



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**“Análisis filogenético de la familia  
Brachionidae (Rotifera) basado en  
secuencias de genes nucleares (28S del  
RNA Ribosomal) y mitocondriales  
(citocromo c oxidasa subunidad I)”.**

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A

MIRIAM ERANDI REYNA FABIÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN  
ROMÁN

COMITÉ TUTORAL: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA  
DR. DANIEL PIÑERO DALMAU

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

PDCB/grad/038/Jur/2011

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN**  
**ESCOLAR, UNAM**  
Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **281** del 25 de mayo del 2011, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **MIRIAM ERANDI REYNA FABIÁN**, con número de cuenta **97151041**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE (ROTIFERA) BASADO EN SECUENCIAS DE GENES NUCLEARES (28S DEL RNA RIBOSOMAL) Y MITOCONDRIALES (CITOCROMO C OXIDASA SUBUNIDAD 1)"**, dirigida por el Dr. Juan Pedro Laclette San Román.

Presidente:	Dr. Gerardo Pérez Ponce de León
Vocal:	Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann
Vocal:	Dr. Gerardo Zúñiga Bermúdez
Vocal:	Dr. Juan José Morrone Lupi
Secretario:	Dr. Juan Pedro Laclette San Román

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno con **cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria a 31 de enero del 2012.

**DR. DANIEL PIÑERO DALMAU**  
**COORDINADOR**

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**  
**RESPONSABLE DE ENTIDAD**

c.c.p. Expediente alumno

DPCVAZ01sep

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcbumam.mx> E-mail: [pdcbumam@servidor.unam.mx](mailto:pdcbumam@servidor.unam.mx)

## **AGRADECIMIENTOS**

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México. Lugar multicultural, de gran riqueza ideológica, donde se motiva el conocimiento y el crecimiento humano individual y colectivo.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

A CONACYT (No. Becario 203367) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Juan Pedro Laclette por ser un gran ejemplo a seguir en lo académico y personal. Por enseñarme a aceptar mis errores, ser crítica y finalizar mis metas.

A mi comité tutorial, el Dr. Martín García Varela por mostrarme el camino hacia el éxito tomando en cuenta distintos puntos de vista y opiniones, por ser mas que un tutor un amigo en quien puedo confiar y por abrirme las puertas de su laboratorio para llevar acabo este proyecto. Al Dr. Daniel Piñero Dalmau por sus críticas al trabajo y su disposición de tiempo que ayudaron en gran medida a mejorar y finalizar esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

A mi mamá y papá por ser un gran ejemplo de fortaleza y motivación aún en los momentos más difíciles. Por enseñarme a vivir feliz y plenamente cada momento de mi vida y por enseñarme a resolver y aprender de mis errores. Por su infinito cariño que se ve reflejado en mi sentimiento de ser una persona plena. Los amo.

A mi hermana Chicha con quien tuve la fortuna de iniciar esta vida junta y compartir momentos increíbles que la llevan a ser mi mejor amiga, en quien puedo confiar y aprender a ver la vida mas tranquila en este mundo lleno de estrés.

A mi hermano Toño quien siempre me saca una sonrisa y me motivan a seguir adelante en compañía de mi hermosa familia. Por los buenos y malos momentos que nos han hecho madurar y quererte cada día más.

A Jesús Benitez, una persona a la que admiro y quiero cada día mas. Espero seguir cultivando esa semilla hasta que nos hace mejores personas, amigos y sobre todo mi gran compañero.

A mis tíos, Miña, Balta, Oscar, Gelo, Mago, Kenia, Yola, Dulia, Lala y Nahúm quienes siempre dan todo sin esperar recibir nada a cambio, gracias por su infinita bondad.

A todos mis primos y sin dejar a un lado a los que viven en el extranjero, con quienes he compartido mis sueños y alegrías. A quienes quiero con todo mi corazón.

A mis hermosas sobrinas Itzia y Alia, son lo que me enseña a creer en la bondad, alegría e ingenuidad que todavía existe en el mundo.

A mis grandes amigo(a)s, Cynthia, Nancy, Marín, Nubia, Andrés, Ale, Irma, Oscar, Guille y a todos los que olvido mencionar por los grandes momentos en la juventud (jajaja) y la infinidad de risas y a veces llanto que los acercan a mi corazón. A Lázaro por aguantar mis enojos y sobre todo por impulsarme a terminar este proyecto.

Al Dr. Martín quien sabe todo mi aprecio, sabes que te debo mucho en este trabajo que no siempre lo refleja un papel pero en una profunda admiración sí.

Al Dr. Rogelio Rosas por su infinita ayuda en la conclusión de la tesis y por enseñarme a ser crítica en la discusión de los resultados, pero más importante por ser un buen amigo.

A mis compañeros de laboratorio; María, Hugo, Dr. Raúl, Dr. Julio Cesar, David, Mirza, Carlitos, por hacerme mas amena la estancia, por compartir un poco de su vida, por las lecciones y el gran apoyo académico y personal.

A mis compañeros del trabajo; José, Cesarea, Benilde, Berna, Ara, Rehot por enseñarme otro horizonte nuevo para mi, muchas gracias por la gran paciencia y grandes lecciones.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo y por sus valiosas aportaciones: A la M. en C. Patricia de la Torre por su asistencia en el laboratorio y por su ayuda en la secuenciación automatizada. A la M. en C. Laura Marquéz por su gran apoyo en la obtención de secuencias y por el uso del laboratorio. Al Dr. Cummings por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y ampliar mis conocimientos en esta área.

## **DEDICATORIA**

Al ángel que cuida a nuestra familia y me permite disfrutar mis logros en compañía de las personas que mas amo.

El ignorante afirma, el sabio duda y reflexiona. La sabiduría es  
un adorno en la prosperidad y un refugio en la adversidad.  
Aristóteles

## I. Índice de contenido

<b>I. Índice de contenido.....</b>	<b>8</b>
<b>II. Índice de Figuras.....</b>	<b>9</b>
<b>III. Índice de tablas.....</b>	<b>11</b>
<b>IV. RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>V. ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>VI. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>VII. ANTECEDENTES.....</b>	<b>18</b>
VII.1. Bases de la Sistemática filogenética.....	18
VII.2. Phylum Rotifera.....	22
VII. 3. Clase Monogononta.....	49
VII. 4. Familia Brachionidae.....	51
VII.5. Clasificación de la familia.....	62
<b>VIII. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>IX. OBJETIVOS.....</b>	<b>64</b>
<b>X. METODOLOGÍA.....</b>	<b>65</b>
X.1. Validez del género Plationus.....	67
X.2. Filogenia de la familia Brachionidae.....	69
<b>XI. RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
XI.1. Validez del género Plationus.....	72
XI.2. Filogenia de la familia Brachionidae.....	78
<b>XII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
XII.1. Validez del género Plationus.....	95
XII.2. Filogenia de la familia Brachionidae.....	99
<b>XIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>109</b>
<b>XIV. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>111</b>
<b>XV. REFERENCIAS.....</b>	<b>112</b>
<b>XVI. ANEXOS.....</b>	<b>129</b>

