California (Pacífico E.)100                    |
| <i>Z. curilensis</i>   | Physeteridae (C)<br><i>Physeter catodon</i>          | Mar de Ojotsk27,160                            |
|                        | Otariidae (P)<br><i>Otaria byronia</i>               | 161+   |
| <i>Z. atlanticum</i>   | Delphinidae (C)<br><i>S. coeruleoalba</i>            | Islas Canarias (A.E.)56, Mediterráneo201       |
|                        | <i>Zalophotrema</i> spp.                             |  |
|                        | Delphinidae (C)<br><i>Lagenorhynchus obliquidens</i> | California (P.E.)70                            |
|                        | <i>Sotalia fluviatilis</i>                           | Amazonas150**                                  |

*Zalophotrema hepaticum* es la especie tipo del género, y se ha citado en 3 especies de otáridos, y dos de fócidos: *Zalophus californianus*, *Eumetopias jubatus*, *Arctiocephalus australis*, *Phoca vitulina* y *Mirounga angustirostris*. De acuerdo con el número de registros, y los valores de prevalencia y abundancia, *E. jubatus*, y, sobre todo, *Z. californianus*, serían los hospedadores principales de *Z. hepaticum*. Dailey (1975) consideró a *A. australis*, *P. vitulina* y *M. angustirostris* como hospedadores secundarios, que se infectarían facultativamente cuando coinciden simpátricamente con *Zalophus* (véase más abajo). Adams (1988) considera razonablemente la misma posibilidad para *Eumetopias jubatus*, puesto que en zonas más septentrionales donde se ha muestreado esta especie (Golfo de Alaska, Mar de Bering) nunca se ha encontrado *Zalophotrema*.

*Zalophotrema lubimowi* sólo se ha citado en *Otaria byronia*, en la descripción original de la especie (Tabla 31). Dado que aquélla se hizo con material obtenido de hospedadores del zoológico de Moscú, no puede aseverarse que *O. byronia* sea su hospedador natural, ni tampoco se conoce la distribución natural de esta especie.

El segundo grupo está compuesto por 3 especies que parasitan cetáceos: *Z. pacificum*, *Z. atlanticum* y *Z. curilense* (Tabla 31).

En condiciones naturales, *Zalophotrema pacificum* y *Z. atlanticum* se han descrito exclusivamente en delfines del género *Stenella*. *Z. pacificum* se encontró principalmente en *S. attenuata* y *S. longirostris* en el Pacífico Este tropical, aunque nunca con prevalencias altas (Dailey y Perrin 1973<sup>58</sup>; Dailey y Otto, 1982<sup>100</sup>). Dailey y Otto (1982) encontraron *Z. pacificum* también en *S. coeruleoalba* de la misma área, pero lo consideraron como un hospedador secundario que se habría infectado debido a la similitud en las dietas con las otras especies de *Stenella*. Existe tres citas de *Z. pacificum* en *S. attenuata* de la costa índica de Sudáfrica (Gibson y Harris, 1979<sup>59</sup>; D. I. Gibson, com. pers.). Por su parte, *Zalophotrema atlanticum* fue primeramente descrito a partir de material de un único ejemplar de *S. coeruleoalba* de las Islas Canarias (Abril et al., 1991)<sup>56</sup>. Posteriormente, Raga et al. (1991)<sup>201</sup> descubrieron altas prevalencias de *Zalophotrema* sp. (*Z. atlanticum*, datos no publicados), en *S. coeruleoalba* del Mediterráneo Occidental.

En las restantes especies de *Stenella* que ha sido analizadas, *S. frontalis*, y *S. clymene*, exclusivas del Atlántico tropical, no se citaron especies del género *Zalophotrema* (Zam et al., 1971<sup>132</sup>; Jefferson, 1995<sup>202</sup>).

Existen otras citas de *Zalophotrema* en delfines, pero, o bien son dudosas o excepcionales, o bien se trata de registros en hospedadores mantenidos en condiciones de cautiverio. Ridgway y Dailey (1972)<sup>70</sup> encontraron huevos putativos de *Zalophotrema* sp. (debido a su sección transversal redondeada) en lesiones cerebrales necróticas de un ejemplar de *Lagenorhynchus obliquidens*. Este tipo de lesiones están normalmente asociadas a *Nasitrema* spp., pero los huevos de este género son de sección triangular. Se ha explicado la presencia de huevos de *Zalophotrema* en un lugar tan inusual como consecuencia de su transporte por el sistema circulatorio (Dailey y Walker, 1978). Por otra parte, Brown et al. (1960)<sup>163</sup> encontraron *Zalophotrema hepaticum* en una hembra de *Tursiops truncatus* en un delfinario de California. Nótese que la especie es propia de pinnípedos, y la presencia en un delfín mular pudo venir determinada por el tipo y origen del alimento.

La descripción original de *Zalophotrema curilensis* en el cachalote (*Physeter catodon*), en el área de las Islas Kuriles del mar de Ojotsk, es la única cita de esta especie hasta la fecha. Todas las menciones posteriores de esta especie son repeticiones de la cita original (Delyamure 1955, 1961; Berzin, 1972). Podría resultar razonable, por la abundancia de citas, que haya habido capturas de hospedador de *Zalophotrema* entre cetáceos y pinnípedos, como discutiremos más adelante (véase también el caso de *Orthosplanchnus*). Sin embargo, la aparición de *Z. curilensis* en el cachalote implica una distribución del género muy incongruente dentro de los hospedadores cetáceos. Esta incongruencia muy difícilmente puede asociarse a errores de muestreo (véase Tabla 25). Es decir, aunque nunca puede descartarse el carácter relicto de *Zalophotrema* dentro de los fisetéridos, la hipótesis parece muy poco parsimoniosa. Otras alternativas son (i) en el área de Ojotsk ha habido una captura de hospedador (cachalote) de *Zalophotrema* desde un hospedador cetáceo/pinnípedo (ii) *Z. curilensis* no pertenece al género *Zalophotrema*.

La alternativa (i) supondría un caso de especiación del parásito no acompañada por especiación del hospedador (Brooks, 1979). No obstante, las asociaciones por colonización (es decir, el establecimiento y especiación de una

especie de *Zalophotrema* en *P. catodon*) exhiben un claro componente estocástico, pero son netamente dependientes de interacciones tróficas prolongadas (Hoberg, 1987). En este sentido, resulta difícil imaginar cómo se han podido establecer conexiones tróficas estables entre grupos con regímenes y comportamientos alimentarios tan diversos (Martin, 1990). Otra posibilidad más convincente es que *Z. curilensis* sea otra especie de *Zalophotrema*, propia de *Stenella* (muy abundante en el área), que exhibe diferencias morfométricas por un efecto de la especie hospedadora.

La alternativa (ii) no resulta muy convincente, dada la similitud morfológica de *Z. curilensis* con las otras especies de *Zalophotrema*, al menos desde el punto de vista de los caracteres morfológicos considerados como filogenéticamente importantes (Delyamure 1955; Abril et al. 1991). El problema podría residir en la propia caracterización de *Zalophotrema* como género, que es un aspecto que se tratará en la discusión de este apartado.

#### Distribución geográfica

Dailey (1975) reconoce un área endémica de infestación de *Z. hepaticum* que comprende el rango más meridional de *Zalophus*, en aguas de Baja California (Fig. 43). Es en dicha zona donde *P. vitulina* y *M. angustirostris* podrían infestarse. El área de distribución de *Z. hepaticum* se extendería hacia las Galápagos, donde también podría infestar a *Arcthocephalus australis galapagoensis* debido a que ésta especie y *Z. californianus* exhiben altas concentraciones poblacionales en dichas islas (Fig. 42).

Hay una notable escasez de datos que cubran toda el área de distribución de las especies de *Stenella* que son hospedadores de *Z. pacificum* y *Z. atlanticum*. Por ejemplo, no existen estudios parasitológicos de *S. attenuata* y *S. longirostris* en el Atlántico. A juzgar por los datos existentes, ambas especies de parásitos podrían exhibir una distribución alopátrica o parapátrica, siendo *Z. pacificum* de carácter indopacífico, y *Z. atlanticum*, atlántico.

Como se comentó anteriormente, *Zalophotrema curilensis* sólo se ha citado en el Pacífico Norte Occidental, en una ocasión.

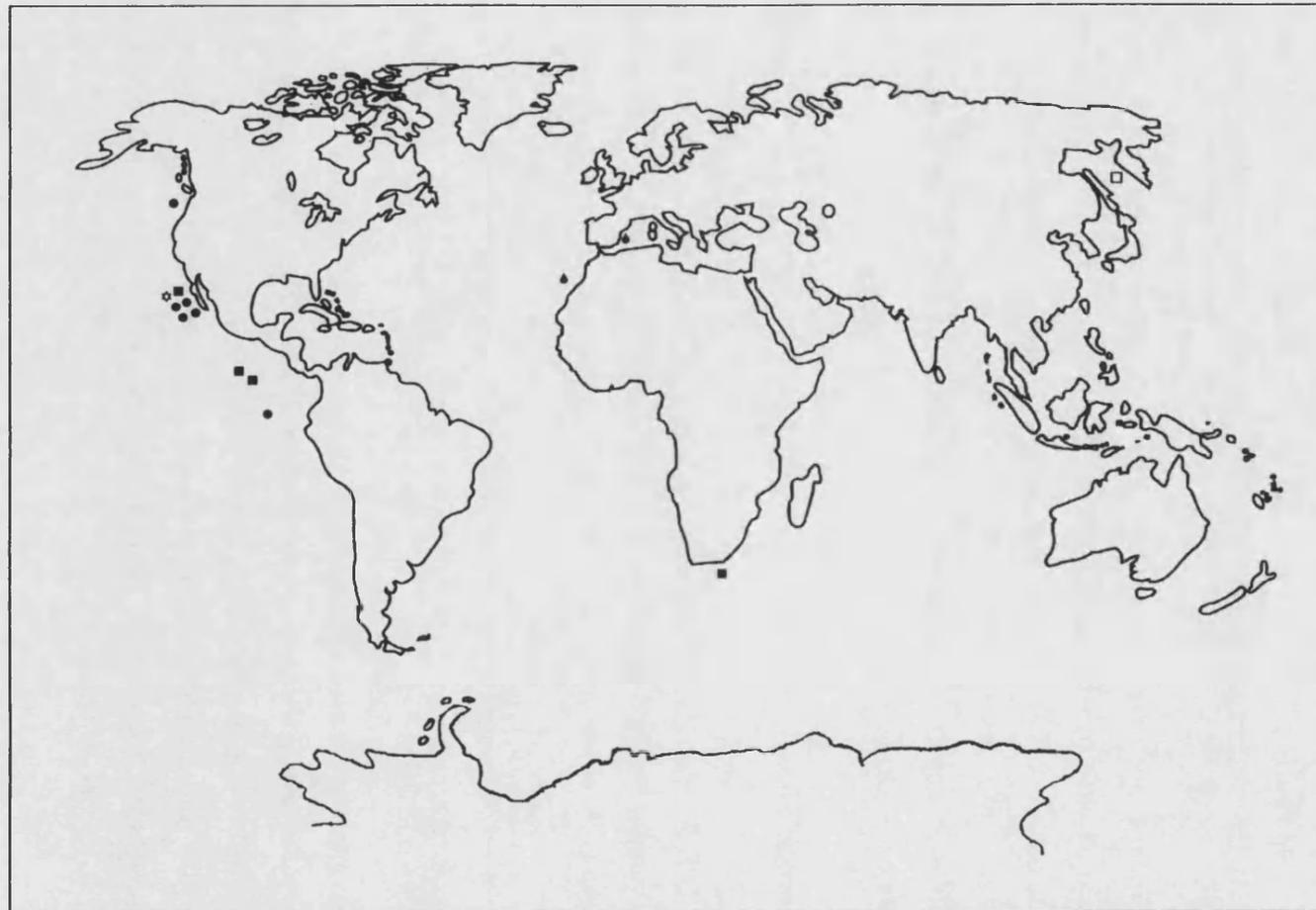


Figura 42. Distribución de las especies de *Zalophotrema* (véase Tabla 31). (●) *Z. hepaticum*, (■) *Z. pacificum*, (□) *Z. curilensis*, (⊙) *Z. lubimowi*, (◆) *Z. atlanticum*, (☆) *Zalophotrema* sp.

Figure 42. Scheme depicting the geographical distribution of *Zalophotrema* species (see Table 31). See above symbols of *Zalophotrema* species.

#### 4.3.7. Género *Campula*

##### Microhábitat

Todas las especies que constituyen este género parasitan los conductos hepato-pancreáticos de sus hospedadores.

##### Especificidad

Las especies del género *Campula* parasitan a miembros de la superfamilia Delphinoidea, concretamente a odontocetos de las familias Delphinidae y Phocoenidae (Tabla 32) (Fig. 43). No hay evidencias de la presencia de *Campula* en la familia Monodontidae, puesto que los numerosos estudios sobre la única especie analizada en este grupo, *Delphinapterus leucas*, han revelado la presencia de campúlidos, pero no del género *Campula* (Tablas 29 y 34). De las subfamilias de Delphinidae reconocidas por de Muizon (1988), Delphininae, Cephalorhynchinae y Globicephalinae, sólo esta última no presenta ninguna especie en la que se haya citado *Campula* (Fig. 43), a pesar de que se han realizado estudios helmintológicos en todos sus miembros, a excepción de *Peponocephala electra*. En los géneros del resto de subfamilias, excepto en *Lissodelphis*, *Lagenorhynchus* y *Sotalia*, se ha registrado este campúlido (Tabla 32). En *Sousa* no se ha llevado a cabo ningún estudio helmintológico (Tabla 25).

*C. oblonga* parasita casi exclusivamente a miembros de la familia Phocoenidae, concretamente *Phocoena phocoena*, y *Phocoenoides dalli*. El gran número de citas y las prevalencias de *C. oblonga* en estos hospedadores muestran que existe gran especificidad. No obstante, en comparación con el resto de Phocoenidae, sobre estas dos especies se han llevado a cabo un mayor número de estudios de tipo parasitológico, (Tabla 25). En delfinidos, *C. oblonga* solamente se ha citado una sola vez, concretamente en *Tursiops truncatus*, (en 2 de 53 ejemplares analizados) (Tabla 32).

*C. folium* se ha citado una única vez en *Neophocaena phocaenoides*, miembro de la familia Phocoenidae (Tabla 32). Esta cita corresponde a la descripción original, basada en 13 vermes encontrados en un único hospedador (Ozaki, 1935)<sup>81</sup>. Dos

## Filogenia y biogeografía de Campulidae

Tabla 32. Especies del género *Campula*, hospedadores en los que se encuentra y localidad de donde proceden las muestras. Los números indican las referencias de donde se han obtenido los datos (véase Apéndice). N: Norte, S.: Sur, E.: Este, O: Oeste. A: Atlántico, P: Pacífico. \* Las referencias no indican la localidad.

Table 32. *Campula* species, hosts and geographic locality of the samples. Numbers indicate the references where the data proceed (see Appendix). N: North, S: South, E: East, O: West, A: Atlantic, P: Pacific. \*: the references do not indicate the locality.

| <i>Campula</i>       | Familias                       | Localidad  |
|----------------------|--------------------------------|--|
| <i>C. oblonga</i>    | <b>Delphinidae</b>             |  |
|                      | <i>Tursiops truncatus</i>      | N.O. Florida (A.O.)32  |
|                      | <b>Phocoenidae</b>             |  |
|                      | <i>Phocoena phocoena</i>       | 151*,166*, Mar de Irlanda59,93, Mar del Norte (Dinamarca89, Holanda90,94, Gran Bretaña59,93), Mar Negro y Mar de Azov15, Atlántico88,19 y Pacífico88, Nueva Inglaterra (A.N.)69, Francia (A.N.)60, Oregón (P.E.)77, Pacífico N.O.64, Alaska132 |
|                      | <i>Phocoenoides dalli</i>      | Islas Aleutianas (P.N.)83, California (P.E.)61,63,86,149, Mar de Japón (P.O.)85, Pacífico88  |
| <i>C. delphini</i>   | <b>Delphinidae</b>             |  |
|                      | <i>T. truncatus</i>            | Florida (A.O.)32   |
|                      | <i>Delphinus delphis</i>       | 152*, 15*, Mediterráneo O.50   |
|                      | <i>Stenella coeruleoalba</i>   | Mediterráneo O.50  |
| <i>C. palliata</i>   | <b>Delphinidae</b>             |  |
|                      | <i>T. truncatus</i>            | Florida (A.O.)32,46  |
|                      | <i>D. delphis</i>              | 151*,166*, Mar Negro15,27, Francia (A.E.)60  |
|                      | <i>S. coeruleoalba</i>         | Mediterráneo54,55,102  |
|                      | <i>S. frontalis</i>            | Florida (A.O.)32   |
|                      | <i>Steno bredanensis</i>       | Golfo de Méjico40  |
|                      | <i>Grampus griseus</i>         | Florida (A.O.)32   |
| <i>C. rochebruni</i> | <b>Delphinidae</b>             |  |
|                      | <i>D. delphis</i>              | 152*, California (P.E.)61,62,63,70,100, Costas Británicas195   |
|                      | <i>S. coeruleoalba</i>         | Mediterráneo54,102,167   |
|                      | <i>S. attenuata</i>            | Pacífico E.58, S. Africa59   |
|                      | <i>S. longirostris</i>         | Pacífico E.58  |
| <i>C. follum</i>     | <b>Phocoenidae</b>             |  |
|                      | <i>N. phocaenoides</i>         | Mar de Japón (P.O.)81  |
| <i>Campula</i> sp.   | <b>Delphinidae</b>             |  |
|                      | <i>Lagenodelphis hosei</i>     | Australia71  |
|                      | <i>Tursiops truncatus</i>      | Atlántico O.101  |
|                      | <i>D. delphis</i>              | Pacífico E.100   |
|                      | <i>S. coeruleoalba</i>         | Pacífico E.100   |
|                      | <i>Cephalorhynchus hectori</i> | Nueva Zelanda72  |

motivos nos han llevado a considerar con cautela la validez de esta especie. En primer lugar, la descripción original es la única cita que existe, y está basada en vermes encontrados en un solo individuo hospedador (Ozaki, 1935). Segundo, a pesar de que Ozaki (1935) reconoció la gran similitud entre los especímenes que él describió, y *C. oblonga*, las diferencias en las dimensiones de los testículos y en la anchura del cuerpo entre ambas especies le llevaron a erigir una nueva especie, *C. folium*. Sin embargo, esta adscripción es dudosa puesto que dichas diferencias pueden reflejar simplemente el diferente desarrollo que pueden sufrir ciertas estructuras a lo largo del crecimiento del animal. A falta de más datos, consideramos prudente considerar el estatus de estos especímenes con ciertas reservas.

Las tres especies restantes, *C. delphini*, *C. palliata* y *C. rochebruni*, parasitan exclusivamente a delfínidos, especialmente a *D. delphis*, *S. coeruleoalba* y *T. truncatus* (Fig. 43). Las prevalencias de *C. delphini* en estas tres especies son relativamente bajas. Zam et al. (1971)<sup>32</sup> examinaron 53 *T. truncatus* de los que sólo 2 se vieron afectados por *C. delphini* (3,8% de prevalencia). En *D. delphis* y *S. coeruleoalba* las prevalencias fueron de 6,7% (1 de 15) y 60% (3 de 5), respectivamente (Hörning y Pilleri, 1969)<sup>50</sup>.

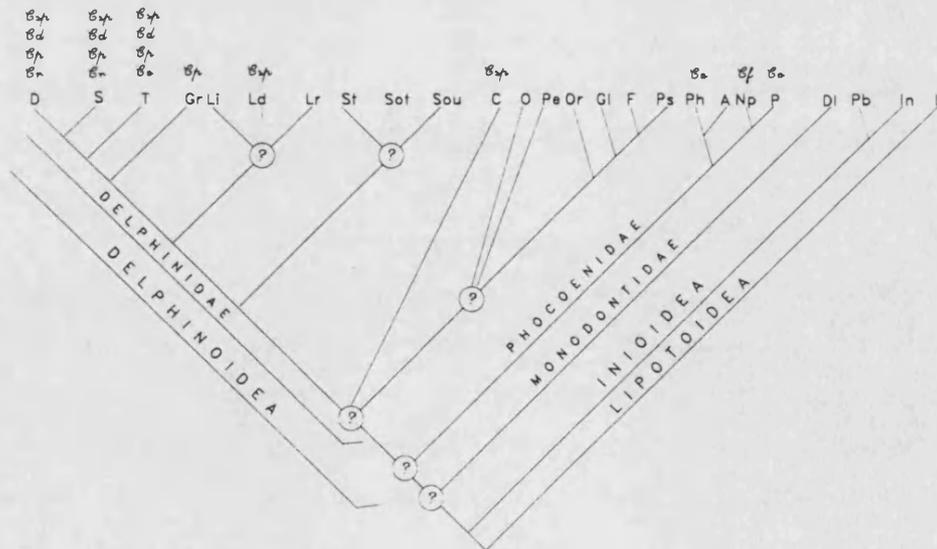


Figura 43. Presencia de las especies de *Campula* en los géneros del infraorden Delphinida (véase Tabla 31). Véanse los nombres de los hospedadores en la Tabla 32. Cd, *C. delphini*, Cf, *C. folium*, Co, *C. oblonga*, Cp, *C. palliata*, Cr, *C. rochebruni*, Csp, *Campula* sp.

Figure 43. Occurrence of *Campula* species in genera of infraorder Delphinida (see Table 31). See above names of *Campula* species and host names in Table 32.

*C. palliata* se ha citado en 6 especies de odontocetos (Tabla 32). En el caso de *D. delphis* no disponemos de datos de prevalencias. Únicamente Raga et al. (1987)<sup>60</sup> indicaron que se examinó un *D. delphis*. Las prevalencias de *C. palliata* en *S. coeruleoalba* fueron del 42,85% (6 de 14, Manfredi et al., 1992)<sup>54</sup> y 10% (1 de 10) (Raga y Carbonell (1985)<sup>55</sup>. En *T. truncatus* se ha citado *C. palliata* en dos ocasiones, con prevalencias de 5,7% (3 de 53) (Zam et al., 1971)<sup>32</sup> y 29,2% (7 de 24) (Woodard et al., 1969)<sup>46</sup>. En otras especies de delfínidos, *Steno bredanensis*, *Grampus griseus* y *S. frontalis*, este campúlido se ha registrado una sola vez, siendo las prevalencias variables. En *S. bredanensis*, los 2 ejemplares examinados estaban parasitados (Forrester y Robertson, 1975)<sup>40</sup>. En el caso de *G. griseus*, un 33,3% de los hospedadores (1 de 3) presentaron esta especie de helminto (Zam et al., 1971)<sup>32</sup>, mientras que en *S. frontalis*, el 11,8% de los hospedadores (2 de 17) presentó este digénido (Zam et al., 1971)<sup>32</sup>. Parece ser que estos odontocetos se asocian con otras especies de cetáceos a la hora de alimentarse (Martin, 1990). Así, *S. bredanensis* se asocia en ocasiones con *T. truncatus*, *S. attenuata*, *S. longirostris* y *G. melas*. En el caso de *T. truncatus*, esta asociación se ha citado con *P. crassidens* y *G. melas*. *S. frontalis* coincide geográficamente con otros congéneres y *G. griseus* forma asociaciones mixtas con otras especies de delfines (Martin, 1990). Las citas de *C. palliata* en estas cuatro últimas especies de odontocetos se registraron en una misma área geográfica. *S. bredanensis* en el Golfo de Méjico y las otras tres especies en Florida. Todo ello podría hacer pensar que estos cetáceos se han infestado por vermes de esta especie, dada esa tendencia a asociarse con otras especies a la hora de alimentarse en una misma zona geográfica.

*C. rochebruni* se presenta en *D. delphis* y en tres especies del género *Stenella*, *S. coeruleoalba*, *S. attenuata* y *S. longirostris* (Tabla 32). En todos los hospedadores son varias las citas de *C. rochebruni*, pero en *D. delphis* y *S. coeruleoalba* son en las que se ha registrado la presencia de este campúlido en mayor número de ocasiones (Tabla 32), además de presentarse prevalencias variables, aunque en ocasiones resultaron bastante elevadas en ambos hospedadores. Así, en *D. delphis*, se han indicado prevalencias del 62,1% (23 de 37, Dailey, 1989)<sup>61</sup>, 76,7% (23 de 30, Cowan et al., 1986)<sup>63</sup>, 42,9% (3 de 7) (Ridgway y Dailey, 1972)<sup>70</sup> y 12% (8 de 65) (Dailey y Otto, 1982)<sup>100</sup>. Manfredi et al. (1992)<sup>54</sup> encontraron una prevalencia del 85,71% (12 de 14) en *S. coeruleoalba*. En *S. attenuata* y *S. longirostris*, Dailey y Perrin (1973)<sup>58</sup>

señalaron una prevalencia del 3,9% (2 *S. attenuata* y 1 *S. longirostris*, de un total de 78. Estos autores no especifican el total de delfines de cada una de las especies).

Según lo expuesto anteriormente, parece haberse producido una gran diversificación de *Campula* (*C. delphini*, *C. palliata* y *C. rochebruni*) en tres géneros de Delphinidae: *Delphinus*, *Stenella* y *Tursiops*, pero especialmente en los dos primeros (Fig. 43). Podría existir un sesgo en la especificidad real de estas especies, ya que existe un mayor número de trabajos sobre *D. delphis* y *S. coeruleoalba* respecto al resto de odontocetos en los que se presentan las especies de *Campula* (Tabla 32). Sin embargo, las prevalencias sugieren que las especies anteriores de *Campula*, especialmente *C. rochebruni*, ejercen una importante parasitación en *D. delphis* y *S. coeruleoalba* (véase más arriba). Además, los estudios sobre otros delfínidos, como *Lissodelphis* y *Lagenorhynchus*, se han realizado a partir un número de hospedadores nada despreciable (10 *Lagenorhynchus obliquidens* y 6 *Lissodelphis borealis*, Cowan et al., 1989<sup>63</sup>; 12 *Lagenorhynchus obliquidens* y 6 *Lissodelphis borealis*, Dailey, 1989<sup>61</sup>), sin demostrarse la presencia de *Campula*. En *Sotalia* tampoco se ha citado este campúlido.

Existen citas sobre la presencia de ejemplares de *Campula*, que no se llegaron a identificar a nivel de especie, en *Tursiops truncatus* (Mead y Potter, 1990), *Stenella coeruleoalba* (Dailey y Otto, 1982) y *Delphinus delphis* (Dailey y Otto, 1982). Tampoco se llegó al nivel de especie en la identificación de ejemplares de *Campula* en *Lagenodelphis hosei* y *Cephalorhynchus hectori* (Hutton et al., 1987)<sup>72</sup>, constituyendo estas últimas, las únicas citas de la presencia de *Campula* en estas especies de delfínidos.

