

Taxonomía y sistemática

La alta variación morfológica de los estadios inmaduros del nemátodo *Gnathostoma* sp. I no está respaldada por información molecular

The high morphological variation found in the immature stages of the nematode Gnathostoma sp. I is not supported by molecular information

Miguel Ángel Mosqueda-Cabrera *, Diana Laura Desentis-Pérez
y Tania Araceli Padilla-Bejarano

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento El Hombre y su Ambiente, Calzada del Hueso Núm. 1100, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, 04960 Ciudad de México, México

*Autor para correspondencia: zitzitl@correo.xoc.uam.mx (M.Á. Mosqueda Cabrera)

Recibido: 5 agosto 2022; aceptado: 24 septiembre 2024

Resumen

Las larvas de tercer estadio avanzado (AdvL₃) de *Gnathostoma* sp. I aisladas de la musculatura de *Dormitator latifrons* y *Rhamdia guatemalensis* son morfológica y molecularmente iguales entre sí y se relacionan genéticamente con un juvenil aislado del hígado de *Didelphis marsupialis*, en la cuenca del río Ostuta, Oaxaca. Asimismo, son diferentes de las 3 especies de *Gnathostoma* descritas para México por el tamaño del cuerpo, por los ganchos del bulbo cefálico en la fase AdvL₃ y por la presencia de un prepucio cuticular en el extremo posterior de un macho juvenil. A través del marcador molecular COI, un análisis de distancias genéticas y la inferencia de la filogenia entre las especies del género, se concluye que *Gnathostoma* sp. I está estrechamente emparentada, pero taxonómicamente es diferente a *G. turgidum* y a las otras especies presentes en México y el mundo, aun cuando falta material para establecerla como especie nueva. Por otro lado, con base en características morfológicas se documenta el hallazgo de las AdvL₃ de *G. lamothei* (en *Rhamdia guatemalensis* y *Lontra longicaudis*) y la AdvL₃ de otra especie no identificada (en *R. guatemalensis* y *Synbranchus marmoratus*), pero distinta a las anteriores de acuerdo con evidencias morfológicas y moleculares.

Palabras clave: *Gnathostoma* spp.; Tercer estadio avanzado; Filogenia; México; Marsupiales

Abstract

The third-stage advanced larvae (AdvL_3) of *Gnathostoma* sp. I isolated from the musculature of *Dormitator latifrons* and *Rhamdia guatemalensis* are identical to each other morphologically and molecularly, and are genetically related to a juvenile isolated from the liver of *Didelphis marsupialis*, in the Ostuta River basin, Oaxaca. They are different from the 3 species of *Gnathostoma* described from Mexico by body size and the hooks of the cephalic bulb in the AdvL_3 stage, as well as, in the presence of a cuticular pouch at the posterior end of the juvenile male. Through the COI molecular marker, a genetic distance analysis, and phylogenetic inference among the species of the genus, we conclude that *Gnathostoma* sp. I is closely related to, but distinct from *G. turgidum* and from other species found in Mexico and worldwide, even though there is not enough material to establish it as a new species. Additionally, based on morphologic characteristics, we documented the discovery of AdvL_3 of *G. lamothei* (in *Rhamdia guatemalensis* and *Lontra longicaudis*) and AdvL_3 of another unidentified species (in *R. guatemalensis* and *Synbranchus marmoratus*), which is distinct to above according to morphologic and molecular evidence.

Keywords: *Gnathostoma* spp.; Advanced third stage; Phylogeny; Mexico; Marsupials

Introducción

Entre el enorme conjunto de especies de helmintos que se distribuyen en México se encuentra el género *Gnathostoma* Owen, 1836 (Spirurida: Gnathostomatidae) conformado por 12 especies válidas (Almeyda-Artigas, 1991; Bertoni-Ruiz et al., 2005; Miyazaki, 1954). Tres de ellas se distribuyen en México: *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991; *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 y *Gnathostoma lamothei* Bertoni-Ruiz, García-Prieto, Osorio-Sarabia y León-Règagnon, 2005 (Gaspar-Navarro et al., 2013). Las especies presentan una alta especificidad hacia mamíferos carnívoros como sus hospederos definitivos; *G. binucleatum* (Canidae, Felidae, Suidae), *G. lamothei* (Procyonidae) y *G. turgidum* (Didelphidae) (Pérez-Álvarez et al., 2008). El hospedero definitivo adquiere la infección al alimentarse de los segundos hospederos intermedios, peces dulceacuícolas para las 2 primeras especies (Almeyda-Artigas, 1991; Bertoni-Ruiz et al., 2005), ranas y accidentalmente peces para la última (Mosqueda-Cabrera et al., 2009, 2023).

El objetivo de la presente investigación fue describir un morfotipo de *Gnathostoma* que difiere morfológicamente de las especies conocidas para didélfidos de México, proveniente de una zona no explorada previamente, la cuenca del río Ostuta, Oaxaca.

Materiales y métodos

La cuenca del río Ostuta forma parte de la porción oriente de la región hidrográfica Tehuantepec (RH22). Se localiza en la zona suroriental del estado de Oaxaca, que limita con Chiapas. La laguna Las Garzas ($16^{\circ}17'46''$ N, $94^{\circ}27'17''$ O), es un cuerpo de agua semipermanente, remanente de un antiguo cauce de río ubicado en la región hidrográfica Costa de Chiapas (RH23) en la cuenca del

mar Muerto, que colinda al oeste con la cuenca del río Ostuta (Conagua, 2021) y es irrigada por la misma durante lluvias torrenciales (fig. 1).

Esta investigación fue conducida debido al hallazgo fortuito de larvas tercer estadio avanzado (AdvL_3) en las heces de la nutria neotropical *Lontra longicaudis* de la cuenca del río Ostuta, Oaxaca durante abril y mayo de 2018. Posteriormente, durante el 2022 se realizó la búsqueda de larvas de *Gnathostoma* en peces de este río y en cuerpos de agua asociados a la región hidrográfica (RH23). Para su captura se utilizaron redes de pesca como atarrayas y chinchorros. La musculatura de los peces fue revisada a contraluz entre 2 vidrios y posteriormente digerida con pepsina artificial (16 gr de pepsina, 6 gr de NaCl y 8 ml de HCl en 1 L de agua). La búsqueda de las larvas se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico; fueron fijadas en alcohol etílico al 70% caliente y conservadas en alcohol etílico al 70% frío. Para su estudio fueron transparentadas con lactofenol de Amman y observadas bajo el microscopio compuesto. Todas las medidas se presentan en micras, se especifica el rango y entre paréntesis el promedio seguido de la desviación estándar y el número de observaciones. Los parámetros de la infección fueron calculados de acuerdo con Bush et al. (1997). Se tomaron fotografías con una cámara digital montada a un microscopio óptico y los dibujos fueron realizados con ayuda una cámara clara. La captura y el sacrificio del tlacuache común *Didelphis marsupialis* fue realizada de acuerdo con Almeyda-Artigas et al. (2010) e identificado por la morfología craneal siguiendo a Gardner (1973). El material de referencia fue depositado en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM). La obtención de los organismos se realizó bajo el permiso de colecta SCPA/DGVS/03184/22 expedido por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.

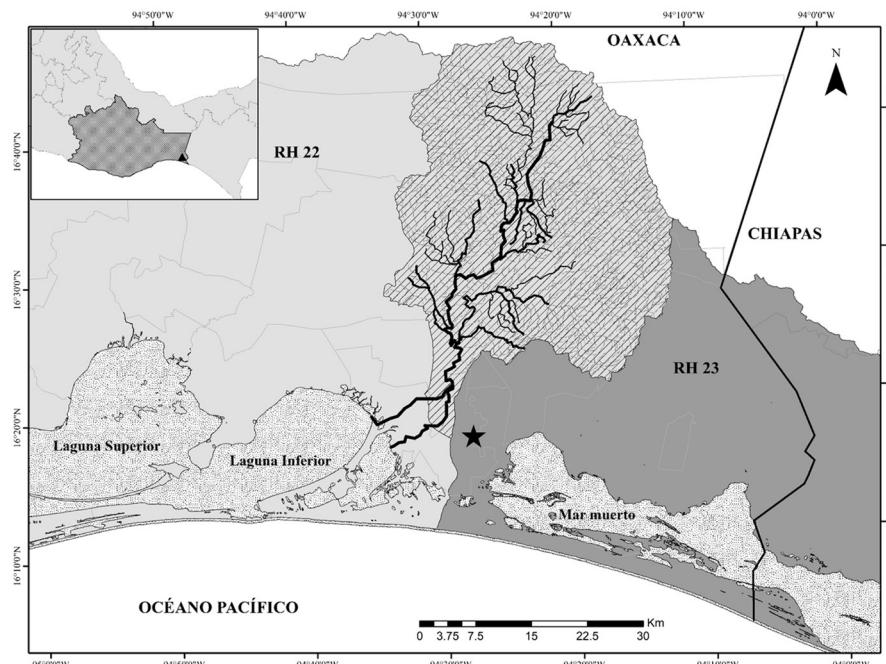


Figura 1. Cuenca del río Ostuta, Oaxaca en la región hidrográfica Tehuantepec (RH22). Laguna Las Garzas en la región hidrográfica Costa de Chiapas (RH23). Mapa elaborado por D.L. Desentis Pérez.

