

# Morfometría y diagnóstico molecular de larvas de *Anisakis* (Nematoda: Ascaridida) en *Merluccius gayi* (Chordata: Gadiformes) y *Dosidicus gigas* (Mollusca: Teuthida) en la región del Biobío, Chile

Morphometry and molecular diagnosis of *Anisakis* (Nematoda: Ascaridida) in *Merluccius gayi* (Chordata: Gadiformes) and *Dosidicus gigas* (Mollusca: Teuthida) in Biobío Region, Chile

Luisana Lugo-Pérez<sup>1,2,3\*</sup>, Iván Vera-Escalona<sup>1,3</sup>, Mario George-Nascimento<sup>1,3</sup>,  
Antonio Brante<sup>1,3</sup> y Maribet Gamboa<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción, Chile

<sup>2</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Mención Biodiversidad y Biorecursos, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción, Chile

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Biodiversidad y Ambientes Sustentables (CIBAS), Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción, Chile

\*Autor corresponsal: [luisana.lugo@ucsc.cl](mailto:luisana.lugo@ucsc.cl)

**Abstract.-** Species of the genus *Anisakis* (Nematoda: Anisakidae) are indirect life-cycle marine parasites. Planktonic crustaceans serve as first intermediate hosts, while fish and cephalopods as second intermediate or paratenic hosts, and finally the cycle is completed in cetaceans, marine mammals that are the main definitive hosts of the genus. In the life cycle, *Anisakis* larvae can be ingested by humans as accidental hosts, which can cause anisakiasis, a zoonosis acquired through the consumption of raw or marinated fish and cephalopods. These nematodes have a cosmopolitan distribution; however, their diversity has been poorly studied in the southern hemisphere. Therefore, diversity of *Anisakis* spp. larvae present in two host species in Chile was evaluated by combining morphometric and genetic analysis. For this purpose, *Anisakis* spp. larvae were collected from the abdominal cavity of hake *Merluccius gayi* and the Humboldt squid *Dosidicus gigas* from fishing ports in the Biobío Region, Chile. Morphometric characterization of *Anisakis* spp. larvae consisted of measuring the length of the esophagus, esophageal ventricle, tail, total length and maximum body width. The nuclear ITS (ITS1- ITS2) and mitochondrial COX2 molecular regions were used for genetic analysis. Morphometric results revealed that *Anisakis* larvae extracted from *D. gigas* were significantly longer than those collected from *M. gayi*, suggesting high host-dependent phenotypic variability. Molecular and phylogenetic analyses determined the presence of *Anisakis pegreffii* in both host, however, demonstrated low genetic differentiation and nucleotide diversity among sequences, indicating low genetic variability for the data set. This work constitutes the first molecular record of *A. pegreffii* in intermediate / paratenic hosts from the coast of Chile.

**Key words:** Molecular taxonomy, comparative genetics, phylogenetics, *Anisakis pegreffii*

**Resumen.-** Las especies del género *Anisakis* (Nematoda: Anisakidae) son parásitos marinos con ciclo de vida indirecto. Los crustáceos planctónicos intervienen como primeros hospedadores intermediarios, mientras que peces y cefalópodos intervienen como segundos hospedadores intermediarios o paraténicos, finalmente el ciclo se cierra en los cetáceos, mamíferos marinos que son los principales hospedadores definitivos del género. En el ciclo de vida, las larvas de *Anisakis* pueden ser ingeridas por el hombre interviniendo como huésped accidental, lo que puede ocasionar anisakiasis, una zoonosis adquirida a través del consumo de peces y cefalópodos crudos o marinados. Estos nemátodos tienen una distribución cosmopolita, sin embargo, su diversidad ha sido escasamente estudiada en el hemisferio Sur. Por tanto, se evaluó la diversidad de las larvas de *Anisakis* spp., presentes en dos especies de hospederos de Chile, combinando el análisis morfométrico y genético. Para ello, se recolectaron larvas de *Anisakis* spp. en la cavidad abdominal de la merluza *Merluccius gayi* y el calamar de Humboldt *Dosidicus gigas*, procedentes de terminales pesqueros de la región del Biobío, Chile. La caracterización morfométrica de las larvas de *Anisakis* spp., consistió en la medición de la longitud del esófago, ventrículo esofágico, cola, longitud total y ancho máximo del cuerpo. Para los análisis genéticos se usó la región molecular nuclear ITS (ITS1-ITS2) y mitocondrial COX2. Los resultados morfométricos revelaron que las larvas de *Anisakis* extraídas de *D. gigas* fueron significativamente de mayor longitud que las recolectadas en *M. gayi*, sugiriendo una alta variabilidad fenotípica hospedador-dependiente. Los análisis moleculares y filogenéticos determinaron la presencia de *Anisakis pegreffii* en ambos hospedadores, sin embargo, demostraron una baja diferenciación genética y diversidad nucleotídica entre las secuencias, indicando una escasa variabilidad genética para el conjunto de datos. Este trabajo constituye el primer registro molecular de *A. pegreffii* en hospedadores intermediario o paraténicos de la costa de Chile.

**Palabras clave:** Taxonomía molecular, genética comparativa, filogenética, *Anisakis pegreffii*



## INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Anisakis* Dujardin, 1845 son nemátodos parásitos cosmopolitas en sistemas acuáticos marinos (Irigoitía *et al.* 2018). De nueve especies descritas, destacan algunas por su importancia zoonótica (Guardone *et al.* 2018, Mattiucci *et al.* 2018) como *A. simplex* y *A. pegreffii*, cuya distribución en estos ecosistemas se encuentra estrechamente relacionada al ámbito ecológico de sus hospedadores definitivos (Gaglio *et al.* 2018, Mattiucci *et al.* 2018).

El ciclo vital de las especies de *Anisakis* comienza con la eclosión de huevos embrionados, expulsados a través de las heces de los cetáceos, hospedadores definitivos. En el ecosistema marino se desarrollan dentro del huevo una larva de primer (L1) y segundo estadio (L2), posteriormente esta última eclosiona y es ingerida por pequeños crustáceos (hospedador intermediario); organismos en los cuales la larva muda al tercer estadio (L3), y crece hasta que un pez o cefalópodo depreda a los crustáceos (segundo hospedador intermediario o paraténico).

Cuando peces y cefalópodos, depredan sobre estos crustáceos, o adquieren el estadio L3 de vida libre, intervienen como segundos hospedadores intermediarios o paraténicos. Éstos hospedadores acumulan los parásitos adquiridos a través de sucesivas infecciones (Levsen & Berland 2011), motivo por el cual, la abundancia de los parásitos resulta mayor en especies piscívoras (Anderson 2000). Una vez ingerida por los hospedadores, las larvas se encapsulan en la masa visceral e incluso en la musculatura (Levsen & Berland 2011, Mehrdana *et al.* 2014), y pasarán a través de transmisión trófica a otro hospedador intermediario / paraténico o definitivo. Finalmente, el ciclo de biológico de *Anisakis* spp, se completa cuando los cetáceos consumen presas de niveles tróficos inferiores y estas se encuentran parasitadas (*e.g.*, peces, cefalópodos); la L3 ingresa en las cámaras gástricas y se adhiere a la mucosa, donde muda a la cuarta etapa (L4), cerrando el ciclo de vida cuando maduran reproductivamente (Mladineo *et al.* 2023).

Las larvas de *Anisakis* spp. pueden ocasionar en la población humana una zoonosis conocida como anisakiasis, a través de la ingesta de estados larvales presentes en la musculatura de peces o cefalópodos (hospedadores intermediarios) que se consumen crudos o con poca cocción (Mattiucci *et al.* 2018). La notificación de esta zoonosis parasitaria ha aumentado significativamente debido a la globalización gastronómica (incremento del consumo de pescado semicrudo), el crecimiento de los mercados internacionales, y la integración de mejores herramientas de

diagnóstico. Esta zoonosis puede presentarse de dos formas: no invasiva, cuando el estado larval se aloja en el intestino, e invasiva, en el caso que las larvas penetren la mucosa gástrica o intestinal. Los síntomas incluyen, epigastralgia, náuseas, vómitos, y dolor abdominal, y pueden estar acompañados de urticaria crónica, rinitis, conjuntivitis, dermatitis de contacto, asma y anafilaxia (Mattiucci *et al.* 2017a).

A pesar de que los ejemplares adultos de las especies de *Anisakis* pueden identificarse de manera efectiva a través de los caracteres sexuales de los machos (Mattiucci *et al.* 2018), éstos caracteres se encuentran ausentes en los estados larvales, lo que conlleva a que la identificación se base únicamente en algunas de sus características morfológicas, clasificándolas en dos tipos: *Anisakis* tipo I y II (Berland 1961). La larva tipo I tiene un ventrículo largo (0,50-1,5 mm), y la unión con el intestino es de forma oblicua, mientras que la larva tipo II, la longitud del ventrículo es menor (0,22-0,75 mm) y la unión con el intestino es recta (Berland 1961, Quiazon *et al.* 2008, Murata *et al.* 2011). Sin embargo, el uso exclusivo de caracteres morfológicos, sumados a la alta plasticidad morfométrica reportada para la familia Anisakidae (George-Nascimento & Llanos 1995), durante muchos años generó una serie de controversias en la taxonomía de estos parásitos (Buchmann & Mehrdana 2016).

En Chile, larvas de *Anisakis* se han registrado al menos en 37 especies marinas (Muñoz & Olmos 2008), muchas de ellas de importancia comercial, como *Thyrssites atun* (sierra) (Torres & González 1978), *Brama australis* (reineta) (George-Nascimento *et al.* 2002), *Trachurus murphyi* (jurel) (George-Nascimento & Arancibia 1992), y *Scomber japonicus* (caballa) (Rodríguez *et al.* 2000). Por otro lado, adultos de *Anisakis* se han registrado en especies de cetáceos tales como *Cephalorhynchus eutropia* (delfín chileno), *Phocoena spinipinnis* (marsopa espinosa), *Balaenoptera borealis* (ballena sei), *B. edeni* (ballena de Bryde) y *B. physalus* (ballena fin) (Muñoz & Olmos 2008). Desde una perspectiva de salud pública, la zoonosis reportada en Chile está asociada principalmente a larvas de *Pseudoterranova cattani*, (Rodríguez & George-Nascimento 2021) causante de la pseudoterranovosis orofaríngea, parasitosis vinculada al consumo de ceviche, pescado ahumado y sushi (Weitzel *et al.* 2015). Sin embargo, los registros de las especies *A. simplex* (s. s.) y *A. pegreffii* como agentes causales de anisakiasis en humanos (Mattiucci *et al.* 2018) en países como Japón (Umehara *et al.* 2007), Corea del Sur (Lim *et al.* 2015), Italia (Mattiucci *et al.* 2017a) y Croacia (Mladineo *et al.* 2017), implican la relevancia en la presencia de estados larvales de *Anisakis* spp. en los hospedadores de importancia económica y alimenticia.