### Distribución geográfica

Las especies del género *Campula* se distribuyen mundialmente, excepto por las zonas circumpolares (Fig. 44). En principio, los datos apuntan hacia una mayor abundancia de estas especies en el Hemisferio Norte. Del total de 57 trabajos helmintológicos sobre especies de delfínidos en los que se ha detectado alguna vez alguna especie de *Campula* (Tabla 32), 49 se realizaron en regiones del Hemisferio Norte (86%), mientras que sólo 8 se llevaron a cabo en el Hemisferio Sur (14%). De los 49 trabajos realizados en el Hemisferio Norte, en 37 (75,5%) se encontraron

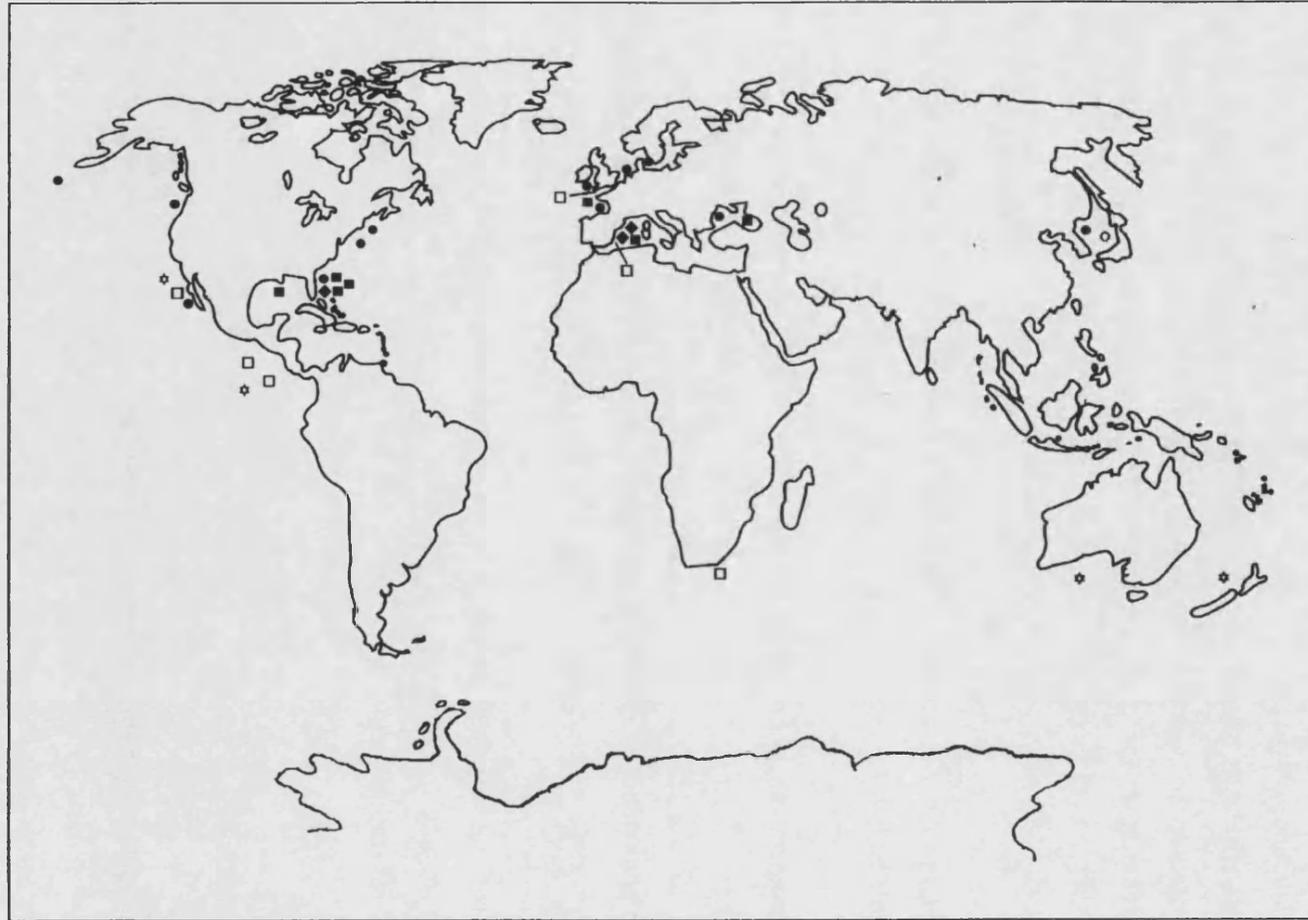


Fig. 44. Distribución de las especies de *Campula* (véase Tabla 32). (●) *C. oblonga*, (◆) *C. delphini*, (■) *C. palliata*, (□) *C. rochebruni*, (⊙) *C. folium*, (☆) *Campula* sp.

Fig. 44. Scheme depicting the geographical distribution of *Campula* species (see Table 32). See above symbols of *Campula* species.

especies de *Campula*. De los 8 estudios en el Hemisferio Sur, en 6 (75%) se registró la parasitación por las especies de *Campula*. Como podemos observar, el porcentaje de presencia de las especies de *Campula* es similar (alrededor del 75%), pero existe una gran diferencia respecto al número de citas en ambos hemisferios. Por ello, no puede aseverarse que exista una mayor presencia de *Campula* en el Hemisferio Norte. Respecto a las especies de Phocoenidae, sólo las que se distribuyen por el Hemisferio Norte son las que se encuentran parasitadas por las especies de *Campula*: *Phocoena phocoena*, *Phocoenoides dalli* y *Neophocaena phocaenoides*. No se tiene constancia de la presencia de *Campula* en las dos especies meridionales de las que se tienen referencias, *Phocoena sinus* y *P. spinnipinis*. Sin embargo, el único trabajo sobre *P. sinus* (véase Lamothe-Argumedo, 1988)<sup>79</sup> indica únicamente la aparición de una especie de *Hadwenius* en el intestino, pero no señala si se revisó el hígado. En el caso de *P. spinnipinis*, todos los órganos fueron examinados. Dada la ausencia de trabajos helmintológicos sobre otro de los focénidos que se distribuye por el Hemisferio Sur, *Australophocaena dioptrica*, no podemos asegurar que *Campula* no se encuentra en los Phocoenidae del Hemisferio Austral.

Los miembros de *C. oblonga* parecen ser bastante específicos. Casi todos los registros se han dado en miembros de la familia Phocoenidae (Tabla 32). Se ha encontrado *C. oblonga* en todas las regiones por las que se distribuye *P. phocoena*: aguas templadas y subárticas del Hemisferio Norte, y los mares Negro y Azov. La distribución de *P. dalli* se restringe al Pacífico Norte, en donde también se han dado abundantes citas de esta especie. Aparentemente, los helmintos siguen la distribución geográfica de sus hospedadores. La presencia de *C. oblonga* en *T. truncatus* está avalada por una sola cita, lo cual hace pensar en que se trata de un hecho accidental.

Todas las citas sobre *C. palliata*, *C. rochebruni* y *C. delphini* en *S. coeruleoalba* son del Mediterráneo. Podría existir un sesgo en la distribución real de estas especies, ya que existen pocos estudios helmintológicos de *S. coeruleoalba* en otras zonas (Tabla 32).

#### 4.3.8. Género *Oschmarinella*

##### Microhábitat

Las especies que constituyen este género parasitan los conductos hepato-pancreáticos de sus hospedadores.

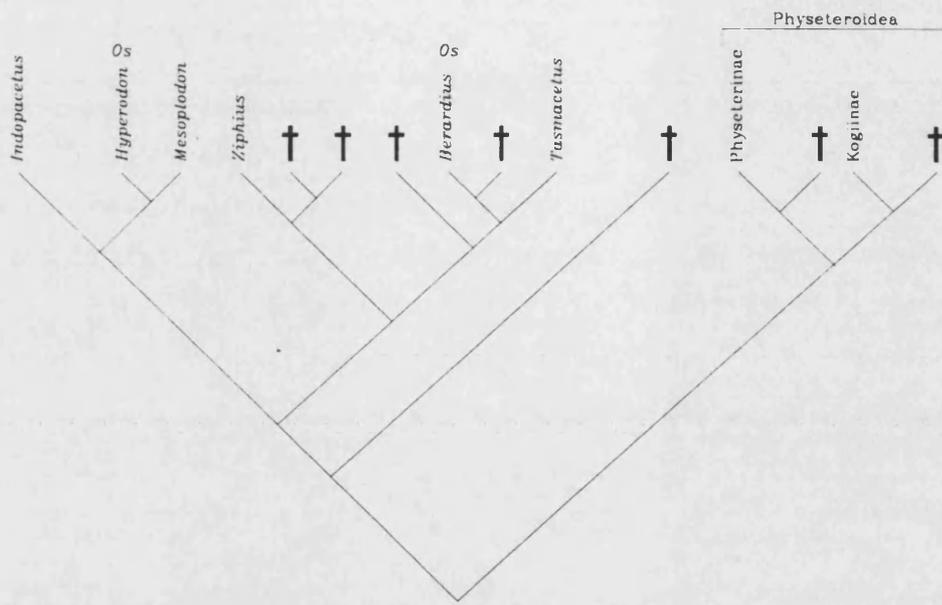
##### Especificidad

Tres especies componen el género *Oschmarinella*: *O. sobolevi*, que parasita exclusivamente a odontocetos de la familia Ziphiidae, *O. laevicaecum* y *O. mascomai*, que parasitan a delfínidos (Tabla 33) (Fig. 45). La cita de *O. sobolevi* en *Berardius bairdii* no es la original, puesto que solamente hemos encontrado la referencia de Delyamure (1961)<sup>27</sup>. Este autor no menciona la procedencia de dicha cita, pudiéndose tratar de datos del propio autor, sin indicar ningún parámetro de infestación. Raga (1986)<sup>57</sup> describió la especie *O. mascomai* a partir de cinco vermes de un solo individuo de *Stenella coeruleoalba*, no indicándose el número total de vermes que se hallaron. Posteriormente, se halló en un 58,8% (51 hospedadores analizados) en la misma especie (Raga et al., 1991). De forma similar, Yamaguti (1942)<sup>38</sup> basó la descripción de *O. laevicaecum* (entonces *Campula laevicaecum*) en cinco campúlidos procedentes de un solo individuo de *Stenella longirostris*. En el caso de *O. laevicaecum* en *Lagenorhynchus acutus*, se encontró una prevalencia relativamente elevada, puesto que aparecieron parasitados 18 de los 37 delfines que se examinaron (48,7%) (Beverley-Burton, 1978)<sup>67</sup>. En el resto de citas no se indicaron datos de prevalencia.

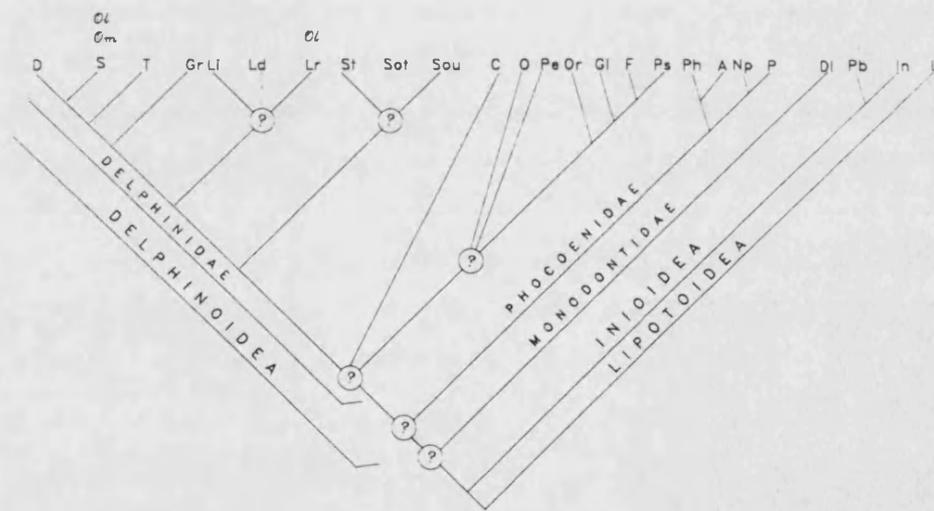
Tabla 33. Especies del género *Oschmarinella*, hospedadores a los que parasita y localidades de donde proceden las muestras. Los números indican las citas de donde se han obtenido los datos (véase Apéndice). A.: Atlántico, O: Oeste, P: Pacífico.

Table 33. *Oschmarinella* species, hosts and geographic locality of the samples. Numbers indicate the references where the data proceed (see Appendix). A: Atlantic, O: West, P: Pacific.

| <i>Oschmarinella</i>  | Hospedadores                 | Localidad   |
|-----------------------|------------------------------|---|
| <i>O. sobolevi</i>    | Ziphiidae                    |   |
|                       | <i>Berardius bairdii</i>     | Mar de Ojotsk (P.O.) <sup>27</sup>                          |
|                       | <i>Hyperoodon ampullatus</i> | Pacífico <sup>29</sup>                                      |
| <i>O. laevicaecum</i> | Delphinidae                  |   |
|                       | <i>Lagenorhynchus acutus</i> | Maine (A.O.) <sup>67</sup> , Nueva Inglaterra <sup>69</sup> |
|                       | <i>Stenella longirostris</i> | Japón (P. O.) <sup>38</sup>                                 |
| <i>O. mascomai</i>    | Delphinidae                  |   |
|                       | <i>S. coeruleoalba</i>       | Mediterráneo O. <sup>57,201</sup>                           |



A



B

Figura 45 (A) y (B). Presencia de las especies de *Oschmarinella* en Ziphiidae y Delphinidae (véase Tabla 33). Véanse los nombres de los hospedadores en la Fig. 33. Ol: *O. laevicaecum*, Om: *O. mascomai*, Os: *O. sobolevi*. Las cruces en la filogenia (A) indican taxones extintos.

Figure 45 (A) and (B). Occurrence of *Oschmarinella* species in Ziphiidae y Delphiniidae (see Table 33). Crosses in phylogeny (A) indicate extinct.

Distribución geográfica

Salvo la presencia de *O. mascomai* en el Mediterráneo, las citas de las otras dos especies se han dado en el Pacífico Norte y Atlántico Norte (Fig. 47). Skrjabin (1947) citó *O. sobolevi* en *Hyperoodon rostratus* (= *ampullatus*) en el Pacífico. Sorprendentemente, este odontoceto se distribuye únicamente por el Atlántico Norte. Quizá se trate de una confusión en la especie hospedadora.

**4.3.9. Género *Orthosplanchnus***Microhábitat

Las especies de *Orthosplanchnus* aparecen en los conductos hepato-pancreáticos de pinnípedos. *O. fraterculus* se encuentra generalmente en la vesícula biliar de la nutria marina, *Enhydra lutris*. Algunas especies de este género se han encontrado en el intestino de mamíferos marinos, pero según Adams (1988), la presencia en este órgano podría ser consecuencia de la migración desde el hígado posteriormente a la muerte del hospedador. Este hecho fue previamente sugerido por Beverley-Burton (1972) respecto a *O. antarcticus*, parásito de la foca de Weddell, *Leptonichotes weddelli*.

Sistemática, especificidad y distribución geográfica

Estos aspectos se tratarán conjuntamente para una mejor comprensión de los patrones.

Hasta la fecha se han descrito 7 especies dentro del género *Orthosplanchnus*: *O. arcticus*, *O. fraterculus*, *O. rossicus*, *O. oculatus*, *O. pygmaeus*, *O. albamarinus* y *O. antarcticus* (ya se comentó que *O. sudarikovi* era un *incertae sedis*, véase apartado 1.1.2.). Los hospedadores principales de este género son pinnípedos, aunque también se han citado en cetáceos y la nutria marina (*Enhydra lutris*) (Tabla 34) (Fig. 47).

*O. arcticus* es la especie más extendida del género. De acuerdo con sus valores de prevalencia y abundancia, este parásito aparece mayoritariamente en especies de la subfamilia Phocinae: *Erignathus barbatus* y *Phoca hispida* (Tabla 34;

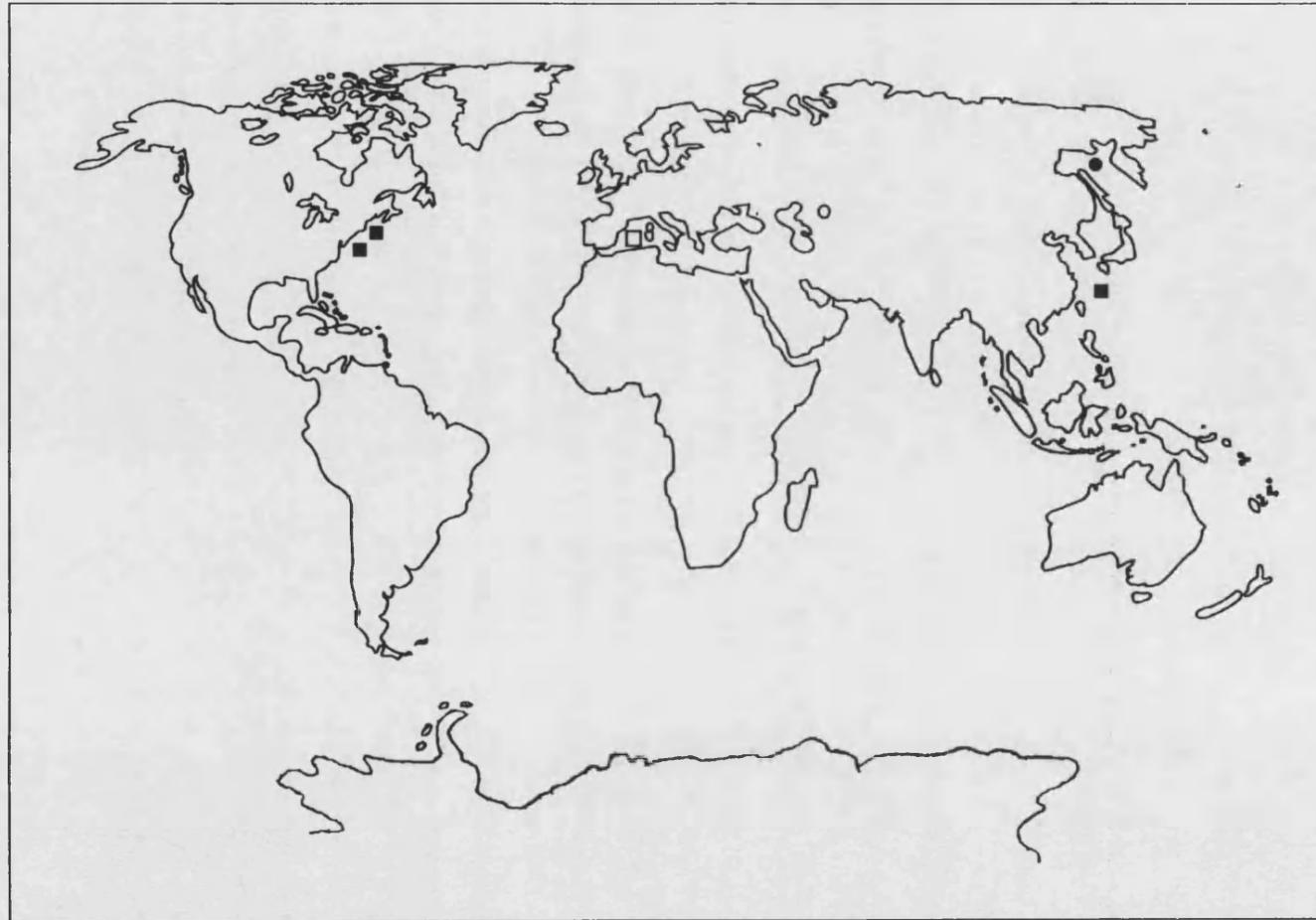


Figura 46. Distribución de las especies de *Oschmarinella* (véase Tabla 33). (●) *O. sobolevi*, (■) *O. laevicaecum*, (□) *O. mascomai*.

Figure 46. Scheme depicting the geographical distribution of *Oschmarinella* species (see Table 33). See above symbols of *Oschmarinella* species.

véase también Adams, 1988). Asimismo, se ha citado con cierta frecuencia en la morsa, *Odobenus rosmarus* (familia Odobenidae). Por último, se ha registrado, en menor medida, en otras especies del género *Phoca* (sensu Wyss, 1988), y en la foca de casco, *Cystophora cristata* (Tabla 34) (Fig. 47). *O. arcticus* en el odontoceto *Globicephala melas* se ha citado únicamente en dos ocasiones (Tabla 34). En las Feroe, Raga y Balbuena (1993)<sup>36</sup> indicaron que este campúlido se presentó de forma ocasional, por lo que no se mostraron parámetros de infestación. Cowan (1967)<sup>37</sup> encontró una prevalencia muy baja (5,5%, 3 de 55).

Adams (1988)<sup>132</sup> comenta que *O. arcticus* muestra prevalencias considerablemente más altas en *E. barbatus* que en otras especies de focas, como *P. hispida*, *P. largha* y *P. fasciata*. Por ejemplo, en *P. hispida* aparece muy raramente en el área de Bering (Adams, 1988). Esto sugiere que *E. barbatus* es probablemente el principal hospedador de *O. arcticus*. Adams (1988) apuntó que los hábitos tróficos bentónicos de esta especie, con una predación mayoritaria sobre invertebrados, la pondrían en mayor contacto con el parásito. Ello explicaría además la aparición frecuente de *O. arcticus* en las morsas del área de Bering (Fig. 48 B), cuyo régimen trófico es muy similar (se ha sugerido que ambas especies pueden competir), aunque no aclara por qué no se ha citado en morsas del Atlántico. De acuerdo con esta idea, no es extraño que *O. arcticus* aparezca mucho más raramente en otras focas ictiófagas no bentónicas. Es probable que la elevada cantidad de registros de *O. arcticus* en *P. hispida* se deba más a que el área de solapamiento de esta especie con *E. barbatus* es máxima entre los pinnípedos de la región (véase Fig. 48 A y D). Otro argumento a favor de una relación más estrecha entre *E. barbatus* y *O. arcticus* es que la distribución del parásito imita en gran medida la del hospedador (obviamente, considerando sólo las zonas donde se han realizado análisis). Así, *O. arcticus* aparece en el área de Ojotsk, y frente a los territorios del Noroeste (Canadá), exclusivamente en *E. barbatus*. Todas las restantes citas en otras especies de pinnípedos se dan en condiciones de simpatria con *E. barbatus* (Fig. 48 B, C y D; Fig. 49 A, B, C y D). En cualquier caso, *O. arcticus* no parece mostrar una especificidad muy estrecha.

*O. fraterculus* es otra especie muy extendida, que se distribuye dentro de tres grupos bien diferenciados de hospedadores: entre los Phocinae, donde el hospedador más importante parece ser *E. barbatus*; en la morsa, donde aparece con relativa frecuencia; también, por último, en la nutria marina, con altas prevalencias e

Tabla 34. Especies del género *Orthosplanchnus*, hospedadores a los que parasita y localidades en las que se han registrado las especies. Los números indican las referencias de donde proceden los datos (véase Apéndice). C: Cetacea, CA: Carnívora, Pi: Pinnipedia. P: Pacífico, N: Norte, (O: Oeste, \*: las referencias no indican la localidad.

Table 34. *Orthosplanchnus* species, hosts and geographic locality of the samples. Numbers indicate the references where the data proceed (see Appendix). C: Cetacea, CA: Carnívora, Pi: Pinnipedia, P: Pacific, N: North, O: West, \*: the references do not indicate the locality.

| <i>Orthosplanchnus</i>       | Hospedadores                           | Localidad   |
|------------------------------|--|---|
| <i>O. arcticus</i>           | Phocidae (Pi)                          |   |
|                              | <i>Phoca vitulina</i>                  | Mar de Barents (Artico)104  |
|                              | <i>P. largha</i>                       | Mar de Bering (Anadir y Pribilof)162  |
|                              | <i>P. hispida</i>                      | Mar Blanco23,27, Mar de Kara27, Mar de Barents23,116, Mar de Groenlandia23, Anadir (Bering)169, Estrecho de Bering169, Mar de los Chuckchos178, Mar de Bering178, Isla de San Lorenzo (P.N.)132, Shantar (Mar de Ojotsk)180 |
|                              | <i>P. groenlandica</i>                 | 154*, Artico (Mar Blanco27, Mar de Kara27)  |
|                              | <i>P. fasciata</i>                     | Mar de Bering132  |
|                              | <i>Cystophora cristata</i>             | Artico (Mar Blanco, Barents y Groenlandia)23  |
|                              | <i>Erignathus barbatus</i>             | Artico (Mar de Kara27,104, Mar Blanco23,27,125, Groenlandia23,126, Spitzbergen126, Mar de Bering105,125, Mar de Barents23,125), Pacífico O. (Sajalin127, Mar de Ojotsk125), Canadá (Territorios del N.O.)19                 |
|                              | Odobenidae (Pi)                        |   |
|                              | <i>Odobenus rosmarus</i>               | Alaska126, Pacífico N.68, Península de los Chuckchos185, Mar de los Chuckchos y Bering186   |
|                              | Delphinidae (C)                        |   |
| <i>Globicephala melas</i>    | Atlántico (Islas Feroe36, Terranova37) |   |
| <i>O. rossicus</i>           | Odobenidae (Pi)                        |   |
|                              | <i>O. rosmarus</i>                     | Subártico131 (Mar Blanco27,16, Mar de Bering126, 186, Alaska126), Pacífico N.68, Mar de los Chuckchos185,186  |
| <i>O. pygmaeus</i>           | Phocidae (Pi)                          |   |
|                              | <i>P. hispida</i>                      | Isla de San Lorenzo (Canadá)132   |
|                              | <i>P. fasciata</i>                     | Mar de Bering120  |
|                              | <i>P. largha</i>                       | Mar de Bering (Karagin)105,162  |
|                              | Eschrichtidae (C)                      |   |
| <i>Eschrichtius robustus</i> | Mar de los Chuckchos (P.N.)13          |   |
| <i>O. fraterculus</i>        | Phocidae (Pi)                          |   |
|                              | <i>P. fasciata</i>                     | Mar de Bering120  |
|                              | <i>E. barbatus</i>                     | Artico (Point Barrow (Alaska)124, Spitzbergen16), Isla de San Lorenzo (P.N.)124, Mar Blanco125, Mar de Bering125  |
|                              | Odobenidae (Pi)                        |   |
|                              | <i>O. rosmarus</i>                     | 155*, Península de los Chuckchos185, Mar de los Chuckchos y Bering186, Spitzbergen155   |
| <i>O. albamarinus</i>        | Mustelidae (CA)                        |   |
|                              | <i>Enhydra lutris</i>                  | Islas Aleutianas (P.N.)124,136, Isla Príncipe de Gales (Canadá)126  |
| <i>O. albamarinus</i>        | Monodontidae (C)                       |   |
|                              | <i>Delphinapterus leucas</i>           | Mar Blanco23, Kanin (Mar de Barents)26  |
| <i>O. oculatus</i>           | Odobenidae (Pi)                        |   |
|                              | <i>O. rosmarus</i>                     | Mar de los Chuckchos (P.N.)133,185,186, Pacífico N.68   |
| <i>O. antarcticus</i>        | Phocidae                               |   |
|                              | <i>Leptonichotes weddelli</i>          | Antártico52,130   |

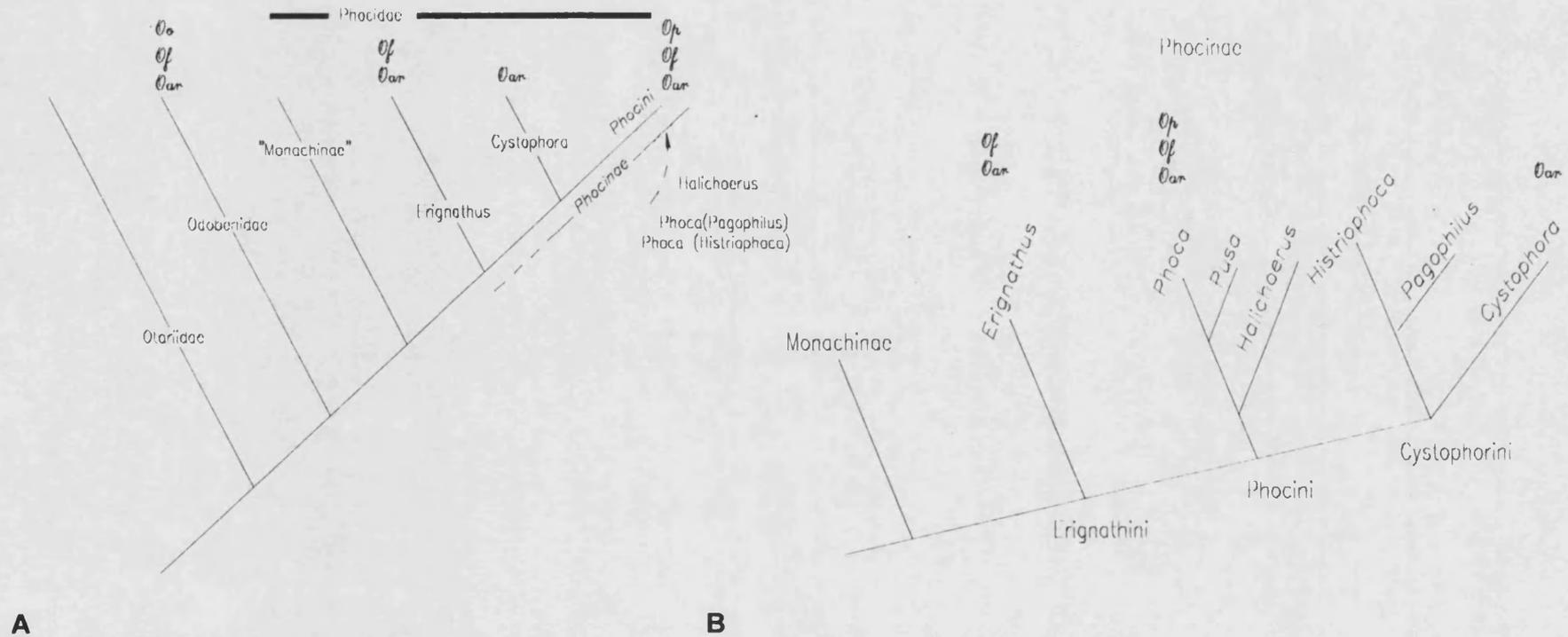


Figura 47 (A) y (B). Presencia de las especies de *Orthosplanchnus* en pinnípedos, según las dos hipótesis propuestas en el punto 4.2.4 (II)(pag. 104). Oar: *O. arcticus*, Of: *O. fraterculus*, Oo: *O. oculus*, Op: *O. pygmaeus*.