La extracción del DNA se llevó a cabo utilizando el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN). Se amplificó la región del segundo espaciador interno transcrita (ITS2) y la subunidad I del citocromo c oxidasa (COI) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). La amplificación de las secuencias nucleotídicas parciales de los genes mencionados se llevó a cabo a partir de reacciones compuestas por una solución de 8.5 μ l de H₂O, 3 μ l de buffer 5x, 0.2 μ l de cada oligonucleótido, 0.1 μ l de enzima Taq polimerasa (Bioline) y 3 μ l de DNA genómico en un volumen total de 15 μ l. La región ITS2 se amplificó con los oligonucleótidos NEWS2 (forward) 5'-TGTGTCGATGAAGAACGCAG-3' e ITS2-RIXO (reverse) 5'-TTCTATGCTAAATTAGGGG-3' (Almeyda-Artigas et al., 2000a), con el siguiente perfil térmico: 1 ciclo de 94 °C por 1 min; 5 ciclos de 92 °C por 30 s, 45 °C por 30 s y 72 °C por 1 min; 35 ciclos de 92 °C por 30 s, 53 °C por 30 s y 72 °C por 1 min; elongación final a 72 °C por 5 min. Los productos de la PCR fueron purificados mediante el kit de purificación QIAquick PCR (50) (QIAGEN). Las secuencias fueron obtenidas mediante el secuenciador de DNA automatizado ABI Prism 310 en el Laboratorio de Secuenciación Genómica del PABIO-UNAM. En el caso del ITS-2 se usaron los oligonucleótidos: NEWS2 e ITS2-RIXO para la secuenciación, en el caso del COI se usaron los oligonucleótidos M13F (5'-TGTAACACGACGG CCAGT-3') y M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Messing, 1993).

Las secuencias obtenidas se alinearon en el programa MAFFT V7 (en línea) con sus homólogas (COI/ITS2) disponibles en el repositorio GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), correspondientes a especies nominales del género *Gnathostoma* en México y una especie del género *Anisakis* (*A. pegreffii* FJ907317/AY603531) como grupo externo: *G. binucleatum* (AB180103/EU915244), *G. lamothiei* (KF648543), *G. turgidum* (KT894798/KF648548), *G. spinigerum*

MAFFT V7 (en línea) con sus homólogas (COI/ITS2) disponibles en el repositorio GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), correspondientes a especies nominales del género *Gnathostoma* en México y una especie del género *Anisakis* (*A. pegreffii* FJ907317/AY603531) como grupo externo: *G. binucleatum* (AB180103/EU915244), *G. lamothiei* (KF648543), *G. turgidum* (KT894798/KF648548), *G. spinigerum*

(AB037132/KF648553), *G. nipponicum* (JQ824059/JN408314), *G. hispidum* (JQ824056/JQ824057). A partir de los alineamientos múltiples de secuencias se realizó un análisis de distancias genéticas en el programa MEGA X 11.0.13 para establecer la similitud entre las distintas especies utilizando el modelo Kimura 2 parámetros (K2P) de acuerdo con Hebert et al. (2003). El análisis filogenético se realizó con los 2 marcadores moleculares (COI, ITS-2), de manera independiente y posteriormente fueron concatenados con un ajuste manual en el programa Mesquite v. 3.6 (Maddison y Maddison, 2019). La inferencia filogenética se realizó utilizando el criterio de inferencia bayesiana (IB) en el programa MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist et al., 2012). Los resultados se ilustraron en un árbol filogenético construido en el programa FigTree v. 1.4.2 (Rambaut, 2006).

Descripción

Gnathostoma sp. I (figs. 2-4)

Juvenil. Bulbo cefálico con ganchos de una sola punta dispuestos en 10 hileras completas, mide 393.6 × 861, de largo y ancho, respectivamente. Dos papillas cervicales laterales, derecha e izquierda, ambas en la décima hilera. Ancho del cuerpo a la altura de la intersección esófago-intestino 1,479.60. Esófago de 14,586.39 de largo × 836.10 de ancho, cubre 58.3% respecto al ancho del cuerpo. Cuatro sacos cervicales se proyectan desde la base del bulbo cefálico, en promedio miden 2,379.69 de largo, 16.31% respecto al largo del esófago. Bursa con pequeñas espinas ventrales en sentido posteroanterior, presenta 4 pares de papillas pedunculadas; 2 pares preanales, un par adanal y 2 pares postanales; además, 4 pares de papillas no pedunculadas; un par preanal, 2 pares adanales y un par postanal. Dos espículas, la derecha 3,267.43 de largo × 142.68 de ancho; la izquierda 949.41 largo × 93.48 de ancho; proporción de 1:3.4; el extremo posterior con cutícula holgada más larga que el cuerpo, similar a un prepucio.

Espinás corporales presentes solo en la región anterior del cuerpo con variaciones en el número de puntas según la región; a, inmediatamente posteriores al bulbo cefálico, con 5-7 puntas son comunes las de 5, más largas (49.06) que anchas (22.08); b, en la región que ocupan las papillas cervicales, de 5-9 puntas son comunes las de 7 y 8, con 61.32 de largo y 31.89 de ancho; c, a la altura de los sacos cervicales, con 5 a 10, más largas (108.24) que anchas (75.80), con una a 3 puntas laterales y tronco central con 3 y 5 puntas; d, a la altura de la intersección esófago-intestino, espinas con 5 a 6 puntas más anchas que largas, 59.04 y 39.36, respectivamente, las puntas laterales generalmente más cortas y con 3 a 4 puntas centrales;

e, posterior a la intersección esófago-intestino, cambian drásticamente de forma y tamaño, siendo más largas (59.04) que anchas (34.44) con un par de puntas laterales cortas y de 2 a 3 puntas centrales de igual tamaño; en la parte más posterior de la porción escamada del cuerpo se observa un gradiente donde las puntas centrales de las espinas van ensanchándose y desapareciendo las puntas laterales hasta terminar en espinas de una sola punta.

Datos morfológicos adicionales (basados en la observación directa de especímenes depositados en la CNHE 4739): macho obtenido del estómago de *Didelphis marsupialis*. Mide 46,000 de largo por 2,182.41 de ancho máximo. Esófago 6,625 por 542.52 de largo y ancho, respectivamente; cubre 14.4% respecto a la longitud del cuerpo. Dos papillas cervicales en 11 (izquierda) y 10 (derecha), sobre las hileras de espinas del cuerpo. Bulbo cefálico 442.80 por 939.72 de largo y ancho, respectivamente, con 9 hileras completas de ganchos con una sola punta de base gruesa y cónica. Extremo posterior con cutícula holgada corrugada y arreglo de las espinas en el cuerpo iguales a la forma juvenil que aquí se describe. Las espinas cubren 61% del cuerpo.

Resumen taxonómico

Hospedero: tlacuache común *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 (Didelphimorphia: Didelphidae).

Sitio de infección: hígado.

Localidad: inmediaciones del río Ostuta, San Francisco Ixhuatán, Oaxaca.

Depósito de especímenes: CNHE 12827.

Comentarios taxonómicos

Para propósitos comparativos, estudiamos especímenes de *G. turgidum* de *D. marsupialis* (CNHE 4739) y *G. turgidum* de *D. virginiana* (CNHE 4261, 4740, 4736). La presencia de una cutícula holgada en el extremo posterior en la forma juvenil estudiada en este trabajo y su ausencia en el adulto de *G. turgidum* (CNHE 4739), así como el porcentaje espinado del cuerpo (61% vs. 40%, respectivamente), son las únicas características diferentes entre las especies. La relación entre las espículas del macho, el número de puntas y arreglo de las espinas en el cuerpo no mostraron diferencias entre ambos lotes de material.

Los fragmentos de gen amplificados, ITS-2 (480 pb) y COI (702 pb), se encuentran disponibles en GenBank con números de acceso PQ149238 y PQ143178, respectivamente, y pertenecen al segundo tercio del juvenil de *Gnathostoma* sp. I.