Entre los hospedadores intermediarios o paraténicos de *Anisakis* spp. se encuentran la merluza *Merluccius gayi* (Guichenot, 1848) y el calamar *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835). En este sentido, diversos estudios se han enfocado en determinar la prevalencia de *Anisakis* spp. sobre ambas especies hospedadoras. Reportes del parasitismo en *M. gayi* se han registrado en la zona centro del país (George-Nascimento 1996), en la región de Coquimbo, Puerto Montt, Valparaíso (San Antonio), Biobío (Talcahuano; Oliva & Ballón 2002, Concepción, Madrid *et al.* 2016), y Maule (Talca; Silva *et al.* 2020, Muñoz-Caro *et al.* 2022). En *D. gigas*, este parásito se ha registrado en la plataforma continental del centro-sur de Chile (Pardo-Gandarillas *et al.* 2009, 2014) y en la costa de Arequipa, Perú (Céspedes *et al.* 2011).

La mayoría de estos reportes se han basado en la identificación morfológica de *Anisakis*, excepto por el enfoque molecular empleado por Muñoz-Caro *et al.* (2022) y Ebmer *et al.* (2020) en estados larvales extraídos de *Merluccius gayi*, *Thyrsites atun* y *Otaria flavescens* respectivamente; así como los reportes de Mattiucci *et al.* (2018) realizados en estados larvales y adultos de *A. pegreffii*, *A. berlandi*, y *A. ziphidarum* parasitando los cetáceos *Globicephala melas*, *Mesoplodon* sp. y *Ziphius cavirostris*, cetáceos varados en la costa sur de Chile. En la actualidad, no existen registros acerca del uso de herramientas moleculares para larvas de *Anisakis* spp. en *M. gayi* y *D. gigas*; lo cual sería útil para una identificación más confiable de estas larvas, ya que morfológicamente resultan indistinguibles a nivel de especie (Mattiucci & Nascetti 2007).

Con base en lo planteado, el uso de herramientas moleculares como la secuenciación de la región del espaciador interno transcrito (ITS1- ITS2) del ADN ribosómico nuclear (ARNr), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Umehara *et al.* 2007), la subunidad 2 de la citocromo oxidasa del gen mitocondrial (COX2) y el análisis de aloenzimas, han permitido diferenciar diez especies pertenecientes al género *Anisakis* en cuatro clados (Mattiucci *et al.* 2018).

El clado I, conformado por *A. berlandi*, *A. pegreffii* y *A. simplex* (s. s.) que generalmente se conocen como el complejo *A. simplex* (sl); mientras que en el clado II se ubican los taxones *A. ziphidarum* y *A. nascettii*. El Clado 3 incluye las especies *A. physeteris*, *A. paggiae* y *A. brevispiculata*. En tanto, *A. typica* representa el clado 4 (Mattiucci *et al.* 2018). Además, existen reportes de hibridación, resultante del cruce entre *A. pegreffii* y *A. simplex* (s. s.) (Abollo *et al.* 2003, Pekmezci *et al.* 2014, Mattiucci *et al.* 2018), así como entre *A. pegreffii* y *A. berlandi* (Bello *et al.* 2021). Estos clados han sido descritos como unidades filogenéticas distintas, disímiles en características ecológicas, ciclos de vida, preferencias de hospedadores (paraténicos y definitivos) y distribuciones zoogeográficas (Mattiucci & Nascetti 2007, Mattiucci *et al.* 2018).

Por tanto, es necesario ampliar el conocimiento sobre la biodiversidad de las especies parásitas de nemátodos (Aibinu *et al.* 2019, Fiorenza *et al.* 2020). El objetivo de esta investigación fue: (i) determinar la identidad taxonómica de larvas de tercer estadio de *Anisakis* spp. presentes en *M. gayi* y *D. gigas* a través de una caracterización morfométrica y molecular basada en análisis filogenéticos e índices genéticos; así como, (ii) proporcionar información sobre aspectos biológicos y ecológicos de las larvas de *Anisakis* presentes en la región del Biobío. La información generada ampliará los escasos conocimientos sobre la biodiversidad de *Anisakis* en el área estudiada, con la apertura a estudios epidemiológicos y de salud pública.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Entre agosto y septiembre del 2018 se recolectaron 3 ejemplares frescos de *M. gayi* y 5 de *D. gigas* en los terminales pesqueros de la región del Biobío, en la ciudad de Talcahuano (36°42'32,5"S-73°06'50,5"O) y San Vicente (36°43'27,2"S-73°07'54,3"O). Los especímenes fueron llevados al laboratorio de Ecología de Parásitos de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, donde se realizó la visceración. Posteriormente, se examina visualmente el hígado, estómago, intestino; en el caso particular de *M. gayi*, la musculatura se dividió en filetes epiaxiales e hipoaxiales, inspeccionados también visualmente en búsqueda de estadios larvales de *Anisakis*. Las muestras obtenidas de ambos hospedadores fueron tamizadas bajo chorro de agua a presión en un cilindro plástico con fondo de dos tamices de 0,5 y 0,33 mm de luz. Las larvas de *Anisakis* spp. obtenidas se enjuagaron con agua destilada y se transfirieron a cápsulas de Petri, donde a través de una lupa estereoscópica se identificaron los caracteres de interés para su caracterización morfométrica y posterior análisis genético utilizando un marcador nuclear (ITS1-ITS2) y uno mitocondrial (COX2).

### MORFOMETRÍA

La caracterización morfométrica de las larvas de *Anisakis* spp., extraídas de *M. gayi* y *D. gigas*, se realizó midiendo la longitud del esófago, longitud del ventrículo esofágico, longitud de la cola, largo total y ancho máximo del cuerpo (Berland 1961), a través de un microscopio de 40X/100X equipado con una cámara Leica®. La longitud corporal de los parásitos se ilustró mediante la técnica de cámara lúcida, para posteriormente obtener su medición a través de un curvómetro, y finalmente convertir los valores a mm. La variabilidad morfométrica fue comparada entre las especies de hospedadores por medio de un análisis multivariado

permutado de la varianza (PERMANOVA), después de 9999 permutaciones, utilizando el programa estadístico PRIMER V6 (Clarke & Gorley 2006) y un análisis de componentes principales (ACP) usando el paquete de vegan (Oksanen *et al.* 2012) en R v. 3.3 (R Core Team 2014).

### IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La extracción del ADN genómico de los especímenes de *Anisakis* spp., recolectados de ambos hospedadores, se realizó con el kit E.Z.N.A.® Tissue DNA (OMEGA bio-Tek, Norcross, GA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dos regiones genómicas fueron amplificadas. Para la región nuclear ITS (ITS1-ITS2), se utilizaron los cebadores NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') y NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (Zhu *et al.* 1998). Las condiciones de amplificación del programa de PCR fueron: 10 min (95 °C), 35 ciclos de 30 s (95 °C), 30 s (58 °C) y 75 s (72 °C), seguidos de un alargamiento final de 15 min (72 °C). Para el análisis del gen mitocondrial COX2, se emplearon los cebadores 211 (5'-TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3') y 210 (5'-CACCAACTCTTAAATTATC-3') (Nadler & Hudspeth 2000) bajo las siguientes condiciones de PCR: 8 min (95 °C), luego 40 ciclos de 40 s (96 °C), 40 s (45 °C) y 40 s a (72 °C), seguido de un alargamiento final de 10 min a 72 °C. La visualización de los productos resultantes se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR y un transluminador UV. Posteriormente, las muestras fueron enviadas a secuenciación en la empresa AUSTRAL-Omics (Universidad Austral de Chile, Chile).

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el programa Geneious Prime 2014 (v7.1.3) (Biomatters, Inc)<sup>1</sup>. La identificación taxonómica de las larvas fue realizada con una búsqueda de homología entre las secuencias disponibles en la base de datos, empleando el algoritmo BLAST con > 99% de similaridad en GenBank (Altschul *et al.* 1990).

Adicionalmente, con el fin de evaluar la variabilidad genética de las secuencias obtenidas, se realizó un análisis comparativo. Se extrajeron secuencias procedentes de diferentes áreas geográficas, y tipos de hospedadores (intermediario / paraténico y definitivo) de la base de datos GenBank. Se seleccionaron un total de 78 secuencias para el gen ITS, y 84 para el gen mitocondrial COX2. El alineamiento múltiple (secuencias obtenidas y extraídas) se realizó con el

algoritmo MUSCLE, disponible en el paquete del programa MEGA v.10 (Kumar *et al.* 2016). Los valores de distancia genética intraespecífica se calcularon utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (K2P), mediante el programa MEGA. La diversidad genética en términos de número de haplotipos (*h*), diversidad de haplotipos (Hd), y diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) se obtuvieron utilizando el programa DnaSP 6.12 (Rozas *et al.* 2017). Adicionalmente, se determinó la distribución de haplotipos, así como visualización de sus relaciones, usando el programa TCS (Clement *et al.* 2000), implementado en el programa PopART (Leigh & Bryant 2015). El método TCS calcula distancias por pares entre secuencias y se basa en la parsimonia estadística para encontrar las conexiones entre secuencias (Clement *et al.* 2000). El método TCS elimina las secuencias con más datos faltantes que otras y posteriormente completa los sitios con espacios o caracteres no correspondientes al alineamiento original.

### ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para determinar posibles relaciones filogenéticas entre las especies de *Anisakis* de las secuencias obtenidas y las disponibles en GenBank, se emplearon dos tipos de análisis, el análisis de Máxima Verosimilitud (ML) y el de aproximación de Inferencia Bayesiana (IB). ML se ejecutó en el programa IQ-Tree (Nguyen *et al.* 2015), con el modelo evolutivo General de Tiempo Reversible (GTR), seleccionado de manera predeterminada, y un análisis *bootstrap* de 1.000 réplicas de soporte  $\geq 70$  para los clados. La IB se obtuvo mediante el programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2005) con el algoritmo Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), con 2 corridas simultáneas de 4 cadenas, y una temperatura de 0,2 durante 7.000.000 generaciones, muestreando las Cadenas de Markov en intervalos de 1.000 generaciones, con un *burn-in* del 10% de las muestras y soporte > de 0,8 para los clados. La convergencia de los datos se examinó utilizando el programa Tracer (v 1.7) (Rambaut *et al.* 2018), comprobando el tamaño efectivo de muestreo (Effective Sampling Size, ESS), estadísticos básicos, y la distribución de los diferentes parámetros. El modelo evolutivo empleado para IB, se determinó utilizando la prueba de razón de probabilidad jerárquica (hLRT) implementada en el programa jModeltest 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2005), seleccionando de acuerdo al Criterio de Inferencia Bayesiana (IB; Posada & Buckley 2004) el modelo evolutivo GTR+I+G, para ambos genes. El programa FIGTREE (v.1.4.2)<sup>2</sup> se empleó para la representación de los árboles filogenéticos.

<sup>1</sup>Geneious Prime <[www.geneious.com](http://www.geneious.com)>

<sup>2</sup>FigTree <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>>

El análisis filogenético del gen ITS se enraizó con especies de los géneros *Anisakis* (*A. nascettii*, JQ912692; *A. brevispiculata*, JQ912694; *A. ziphidarum*, JN005767), *Ascaris* (*A. suum*, AB110023; FJ418786) y *Toxocara* (*T. canis*, AJ002435; FJ418788), tal como ha sido empleado anteriormente en estudios similares (Cavallero *et al.* 2011). Para el gen COX2 se seleccionaron secuencias del género *Contraecum* (*C. osculatum*, EU477206), *Pseudoterranova* (*P. ceticola*, DQ116435) y *Anisakis* (*A. typica*, DQ116427; *A. brevispiculata*, DQ116433; *A. simplex*, DQ116426; *A. ziphidarum*, DQ116430; *A. nascettii*, FJ685642) descritas anteriormente (Mattiucci *et al.* 2011).