## II. Índice de Figuras

FIGURA 1. FOTOGRAFÍA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LA CORONA DE CILIOS DE <i>EUCHLANIS</i> .	23
FIGURA 2. FOTOGRAFÍA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) DE LA LORICA DE <i>PLATYIAS QUADRICORNIS</i> (A, B, C, D, E, F, G) Y <i>BRACHIONUS VARIABILIS</i> (H, I). LA BARRA INDICA LA ESCALA.	25
FIGURA 3. PARTES EN LA QUE SE DIVIDE EL CUERPO Y PRINCIPALES ESTRUCTURAS QUE COMPONEN A LOS ROTÍFEROS.	27
FIGURA 4. PARTES QUE CONFORMAN AL TROPHI. FULCRUM (F), RAMI (R), MALLEI (M) Y UNCUS (U).	28
FIGURA 5. FOTOGRAFÍAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) DE LOS NUEVE DIFERENTES TIPOS DE TROFI. (A) MALEADO DE <i>BRACHIONUS PLICATLIS</i> . (B) MALEORAMADO DE <i>FILINIA LONGISETA</i> . (C) VIRGADO DE <i>EOTHINIA ELONGATA</i> . (D) CARDADO DE <i>LINDIA TORULOSA</i> . (E) FORCIPADO DE <i>ENCENTRUM ASTRIDAE</i> . (F) INCUDADO DE <i>ASPLANCHNOPUS DAHLGRENI</i> (G) UNCINADO DE <i>STEPHANOCEROS FIMBRIATUS</i> . (H) RAMADO DE <i>PHILODINA CITRINA</i> . (I) FULCRADO DE <i>SEISON NEBALIAE</i> . ABBREVIACIONES: FU: FULCRUM; MA: MANUBRIO; IM: INTRAMALLEUS; PC: MANUBRIO POSTERIOR; RA: RAMI, SM: SUPRAMANUBRIO; UN: UNCL. TOMADO Y MODIFICADO DE: SØRENSEN, 2002; MELONE & FONTANETO, 2005 Y SØRENSEN & GIRIBET, 2006.	30
FIGURA 6. CICLO DE VIDA DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE. N: HAPLOIDE, 2N: DIPLOIDE.	35
FIGURA 7. RELACIONES EVOLUTIVAS DEL GRUPO ROTIFERA SEGÚN MELONE ET AL., (1998) BASADO EN CARACTERES MORFOLÓGICOS, EMBRIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.	40
FIGURA 8. RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL GRUPO MONOGONONTA Y BDELLOIDEA SEGÚN SØRENSEN 2002.	41
FIGURA 9. RELACIONES EVOLUTIVAS DE LAS TRES CLASES DEL GRUPO ROTIFERA (MONOGONONTA, BDELLOIDEA, Y SEISONIDEA Y AL GRUPO ACANTHOCEPHALA.	42
FIGURA 10. RELACIONES EVOLUTIVAS DEL GRUPO MONOGONONTA, BDELLOIDEA Y ACANTHOCEPHALA BASADO EN SECUENCIAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL COMPLETO (GI-SIK MIN & JOONG-KI PARK. 2009).	44
FIGURA 11. RELACIONES FILOGENÉTICAS PROPUESTAS PARA LOS GRUPOS: MONOGONONTA (M), BDELLOIDEA (B), SEISONIDEA (S) Y ACANTHOCEPHALA (A). TOMADO DE GARCIA-VARELA & NADLER (2006). <b>HIPÓTESIS 1</b> , BASADA EN MORFOLOGÍA: PRESENCIA DE LOS LEMNISCOS Y SIMILITUDES EN LA PROBOSIS. (LORENZEN, 1985). <b>HIPÓTESIS 2</b> , BASADA EN MORFOLOGÍA DE LOS ESPERMATÓZOIDES, ESTRUCTURA FINA DE LA EPIDERMIS Y DETALLES EN LA ESTRUCTURA LACUNAR (AHLRICH, 1995, 1997). <b>HIPÓTESIS 3</b> , BASADA EN MORFOLOGÍA Y PRESENCIA/AUSENCIA DE PARTENOGENESIS, IMPREGNACIÓN HIPODÉRMICA, COLÁGENO Y DEDOS CON GLÁNDULAS ADHESIVAS (MELONE ET AL., 1998; NIELSEN, 1995; WALLACE AND COLBURN, 1989). <b>HIPÓTESIS 4</b> , BASADO EN SECUENCIAS DE LA PROTEINA "HEAT SHOCK" DE 82 kDA (MARK WELCH, 2000).	46
FIGURA 12. PARTES QUE COMPONEN AL TROFI MALEADO, R: RAMI, F: FULCRUM, U: UNCUS Y M: MANUBRIUM	52
FIGURA 13. <i>BRACHIONUS HAVANENSIS</i> , 2) <i>BRACHIONUS CAUDATUS</i> .	53
FIGURA 14. FOTOGRAFÍA DE <i>NOTHOLCA ACUMINATA</i> , TOMADA DE MICHAEL PLEWKA, 2011.	54
FIGURA 15. EJEMPLARES DE LA ESPECIE <i>KERATELLA SP.</i>	55
FIGURA 16. EJEMPLAR DE REPRESENTANTE DE LA ESPECIE <i>KELICOTTIA LONGISPINA</i> .	56
FIGURA 17. ÁRBOL DE MÁXIMA VEROSIMILITUD (-LN VEROSIMILITUD DE 5720.1) INFERIDO DE LA BASE DE DATOS COX1. LOS NÚMEROS CERCA DE LOS NODOS INTERNOS MUESTRAN EL VALOR DE LAS FRECUENCIAS DE APOYO (BOOTSTRAP) DE LOS CLADOS.	74
FIGURA 18. ÁRBOL DE MÁXIMA VEROSIMILITUD (-LN VEROSIMILITUD DE 3791.0) INFERIDO DE LA BASE DE DATOS 28S. LOS NÚMEROS CERCA DE LOS NODOS INTERNOS MUESTRAN EL VALOR DE LAS FRECUENCIAS DE APOYO (BOOTSTRAP) DE LOS CLADOS.	76
FIGURA 19. ÁRBOL DE MÁXIMA VEROSIMILITUD DE LA BASE DE DATOS COMBINADA COX1+28S, HO (VALOR -LN VEROSIMILITUD DE 9809.5). LOS NÚMEROS CERCA DE LOS NODOS INTERNOS MUESTRAN EL VALOR DE LAS FRECUENCIAS DE APOYO (BOOTSTRAP) DE LOS CLADOS. LAS DIFERENCIAS ENTRE LAS TRES HIPÓTESIS ALTERNATIVAS: HA1 (VALOR DE -LN VEROSIMILITUD DE 9818.98; p=0.055*), HA2 (VALOR DE -LN VEROSIMILITUD DE 9819.05; p=0.052*) Y HA3 (VALOR DE -LN VEROSIMILITUD DE 9812.65; p=0.178*), *p>0.05 NO SON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.	77
FIGURA 20. ÁRBOL DE MÁXIMA PARSIMONIA (1,342 PASOS) INFERIDO DE LA BASE DE DATOS DEL COX1. EL NÚMERO ADYACENTE A LAS RAMAS INDICA EL PORCENTAJE DE 1,000 BÚSQUEDAS DE BOOSTRAP.	80