Las notables diferencias morfológicas en el tamaño del cuerpo entre las AdvL₃ de *Gnathostoma* aisladas de los peces *D. latifrons* y las de *G. turgidum* (tabla 1), así

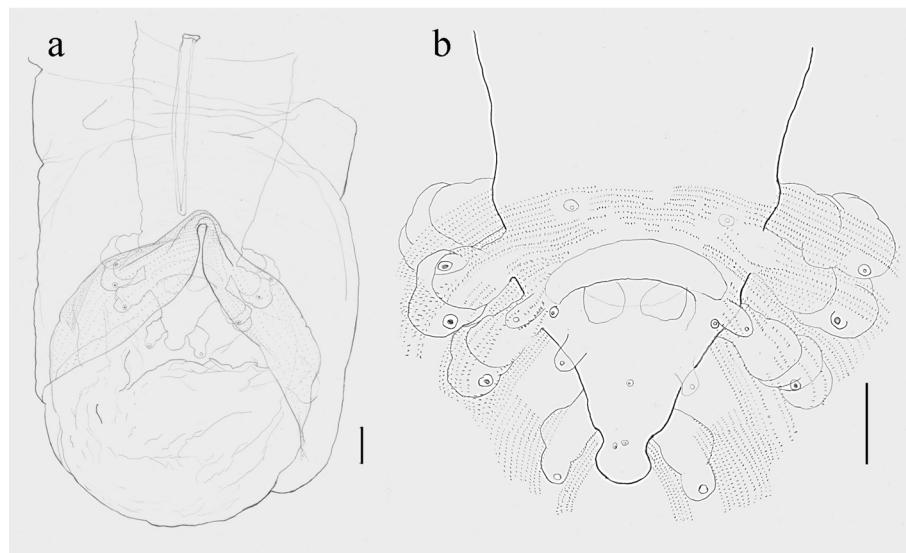


Figura 2. *Gnathostoma* sp. I parásito de *D. marsupialis*. a) Espícula derecha y cutícula holgada del extremo posterior; b) patrón de espinación de la bursa con papilas ventrales y laterales.

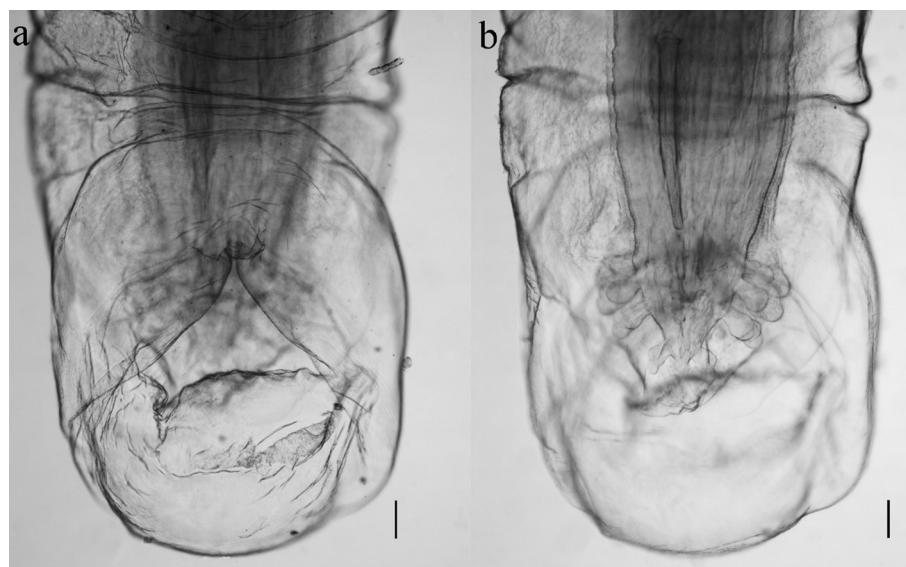


Figura 3. Extremo posterior de juvenil de *Gnathostoma* sp. I. (a) Cutícula holgada; b) espícula derecha y papilas de la bursa. Escala de las barras = 200 µm.

como el tamaño de los ganchos en las 4 hileras del bulbo cefálico, nos condujeron a pensar que pudieran tratarse de especies independientes. El análisis de distancias genéticas de las secuencias (modelo K2P del ITS2) determinó que las AdvL₃ obtenidas de *D. latifrons* y el juvenil obtenido de *D. marsupialis* son iguales entre sí pero también muy similares a las secuencias de *G. turgidum* con valores de 0.0043 para el juvenil y 0.0046 para la AdvL₃. En cuanto

al marcador molecular COI, en el análisis de distancias genéticas de las secuencias registramos una distancia genética de 0.0657 con respecto a las ya mencionadas y la secuencia de *G. turgidum*. Basados en estos datos, nuestro material podría representar una variante de *G. turgidum* o una especie cercanamente relacionada a ésta (fig. 5). Sin embargo, y pese a las diferencias morfológicas tan claras entre ambos taxones, preferimos adoptar una

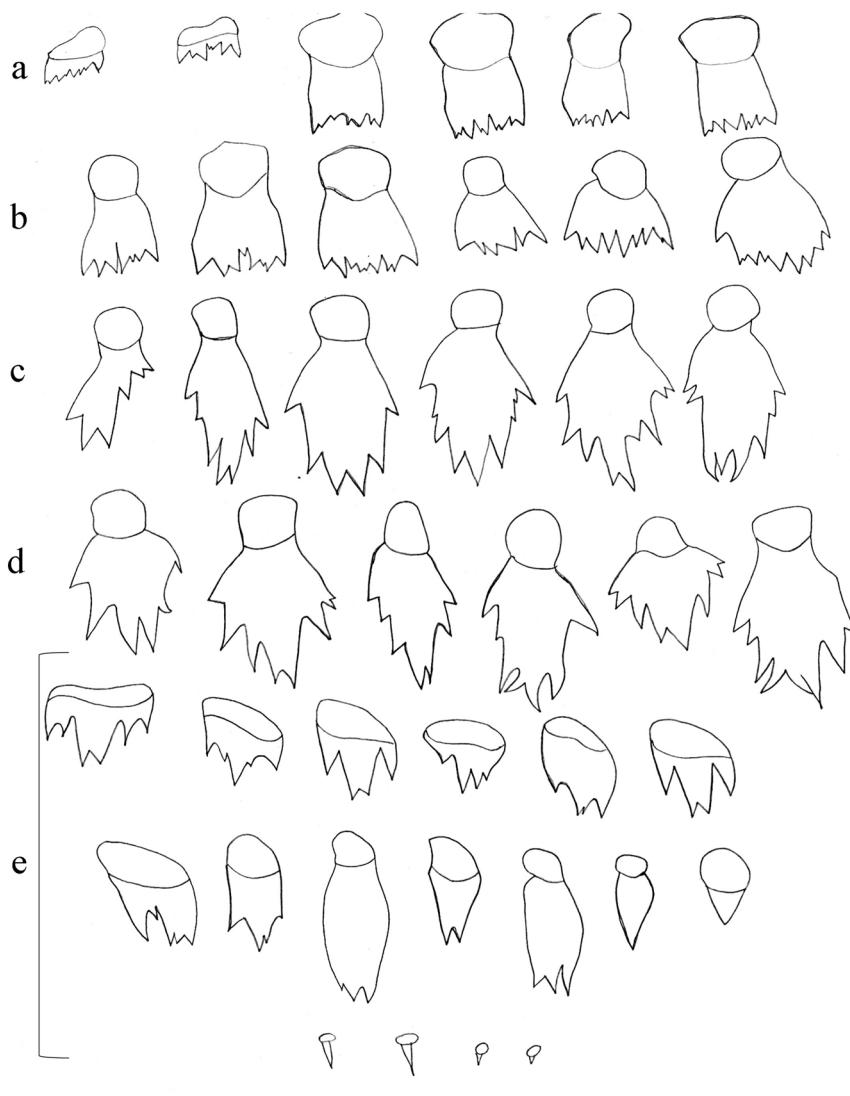


Figura 4. Arreglo de las espinas en el cuerpo de *Gnathostoma* sp. I. a) Primeras hileras del cuerpo; b) región de la papila cervical; c) región distal de los sacos cervicales; d) intersección esófago-intestino; e) región final de la superficie espinada. Escala de la barra = 100 μ m.

posición conservadora y no establecer a las larvas y al juvenil que recuperamos en el río Ostuta, Oaxaca, como una especie independiente hasta contar con una mayor cantidad de evidencias, tanto morfológicas (de hembras y machos adultos) como moleculares.