## RESULTADOS

### MORFOMETRÍA DE LARVAS DE *ANISAKIS* SPP. EN *M. GAYI* Y *D. GIGAS*

El examen visual reveló que las larvas de *Anisakis* spp. extraídas de la masa visceral de ambos hospedadores (altamente infectados) estaban encapsuladas en una membrana o cutícula de color blanco a transparente que cubría la longitud total de los parásitos, plegándolos en forma de un espiral compacto. Se recolectaron un total de 17 larvas de *Anisakis* spp., 7 extraídas de *M. gayi* y 10 de *D. gigas*. Finalmente, el material obtenido fue caracterizado morfométricamente y fijado en etanol al 90% para posteriores análisis genéticos (debido a que no se recolectó el total de las L3 presentes en cada hospedador examinado, no se presenta la prevalencia de *Anisakis* spp).

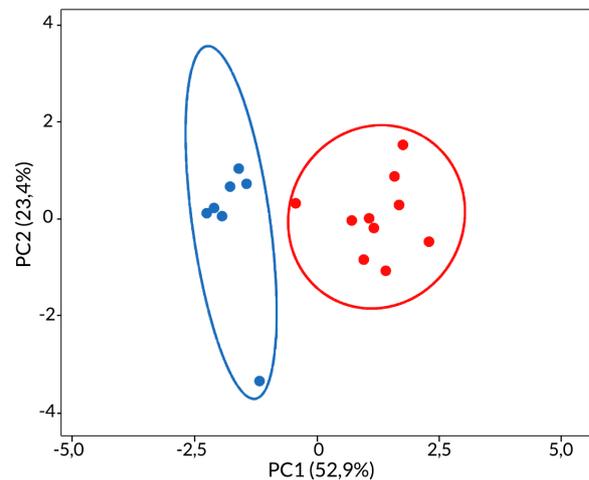
Cuando las larvas se liberaron de la cápsula (mediante el empleo de pinzas), se procedió la observación bajo lupa de los caracteres morfológicos. Se evidenció una amplia variabilidad de rangos de talla en la mayoría de los caracteres morfométricos, observando que las larvas extraídas de *M. gayi* resultaron de menor tamaño (Tabla 1).

El análisis de ACP arrojó evidentes diferencias en las variables morfométricas entre los especímenes recolectados, identificando dos grupos coincidentes con las especies de hospedadores (Fig. 1), lo que explicó el 76,3% de la variación. El análisis multivariado de la varianza de la morfometría de las larvas de *Anisakis*, basado en permutaciones (PERMANOVA), detectó diferencias significativas entre las especies de hospedadores (Pseudo  $F_{(1,15)} = 5,159$ ;  $P < 0,0029$ ).

**Tabla 1. Promedio, valor mínimo, máximo, y desviación estándar de cada variable morfométrica de 17 larvas de *Anisakis* spp. encontradas en *Dosidicus gigas* y *Merluccius gayi* en la región del Biobío, Chile / Mean, minimum, maximum value, and standard deviation of each morphometric variable of 17 *Anisakis* spp. larvae found in *Dosidicus gigas* and *Merluccius gayi* in Biobío Region, Chile**

Carácter morfométrico* Larvas <i>Anisakis</i> spp.	<i>Merluccius gayi</i>		<i>Dosidicus gigas</i>	
	Promedio, valor mínimo, máximo	d. e.	Promedio, valor mínimo, máximo	d. e.
Longitud esófago	0,67 (0,51-0,86)	0,11	2,03 (0,58-2,9)	0,62
Longitud ventrículo	0,27 (0,18-0,33)	0,05	0,98 (0,30-1,58)	0,31
Ancho máximo	0,16 (0,13-0,18)	0,02	0,47 (0,21-0,65)	0,14
Longitud cola	0,08 (0,06-0,10)	0,02	0,25 (0,15-0,36)	0,06
Longitud del cuerpo	8,83 (7,20-10,80)	1,37	10,26 (7,80-14,40)	2,06

\*Datos expresados en mm; (d.e.)= desviación estándar



**Figura 1. Análisis de componentes principales de la morfometría de 17 ejemplares de larvas de *Anisakis pegreffii*, obtenidas de los hospedadores *M. gayi* (círculos azules) y *D. gigas* (círculos rojos) en la región del Biobío, Chile / Principal component analysis of the morphometrics of 17 specimens of *Anisakis pegreffii* larvae obtained from hosts *M. gayi* (blue circles) and *D. gigas* (red circles) in Biobío Region, Chile**

## SECUENCIAS DE LAS LARVAS DE *ANISAKIS* EN *M. GAYI* Y *D. GIGAS*

La amplificación de la región ITS (ITS1- ITS2) produjo un amplicón de 587 pares de base (pb), mientras que el del gen COX2 fue de 559 pb. Los índices genéticos obtenidos para el conjunto de 10 secuencias pertenecientes al gen ITS, develaron un sitio polimórfico, 2 haplotipos, y una mutación entre ellas, así como elevados valores de Hd (0,200) y una baja diversidad nucleotídica (0,00036). Contrastadamente, las 11 secuencias del gen mitocondrial, revelaron 26 sitios polimórficos, 10 haplotipos, 26 mutaciones, y elevados valores tanto de diversidad haplotípica Hd (0,982), como nucleotídica (0,01395) (Tabla 2). De igual modo, se obtuvieron resultados disímiles al calcular las diferencias nucleotídicas de ambos conjuntos de datos, donde los valores inferidos para el gen nuclear (k:0,2000) resultaron inferiores en comparación con el gen mitocondrial (K= 7,38182). La distancia genética inferida del ITS osciló entre 0,000 y 0,002 nucleótidos (Tabla S1, material suplementario), mientras que para el COX2 se evidenciaron entre 0,002 y 0,031 nucleótidos (Tabla S2, material suplementario).

La identificación taxonómica basada en homologías con la base de datos (NCBI) arrojó valores entre 99-100% de homología con la especie *A. pegreffii* para ambos genes (ITS y COX2, Tabla S3, material suplementario).

Las secuencias obtenidas para la región ITS (ITS1-ITS2) y el gen COX2 fueron depositadas en GenBank, con los números de acceso correspondientes (Tabla S4, material suplementario).

## ANÁLISIS COMPARATIVO

Por otra parte, el alineamiento realizado al conjunto de datos de 88 secuencias (obtenidas y extraídas de la base de datos) correspondientes al gen ITS (Tabla 3), abarcaron 159 sitios polimórficos, 207 mutaciones, 587 pares de bases, una elevada diversidad haplotípica (Hd= 0,275) y bajos valores de diversidad nucleotídica (0,001). De este conjunto de datos se derivaron 14 haplotipos, donde el haplotipo con mayor número de secuencias incluyó todas las secuencias obtenidas en este estudio y 75 secuencias extraídas de la base de datos. No se observó una agrupación específica entre los haplotipos. La distancia genética varió entre 0,0001 y 0,368 nucleótidos (promedio de 0,002). La red de haplotipos generó un haplotipo central, sin distinción entre las secuencias obtenidas de larvas provenientes de *M. gayi* y *D. gigas* (Fig. 2A).

Los análisis filogenéticos de ML y IB para el gen ITS corroboraron que la especie encontrada en ambos hospedadores estudiados fue *A. pegreffii*, linaje que mostró un 100% de identidad con los extraídos de hospedadores de diferentes niveles tróficos y áreas geográficas. Sin embargo, no se observó una estructura diferenciada entre las secuencias, resultando una politomía (Figs. S1 y S2, material suplementario). Esto sugiere que el gen ITS puede ser usado para la identificación de las especies de *Anisakis*, pero sin resolución para estudios de genética de poblaciones.

Dentro del mismo contexto, al llevar a cabo el análisis genético comparativo del conjunto de datos correspondientes al gen COX2 (Tabla 3), se observó una longitud de 559 pares de bases, 158 sitios polimórficos y un total de 207 mutaciones para las 94 secuencias. Se observó una baja

**Tabla 2. Índices genéticos empleados para ITS y COX2 en ejemplares de *A. pegreffii* de secuencias obtenidas en este estudio / Genetic indices used for ITS and COX2 in *A. pegreffii* specimens from sequences obtained in this study**

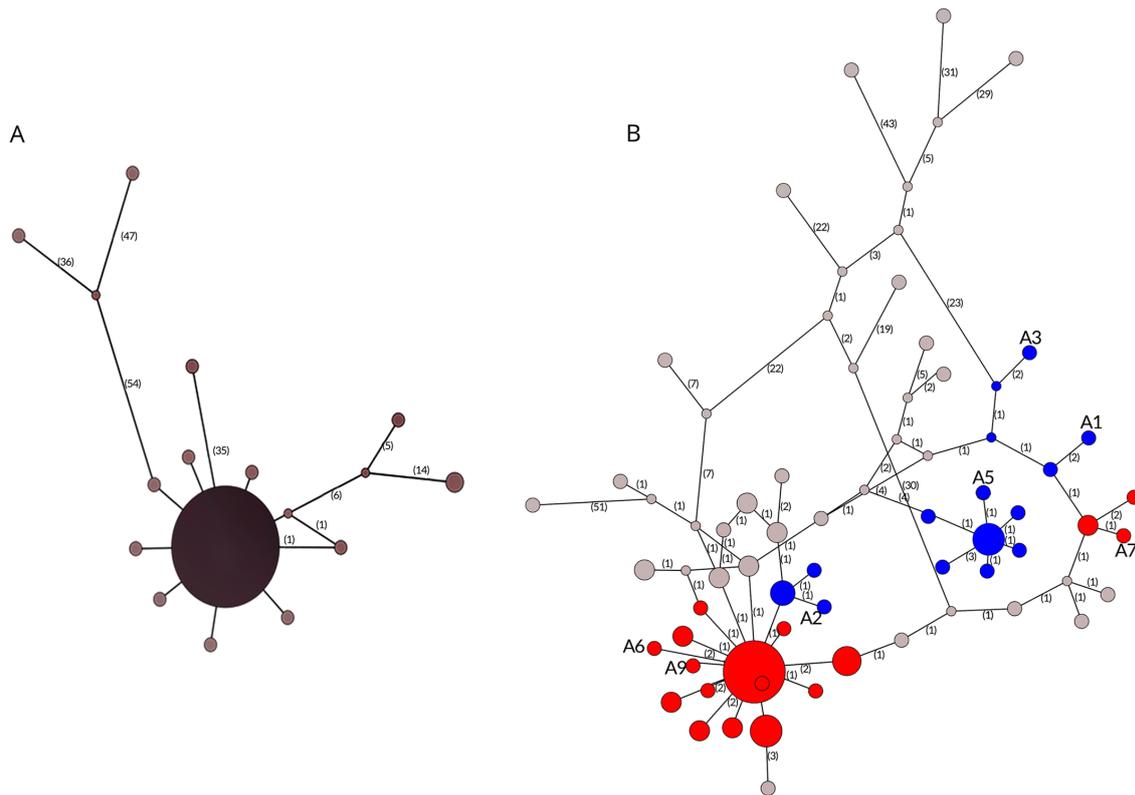
	Secuencias	Longitud	S	H	Mutaciones	Hd	Diversidad nucleotídica	Diferencias nucleotídicas (Promedio)
ITS	10	548	1	2	1	0,200	Pi: 0,00036	k: 0,20000
COX2	11	559	26	10	26	0,982	Pi: 0,01395	k: 7,38182