FIGURA 21. ÁRBOL DE MÁXIMA VEROSIMILITUD BASADO EN SECUENCIAS DEL <i>Cox1</i> (-LN 5808.8284). EL LARGO DE LAS RAMAS ES PROPORCIONAL A LA SUBSTITUCIÓN DE NUCLEÓTIDOS. EL NÚMERO ADYACENTE A LAS RAMAS INDICA EL PORCENTAJE DE 1,000 BÚSQUEDAS DE BOOTSTRAP.....	82
FIGURA 22. INFERENCIA BAYESIANA CON $10 \times 10^6$ GENERACIONES BASADA EN 619PB. LOS VALORES ADYACENTES A LAS RAMAS INDICAN LA PROBABILIDAD POSTERIOR PARA EL CLADO.....	83
FIGURA 23. ÁRBOL DE MÁXIMA PARSIMONIA (1,620 PASOS) INFERIDO DE LA BASE DE DATOS DEL 28S. EL NÚMERO ADYACENTE A LAS RAMAS INDICA EL PORCENTAJE DE 1,000 BÚSQUEDAS DE BOOTSTRAP. 84	
FIGURA 24. ÁRBOL DE MÁXIMA VEROSIMILITUD BASADO EN SECUENCIAS DEL <i>Cox1</i> (-LN 11413.88). EL LARGO DE LAS RAMAS ES PROPORCIONAL A LA SUBSTITUCIÓN DE NUCLEÓTIDOS. EL NÚMERO ADYACENTE A LAS RAMAS INDICA EL PORCENTAJE DE 1,000 BÚSQUEDAS DE BOOTSTRAP.....	86
FIGURA 25. INFERENCIA BAYESIANA CON $10 \times 10^6$ GENERACIONES BASADA EN 2,893PB. LOS VALORES ADYACENTES A LAS RAMAS INDICAN LA PROBABILIDAD POSTERIOR PARA EL CLADO.....	87
FIGURA 26. ÁRBOL DE MÁXIMA PARSIMONIA (3,001PASOS) INFERIDO DE LA BASE DE DATOS DEL <i>Cox1</i> +28S. EL NÚMERO ADYACENTE A LAS RAMAS INDICA EL PORCENTAJE DE 1,000 BÚSQUEDAS DE BOOTSTRAP.....	89
FIGURA 27. ÁRBOL DE MÁXIMA VEROSIMILITUD BASADO EN SECUENCIAS DEL <i>Cox1</i> +28S (-LN 11413.88). EL LARGO DE LAS RAMAS ES PROPORCIONAL A LA SUBSTITUCIÓN DE NUCLEÓTIDOS. EL NÚMERO ADYACENTE A LAS RAMAS INDICA EL PORCENTAJE DE 1,000 BÚSQUEDAS DE BOOTSTRAP. .	90
FIGURA 28. ÁRBOL DE INFERENCIA BAYESIANA DE LA BASE DE DATOS <i>Cox1</i> +28S CON $20 \times 10^6$ GENERACIONES BASADA EN 3,512PB. LOS VALORES ADYACENTES A LAS RAMAS INDICAN LA PROBABILIDAD POSTERIOR PARA EL CLADO.....	92
FIGURA 29. A) ÁRBOL OBTENIDO DE GIRIBET ET. AL., 2004 MOSTRANDO LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS DE DOS ESPECIES ( <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i> Y <i>NOTHOLCA</i> ) REPRESENTANTES DE DOS GÉNEROS DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE. B) ACERCAMIENTO DE LA RAMA QUE CONTIENE A LOS REPRESENTANTES DE BRACHIONIDAE. EN AZUL SE ILUSTAN A LAS DOS ESPECIES PERTENECIENTES A <i>BRACHIONUS</i> Y <i>NOTHOLCA</i> .....	100
FIGURA 30. ÁRBOL TOMADO Y RECORTADO PARA FINES DE VISUALIZACIÓN DE SØRENSEN & GIRIBET, 2006 BASADO EN CARACTERES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES MOSTRANDO LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS DE CINCO ESPECIES DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE. LOS CUADROS EN ROJO MUESTRAN LA POSICIÓN POLIFILÉTICA DE DICHAS ESPECIES.....	101
FIGURA 31. ÁRBOL TOMADO Y RECORTADO PARA FINES DE VISUALIZACIÓN DE SØRENSEN & GIRIBET, 2006 BASADO EN CARACTERES MORFOLÓGICOS MOSTRANDO LAS RELACIONES MONOFILÉTICAS DE CINCO ESPECIES DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE. EL CUADRO EN ROJO MUESTRAN LA POSICIÓN DE DICHAS ESPECIES.....	102
FIGURA 32. ÁRBOL TOMADO DE SØRENSEN, 2002 BASADO EL ANÁLISIS DE LOS CARACTERES QUE CONFORMAN EL TROFI Y EL CUAL MOSTRA UNA POLITOMÍA EN EL CLADO DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE, EPIPHANIDEA Y PROALIDAE SEÑALADO CON ROJO.....	103
FIGURA 33. CARACTERES MORFOLÓGICOS QUE COMPARTEN LAS ESPECIES DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE Y EPIPHANIDAE. TOMADO DE SØRENSEN, 2002. A) <i>E. SENTA</i> , RAMI FENESTRADO, B) SUBUNCUS ESCLEROFILAR, C) <i>B. STYLATA</i> D) <i>E. SENTA</i> .....	104
FIGURA 34. ÁRBOL TOMADO Y RECORTADO PARA FINES DE VISUALIZACIÓN DE GARCÍA-VARELA, 2006 BASADO EN BASES DE DATOS DE CARACTERES MOLECULARES. SE OBSERVAN EN ROJO LAS RELACIONES ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>BRACHIONUS</i> Y <i>EPHIPANES</i> .....	105