Gnathostoma sp. I (figs. 6, 7)

Larva de tercer estadio avanzado. La siguiente descripción está basada en la observación de 23 larvas. El cuerpo mide 1,149-1,414 (1, 262 \pm 90.86; 11) de largo y 94.71-129.77 (105.82 \pm 12.59; 11) de ancho; está cubierto

totalmente por hileras de espinas transversales, cuyo número oscila entre 180-223 (192.79 \pm 11.82; 13). Bulbocefálico 30.77-85.85 (44.69 \pm 14.57; 13) de largo \times 65.23-169.24 (91.90 \pm 26.72; 13) de ancho; presenta espinas dispuestas en 4 hileras transversales: 27-37 (31.17 \pm 2.59; 23), 28-44 (34.39 \pm 3.78; 23), 30-44 (37.22 \pm 3.42; 23) y 33-46 (41.26 \pm 3.75; 23), de la primera a la cuarta, respectivamente. Miden: 4.44-6.22 (5.33 \pm 0.68) \times 1.77-2.66 (2.28 \pm 0.31), 5.33-5.77 (5.64 \pm 0.21) \times 2.22-2.66 (2.35 \pm 0.21), 5.33-6.22 (5.65 \pm 0.34) \times 2.66-3.55 (3.11 \pm 0.26), 4.44-4.88 (4.82 \pm 0.17) \times 2.66-3.55

Tabla 1

Comparación morfométrica entre larvas de tercer estadio avanzado de las 3 especies de *Gnathostoma* en México. PCi = Papila cervical izquierda, PCd = papila cervical derecha, PE = poro excretor, Ea = ancho del esófago, Ca = ancho del cuerpo, — sin datos.

| Especie referencia | Largo / ancho | PE | Proporción Ea vs. Ca | Cantidad de ganchos en las hileras del bulbo cefálico | | | | |
|---|---|---------------|----------------------|---|---------------|---------------|---------------|---------|
| | | | | I | II | III | IV | IV-I |
| <i>G. lamothei</i> | | | | | | | | |
| Gaspar-Navarro et al (2013) ^a | 3,582.24-5,095.90 (4,487.94) / 236.60-318.24 (288.74) | 20-29 (23.07) | (0.41) | 34-44 (39.33) | 38-47 (43.27) | 40-48 (44.20) | 45-58 (47.33) | (7.13) |
| Cole et al. (2014) ^b | — | — | — | 36 | 38 | 36 | 36 | 0 |
| Presente estudio ^c | 1,879.44-1,928.64 (1,906.36) / 245.28-260.76 (253.71) | 20-23 (21.33) | (0.57) | 41-45 (42.33) | 43-45 (44.33) | 46-49 (47.33) | 49-51 (50.00) | (7.67) |
| Presente estudio ^d | 3,104.52 / 225.66 | 26 | 0.71 | 42 | 47 | 45 | 47 | 5 |
| <i>G. turgidum</i> | | | | | | | | |
| Mosqueda-Cabrera et al. (2009) ^e | 1,530.00-2,007.40 (1,670.20) / 134.6-160.4 (140.80) | 15-22 (19.7) | | 26-34 (30.80) | 29-38 (34.00) | 29-43 (36.70) | 33-42 (39.60) | (8.80) |
| Díaz-Camacho et al. (2010) ^f | 1,300-4000 (2,700.00) / — | — | — | (34.00) | (37.00) | (36.00) | (42.00) | (8.00) |
| Cole et al., 2014 ^g | — | — | — | 32-37 (35.00) | 34-40 (37.40) | 36-41 (38.20) | 42-48 (44.20) | (9.20) |
| Mosqueda-Cabrera et al. (2023) ^h | 1,544 / 142.3 | 21 | 0.65 | 34 | 36 | 40 | 45 | 11 |
| <i>Gnathostoma</i> sp. I | | | | | | | | |
| Presente estudio ⁱ | 1,234.80 / 115.28 | 15 | 0.45, — | 25, 32 | 27, 33 | 28, 36 | 36, 42 | 11, 10 |
| Presente estudio ^j | 1,149.10-1,413.39 (1,262.7) / 94.71-129.77 (105.82) | 15-21 (18.73) | (0.51) | 27-37 (31.17) | 28-44 (34.39) | 30-44 (37.22) | 33-46 (41.26) | (10.04) |
| <i>G. binucleatum</i> | | | | | | | | |
| Almeyda-Artigas (1991) ^k | 2,600-5,900 (4,300.00) / — | — | (0.70) * | 35-44 (38.90) | 38-47 (42.40) | 40-49 (44.70) | 43-52 (48.20) | (9.5) |
| García-Márquez et al. (2009) ^l | 3,120-3,140 (3,130.00) / — | — | — | 36-29 (38.00) | 40-41 (40.00) | 44-46 (45.00) | 44-47 (46.00) | (8.00) |
| <i>Gnathostoma</i> sp. II | | | | | | | | |
| Presente estudio ^m | 1,919- 1,989 / 137- 145 ** | 17-25 (20.33) | (0.66) | 33-37 (34.33) | 35-43 (38.00) | 38-43 (40.67) | 41-47 (44.67) | (10.3) |

^a Larvas obtenidas experimentalmente de *Lithobates heckscheri*, ^b de una larva obtenida de la musculatura de *M. albus*, ^c de 3 larvas encontradas en excretas de *L. longicaudis*, ^d de una larva obtenida de la musculatura de *Rhamdia guatemalensis*, ^e de 11 larvas obtenidas de la musculatura de *R. swinhonis*, ^f de 28 larvas obtenidas del hígado de *Didelphis virginiana* (S-L3), ^g de 5 larvas obtenidas de la musculatura de *M. albus*, ^h de una larva obtenida de la musculatura de *Gobiomorus dormitor*, ⁱ de 2 larvas obtenidas de la musculatura de *Rhamdia guatemalensis*, ^j de 23 larvas obtenidas de la musculatura de *Dormitator latifrons*, ^k de 30 larvas obtenidas de la musculatura de *Petenia splendida*, ^l de 8 larvas obtenidas de la musculatura de *D. latifrons* y *Sciades guatemalensis*, ^m de 3 larvas 2 obtenidas de la musculatura de *S. marmoratus* y una de la musculatura de *R. guatemalensis*. * Datos de Gaspar-Navarro et al. (2013). ** Datos de 2 larvas.

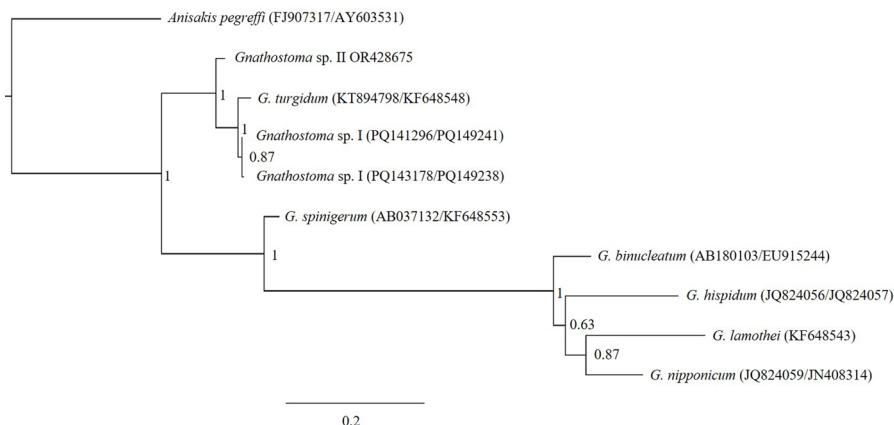


Figura 5. Relaciones filogenéticas entre *Gnathostoma* sp. I y algunas especies del género *Gnathostoma* inferidas mediante los marcadores moleculares (COI/ITS-2). Los valores de probabilidad bayesiana se indican en los nodos.

(3.11 ± 0.36), largo y ancho de la primera a la cuarta hilera, respectivamente. Cuatro sacos cervicales ocupan de 43.23 a 75.29% (58.99 ± 7.65 ; $n = 10$) de la longitud de esófago. El esófago abarca de 32 a 73.81% (40.30 ± 2.60 ; $n = 10$) del largo total y 51% de su ancho, a la altura de la intersección esófago-intestino. El poro excretor ventral, se ubica en las hileras 15-21 (18.73 ± 1.60 ; $n = 15$). Dos papilas cervicales laterales, la derecha situada en la hilera 9-13 (10.58 ± 1.20 ; $n = 19$) y la izquierda en la hilera 9-16 (11.11 ± 1.60 ; $n = 18$). Primordio genital ubicado en 65.61 a 69.67% (68.39 ± 0.56 ; $n = 4$) del cuerpo. Dos papilas caudales, la derecha anterior al primordio genital de 58.06 a 70.91% (62.82 ± 2.27 ; $n = 11$) y la izquierda inmediatamente posterior al primordio genital ubicada en 61.26 a 81.56% (72.85 ± 4.18 ; $n = 11$) del extremo anterior del cuerpo, respectivamente.

Resumen taxonómico

Localidad: laguna Las Garzas, San Francisco Ixhuatán, Oaxaca.

Hospedero: *Dormitator latifrons* (Eleotridae).

Otros hospederos: *Rhamdia guatemalensis* (Heptapteridae).

Sitio de infección: musculatura.

Parámetros de infección: prevalencia 30.6%, intensidad promedio 4.8, abundancia promedio 1.47.

Distribución en el hospedero: 51 larvas en 11 hospederos: 0 (25), 1 (3), 2 (2), 3 (1), 6 (2), 7 (2), 15 (1).

Depósito de especímenes: CNHE 11674.