Figure 47 (A) and (B). Occurrence of *Orthosplanchnus* species in pinnipeds (both phylogenetic trees for pinnipeds are shown). See above abbreviations of *Orthosplanchnus* species.

intensidades (Lauckner, 1985b). Las tres especies comparten dietas parcialmente similares, debido a sus hábitos tróficos bentónicos y su predación mayoritaria sobre invertebrados. Desde esta perspectiva, resulta difícil evaluar la especificidad de *O. fraterculus*. Así, por ejemplo, en el área de Bering, donde el parásito infecta a las tres especies, se han registrado prevalencias de alrededor de un 50% en *E. barbatus*, y de un 100% en *O. rosmarus* (Lauckner, 1985a). Por otro lado, *O. fraterculus* es una especie muy frecuente en las nutrias marinas de Alaska (Rausch, 1953) (Fig. 50). *O. fraterculus* exhibe una extensión geográfica muy similar en los dos pinnípedos (Fig. 48 A y B)), que abarca la región subártica Atlántica y Pacífica. De acuerdo con estos datos, la aparición en la nutria podría ser una captura secundaria ligada a sus hábitos tróficos, que son muy similares a los de las dos especies de pinnípedos. No obstante, esta interpretación depende de cómo se haya extendido históricamente el género, como se discutirá ampliamente en la Discusión.

Dos especies son exclusivas de la morsa: *O. rossicus* y *O. oculatus*. Ambas pueden aparecer con notables niveles de infestación en ciertas áreas (véase, por ejemplo, Adams, 1988). *O. rossicus* muestra una distribución geográfica que imita la de su hospedador (con las reservas antes mencionadas). Sin embargo, *O. oculatus* parece endémica del área de Bering. Por su parte, *O. pygmaeus* se ha registrado en varias ocasiones, pero siempre muy puntualmente y en escasa cantidad. La especie fue descrita originalmente a partir de un único espécimen encontrado en la ballena gris (*Eschrichtius robustus*) en el mar de Bering. Posteriormente se ha citado en varias especies de *Phoca* (Tabla 34), también en la misma área. Adams (1988) especuló que, a partir de las similitudes morfológicas entre esta especie y *O. oculatus*, ambas podrían considerarse conespecíficas. La sugerencia es interesante desde un punto de vista ecológico, puesto que podría solucionar la aparente escasez de *O. pygmaeus* en todos los hospedadores donde se ha registrado. Parece bastante claro que *E. robustus* no es el hospedador característico de *O. pygmaeus*, y que la infestación excepcional de este hospedador podría deberse a la alimentación bentónica de la ballena en un área geográfica adecuada. Por otra parte, la escasa aparición en otras focas (de alimentación ictiófaga y no bentónica) se justificaría por las mismas razones ofrecidas para *O. arcticus*. Por otra parte, desde un punto de vista geográfico, el carácter endémico de *O. pygmaeus* en el área de Bering coincide con el patrón geográfico de *O. oculatus*, por lo cual la hipótesis de que ambas especies sean sinónimas cobra todavía más fuerza.

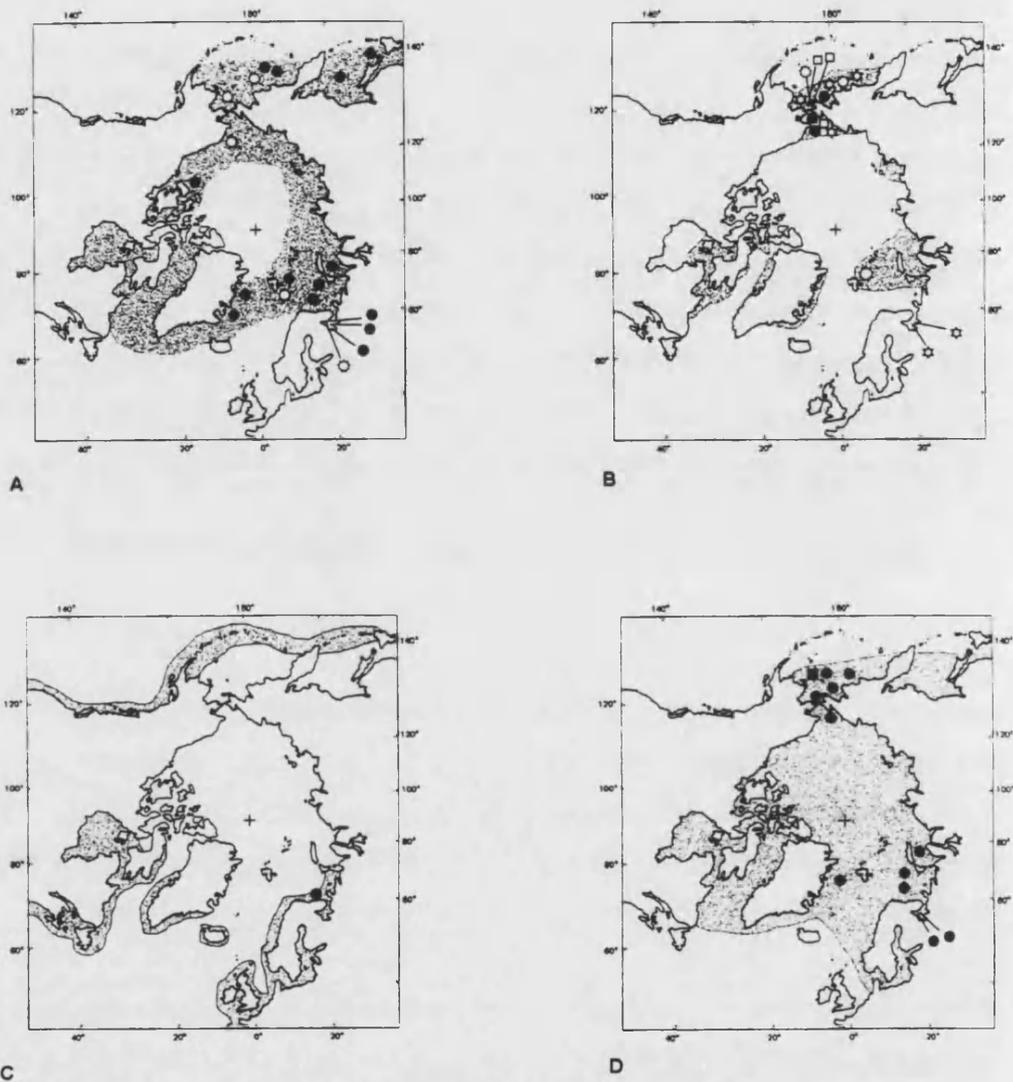


Figura 48. Distribución de las especies de *Orthosplanchnus* en pinnípedos (véase Tabla 34). Se muestra también la distribución de los hospedadores: (A) *O. arcticus* y *O. fraterculus* en *Erignathus barbatus*, (B) *O. arcticus*, *O. fraterculus*, *O. oculatus* y *O. rossicus* en *Odobenus rosmarus* (Delyamure 1955, 1961 cita *O. rossicus* en el Mar Blanco a pesar de que no se corresponde con la distribución actual de *O. rosmarus*)\* y , (C) *O. arcticus* en *Phoca vitulina*, (D) *O. arcticus* y *O. pygmaeus* en *P. hispida*. *O. arcticus* (●), *O. fraterculus* (○), *O. oculatus* (□), *O. rossicus* (☆), *O. pygmaeus* (■).

Figure 48. Scheme depicting the distribution of *Orthosplanchnus* species in pinnipeds (see Table 34). The host distribution is also shown. \*Delyamure 1955, 1961 indicated *O. rossicus* in the White Sea although it does not correspond with the current distribution of *O. rosmarus*. See above the symbols for species.

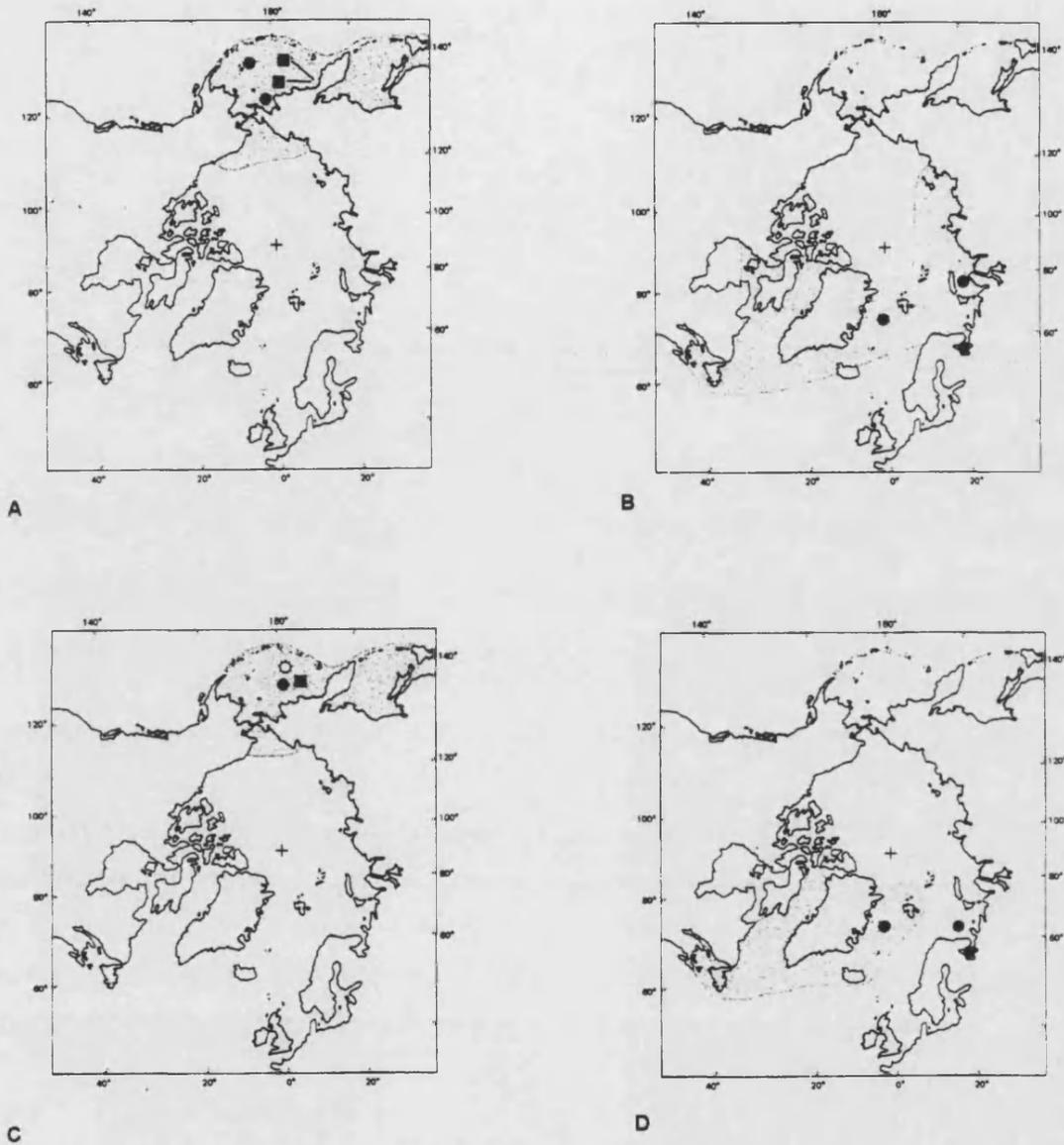


Figura 49. Distribución de las especies de *Orthosplanchnus* en pinnípedos (véase Tabla 33). Se muestra también la distribución de los hospedadores. (A) *O. arcticus* y *O. pygmaeus* en *Phoca largha*, (B) *O. arcticus* en *Phoca groenlandica*, (C) *O. arcticus*, *O. pygmaeus* y *O. fraterculus* en *P. fasciata*, (D) *O. arcticus* en *Cystophora cristata* (Treschev (1978) cita *O. arcticus* en *C. cristata* en el Mar Blanco y de Barents, a pesar de que no corresponden a zonas actuales de distribución de este hospedador)\*. *O. arcticus* (●), *O. pygmaeus* (■), *O. fraterculus* (○).

Figure 49. Scheme depicting the distribution of *Orthosplanchnus* species in pinnipeds (see Table 34). The host distribution is also shown. See above the symbols for species. \*Treschev (1978) indicated *O. arcticus* in *C. cristata* in the White Sea although it does not correspond to the current distribution of this host.

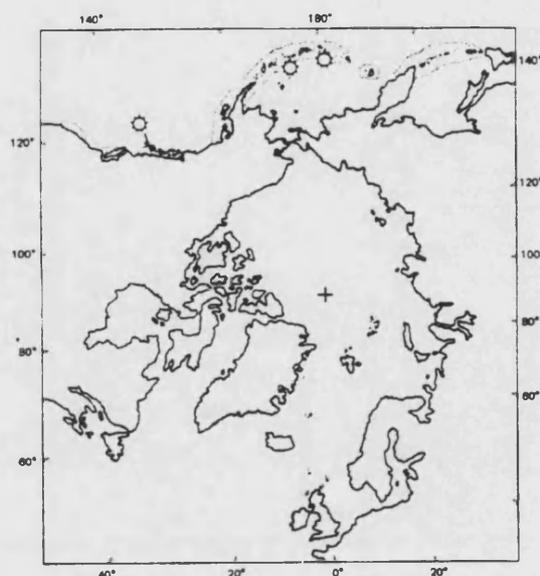


Figura 50. Distribución de *O. fraterculus* en la nutria marina, *Enhydra lutris* (véase Tabla 34).

Figure 50. Distribution of *O. fraterculus* in the sea otter, *Enhydra lutris* (see Table 34).

Las dos especies restantes están envueltas en problemas taxonómicos. *O. albamarinus* parece ser exclusiva de la beluga (*Delphinapterus leucas*), en la que se encontraron cantidades muy escasas de vermes en dos ocasiones. Adams y Rausch (1989) consideraron que la especie probablemente debería ser transferida a otro género, aunque la mantuvieron tentativamente dentro de *Orthosplanchnus*. Salvador et al. (1996) sugirieron que la especie era morfométricamente más similar a las especies del género *Oschmarinella* que a las de *Orthosplanchnus*. D.I. Gibson (com. pers.) está en vías de transferir la especie finalmente a este último género.

El caso de *O. antarcticus* es más interesante, y bastante más conflictivo. La especie ha sido citada únicamente en dos ocasiones, en la foca de Weddell (*Leptonichotes weddelli*) del Antártico. Constituye por tanto el único caso de un miembro del *Orthosplanchnus* como parásito de un representante de los Monachinae, y en el Hemisferio Sur. La especie fue descrita originalmente sin espinas en el metratermo (Adams, 1988; Adams y Rausch, 1989), e igualmente redescrita sin ellas (Beverly-Burton, 1972). No obstante, según Beverly-Burton (1972), las espinas podrían haberse perdido antes de la fijación. (Recordemos que la presencia/ausencia de espinas en el metratermo es el único carácter que permite distinguir fehacientemente los géneros *Orthosplanchnus* y *Hadwenius*, Tabla 2). Adams y

Rausch (1989) confirmaron la presencia de una espina y un disco basal en el metratermo de uno de los especímenes del lote de Beverley-Burton (1972). Esto parecía corroborar la suposición de aquella autora. De todos modos, existen muchos más problemas en torno a la identidad de esta especie. La ausencia de *Orthosplanchnus* en el resto de especies antárticas de fócidos (4 especies), e incluso el escaso número de registros en la foca de Weddell resultan particularmente extraños. No existen siquiera particularidades tróficas en *L. weddelli* capaces de explicar una acusada especificidad de *O. antarcticus* hacia esta especie por este motivo (véase, por ejemplo, King, 1983; y resúmenes de diferentes autores en Vol.2 de Ridgway and Harrison, 1981). Por último, *O. antarcticus* se encontró en el intestino en los dos registros (Adams, 1988). Beverley-Burton (1972) consideró que ésta podía ser una localización post mortem de vermes provenientes de los conductos hepatopancreáticos. Esta posibilidad podría ser plausible, según lo comentado más arriba. No obstante, resulta curioso que se hallaran en el mismo órgano en las dos ocasiones, y que hubiese tanta cantidad, de acuerdo con las observaciones de Beverley-Burton (1972). En definitiva, es posible considerar (poco parsimoniosamente) a *O. antarcticus* como un relicto de la foca de Weddell en el Hemisferio Sur, pero existen bastantes dudas sobre los caracteres morfológicos diferenciales del género, así como el hábitat seleccionado por la especie dentro del hospedador. Esto lleva a pensar que pudiese tratarse de un representante de otro género (*Hadwenius?*), aunque la cuestión está abierta.

Como conclusión, desde el punto de vista de la especificidad y la diversificación de *Orthosplanchnus*, cabe señalar los siguientes patrones:

a) En la región del Artico-subártico, *Orthosplanchnus* spp. están esencialmente ligadas a *E. barbatus* y *O. rosmarus*. *O. fraterculus* también parece bien asentada en la nutria marina, y *O. pygmaeus* podría tener un grupo diferente de hospedadores. Aunque no puede evaluarse en qué medida las otras especies de pinnípedos podrían contribuir al mantenimiento de las suprapoblaciones de *Orthosplanchnus* en las diferentes localidades (véase Holmes, 1979), nos inclinamos a considerarlas en general como hospedadores facultativos ecológicos (*sensu* Hoberg y Adams, 1992).

b) La morsa es la especie que alberga un mayor número de especies de *Orthosplanchnus*, cuatro, dos de las cuales son específicas.

c) A pesar de la especificidad general de las especies, el género *Orthosplanchnus* está presente en todos los fócidos árticos. Aparentemente, *Orthosplanchnus* parece haberse extendido sin especiar en todo el género *Phoca* (descontando *O. pygmaeus?*), en *Cystophora cristata*, en la nutria marina, y, excepcionalmente, en algunos cetáceos.

d) La información disponible sugiere descartar a *O. albamarinus* como una especie del género *Orthosplanchnus*, y arroja dudas importantes sobre el estatus genérico de *O. antarcticus*.

Desde un punto de vista biogeográfico, cabe señalar los siguientes patrones:

e) A gran escala, la distribución de *Orthosplanchnus* se encuentra exclusiva, o mayoritariamente constreñida a la región ártica y subártica. Los límites de la distribución de *Orthosplanchnus* vienen definidos en gran medida por la distribución de sus hospedadores definitivos fundamentales.

f) A pesar de las limitaciones geográficas en los muestreos, parece haber dos grandes áreas, Bering, y el área marina delimitada por la costa este de Groenlandia y Eurasia, donde se concentran los registros de *Orthosplanchnus*.

g) Bering es el área de mayor diversificación de *Orthosplanchnus*. Todas las especies, salvo *O. antarcticus*, se encuentran allí. Además, es la única área dentro del rango global de *Orthosplanchnus* que posee una/dos especies endémicas (*O. oculatus* y *O. pygmaeus*).

#### 4.4. DISCUSIÓN

El análisis de los patrones sobre especificidad y biogeografía de los géneros de Campulidae se han centrado en este trabajo en un exámen de sus relaciones con el hospedador definitivo. Esta visión es necesariamente parcial puesto que siempre cabe asignar papeles igualmente importantes a los hospedadores intermediarios y paraténicos en la especiación y distribución de los parásitos. Ello implicaría obtener y analizar datos sobre otros taxones implicados, su vagilidad, su biogeografía histórica, y las implicaciones derivadas de esta biogeografía en lo que respecta al aislamiento o expansión de poblaciones y la interrupción o no del flujo genético. Desde un punto de vista biogeográfico, esto es lo que Delyamure (1955) planteó diciendo simplemente que un parásito sólo puede existir donde todos sus hospedadores están presentes. Si el parásito exhibe además fases de vida libre, los factores abióticos también pueden haber jugado un papel importante en la distribución y diversificación de aquél.

Desde un punto de vista conceptual, es importante distinguir entre lo que podrían denominarse 'determinantes ecológicos' frente a los 'determinantes históricos' en las distribuciones observadas de los parásitos. Estos factores, por supuesto, no representan visiones yuxtapuestas, sino complementarias. Consideramos que existen condicionantes ecológicos cuando los factores que limita la distribución de un parásito generan la falta de condiciones necesarias para el ciclo pueda completarse. Por ejemplo, Chubb (1970) sugirió que los patrones de distribución de los acantocéfalos en peces de las Islas Británicas estaban determinados por la presencia o ausencia de hospedadores intermediarios isópodos. Un determinante poco considerado, pero fundamental, en la distribución de trematodos dulceacuícolas es el nivel de  $\text{Ca}^{++}$  en el agua (Esch y Fernández, 1993). Este elemento es necesario para el mantenimiento de una diversidad y abundancia aceptables de moluscos, que a su vez limitarían la aparición y distribución de la mayoría de los trematodos. En otras ocasiones, es el propio factor abiótico el que influye directamente sobre la distribución. Por ejemplo, el digénido marino *Derogenes varicus* tiene una casi completa falta de especificidad por sus hospedadores intermediarios y definitivos. Sin embargo, lo que limita su distribución ecológica es la temperatura, de manera que el parásito se encuentra a diferentes profundidades según el área geográfica (Esch y Fernández 1993).

En el medio marino, un factor importante que influye en la distribución de los parásitos es el tipo de agua, puesto que, o bien determina el tipo de fauna de vida libre que puede existir en un área determinada (particularmente, el plancton, que actúa frecuentemente como primer hospedador intermediario), o como ya se ha señalado, posee una serie de características fisicoquímicas conservativas que pueden influir directamente sobre la supervivencia de determinadas fases del ciclo vital del parásito. Por ejemplo, Hoberg (1986) encontró que los procesos coevolutivos eran importantes en la composición de acantocéfalos del género *Corynosoma* en las comunidades helmínticas de aves marinas antárticas. Sin embargo, la distribución actual restringida de dichos *Corynosoma* parece ligada a fenómenos oceanográficos tales como la Convergencia Antártica, que podrían estar limitando la distribución de los hospedadores intermediarios anfipodos y/o la de los hospedadores paraténicos peces, que están confinados a masas de agua específicas de los océanos más australes. Por citar otro ejemplo, Helle y Valtonen (1980) atribuyeron la pobreza en la fauna helmíntica de las focas del Báltico a las especiales características de salinidad de este mar. A veces, las diferencias entre el tipo de agua pueden generar diferencias cuantitativas más que cualitativas en las faunas helmínticas (véase, por ejemplo, Aznar et al. 1995).

Los factores históricos manifiestan la contingencia en el origen y posterior destino de las asociaciones parásito/hospedador. Por ejemplo, Schulte y Poinar (1991) sugirieron que la divergencia entre las poblaciones asiáticas y americanas de las poblaciones de *Rhabditis orbitalis* podría deberse a la similitud en las condiciones ecológicas en los dos continentes. Sin embargo, es perfectamente posible que el tiempo que ha pasado desde que desapareció el "puente" de Bering no haya sido suficiente como para permitir divergencia genética (Esch y Fernández, 1993). En general, los límites de la distribución y diversificación de un parásito vendrían definidos por la antigüedad de la asociación con sus hospedadores. Así, por ejemplo, Rohde (1982, 1986) propuso que las diferencias de diversidad global de monogénidos y nematodos entre el Pacífico y el Atlántico podría estar causada por el hecho de que el Pacífico ha existido durante un periodo geológico considerablemente más largo que el Atlántico.

Las explicaciones de uno u otro tipo pueden ser complementarias, como se ha señalado más arriba. En el caso de los cestodos del género *Anophryocephalus* (de los que se hablará con cierto detalle más adelante), Hoberg (1992, 1995) sugirió que su distribución restringida a las áreas subártica y árticas de este género es producto de la

distribución de los hospedadores definitivos pinnípedos. *Anophryocephalus* está originalmente asociado a fócidos, de forma que la compleción del ciclo sólo puede realizarse donde existen colonias localizadas de focas (no obstante, Hoberg, 1995 reconoce que los hospedadores intermediarios peces podrían actuar como determinantes regionales de distribución del parásito, puesto que muchos de ellos son presas clave con distribuciones localizadas). Desde un punto de vista histórico, la distribución restringida de *Anophryocephalus* puede verse desde el carácter relativamente reciente de la asociación. Esta parece estar ligada a los ciclos de glaciación del Plioceno Tardío y el Pleistoceno, de forma que la expansión por el Pacífico es relativamente reciente. Sin embargo, *Anophryocephalus* ha especiado en otáridos en dicha área, y no es descabellado suponer que la asociación podría extenderse más meridionalmente en el futuro. Un planteamiento similar puede desprenderse de los análisis de Aznar (1995) sobre la helmintofauna intestinal de los cetáceos. Puesto que la mayoría de los elementos intestinales en estos hospedadores parecen tener un origen pelágico, la pobreza relativa de las helmintofaunas en las especies hospedadoras costeras está determinada por factores históricos, puesto que la expansión ¿todavía? no se ha completado. Los interrogantes que surgen de estos planteamientos históricos no son sino una forma de plantear de qué forma se despliegan las constricciones históricas. Es decir, las "decisiones" tomadas por el parásito en el pasado pueden derivar en una mayor o menor constricción en el presente.

La argumentación desarrollada hasta aquí es muy importante para entender (aunque no para interpretar fehacientemente) varios de los patrones que se observan en las distribuciones actuales de los géneros de la familia Campulidae. Como veremos, en unos casos será posible reconocer una influencia no despreciable de los hospedadores definitivos sobre los patrones de distribución de algunos géneros; en otros casos, se discutirán distribuciones que parecen menos ligadas a la influencia de los hospedadores definitivos, y que plantean por tanto alternativas ecológicas y/o históricas relacionadas con otras fases del ciclo, de las que podremos decir bien poco, salvo que aparentemente podrían influir globalmente más.

Dos patrones claros surgen de lo expuesto en el apartado 4.3.2. con respecto al género *Lecithodesmus*: (i) parasita casi exclusivamente a misticetos; (ii) se ha registrado mayoritariamente en el Hemisferio Norte. Respecto al punto (ii) no tenemos ningún tipo de evidencia fehaciente que pudiera relacionarse con este patrón (¿diferentes hábitos alimenticios de las ballenas (véase, por ejemplo, Martin, 1990)?, ¿factores históricos relacionados con el hipotético centro de origen de los balaenoptéridos (véase Klumov, 1963; Gaskin, 1982)?). A continuación discutiremos el punto (i).