### III. Índice de tablas

TABLA 1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS NUEVE PRINCIPALES TIPOS DE TROFI. ....	29
TABLA 2.	ESTUDIOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE ROTÍFEROS DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE EN MÉXICO. ....	61
TABLA 3.	ESPECIES ANALIZADAS EN ESTE ESTUDIO. ND= NO DETERMINADO, * NÚMERO DE ACCESO DEL GENE BANK. ....	73
TABLA 4.	ESPECIES ANALIZADAS EN ESTE ESTUDIO. ND= NO DETERMINADO, * NÚMERO DE ACCESO DEL GENE BANK. ....	79
TABLA 5.	INFORMACIÓN DE LAS BASES DE DATOS UTILIZADA EN LA RECONSTRUCCIÓN DE LAS HIPÓTESIS FILOGENÉTICAS CON EL MÉTODO DE MÁXIMA PARSIMONIA. ....	81
TABLA 6.	INFORMACIÓN DE LAS BASES DE DATOS PARA LA RECONSTRUCCIÓN DE HIPÓTESIS FILOGENÉTICAS CON EL MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD. ....	81
TABLA 7.	PRUEBA DE SHIMODAIRA & HASEGAWA (HS). HA: FORZANDO A BRACHIONIDAE COMO GRUPO MONOFILÉTICO. H <sub>0</sub> : Y NUESTRO MEJOR ÁRBOL OBTENIDO DE LA BASE DE DATOS COX1. ....	93
TABLA 8.	PRUEBA DE SHIMODAIRA & HASEGAWA (HS). HA: FORZANDO A BRACHIONIDAE COMO GRUPO MONOFILÉTICO. H <sub>0</sub> : Y NUESTRO MEJOR ÁRBOL OBTENIDO DE LA BASE DE DATOS 28S. * <i>p</i> <0.05. ....	94
TABLA 9.	PRUEBA DE SHIMODAIRA & HASEGAWA (HS). HA: FORZANDO A BRACHIONIDAE COMO GRUPO MONOFILÉTICO. H <sub>0</sub> : Y NUESTRO MEJOR ÁRBOL OBTENIDO DE LA BASE DE DATOS COX1+28S. * <i>p</i> <0.05. ....	94
TABLA 10.	DISTANCIAS GENÉTICAS INTERESPECÍFICAS DE LOS GÉNEROS DE LA FAMILIA BRACHIONIDAE. EL * GÉNEROS CUYAS DISTANCIAS NO SE AVALUARON DEBIDO YA QUE SOLO CUENTAN CON UNA ESPECIE. ....	108

#### IV. RESUMEN

La familia Brachionidae es una de las más diversas del phylum Rotifera. Diferencias en caracteres morfológicos se han usado para clasificar a las 217 especies en siete géneros. Actualmente no se entienden las relaciones evolutivas de los géneros que comprenden a la familia, lo cual genera problemas de clasificación como es el caso del género *Plationus*. El género *Plationus*, conformado por las especies *Plationus patulus*, *P. patulus macracanthus*, *P. polyacanthus* y *P. felicitas* generó gran controversia debido a que con base en caracteres morfológicos y ecológicos, las especies pueden asignarse alternativamente en el género *Brachionus* o en el género *Platyias*. En contraste, estudios basados en microscopia electrónica de barrido del trofi, han asignado este taxón en un género nuevo llamado *Plationus*. En el presente estudio se utilizaron Métodos de Parsimonia, Máxima Verosimilitud y Bayesianos basados en caracteres moleculares (*Cox1* y 28S) para probar la posición filogenética de la familia Brachionidae. En general los resultados mostraron que se trata de un agrupamiento parafilético/polifilético dependiendo de la base de datos utilizada, que integra al grupo externo *Epiphanes*. Esto apoya algunos trabajos que han abordado la filogenia de Rotifera basados en caracteres morfológicos y moleculares (Sørensen, 2002; Sørensen & Giribet, 2006; García-Varela & Nadler, 2006). Además, se abordó el problema de la validez del género *Plationus* a través de análisis Bayesianos y de Máxima Verosimilitud, basados en secuencias de genes *Cox1* y de la región D2+D3 de la subunidad 28S de los genes ribosomales. Los resultados apoyaron la hipótesis de Segers (1993), en el sentido que las especies *Plationus patulus*, *P. patulus macracanthus*, *P. polyacanthus* y *P. felicitas* pertenecen a un género independiente a

*Brachionus* y a *Platyias*, lo cual apoya la validez de *Platinius* como género nuevo. Este trabajo es de los primeros que utilizan el gen 28S para resolver las relaciones filogenéticas de los rotíferos. Este gen, cuya tasa de evolución no es muy alta combinado con uno de tasa más rápida como es el *Cox1* da mejores resultados en cuanto a la resolución de los clados interespecíficos e intraespecíficos.

## V. ABSTRACT

The Brachionidae is one of the most diverse families of Rotifera. Differences in the morphologic characters have been used to classify the 217 species within seven genera. Currently, the evolutionary relationships among the genera included in the family are not well understood, which results in classification problems, i.e. like genus *Plationus*. Genus *Plationus*, composed by species: *Plationus patulus*, *P. patulus macracanthus*, *P. polyacanthus* and *P. felicitas* is still controversial, as the analysis of morphologic and ecological characters have resulted in the inclusion of the species either within *Brachionus* or *Platyias*. In contrast, scanning electronic microscopy studies of trophi, have resulted in the definition of a new genus called *Plationus*. In the present study, we used parsimony, maximum likelihood and Bayesian methods for the molecular characters (*Cox1* and 28S) analysis to evaluate the phylogenetic position of Brachionidae. Our results showed that Brachionidae is a paraphyletic/polyphyletic group depending on the used database, that includes the outgroup specie *Epiphanes senta*. This is also supported by previous analyses of Rotifera phylogeny based on molecular and morphological characters (Sørensen, 2002; Sørensen & Giribet, 2006); García-Varela & Nadler, 2006). Moreover, the validity of the *Plationus* genus was also approached through Bayesian and maximum likelihood analysis, based on sequence from *Cox1* genes and region D2+D3 of 28S rRNA. The results supported the hypothesis of Segers (1993), in the sense that *Plationus patulus*, *P. p. macracanthus*, *P. polyacanthus* and *P. felicitas* belong to a separate genus, which supports the validity of *Plationus* as a new genus. A nuclear ribosomal gene (28S) was used for the first time as a molecular marker to determine differences/similarities among Brachionidae species. 28S gene,

which evolves slowly combined with the rapid evolving *Cox1* showed better resolution and bootstrap support for inter and intraspecific relationships.

## VI. INTRODUCCIÓN

La taxonomía y los esquemas filogenéticos propuestos para los seres vivos han sido basados principalmente en el estudio de caracteres morfológicos, fisiológicos y embriológicos. Recientemente, los estudios de sistemática molecular han tenido un fuerte impacto en la definición de las relaciones genealógicas entre los invertebrados. Los marcadores moleculares más utilizados en la actualidad son los genes ribosomales 18S y 28S, así como genes mitocondriales como el *Cox1*, considerados como la columna vertebral en la filogenia de los metazoarios (Woese, 1987; Morris, 1993; Wainright, *et al.*, 1993; Patterson, *et al.*, 1993; Littlewood *et al.*, 1998; Giribet *et al.*, 2000). Su uso se ha difundido debido a la presencia de regiones conservadas y variables que son usadas para diferenciar desde taxa superiores hasta especies.