Comentarios taxonómicos

Las AdvL₃ de *Gnathostoma* sp. I son similares a las de *G. turgidum* (Mosqueda-Cabrera et al., 2009, 2023) en

la cantidad de ganchos en las hileras del bulbo cefálico y en la ubicación de las papilas cervicales y el poro excretor. Sin embargo, difieren en el tamaño del cuerpo (tabla 1), en la forma de los ganchos de las hileras del bulbo cefálico, ligeramente redondos en los ejemplares que ahora describimos (fig. 7a) vs. rectangulares (fig. 1, Mosqueda-Cabrera et al., 2009, 2023; en ambos fig. 1) en *G. turgidum*; asimismo, las dimensiones de los ganchos de la segunda y tercera hilera son iguales y mayores que los de la primera y cuarta hilera en el material de la laguna Las Garzas mientras que en *G. turgidum* los ganchos de la cuarta hilera son menores con respecto a los de las 3 hileras precedentes.

Las AdvL₃ de *Gnathostoma* sp. I se diferencian de las de *G. lamothei* (Gaspar- Navarro et al., 2013) y *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas, 1991) en el tamaño del cuerpo, ya que son más pequeñas; además, presentan menor cantidad promedio de ganchos en las hileras del bulbo cefálico. Finalmente, la posición del poro excretor se traslata con la de *Gnathostoma* sp. II, y es diferente de *G. lamothei* y *G. binucleatum* (tabla 1).

Los fragmentos de gen amplificados, ITS-2 (496 pb) y COI (694 pb), se encuentran disponibles en el GenBank con número de acceso PQ149241 y PQ141296, respectivamente.

Los primeros reportes del material que describimos en este trabajo fueron realizados por Almeyda-Artigas et al. (2000a, b). Las secuencias del ITS2 del DNA ribosomal de las AdvL₃ obtenidas experimentalmente de *D. marsupialis* por estos autores fueron nombradas como *Gnathostoma* sp. III, y de acuerdo con ellos, no fueron distintas a las de *G. turgidum*, no obstante las diferencias morfológicas observadas ahora.

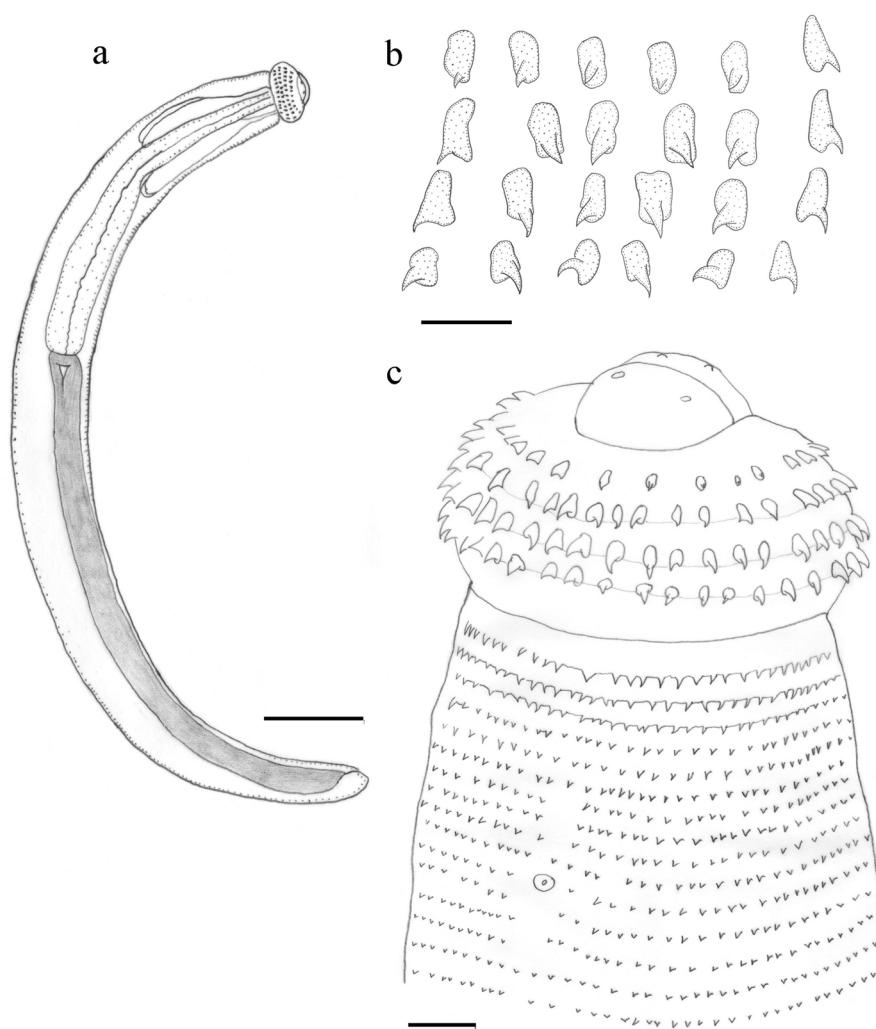


Figura 6. *Gnathostoma* sp. I. a) Larva de tercer estadio avanzado; b) ganchos en las hileras del bulbo cefálico; c) extremo anterior del cuerpo. Escala de las barras, a = 200 μ m, b y c = 10 μ m.

Gnathostoma sp. I (fig. 8)

Larva de tercer estadio temprano. Descripción basada en la observación de 3 larvas envueltas en un quiste. Longitud del cuerpo 494.90-676.20 (563.06 ± 99.36 ; 3) y 225.40-380.18 (314.56 ± 80.03 ; 3) del esófago. El esófago cubre el 45.54-73.81% (56.45 ± 15.20 ; 3) de la longitud del cuerpo. Cuatro sacos cervicales 223.21 (n = 1) ocupan 43.33% del largo del esófago. Bulbo cefálico con 4 hileras transversales de ganchos 29-33 (30.67 ± 2.08 ; 3), 29-36 (32.33 ± 3.51 ; 3), 31-38 (35.00 ± 3.61 ; 3) y 37-45 (39.67 ± 4.62 ; 3), respectivamente.

Resumen taxonómico

Localidad: laguna Las Garzas, San Francisco Ixhuatán, Oaxaca.

Hospedero: *Dormitator latifrons* (Eleotridae).

Sitio de infección: musculatura.

Parámetros de infección: prevalencia 2.8%, IP 3.0, AP 0.08.

Depósito de especímenes: CNHE 11826.

Comentarios taxonómicos

Las larvas presentan características propias de tercer estadio temprano (EaL₃) por el tamaño del cuerpo (563) y la forma de los ganchos (fig. 8b). Esta fase se desarrolla en copépodos y no existe registro de EaL₃ enquistadas en la musculatura de los segundos hospederos intermedios como las que aquí se documentan. No pudo ser recuperado material molecular de las larvas.