Se pueden plantear dos hipótesis respecto al origen de *Lecithodesmus*: (a) suponiendo una asociación por descendencia (Brooks y McLennan, 1991), podría sugerirse que *Lecithodesmus* sería el género basal en el cladograma de los campúlidos. La divergencia entre odontocetos y misticetos originó *Lecithodesmus* en estos últimos, diversificándose más tarde en las especies actuales. Las evidencias que favorecerían esta hipótesis son (i) la presencia de *Lecithodesmus* sólo en misticetos y, además, en los tres grandes grupos de este suborden, Balaenidae, Balaenopteridae y Eschrichtiidae. (ii) Otro hecho importante es que ninguna otra especie de campúlido se presenta en misticetos (véase el apartado 4.3.9., sobre la presencia de *Orthosplanchnus* en *Eschrichtius robustus*) (iii). Podría hablarse de una gran diversificación de las especies de *Lecithodesmus* en Balaenopteridae, mientras que *L. goliath* es la especie más extendida entre los misticetos, no habiendo sufrido, aparentemente, especiación (Fig. 36). (b) Alternativamente, el origen de *Lecithodesmus* pudo haber tenido lugar por un fenómeno de captura de hospedador a partir de campúlidos de odontocetos. Dicho fenómeno pudo haberse producido en el ancestro de Balaenopteridae, e incluso en el ancestro de las especies de *Balaenoptera*, puesto que es en este grupo en donde las especies de *Lecithodesmus* se hallan más ampliamente diversificadas y con prevalencias más altas (véase el apartado 4.3.2. sobre especificidad de *Lecithodesmus*). Datos paleontológicos sugieren que los grupos basales de odontocetos y misticetos fueron contemporáneos (Barnes, 1985), por lo que la captura de hospedador fue posible en los ancestros de los grupos actuales. Las escasas citas y bajas prevalencias de estos campúlidos sobre otros balaenoptéridos, como *Megaptera*, y otras familias de misticetos, como Balaenidae y Eschrichtiidae, plantea la posibilidad de que la presencia de *Lecithodesmus* en los mismos sea debida a captura de hospedador a partir de balaenoptéridos. También se podría sugerir que la captura de hospedador a partir de

odontocetos tuvo lugar una vez, comenzó la diversificación de las especies de misticetos. Sin embargo, resulta difícil creer que un mismo grupo de helmintos hayan capturado un mismo grupo de hospedadores (misticetos), en múltiples ocasiones. En nuestra opinión, la opción más parsimoniosa es la que sugiere un proceso coevolutivo parásito-hospedador. A pesar de que suponemos una posición basal de *Lecithodesmus* en la filogenia de los géneros de Campulidae, no podemos confirmarla mediante datos moleculares puesto que, como ya se comentó en el apartado 3.3. de resultados, no fue posible la obtención de la secuencia génica de la NADH3 del representante del género *Lecithodesmus*, *L. goliath*. En futuros trabajos se intentará dilucidar si esta hipótesis es cierta o no.

Un aspecto muy interesante respecto al grupo hermano de misticetos, fisetéridos (véase apartado 4.2.4. sobre las relaciones filogenéticas entre estos dos grupos), es la ausencia de especies de *Lecithodesmus*, concretamente en las dos especies en las que se han llevado a cabo estudios parasitológicos, *Kogia breviceps* y *Physeter catodon* (Tabla 25). Siempre se han considerado a los fisetéridos como odontocetos diferentes del resto de miembros de este suborden, de forma que no se ajustan totalmente a las características que reúnen al resto de odontocetos. En esta misma línea, los fisetéridos destacan por la total ausencia de campúlidos. En *P. catodon* se han realizado mayor número de trabajos helmintológicos. Salvo una especie de *Zalophotrema* (bastante cuestionable, véase apartado 4.3.6.), estos estudios sobre *P. catodon*, no han demostrado la presencia de ningún otra especie de campúlido (Mathews, 1938a<sup>1</sup>; Rees; 1953<sup>3</sup>; Dailey y Vogelbein, 1991<sup>8</sup>). Algunos de dichos trabajos realizaron un examen exhaustivo de un considerable número de ejemplares, como el de Dailey y Vogelbein (1991) en el Antártico, los cuales analizaron 35 individuos, o el de Mathews (1938a) en el Atlántico Sur, con 78 ejemplares necropsiados.

Desconocemos la posición del género *Hunterotrema* en el árbol molecular consenso (Fig. 29). Sin embargo, de acuerdo con los datos de especificidad y biogeografía de este género, y de la filogenia y biogeografía de sus hospedadores, cabe plantear dos hipótesis. (a) Si se asume que *Hunterotrema* es un campúlido, la única posibilidad es que la especiación de *Hunterotrema* se produjera tras la divergencia entre los Iniidae y su grupo hermano, los Pontoporiidae (véase Fig. 33), de forma que el parásito acompañaría al hospedador en su dispersión por la cuenca del

Amazonas y el Orinoco. La evidencia paleontológica indica que los Inioidea han estado confinados a este medio dulceacuícola desde su origen. Según Cozzuol (1992), los Iniidae presentaban en el pasado mayor diversidad y distribución que en la actualidad. Los restos fósiles más antiguos de este grupo se han encontrado en sedimentos fluviales del Mioceno tardío (hace 7 millones de años, aproximadamente), en varias regiones de América del Sur. La mayoría de los inidos fósiles pertenecen a una subfamilia distinta de la actual, con una serie de características indicativas de su adaptación a un medio de alta turbidez (rostro muy largo y reducción de la órbita ocular). Todo ello parece indicar que la invasión del medio fluvial fue bastante temprana (Cozzuol, 1992). La región de la cuenca del Paraná (a la altura del Río de la Plata) estuvo ocupada por una transgresión marina durante la mitad y final del Mioceno. Por ello, la invasión del medio continental y la evolución temprana de los Iniidae tuvo que ocurrir en las cuencas del norte de América del Sur (Cozzuol, 1992). Estas cuencas corresponderían a lo que hoy son las cuencas del Amazonas y del Orinoco.

(b) La segunda hipótesis que planteamos es la posibilidad de que *Hunterotrema* no pertenezca a la familia Campulidae, desconociendo, por tanto, la procedencia de este helminto.

Según la filogenia molecular consenso presentada en este estudio (Fig. 29), la especie de *Hadwenius* empleada para el análisis filogenético, *H. tursionis*, aparece como el campúlido que diverge con anterioridad a los representantes de los géneros *Zalophotrema*, *Campula*, *Oschmarinella*, *Orthosplanchnus* y *Nasitrema*.

La antigüedad del género *Hadwenius* con respecto al resto de campúlidos, excepto *Lecithodesmus* (véase discusión anterior), explicaría que sea el género de Campulidae con una mayor extensión y diversificación dentro de los odontocetos. Excepto en Ziphiidae, Lipotidae, Platanistidae (en los que los estudios helmintológicos han sido escasos o nulos) y Physeteriidae, en el resto de familias de odontocetos aparecen especies de *Hadwenius* (Fig. 38). Es el género de la familia Campulidae que presenta mayor número de especies (un total de ocho), que parasitan a un gran número de géneros de odontocetos, tanto pelágicos como costeros (Fig. 38). En 15 géneros pertenecientes a las familias Pontoporiidae, Monodontidae, Phocoenidae y Delphinidae, (83,3%), se ha registrado la parasitación de especies de *Hadwenius*

(*Delphinus*, *Stenella*, *Tursiops*, *Grampus*, *Lagenorhynchus*, *Steno*, *Cephalorhynchus*, *Orca*, *Globicephala*, *Pseudorca*, *Phocoenoides*, *Neophocaena*, *Phocoena*, *Delphinapterus* y *Pontoporia*). En 6 no tenemos constancia de trabajos parasitológicos detallados (*Lagenodelphis*, *Sousa*, *Orcaella*, *Peponocephala*, *Australophocaena* y *Monodon*). Sólo no se han encontrado especies de *Hadwenius* en 3 géneros (*Lissodelphis*, *Sotalia* y *Feresa*). La aparición en una gran cantidad de grupos y la distribución mundial de sus especies indicarían un periodo largo de coevolución parásito-hospedador, con gran cantidad de fenómenos de captura de hospedador entre distintas especies de odontocetos. Según Brooks y McLennan (1993a), la falta de especificidad no elimina la posibilidad de que cualquier parásito haya evolucionado con uno de sus hospedadores y haya colonizado otros sin llegar a especiar. Un ejemplo similar a *Hadwenius* ocurre con los digénidos de la familia Spirorchidae, parásitos de tortugas, la cual se compone de dos subfamilias: Hapalotrematinae y Spirorchinae. La primera de ellas comprende los espiróquidos basales, cuyas especies ocupan un amplio rango de hospedadores en Norteamérica, África, India, Asia y la antigua USSR (Platt, 1992). Estas especies ocupan sobre todo los grupos basales de tortugas. La gran extensión geográfica así como la enorme variedad de hospedadores a los que parasitan sugiere un periodo largo de asociación entre los espiróquidos y las tortugas (Platt, 1992).

El siguiente aspecto que trataremos se refiere a la presencia de *Hadwenius* en Pontoporiidae. De todos los grupos de odontocetos a los que parasita *Hadwenius*, el que primero divergió fue el de los Iniioidea, que comprende las familias Iniidae y Pontoporiidae (véase apartado 4.2.4.). Los Iniidae y Pontoporiidae constituyen un grupo con una historia relativamente larga, el cual podría haberse desarrollado en el Atlántico tropical, o haber llegado a esta zona, mientras la ruta subtropical del Tetis del sur de Europa estaba todavía abierta (Gaskin, 1982). Los Iniidae pasaron del medio marino al fluvial, mientras que Pontoporiidae es esencialmente marina, aunque tuvo ancestros dulceacuícolas, puesto que se ha sugerido que invadió el medio fluvial en varias ocasiones (véase Aznar et al., 1994). Veíamos que el único representante de esta última familia, *P. blainvillei*, era parasitado por *H. pontoporiae* en aguas argentinas (Raga et al., 1994b). Podemos plantear dos hipótesis respecto al origen de *Hadwenius* en *Pontoporia*. (a) Suponiendo un proceso coevolutivo, esta temprana divergencia de los Iniioidea podría haber dado lugar a la especiación de *H. pontoporiae*, el cual no se presenta en ningún otro miembro de Iniioidea y

Delphinoidea. Parece ser que *H. pontoporiae* muestra bastante especificidad por la especie hospedadora en la zona en donde se estudió (Aznar et al., 1994). *H. pontoporiae* no se observó en tres especies de cetáceos recolectados en Argentina en la misma época que los ejemplares de *P. blainvillei* estudiados por Aznar et al. (1994): *P. spinnipinis* (Corcuera et al., 1994), *D. delphis* y *L. obscurus* (J.A. Raga, com. pers.). La especificidad evolutiva de esta especie excluye, probablemente, la posibilidad de colonizar otros hospedadores (Aznar et al., 1994). (b) Una hipótesis alternativa implicaría un fenómeno de captura de hospedador a partir de campúlidos de Delphinoidea, bien en la actualidad o bien en el ancestro de Pontoporiidae.

La aparición de representantes del género *Nasitrema* en cetáceos parece claramente ligada a factores geográficos, dentro de una especificidad general por ciertos grupos de odontocetos (Tabla 30) (Figs. 40 y 41). En este sentido, *Nasitrema* nunca se ha citado en la beluga (*Delphinapterus leucas*), el único monodóntido que se ha analizado desde un punto de vista parasitológico (Tabla 25). Esto arroja dudas sobre si *Nasitrema* no se halla en monodóntidos por cuestiones de especificidad, o porque la única especie analizada se encuentra fuera del área geográfica del parásito. La ausencia de hospedadores de altas latitudes incluso dentro de las familias Delphinidae y Phocoenidae, tales como *Lagenorhynchus acutus*, *Globicephala melas* y *Phocoena phocoena*, indica que el factor geográfico podría ser, con mucho, el más importante. De hecho, *Nasitrema* aparentemente no imita la distribución de ninguno de los hospedadores definitivos que podrían considerarse esenciales (al menos en ciertas áreas), como *Delphinus delphis* o *Tursiops truncatus*. Más bien parece que prácticamente todas las especies de hospedadores definitivos potenciales (es decir, delfínidos y focénidos) son susceptibles de infectarse con *Nasitrema* si se encuentran en el área geográfica apropiada, porque las mismas especies, en otras áreas, no presentan este parásito. De los datos sobre distribución geográfica, puede suponerse que *Nasitrema* está repartida por toda la región indopacífica, aunque existen vastas zonas donde faltan estudios. Lo que parece todavía más claro es que *Nasitrema* probablemente no ha colonizado nunca el Atlántico Norte oriental ni el Mediterráneo. La razón es clara: *Nasitrema* no se encuentra en ninguna de las mismas especies hospedadoras donde aparece en la zona indopacífica. La distribución geográfica actual de *Nasitrema* podría estar más relacionada con factores ecológicos y/o históricos del tipo de los presentados al comienzo de esta Discusión (véase también el caso de *Lecithodesmus*). Aparentemente, *Nasitrema* se originó en el Pacífico, y se

dispersó hacia el Atlántico Oeste (¿siguiendo la costa sudamericana o a través del Canal de América Central?), pero nunca ha completado una mayor dispersión.

De acuerdo con el árbol filogenético consenso (Fig. 29) y la discusión precedente sobre el género *Hadwenius*, resulta evidente que *Zalophotrema* se originó de un ancestro que parasitaba cetáceos. La cuestión es si dicho ancestro (i) pasó por colonización a pinnípedos (más concretamente, otáridos), y más tarde fue recapturado por el género *Stenella*, o (ii) la asociación con *Stenella* es basal, y la captura de algunas especies de otáridos, secundaria. Ambas opciones son problemáticas.

De acuerdo con los datos disponibles, *Zalophus californianus* debe ser el hospedador principal de *Z. hepaticum*, y las demás especies de pinnípedos simpátricos actuarían, en mayor o menor grado, como hospedadores facultativos ecológicos (sobre todo en el caso de los fócidos). Según la filogenia de la familia Otariidae (véase apartado 4.2.4. (II), pág. 103), puede asumirse que *Zalophotrema hepaticum* debe ser una captura puntual de *Zalophus* (o, a lo sumo, en el ancestro de *Zalophus* y *Eumetopias*), más que un relictó.

Por su parte, los datos obtenidos en *Stenella* apuntan a que *Zalophotrema* está claramente asociado a este género, y que la aparición puntual en otros cetáceos debe ser secundaria o accidental. La distribución de *Zalophotrema* en las especies de *Stenella* sugiere un patrón interesante: estos parásitos sólo se encuentran en las 3 especies de *Stenella* que se distribuyen en mares tropicales y templados del cinturón Atlántico-Pacífico-Indico, *S. attenuata*, *S. longirostris* y *S. coeruleoalba* (Tabla 31). Aunque existen muy pocos estudios de las dos especies exclusivamente atlánticas, *S. frontalis* y *S. clymene*, hasta ahora *Zalophotrema* no se citó en ninguna de ellas. Por otra parte, la aparición de *Z. atlanticum* en Canarias y el Mediterráneo, con prevalencias importantes, excluye la posibilidad de que el género sea exclusivamente Indopacífico.

No se conoce la relación filogenética entre las especies de *Stenella*, aunque en estos momentos se están llevando a cabo estudios moleculares al respecto que arrojan dudas sobre el carácter monofilético, no sólo de este género, sino de otros relacionados (R. leDuck, com. pers.). A falta de datos más concluyentes, nosotros aceptaremos la monofilia del género. Perrin et al. (1978) propusieron que las especies

endémicas de *Stenella* del Atlántico (*S. frontalis* y *S. clymene*) podrían representar formas más antiguas que *S. attenuata* y *S. longirostris*, que son indopacíficas y atlánticas. La razón es que durante los periodos de glaciación del Pleistoceno el Cabo de Buena Esperanza actuó como una barrera para el paso de elementos entre el Atlántico y el Indico; sin embargo, el paso de fauna en los periodos interglaciares sería en un único sentido (del Indico al Atlántico), debido al régimen de corrientes (véase Perrin et al., 1978, y Gaskin, 1982 para más detalles). Si esto es así, cabe pensar que *Zalophotrema* pudo haberse asociado con *Stenella*, no en su origen, sino tras las primeras especiaciones dentro del género (de todos modos, la posición de *S. coeruleoalba* en este proceso es incierta).

La falta de una cronología absoluta, y de datos más precisos sobre el origen y diversificación de los géneros implicados, impide discriminar entre la hipótesis (i) y (ii). Sin embargo, si se asume la hipótesis de que *Stenella* es el grupo primario de *Zalophotrema*, resulta prácticamente imposible que *Zalophotrema* sea un producto coevolutivo. La razón es sencilla: *Stenella* no parece ser un género basal dentro de Delphinidae (véase Fig. 33), y otro género de Campulidae claramente más reciente, *Campula*, está muy extendido dentro de las familias Delphinidae y Phocoenidae. En consecuencia, es prácticamente imposible imaginar un escenario en el que esta situación filogenética pudiera tener lugar. Por el momento, la única alternativa plausible, es que *Zalophotrema* se incluya (como subgénero?) dentro del género *Campula*, dado que la única diferencia morfológica remarcable entre *Campula* y *Zalophotrema* es la forma de los huevos.

De acuerdo con el árbol filogenético consenso (Fig. 29), *Campula* se originó a partir de un ancestro que parasitaba odontocetos. No conocemos dónde se sitúa el origen, puesto que las relaciones filogenéticas de los hospedadores en los que se presenta no están claramente establecidas y, además, no disponemos de la filogenia de las especies de *Campula*. Como ya se explicó en el apartado 4.2.4., según Milinkovitch et al. (1994), la divergencia de las tres familias que componen la superfamilia Delphinoidea: Monodontidae, Phocoenidae y Delphinidae, tuvo lugar en un corto periodo de tiempo. Parece ser que los miembros más antiguos de Monodontidae y Phocoenidae fueron contemporáneos de los más antiguos de Delphinidae (Barnes, 1985), lo que podría indicar la rápida divergencia de los miembros de la superfamilia Delphinoidea.

Según los datos del apartado 4.3.7. parece bastante más probable que *Campula* coevolucionara con una de las familias a las que parasita (Delphinidae o Phocoenidae), apareciendo en la otra por captura de hospedador. Un proceso coevolutivo implicaría pérdidas, al menos en Globicephalinae y varios géneros de Delphininae (*Sotalia*, *Lagenorhynchus*, *Lissodelphis*). Recordemos que los estudios realizados sobre estos géneros no han mostrado la presencia de *Campula* (véase apartado 4.3.7.). La cuestión ahora es intentar dilucidar dónde se produjo la captura de hospedador: (a) de Phocoenidae a Delphinidae o (b) de Delphinidae a Phocoenidae.

(a) Teniendo en cuenta las consideraciones indicadas en el apartado 4.3.7. sobre *Campula folium* y sobre la presencia, probablemente secundaria, de *C. oblonga* en el delfínido *Tursiops truncatus*, podemos establecer que *C. oblonga* es específica de Phocoenidae. Si suponemos que la captura de hospedador tuvo lugar de Phocoenidae a Delphinidae, *C. oblonga* constituiría la especie basal del género, a partir de la cual sucedió la diversificación del resto de especies en Delphinidae tras la captura.

(b) La captura de hospedador de Delphinidae a Phocoenidae dió lugar a la aparición de *C. oblonga* en Phocoenidae, mientras que en Delphinidae se produjo una amplia diversificación, especialmente en *Delphinus*, *Stenella* y *Tursiops*. La captura de hospedador debió producirse con anterioridad a la formación de las poblaciones de *P. phocoena* en el Mar Negro, pues *C. oblonga* se ha citado en esta zona. La especiación del género *Phocoena* se ha achacado a los eventos del Plioceno y Pleistoceno. En estos períodos se produjeron transgresiones ecuatoriales de aguas tropicales más frías, seguido de aislamiento en ambos hemisferios al ir calentándose de nuevo las aguas (Davies, 1963; Yurik, 1977). En uno de los períodos de enfriamiento, individuos de la especie *P. phocoena* penetraron en el Mediterráneo, el cual presentaba temperaturas más bajas que actualmente, quedando aislados en esta región al aumentar la temperatura. Ello dió lugar a las poblaciones actuales del Mar Negro y Mar Azov.

Ante la falta de datos sobre la divergencia de las familias de Delphinoidea y las relaciones filogenéticas entre las especies *Campula*, no podemos rechazar ninguna de

las dos opciones planteadas. Sin embargo, integrando la información sobre el género *Zalophotrema*, la hipótesis más plausible sería la (b). Dos motivos nos conducen a ello: (i) siendo *Zalophotrema* un género que divergió con anterioridad a *Campulæ*, la posibilidad de que *Zalophotrema* sea un taxón incluido dentro de *Campula* (véase más arriba) y el hecho de que ninguna de las especies de *Zalophotrema* parasita a miembros de la familia Phocoenidae se podría sugerir que el núcleo de origen de los campúlidos de este grupo esté en Delphinidae, habiéndose producido posteriormente una captura de hospedador en Phocoenidae; (ii) parece ser que la mayor diversificación de helmintos tiene lugar en el grupo hospedador original (véase ejemplo de Tetrabotriidae en Hoberg y Adams, 1992). Según esto, en el caso de *Campula* la mayor diversificación específica parece haberse producido en Delphinidae, el cual constituiría el grupo original de estos campúlidos.

La presencia de las especies de *Oschmarinella* en cetáceos no parece seguir ningún patrón claro, tanto en la distribución geográfica como en los grupos de cetáceos en los que se presenta (Tabla 33, Fig. 46). La escasez de datos sobre este género complica la formulación de hipótesis sobre su origen. Por otra parte, como ya se comentó en el apartado 4.3.1., actualmente no está clara la identidad de *O. mascomai* (J.A. Raga, com. pers.). Sin embargo, fue el único representante de este género del que pudimos disponer para establecer la filogenia molecular de campúlidos. La posibilidad de que *O. mascomai* pertenezca a otro género explicaría su posición en la filogenia molecular (Fig. 29). Ante el estatus incierto de *O. mascomai* no podemos saber cual sería la posición real de *Oschmarinella* en la filogenia de Campulidae.

De acuerdo con el árbol consenso obtenido sobre la filogenia de los géneros de Campulidae (Fig. 29), puede hipotetizarse que *Orthosplanchnus* se originó por la colonización de Campúlidos que parasitaban odontocetos, hacia los pinnípedos, siendo *Oschmarinella* el género hermano putativo. La selección de hábitat que exhiben las especies de *Orthosplanchnus* es claramente congruente con esta secuencia.

La primera cuestión que surge es cuándo, y sobre qué grupo de hospedadores se inició la asociación. Normalmente se ha asumido que ésta se estableció primariamente con los pinnípedos, y que es antigua. Sorprendentemente, este último matiz se ha basado de forma preponderante en el registro de *O. antarcticus*, ya que

ésto indicaría una distribución bipolar del género, y sobre miembros basales de la familia Phocidae (Monachinae, Figs. 34 y 35). Entre otros, esta idea ha sido sugerida por Dailey (1975), Adams y Rausch (1989) y Hoberg y Adams (1992). A partir de los datos sobre especificidad de *Orthosplanchnus* que conocemos, puede postularse que la captura pudo producirse, como máximo, antes de la segregación de odobénidos y fóciidos ( Fig. 34), lo cual no está en contradicción con lo que sugieren estos autores, pero descansa sobre evidencias más sólidas. Apoyar la hipótesis sobre la base del registro de *O. antarcticus* es muy poco parsimoniosa, ya que habría que postular que ha existido un gran número de extinciones del parásito dentro de los Monachinae: en el ancestro de la tribu Monachini (focas monje tropicales); en el ancestro de la tribu Miroungini (elefantes marinos), y en los restantes géneros de la tribu Lobodontini (*Hydrurga*, *Ommatophoca*, *Lobodon*). Y esto es así porque los Monachinae llevan geográficamente separados de los Phocinae de 5 a 10 m.a. Podría objetarse que la inferencia de que ha habido un gran número de extinciones es débil porque la información sobre la helmintofauna de Monachinae es muy fraccionaria (de hecho, no hay estudios completos en casi ninguna de las especies, véase Tabla 26). Sin embargo, este argumento no es excesivamente sólido. Se tiene constancia de que prácticamente todas las especies de este grupo se han analizado alguna vez desde un punto de vista parasitológico, desde principios de siglo (véase, por ejemplo, algunas referencias en Lauckner, 1985a). Si *Orthosplanchnus* hubiera estado más extendida en pinnípedos del Hemisferio Sur, nuestra impresión es que debería haber más citas sobre trematodos hepáticos en este grupo de hospedadores (aunque no se hubiesen clasificado). Si a este argumento sumamos las objeciones taxonómicas y ecológicas aducidas en el apartado 4.3.9., el estatus genérico de *O. antarcticus* se hace más y más dudoso.

En conclusión, nuestra hipótesis es que o bien (a) la captura de hospedador tuvo lugar en el ancestro de Odobenidae + Phocidae, pero perdiéndose posteriormente en los Monachinae (asumiendo un carácter monofilético de éste último grupo, véase Hoberg y Adams, 1992), o (b) la captura se produjo en los Phocidae, y el género se extendió a Odobenidae a través de las redes tróficas, en un contexto ecológico y geográfico concreto. Con la información disponible hasta el momento, ambas posibilidades son igualmente plausibles. Por el momento no existe una filogenia del género que pueda servir de base para plantear hipótesis biogeográficas más concretas que discernan entre ambas posibilidades.

En cualquier caso, los patrones globales sobre la especificidad y biogeografía de *Orthosplanchnus* (véase 4.3.9.) permiten una mayor profundización sobre los procesos implicados en la diversificación de este género. Esto puede hacerse gracias al conocimiento inestimable que se posee en torno al origen y diversificación del género *Anophryocephalus* (Cestoda: Tetrabothriidae), que también parasita pinnípedos en la misma área geográfica (Hoberg, 1992; Hoberg y Adams, 1992; Hoberg, 1995).

En sus distintos trabajos, Hoberg describe cómo el género *Anophryocephalus* exhibe una distribución restringida a la región holártica boreal, y limitada a un pequeño grupo de fócidos y otáridos (descontando hospedadores facultativos ecológicos). La asociación parece tener un claro origen por captura a partir de odontocetos, y los cladogramas de las especies de parásitos son muy incongruentes respecto a las de sus hospedadores. Esto sugiere que las asociaciones parásito/hospedador a nivel específico también vienen fuertemente determinadas por colonización, en virtud de la ecología trófica de los hospedadores. Prácticamente, todos los resultados obtenidos al respecto en el caso de *Orthosplanchnus* son similares. En primer lugar, el origen es a partir de una captura desde odontocetos. Por otro lado, aunque no poseemos un cladograma detallado de las especies de *Orthosplanchnus*, varias evidencias indican que la colonización ha determinado gran parte de las asociaciones. Así, por ejemplo, *O. arcticus* u *O. fraterculus* se dan en hospedadores principales no inmediatamente emparentados: entre los pinnípedos, morsas y focas barbudas, pero no frecuentemente en otras focas; también en fisípedos, como nutrias marinas. Puede sospecharse que este tipo de patrones son el resultado de asociaciones establecidas en gran medida mediante interacciones predecibles a largo plazo a través de redes tróficas (véase Hoberg, 1987). El caso más claro es el de la similitud de las faunas de todas las especies de hospedadores con alimentación bentónica (véase apartado 4.3.9.).

Desde un punto de vista histórico, básicamente, la idea de Hoberg respecto al género *Anophryocephalus* es que fue capturado por el ancestro del género *Phoca* en el área atlántica Subártica, "acompañando" a este género a medida que colonizó el Artico y atravesó el Estrecho de Bering. Hoberg postula que la diversificación y extensión del parásito estuvo relacionada con los episodios de aislamiento que los

ciclos glaciares del Plioceno Tardío y el Pleistoceno impusieron sobre las poblaciones de hospedador (y, en consecuencia, sobre las de *Anophryocephalus*). Así, se producirían situaciones de vicarianza y microalopatría que generarían especiación de los hospedadores, o los parásitos, o ambos (la tasa de especiación puede ser diferente para cada uno, y los periodos de aislamiento podrían ser o no suficientemente largos para generar especiación en cada caso). En los periodos entre glaciaciones se produciría la expansión poblacional (y geográfica) de los hospedadores, que permitiría también una mayor posibilidad de intercambio de parásitos a través de las redes tróficas. Consecuencia de estos periodos de intercambio fue la expansión del parásito hacia diferentes especies de pinnípedos, en algunos de los cuales, no estrechamente relacionados con el género *Phoca*, como *Eumetopias jubatus* (familia Otariidae) se produjo especiación del parásito, al menos en dos ocasiones (véase Hoberg y Adams, 1992; Hoberg, 1995).