En la mayoría de los seres vivos los genes ribosomales se encuentran en cadenas de más de cien copias lo que facilita su detección y caracterización. Además, hay grandes grupos de copias vecinas que recombinan continuamente lo que homogeniza las secuencias nucleotídicas de todas las copias (Hillis & Dixon, 1991). Las regiones codificadoras de genes ribosomales nucleares muestran una baja tasa de cambios. Por ello se usan como marcadores moleculares para investigar las relaciones de organismos altamente divergentes ya sea phyla, clases o familias. El estudio de las secuencias de las subunidades menor y mayor de los genes ribosomales son también utilizadas para dar apoyo o rechazar hipótesis filogenéticas (Littlewood *et al.*, 1998; Giribet *et al.*, 2000; Mallatt *et al.*, 2004).

Otros genes usados en la sistemática filogenética son los genes mitocondriales, que se heredan por vía materna y que presentan una alta tasa de mutación, lo que permite aplicarlos para el análisis de especies cercanas, complejo de especies o

poblaciones. De hecho proyecto denominado *Código de barras de la vida* utiliza este tipo de identificación para distinguir y clasificar a los organismos mediante la secuencia de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (*Cox1*).

En el presente estudio se propusieron las hipótesis de relaciones filogenéticas para la familia Brachionidae con base en características morfológicas y moleculares tratando de aclarar la controversias al respecto a la definición del género *Plationus*. Para ello, se secuenciaron y analizaron los genes nucleares (28S del RNA Ribosomal) y mitocondriales (subunidad I de la citocromo c oxidasa), así como las características morfológicas distintivas de las especies (mastax, lórica, corona y pie). A partir de las relaciones filogenéticas obtenidas del análisis de Máxima Verosimilitud (ML) se analizaron las relaciones de parentesco entre las especies, los géneros y la familia. Con los resultados obtenidos se propone una nueva clasificación y se apoyan las relaciones filogenéticas entre los géneros *Plationus* y *Paranuraeopsis*.

## VII. ANTECEDENTES

### *VII.1. Bases de la Sistemática filogenética*

El reconocimiento de la diversidad como producto de la evolución, hizo a Charles Darwin proponer una clasificación estrictamente basada en la ancestría y descendencia de los organismos. Con ello surgió la sistemática, disciplina de la biología comparada que estudia la clasificación de las especies con base a su historia evolutiva (filogenia). La sistemática debe cubrir tres funciones sustantivas; el primero es el reconocimiento de la biodiversidad, el segundo es el análisis de las relaciones filogenéticas entre las especies y el tercero es la elaboración de una clasificación que refleje la historia evolutiva (filogenia) de las mismas.

Los principios y conceptos de la sistemática filogenética (también denominada cladismo) se formalizaron en 1950 con la obra “*Elementos de una sistemática filogenética*” del entomólogo Willi Hennig. El concepto detrás del método consiste en comparar especies, empleando caracteres que evidencien una historia evolutiva compartida. Esto significa, establecer las relaciones de hermandad entre las especies, asumiendo que las similitudes (los caracteres derivados compartidos; sinapomorfias) reflejan el parentesco entre ellas bajo el principio de la parsimonia, es decir, la elección del cladograma o árbol filogenético que explica la filogenia de un grupo con el menor número de cambios evolutivos. El resultado de la aplicación de este método es un diagrama de ramificación denominado cladograma, el cual muestra la historia evolutiva de un grupo de interés (Eliosa & Navarro, 2005).

Estas ideas han sido desarrolladas y seguidas por numerosos autores, cuyo objetivo es probar la monofilia en los distintos niveles jerárquicos. De acuerdo al

cladismo, un grupo monofilético es aquel que comprende a la especie ancestral y a todos sus descendientes.

La cladística ha sido el método más empleado para llevar a cabo estudios de inferencia filogenética. En la actualidad, el uso de caracteres moleculares ha promovido la aparición de otros métodos de inferencia filogenética basados en simulaciones estadísticas que incluyen información acerca del modelo de evolución (sustituciones de nucleótidos) más probable, que pudo dar origen a la matriz de datos que se está empleando. Dentro de estos métodos se encuentran la máxima verosimilitud (ML) y los análisis bayesianos (BI).

Cabe señalar que cuando se infiere una hipótesis filogenética, el taxónomo debe considerar que el resultado es sólo una hipótesis, ya que las relaciones evolutivas verdaderas quedan ocultas en el pasado (Goyenechea et. al., 2009).

### ***Importancia de la sistemática filogenética***

Las clasificaciones no solo son archivos de información, sino también hipótesis acerca de los patrones de la biodiversidad. Por ende, la importancia de la sistemática no solo radica en el conocimiento de la biodiversidad, sino también en el conocimiento de la historia biológica de los organismos. La determinación confiable de las especies en una filogenia, es de gran importancia en áreas como la medicina, en donde es vital la correcta identificación de las especies que afectan a los paciente en infecciones parasitarias, piquetes de arácnidos, mordeduras de serpientes y en intoxicaciones por hongos, entre otras (Eliosa & Navarro, 2005).

La sistemática también es de gran utilidad en labores de conservación de la biodiversidad, ya que influye en los criterios de selección para determinar áreas prioritarias de conservación, así como las especies a conservar. Esto se debe a que para maximizar la conservación de la biodiversidad no resulta suficiente considerar el mayor número de especies *per se*, si no que se debe representar la mayor parte de los grupos del “árbol de la vida” (existe solamente un árbol único de la vida, que comienza con el primer ser vivo sobre la Tierra y termina con todas las especies de organismos que existen en la actualidad ). En otras palabras, se debe conservar el mayor número de historias evolutivas posibles.

#### ***Sistemática molecular en las clasificaciones.***

La clasificación de las especies no es una tarea fácil ya que se debe considerar su morfología, fisiología, etología, ecología, entre otras características. Sin embargo, Hebert (2003) argumenta que las clasificaciones basadas en morfología presentan cuatro limitantes principales. Primera: plasticidad fenotípica como la variabilidad genética de los caracteres usados para reconocer a las especies pueden llevar a una identificación incorrecta. Segunda: este tipo de clasificación no toma en cuenta a las especies crípticas, las cuales son comunes en algunos grupos y se definen por ser fenotípicamente similares y genotípicamente diferentes (Knowlton, 1993; Pfenninger & Schwenk, 2007). Tercero: la mayoría de las claves basadas en caracteres morfológicos resultan eficientes para ciertos estadios de desarrollo y algunos géneros. Cuarta: la elaboración de claves de identificación demanda un gran número de taxónomos expertos en el área.