S: Sitios polimórficos, H: N° de haplotipos, Hd: Diversidad de haplotipos

**Tabla 3. Índices genéticos empleados para ITS y COX2 en ejemplares de *A. pegreffii* de secuencias obtenidas en este estudio y extraídas de GenBank / Genetic indices used for ITS and COX2 in *A. pegreffii* specimens from sequences obtained in this study and extracted from GenBank**

	Secuencias	Longitud	S	H	Mutaciones	Hd	Diversidad nucleotídica	Diferencias nucleotídicas (Promedio)
ITS	88	548	159	14	185	0,275	Pi: 0,01359	k: 6,045
COX2	94	559	158	53	207	0,9520	Pi: 0,0750	k: 13,009

S: Sitios polimórficos, H: N° de haplotipos, Hd: Diversidad de haplotipo



**Figura 2.** Red de haplotipos de *A. pegreffii* basada en secuencias de nucleótidos de A) región ITS y B) región COX2. Los círculos representan los haplotipos y sus tamaños son relativos al número de individuos que comparten el haplotipo específico. El color azul representa larvas en *M. gayi* y el rojo en *D. gigas* / Haplotype network of *A. pegreffii* based on nucleotide sequences of the A) ITS region and B) COX2 region. Circles represent haplotypes and their sizes are relative to the number of individuals sharing the specific haplotype. Blue represents larvae inside *M. gayi* and red in *D. gigas*

diversidad nucleotídica (0,027), contrastante con una elevada diversidad haplotípica ( $Hd=0,95$ ). Se obtuvieron 53 haplotipos y la distancia genética demostró una variación de 0,0001 a 0,18 nucleótidos (promedio de 0,017), destacando la cercanía genética (0,01) de las secuencias generadas con el linaje *A. simplex* / *A. pegreffii*. La red de haplotipos mostró una conformación similar a una estrella, donde la mayoría de los haplotipos resultaron únicos y estrechamente relacionados con un haplotipo central común (Fig. 2B). Este haplotipo central estuvo compuesto de secuencias pertenecientes a hospedadores (intermediarios / paraténicos y definitivos) de distintos niveles tróficos y áreas geográficas. Las secuencias de *M. gayi* (A1, A2) y *D. gigas* (A6 y A7) destacan por compartir haplotipos con ejemplares extraídos de hospedadores definitivos como *Tursiops truncatus* (KC480040), *Stenella coeruleoalba* (KC480027), *Orcinus orca* (MT188612), *Neophocaena asiaorientalis* (MT312488) y *Delphinus delphis* (DQ116428), mamíferos marinos con un amplio rango de movilidad.

Para el gen COX2 se observó una estructuración poblacional. Los métodos filogenéticos ML e IB produjeron topologías similares (Figs. 3 y 4). Ambas topologías agrupan las secuencias de *M. gayi* y *D. gigas* en un clado junto al linaje

*A. pegreffii* de hospedadores con diferentes niveles tróficos reportados a nivel global, coincidiendo en la agrupación de las secuencias generadas con las extraídas de *Stenella coeruleoalba* (KC809997; Mar Mediterráneo) *Peltorhamphus novaezeelandiae* (KY909256; Nueva Zelanda) e *Illex argentinus* (MK598052; Islas Malvinas). No se evidenció la existencia de patrones geográficos o clados-asociados al nivel trófico de los hospedadores estudiados.

## DISCUSIÓN

### MORFOMETRÍA

La morfometría de las larvas de *A. pegreffii* recolectadas de *M. gayi* y *D. gigas* evidenció dos morfotipos estrechamente asociados a cada especie hospedadora. Los estados larvales extraídos de *D. gigas* exhibieron mayor longitud en los caracteres evaluados (esófago, ventrículo y longitud corporal) con respecto a las larvas presentes en *M. gayi*. Las evaluaciones morfométricas obtenidas evidencian que los nemátodos extraídos de ambos hospedadores concuerdan con las características propias (ventrículo largo y la presencia de mucrón) de los estadios larvales de tipo I (Berland 1961). Posteriormente el análisis y comparación de

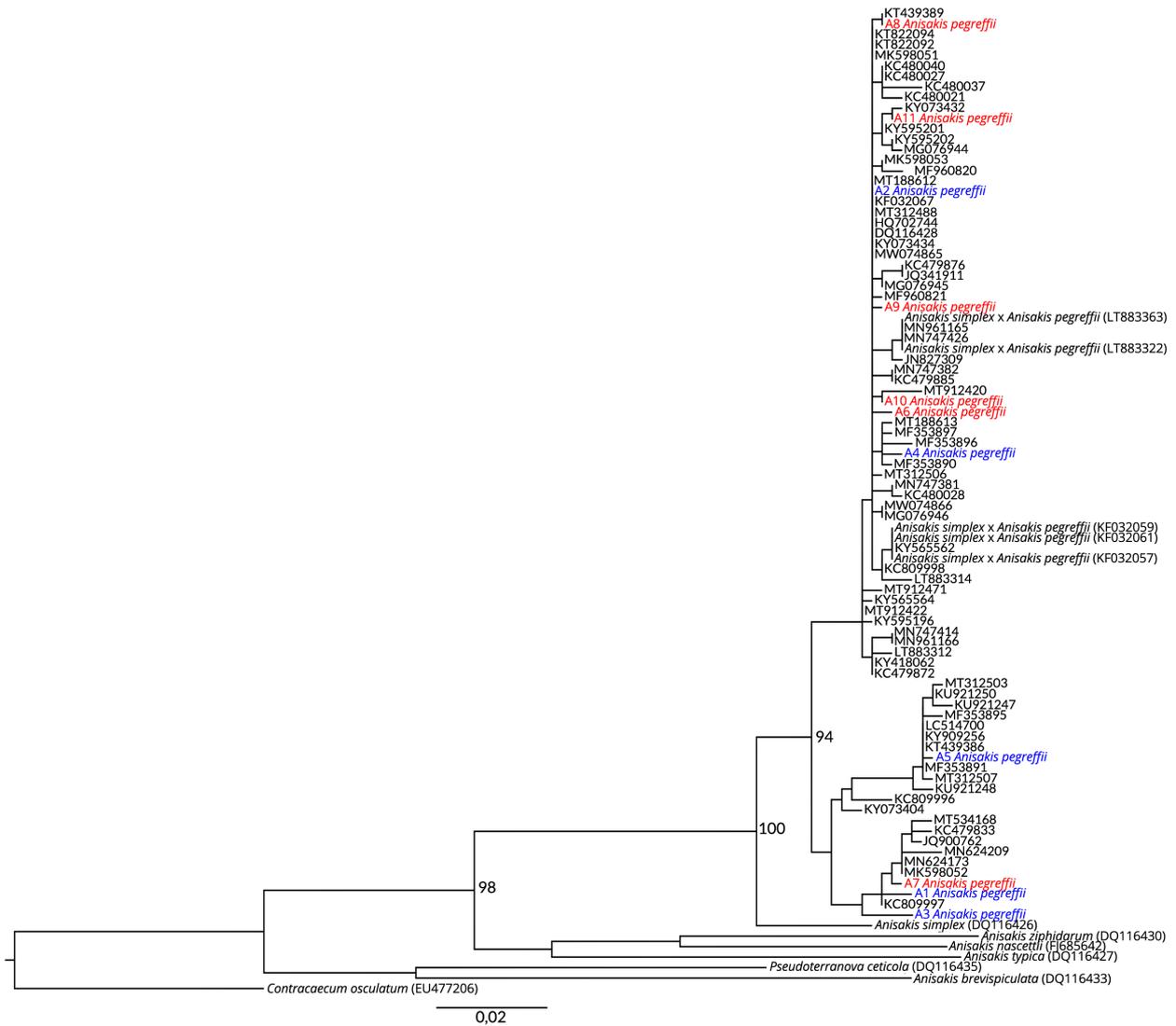


Figura 3. Análisis de máxima verosimilitud del gen COX2 de larvas de *A. pegreffii* obtenidas en este estudio y extraídas de la base de datos. Los soportes en cada nodo son mostrados con valores mayor al 90%. Como grupo externo se incluyeron *P. ceticola* (DQ116435); *C. osculatum* (EU477206); *A. typica* (DQ116427); *A. brevispiculata* (DQ116433); *A. simplex* (DQ116426); *A. ziphidarum* (DQ116430); y *A. nascettii* (FJ685642). El color azul representa larvas en *M. gayi* y el rojo en *D. gigas* / Maximum likelihood analysis of the COX2 gene of *A. pegreffii* larvae obtained in this study and extracted from the database. Supports at each node are shown with values greater than 90%. Outgroup included *P. ceticola* (DQ116435); *C. osculatum* (EU477206); *A. typica* (DQ116427); *A. brevispiculata* (DQ116433); *A. simplex* (DQ116426); *A. ziphidarum* (DQ116430); and *A. nascettii* (FJ685642). Blue represents larvae inside *M. gayi* and red in *D. gigas*