La hipótesis de Hoberg es coherente con los datos paleontológicos existentes sobre el origen y diversificación de la familia Phocidae y el género *Phoca*. En lo que concierne a la información relevante disponible respecto al problema de *Orthosplanchnus*: (i) la subfamilia Phocinae se originó en el Atlántico Norte y se dispersó hacia las regiones boreales y subárticas. La extensión por el Pacífico tuvo lugar a través del Estrecho de Bering, que se abrió hace alrededor de 3,0-3,5 millones de años. La radiación de los fócinos modernos tuvo lugar durante el Plioceno Tardío y el Pleistoceno, coincidiendo con el comienzo de los ciclos principales de glaciación en el Hemisferio Norte (véase resumen en Hoberg y Adams, 1992); (ii) los odobénidos tienen su origen en el Pacífico (Baja California, México), pero su dispersión implicó el paso por el Estrecho Centroamericano, de modo que la evolución posterior de este grupo ocurrió en el Atlántico. En el Pleistoceno, el género *Odobenus* estaba ya repartido en el Atlántico Este y Oeste. La entrada hacia el Pacífico tuvo lugar también a través del Estrecho de Bering hace unos 70.000 años.

Es posible plantear un paralelismo en la evolución geográfica de *Orthosplanchnus* y *Anophryocephalus*. Nuestra hipótesis es que la captura de *Orthosplanchnus* debió producirse también en el Atlántico, aunque no es posible determinar si sobre *Odobenus*, o sobre *Erignathus*. Posteriormente se extendería hacia la región del Pacífico acompañando a sus hospedadores a través de Bering. Desde este punto de vista, es probable que *O. arcticus* u *O. fraterculus* sean las

especies basales del género. La similitud en la evolución geográfica de *Anophryocephalus* y *Orthosplanchnus* se ve sustentada por la sorprendente similitud geográfica en la distribución de ambos géneros (véase Hoberg y Adams, 1992; Hoberg, 1995).

Según la discusión anteriormente desarrollada respecto a los géneros de la familia Campulidae, es posible hipotetizar sobre la posición de aquéllos géneros cuyos representantes no pudieron ser incluidos en el estudio molecular (es decir, *Lecithodesmus* y *Hunterotrema*). Por lo tanto, la hipotética filogenia de los géneros de la familia Campulidae que proponemos sería la representada en la Fig. 51.

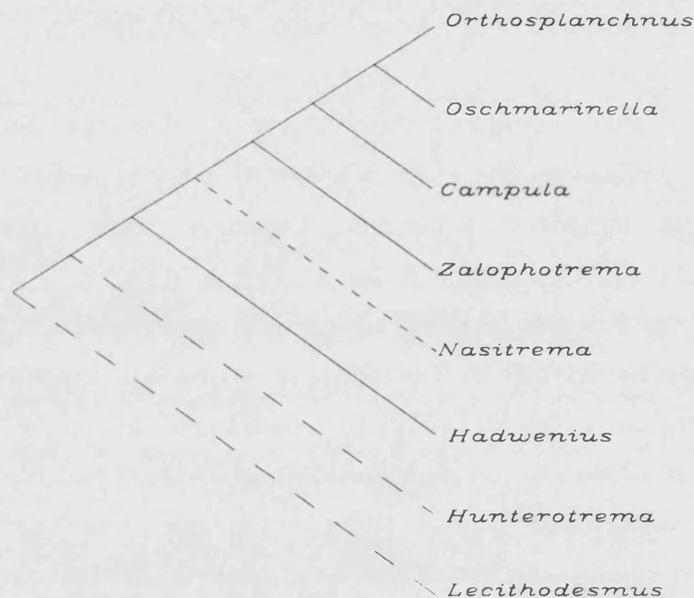


Figura 51. Hipótesis sobre las relaciones filogenéticas de los géneros de la familia Campulidae, de acuerdo con la filogenia molecular presentada en este estudio y la discusión precedente (apartado 4.4). Las líneas discontinuas en *Lecithodesmus* y *Hunterotrema* indican su posible situación en el cladograma de los Campulidae. La línea discontinúa en *Nasitrema* significa su posición inestable en la filogenia molecular que se obtuvo en este trabajo (véase Fig. 29).

Figure 51. Hypothesis on the relationships of the genera of the family Campulidae, according to the molecular phylogeny obtained in this study and preceding discussion (section 4.4.). Discontinuous lines in *Lecithodesmus* and *Hunterotrema* indicate their possible location in the tree of the family Campulidae. Discontinuous line in *Nasitrema* indicates its unstable location, according to the molecular phylogeny obtained in this study (see Fig. 29).

En términos generales, se pueden reconocer tres elementos fundamentales en la historia de la familia Campulidae y mamíferos marinos desde el punto de vista de la relación parásito-hospedador:

a) La fauna de campúlidos en misticetos divergió y, finalmente, se independizó de la de otros mamíferos marinos. Cualquiera que fuese el origen particular de *Lecithodesmus* (véase más arriba), las ballenas actuales sólo presentan esta especie de campúlido y este campúlido, además, no se presenta en ningún otro cetáceo. La gran divergencia en el tipo de alimentación entre las ballenas y los odontocetos, quizá impidió la posibilidad de más intercambios faunísticos de esta particular familia de digénidos, a lo largo de la subsecuente historia de estos grupos de hospedadores. Por tanto, se espera que se produzca intercambio de helmintos (*Lecithodesmus*), sólomente entre las distintas especies de ballenas, en contextos adecuados. La divergencia fisiológica entre los hospedadores odontocetos y misticetos, que podría aumentar la especificidad de los parásitos, no parecería ser la explicación a la presencia exclusiva de *Lecithodesmus* en misticetos, ya que ha habido capturas de hospedador entre taxones más distantes, como focas y delfines.

b) *Hunterotrema* constituye una unidad coevolutiva que se aisló históricamente del resto de sus hospedadores potenciales. Consecuentemente, sólo se podría esperar que fuera compartida por delfines simpátricos actuales (como, *Sotalia fluviatilis*, del que no hay datos sobre la existencia de este helminto).

c) La fauna de campúlidos de delfines, marsopas y pinnípedos parece haberse originado a partir de una intrincada historia de eventos coevolutivos y de colonización, a distintas escalas filogenéticas. Varios autores (por ejemplo, Brooks, 1979 y Hoberg, 1987) han argumentado que la captura de hospedador es un proceso estocástico, pero que depende de una larga historia de interacciones parásito-hospedador. Estas interacciones están ligadas a redes tróficas, las cuales parecen poner en contacto una serie de hospedadores de distinto origen filogenético (por ejemplo, delfines, marsopas y focas). Asumiendo que la distancia fisiológica no es un obstáculo fundamental para la colonización (y la colonización es, de hecho, un tema común en el desarrollo de faunas parasitarias en homeotermos marinos, incluyendo aves marinas y mamíferos), se espera que los campúlidos puedan extenderse y finalmente especiar fuera de sus unidades coevolutivas. Esta podría ser la razón de por qué los delfines y marsopas



comparten la mayoría de los géneros de campúlidos, y de por qué algunos campúlidos han pasado a pinnípedos al menos dos veces.

## **5. ORIGEN DE LA FAMILIA CAMPULIDAE**



Tradicionalmente, se ha relacionado a los campúlidos con dos familias: Fasciolidae, formada por parásitos de rumiantes terrestres, y Acanthocolpidae, compuesta por parásitos de peces (véase apartado 1.2.). Los únicos estudios en los que se han tratado las relaciones entre estos tres grupos son los de Brooks et al. (1985, 1989). En este capítulo se tratará de discutir las evidencias a favor y en contra de las dos alternativas sobre el origen de la familia Campulidae: origen común con Fasciolidae, lo cual implicaría un proceso de asociación por descendencia y origen común a Acanthocolpidae, lo cual implicaría un fenómeno de captura de hospedador.

### 5.1. **Morfología**

La relación entre las familias Campulidae y Fasciolidae se estableció a partir de la similitud en ciertos caracteres morfológicos. Brooks et al. (1985) definieron a los campúlidos como Fascioloidea con huevos de sección triangular, testículos dendríticos, vitelaria que se extiende a lo largo del cuerpo, ventosa ventral en el tercio anterior del cuerpo y sin vesícula seminal externa. Las únicas diferencias son: la presencia de ciegos intestinales anteriores en campúlidos, que están ausentes en fasciólidos; la presencia de ramificaciones en los ciegos y en la vesícula excretora en fasciólidos, que no aparecen en campúlidos; y la sección de los huevos, que es triangular en campúlidos y circular en fasciólidos. Estas diferencias morfológicas fueron consideradas por los distintos autores bien para mantener a estos dos grupos como familias independientes, o bien para agruparlos incluso en una misma familia (véase, por ejemplo, Stunkard y Alvey, 1930).

Respecto a Acanthocolpidae, Brooks et al. (1989) señalaron que las características que relacionan a éstos con Campulidae son: (1) la presencia de cercarias con manchas oculares, carácter que no se presenta en equinostomatiformes, grupo en el que se incluyeron inicialmente los campúlidos, junto a fasciólidos (Brooks et al., 1985), (2) un gran cirro espinoso, (3) metratermo espinoso, (4) prefaringe larga y (5) ventosa oral terminal o subterminal. El punto más conflictivo es el (1), como veremos a continuación. En primer lugar, la presencia de manchas oculares no se señala siempre en el mismo estado larvario. Es decir, en ocasiones se habla de miracidios con manchas oculares y en otras, de la cercaria. Parece ser que se trata de un carácter variable en las distintas fases del crecimiento larvario. En ciertos casos, las manchas oculares se pierden; en otros, se retienen en forma de un pigmento disperso en el adulto y, en ciertos grupos, se mantienen intactas en el adulto (R. Bray, com. pers.). Por ejemplo, Cheng (1976) citó la presencia de

manchas oculares en el miracidio de *Fasciola hepatica*, carácter que Brooks et al. (1985) señalan como ausente en las cercarias de equinostomatiformes. En segundo lugar, no parece existir un acuerdo sobre la presencia de manchas oculares en campúlidos. Así, Cable (1974) citó la presencia de manchas oculares en cercarias putativas de *Orthosplanchnus fraterculus*; Appy (1974) también señaló que los miracidios de *Nasitrema* presentaban manchas oculares, mientras que Dailey (1985) no las encontró en el miracidio de *Campula rochebruni*. En nuestra opinión, dada la imprecisión y el desconocimiento de los caracteres relacionados con las formas larvianas, sobre todo de campúlidos, hace que sea poco prudente el empleo de los mismos para establecer relaciones de parentesco.

## **5.2. Probabilidad de los sucesos**

Para cada una de las dos posibles hipótesis sobre el origen de los campúlidos, coevolución y captura de hospedador, se argumentarán las evidencias a favor y en contra de la probabilidad de que se haya producido uno u otro fenómeno. Además, en cada caso se expondrán ejemplos de estos procesos en otros grupos de parásitos.

### **Coevolución**

a) Los argumentos que *harían probable* el origen de la familia Campulidae por coevolución se exponen a continuación:

(i) Grupos hermanos. La hipótesis coevolutiva parte del hecho de que los artiodáctilos y los cetáceos parecen ser grupos hermanos, y que los fasciúlidos parasitan artiodáctilos, mientras que los campúlidos parasitan mamíferos marinos, especialmente cetáceos.

Flower (1883, en Barnes, 1990) fue el primero que propuso una estrecha relación entre los órdenes Cetacea y Arthiodactila, a partir de caracteres morfológicos. Recientes estudios a nivel paleontológico, bioquímico y molecular, han establecido con bastante firmeza que los cetáceos y artiodáctilos constituyen grupos hermanos (Barnes, 1990; Milinkovitch, 1992). Graur y Higgins (1994) demostraron, además, que los cetáceos se encuentran más próximos al suborden Ruminantia (vacas, jirafas, ciervos, ovejas, cabras, etc.) que a cualquier otro suborden de artiodáctilos (en donde se incluirían el resto, es decir, cerdos e hipopótamos). Parece ser que los arqueocetos, suborden que comprende los

cetáceos más primitivos y que está compuesto por especies fósiles (Barnes, 1984), se desarrollaron a partir de ungulados terrestres del grupo de los mesoníquidos condilartos (Morales, 1990). El hecho de que los mesoníquidos fueran carnívoros (Lavocat, 1961; Morales, 1990) y que pudieran alimentarse posiblemente partir de moluscos (Lavocat, 1961), habría facilitado el desarrollo del ciclo vital de los campúlidos (o sus ancestros) en el medio marino.

(ii) Formas hospedadoras intermedias dulceacuícolas. La transición de los ancestros de los cetáceos del medio terrestre al acuático supuso una importante modificación en lo que respecta, principalmente, a la fisiología y morfología de los mismos. Sin embargo, se han encontrado formas fósiles intermedias en las que se observa una modificación progresiva de las estructuras (Gingerich et al., 1994; Gould, 1994; Thewissen et al., 1994). Además, parece ser que antes de habitar de forma permanente el medio marino, los cetáceos vivieron en los ríos que bordeaban los mares. Los restos fósiles de arqueocetos, concretamente *Pakicetus*, que representa el cetáceo más antiguo que se conoce, se han localizado en sedimentos fluviales (Gould, 1994). Todo ello sugiere que el tránsito de un medio a otro no se produjo de forma tan radical como para impedir un proceso coevolutivo entre los cetáceos y sus helmintos.

Algunos casos de coevolución con tránsitos entre medios muy diferentes han sido expuestos por Delyamure (1955), Balbuena et al. (1994) y Brooks y McLennan (1993b). El primer autor citó varios géneros de nematodos que, posiblemente, fueron retenidos por sus hospedadores al pasar desde el medio terrestre al acuático. Este investigador llegó a esta conclusión porque se han encontrado especies de nematodos de la misma familia en cetáceos y en carnívoros terrestres. De forma similar, Balbuena et al. (1994) consideraron un origen terrestre para los nematodos de la familia Pseudaliidae, puesto que la mayoría de las especies de metastrongilidos se presentan en mamíferos terrestres. Según Anderson (1982), los pseudálidos se adaptaron a la vida marina junto con sus hospedadores. Brooks y McLennan (1993b) expusieron el caso de la familia Potamotrygonidae, compuesta por los únicos elasmobranquios (rayas) que viven ligados permanentemente a medio fluvial. Sus especies se distribuyen por varios sistemas fluviales de América del Sur (Amazonas, Orinoco, Maracaibo, Paraná y Magdalena). Tras un estudio sobre la biogeografía histórica y filogenia de las rayas de agua dulce y de sus parásitos, se llegó a la conclusión de que la mayoría de los parásitos que presentan estos peces fueron introducidos al medio dulceacuícola con los ancestros de las rayas. Estos helmintos emplean moluscos o

artrópodos como hospedadores intermediarios, cuyos ancestros de origen marino penetrarían en las aguas dulces neotropicales, junto con los ancestros de los Potamotrygonidae (Brooks y McLennan, 1993b).

(b) Los argumentos que *no harían probable* el origen de la familia Campulidae por coevolución son los siguientes:

(i) Pérdida de parásitos. Delyamure (1955) sugirió que el paso de los hospedadores de un ecosistema terrestre a uno acuático conllevó, con toda probabilidad, a la extinción de gran parte de los helmintos que albergaban, ya que no pudieron adecuar sus ciclos vitales al nuevo medio. El medio pelágico sería una barrera que impidió la dispersión de los parásitos de origen terrestre (Hoberg, 1987). Parece ser que este factor ha sido de especial importancia en la estructuración de las comunidades helmínticas de algunas especies de cetáceos, como *Globicephala melas* y *Pontoporia blainvillei* (Balbuena y Raga, 1993; Aznar et al., 1994).

(ii) Ajuste de ciclos vitales. El principal problema para los parásitos que sobrevivieron al tránsito de la tierra al mar fue el de encontrar, de forma más o menos rápida, los hospedadores intermediarios adecuados para poder completar el ciclo vital. En el caso de la familia Campulidae, no se conoce nada sobre el ciclo vital.

### **Captura de hospedador**

a) El argumento que *haría probable* el origen de la familia Campulidae por captura de hospedador se expone a continuación:

Alta frecuencia de exposición del parásito a partir de presas. Aunque el medio pelágico pudo constituir una barrera a la hora de la dispersión de los parásitos de procedencia terrestre, es posible que los cetáceos, en su nuevo medio, se infectaran con otras especies de helmintos, especialmente de peces (Delyamure, 1955). La colonización está controlada por mecanismos estocásticos, pero depende de la predecibilidad a largo plazo en la relación entre un determinado predador y una determinada presa (véase Hoberg, 1987). No obstante, la colonización de un nuevo hospedador puede operar de forma bastante rápida (Holmes y Price, 1980).

Los acantocólpidos comprenden parásitos cuyo ciclo vital incluye gasterópodos marinos como hospedadores intermediarios, y peces como definitivos. Asumir un origen común para acantocólpidos y campúlidos implica que trematodos cuyo ciclo finalizaba en peces tuvieron que extenderlo hacia un hospedador mamífero. Por supuesto, esto no es excepcional. Un ejemplo paradigmático de cómo una extensión de hospedador ha tenido un gran éxito evolutivo es el caso de los digénidos, que fueron primitivamente parásitos de moluscos, pasando posteriormente a un hospedador vertebrado al alimentarse directamente de moluscos que portaban parásitos adultos (Gibson, 1987). En dicha situación, la presión de selección habría provocado la extensión del periodo de supervivencia del parásito y, por tanto, la permanencia de los huevos en el nuevo hospedador, convirtiéndose más tarde en hospedador definitivo. De forma similar, los mamíferos marinos pudieron adquirir los campúlidos al alimentarse de los peces infestados, de forma que la larva que parasitaba al pez, fue capaz de completar su desarrollo en el mamífero, convirtiéndose así en hospedador definitivo. En el contexto de los homeotermos marinos, uno de los casos más claros de captura de hospedador lo constituyen los cestodos de la familia Tetrabothriidae. Se trata de un grupo monofilético, ampliamente distribuido entre mamíferos homeotermos que aparecieron por colonización a partir de cestodos de elasmobranquios (Hoberg, 1987, véase más arriba). La distribución de algunos de sus géneros sugiere que el proceso de captura de hospedador ha sido un factor muy importante en la radiación de la familia en aves marinas, cetáceos y pinnípedos (Hoberg, 1987). Este proceso habría tenido lugar por las asociaciones de tipo trófico entre elasmobranquios y mamíferos homeotermos, siendo los crustáceos, cefalópodos y teleósteos presas comunes.

b) El argumento que *no haría probable* el origen de la familia Campulidae por captura de hospedador sería el siguiente:

#### Distancia fisiológica y filogenética entre los hospedadores

En el apartado anterior, cuando se comentó la posibilidad de que los campúlidos procedieran de formas que parasitaban mamíferos terrestres, se señaló la dificultad que debía suponer el paso de un sistema terrestre a otro acuático a la hora de acomodar los ciclos de vida de los parásitos. En este caso, la dificultad estriba en que los helmintos parasitan un determinado tipo de hospedador, peces, invadiendo posteriormente un hospedador de unas condiciones completamente distintas, mamíferos. Según Freeland

(1983) cuanto mayor es la distancia filogenética entre dos hospedadores, menos probable es que un parásito de uno de ellos posea antígenos compatibles con el otro hospedador, dificultando así el proceso de colonización. Balbuena y Raga (1993) sugirieron que el aislamiento de los cetáceos en el medio marino restringió la posibilidad de nuevas infecciones con helmintos compatibles con la fisiología del hospedador, lo que constituiría un obstáculo para la captura de hospedador.

### 5.3. Microhábitat

Según Hoberg y Lichtenfels (1994), la filogenia de los helmintos puede proporcionar información respecto a la evolución de la selección de hábitat dentro del hospedador. De Queiroz y Wimberger (1993) establecieron que los caracteres comportamentales (como, por ejemplo, la elección predecible de un tipo de hábitat) pueden ser empleados a la hora de establecer filogenias, puesto que no presentan mayor convergencia que los caracteres morfológicos. En este sentido, se pueden plantear varias hipótesis respecto al origen de la familia Campulidae:

Como se observó en la filogenia propuesta para los géneros de la familia Campulidae (Fig. 51), *Lecithodesmus* constituiría el género basal de los campúlidos (véase apartado 4.4.). Por lo tanto, se podría hipotetizar que el hígado es el hábitat ancestral (carácter plesiomórfico), y se ha heredado de un ancestro hepático, al igual que en algunos grupos de fasciólidos (Fig. 52). Este carácter se mantiene en cinco géneros que parasitan los conductos hepato-pancreáticos de sus hospedadores (*Lecithodesmus*, *Zalophotrema*, *Campula*, *Oschmarinella* y *Orthosplanchnus*). No obstante, otros tres seleccionan otros hábitats (*Hadwenius* es intestinal, *Hunterotrema* pulmonar y *Nasitrema* parasita los senos pterigoideos, Fig. 52). Estos hábitats serían derivados (apomórficos), lo que sugeriría una importante potencialidad para colonizar nuevos hábitats. Esto no parece demasiado sorprendente, puesto que en los fasciólidos también hay grupos que han colonizado los pulmones e intestino; incluso un mismo género puede parasitar el hígado y los pulmones del hospedador (Yamaguti, 1971). Todo ello sugiere quizá que esa potencialidad estaba latente en el ancestro. De hecho, si se asume que *Lecithodesmus* ha sido capturado secundariamente (véase Pto. 4.4.), el género basal de los campúlidos debería ser ahora *Hunterotrema* (Fig. 51), cuyo habitat pulmonar coincide con el del género *Fascioloides* (familia Fasciolidae).

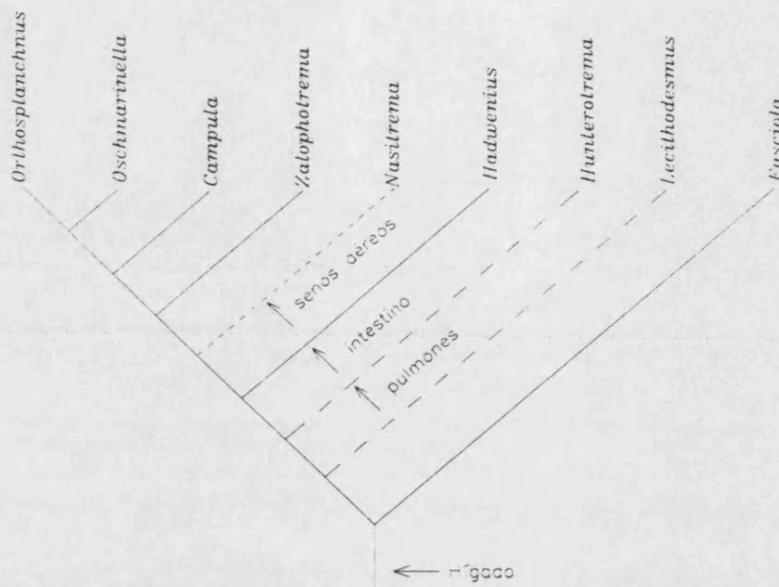


Figura 52. Cladograma de los géneros de la familia Campulidae, en donde se indican los cambios de hábitat suponiendo una hipótesis coevolutiva. Las relaciones que se muestran son consistentes con la propuesta del hígado como hábitat ancestral.

Figura 52. Cladogram of the genera of the family Campulidae, indicating helminth habitat shifts under an hypothesis of coevolution. The relationship is consistent to the liver as the ancestral habitat.

Si, por contra, se asume que un ancestro de los acantocólpidos colonizó un hospedador cetáceo, ello supondría un cambio drástico en el tipo de hospedador (de pez a mamífero). En este caso, es mucho más difícil explicar cómo pudo cambiar el hábitat ancestral intestinal, propio de todas las especies de Acanthocolpidae, hacia un hábitat hepático (¡o pulmonar!), propio de las especies presumiblemente basales de Campulidae. La razón es la siguiente: las vías de migración seguidas por los parásitos para alcanzar un órgano concreto implican pautas de acción muy fijas (Sukhdeo, 1990) que responden a señales fisicoquímicas muy específicas (Adamson y Caira, 1994). Cabe asumir que la distancia fisiológica entre peces y mamíferos supone un obstáculo importante para la modificación inicial de estas vías migratorias. Además, la captura de hospedador a partir de acantocólpidos constituiría un proceso menos parsimonioso, puesto que implicaría un mayor número de cambios de hábitat.



## **6. RESUMEN Y CONCLUSIONES**



En el presente trabajo se ha realizado un estudio filogenético y biogeográfico de la familia Campulidae. Mediante el estudio del gen mitocondrial NADH3 se obtuvo una filogenia parcial de dicha familia, empleando las especies *Hadwenius tursionis*, *Zalophotrema atlanticum*, *Campula oblonga*, *Oschmarinella mascomai* y *Orthosplanchnus fraterculus* (de las subfamilias Orthosplanchninae y Campulinae). Además, se usó *Nasitrema globicephalae* para esclarecer las relaciones entre las familias Campulidae y Nasitrematidae. *Dicrocoelium dendriticum* y *Fasciola hepatica* fueron empleados como grupos externos u "outgroups". Los datos de la filogenia molecular obtenida se contrastaron con los de la taxonomía tradicional respecto a la división actual de Campulidae en subfamilias, así como el estatus de la familia Nasitrematidae. Además, se evaluaron hipótesis alternativas preliminares de coevolución y colonización para intentar explicar el origen y subsecuente asociación entre los campúlidos y sus hospedadores.

A raíz del trabajo realizado se han extraído las siguientes conclusiones:

1. La filogenia molecular consenso obtenida para los campúlidos en el presente trabajo indica una posición basal para la especie *Hadwenius tursionis*. La siguiente divergencia se produce en *Zalophotrema atlanticum*, después en *Campula oblonga*, *Oschmarinella mascomai* y, por último, *Orthosplanchnus fraterculus*. La posición de *Nasitrema globicephalae* no quedó perfectamente definida en ninguno de los análisis; en unos casos apareció más próxima a *H. tursionis* y, en otras, a *Zalophotrema atlanticum*.
2. La filogenia molecular obtenida en el presente estudio sugiere que las subfamilias Orthosplanchninae y Campulinae no parecen presentar un origen monofilético, por lo que la agrupación de los géneros *Orthosplanchnus*, *Oschmarinella* y *Hadwenius* en la subfamilia Orthosplanchninae y de *Campula* y *Zalophotrema* en la subfamilia Campulinae parece artificial.
3. La especie *Nasitrema globicephalae*, tradicionalmente asignada a la familia Nasitrematidae, forma parte de un grupo monofilético con el resto de los campúlidos. En consecuencia, el género *Nasitrema* debería pasar a formar parte de la familia Campulidae.

4. Sugerimos dos hipótesis alternativas sobre el origen del género *Lecithodesmus*: (i) este género podría haber coevolucionado con los mysticetos (con lo que ocuparía una posición basal en el en el cladograma de los campúlidos), o (ii) podría haber sido producto de un fenómeno de captura de hospedador a partir de campúlidos de odontocetos, hacia la familia Balaenopteridae o, más concretamente, hacia el género *Balaenoptera*.

5. Aunque se desconoce la posición del género *Hunterotrema* en la filogenia molecular, éste debe haber aparecido tras un proceso de coevolución con Iniidae, puesto que los Iniioidea han estado confinados al medio dulceacuícola desde su origen. En cualquier caso, sería necesaria una revisión taxonómica del género como tal.

6. *Hadwenius* es el género de Campulidae con mayor grado de diversificación y extensión geográfica y de hospedadores. La aparición en un gran número de grupos de odontocetos (Pontoporiidae, Monodontidae, Phocoenidae y Delphinidae) y la distribución mundial de sus especies indicarían un periodo largo de interacción parásito-hospedador, con gran cantidad potencial de fenómenos de captura de hospedador entre distintas especies de odontocetos. Desde esta perspectiva, no es posible discernir el grupo de hospedadores originalmente ligado al ancestro de *Hadwenius*.