Dichas limitantes en las identificaciones de los organismos basadas en los caracteres morfológicos, aunado a la carencia de taxónomos especialistas para identificar a las 15 millones de especies estimadas por Hammond (1992) y Hawksworth & Kalin-Arroyo (1995) han promovido el uso de técnicas moleculares como una nueva herramienta de identificación basadas en microgenómica.

En algunos animales el ADN mitocondrial (mtADN) es un genoma relativamente pequeño (15-20kb), el cual contiene 37 genes en vertebrados. Estos genes tienen a sus homólogos en los mtADN's de plantas, hongos y protistas (Boore & Brown, 1994; Levings & Vasil, 1995; Gray *et. al.*, 1998; Paquin *et. al.*, 1997).

Las secuencias de los genes mitocondriales en animales evolucionan rápidamente y los arreglos en sus genes permanecen a menudo sin cambios por grandes periodos de tiempo. Con algunas excepciones, dichos arreglos son relativamente estables entre especies de grupos mayores (phylum), pero muy variable entre phyla. Su comparación, tuvo un gran potencial para resolver las ramas más profundas en la filogenia de los metazoarios (Boore, 1999). Así mismo, las combinaciones en los arreglos genéticos, hacen prácticamente imposible que dos taxa que evolucionan independientemente adquieran un estadio idéntico y si así fuese, sería poco probable que se debe a convergencias.

En el 2003, Paul Hebert propuso que un fragmento de 640 pares de bases del ADN mitocondrial que codifica para la Citocromo Oxidasa subunidad 1 (*Cox1*) en la cadena respiratoria, es distinto y único en cada especie. Dicho fragmento de 640 nucleótidos presenta algunas ventajas en la construcción de hipótesis filogenéticas. Primera, los iniciadores “*primers*” diseñados por Folmer *et al.*, (1994) son muy conservados, ya que amplifican en una amplia variedad de taxa, incluyendo a los rotíferos (Reyna-Fabián *et. al.*, 2010; Birky *et. al.*, 2005). Segunda, la señal

filogenética (relación ancestro-descendiente) es más informativa que en cualquier otro gen mitocondrial, ya que al ser un gen codificante provee una mejor resolución en las ramas más profundas del cladograma, distinguiendo entre las poblaciones de las especies (Birky, 2007).

Otras ventajas en la construcción de hipótesis filogenéticas basadas en genes codificantes son:

- 1.- Se pueden distinguir los cambios sinónimos de los no-sinónimos con el fin de distinguir los efectos de la selección natural de las mutaciones y deriva génica.
- 2.- En genes mitocondriales haploides, se obtienen secuencias de los productos amplificados sin necesidad de clonarlos para distinguir entre los dos alelos del gen.
- 3.- Es difícil confundir los resultados de los análisis filogenéticos basados en genes mitocondriales en comparación con los genes parálogos, ya que los eventos de duplicación y delección de genes son eventos poco comunes en el DNA mitocondrial de animales (Boore, 1999).

## ***VII.2. Phylum Rotifera***

### ***Características generales***

El nombre rotíferos deriva del latín, *rota* “rueda” y *ferre* “portar o cargar”, es decir portador de ruedas (Wallace & Snell, 1991). Presentan una corona de cilios en la cabeza, la cual es un órgano rotatorio con forma de disco compuesto por dos bandas concéntricas ciliadas llamadas trocus y cingulo (Figura 1). Los movimientos metacrónicos de los cilios en la corona parecen dos ruedas moviéndose, por lo cual

recibe el nombre de Rotífero. Esta corona tiene un papel determinante en la mayoría de las actividades vitales como la locomoción, natación, captura de alimento, defensa y reconocimiento coespecífico (Remane *et. al.*, 1980; Climent & Wurdak, 1994).



Figura 1. Fotografía de microscopia electrónica de barrido de la corona de cilios de *Euchlanis*.

Estos organismos presentan un número fijo de células (eutelia), entre 900 y 1000 que no cambian entre los integrantes de una misma especie (Segers, 1992). Asimismo, también son capaces de soportar variaciones de temperatura comprendidas entre 40°C hasta -272°C.

Los rotíferos son organismos pseudocelomados, microscópicos de 25-250 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) de longitud, con simetría bilateral. Los de vida libre habitan en ambientes marinos, dulceacuícolas y en rocas o musgos que retienen humedad. Algunos géneros (*Synchaeta*, *Keratella*, *Notholca*) pueden vivir en lagunas costeras con bajos niveles de salinidad (Koste, 1978; Nogrady *et al.*, 1993).

Otras especies son parásitas de crustáceos, holoturias, anélidos, etc. La mayoría de estos organismos son solitarios, aunque 25 especies forman colonias de diversos tamaños (Wallace, 1987). Actualmente, con base en las características morfológicas los

rotíferos están clasificados en 120 géneros con cerca de 2,030 especies clasificadas en tres clases: Monogononta con aproximadamente 1,570 spp, Bdelloidea con cerca de 461 spp y Seisonidea con 3 spp (Nogrady *et al.*, 1993; Sørensen, 2006; Segers, 2007).

Los rotíferos de vida libre son consumidores primarios en las cadenas tróficas acuáticas y se alimentan principalmente de detritus, bacterias, fitoplancton y levaduras. Juegan un papel importante en la transferencia de carbono de la red alimentaria microbiana (bacterias y cianobacterias, flagelados y ciliados) a la cadena alimenticia de algas, crustáceos y peces (Ooms, 1998).

A la pared del cuerpo de estos organismos se le denomina lórica, la cual está cubierta por una cutícula elástica y en algunas especies puede ser rígida, en forma de placas. La lórica es una lámina gruesa que cubre el tronco, espinas, apéndices y en algunos casos el pie (Figura 2). Es un sincitio delgado y uniforme en el cual hay núcleos embebidos en el citoplasma a intervalos regulares. Por debajo hay una capa de espesor variable llamada lámina intracitoplasmática. En algunas especies (organismos loricados) la mayor parte del integumento es grueso y en algunas otras es delgado y flexible (organismos iloricados) (Serranía-Soto, 2006), lo cual depende del número de filamentos proteicos embebidos en la pared del cuerpo (Wallace *et. al.*, 2006).

La estructura de la lórica y de sus apéndices son caracteres de importancia en la clasificación de las especies. Los apéndices de la lórica son relevantes ya que proporcionan la capacidad de flotación a las especies planctónicas o como defensa frente a sus depredadores como en el caso de la especie *Brachionus calyciflorus*.