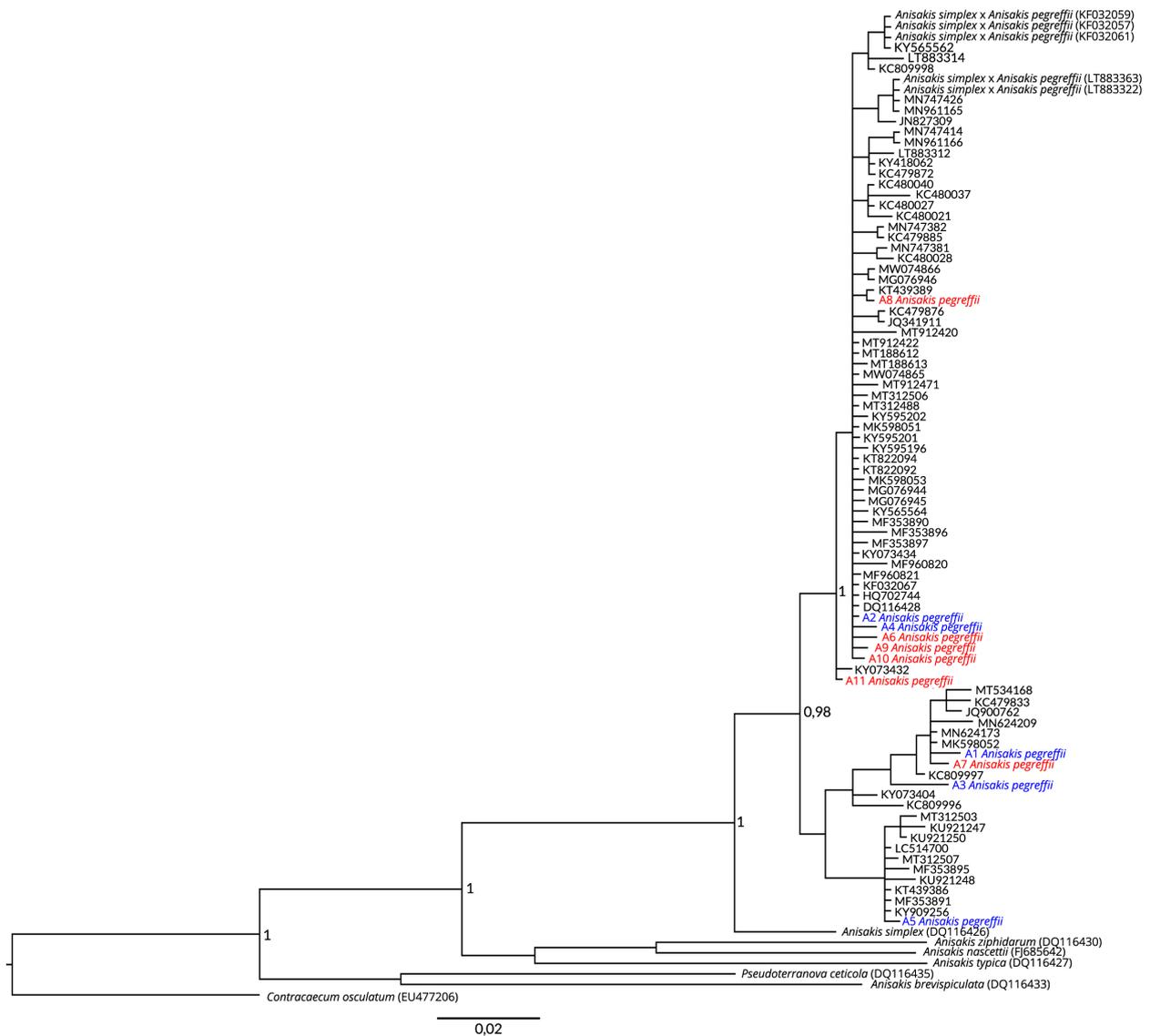


Figura 4. Inferencia bayesiana del gen COX2 de larvas de *A. pegreffii* obtenidas en este estudio y extraídas de la base de datos. Los soportes en cada nodo son mostrados con valores mayores a 0,98. Como grupo externo se incluyeron *P. ceticola* (DQ116435); *C. osculatum* (EU477206); *A. typica* (DQ116427); *A. brevispiculata* (DQ116433); *A. simplex* (DQ116426); *A. ziphidarum* (DQ116430); *A. nascettii* (FJ685642). El color azul representa larvas en *M. gayi* y el rojo en *D. gigas* / Bayesian inference of the COX2 gene of *A. pegreffii* larvae obtained in this study and extracted from the database. Supports at each node are shown with values greater than 0.98. Outgroup included *P. ceticola* (DQ116435); *C. osculatum* (EU477206); *A. typica* (DQ116427); *A. brevispiculata* (DQ116433); *A. simplex* (DQ116426); *A. ziphidarum* (DQ116430); *A. nascettii* (FJ685642). Blue represents larvae inside *M. gayi* and red in *D. gigas*

parámetros morfométricos como longitud del ventrículo y esófago, caracteres distintivos entre las especies hermanas *A. simplex* (s. s.) y *A. pegreffii* (Quiazon *et al.* 2008), arrojaron coincidencia principalmente con los criterios morfológicos estándar de *A. pegreffii* descritos por otros autores (Silva & Eiras 2003, Quiazon *et al.* 2008, Lopes *et al.* 2020).

Las diferencias observadas en la longitud corporal de las larvas recolectadas de ambos hospedadores se podrían relacionar al hecho que los parásitos recientemente ingeridos por el primer hospedador paraténico usualmente presentan un menor tamaño (McClelland 1995). *D. gigas* es un depredador con un amplio nicho trófico, en cuya dieta figuran peces e invertebrados (Ibáñez *et al.* 2013), entre las que se incluye *M. gayi*, que ha sido frecuentemente reportada en su contenido estomacal (Ibáñez *et al.* 2008). Esto explicaría que una de las larvas encontradas en el cefalópodo sea de similar morfometría a las de merluzas (Fig. 1), ya que podría haber sido ingerida recientemente. Sin embargo, otros factores pueden intervenir en dichas variaciones, por ejemplo; se ha documentado que un hospedador de mayor tamaño debería brindar mayor espacio a los parásitos (McClelland 1995); mientras que otros autores han comprobado como la longitud de las larvas de *Anisakis* spp. se hace más elevada tanto con la longevidad del hospedador, como por el sitio de infección, debido a las diferencias en el contenido bioquímico propio de cada órgano o tejido (Strømnes & Andersen 2003). Igualmente es posible que la variabilidad de tamaño sea consecuencia de diferentes etapas de desarrollo de las larvas. Por tanto, es necesario realizar estudios bajo condiciones controladas, que permitan evaluar cada uno de estos factores, y con ello comprender las condiciones que pueden afectar las variaciones morfométricas de *Anisakis* spp.

Las larvas de *Anisakis* spp. parasitan una amplia gama de hospedadores, por lo que se generan diferentes presiones selectivas dependiendo de las diversas condiciones internas de cada hospedador (Riquelme *et al.* 2006). Esto constituiría un nicho diferente para el parásito (Poulin & Leung 2011), lo que se reflejaría en variaciones en el tamaño corporal, proporciones de las distintas partes del cuerpo, caracteres sexuales, forma, y tamaño de apéndices (George-Nascimento & Muñoz 1997, George-Nascimento *et al.* 2004).

Las variaciones morfométricas en estados larvales han sido reportadas para otras especies de anisákidos. Por ejemplo, larvas de tercer estado de *Pseudoterranova cattani* extraídas de *Cilus gilberti*, *Genypterus maculatus*, *Paralichthys microps* y *M. gayi* de la costa chilena presentaron variaciones morfométricas (George-Nascimento & Llanos 1995), al igual que estados larvales de *P. cattani* recolectados en los peces *Percophis brasiliensis* y *Acanthistius patachonicus* en el océano Atlántico sudoeste (Hernández-Orts *et al.* 2013).

En el caso particular de *Anisakis* spp., estudios realizados en *Trachurus trachurus* capturados en la costa occidental de Portugal (Gomes 2014, Lopes *et al.* 2020) también han detectado variación en los caracteres morfológicos en estados

larvales de *Anisakis* spp., reportando ejemplares de menor tamaño corporal, con respecto a los extraídos de *T. trachurus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus* y *Micromesistius poutassou* capturados en la misma área geográfica (Silva & Eiras 2003). Por tanto, las variables morfométricas se deben considerar como una aproximación, y con cautela si se pretende distinguir especies que infectan diferentes hospedadores; además un incremento del número de muestras podrá conllevar a un resultado más asertivo.

#### ANÁLISIS MOLECULAR

Dada la falta de caracteres morfológicos diferenciales, los marcadores moleculares resultan una herramienta importante para resolver los problemas asociados a su determinación taxonómica (Martín-Sánchez *et al.* 2005, Blasco-Costa *et al.* 2016). En este estudio, el análisis molecular (COX2 y ITS) identificó únicamente *A. pegreffii* para ambos hospedadores. En el hemisferio sur, las larvas de *A. pegreffii* han sido identificadas mediante marcadores moleculares (mitocondriales, COX2 y nucleares, EF1 $\alpha$ -1) en la zona de pesca común de la costa argentino-uruguaya, parasitando a *Zenopsis conchifer*, *Sympterygia bonapartii*, *Zearaja chilensis* y *Atlantoraja castelnaui* (Irigoitia *et al.* 2018, Lanfranchi *et al.* 2018) y en las Islas Malvinas, en el hospedador *Illex argentinus* (Cipriani *et al.* 2019). En Chile, escasos estudios han utilizado un enfoque molecular para la identificación de larvas de *Anisakis*, destacando el reporte de la especie *A. pegreffii* en la costa sur del país en cetáceos (Mattiucci *et al.* 2018) y en dos áreas de pesca artesanal en la Costa del Maule, parasitando a *M. gayi*, *Thyrstites atun* y *Brama australis* (Muñoz-Caro *et al.* 2022).

Entre los dos marcadores genéticos empleados, se detectó un alto número de haplotipos para el gen COX2. Esto podría implicar la existencia de diferencias genéticas entre las larvas, ya que diferencias en un solo nucleótido entre las secuencias pudiera ser un indicativo de diferenciación poblacional (Blažeković *et al.* 2015). Sin embargo, la diversidad de haplotipos encontrada pudiera estar implicada con la elevada proporción de haplotipos únicos, tal como ha sido observado anteriormente en la costa noroeste de Escocia (0,997; Cross *et al.* 2007), el Mar Adriático (0,957  $\pm$  0,011; Mladineo & Poljak 2014 y 0,64; Blazekovic *et al.* 2015), Mar Mediterráneo (0,67; Mattiucci *et al.* 2009), océano Atlántico (0,976; Mattiucci *et al.* 2017b) y el océano Atlántico sudoeste (0,98  $\pm$  0,01; Irigoitia *et al.* 2021). De los 53 haplotipos encontrados, dos agrupaban secuencias de larvas provenientes de *M. gayi* y *D. gigas*, resultado congruente con previos estudios (Mladineo & Poljak 2014) donde el mismo haplotipo de larvas de *Anisakis* spp. fue encontrado en diferentes hospedadores.

#### ANÁLISIS COMPARATIVO

Para ambos genes, fue observada una baja diferenciación genética y diversidad nucleotídica entre las secuencias obtenidas y extraídas de la base de datos, lo que indicaría

una escasa variabilidad genética, y reportado anteriormente para *Anisakis* spp. (Cross *et al.* 2007, Mattiucci & Nascetti 2007, Mattiucci *et al.* 2009, 2017b; Pekmezci *et al.* 2014, Blazekovic *et al.* 2015, Irigoitia *et al.* 2021). Se ha implicado que la baja diversidad genética en *Anisakis* spp. puede ser consecuencia de la perturbación del hábitat, como la contaminación, sobrepesca y cambio climático (Mattiucci *et al.* 2017b), afectando las redes tróficas y la viabilidad de los hospedadores. La región del Biobío es una de las zonas más productivas de Chile en materia de extracción de recursos pesqueros (Ayala-Córdova 2022), por lo tanto, la alta extracción de ambos hospedadores podría repercutir sobre la diversidad genética de *Anisakis*.

La identificación de 14 haplotipos ribosómicos revela un grado considerable de variabilidad intraespecífica. Sin embargo, gracias a una mayor tasa de evolución de los genes mitocondriales (Froeschke & von der Heyden 2014), los resultados obtenidos en esta investigación, coinciden con trabajos previos en reportar al gen COX2 como un valioso marcador genético para el análisis de la estructura poblacional de *Anisakis* spp. (Baldwin *et al.* 2011, Mattiucci *et al.* 2018).

El presente estudio contribuye con el primer reporte *A. pegreffii* en *D. gigas* y un nuevo registro parasitario para esta especie de cefalópodo para la región del Biobío. *D. gigas* cuenta con una extensa movilidad en el ecosistema marino, donde se alimenta de una amplia gama de presas (peces, eufáusidos y otros cefalópodos, Ibáñez 2013), por tanto, esta especie desempeña un rol fundamental en la transferencia de los estados larvales de *Anisakis* spp., a través de la red alimentaria, desde hospedadores intermediarios / paraténicos hasta los cetáceos, hospedadores finales del ciclo (Abollo *et al.* 1998).

En el ámbito sanitario, aunque la ingesta accidental de estadios larvales de *Anisakis* spp. es la más frecuente en los reportes de la anisakiasis, no es la única forma de infección; ya que, incluso los nématodos muertos o fragmentos de ellos podrían generar sintomatología alérgica en pacientes sensibilizados (Audicana & Kennedy 2008). Por consiguiente, resulta fundamental proporcionar información precisa y una identificación adecuada de las larvas de *Anisakis* spp. en los productos pesqueros.