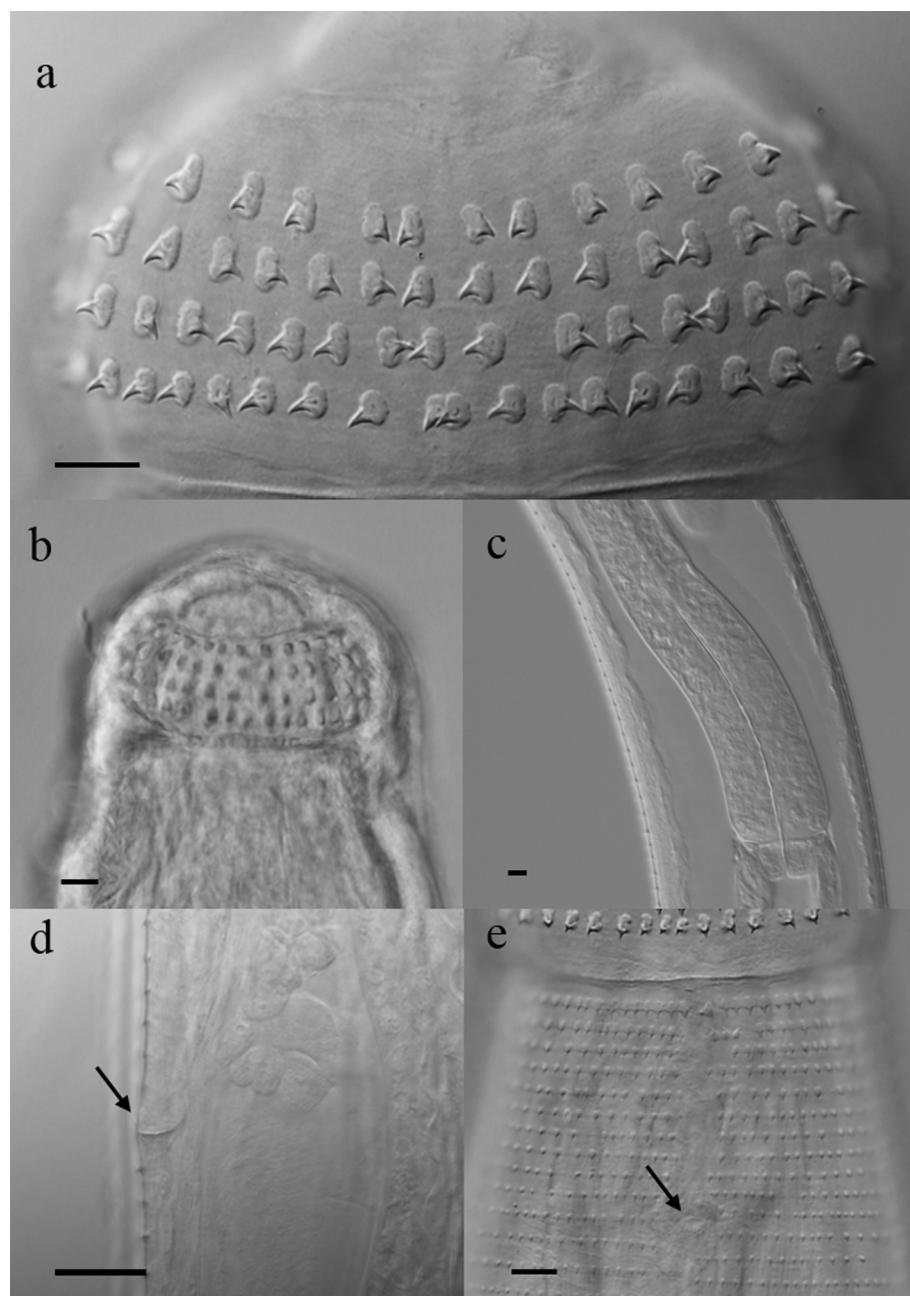


Figura 7. Larva de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. I. a) Bulbocefálico con 4 hileras de ganchos; b) capsula; c) intersección esófago-intestino; d) vista lateral del poro excretor; e) vista frontal de la papila cervical. Escala de la barra = 10 μ m.

Gnathostoma lamothei Bertoni-Ruiz, García-Prieto, Osorio-Sarabia y León-Règagnon (2005) (fig. 9)

Larva de tercer estadio avanzado. La siguiente descripción está basada en la observación de 3 larvas. El cuerpo mide 1,879.44-1,928.64 ($1,906.36 \pm 24.9$) de largo y 245.28-260.76 (253.71 ± 7.8) de ancho. Cuatro

sacos cervicales se proyectan desde el inicio del cuerpo y cubren 53.83-66.37% (59.32 ± 6.4), con respecto a la longitud del esófago. Cuerpo cubierto totalmente de diminutas espinas dispuestas en hileras transversales de 209-240 (220 ± 17.3). Bulbocefálico 73.58-85.85 (81.48 ± 6.9) por 176.6-205 (192.61 ± 14.5) de largo y ancho,

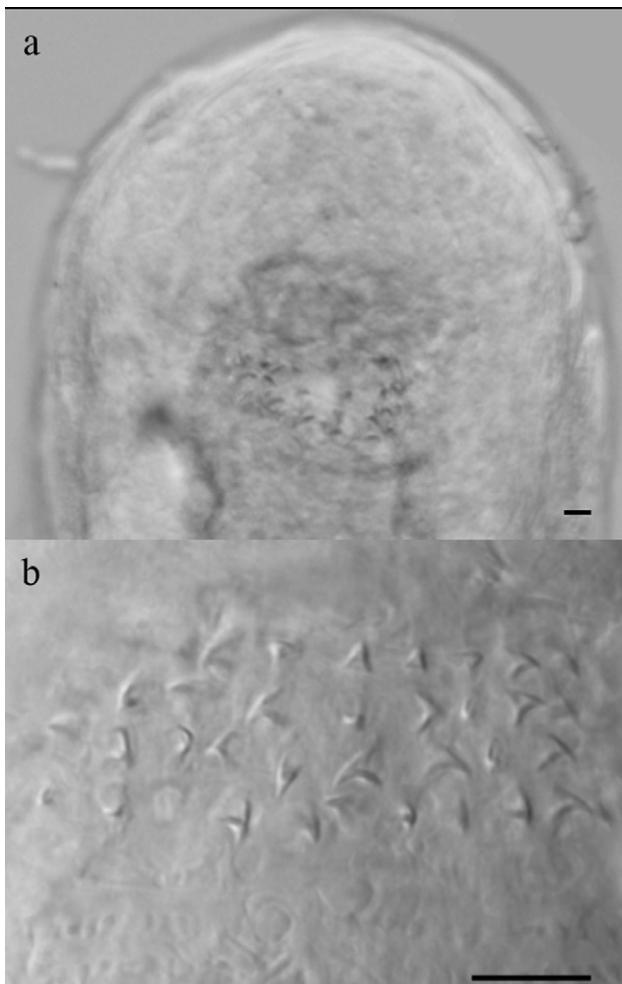


Figura 8. Larva de tercer estadio temprano de *Gnathostoma* sp. I enquistada en la musculatura de *Dormitator latifrons*. a) Bulbocefálico; b) ganchos en las hileras del bulbo cefálico. Escala de la barra = 10 μ m.

respectivamente. Bulbo cefálico con espinas dispuestas en 4 hileras transversales, 41-45 (42.33 ± 2.3), 43-45 (44.33 ± 1.2), 46-49 (47.33 ± 1.5) y 49-51 (50.00 ± 1.0), de la primera a la cuarta, respectivamente. Poro excretor ventral entre las hileras 20-23 (21.33 ± 1.5) del cuerpo. Dos papilas cervicales laterales, la izquierda entre las hileras 9-15 (11.33 ± 3.2) y la derecha 10-14 (11.33 ± 2.3 ; 3) del cuerpo. El esófago ocupa 38.48-42.51% (40.47 ± 2.0) del cuerpo, en promedio abarca 57% del ancho a la altura de la intersección esófago-intestino. Dos papilas caudales laterales, la izquierda a 130-144 (137.33 ± 7.0) hileras del cuerpo y la derecha a 123-149 (136.67 ± 13.1). Primordio genital no observado. Ano subterminal, a 122.64 (n = 1) del extremo posterior.

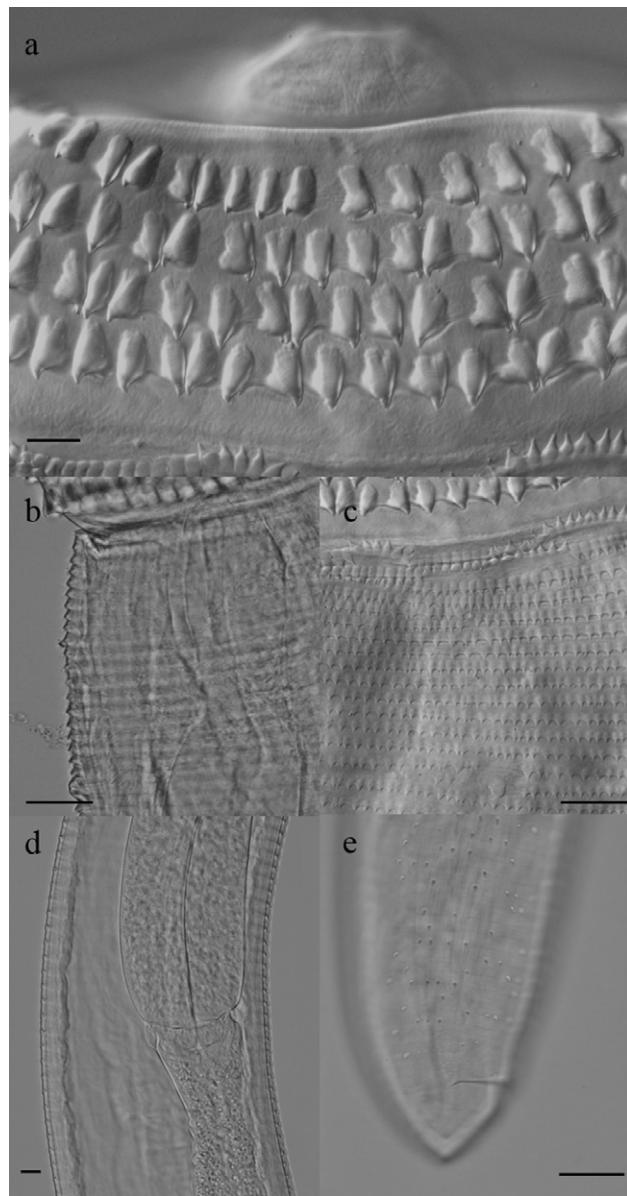


Figura 9. Larva de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma lamothei*. a) Vista lateral del bulbo cefálico; b) vista lateral del poro excretor; c) vista frontal de la papila cervical; d) intersección esófago-intestino; e) cola. Escala de la barra = 25 μ m.

Resumen taxonómico

Localidad: río Ostuta.
Hospedero: excreta de *Lontra longicaudis* (Mustelidae).
Prevalencia: (1/20) 5.0%.
Otros hospederos: musculatura de *Rhamdia guatemalensis* (Heptapteridae).
Depósito de especímenes: CNHE 11160.