7. El género *Nasitrema* aparece en un gran número de especies de las familias Phocoenidae y Delphinidae, sin un patrón de especificidad global muy aparente. Por contra, este género exhibe una distribución geográfica muy definida, con una región endémica en el Pacífico Este, y una ausencia marcada, al menos, en el Atlántico Noreste y el Mediterráneo. Aparentemente, dicho patrón podría estar más ligado a la combinación de dos factores: (i) el centro de origen putativo del género podría situarse en el Pacífico Este, (ii) la interacción ecológica y/o histórica con los hospedadores intermediarios y/o las condiciones fisicoquímicas de los océanos habrían limitado la dispersión.

8. *Zalophotrema* parasita dos grupos de hospedadores muy dispares y específicos: Otáridos (principalmente *Zalophus californianus*), y delfínidos (particularmente, 3 especies de *Stenella*). A partir de estos datos, parece muy probable asumir que en

esta distribución ha mediado una captura de hospedador de uno a otro grupo. Por tanto, cabe plantear que (i) el ancestro de *Zalophotrema* pasó por colonización a otáridos desde un ancestro que parasitaba odontocetos, y más tarde fue recapturado por el género *Stenella*, o (ii) la asociación con *Stenella* es basal, y la captura de algunas especies de otáridos, secundaria. Si se asume la hipótesis de que *Stenella* es el grupo primario de *Zalophotrema*, resulta muy difícil que éste haya surgido por coevolución.

9. *Campula* aparece bastante extendida en las familias Delphinidae y Phocoenidae. No obstante, las especies de *Campula* parecen mayormente ligadas a los géneros *Phocoena* y *Phocaenoides*, y al grupo *Delphinus*, *Stenella* y *Tursiops*. De nuevo se plantea cual fue el grupo con el que coevolucionó (ancestros dentro de Delphinidae o Phocoenidae) y en cuál se produjo la colonización posterior.

10. Ante el estatus taxonómico incierto de *Oschmarinella mascomai* no podemos saber cual sería la posición real del género *Oschmarinella* en la filogenia molecular de Campulidae. Además, hay una extrema escasez de registros sobre *Oschmarinella* en la literatura, que complica la formulación de hipótesis sobre su origen. El estatus genérico de *Oschmarinella* debería revisarse.

11. El género *Orthosplanchnus* es casi exclusivo de pinnípedos y la nutria marina, habiéndose originado por la colonización de campúlidos que parasitaban odontocetos. La captura de hospedador tuvo lugar, o bien en el ancestro de Odobenidae + Phocidae, perdiéndose posteriormente en los Monachinae, o bien dentro del grupo Phocidae (*Erignathus*?) u Odobenidae (*Odobenus*), extendiéndose al otro grupo y la nutria marina a través de las redes tróficas. Los patrones globales sobre la especificidad y biogeografía de *Orthosplanchnus*, y la información obtenida en otros grupos de helmintos que parasitan focas árticas, permiten hipotetizar que la captura de *Orthosplanchnus* debió producirse en el Atlántico boreal. Posteriormente se extendería hacia el Pacífico subártico acompañando a sus hospedadores a través de Bering.

12. En resumen, pueden destacarse tres grupos de procesos implicados en la asociación de la fauna de campúlidos con sus hospedadores: (a) los mysticetos poseerían campúlidos exclusivos y no compartidos con los de otros mamíferos

marinos. Ello podría estar relacionado con la divergencia trófica de este grupo frente a otros cetáceos, que impediría intercambios posteriores a través de las redes tróficas; (b) *Hunterotrema* habría quedado aislado desde su origen por el confinamiento ecológico histórico de sus hospedadores y (c) los delfines, marsopas y pinnípedos habrían mantenido una larga y compleja historia de coevolución, e intercambio de campúlidos a diferentes escalas filogenéticas merced a la coincidencia básica en sus regímenes tróficos.

13. El origen de la familia Campulidae es incierto, y los análisis del presente trabajo no pueden dar respuestas concluyentes. En este trabajo se han evaluado, en términos de congruencia, las hipótesis alternativas de coevolución a partir de un digénido terrestre que parasitaba artiodáctilos (grupo hermano putativo: Fasciolidae), y la de una colonización a partir de digénidos de peces (grupo hermano putativo: Acanthocolpidae). Los resultados indican que (a) no hay criterios morfológicos claros que permitan relacionar mejor Campulidae con Fasciolidae o con Acanthocolpidae; (b) los dos procesos, coevolución y colonización, son teóricamente equiprobables, de acuerdo con la información disponible, los obstáculos potenciales, y lo que se observa en otros muchos grupos; (c) el patrón de selección de hábitat dentro del hospedador de los géneros de Campulidae es más parsimonioso con la hipótesis de coevolución. Por último, el empleo de la especie tipo de los Fasciolidae, *Fasciola hepatica*, como "outgroup" del análisis realizado, ha generado una filogenia molecular coherente.

## **7. APÉNDICE**



## APÉNDICE

Listado de referencias empleadas en las tablas 25 a 34 (véanse las referencias completas en Bibliografía).

1. Mathews (1938a)
2. Heckmann et al. (1987)
3. Rees (1953)
4. Skrjabin (1974)
5. Alvarez y Pefaur (1970)
6. Rice (1977)
7. Margolis y Pike (1955)
8. Dailey y Vogelbein (1991)
9. Lambertsen (1986)
10. Skrjabin (1970b)
11. Yablokov et al. (1972)
12. Measures (1993)
13. Yurakhno (1967)
14. Mathews (1938b)
15. Delyamure (1957)
16. Delyamure (1955)
17. Lyster (1940)
18. Martineau et al. (1988)
19. Price (1932)
20. Delyamure (1964)
21. Wazura et al. (1986)
22. Measures et al. (1995)
23. Treschev (1978)
24. Krotov y Delyamure (1952)
25. Yamaguti (1971)
26. Treschev (1968)
27. Delyamure (1961)
28. Raga (1985)
29. Skrjabin (1947)
30. Reyes et al. (1992)
31. Skrjabin (1959)
32. Zam et al. (1971)
33. Forrester et al. (1980)
34. Cannon (1977)
35. Raga y Balbuena (1988)
36. Raga y Balbuena (1993)
37. Cowan (1967)
38. Yamaguti (1942)
39. Schroeder et al. (1973)
40. Forrester y Robertson (1975)
41. Ferrero (1994)
42. Santos et al. (1992)
43. Greenwood et al. (1979)
44. Delyamure (1949)
45. Johnston y Ridgway (1969)
46. Woodard et al. (1969)
47. Delyamure y Serdyukov (1966)
48. van Waerebeek et al. (1990)
49. Raga et al. (1985)
50. Hörning y Pilleri (1969)
51. O'Shea et al. (1991)
52. Beverley-Burton (1972)
53. Raga et al. (1982)
54. Manfredi et al. (1992)
55. Raga y Carbonell (1985)
56. Abril et al. (1991)
57. Raga (1986)
58. Dailey y Perrin (1973)
59. Gibson y Harris (1979)
60. Raga et al. (1987)
61. Dailey (1989)
62. Walker (1977)
63. Cowan et al. (1986)
64. Ching y Robinson (1959)
65. Alfaro et al. (1994)
66. Pilleri (1973/74)
67. Beverley-Burton (1978)
68. Delyamure y Popov (1975a)
69. Geraci y St. Aubin (1979)
70. Ridgway y Dailey (1972)
71. McColl y Obendorff (1982)
72. Hutton et al. (1987)
73. McKenzie y Blair (1983)
74. Torres et al. (1992)
75. Spotte et al. (1979)
76. van Waerebeek y Oporto (1990)
77. Dailey y Stroud (1978)
78. Aguilar et al. (1992)
79. Lamothe-Argumedo (1988)
80. Hafeezullah (1986)
81. Ozaki (1935)
82. Petter y Pilleri (1982)
83. Conlongue et al. (1985)
84. Delyamure y Kleinenberg (1958a)
85. Yamaguti (1951)
86. Dailey (1971a)
87. Dailey y Walker (1978)
88. Margolis y Arai (1989)
89. Clausen (1985)
90. Kastelein et al. (1990)
91. Mathews (1937)
92. Tantalean y Escalante (1987)
93. Baker y Martin (1992)
94. Borgsteede et al. (1991)
95. McIntosh (1960)
96. Dailey (1971b)
97. Aznar et al. (1994)
98. Rice y Wolman (1971)
99. Treschev (1966)
100. Dailey y Otto (1982)
101. Mead y Potter (1990)
102. Di Cave et al. (1993)

103. Rice (1963)
104. Delyamure et al. (1964)
105. Delyamure et al. (1976a)
106. Breuer et al. (1988)
107. Kovalenko (1976)
108. Shults (1986)
109. Dailey y Hill (1970)
110. Margolis (1954)
111. Joseph et al. (1986)
112. Sweeney y Gilmartin (1974)
113. Schroeder y Wegeforth (1935)
114. Machida y Yamaguchi (1981)
115. Goitsev et al. (1978)
116. Treschev et al. (1967)
117. Adams (1986)
118. Delyamure et al. (1980)
119. Popov et al. (1980)
120. Shults y Frost (1988)
121. Popov (1975)
122. Delyamure y Popov (1978)
123. Yurakhno (1984)
124. Rausch y Locker (1951)
125. Delyamure et al. (1976b)
126. Adams y Rausch (1989)
127. Delyamure y Popov (1975b)
128. Delyamure y Treschev (1966)
129. Beverley-Burton (1971)
130. Kurochkin y Nikol'skii (1972)
131. Skrjabin (1944)
132. Adams (1988)
133. Yurakhno (1969)
134. Cappozzo (com. pers.)
135. George Nascimento y Carvajal (1981)
136. Rausch (1953)
137. Morgan et al. (1978)
138. Delyamure et al. (1982)
139. Baker (1980)
140. Baker (1987)
141. Neiland (1961)
142. Brown et al. (1974)
143. Kurochkin (1975)
144. Kurochkin y Zablotskii (1938)
145. Kurochkin (1962)
146. Delyamure y Skrjabin (1960)
147. Kurochkin (1964)
148. Machida (1969)
149. Migaki et al. (1971)
150. Grafton (1968)
151. Stossich (1892)
152. Poirier (1886)
153. Klumov (1963)
154. Dailey y Brownell (1972)
155. Odhner (1905)
156. Braun (1902)
157. Marchi (1873)
158. Brito y Reyes (1990)
159. Stunkard y Alvey (1930)
160. Berzin (1972)
161. Petrov y Chertkova (1963)
162. Delyamure et al. (1984)
163. Brown et al. (1960)
164. van Beneden (1856)
165. Fleischman y Squire (1970)
166. Baylis (1932)
167. Vegni-Talluri (1982)
168. Neiland et al. (1970)
169. Yurakhno y Popov (1976)
170. Kumar et al. (1975)
171. Harris (1982)
172. Brieva y Oporto (1991)
173. Figueroa (1988)
174. Morimitsu et al. (1987)
175. Bowie (1984)
176. Walker y Cowan (1981)
177. Lewis y Berry (1988)
178. Yurakhno (1972)
179. van Waerebeek et al. (1993)
180. Popov (1972)
181. Preau (1987)
182. Raga et al. (1994a)
183. da Silva et al. (1987)
184. Gunter y Overstreet (1974)
185. Yurakhno y Treschev (1972)
186. Delyamure et al. (1978)
187. Mathews (1938c)
188. Delyamure y Kleinenberg (1958b)
189. Morimitsu et al. (1986)
190. Fernández et al., 1995
191. Hoberg et al. (1993)
192. Raga (com. pers.)
193. Klumov (1959)
194. Santos et al. (1996)
195. Gibson (com. pers.)
196. Schmidt y Dailey (1971)
197. Kagei et al. (1976)
198. Brownell (1981)
199. Brownell (1989)
200. Cappozzo et al. (1994)
201. Raga et al. (1991)
202. Jefferson (1995)
203. Dailey (1975)
204. Best y Abernethy (1994)
205. Reyes y van Waerebeek (1995)
206. Appy (1974)
207. Dailey (1978)
208. Ridgway (1979)
209. Walker et al. (1984)
210. Raga y Robineau (datos no publicados)

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



- Abril, E., Balbuena, J.A. y Raga, J.A. (1991). A new species of the genus *Zalophotrema* (Digenea: Campulidae), *Zalophotrema atlanticum* n. sp., from the liver of striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) (Cetacea: Delphinidae) in Atlantic waters. *Syst. Parasitol.* 18: 133-138.
- Adams, A.M. (1986). Distribution of helminths of ringed seals, *Phoca hispida*, in northern Alaska. *Handbook VI. Int. Cong. Parasitol., Brisbane.* 78(6): p. 78.
- Adams, A.M. (1988). Taxonomy, systematics, and ecology of helminths parasites of the Ringed seal, *Phoca hispida* Schreber, in alaskan waters. *Tesis doctoral University of Washington* 1-203 pp.
- Adams, A.M. y Rausch, R.L. (1989). A revision of the genus *Orthosplanchnus* Odhner, 1905 with considerations of the genera *Odhneriella* Skrjabin, 1915 and *Hadwenius* Price, 1932 (Digenea: Campulidae). *Can. J. Zool.* 67: 1268-1278.
- Adamson, M.L. (1994). Evolutionary factors influencing the nature of parasite specificity. *Parasitology.* 109: S85-S95.
- Aguilar, A., Borrell, A. y Raga, J.A. (1992). Contaminantes organoclorados y parasitismo en marsopas espinosas de la provincia de Buenos Aires. 5ª Reunión de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. 28 Septiembre-2 Octubre, Buenos Aires, Argentina.
- Alfaro, J., Van Waerebeek, K., Van Bresseem y Reyes, J. (1994). Parasitos de *Delphinus capensis* en el Pacífico Suroriental. *Anais da 6ª Reuniao de Trabalho de Especialistas em Mamiferos Aquáticos da America do Sul.* Florianópolis- 24 à 28 de Outubro. p. 80.
- Álvarez, V. y Pefaur, J. (1970). Parasitismo hepático por trematodos en "Rorcual de Rudolphi" (Cetacea) capturados en Chile. *Bol. Chileno Parasitol.* 25(1/2): 2-5.
- Anderson, R.C. (1982). Host-parasite relations and evolution of the Metastrongyloidea (Nematoda). *Mémoires du Museum National d'Histoire Naturelle, Série Zoologie* 123: 129-133.
- Appy, R.G. (1974). The air sinus flukes, genus *Nasitrema* (Trematoda: Nasitrematidae), in porpoises from the eastern Pacific. Tesis de licenciatura ix+96 pp.
- Aquadro, C.F., Kaplan, N. y Risko, K.J. (1984). An analysis of the dynamics of mammalian mitochondrial DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 1: 423-434.
- Árnason, U. y Gullberg, A. (1994). Relationship of baleen whales established by cytochrome b gene sequence comparison. *Nature* 367: 726-728.
- Avise, J.C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 312: 325-342.
- Avise, J.C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution.* Chapman & Hall, Inc., New York, London, 511 pp.
- Aznar, J. (1995). Estudio biológico de la helmintofauna de la franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea) en aguas de Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, 181pp.
- Aznar, F.J., Balbuena, J.A. y Raga, J.A. (1994). Helminth communities of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian waters. *Can. J. Zool.* 72: 702-706.
- Aznar, F.J., Raga, J.A., Corcuera, J.A. y Monzón, F. (1995). Helminths as biological tags franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea, Pontoporiidae) in Argentinian and Uruguayan waters. *Mammalia* 59(3): 427-435.
- Baker, J.R. (1980). The pathology of the grey seal (*Halichoerus frypus*). II. Juveniles and adults. *Br. Vet. J.* 136: 443-447.
- Baker, J.R. (1987). Causes of mortality and morbidity in wild juvenile and adult Grey seals (*Halichoerus grypus*). *Br. Vet. J.* 143.
- Baker, J.R. y Martin, A.R. (1992). Causes of mortality and parasites and incidental lesions in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from British waters. *Vet. Rec.* 130(20): 554-558.
- Balbuena, J.A., Aspholm, P.E., Andersen, K.I. y Bjørge, A. (1994). Lung-worms (Nematoda: Pseudaliidae) of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in Norwegian waters: patterns of colonization. *Parasitology* 108: 343-349.
- Barnes, L. G. (1990). The fossil record and evolutionary relationships of the genus *Tursiops*. En: *The Bottlenose Dolphin*. Eds. S. Leatherwood y R. R. Reeves. Academic Press, Inc. Sandiego California. 3-26 pp.
- Barnes, L.G. (1984). Whales, dolphins and porpoises: origin and evolution of the Cetacea. *Mammals. Notes for a short course organized by P.D. Gingerich and C.E. Badgley. T.W. Broadhead, editor. University of Tennessee Department of Geological Sciences, Studies in Geology, 8:i-iv, 1-234.* 139-154 pp.
- Barnes, L.G. (1985). Evolution, taxonomy and antitropical distributions of the porpoises (Phocoenidae, Mammalia). *Mar. Mammal Sci.* 1(2): 149-165.
- Barnes, L.G., Dommig, D.P. y Clayton, E.R. (1985). Status of studies on fossil marine mammals. *Mar. Mammal Sci.* 1(1): 15-53.
- Barrio, E., Latorre, A. y Moya, A. (1994). Phylogeny of the *Drosophila obscura* species group deduced from mitochondrial DNA sequences. *J. Mol. Evol.* 39: 478-488.
- Baylis, H.A. (1932). A list of worms parasitic in Cetacea. *Discovery Rep.* 6: 393-418.

- Berta, A. y Deméré, T. (1986). *Callorhinus gilmorei* n. sp. (Carnivora: Otariidae) from the San Diego Formation (Blancan) and its implications for otariid phylogeny. *Trans. San Diego Soc. Nat. Hist.* 21: 111-126.
- Berzin, A.A. (1972). Enemies, diseases, parasites. En: *The Sperm Whale*. The Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem 1972. 273-304 pp.
- Best, B. y Abernethy R. B. (1994). Heaviside's Dolphin *Cephalorhynchus heavisidii* (Gray, 1828). En: *Handbook of Marine Mammals Vol.5 The first book of Dolphins*. Eds.: S. H. Ridgway y R. Harrison, F. R. S. Academic Press. London. 289-310 pp.
- Beverley-Burton, M. (1971). Helminths from the Weddell seal, *Leptonychotes weddelli* (Lesson, 1826), in the Antarctic. *Can. J. Zool.* 49(1): 75-83.
- Beverley-Burton, M. (1972). Trematodes from the Weddell Seal, *Leptonychotes weddelli* (Lesson, 1826) with a description of *Orthnosplanchnus weddelli* n.sp. (Trematoda: Campulidae). *Zool. Anz.* 189 1/2.S: 49-60.
- Beverley-Burton, M. (1978). Helminths of the alimentary tract from a stranded herd of the Atlantic white-sided dolphin *Lagenorhynchus acutus*. *J. Fish. Res. Board Can.* 35: 1356-1359.
- Borgsteede, F.H.M., Gaasenbeek, C.P.H. y Van der Linden, J.N. (1991). Investigations on the endoparasites of Harbour porpoises (*Phocoena phocoena* L., 1758) stranded on the Dutch Coast. *Annual meeting of the Netherlands Society of Parasitology*. 1 p.
- Bowie, J.Y. (1984). Parasites from an atlantic bottle-nose dolphin (*Tursiops truncatus*), and revised checklist of parasites of this host. *N. Z. J. Zool.* 11: 395-398.
- Braun, M. (1902). Ueber *Distoma goliath* P. J. v. Ben. 1858. *Cenbalb. f. Bakt. Abt.* 1 32(11): 800-803.
- Breuer, E.M., Hofmeister, R.J., Ernst, R.H. y Hörchner, F. (1988). Pathologic-Anatomic, Histologic and Parasitologic Findings in Harbour seals. Investigations on deaths of Harbour seals in the Wadden Sea in 1988. *Zeitschrift* 75: 139-145.
- Brieva, L.M. y Oporto, J.A. (1991). Prevalencia e intensidad de la infección por tremátodos del género *Nasitrema* en el delfín chileno *Cephalorhynchus eutropia* (Cetacea: Delphinidae). *Arch. Med. Vet.* 23(1): 97-100.
- Brooks, D. R. (1979). Testing the context and extent of host-parasite coevolution. *Syst. Zool.* 28: 299-307.
- Brooks, D.R. (1983). What's going on in evolution? A brief guide to some new ideas in evolutionary theory. *Can. J. Zool.* 61: 2637-2645.
- Brooks, D. R., Bandoni, S. M., Macdonald, C. A. y O'Grady, R. T. (1989). Aspects of the phylogeny of the Trematoda Rudolphi, 1808 (Platyhelminthes: Cercomeria). *Can. J. Zool.* 67: 2609-2624.
- Brooks, D. R., O'Grady, R. T. y Glen, D. R. (1985). Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptative radiation. *Can. J. Zool.* 63: 411-443.
- Brooks, D.R. y McLennan, D.A. (1991). *Phylogeny, Ecology, and Behavior: A Research Program in Comparative Biology*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 434 pp.
- Brooks, D.R. y McLennan, D.A. (1993a). *Parascript. Parasites and the language of evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, 429 pp.
- Brooks, D.R. y McLennan, D.A. (1993b). Historical ecology: examining phylogenetic components of community evolution. En: *Species diversity in ecological communities*. Ed: Ricklefs, R.E., Schluter, D. The University of Chicago Press, Chicago and London. 267-280 pp.
- Brown, D.H., McIntyre, R.W., Delli Quari, C.A. y Schroeder, R.J. (1960). Captive dolphins and seals. *J.A.V.M.A.* 137(9): 534-538.
- Brown, R.J., Smith, A.W., Keyes, C., Trevethan, W.P. y Kupper, J.L. (1974). Lesions associated with fatal hookworm infections in the northern fur seal. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 165(9): 804-805.
- Brown, W.M. (1985). The mitochondrial genome of animals. En: *Molecular Evolutionary Genetics*. Ed.: R.J. McIntyre. Plenum Press, London. 95-139 pp.
- Brown, W.M., Prage, E.M., Wang, A. y Wilson, A.C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.
- Brownell, R. L. (1981). Biology of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in Uruguay waters. *Natl. Geogr. Soc. Res. Rep.* 13: 129-140.
- Brownell, R. L. (1989). Franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Gervais and d'Orbigny, 1844). En: *Handbook of marine mammals*. Vol. 4. River dolphins and larger toothed whales. Ed: S.H. Ridgway y R. Harrison. Academic Press, London. 45-67 pp.
- Caballero, E. (1952). Revisión de los géneros y especies que integran la Familia Acanthocolpidae, Lühe, 1909. (Trematoda: Digenea). *Rev. Med. Vet. Parasitol. (Maracay)*. Tomo XI Nos. 1 y 2. 231 pp.
- Cable, R.M. (1974). Phylogeny and taxonomy of trematodes with reference to marine species. En: *Simbiosis in the Sea*. Ed. W. B. Vernberg. University of South Carolina Press. Columbia, South Carolina 173-193 pp.
- Cannon, L.R.G. (1977). Some aspects of the biology of *Peponocephala electra* (Cetacea: Delphinidae). II. Parasites. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 28: 717-722.

- Cappozzo, H.L., Raga, J.A. y Batallés, L.M. (1994). Estudios de una comunidad de helmintos gastrointestinales de lobos marinos de dos pelos, *Arctocephalus australis*, en aguas de Uruguay. *Anais da 6ª reuniao de trabalho de especialistas em mamíferos acuáticos da América do Sul*. Eds. A. Ximenez y P.C. Simoes-Lopes. Florianópolis-24 à 28 de Outubro de 1994, p. 42.
- Cheng, T. C. (1978). *Parasitología General*. Ed. AC, Madrid España xxii+965 pp.
- Ching, H.L. y Robinson, E.S. (1959). Two campulid trematodes from a new host, the harbor porpoise. *J. Parasitol.* 45: 181.
- Chou, O., Russell, M., Birch, D.E., Raymond y J., Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nuc. Ac. Res.* 20(7): 1717-1723.
- Chubb, J.C. (1970). The parasite fauna of British freshwater fish. *Symposia of the British society for Parasitology*. A.E.R. Taylor y R. Muller, Blackwell Scientific Publications, Oxford. 8:119-144.
- Clausen, B. y Andersen, S. (1985). Health status of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from Danish waters. *ICES. C. M. Marine Mammals Committee* 10: 1-12.
- Clayton, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705.
- Conlongue, G.J., Ogden, J.A., y Foreyt, W.J. (1985). Parasites of the Dall's Porpoise (*Phocoenoides dalli*, True). *J. Wildl. Dis.* 21(2): 160-166.
- Corcuera, J., Monzón, F., Crespo, E.A., Aguilar, A. y Raga, J.A. (1994). Interactions between marine mammals and the coastal fisheries of Necochea and Claromecó (Buenos Aires Province, Argentina). *Rep. int. Whal. Commn. (Special issue 15)*, Cambridge. 283-290 pp.
- Corcuera, J., Monzón, F., Aguilar, A., Borrell, A. y Raga, J.A. (1995). Life history data, organochlorine pollutants and parasites from some Burmeister's porpoises (*Phocoena spinnipinis*) caught in northern Argentine waters. *Rep. int. Whal. Commn. (Special issue 16)*, Cambridge. 365-372 pp.
- Cowan, D.F. (1967). Helminth parasites of the pilot whale *Globicephala melaena* (Traill, 1809). *J. Parasitol.* 53(1): 166-167.
- Cowan, D.F., Walker, W.A. y Bronwell, R.L. (1986). Pathology of small cetaceans stranded along southern California beaches. En: *Research on dolphins*. Ed: Harrison y Bryden. Cambridge University Press. 323-367 pp.
- Cozzuol, M.A. (1992). Origen y evolución de los Iniidae (Cetacea, Odontoceti). *5ta Reunión de especialistas en mamíferos acuáticos de América del Sur*. Buenos Aires - Argentina. 28 de Septiembre al 2 de Octubre de 1992, p 17.
- Da Silva, V.M.F., Thatcher, V.E. y Capistrano, L. (1987). The mass stranding of *Peponocephala electra* on the Brazilian coast and possible relationship to the parasites *Stenurus globicephalae* (Nematoda) and *Nasitrema* sp. (Trematoda). *Seventh Biennial Conference on the Biology Marine Mammals*, ABSTRACTS. Miami, Florida, USA. 1 p.
- Dailey, M.D. (1971a). Distribution of Helminths in the Dall porpoise (*Phocoenoides dalli* True). *J. Parasitol.* 57(6): 1348.
- Dailey, M.D. (1971b). A new species of *Hunterotrema* (Digenea: Campulidae) from the Amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*). *Bull. Soc. Calif. Acad. Sci.* 70(2): 79-80.
- Dailey, M.D. (1975). The distribution and intraspecific variation of helminth parasites in pinnipeds. *Rapp. P-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer*, 169: 338-352.
- Dailey, M.D. (1978). Parasitology-Basic Considerations. En: *Zoo and Wild Animal Medicine*. Toronto. 592-596 pp.
- Dailey, M.D. (1985). Diseases of Mammalia: Cetacea. En: *Diseases of marine animals. Volume IV, part 2. Introduction Reptilia, Aves, Mammalia*. Ed.:O. Kinne, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg 805-844 pp.
- Dailey, M.D. (1989). A survey of marine mammals metazoan parasites of the southern California coast with references to potential research in mexican populations. *VII Simposio Int. Biol. Mar.* 1-5 Junio.
- Dailey, M.D. y Brownell, R.L. (1972). A checklist of marine mammal parasites. En: *Mammals of Sea. Biology and Medicine*. Ed.: S.H. Ridgway, C.C. Thomas Publisher, Springfield, 812 pp.
- Dailey, M.D. y Hill, B.L. (1970). A survey of Metazoan parasites infecting the California (*Zalophus californianus*) and Steller (*Eumatopias jubatus*) sea lion. *Bull. Soc. Calif. Acad. Sci.* 69 (3/4): 126-132.
- Dailey, M.D. y Otto, K.A. (1982). Parasites as biological indicators of the distributions and diets of marine mammals common to the eastern Pacific. NOAA,SFC, Adm. Rep. LJ-82-13C: 1-44.
- Dailey, M.D. y Perrin, W.F. (1973). Helminth parasites of porpoises of the genus *Stenella* in the eastern tropical pacific, with descriptions of two new species: *Mastigonema stenellae* gen. et sp. n. (Nematoda: Spiruroidea) and *Zalophotrema pacificum* sp. n. (Trematoda: Digenea). *Fish. Bull.* 71(2): 455-471.
- Dailey, M.D. y Stroud, R. (1978). Parasites and associated pathology observed in cetaceans stranded along the Oregon coast. *J. Wildl. Dis.* 14: 503-511.
- Dailey, M.D. y Vogelbein, W.K. (1991). Parasite fauna of three species of antarctic whales with reference to their use as a potential stock indicators. *Fish. Bull.* 69: 355-365.
- Dailey, M.D. y Walker, W.A. (1978). Parasitism as a factor (?) in single strandings of southern california cetaceans. *J. Parasitol.* 64(4): 593-596.