En conclusión, la identificación a través de caracteres morfométricos permitió la separación de larvas asociadas a la especie de hospedador, sin embargo, presenta limitaciones en la identificación taxonómica de las especies, pero puede ser una útil para estudiar asociaciones entre larva y hospedador. Las técnicas moleculares sí demostraron ser una herramienta útil para la identificación de especies de *Anisakis*. Ambos genes (ITS y COX2) permitieron identificar larvas de *A. pegreffii*, aun cuando no se obtuvo suficiente resolución para revelar posibles patrones interespecíficos en el gen ITS, en contraste del gen COX2.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Marco Quispe por facilitar ejemplares de *D. gigas* y a Francisco Silva, por su asistencia en el Laboratorio de Ecología Molecular. AB y MG-N agradecen al proyecto CIBAS año 2020. Luisana Lugo Pérez fue financiada por la Dirección de Postgrado UCSC bajo el número N°29/2019.

## LITERATURA CITADA

- Abollo E, C Gestal, A López, AF González, A Guerra & S Pascual. 1998.** Squid as trophic bridges for parasite flow within marine ecosystems: the case of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae), or when the wrong way can be right. *South African Journal of Marine Science* 20(1): 223-232. <doi 10.2989/025776198784126575>
- Abollo E, L Paggi, S Pascual & S D'amelio. 2003.** Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infection, Genetics and Evolution* 3(3): 175-181. <doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00073-X>
- Aibinu IE, PM Smooker & AL Lopata. 2019.** *Anisakis* nematodes in fish and shellfish- from infection to allergies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 9: 384-393. <doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.04.00>
- Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers & DJ Lipman. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anderson RC. 2000.** Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission, 672 pp. CABI Publishing, Wallingford.
- Ayala-Córdova J. 2022.** Pautas de desarrollo pesquero, agentes socioeconómicas y experiencias laborales en la región del Biobío de Chile. *Trabajo y Sociedad* 23(38): 69-95.
- Baldwin RE, MB Rew, ML Johansson, MA Banks & KC Jacobson. 2011.** Population structure of three species of *Anisakis* nematodes recovered from Pacific sardines (*Sardinops sagax*) distributed throughout the California Current system. *The Journal of Parasitology* 97(4): 545-554. <doi.org/10.1645/GE-2690.1>
- Bello E, M Palomba, SC Webb, M Paoletti, P Cipriani, G Nascetti & S Mattiucci. 2021.** Investigating the genetic structure of the parasites *Anisakis pegreffii* and *Anisakis berlandi* (Nematoda: Anisakidae) in a sympatric area of the southern Pacific Ocean waters using a multilocus genotyping approach: first evidence of their interspecific hybridization. *Infection, Genetics and Evolution* 92: 104887. <doi: 10.1016/j.meegid.2021.104887>
- Berland B. 1961.** Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2(1): 1-50. <doi.org/10.1080/00364827.1961.10410245>
- Blasco-Costa I, SC Cutmore, TL Miller & MJ Nolan. 2016.** Molecular approaches to trematode systematics: 'best practice' and implications for future study. *Systematic Parasitology* 93(3): 295-306.

- Blažeković K, IL Pleić, M Đuras, T Gomerčić & I Mladineo. 2015.** Three *Anisakis* spp. isolated from toothed whales stranded along the eastern Adriatic Sea coast. *International Journal for Parasitology* 45(1): 17-31. <doi: 10.1016/j.ijpara.2014.07.012>
- Buchmann K & F Mehrdana. 2016.** Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (s.l.), *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatatum* (s.l.) on fish and consumer health. *Food and Waterborne Parasitology* 4: 13-22. <doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.003>
- Cavallero S, A Ligas, F Bruschi & S D'Amelio. 2011.** Molecular identification of *Anisakis* spp. from fishes collected in the Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). *Veterinary Parasitology* 187(3-4): 563-566. <doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.033>
- Céspedes R, J Iannacone & A Salas. 2011.** Helmintos parásitos de *Dosidicus gigas* "Pota" eviscerada en Arequipa, Perú. *Ecología Aplicada* 10(1/2): 1-11. <doi.org/10.21704/rea.v10i1-2.408>
- Cipriani P, L Giuliotti, M Palomba, S Mattiucci, M Bao & A Levsen. 2019.** Occurrence of larval ascaridoid nematodes in the Argentinean short-finned squid *Illex argentinus* from the Southwest Atlantic Ocean (off Falkland Islands). *International Journal of Food Microbiology* 297: 27-31. <doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.019>
- Clarke KR & RN Gorley. 2006.** PRIMER v6: User Manual/Tutorial, 190 pp. PRIMER-E, Plymouth.
- Clement M, D Posada & KA Crandall. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1659. <doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Cross MA, C Collins & N Campbell. 2007.** Levels of intra-host and temporal sequence variation in a large CO1 sub-units from *Anisakis simplex sensu stricto* (Rudolphi 1809) (Nematoda: Anisakidae): implications for fisheries management. *Marine Biology* 151: 695-702 <doi.org/10.1007/s00227-006-0509-8>
- Ebmer D, MJ Navarrete, P Muñoz, LM Flores, U Gärtner, J Brabec, S Poppert, A Taubert & C Hermosilla. 2020.** Anthrozoönotic parasites circulating in synanthropic and Pacific colonies of South American Sea Lions (*Otaria flavescens*): Non-invasive techniques data and a review of the literature. *Frontiers in Marine Science* 7: 543829. <doi.org/10.3389/fmars.2020.543829>
- Fiorenza E, C Wendt, K Dobkowski, T King, M Pappaionou, P Rabinowitz, J Samhouri & C Wood. 2020.** It's a wormy world: Meta-analysis reveals several decades of change in the global abundance of the parasitic nematodes *Anisakis* spp. and *Pseudoterranova* spp. in marine fishes and invertebrates. *Global Change Biology* 26(5): 2854-2866. <doi.org/10.1111/gcb.15048>
- Froeschke G & S von der Heyden. 2014.** A review of molecular approaches for investigating patterns of coevolution in marine host-parasite relationships. *Advances in Parasitology* 84: 209-252. <doi.org/10.1016/B978-0-12-800099-1.00004-1>
- Gaglio G, P Battaglia, A Costa, M Cavallaro, G Cammilleri, S Graci, MD Buscemi, V Ferrantelli, F Andaloro & F Marino. 2018.** *Anisakis* spp. larvae in three mesopelagic and bathypelagic fish species of the central Mediterranean Sea. *Parasitology International* 67(1): 23-28. <doi.org/10.1016/j.parint.2017.09.010>
- George-Nascimento M. 1996.** Populations and assemblages of parasites in hake, *Merluccius gayi*, from the southeastern Pacific Ocean: stock implications. *Journal of Fish Biology* 48: 557-568.
- George-Nascimento M & H Arancibia. 1992.** Stocks ecológicos del jurel (*Trachurus symmetricus murphyi* Nichols) en tres zonas de pesca frente a Chile, detectados mediante comparación de su fauna parasitaria y morfometría. *Revista Chilena de Historia Natural* 65: 453-470.
- George-Nascimento M & A Llanos. 1995.** Micro-evolutionary implications of allozymic and morphometric variations in sealworms *Pseudoterranova* sp. (Ascaridoidea: Anisakidae) among sympatric hosts from the Southeastern Pacific Ocean. *International Journal for Parasitology* 25(10): 1163-1171. <doi.org/10.1016/0020-7519(95)00038-4>
- George-Nascimento M & M Muñoz. 1997.** Specificity and host suitability of *Cucullanus genypteri* (Nematoda: Cucullanidae) in three *Genypterus* (Ophiidae) fish host species from the southeastern Pacific Ocean. *Parasite* 4(3): 233-238.
- George-Nascimento M, F Garcías & G Muñoz. 2002.** Parasite body volume and infracommunity patterns in the southern pomfret *Brama australis* (Pisces: Bramidae). *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 835-839.
- George-Nascimento M, G Muñoz, PA Marquet & R Poulin. 2004.** Testing the energetic equivalence rule with helminth endoparasites of vertebrates. *Ecology Letters* 7(7): 527-531.
- Gomes T. 2014.** *Anisakis* spp: Relevância da sua pesquisa e identificação em peixes. M.Sc. Thesis, Facultad de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 80 pp. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/7586>
- Guardone L, D Nucera, N Rosellini, L Tinacci, PL Acutis, A Guidi & A Armani. 2018.** Occurrence, distribution and viability of *Anisakis* spp. larvae in various kind of marketed herring products in Italy. *Food Control* 101: 126-133. <doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.030>
- Hernández-Orts JS, FE Montero, A Juan-García, NA García, EA Crespo, JA Raga & FJ Aznar. 2013.** Intestinal helminth fauna of the South American sea lion *Otaria flavescens* and fur seal *Arctocephalus australis* from northern Patagonia, Argentina. *Journal of Helminthology* 87(3): 336-347. <doi.org/10.1017/S0022149X12000454>
- Huelsbeck JP & R Ronquist. 2005.** Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: Nielsen R (ed). *Statistical methods in molecular evolution*, pp. 183-226. Springer, New York.
- Ibáñez CM. 2013.** El impacto ecológico del calamar *Dosidicus gigas* sobre las poblaciones de peces en el Océano Pacífico. *Amici Molluscarum* 21: 7-16.
- Ibáñez CM, H Arancibia & LA Cubillos. 2008.** Biases in determining the diet of jumbo squid *Dosidicus gigas* (D'Orbigny 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) off southern-central Chile (34°S-40°S). *Helgoland Marine Research* 62(4): 331-338. <doi.org/10.1007/s10152-008-0120-0>
- Irigoitía MM, PE Braicovich, AL Lanfranchi, MD Farber & JT Timi. 2018.** Distribution of anisakid nematodes parasitizing rajiform skates under commercial exploitation in the Southwestern Atlantic. *International Journal of Food Microbiology* 267: 20-28. <doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.009>