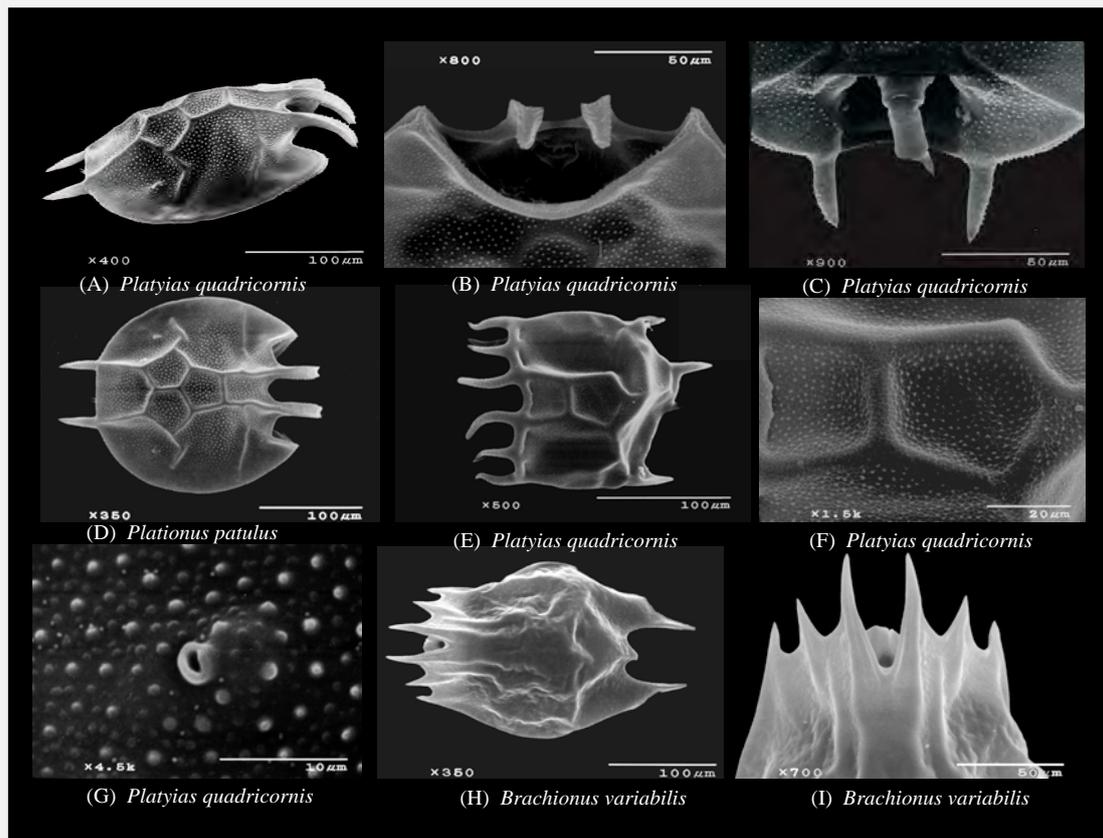


Figura 2. Fotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la lorica de *Platyias quadricornis* (A, B, C, D, E, F, G) y *Brachionus variabilis* (H, I). La barra indica la escala.

Los rotíferos de la clase Bdelloidea son capaces de sobrevivir a una pérdida de agua corporal mediante un estado de aletargamiento llamado “anhidrobiosis”. Este estado es causado por la pérdida de agua debida a evaporación, lo que requiere que el animal haga ajustes metabólicos como el reemplazo del agua por azúcar que actúa como un anticongelante (Crowe, 1971; Keilin, 1959). El metabolismo se detiene mientras el organismo espera a que desaparezcan las condiciones desfavorables como la infección por hongos, ausencia de agua, entre otras.

Esta clase de rotíferos se distinguen de otros organismos resistentes a desecación, ya que no producen trehalosa, un azúcar doble (disacárido) que contribuye a la protección en la reconstrucción celular contra el daño causado por la desecación. En cambio las proteínas involucradas en este tipo de adaptación son más importantes que los compuestos químicos presentes. Por ejemplo, *Philodina roseola* sintetiza una abundante proteína hidrofílica relacionada en la embriogénesis tardía (LEA), en la desecación en plantas. Este tipo de proteínas, LEA, han sido encontradas en la desecación de los nemátodos y otros microorganismos capaces de sobrevivir en ausencia de agua. Tal parece que el tipo de biosíntesis de proteínas hidrofílicas representan un elemento común entre los organismos con anhidrobiosis (Tunnacliffe *et. al.*, 2005).

Los rotíferos bdelloideos también son capaces de resistir a una radiación ionizante extrema (RI), lo cual parece ser una consecuencia en su adaptación evolutiva para sobrevivir a episodios de desecación en condiciones ambientales desfavorables y para reparar el ADN de la fragmentación que se da en el proceso de rehidratación en la anhidrobiosis (Gladyshev & Meselson, 2008).

El cuerpo de los rotíferos se divide en tres regiones: cefálica, intermedia y posterior, las cuales se describen a continuación (Figura 3).

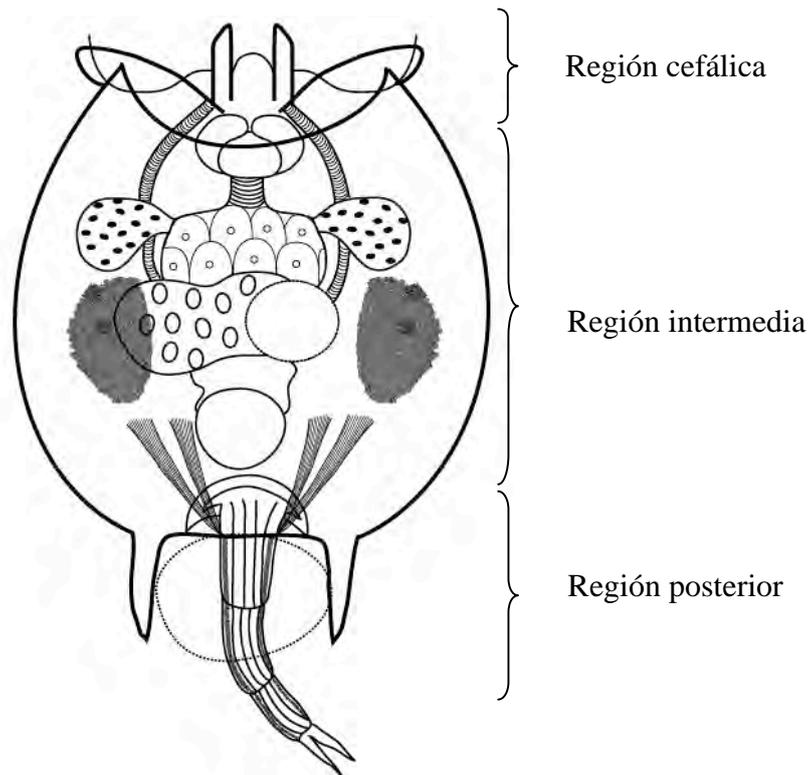
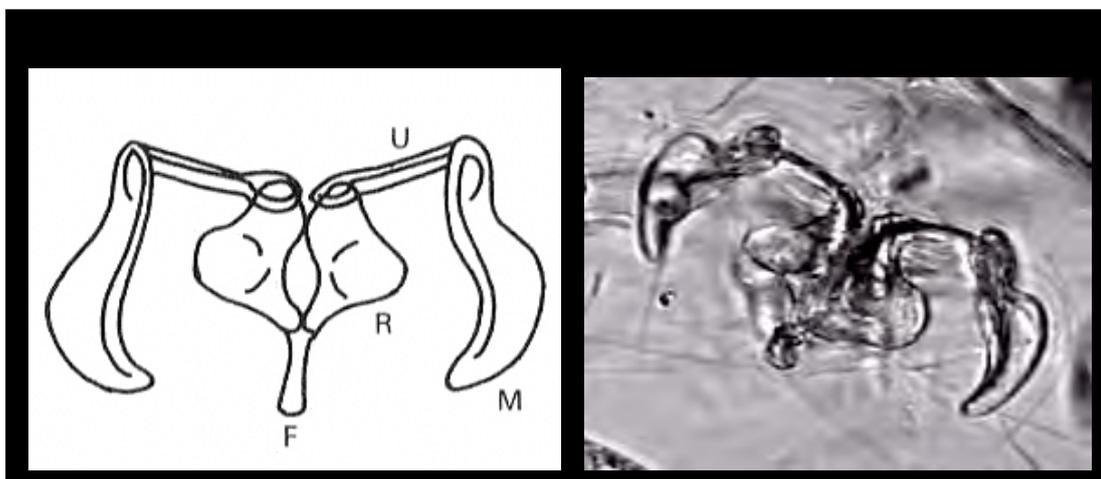