Comentarios taxonómicos

La AdvL₃ de *G. lamothei* ha sido descrita únicamente con datos morfométricos a partir de hospederos infectados experimentalmente (Gaspar-Navarro et al., 2013). Ha sido identificada en 2 registros, a partir de datos sobre la cantidad de ganchos de una larva obtenida de *Monopterus albus* de agua abiertas de Florida en EUA (Cole et al., 2014), y el otro con datos moleculares de AdvL₃ obtenidas de *Gobiomorus dormitor* en Tabasco, México (Hernández-Gómez et al., 2010). La presente investigación describe por primera vez a la AdvL₃ de *G. lamothei* a partir de hospederos infectados de manera natural, descripción que coincide con la obtenida de infecciones experimentales (Gaspar-Navarro et al., 2013), pero difiere con la larva de Florida (Cole et al., 2014) por el menor número de ganchos, los datos taxonómicos de esta larva son más parecidos a *G. turgidum*, pero identificada con marcadores moleculares como *G. lamothei* (tabla 1). En la presente investigación, no pudo ser recuperado material molecular de las larvas por el método de fijación de las excretas de nutria usando formaldehído.

Gnathostoma sp. II (fig. 10).

Larva de tercer estadio avanzado. Descripción basada en la observación de 3 larvas. Larvas con fluido blastocelómico rojo. Cuerpo 1,918.80-1989.5 × 137.36-144.72 de largo y ancho, respectivamente. Presenta 197-210 hileras transversales de espinas en todo el cuerpo. Bulbo cefálico 61.32-80.94 (67.86 ± 11.3) × 117.73-116.79 (134.90 ± 27.6), de largo por ancho, respectivamente. Cuatro hileras transversales de ganchos en el bulbo cefálico 33-37 (34.33 ± 2.3; 3), 35-43 (38.00 ± 4.4), 38-43 (40.67 ± 2.5), 41-47 (44.67 ± 3.2), de la primera a la cuarta, respectivamente. Poro excretor ventral entre las 17-25 (20.33 ± 4.2) hileras del cuerpo. Dos papilas cervicales laterales en la porción anterior del cuerpo, la derecha 10-15 (12.00 ± 2.6) y la izquierda 10-16 (12 ± 3.5), en las hileras de espinas del cuerpo. El esófago abarca 34.9-38.5% del total del cuerpo y cubre 58.9-59.3% del ancho del cuerpo, en la intersección esófago-intestino. Presenta 4 sacos cervicales, en promedio cubren 42.1-44.7% del largo del esófago. Primordio genital en 68.0-82.3% del cuerpo. Papilas caudales no observadas. Ano subterminal, a 29.43-34.34 del extremo posterior.

Resumen taxonómico

Localidad: río Ostuta, San Francisco Ixhuatán, Oaxaca.

Hospedero: *Synbranchus marmoratus* (Synbranchidae)

Otros hospederos: *Rhamdia guatemalensis* (Heptapteridae).

Sitio de infección: musculatura.

Depósito de especímenes: CNHE 11708, 11709.

Comentarios taxonómicos

Las AdvL₃ de *Gnathostoma* sp. II son diferentes a las de *Gnathostoma* sp. I descritas en este trabajo, *G. turgidum* (Mosqueda-Cabrera et al., 2009, 2023), *G. lamothei* (Gaspar-Navarro et al., 2013) y *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas, 1991) en la forma y tamaño de los ganchos de las 4 hileras del bulbo cefálico; además, presentan ganchos más grandes, tanto en la base como en la hoja; son diferentes a *Gnathostoma* sp. I y *G. turgidum* por la mayor cantidad de ganchos en las hileras del bulbo cefálico y por el mayor tamaño del cuerpo (tabla 1); en este aspecto, son más pequeñas que *G. binucleatum* y *G. lamothei*, y diferentes a estas especies en la ubicación del poro excretor (tabla 1).

Los fragmentos de gen amplificado ITS-2 (367 pb), se encuentra disponible en el GenBank con número de acceso OR428675 (ITS-2) y pertenece al cuerpo (sin el bulbo cefálico) de una de las AdvL₃ (*Gnathostoma* sp. II) del presente estudio. El análisis molecular y filogenético sugiere que *Gnathostoma* sp. II representa una especie distinta; no obstante, el escaso material disponible imposibilita erigirla como especie nueva.

Discusión

Los ciclos de vida complejos como el que presentan las especies del género *Gnathostoma* determinan que su estudio sea fragmentado y no se tenga claridad en muchos aspectos. Esto es importante ya que la gnathostomiasis humana es una enfermedad parasitaria con alta incidencia principalmente en Asia y en Latinoamérica. En México, se ha demostrado que la especie causante de esta parasitosis humana es *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas 1991; Alvarez-Guerrero y Alba-Hurtado, 2007); sin embargo, es necesario conocer con mayor detalle los ciclos de vida de las otras 2 especies distribuidas en el país debido a su potencial zoonótico. Mosqueda-Cabrera et al. (2009) descartaron el papel de los peces como hospederos intermedios de *G. turgidum* debido a la falta de hallazgos naturales; sin embargo, recientemente, la AdvL₃ de esta especie fue aislada de la musculatura de peces (*Gobiomorus dormitor*) (Mosqueda-Cabrera et al., 2023), confirmando su potencial zoonótico. Los autores resaltaron la posibilidad de que en los estudios sobre gnatostomosis en peces, las larvas de *G. turgidum*

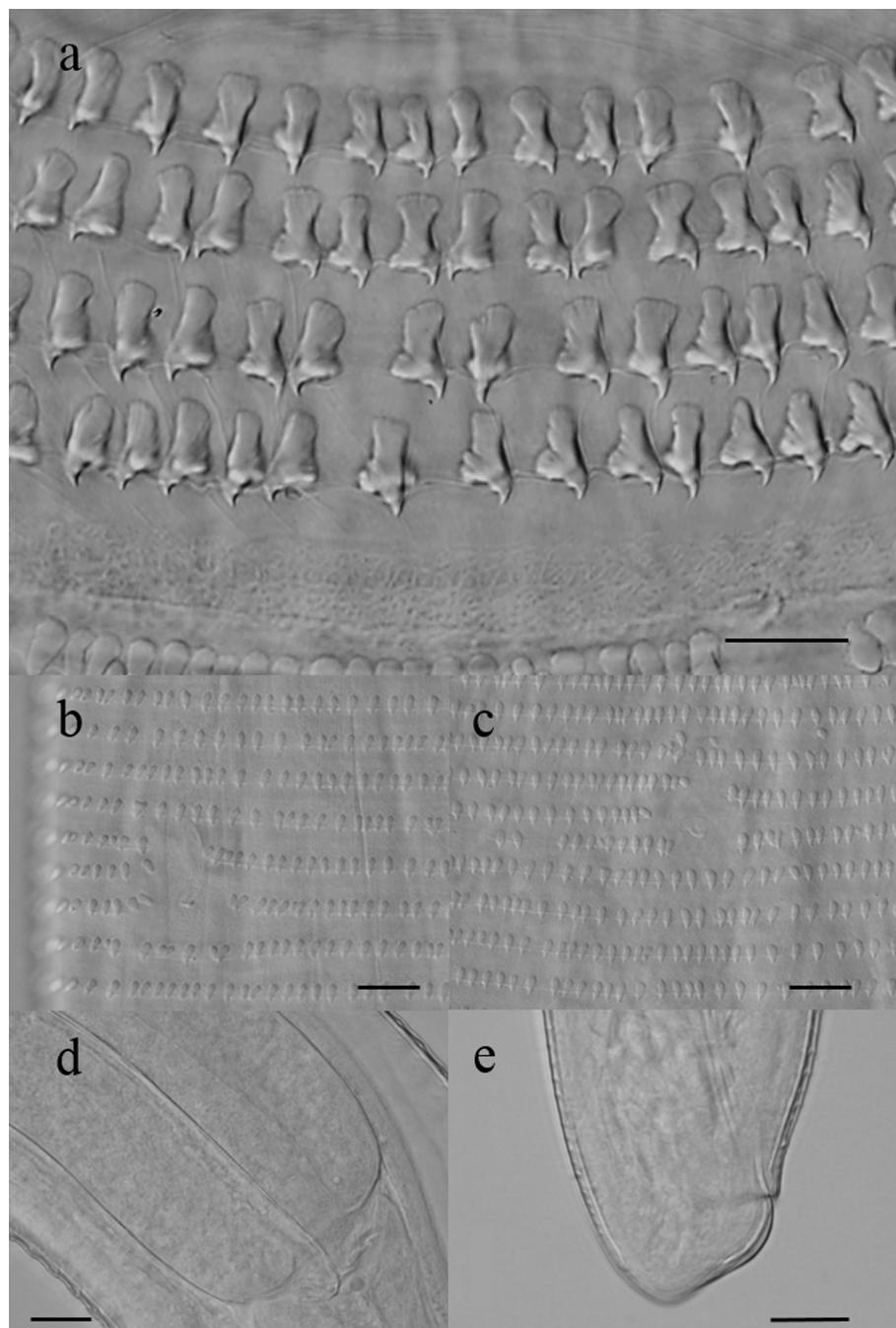


Figura 10. Larva de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. II. a) Vista frontal del bulbocefálico; b) poro excretor; c) papila cervical; d) intersección esófago-intestino; e) cola. Escala de la barra = 20 μm .

pasaran desapercibidas por su tamaño y método de búsqueda (observación a contraluz de la musculatura entre 2 vidrios). Este también sería el caso de las larvas *Gnathostoma* sp. I, colectadas en el río Ostuta, ya que son aún más pequeñas, y solo fueron encontradas

usando un microscopio estereoscópico; en consecuencia, es importante valorar la participación de éstas en la gnatostomiasis humana.