- Irigoitia MM, M Palomba & PE Braicovich. 2021.** Genetic identification of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) from cetaceans of the Southwestern Atlantic Ocean: ecological and zoogeographical implications. *Parasitology Research* 120: 1699-1711. <doi.org/10.1007/s00436-021-07088-w>
- Kumar S, G Stecher & K Tamura. 2016.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-1874. <doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lanfranchi AL, PE Braicovich, DMP Cantatore, MM Irigoitia, MD Farber, V Taglioretti & JT Timi. 2018.** Influence of confluent marine currents in an ecotonal region of the South-West Atlantic on the distribution of larval anisakids (Nematoda: Anisakidae). *Parasites and Vectors* 11(1): 1-13. <doi.org/10.1186/s13071-018-3119-7>
- Leigh JW & D Bryant. 2015.** POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9): 1110-1116.
- Levsen A & B Berland. 2011.** *Anisakis* species. In: Woo PTK & K Buchmann (eds). *Fish parasites pathobiology and protection*, pp. 298-309. CABI, Wallingford. <doi.org/10.1079/9781845938062.0298>
- Lim H, BK Jung, J Cho, T Yooyen, EH Shin & JY Chai. 2015.** Molecular diagnosis of cause of anisakiasis in humans, South Korea. *Emerging Infectious Diseases* 21(2): 342-344. <doi.org/10.3201/eid2102.140798>
- Lopes P, A Vilares, T Caçador, S Martins, I Ferreira, LM Carvalho & MJ Gargaté. 2020.** Occurrence of larval anisakids in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) caught in Portuguese waters. *Parasitology Research* 119(9): 2799-2811.
- Madrid V, A Rivera & I Fernández. 2016.** Prevalencia de larvas de Anisakidae (Nematoda: Ascaridoidae) en musculatura de merluza chilena, *Merluccius* sp. comercializada en Concepción, Chile, en distintos periodos. *Parasitología Latinoamericana* 65(4): 27-31.
- Martín-Sánchez J, ME Artacho-Reinoso, M Díaz-Gavilán & A Valero-López. 2005.** Structure of *Anisakis simplex* s.l. populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex* s.s.: Absence of reproductive isolation between both species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 141(2): 155-162. <doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.02.005>
- Mattiucci S & G Nascetti. 2007.** Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemispheres. *Veterinary Parasitology* 148(1): 43-57.
- Mattiucci S, M Paoletti & SC Webb. 2009.** *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology* 74: 199-217. <doi.org/10.1007/s11230-009-9212-8>
- Mattiucci S, M Paoletti, F Borriani, M Palomba, RM Palmieri, V Gomes, A Casati & G Nascetti. 2011.** First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infectious Diseases* 11: 82. <doi.org/10.1186/1471-2334-11-82>
- Mattiucci S, M Paoletti, A Colantoni, A Carbone, R Gaeta, A Proietti & G Nascetti. 2017a.** Invasive anisakiasis by the parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): diagnosis by real-time PCR hydrolysis probe system and immunoblotting assay. *BMC Infectious Diseases* 17(1): 1-9.
- Mattiucci S, P Cipriani, M Paoletti, A Levsen & G Nascetti. 2017b.** Reviewing biodiversity and epidemiological aspects of anisakid nematodes from the North-east Atlantic Ocean. *Journal of Helminthology* 91(4): 422-439. <doi.org/10.1017/S0022149X1700027X>
- Mattiucci S, P Cipriani, A Levsen, M Paoletti & G Nascetti. 2018.** Molecular epidemiology of *Anisakis* and anisakiasis: An ecological and evolutionary road map. *Advances in Parasitology* 99: 93-263. <doi.org/10.1016/bs.apar.2017.12.001>
- McClelland G. 1995.** Experimental infection of fish with larval sealworm, *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakinae), transmitted by amphipods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52(Suppl. 1): 140-155.
- Mehrdana F, QZM Bahlool, J Skov, MH Marana, D Sindberg, M Mundeling, BC Overgaard, R Korbut, SB Strøm, PW Kania & K Buchmann. 2014.** Occurrence of zoonotic nematodes *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatatum* and *Anisakis simplex* in cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea. *Veterinary Parasitology* 205(3-4): 581-587. <doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.027>
- Mladineo I & V Poljak. 2014.** Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis* spp. from Adriatic commercial fish species. *Applied and Environmental Microbiology* 80(4): 1281-1290. <doi.org/10.1128/AEM.03561-13>
- Mladineo I, Z Trumbić, I Radonić, A Vrbatović, J Hrabar & I Bušelić. 2017.** *Anisakis simplex* complex: ecological significance of recombinant genotypes in an allopatric area of the Adriatic Sea inferred by genome-derived simple sequence repeats. *International Journal for Parasitology* 47(4): 215-223. <doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.11.003>
- Mladineo I, A Charouli, F Jelić, A Chakroborty & J Hrabar. 2023.** *In vitro* culture of the zoonotic nematode *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae). *Parasites & Vectors* 16(1), 51. <10.1186/s13071-022-05629-5>
- Muñoz G & V Olmos. 2008.** Revisión bibliográfica de especies endoparásitas y hospedadoras de sistemas acuáticos de Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(2): 173-245. <doi.org/10.4067/S0718-19572008000200002>
- Muñoz-Caro T, A Machuca, P Morales, J Verdugo, R Reyes, M García & C Hermosilla. 2022.** Prevalence and molecular identification of zoonotic *Anisakis* and *Pseudoterranova* species in fish destined to human consumption in Chile. *Parasitology Research* 121(5): 1295-1304.
- Murata R, J Suzuki, K Sadamasu & A Kai. 2011.** Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitology International* 60(2): 193-198.
- Nadler SA & DSS Hudspeth. 2000.** Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: Hypotheses of structural and sequence evolution. *The Journal of Parasitology* 86(2): 380-393. <doi.org/10.2307/3284785>

- Nguyen LT, HA Schmidt, A von Haeseler & BQ Minh. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32(1): 268-274. <doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Oksanen J, FG Blanchet, R Kindt, P Legendre, PR Minchin, RB O'Hara, GL Simpson, P Solymos, MHH Stevens & H Wagner. 2012. *Vegan*. Community ecology R Package. R package Version 2.0-4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oliva ME & I Ballón. 2002. Metazoan parasites of the Chilean hake *Merluccius gayi gayi* as a tool for stock discrimination. *Fisheries Research* 56(3): 313-320.
- Pardo-Gandarillas MC, K Lohrmann, AL Valdivia & CM Ibáñez. 2009. First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d'Orbigny 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current system off Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44: 397-408.
- Pardo-Gandarillas MC, KB Lohrmann, M George-Nascimento & CM Ibáñez. 2014. Diet and parasites of the jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Humboldt Current System. *Molluscan Research* 34(1): 10-19. <doi.org/10.1080/13235818.2013.860870>
- Pekmezci GZ, EE Onuk, CS Bolukbas, B Yardimci, AT Gurler, M Acici & S Umur. 2014. Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. *Veterinary Parasitology* 201(1/2): 82-94. <doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.005>
- Posada D & TR Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53(5): 793-808. <doi.org/10.1080/10635150490522304>
- Poulin R & TLF Leung. 2011. Body size, trophic level, and the use of fish as transmission routes by parasites. *Oecologia* 166(3): 731-738. <doi.org/10.1007/s00442-011-1906-3>
- Quiazon KMA, T Yoshinaga, K Ogawa & R Yukami. 2008. Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitology International* 57(4): 483-489.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>
- Rambaut A, AJ Drummond, D Xie, G Baele & MA Suchard. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5): 901-904. <doi:10.1093/sysbio/syy032>
- Riquelme C, M George-Nascimento & L Balboa. 2006. Morfometría y fecundidad de *Profillicollis bullocki* Mateo, Córdova & Guzmán 1982 (Acanthocephala: Polymorphidae) en especies simpátricas de aves costeras de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 79(4): 465-474 <doi.org/10.4067/S0716-078X2006000400005>
- Rodríguez L, L Balboa & M George-Nascimento. 2000. Parasitismo en la caballa *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 y el jurel *Trachurus symmetricus murphyi* Nichols, 1920 frente a Chile central. *Biología Pesquera* 28: 15-21.
- Rozas J, A Ferrer-Mata, JC Sánchez-DelBarrio, S Guirao-Rico, P Librado, SE Ramos-Onsins, A Sánchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299-3302.
- Silva MER & JC Eiras. 2003. Occurrence of *Anisakis* sp. in fishes off the Portuguese west coast and evaluation of its zoonotic potential. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 23(1): 13-17.
- Silva A, MT Rojas, P Morales, T Muñoz & A Machuca. 2020. Anisakid nematodes prevalence in Chilean hake (*Merluccius gayi gayi*) commercialized in the city of Talca, Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research* 48(1): 136-140. <doi.org/10.3856/vol48-issue1-fulltext-2300>
- Strømnes E & K Andersen. 2003. Growth of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematodes, Ascaridoidea, Anisakidae) third-stage larvae in paratenic fish hosts. *Parasitology Research* 89(5): 335-341. <doi.org/10.1007/s00436-002-0756-7>
- Torres P & H González. 1978. Determinación de larvas de *Terranova* (= *Phocanema*) y *Anisakis* en *Genypterus* sp. Aspectos morfológicos e histopatológicos a nivel hepático. *Boletín Chileno de Parasitología* 33: 82-86.
- Umehara A, Y Kawakami, J Araki & A Uchida. 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology International* 56(3): 211-215. <doi.org/10.1016/j.parint.2007.02.005>
- Weitzel T, H Sugiyama, H Yamasaki, C Ramirez, R Rosas & R Mercado. 2015. Human infections with *Pseudoterranova cattani* nematodes, Chile. *Emerging Infectious Diseases* 21(10): 1874-1875. <doi.org/10.3201/eid2110.141848>
- Zhu X, RB Gasser, M Podolska & NB Chilton. 1998. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 28(12): 1911-1921. <doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00150-7>

Recibido el 7 octubre 2022  
Aceptado el 28 diciembre 2023

Editor: Pilar Muñoz Muga

#### RBMO CITATION STYLE

Lugo-Pérez L, I Vera-Escalona, M George-Nascimento, A Brante & M Gamboa. 2024. Morfometría y diagnóstico molecular de larvas de *Anisakis* (Nematoda: Ascaridida) en *Merluccius gayi* (Chordata: Gadiformes) y *Dosidicus gigas* (Mollusca: Teuthida) en la región del Biobío, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 59(1): 51-67. <https://doi.org/10.22370/rbmo.2024.59.1.4461>

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla S1. Distancia genética inferida mediante el análisis del gen ITS, de larvas de *Anisakis* spp. obtenidas de *M. gayi* y *D. gigas* en la Región del Biobío, Chile. El color azul representa larvas en *M. gayi* y el rojo en *D. gigas* / Genetic distance inferred by ITS gene analysis of *Anisakis* spp. larvae obtained from *M. gayi* and *D. gigas* in Biobío Region, Chile. Blue represents larvae inside *M. gayi* and red in *D. gigas***

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
A1										
A2	0,000									
A3	0,000	0,000								
A4	0,000	0,000	0,000							
A5	0,000	0,000	0,000	0,000						
A6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
A7	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002				
A8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002			
A9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000		
A10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	

**Tabla S2. Distancia genética inferida mediante el análisis del gen COX2, de larvas de *Anisakis* spp. obtenidas de *M. gayi* y *D. gigas* en la Región del Biobío, Chile. El color azul representa larvas en *M. gayi* y el rojo en *D. gigas* / Genetic distance inferred by COX2 gene analysis of *Anisakis* spp. larvae obtained from *M. gayi* and *D. gigas* in Biobío Region, Chile. Blue represents larvae inside *M. gayi* and red in *D. gigas***

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
A1											
A2	0,022										
A3	0,018	0,025									
A4	0,024	0,005	0,027								
A5	0,029	0,022	0,029	0,027							
A6	0,025	0,004	0,029	0,009	0,025						
A7	0,009	0,024	0,016	0,025	0,031	0,027					
A8	0,019	0,002	0,023	0,007	0,019	0,006	0,021				
A9	0,024	0,002	0,027	0,007	0,020	0,005	0,025	0,004			
A10	0,024	0,002	0,027	0,007	0,024	0,005	0,025	0,004	0,004		
A11	0,017	0,004	0,022	0,007	0,020	0,007	0,017	0,002	0,006	0,006	