- Davey, J. T. (1971). A revision of the genus *Anisakis* Dnjardin, 1845 (Nematoda: Ascaridoidea). *J. Helminthol.* 45(1): 51-72.
- Davies, J.L. (1963). The antitropical factor in cetacean speciation. *Evolution* 17: 107-116.
- Delyamure, S.L. (1949). Towards the study of the Helminth Fauna of the Dolphin, *Tursiops tursio* Fabr. *Fish. Res. Board Can.* 2(134): 110-113.
- Delyamure, S.L. (1955). *Helminthfauna of marine mammals (ecology and phylogeny)*. Moscow: Izd. Akad. Nauk SSSR, 517 pp.
- Delyamure, S.L. (1957). Dependence of the Helminth fauna of dolphins of the Black and Azov Seas on ecologico-geographical factors. *Fish. Res. Board Can. Translation Series.* 131: 1-10.
- Delyamure, S.L. (1961). Sur la nécessité d'explorer à tous les points de vue et au point de vue systématique, les parasites des mammifères marins industriels. *Tr. Soveshch. Ikhtfol. Kom. Akad. Nauk. Sssr.* 21(12): 222-232.
- Delyamure, S.L. (1964). Enemies and parasites. En: *Beluga (Delphinapterus leucas). Investigations of the species.* Edited by: Yablokov, A.V., Bel'kovich, V.M., Kleinenberg, S.E. y Tarasevich, M.N. (1964). Akademiya Nauk S.S.S.R., Moscow (En ruso: Translated by Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem).
- Delyamure, S.L. y Kleinenberg, S.E. (1958a). New data on the helminthfauna of the white whale. *Bull. Biol.* 63(3): 25-32.
- Delyamure, S.L. y Kleinenberg, S.E. (1958b). On the study of the helminth fauna of the beluga from the Southeast of Barents and Karsk Seas. *Rad. Gel'mintol. K. 80. Akad. Skrjabin* : 123-126.
- Delyamure, S.L. y Popov, V.N. (1975a). K izucheniiu vozrastnoi dinamiki gel'mintofauny tikhookeanskogo morzha. Morskije mlekopitaiushchie. Chast' I. Materialy VI vsesoiuznogo Obshchestva, Kiev, Oktiabr 1975, Univ. Simferpol, Kiev, USSR, 104-106 pp.
- Delyamure, S.L. y Popov, V.N. (1975b). A study of the helminth fauna of the bearded seal, inhabiting the Sakhalin Bay. *Nauchn. Dokl. Vyssh. Shk. Biol. Nauki.* 10: 7-10.
- Delyamure, S.L. y Popov, V.N. (1978b). Helminthological data on the local character of *Histiophoca fasciata* herds in the Sea of Okhotsk. *1st. All-Union Meeting of parasitocoenologists* : 30-32.
- Delyamure, S.L. y Serdyukov, A.M. (1966). The finding of the trematode *Synthesium tursionis* (Marchi, 1872) in the bottlenose dolphin from the Black Sea. *Materialy k Nauchnoi Konferentsii Vsesoyuznogo Obschchestra Gel'mintologov* 3: 104-106.
- Delyamure, S.L. y Skrjabin, A.S. (1960). Helminthofaune des otaries des Comandeurs. *Nauchn. Dokl. Vyssh. Shk. Biol. Nauki.* 2: 11-14.
- Delyamure, S.L. y Treschev, V.V. (1966). On the helminth fauna of *Cystophora cristata* Erxleben dwelling in the Greenland Sea. *Zool. Zh.* 45 : 1867-1871.
- Delyamure, S.L., Popov, V. y Mikhalev, E.S. (1982). The helminth fauna of *Pusa sibirica*. En: *Morfologicheskie issledovaniva Baikal'skoi nerpy*, edited by Pastukhov, V.D.
- Delyamure, S.L., Popov, V.N. y Traschenkov, N. (1980). A study of the helminth fauna of seals in the Baltic Sea and Lake Ladoga. *Nauch. Dokl. Vyssh. Shk., Biol. Nauki.* 7(199): 43-45.
- Delyamure, S.L., Skrjabin, A.S. y Alexeiev, E.V. (1964). Sur l'étude de l'helminthofaune des Pinnipèdes d'intérêt industriel des mers de Karsk, Barents, Blanche et Groenland. *Nauchn. Konf. Krim. Pedagog. Inst. Frunze, Simferopol.* 203-205 pp.
- Delyamure, S.L., Yurakhno, M.V. y Popov, V.N. (1976). The helminth fauna of Bering sea pinnipeds from the Karagin gulf, USSR. *Parazitologiya.* 10(4): 325-332.
- Delyamure, S.L., Yurakhno, M.V. y Popov, V.N. (1978a). Nekotorye itogi izucheniia gel'mintofauny tikhookeanskogo morzha, Nauchnye i prikladnye problemy gel'mintologii. K 100-letiiu so dnia rozhdeniia Akademika K.I. Skriabina (1878 -1978). Nauka, Moskva, 38-43 pp.
- Delyamure, S.L., Popov, V.N., Yurakhno, M.V. y Treshchev, V.V. (1976). Helminth fauna of the bearded seal (*Erignathus barbatus*) in various districts of its distribution area. *Kratkie tezisy dokladov II Vsesoyuznogo simpoziuma po parazitam bolezniam morskikh zivotnykh* pag. 24-25.
- Delyamure, S.L., Yurakhno, M.V., Popov, V.N., Shults, L.M., y Fay, F.H. (1984). Helminthological comparison of subpopulations of Bering Sea spotted seals, *Phoca largha* Pallas. En: *Soviet-American cooperative research on marine mammals*. Ed: Fay, F.H. y Fedoseev, G.A. NOAA, NMFS: 61-65 pp.
- De Queiroz, A., Winberger, P.H. (1993). The usefulness of behaviour for phylogeny estimation levels of homoplasy in behavioral and morphological characters. *Evolution.* 47(1): 46-60.
- De Renzi, M. (1982). La forma orgánica: Un pretext per establir contacte amb alguns problemes de fons de la Biologia. *Estudios dedicados a Juan Peset Aleixandre*, T.3, Universidad de Valencia. 351-388 pp.
- De Renzi, M. (1986). Relaciones entre la sistemática y ciencia de la forma. *Paleontologia i Evolució*, 20: 135-149.
- DeSalle, R. (1992). The phylogenetic relationships of flies in the family Drosophilidae deduced from mtDNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 1: 31-40.
- DeSalle, R., Freedman, T., Prager, E.M. y Wilson, A.C. (1987). Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 26: 157-164.

- Di Cave, D., Carlini, R., Cerioni, S., Mariniello, L., Orecchia, P. y Paggi, L. (1993). Parasitic metazoa of a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba* Meyen, 1833) (Cetacea: Delphinidae), stranded along central Italian Coast. *Proceedings of the seventh annual conference of the European Cetacean Society*. 18-21 February, Inverness, Scotland. p. 188.
- Esch, G.W. y Fernández, J.C. (1993). *A functional biology of parasitism. Ecological and evolutionary implications*. Chapman and Hall, London. 337 pp.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.* 22: 521-565.
- Felsenstein, J. (1990). *PHYLIP Manual*. Version 3.3. University Herbarium of the University of California, Berkeley.
- Fernández, M., Balbuena J.A., Pertusa J.F. y Raga J.A. (1995). Biometric variability of *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) (Digenea, Campulidae) from the intestine of the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu 1821). *Syst. Parasitol.* 30:67-76.
- Fernández, M., Balbuena, J.A. y Raga, J.A. (1994). *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) n. comb. (Digenea, Campulidae) from the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) in the western Mediterranean. *Syst. Parasitol.* 28: 223-228.
- Ferrero, R.C. (1994). Recent strandings of rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) on the Oregon and Washington coasts. *Mar. Mammal Sci.* 10(1): 114-116.
- Figueroa, L. (1988). *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) Price, 1932 (Digenea: Campulidae) en *Cephalorhynchus eutropia* Gray, 1846 (Cetacea: Odontoceti) en la costa chilena. *Parasitol. al Día*, 12: 185-186.
- Fleischman, R.W. y Squire, R.A. (1970). Verminous Pneumonia in the California Sea Lion (*Zalophus californianus*). *Path. Vet.* 7: 89-101.
- Flower, W.H. (1883). On whales, present and past and their probable origin. *Proc. Zool. Soc. London 1883*. 406-513 pp.
- Forrester, D., Odell, D.K., Thompson, N.P. y White, J.R. (1980). Morphometrics, parasites and chlorinated hydrocarbon residues of pygmy killer whales from Florida. *J. Mammal.* 61(2): 356-360.
- Forrester, D.J. y Robertson, W.D. (1975). Helminths of Rough-Toothed Dolphins, *Steno bredanensis* Lesson, 1828, from Florida waters. *J. Parasitol.* 61(5): 922.
- Freeland, W.J. (1983). Parasites and the coexistence of animal host species. *Am. Nat.* 121(2): 223-236.
- Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruthers, M.H., Nielson, T. y Turner, D.H. (1986). Improved free-energy parameters from prediction of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 9373-9377.
- Garey, J.R. y Wolstenholme, D.R. (1989). Platyhelminths mitochondrial DNA: evidence for early evolutionary origin of a tRNA<sup>Ser</sup>AGN that contains a dihydrouridine arm replacement loop, and of serine-specifying AGA and AGG codons. *J. Mol. Evol.* 28: 374-387.
- Gaskin, D.E. (1982). The zoogeography of cetacea. En: *The ecology of whales and dolphins*. Heinemann London and Exeter, New Hampshire. 208-247 pp.
- George-Nascimento, M. y Carvajal, J. (1981). Helmintos parasitos del Lobo Marino Común *Otaria flavescens* en el golfo de Arauco, Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 36: 72-73.
- Geraci, J.R. y St. Aubin, D.J. (1979). The role of parasites in marine mammal strandings along the New England coast. En: *Biology of Marine Mammals: Insights through Strandings*. Final Report to U.S. Marine Mammal Commission in Fulfillment of Contract MM7AC020.
- Gibson, D.I. (1979). Materials and methods in Helminth Alpha-Taxonomy. Zoology, British Museum (Natural History). *Parasitology* 79(3), XXXVI.
- Gibson, D.I. (1981). Evolution of digeneans. En: *Workshop on evolution of helminths. IV. European multicolloquium of parasitology*. *Parasitology*. 82: 161-163.
- Gibson, D.I. y Harris, E.A. (1979). The helminth-parasites of Cetaceans in the collection of the British Museum (Natural History). *Invest. Cetacea* 10: 309-324.
- Gingerich, P.D., Raza, S.M., Arif, M., Anwar, M. y Zhou, X. (1994). New whale from the Eocene of Pakistan and the origin of cetacean swimming. *Nature* 368: 844-847.
- Goltsev, V.N., Yurakhno, M.V. y Popov, V. (1978). About the locality of the Karaga and Anadyr populations of *Phoca vitulina largha*. *Rev. Zool.* 57(2): 280-287.
- Gould, S.J. (1994). Hooking Leviathan by its past. Two tales of tails confirm the theory, of the whale's return to the sea. *Nat. Hist.* 5: 8-15.
- Grafton, T.S. (1968). Necropsy of a Scared Dolphin of the Amazon (*Sotalia fluviatilis*). *Proceedings of the second Symposium on Diseases and Husbandry of Aquatic Mammals*. Marine research Laboratory, February 21-22, 19-25 pp.
- Graur, D. y Higgings, D.G. (1994). Molecular evidence for the inclusion of cetaceans within the order Artiodactyla. *Mol. Biol. Evol.* 11(3): 357-364.

- Greenwood, A.G., Taylor, D.C. y Gauckler, A. (1979). Odontocete parasites: Some new host records. *Aquat. Mamm.* 7(1): 23-25.
- Gunter, G. y Overstreet, R. (1974). Cetacean notes. I. Sei and Rorqual whales on the Mississippi coast, a correction. II A Dwarf Sperm whale in Mississippi sound and its helminth parasites. *Gulf Res. Rep.* 4(3): 479-481.
- Hafeezullah, M. (1986). On a Trematode (Digenea: Campulidae) of a marine mammal from Arabian Sea. *Rec. Zool. Surv. India* 83(1&2): 41-48.
- Hafner, M.S. y Nadler, S. A. (1990). Cospeciation in host-parasite assemblages: comparative analysis of rates of evolution and timing of coespeciation events. *Syst. Zool.* 39(3): 192-204.
- Harris, E.A. (1982). The helminth parasites of the cetacea (or "Parasitology with a porpoise"). *Parasitology* 85(2): 71.
- Hasegawa, M. y Yano, T. (1984). Maximum likelihood method of phylogenetic inference from DNA sequence data. *Bull. Biometric Soc. Japan* 5: 1-7.
- Heckmann, R.A., Jensen, L.A., Warnock, R.G. y Coleman, B. (1987). Parasites of the bowhead whale, *Balaena mysticetus*. *Great Basin Nat.* 47(3): 355-372.
- Hedges, S.B. (1992). The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol. Biol. Evol.* 9: 366-369.
- Helle, E. y Valtonen, E.T. (1980). On the occurrence of *Corynosoma* spp. (Acantocephala) in ringed seals (*Pusa hispida*) in the Bothnian Bay, Finland. *Can. J. Zool.*, 58: 298-303.
- Higgins, D.G. y Sharp, P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237-244.
- Hillis, D.M. y Bull, J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42(2): 182-192.
- Hillis, D.M. y Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Hillis, D.M. y Huelsenbeck, J.P. (1992). Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *J. Hered.* 83: 189-195.
- Hillis, D.M., Allard, M.W. y Miyamoto, M.M. (1993). Analysis of DNA sequence data: phylogenetic inference. En: *Methods in Enzymology*, 224, Academic Press, Inc. 456-487 pp.
- Hoberg, E. P. (1987). Recognition of larvae of the Tetrabothriidae (Eucestoda): implications for the origin of tapeworms in marine homeotherms. *Can. J. Zool.* 65: 997-1000.
- Hoberg, E.P. (1992). Congruent and synchronic patterns in biogeography and speciation among seabirds, pinnipeds and cestodes. *J. Parasitol.* 78(4): 601-615.
- Hoberg, E.P. (1995). Historical biogeography and modes of speciation across high-latitude seas of the Holarctic: concepts for host-parasite coevolution among the Phocini (Phocidae) and Tetrabothriidae (Eucestoda). *Can. J. Zool.* 73: 45-57.
- Hoberg, E.P. y Adams, A.M. (1992). Phylogeny, historical biogeography, and ecology of *Anophryocephalus* spp. (Eucestoda: Tetrabothriidae) among pinnipeds of the Holarctic during the late Tertiary and Pleistocene. *Can. J. Zool.* 70: 703-719.
- Hoberg, E.P. y Lichtenfels, J.R. (1994). Phylogenetic systematic analysis of the Trichostrongylidae (Nematoda), with an initial assessment of coevolution and biogeography. *J. Parasitol.* 80(6): 976-996.
- Hoberg, E.P., Daoust, P. y McBurney, S. (1993). *Bolbosoma capitatum* and *Bolbosoma* sp. (Acanthocephala) from Sperm Whales (*Physeter macrocephalus*) stranded on Prince Edward Island, Canada. *J. Helminthol. Soc. Wash.* 60(2): 205-210.
- Holmes, J.C. (1979). Parasite population and host community structure. En: *Host-parasite interfaces*, Ed. B.B. Nickol. Academic Press, New York, San Francisco, London, 27-45 pp.
- Holmes, J.C. y Price, P.W. (1980). Parasite communities: The roles of phylogeny and ecology. *Syst. Zool.* 29(2): 203-213.
- Holmquist, R., Miyamoto, M.M. y Goodman, M. (1988). Higher-primate phylogeny: Why can't we decide?. *Mol. Biol. Evol.* 5: 201-216.
- Hörning, B. y Pilleri, G. (1969). *Campula dephini* (Trematoda, Campulidae) bei *Delphinus delphis* und *Stenella styx* dem westlichen Mittelmeer. *Invest. Cetacea* 1: 193-196.
- Hutton, J., Blair, D., Slooten, E. y Dawson, S.M. (1987). Case studies of fluke-induced lesions in mesenteric lymph nodes of Hector's dolphins *Cephalorhynchus hectori*. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 83-86.
- Jefferson, T.A. (1995). Notes on the biology of the clymene dolphin (*Stenella clymene*) in the northern gulf of Mexico. *Mar. Mammal Sci.* 11(4): 564-573.
- Johnston, D.G. y Ridgway, S.H. (1969). Parasitism in some marine mammals. *J.A.V.M.A.* 155(7): 1064-1072.
- Joseph, B.E., Cornell, L.H. y Migaki, G. (1986). Metastatic squamous cell carcinoma in a beached California sea lion (*Zalophus californianus*). *J. Wildl. Dis.* 22(2): 281-283.
- Kagei, N., Tobayama, T. and Nagasaki, Y. (1976). On the helminth of franciscana *Pontoporia blainvillei*. *Sci. Rep. Whales Res.Inst.* 28: 161-166.

- Kastelein, R.A., Bakker, M.J. y Dokter, T. (1990). The medical treatment of 3 stranded Harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). *Aquat. Mamm.* 15(4): 181-202.
- King, J.E. (1983). *Seals of the world*. Oxford University Press. Oxford, UK. 207 pp.
- Klima, M. (1995). Cetacean phylogeny and systematics based on the morphogenesis of the nasal skull. *Aquat. Mamm.* 21.2: 79-89.
- Klumov, S.K. (1959). Basic results of the work of the expedition of the institute of oceanography of the Academy of Sciences of the USSR and TINRO on the study of the cetaceans in far east in 1951-1956. *Manuscript of the Institute of Oceanography of the Academy of Sciences of USSR*.
- Klumov, S.K. (1963). Food and helminth fauna of whalebone whales (Mystacoceti) in the main whaling regions of the world ocean. *Ac.Sc.,USSR,TRUDY, Institute of Oceanology, Moscow* 71: 94-194.
- Kovalenko, L.M. (1976). Helminth fauna of seals on the Kuril Islands. *Kratkie tezisy dokladov II Vsesoyuznogo simpoziuma po parazitam i boleznyam morskikh zhivotnykh.* 32-33 pp.
- Krotov, A.I. y Delyamure, S.L. (1952). K faune paraziticheskikh chervei mlekopiyayushchikh i ptits SSSR. *Tr. Gel'mintol. Lab. Akad. Nauk. SSSR.* 6: 278-292.
- Kumar, S., Tamura, K. y Nei, K. (1993). *MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, Version 1.01. Institute of Molecular Evolutionary Genetics. The Pennsylvania State University. University Park, PA16802, USA. 130 pp.
- Kumar, V., Vercruyse, J., Kageruka, P. y Mortelmans, J. (1975). *Nasitrema attenuata* (Trematoda) infection of *Tursiops truncatus* and its potentialities as an aetiological agent of chronic pulmonary lesions. *J. Helminthol.* 49: 289-292.
- Kurochkin, Y.V. (1962). Helminth fauna of the Caspian seal from its autumn haul-ground. *Tr. Astrakh. Zapoved.* 6: 119-126.
- Kurochkin, Y.V. (1964). Scientific results of the 315th all union helminthological expedition. *Parasitological Works. Transactions of the Astrakhan State Wildlife Preserve* 9: 8-27.
- Kurochkin, Y.V. (1975). Parasites of the caspian seal *Pusa caspica*. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer.* 169: 363-365.
- Kurochkin, Y.V. y Nikol'skii, O.R. (1972). K fauna trematod antarkticheskikh tyulenei. *Izv. Tikhookean. Nauhno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanogr.* 81: 266-269.
- Kurochkin, Y.V. y Zablotskii, V.I. (1938). On the helminth fauna of Caspian seals. *Trudii Astrakhanskogo Zapovednika* 6: 337-343.
- Kwiatowski, J., Skarecky, D., Hernández, S., Pham, D., Quijas, F. y Ayala, F.J. (1991). High fidelity of the polymerase chain reaction. *Mol. Biol. Evol.* 8: 884-887.
- Lambertsen, R.H. (1986). Disease of the common fin whale (*Balaenoptera physalus*): Crassicaudiosis of the urinary system. *J. Mamm.* 67(2): 353-366.
- Lamothé-Argumedo, R. (1988). Tremátodos de mamíferos III. Hallazgo de *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) Stunkard y Alvey, 1930, en *Phocoena sinus* (Phocoenidae) en el golfo de California, Mexico. *Anales Inst. Biol. U.N.A.M.* 58 (Ser. Zool. (1)): 1-20.
- Larson, A. y Kirk, D.L. (1992). Molecular phylogeny of the volvocine flagellates. *Mol. Biol. Evol.* 9: 85-105.
- Lauckner, G. (1985a). Diseases of Mammalia: Pinnipedia. En: *Diseases of Marine Animals. Vol. IV Part 2*. Ed: O. Kinne, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 683-793 pp.
- Lauckner, G. (1985b). Diseases of Mammalia: Carnivora. En: *Diseases of Marine Animals. Vol. IV Part 2*. Ed: O. Kinne, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 645-682 pp.
- Lavocat, R. (1961). Condylarthra. En: *Traité de Paléontologie. Mammifères évolution*. Vol. 6(1) Ed. J. Piveteau. Masson et Cie. 1-30 pp.
- Lewis, R.J. y Berry, K. (1988). Brain lesions in a Pacific White-sided Dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *J. Wildl. Dis.* 24(3): 577-581.
- Li, W. y Graur, D. (1991) *Fundamentals of molecular evolution*. Ed.: Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass., 01375 USA. xviii+286 pp.
- Liu, H. y Beckembach, A.T. (1992). Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol. Phyl. Evol.* 1: 41-52.
- Lluch, J., Roca, V. y Navarro, P. (1987). *Campulla paliata* (Loos, 1885) Loos, 1901 (Digenea: Campulidae) parásito del delfín listado (*Stenella coeruleoalba* Mayen, 1833) (Mammalia: Delphinidae). *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat.(Biol.)*. 83(1-4): 135-139.
- López-Bueno, A. y González-Candelas, F. (1992). *DISTANCE: a program for computing genetic distances from DNA sequences*. CABIOS.
- Lumb, S.M., Bray, R.A. y Rollinson, D. (1993). Partial small subunit (18S) rRNA gene sequences from fish parasites of the families Lepocreadiidae and Fellodistomidae (Digenea) and their use in phylogenetic analyses. *Syst. Parasitol.* 26: 141-149.
- Lyster, L.L. (1940). Parasites of some Canadian sea mammals. *Can. J. Res.* 18 (Sec.D (12)): 395-409.

- Machida, M. (1969). Parasites of the Northern Fur Seal and their Relationship to the Breeding Islands. *Proc. Jap. Soc. Sys. Zool.* 5: 16-17.
- Machida, M., Seki, N. y Yamaguchi, K. (1981). Trematodes of Steller sea lion caught off Hokkaido, Northern Japan. *Bull. Natn. Scid. Mus., Ser. A.* 7(4): 147-154.
- Maddison, W.P., Donoghue, M.J. y Maddison, D.R. (1984). Outgroup analysis and parsimony. *Syst. Zool.* 33: 33-103.
- Manfredi, M.T., Dini, W., Ganduglia, S., Podesta, M. y Repetto, G. (1992). Parasitological findings in striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*. *European research on cetaceans* 6: 218-219.
- Marchi, P. (1873). Sopra una specie nuova di *Distomum* trovata nelle intestina del *Delphinus tursio*. *Atti. Soc. Ital. Sci. Nat. Milan* 15(4): 304.
- Margolis, L. (1954). List of the parasites recorded from sea mammals caught off the west coast of North America. *J. Fish. Res. Board Can.* 11(3): 267-283.
- Margolis, L. y Arai, H.P. (1989). Parasites of Marine Mammals. En: *Synopsis of the parasites of Vertebrates of Canada*. Ed.: Kennedy, M.J. Alberta. Agriculture, Animal Health Division: 1-26 pp.
- Margolis, L. y Pike, J.C. (1955). Some helminth parasites of Canadian pacific whales. *J. Fish. Res. Board Can.* 12(1): 97-120.
- Margolis, L., Esch, G. W., Holmes, J. C., Kuris, A. M. y Schad, G. A. (1982). The use of ecological terms in parasitology (Report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitology). *J. Parasitol.* 68(1): 131-133.
- Martin, A. R. (1990). *Whales and dolphins*. Salamander books Ltd., U.K. 192 pp.
- Martineau, D., Lagacé, A., Béland, P., Higgins, R., Armstrong, D. y Shugart, L.R. (1988). Pathology of stranded beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Québec, Canada. *J. Comp. Path.* 98: 287-311.
- Mathews, L.H. (1937). The humpback whale, *Megaptera nodosa*. *Discovery Rep.* 17(pl. 2): 7-92.
- Mathews, L.H. (1938a). The sperm whale, *Physeter catodon*. *Discovery Rep.* 17 (Plates 3-9): 93-168.
- Mathews, L.H. (1938b). The sei whale, *Balaenoptera borealis*. *Discovery Rep.* 17: 183-290.
- Mathews, L.H. (1938c). Notes on the southern right whale, *Eubalaena australis*. *Discovery Rep.* 17 (pl. 12-17): 169-182.
- McColl, K.A. y Obendorff, D.L. (1982). Helminth parasites and associated pathology in stranded Fraser's dolphins, *Lagenodelphis hosei* (Fraser, 1956). *Aquat. Mamm.* 9(2): 30-34.
- McIntosh, A. (1960). A new Campulid Trematode, *Hunterotrema caballeroi*, n. g., n. sp. from an Amazon Dolphin, *Inia geoffrensis*. En: *Libro Homenaje al Dr. Eduardo Caballero y Caballero, Jubileo 1930-1960*. México: Instituto Politécnico Nacional, 207-272 pp.
- McKenzie, J. y Blair, D. (1983). Parasites from Hector's dolphin (*Cephalorhynchus heston*). *N. Z. J. Zool.* 10. 1 p.
- Mead, J.G. y Potter, C.W. (1990). Natural history of bottlenosed dolphins along the central Atlantic coast of the United States. En: *The Bottlenosed Dolphin*. Ed.: Leatherwood, S. y Reeves, R.R. San Diego: Acad. Press. Inc. 165-195 pp.
- Measures, L.N. (1993). Annotated List of Metazoan Parasites Reported from the Blue Whale, *Balaenoptera musculus*. *J. Helminthol. Soc. Wash.* 60(1): 62-66.
- Measures, L.N., Beland, P., Martineau, D. y De Guise, S. (1995). Helminth of an endangered population of belugas, *Delphinapterus leucas*, in the St. Lawrence stuary, Canada. *Can. J. Zool.* 73: 1402-1409.
- Mierendorf, R. C. y Pfeffer, D. (1987). Direct sequencing of denatured plasmid DNA. En: *Guide to molecular cloning techniques. Methods in Enzymology* vol. 152. Eds. S. L. Berger y A. R. Kimmel. Academic Press, San Diego. 556-562 pp..
- Migaki, G., Van Dyke, D. y Hubbard, R.C. (1971). Some histopathological lesions caused by helminths in marine mammals. *J. Wildl. Dis.* 7: 281-289.
- Milinkovitch, M.C. (1992). DNA-DNA hybridizations support ungulate ancestry of Cetacea. *J. Evol. Biol.* 5: 149-160.
- Milinkovitch, M.C., Meyer, A. y Powell, J.R. (1994). Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Mol. Biol. Evol.* 11(6): 939-948.
- Milinkovitch, M.C., Ortí, G. y Meyer, A. (1995). Novel phylogeny of whales revisited but not revised. *Mol. Biol. Evol.* 2(3): 518-520.
- Miyamoto, M.M., Allard, M.W., Adkins, R.M., Janecek, L.L. y Honeycutt, R.L. (1994). A congruence test of reliability using linked mitochondrial DNA sequences. *Syst. Biol.* 43(2): 236-249.
- Morales, J. (1990). Condilartros. En: *Paleontología*. Ed.: B. Meléndez. Paraninfo. 3(1) Mamíferos (1ª Parte): 355-373 pp.
- Morgan, I.R., Cople, I.W., Westbury, H.A. y Campbell, J. (1978). Diseases Investigations of Penguins and Elephant seals on Macquarie Island. *Research Project Series* 47: 1-55.
- Morimitsu, T., Nagai, T., Ide, M., Kawano, H., Naichuu, A., Koono, M. e Ishii, A. (1987). Mass stranding of odontoceti caused by parasitogenic eighth cranial neuropathy. *J. Wildl. Dis.* 23(4): 586-590.