Entre las especies de *Gnathostoma*, existe un complejo infectando diferentes especies de hospederos

muy emparentados filogenéticamente. Se conoce que el mapache (*Procyon lotor*) es parasitado por 2 especies de *Gnathostoma* con alta especificidad hospedatoria: *G. lamothei* asociado a *Procyon lotor hernandezii* Wagler, 1831 y *G. procyonis* a la subespecie *Procyon lotor lotor* Linnaeus, 1758. Las formas adultas de ambas especies son muy parecidas entre sí, con diferencias únicamente en el tamaño de las espículas, el número de puntas de las escamas transversales del cuerpo en la región posterior al bulbocefálico y a la altura de la papila, así como en la ausencia de escamas en la mitad posterior de cuerpo (presencia de “bosses”) en *G. lamothei* (Bertoni-Ruiz et al., 2005). Por otra parte, el género *Didelphis* Linnaeus, 1758 comprende 6 especies de marsupiales que se distribuyen en toda América (Gardner, 1973); entre éstas, *D. marsupialis* Linnaeus, 1758 es una especie con distribución neotropical y *D. virginiana* Kerr, 1792 con una neártica (Dias y Perini, 2018); ambas están presentes en México y se han reportado como hospederos definitivos de *G. turgidum* (Pérez-Álvarez et al., 2008). La evidencia de un complejo de diferentes especies de *Gnathostoma* en las 2 subespecies de prociónidos sugeriría la hipótesis de que cada especie de marsupial pueda actuar como hospedero definitivo de especies diferentes de *Gnathostoma*; *D. virginiana* para *G. turgidum* y *D. marsupialis* para el material descrito en este trabajo, ya que ambas especies son muy parecidas entre sí, y sus hospederos están estrechamente relacionados filogenéticamente. No obstante, como se señaló anteriormente, consideramos que es necesario obtener más información de campo y laboratorio para apuntalar esta hipótesis.

Agradecimientos

Agradecemos profundamente la colaboración de Luis García Prieto (CNHE) durante la colecta de peces y helmintos, además, por el préstamo de especímenes y literatura. A Edgar Uriel Montes de Oca y Andrés Velázquez Brito de la CNHE por su valiosa ayuda con los datos moleculares. A Gerardo Torres Carrera por la lectura crítica del manuscrito. Agradecemos el servicio del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM, como parte del Laboratorio Nacional de Biodiversidad, y en particular el apoyo técnico de A. Jiménez-Marín, N. López y L. Márquez.

Referencias

- Almeyda-Artigas, R. J. (1991). Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* n. sp. (Nematoda: Spirurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuícolas y oligohalinos como vectores de la gnathostomiasis humana en la cuenca baja del río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. *Anales del Instituto Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 18, 137–155.
- Almeyda-Artigas, R. J., Bargues, M. D. y Mas-Coma, S. (2000a). ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology*, 86, 537–544. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0537:irsogs\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0537:irsogs]2.0.co;2)
- Almeyda-Artigas, R. J., Bargues, M. D. y Mas-Coma, S. (2000b). rDNA of *Gnathostoma* species (Nematoda): ITS-2 microsatellites and 5.8 S gene secondary structure. *Research and Reviews in Parasitology*, 60, 51–56.
- Almeyda-Artigas, R. J., Mosqueda-Cabrera, M. Á. y Sánchez-Núñez, E. (2010). Precocity of *Gnathostoma turgidum* in naturally infected four-eyed opossum *Philander opossum pallidus* from Temascal, Oaxaca, Mexico. *Parasitology Research*, 106, 439–443. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1682-8>
- Álvarez-Guerrero, C. y Alba-Hurtado, F. (2007). Estuarine fish and turtles as intermediate and paratenic hosts of *Gnathostoma binucleatum* in Nayarit, Mexico. *Parasitology Research*, 102, 117–122. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0738-x>
- Bertoni-Ruiz, F., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D. y León-Règagnon, V. (2005). A new species of *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae), parasite of *Procyon lotor hernandezii* from Mexico. *Journal of Parasitology*, 91, 1143–1149. <https://doi.org/10.1645/ge-516r.1>
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M. y Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*, 83, 575–583.
- Cole, R. A., Choudhury, A., Nico, L. G. y Griffin, K. M. (2014). *Gnathostoma spinigerum* in live Asian swamp eels (*Monopterus* spp.) from food markets and wild populations, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 634–642. <https://doi.org/10.3201/eid2004.131566>
- Conagua (Comisión Nacional del Agua). (2021). *Programa Hídrico Regional 2021-2024. Región Hidrológico-Administrativa XI Frontera Sur. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua*.
- Dias, C. A. y Perini, F. A. (2018). Biogeography and early emergence of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia, Mammalia). *Zoologica Scripta*, 47, 645–654.
- Díaz-Camacho, S. P., Delgado-Vargas, F., Willms, K., de la Cruz-Otero, M. C., Rendón-Maldonado, J. G., Robert, L. et al. (2010). Intrahepatic growth and maturation of *Gnathostoma turgidum* in the natural definitive opossum host, *Didelphis virginiana*. *Parasitology International*, 59, 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.04.004>
- García-Márquez, L. J., Lamothe-Argumedo, R., Osorio-Sarabia, D., García-Prieto, L. y León-Règagnon, V. (2009). Morphological and molecular identification of *Gnathostoma binucleatum* (Nematoda: Gnathostomatidae) advanced third stage larvae (AdvL3) in the state of Colima, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80, 867–870. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2009.003.157>

- Gardner, A. L. (1973). The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. *Special Publications of the Museum Texas Tech University*, 4, 1–81.
- Gaspar-Navarro, J., Almeyda-Artigas, R. J., Sánchez-Miranda, E., Carranza-Calderón, L. y Mosqueda-Cabrera, M. A. (2013). Description of advanced third-stage larvae of *Gnathostoma lamothei* Bertoni-Ruiz et al. 2005 (Nematoda: Gnathostomatidae) from experimental hosts and contributions to its life cycle. *Parasitology Research*, 112, 169–175. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3122-4>
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. y DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hernández-Gómez, R. E., Martínez-Salazar, E. A., López-Jiménez, S. y León-Règagnon, V. (2010). Molecular identification of the advanced third-stage larvae (AdvL3) of *Gnathostoma lamothei* in Tabasco, Mexico. *Parasitology International*, 59, 97–99. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.008>
- Maddison, W. P. y Maddison, D. R. (2019). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, version 3.6. 2018.
- Messing, J. (1993). M13 cloning vehicles. Their contribution to DNA sequencing. *Methods in Molecular Biology*, 23, 9–22. <https://doi.org/10.1385/0-89603-248-5:9>
- Miyazaki, I. (1954). Studies on *Gnathostoma* occurring in Japan (Nematoda: Gnathostomidae). II. Life history of *Gnathostoma* and morphological comparison of its larval forms. *Kyushu Memoirs of Medical Science*, 5, 123–39.
- Mosqueda-Cabrera, M. Á., Sánchez-Miranda, E., Carranza-Calderón, L. y Ortiz-Nájera, H. E. (2009). Finding advanced third-stage larvae of *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 in Mexico from natural and experimental host and contributions to the life cycle description. *Parasitology Research*, 104, 1219–1225. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1318-4>
- Mosqueda-Cabrera, M. Á., Desentis-Pérez, D. L., Padilla-Bejarano, T. A. y García-Prieto, L. (2023). Possible zoonotic implications of the discovery of the advanced third stage larva of *Gnathostoma turgidum* (Spirurida: Gnathostomatidae) in a Mexican fish species. *Helminthologia*, 60, 112–116. <https://doi.org/10.2478/helm-2023-0011>
- Pérez-Álvarez, Y., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D., Lamothe-Argumedo, R. y León-Règagnon, V. (2008). Present distribution of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in México. *Zootaxa*, 1930, 39–55. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1930.1.3>
- Prosser, S. W., Velarde-Aguilar, M. G., León-Règagnon, V. y Hebert, P. D. (2013). Advancing nematode barcoding: a primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources*, 13, 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12082>
- Rambaut, A. (2006). Figtree. Tree figure drawing tool. Version 1.4. 2. Institute of Evolutionary Biology.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S. et al. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>