**Tabla S3. Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp. obtenidas de *D. gigas* y *M. gayi* basadas en comparación con secuencias homólogas de la base de datos, y su porcentaje de identidad determinado mediante la herramienta BLAST / Taxonomic identification of *Anisakis* spp. larvae obtained from *D. gigas* and *M. gayi* based on comparison with homologous sequences in the database, and their percentage identity determined using BLAST tool**

	Gen	Hospedador	Localidad de muestreo	Especie larva <i>Anisakis</i>	BLAST (% de identidad)
ITS	A1	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	100
	A2	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	100
	A3	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	100
	A4	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	100
	A5	<i>D. gigas</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	100
	A6	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	100
	A7	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	99,83
	A8	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	100
	A9	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	100
	A10	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	100
COI	A1	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	99,46
	A2	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	100
	A3	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	99,10
	A4	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	99,64
	A5	<i>M. gayi</i>	Talcahuano	<i>A. pegreffii</i>	100
	A6	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	99,82
	A7	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	99,64
	A8	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	100
	A9	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	100
	A10	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	100
	A11	<i>D. gigas</i>	San Vicente	<i>A. pegreffii</i>	100

Tabla S4. Números de acceso de GenBank correspondientes a las secuencias de la región ITS y del gen COX2 obtenidas de *M. gayi* y *D. gigas* en la Región del Biobío, Chile. El color azul representa larvas en *M. gayi* y el rojo en *D. gigas* / GenBank accession numbers corresponding to ITS region and COX2 gene sequences obtained from *M. gayi* and *D. gigas* in the Biobío Region, Chile. Blue represents larvae inside *M. gayi* and red in *D. gigas*

Secuencia	ITS	COX2
A1	OR607660	PQ323383
A2	OR607659	PQ323384
A3	OR607658	PQ323385
A4	OR607657	PQ323386
A5	OR607656	PQ323387
A6	OR607655	PQ323388
A7	OR607654	PQ323389
A8	OR607653	-
A9	OR607652	PQ323390
A10	OR607651	PQ323391

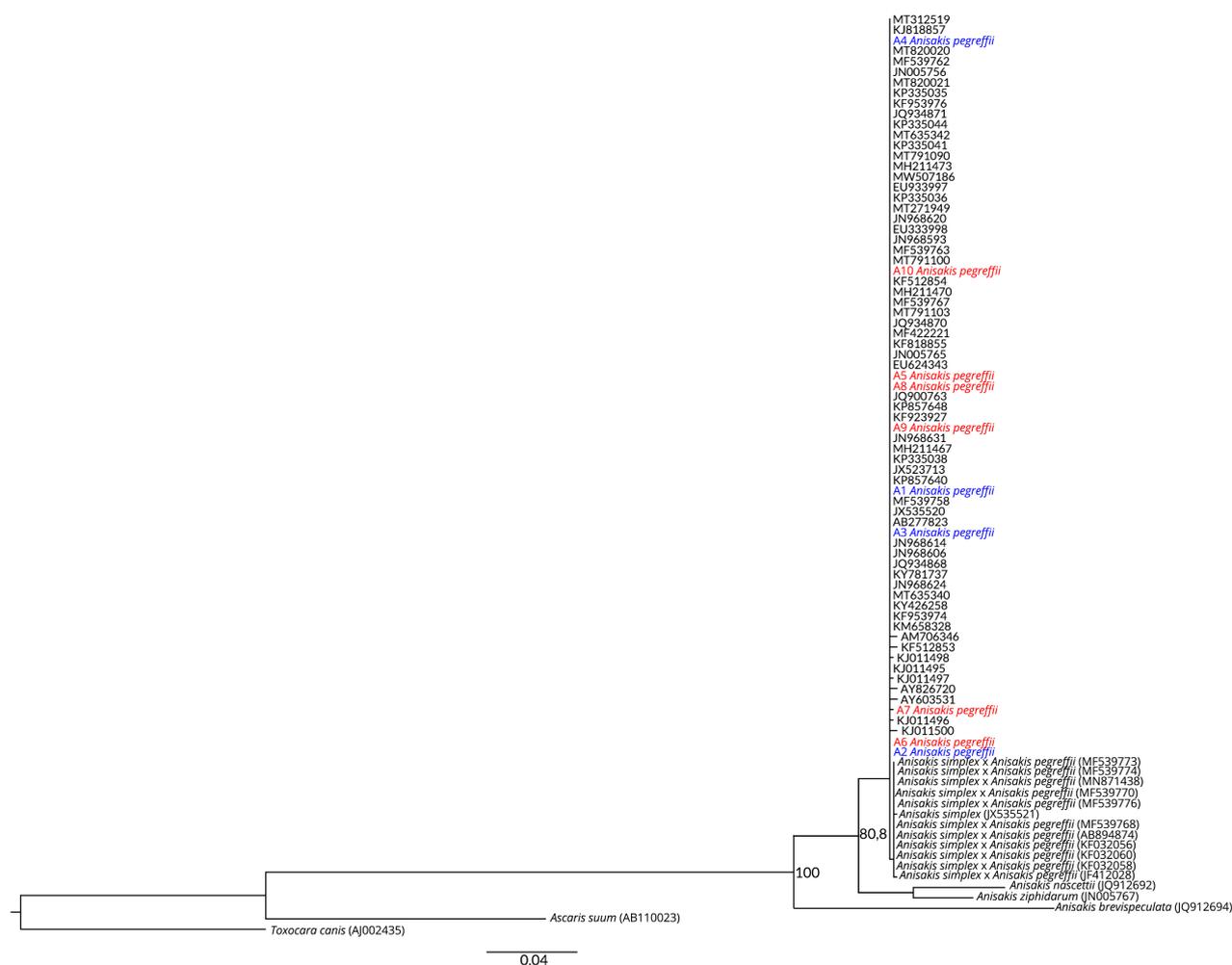


Figura S1. Análisis de Máxima Verosimilitud del gen ITS de larvas *A. pegreffii* obtenidas en este estudio y extraídas de la base de datos. Los soportes en cada nodo son mostrados con valores mayor al 70%. Como grupo externo se incluyeron *Toxocara canis* (AJ002435); *Ascaris suum* (AB110023); *A. ziphidarum* (JN005767); *A. nascettii* (JQ912692); *A. brevispiculata* (JQ912694). El color azul representa larvas en *M. gayi* y el rojo en *D. gigas* / Maximum likelihood analysis of the ITS gene of *A. pegreffii* larvae obtained in this study and extracted from the database. Supports at each node are shown with values greater than 70%. Outgroup included *Toxocara canis* (AJ002435); *Ascaris suum* (AB110023); *A. ziphidarum* (JN005767); *A. nascettii* (JQ912692); *A. brevispiculata* (JQ912694). Blue represents larvae inside *M. gayi* and red in *D. gigas*

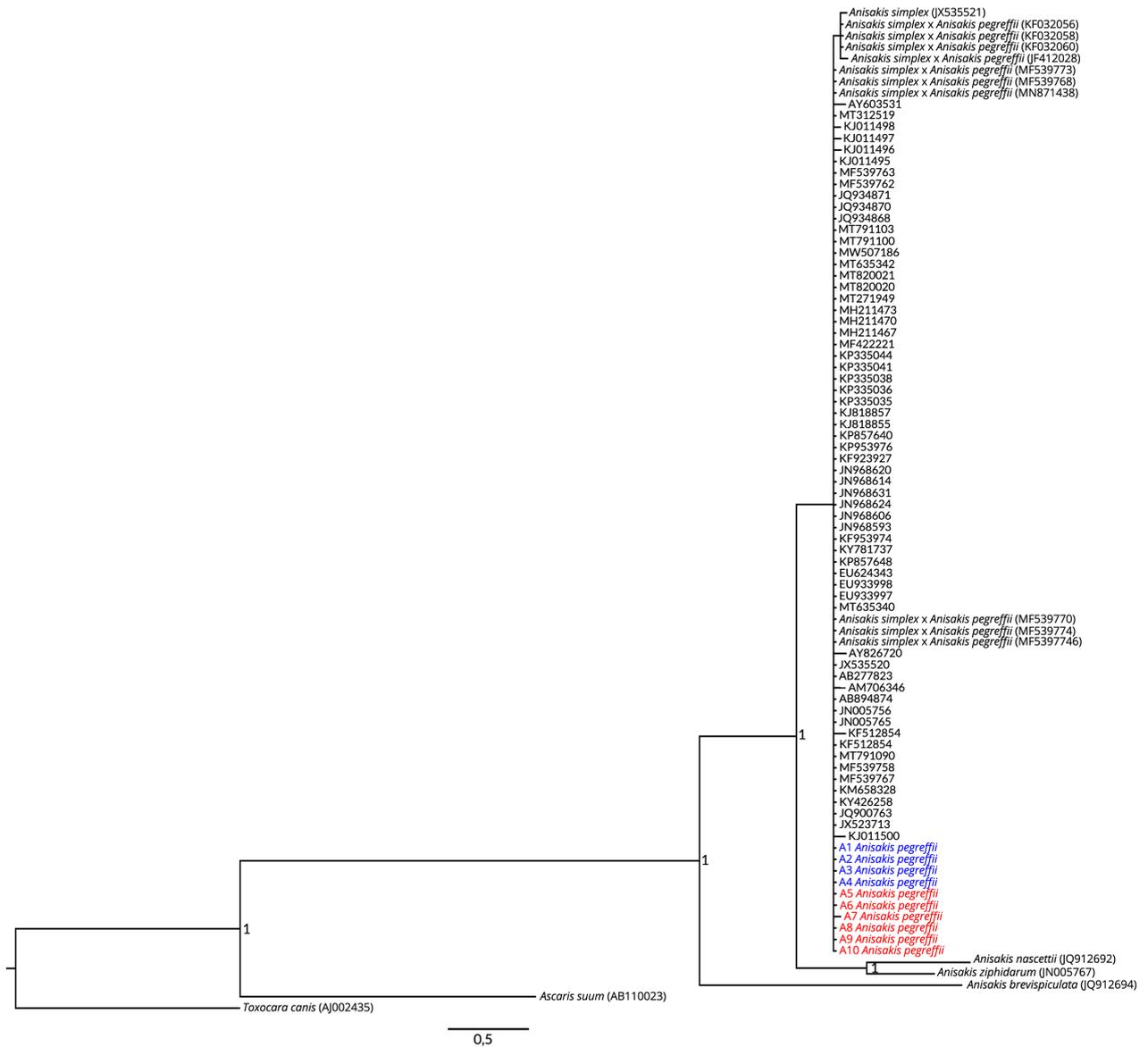


Figura S2. Inferencia Bayesiana del gen ITS de larvas de *A. pegreffii* obtenidas en este estudio y extraídas de la base de datos. Los soportes en cada nodo son mostrados con valores mayor al 70%. Como grupo externo se emplearon *Toxocara canis* (AJ002435); *Ascaris suum* (AB110023); *A. ziphidarum* (JN005767); *A. nassettii* (JQ912692); *A. brevispiculata* (JQ912694). El color azul representa larvas en *M. gayi* y el rojo en *D. gigas* / Bayesian inference of the ITS gene from *A. pegreffii* larvae obtained in this study and extracted from the database. Supports at each node are shown with values greater than 70%. *Toxocara canis* (AJ002435); *Ascaris suum* (AB110023); *A. ziphidarum* (JN005767); *A. nassettii* (JQ912692); *A. brevispiculata* (JQ912694) were employed as external group. Blue represents larvae inside *M. gayi* and red in *D. gigas*