- Morimiitsu, T., Tomoyuki, N., Minoru, I., Akira, I. y Masashi, K. (1986). Parasitogenic octavus neuropathy as a cause of mass stranding of Odontoceti. *J. Parasitol.* 72(3): 469-472.
- Moritz, C., Dowling, T.E. y Brown, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.
- Muizom, C. de (1982). Phocid phylogeny and dispersal. *Ann. S. Afr. Mus.* 89: 175-213.
- Muizom, C. de (1984). Les vertébrés fossiles de la Formation Pisco (Pérou). Deuxième partie: les Odontocètes (Cetacea, Mammalia) du Pliocène inférieur de Sud Sacaco. *Trav. Inst. Fr. Etud. Andines*, 27. En: *Rech. sur. Civ.*, 50, ADPF Paris. 1-118 pp.
- Muizom, C. de (1987). The affinities of *Notocetus vanbenedeni*, an Early Miocene Platanistoid (Cetacea, Mammalia) from Patagonia, Southern Argentina. *Am. Mus. Novitates*. 2904: 1-27.
- Muizom, C. de (1988). Les relations phylogénétiques des Delphinida (Cetacea, Mammalia). *Annales de Paléontologie (Vert.-Invert.)*, 74(4): 159-227.
- Muizom, C. de 1990(1991). A new Ziphiidae (Cetacea) from the Early Miocene of Washington State (USA) and phylogenetic analysis of the major groups of odontocetes. *Bull. Mus. natn. Hist. nat.*, section C, 3-4: 279-326.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Nahhais, F.M. y Cable, R.M. (1964). Digenetic aspidogastriid trematodes from marine fishes of Curaçao and Jamaica. *Tulane Stud. Zool.* 11: 169-228.
- Nei, M. y Gojobori, T. (1986). Simple method for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3(5): 418-426.
- Neilamd, K.A. (1961). Suspected role of parasites in non-rookery mortality of fur seals (*Callorhinus ursinus*). *J. Parasitol.* 4(5): 732.
- Neilamd, K.A., Rice, D.W. y Holden, B.L. (1970). Helminths of marine mammals. I. The genus *Nasitrema*, air sinus flukes of delphinid cetacea. *J. Parasitol.* 56(2): 305-316.
- O'Shea, T.J., Homer, B.L., Greiner, E.C. y Layton, A.W. (1991). *Nasitrema* sp.-associated Encephalitis in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in the Gulf of Mexico. *J. Wildl. Dis.* 27(4): 706-709.
- Odhner, T. (1905). Die trematoden des arktischen gebietes. En: *Fauna arctica*. Ed.: Römer y Schaudinn. 291-348 pp.
- Odhner, T. (1926). *Protofasciola* n. g., ein Prototypus der grossen Leberegels. *Arkiv for zoologi. Band* 18A. n°20 1-7.
- Ohamia, T., Osawa, S., Watanabe, K. y Jukes, T.H. (1990). Evolution of the mitochondrial genetic code IV. AAA as an Asparagine codon in some animal mitochondria. *J. Mol. Evol.* 30: 329-332.
- Ozaki, Y. (1935). Trematode parasites of indian porpoise *Neophocaena phocaenoides* Gray. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B. Div. 1, 3*: 115-138.
- Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1939-1943.
- Patterson, C., Williams, D.M. y Humphries, C.J. (1993). Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annu. Rev. Ecol. Sys.* 24: 153-188.
- Perrin, W.F., Mitchell, E.D., y Van Breer, P.J.H. (1978). Historical zoogeography of tropical pelagic dolphins. *Abstract II. Congressus Theriologicus Internationalis. 20-27 June.* p. 79.
- Petrov, A.M. y Chertkova, A.H. (1963). A new trematode, *Zalophotrema lubimowi* n.sp., of the liver of sea lions. *Trudy. Vses. Inst. Gel'mint.* 10: 26-29.
- Petter, A.J. y Pilleri, G. (1982). *Pharurus asiaorientalis* new species, Metastrongylid Nematode, parasite of *Neophocaena asiaorientalis* (Phocoenidae, Cetacea). *Invest. Cetacea* 13: 141-148.
- Pillieri, G. (1973/74). First record of *Anisakis typica* (Nematoda: Ascaridata) in *Delphinus tropicalis* and *Neophocaena phocaenoides* of the coast of Pakistan. *Invest. Cetacea.* 5: 339-340.
- Platt, T. R. (1992). A phylogenetic and biogeographic analysis of the genera of Spirorchinae (Digenea: Spirorchidae) parasitic in freshwater turtles. *J. Parasitol.* 784: 616-629.
- Poirier, M.J. (1886). Trematodes nouveaux ou peu connus. *Bull. Soc. Philom.* 7(10): 20-40.
- Popov, V.N. (1972). First information on the helminth fauna of the Shantar population of Okhotsk ringed seals. En: *Thesis of Works 5th. All-Union Conf., Studies of Marine Mammals, part 2.* Makhachkala 172-176 pp.
- Popov, V.N. (1975). New data on the helminth fauna of *Histiophoca faciaata* Zimm. from the southern part of Okhotsk sea. *Parazitologiya* 9: 31-36.
- Popov, V.N., Yurakhno, M.V. y Skrjabin, V.A. (1980). Helminth fauna of the Okhotsk ringed seal from the Terpeniya Bay Russian-Sfsr, Ussr, and Soya Strait between Japan and Sakhalin Island Russian-sfsr, USSR. *Parazitologiya* 10(4): 325-332.
- Preaw, C.G. (1987). *Contribution a l'étude de la pathologie cardiopulmonaire du dauphin.* Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort: These pour le Doctorat Vétérinaire.
- Price, E.W. (1932). The trematode parasites of marine mammals. *Proc. U. S. Nat. Mus.* 81: 1-68.

- Quicke, D.L.J. (1993). *Principles and techniques of contemporary taxonomy*. Ed.: Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, U.K. xii+311.
- Raga, J.A. (1985). *Contribución al Estudio del parasitismo y demás asociaciones en los cetáceos en la Península Ibérica*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Biológicas. 478 pp.
- Raga, J.A. (1986). *Oschmarinella mascomai* n. sp. (Trematoda: Campulidae) parasite des canaux biliaires de *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) (Cetacea: Delphinidae) en Méditerranée. *Ann. Parasitol. Hum. Coop.* 61(6): 633-636.
- Raga, J.A. (1992). Parasitismus bei den Pinnipedia. En: *Handbuch der Säugetiere Europas, Meeressäuger Teil: Robben*. Eds. R. Duguy y D. Robineau. AULA-Verlag Wiesbaden 41-75 pp.
- Raga, J. A. (1994). Parasitismus bei den Cetacea. En: *Handbuch der Säugetiere Europas, Meeressäuger Teil A: Wale und Delphine 1*. Eds. D. Rohbineau, R. Duguy y M. Klima. AULA-Verlag Wiesbaden 132-179 pp.
- Raga, J.A. y Balbuena, J.A. (1988). *Leucasiella delamurei* sp. n. (Trematoda: Campulidae), a parasite of *Globicephala melaena* (Traill, 1809) (Cetacea: Delphinidae) in the western Mediterranean sea. *Helminthologia* 25: 95-102.
- Raga, J.A. y Balbuena, J.A. (1993). Parasites of the Long-Finned Pilot Whale, *Globicephala melas* (Traill, 1809) in European waters. *Rep. Int. Whal. Commn.* 14: 391-406.
- Raga, J.A. y Carbonell, E. (1985). New dates about parasites on *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) (Cetacea: Delphinidae) in the western Mediterranean sea. En: *Invest. Cetacea*. Edited by Pilleri, G., vol. 17, 207-23 pp.
- Raga, J.A., Carbonell, E. y Raduan, A. (1982). Incidencias de parásitos en los cetáceos varados en las costas españolas del Mediterráneo. *Mem. Mus. Mar. Ser. Zool.* 2(19): 1-12.
- Raga, J.A., Petter, A.J. y Duguy, R. (1987). Catalogue des parasites des Cétacés des collections du Musée Océanographique de La Rochelle. *Bull. Mus. Nat., Paris* 9: 159-168.
- Raga, J.A., Abril, E., Goodall, R.N.P. y Balbuena, J.A. (1994a). *Nasitrema* sp. (Digenea: Nasitremitidae) from the Long-Finned Pilot Whale (*Globicephala melas*) off Tierra del Fuego; A New Host Record. *Rep. Int. Whal. Commn.* 44: 371-374.
- Raga, J.A., Aznar, J., Balbuena, J.A. y Dailey, M.D. (1994b). *Hadwenius pontoporiae* sp. n. (Digenea: Campulidae) from the Intestine of Franciscana (Cetacea: Pontoporidae) in Argentinian Waters. *J. Helminthol. Soc. Wash.* 61(1): 45-49.
- Raga, J.A., Aznar, J., Balbuena J.A. y Fernández M. (1991). Parasites and epizoots in striped dolphins affected by an epizootic in western Mediterranean. *Proceedings of the Mediterranean striped dolphin mortality International Workshop*. Palma de Mallorca, 4-5 November: 39-46.
- Raga, J.A., Carbonell, E., Raduan, A. y Blanco, C. (1985). *Synthesium tursionis* (Marchi, 183) (Trematoda: Campulidae) parásito de *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) (Cetacea: Delphinidae) en el Mediterráneo español. *Rev. Iber. Parasitol.* 45(2): 119-122.
- Rausch, R.L. (1953). Studies on the helminth fauna of Alaska. XIII. Diseases in the sea otter, with special reference to helminth parasites. *Ecology* 34(3): 584-604.
- Rausch, R.L. y Locker, B. (1951). Studies on the helminth fauna of Alaska II. On some helminths parasitic in the sea otter, *Enhydra lutris* (L.). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 18(1): 77-81.
- Rees, G. (1953). A record of some parasitic worms from whales in the Ross Sea area. *Parasitology* 43(1/2): 27-3.
- Repetto, G. (1991). *Indagine parassitologica in Stenella coeruleoalba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Milano, 88 pp.
- Reyes, J.C. y Brito, J.L. (1990). Primer registro del género *Nasitrema* (Trematoda, Digenea) en el delfín liso austral *Lissodelphis peronii* (Lacepede, 1804). *4ª reunión de trabajo de especialistas en mamíferos acuáticos de América del Sur*, Valdivia, Chile, 11-12.
- Reyes, J.C. y Van Waerebeek, K. (1995). Aspects of the biology of Burmeister's porpoise from Peru. En: *Biology of the Phocoenids*. Eds. A. Bjørge y G.P. Donovan. *Rep. int. Whal. Commn.* (Special issue 1), Cambridge, 349-364 pp.
- Reyes, L.M., Crespo, E.A. y Raga, J.A. (1992). Estudio preliminar de los endoparásitos gastrointestinales e mamíferos marinos de Patagonia en relación a su modo de vida. *5ª Reunión de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. 28 Septiembre-2 Octubre*, Buenos Aires, Argentina. p. 55.
- Rice, D.W. (1963). Progress report on Biological studies of the larger Cetacea in the waters of California. *Norsk. Hvalfangst-Tid.* 52(7): 181-187.
- Rice, D.W. (1977). Synopsis of biological data on the sei whale and Bryde's whale in the Eastern North Pacific. *Re. Int. Whal. Commn.* 1: 92-97.
- Rice, D.W. y Wolman, A.A. (1971). The life history and ecology of the gray whale (*Eschrichtius robustus*). *Am. Sc. Mammal. Spec. Publ.* 3: 1-142.
- Ridgway, S.H. y Dailey, M.D. (1972). Cerebral and cerebellar involvement of trematode parasites in dolphins and their possible role in stranding. *J. Wildl. Dis.* 8: 33-43.

- Ridgway, S.H. y Harrison, R.J. (1981). Handbook of Marine Mammals, Vol. 2: Seals. Eds.: Ridgway, S.H. y Harrison, R.J. Academic Press, 359pp.
- Rogers, B.B., Alpert, L.C., Hine, E.A.S. y Buffone, G.J. (1990). Analysis of DNA in fresh tissue by the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Pathol.* 136(3): 541-547.
- Rohde, K. (1982). *Ecology of marine parasites*. University of Queensland Press., St. Lucia, xvi+245 pp.
- Rhode, K. (1986). Differences in species diversity of Monogenea between the Pacific and Atlantic oceans. *Hydrobiologia*, 137: 21-28.
- Ronquist, F. y Nylin, S. (1990). Process and pattern in the evolution of species associations. *Syst. Zool.* 39(4): 323-344.
- Ruano, G., Pagliaro, E.M., Schwartz, T.Z., Lamy, K., Messina, D., Gaensslen, R.E. y Lee, H.C. (1992). Head-soaked PCR: an efficient method for the DNA amplification with applications to forensic analysis. *BioTechniques* 13(2): 266-274.
- Rzhetsky, A. y Nei, M. (1992). A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* 9(5): 945-967.
- Saccone, C., Lanave, P. y Pesole, G. (1993). Time and biosequences. *J. Mol. Evol.* 37: 154-159.
- Salvador, V., Balbuena, J.A. y Raga, J.A. (1996). Contribution to the taxonomy of the family Campulidae Odhner, 1926 (Digenea) by means of a morphometric multivariate analysis. *Syst. Parasitol.* 33: 13-22.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos, C.P., Di Benedetto, A.P., Capistrano, L. y Ramos, R. (1992). Parasitos de mamíferos acuáticos da Costa Brasileira. 5ª Reunión de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. 28 Septiembre-2 Octubre, Buenos Aires, Argentina. p. 60.
- Santos, C.P., Rohde, K., Ramos, R., Di Benedetto, A.P. y Capistrano, L. (1996). Helminths of cetaceans on the Southeastern coast of Brazil. *J. Helminthol. Soc. Wash.* 63: 149-152.
- Schmidt, G.D. y Dailey, M.D. (1971). Zoogeography and the generic status of *Polymorphus (polymorphus) cetaceum* (Johnston et Best., 1942) comb. n. (Acanthocephala). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 38: 137.
- Schroeder, C.R. y Wegeforth, H.M. (1935). The occurrence of Gastric Ulcers in Sea Mammals of the California Coast, their Etiology and Pathology. *Journ. Amer. Veterin. Medic. Association* 85: 333-342.
- Schroeder, R.J., Delliquadri, C.A., McIntyre, R.W. y Walker, W.A. (1973). Marine mammal disease surveillance program in Los Angeles County. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 163(6): 580-581.
- Schulte, F. y Poinar, G.O. (1991). On the geographical distribution and parasitism of *Rhabditis (Pelodera) orbitalis* (Nematoda: Rhabditidae). *J. Helminthol. Soc. Wash.* 58: 82-84.
- Seilacher, A. (1970). Arbeitskonzept zur konstruktions-morphologie. *Lethaia*. 3(4): 393-396.
- Shults, L.M. (1986). Helminth Parasites of the Steller Sea Lion, *Eumetopias jubatus*, in Alaska. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 53(2): 194-197.
- Shults, L.M. y Frost, K.J. (1988). Helminth Parasites of Ribbon Seals, *Phoca fasciata*, in the Bering Sea and their Immediate Host. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 55(1): 68-73.
- Simon, C. (1991). Molecular systematics at the species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA. En: *Molecular Techniques in Taxonomy*. Ed: G.M. Hewitt et al., NATO ASI Series, Vol. H57, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 33-71 pp.
- Skrjabin, A.S. (1959). New helminth species of marine mammals in Pacific Ocean and Dalbnevostochnij Sea. *Izb. Krimsk. Ped. In-Ta.* 34: 99-118.
- Skrjabin, A.S. (1970a). A new trematode, *Cetitrema foliiformis* g. et sp. n., a parasite of the liver of Bryde's whale. *Parazitologiya (Leningk.)* 4(1): 34-38.
- Skrjabin, A.S. (1970b). A New trematode, *Lecithodesmus petrowi* n.sp. parasite of the Bride's whale. *Nauchn. Dokl. Vyssh. Shk. Biol. Nauki.* 7: 7-11.
- Skrjabin, A.S. (1974). First finding of the trematodes *Lecithodesmus goliat* (Van Beneden, 1858) Braun, 1902 (Fam. Campulidae Odhner, 1926) in the Antarctic whales. *Izvestiya Tjookeanskogo Naukhoissledovatel'skogo instituta R'lkogo Zozyaitsva i Okeanografii (Tinro)*. 88:139-144.
- Skrjabin, A.S. (1976). Remarks on the systematics of Campulidae and Nasitrematidae. En: *Kratkle tezisy dokladov II Vsesoyuznogo simpoziuma po parazitam i boleznyam morskikh zhivotnykh*. Kaliningrad, USSR; Ministerstvo Rybnogo Khozyaostva SSSR, AtlantNiro. 56-58 [Ru] State Univ., Simferopol' Ukrainian SSR.
- Skrjabin, K.I. (1915). *Odhneriella rossica* nov. gen. n. sp. vobuditel' pechenochnoglistnoi bolezni morzhei. *Arkh. Vet. Nauk* 45: 1057-1064.
- Skrjabin, K.I. (1935). Fasciolosis from animals and the methods to eradicate it. *Sel'jozgez*, 174 p.
- Skrjabin, K.I. (1944). On Trematodes of the genus *Odhneriella* Skrjabin, 1915, parasitic of the sea mammals. *Comptes Rendus (Doklady) de l'Académie des Sciences de l'URSS* 44(7): 302-303.
- Skrjabin, K.I. (1947). *Oschmarinella sobolevi* n. gen. n. sp. novaya trematoda iz pecheni kita. *Doklady Akad. Nauk.* 57(8): 857-859.

- Smith, A.B. (1994). Rooting molecular trees: problems and strategies. *Biological Journal of the Linnean Society* 51: 279-292.
- Smith, A.B. y Littlewood, D.T.J. (1994). Paleontological data and molecular phylogenetic analysis. *Paleobiology* 20(3): 259-273.
- Smith, J.W. y Wootten, R. (1978). Anisakis and Anisakiasis. *Adv. Parasitol.* 16: 93-163.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*. 2nd. Ed. W. H. Freeman and co., NY, 859 pp.
- Spotte, S., Radliffe, C.W. y Dunn, J.L. (1979). Notes on Commerson's dolphin (*Cephalorhynchus commersonii*) in captivity. *Cetology* 35: 1-9.
- Stossich, M. (1892). I distomi dei mammiferi. *Estratto dal programma della Civica Scuola Reale Superiore, Trieste* : 1-42.
- Stunkard, H.W. y Alvey, C.H. (1930). The morphology of *Zalophotrema hepaticum*, with a review of the trematode family Fasciolidae. *Parasitology* 22: 326-333.
- Sukhdeo, M.V.K. (1990). Habitat selection by helminths: a hypothesis. *Parasitol. Today*, 6:234-237.
- Sweeney, J.C. y Gilmartin, W.G. (1974). Survey of diseases in free-living California sea lions. *J. Wildl. Dis.* 10: 370-376.
- Swofford, D.L. (1985). *Phylogenetic analysis using parsimony (PAUP)*, Version 2.4. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
- Swofford, D.L. y Olsen, G.J. (1990). Phylogenetic reconstruction. En: *Molecular Systematics*. Ed. D.M. Hillis y C. Moritz. Sinauer. Sunderland, Mass. 411-501 pp.
- Tantalean, M. y Escalante, H. (1987). Nota sobre la presencia de *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) Price, 1932 (Trematoda: Campulidae) en *Delphinus delphis* L. (Cetacea: Odontoceti) de la costa peruana. *Parasitol. al Día* 11: 39-40.
- Thewissen, J.G.M., Hussain, S.T. y Arif, M. (1994). Fossil evidence for the origin of aquatic locomotion in archaeocete whales. *Science* 263: 210-212.
- Torres, P., Oporto, J.A., Brieva, L.M. y Escare, L. (1992). Gastrointestinal helminths of the Cetaceans *Phocoena spinnipinis* (Burmeister, 1865) and *Cephalorhynchus eutropia* (Gray, 1846) from the Southern Coast of Chile. *J. Wildl. Dis.* 28(2): 313-315.
- Treschev, V.V. (1966). Novaya Trematoda *Orthosplanchnus sudarikovi* Nov. Sp. (Campulidae) ot Belukhi. *Mater. Nauch. Conf. Vses. O. Gel'mintol.* 3: 292-294.
- Treschev, V.V. (1968). A new campulid *Orthosplanchnus albamarinus* n. sp. (Trematoda, Campulidae) parasite of the whit whale. *Rev. Zool.* 47(6): 937-940.
- Treschev, V.V. (1978). A study of trematodes from marine mammals in the European Arctic. First All-Union Meeting of Parasitocoenologists (Poltava, September 1978), Abstracts Part 3: 163-164.
- Treschev, V.V., Potelov, V.A. y Zavaleeva, D.D. (1967). Contribution à l'étude de l'helminthofaune de *Phoca hispida* et *Cystophora cristata*. *Trabajo de Investigación Científica y Proyecto del Instituto de Peces y Oceanográfico Knupoduyu*. 194-197 pp.
- Van Beneden, P.J. (1856). Note sur une nouvelle espèce de Distome, le géant de sa famille, habitant le foie d'une Baleine, nommée *Distoma goliath*, V. Ben. *Bull. de l'Acad. Roy.* 5(2): 95-97.
- Van Waerebeek, K. y Oporto, J.A. (1990). Observaciones preliminares sobre la biología de *Lissodelphis peronii* (Delphinidae) en el Pacífico Sureste. 4ª Reunión de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. 12-15 Noviembre, Valdivia, Chile. p. 73.
- Van Waerebeek, K., Reyes, J.C. y Alfaro, J. (1993). Helminth parasites and phoronts of dusky dolphins *Lagenorhynchus obscurus* (Gray, 1828) from Peru. *Aquat. Mamm.* 19(3): 159-169.
- Van-Waerebeek, K., Reyes, J.C., Read, A.J. y McKinnon, J.S. (1990). Preliminary observations of bottlenosed dolphins from the Pacific coast of South America. En: *The Bottlenosed Dolphin*, Ed. S. Leatherwood and R.R. Reeves, San Diego, Acad. Press, 143-154pp.
- Vegni-Talluri, M. (1982). *Campula rochebruni* (Poirier, 1886) Bittner et Sprehn, 1928 (Trematoda, Campulidae), parassita dei dotti biliari di *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) (Odontoceti, Delphinidae) del Mar Mediterraneo. *Parassitologia* 24: 177-184.
- Walker, W.A. (1977). Case for Diagnosis. *Mil. Med.* 141(11).
- Walker, W.A. y Cowan, D.F. (1981). Air sinus parasitism and pathology in free-ranging common dolphins (*Delphinus delphis*) in the eastern tropical Pacific. NOAA, NMFS, SFC-Administrative Report. LJ-81-23C, 1-19 pp.
- Walker, W.A., Hochberg, F.G. y Hacker, E.S. (1984). The potential use of the parasites *Crassicauda* (Nematoda) and *Nasitrema* (Platyhelminthes) as biological tags and their role in the natural mortality of common dolphins, *Delphinus delphis*, in the Eastern North Pacific. NOAA/82-ABC-00042 Adm. Rep. LJ-84-08C 1-31 pp.
- Wazura, K.W., Strong, J.T., Glenn, C.L. y Bush, A.O. (1986). Helminths of the beluga whale (*Delphinapterus leucas*) from the Mackenzie river delta, northwest territories. *J. Wildl. Dis.* 22(3): 440-442.

- Wiley, E.O. (1981). *Phylogenetics. The theory and practice of phylogenetic systematics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 439 pp.
- Wolstenholme, D.R., MacFarlane, J.L., Okimoto, R., Clary, D.O. y Wahleithner, J.A. (1987). Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1324-1328.
- Woodard, J.C., Zam, S.G., Caldwell, D.K. y Caldwell, M.C. (1969). Some Parasitic Diseases of Dolphins. *Path. Vet.* 6: 257-272.
- Wyss, A.R. (1988). On "retrogression" in the evolution of the Phocinae and phylogenetic affinities of the monk seals. *Am. Mus. Novit.* 2924: 1-38.
- Yablokov, A.V., Bel'kovich, V.M. y Borisov, V.I. (1972). Whales and dolphins. Part I. Kity i Del'finy. Nauka, Moscow. [Translated by the U.S. Department of Commerce, Springfield, VA 1974, U.S.A.].
- Yamaguti, S. (1942). Studies on the helminth fauna of Japan. Part 40. Three new species of trematodes from the bile ducts of marine mammals. *Biogeographica, Tokyo* 3/4: 399-407.
- Yamaguti, S. (1951). Studies on the helminth fauna of Japan. Part 45. Trematodes of marine mammals. *Arb. Med. Fak. Okayama* 7: 283-294.
- Yamaguti, S. (1958). Digenea of mammals. En: *Systema Helminthum*. Vol.I. Part.1. 844-847 pp.
- Yamaguti, S. (1971). *Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates*. Keigaku Publishing Co. Ltd., Tokyo. Vol 1 y 2, 824 pp.
- Yurakhno, M.V. (1967). *Orthosplanchnus pygmaeus* sp.n. (Trematoda, Campulidae). A parasite of the whale. *Vestn. Zool.* 2: 70.
- Yurakhno, M.V. (1969). New Trematoda *Orthosplanchnus oculatus* sp. n. (Campulidae) parasite of *Odoboenus divergens* Illiger. *Vestnik Zoologii.* 4: 29-31.
- Yurakhno, M.V. (1972). Comparison of the helminth fauna of Chukchi and Bering populations of ringed seals. En: *Thesis of Works 5th. All-Union Conf., Studies of Marine Mammals, part 2*. Makhachkala 275-279 pp.
- Yurakhno, M.V. (1984). Helminth fauna of *Histiophoca fasciata* in the west part of the Bering Sea. *Vestn. Zool. (Ecology)* 2: 70-73.
- Yurakhno, M.V. y Popov, V.N. (1976). Isolation of herds of Bering Sea ringed seal. *Sov. J. Ecol.* 7: 83-85.
- Yurakhno, M.V. y Treschev, V.V. (1972). Kizucheniiu gel'mintofauny tikhoookeanskogo morzha. Tezisy dokladov v vsesoiuznogo soveshcheniia po izucheniiu mlekopitaiushchikh. Makhachkala, USSR, 280-283 pp.
- Yurick, D.B. (1977). Populations, subpopulations, and zoogeography of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena* (L.). MSc thesis, University of Guelph, Ontario, Canada.
- Zam, S.G., Caldwell, D.K. y Caldwell, M.C. (1970). Some internal parasites from freshwater cetaceans from the upper Amazon river. *Invest. Cetacea* 2: 250-251.
- Zam, S.G., Caldwell, D.K. y Caldwell, M.C. (1971). Some endoparasites from small odontocete cetaceans collected in Florida and Georgia. *Cetology* 2: 1-11.
- Zdzitowiecki, K. (1986) Acanthocephala of the Antarctic. *Pol. Polar Res.* 7: 79-117.
- Zdzitowiecki, K. (1991). Antarctic acanthocephala. En: *Synopses of the Antarctic benthos*. Eds. J. W. Wägele y J. Sieg. Vol. 3. Koenigstein Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany. 116 pp.