Figura 3. Partes en la que se divide el cuerpo y principales estructuras que componen a los rotíferos.

**Región cefálica:** Esta región contiene a la corona de cilios que rodea a la boca y es utilizada en la locomoción y captura de alimentos. El mastax es un tubo muscular donde se tritura el alimento. Se compone de un complejo de mandíbulas de quitina llamadas trofi. El trofi presenta dos unidades funcionales: el incus y el maleus. El incus está compuesto del fulcrum (impar) y dos ramas laterales. El incus está formado por dos pares de piezas móviles, cada una en un soporte (manubrio) terminado por uno o varios dientes articulados (uncus) Figura 4. El tamaño y la forma del trofi se relacionan con el tipo de alimentación que presenta cada una de las especies y las diferencias en tamaño y forma son usadas como caracter taxonómico diagnóstico en las familias de los rotíferos (Markevich & Kutikova, 1989).



*Figura 4.* Partes que conforman al trophi. Fulcrum (F), Rami (R), mallei (M) y uncus (U).

Debido a su tamaño tan pequeño, los elementos que componen al trophi son difíciles de observar en un microscopio estereoscópico, por lo que el microscopio electrónico de barrido (SEM) es una excelente herramienta alternativa para estudiar estas estructuras (e.g., Markevich, 1985, 1989; Markevich & Kutikova, 1989).

Se reconocen nueve diferentes tipos de trophi (Tabla 1) y algunas formas intermedias. En la clase Monogononta se describen siete tipos: maleado, maleoramado, virgado, cardado, forcipado, incudado y uncinado que se diferencian en tamaño y forma de las piezas que lo conforman (Figura 5). En las especies de la clase Bdelloidea el trophi es del tipo ramado (Figura 5H), mientras que los Seisonidea se caracterizan por tener un tipo especial de trophi fulcrado (Figura 5I) (Sørensen y Giribet, 2006).

Tipo de trofi	Características	Grupos que lo presentan
Ramado	Caracterizado por la presencia de series de dientes que forman las placas del unci. Estos dientes no son de tamaño uniforme; 1-10 dientes presentes en cada placa (Donner, 1965). Se reconocen algunas diferencias en el trofi dentro de las especies como el número de los dientes presentes en el unci, el cual es un caracter taxonómico diagnostico.	Orden: Bdelloidea.
Fulcrado	Consiste de una pieza alargada denominada fulcrum, en cuya parte anterior se encuentran fijos un par de manubrios en forma de hoja.	Orden: Seisonidea.
Maleado	Unci y mallei estan bien desarrollados y funcionales. El uncus tiene de 4 a 7 dientes grandes. El ramus es grande y posee dientes a lo largo del margen con lo cual se muele el alimento.	Orden: Monogononta Presente en los géneros: <i>Kellicottia</i> , <i>Keratella</i> y <i>Brachionus</i> de la familia Brachionidae.
Maleoramado	Es muy parecido al mastax maleado, excepto por que los rami poseen dientes muy fuertes y los unci tienen una serie de dientes pequeños.	Orden: Monogononta Se encuentra solo en el orden Flosculariacea..
Virgado	Este tipo de trofi está especializado para perforar y bombear el fluido de las células vegetales o presas animales capturadas como alimento. El fulcrum es largo. Los rami son placas anchas triangulares. El uncus tiene uno o dos dientes.	Orden: Monogononta. Presente en las familias: Gastropodidae, Notommatidae, Synchaetidae y Trichocercidae.
Cardado	La función de este trofi es perforar y succionar a las presas. El fulcrum y el manubrio son generalmente largos. Los rami son fuertes, con una proyección en la parte basal denominada álula. El uncus tiene dientes muy desarrollados.	Orden: Monogononta. Presente en la familia Lindiidae.
Forcipado	Este mastax es semejante a unas pinzas. El fulcrum y el manubrio están muy desarrollados. El uncus funciona como mandíbulas. Toda la estructura puede ser proyectada hacia fuera para atrapar a la presa.	Orden: Monogononta. Presente en la familia Dicranophoridae.
Incurado	El incus y el manubrio son muy pequeños. Sin embargo el ramus es muy desarrollado. Esta estructura asemeja a una pinza.	Orden: Monogononta. Presente en la familia Asplanchnidae.
Uncinado	El uncus tiene muy pocos dientes y uno de ellos es más desarrollado. El fulcrum es relativamente pequeño.	Orden: Monogononta. Presente en la familia Collotheidae.

Tabla 1. Características de los nueve principales tipos de trofi.

El mastax es seguido por el esófago, de longitud corta que se comunica con el estómago. En el extremo anterior del estómago se encuentran un par de bolsas llamadas glándulas gástricas, cuyas secreciones ayudan en la digestión del alimento.

De esta región cefálica también parte el sistema nervioso de tipo ortogonal, el cual consta de receptores sensoriales y un cerebro dorsal situado por encima de la faringe del cual se derivan dos cordones longitudinales que se fusionan en un ganglio en la parte posterior del cuerpo. En la región apical de muchas especies se localiza un órgano retrocerebral, el cual consiste de un par de glándulas y un saco cuya función es desconocida. Los ductos del órgano retrocerebral llegan hasta la superficie de la corona (Wallace, 2001).

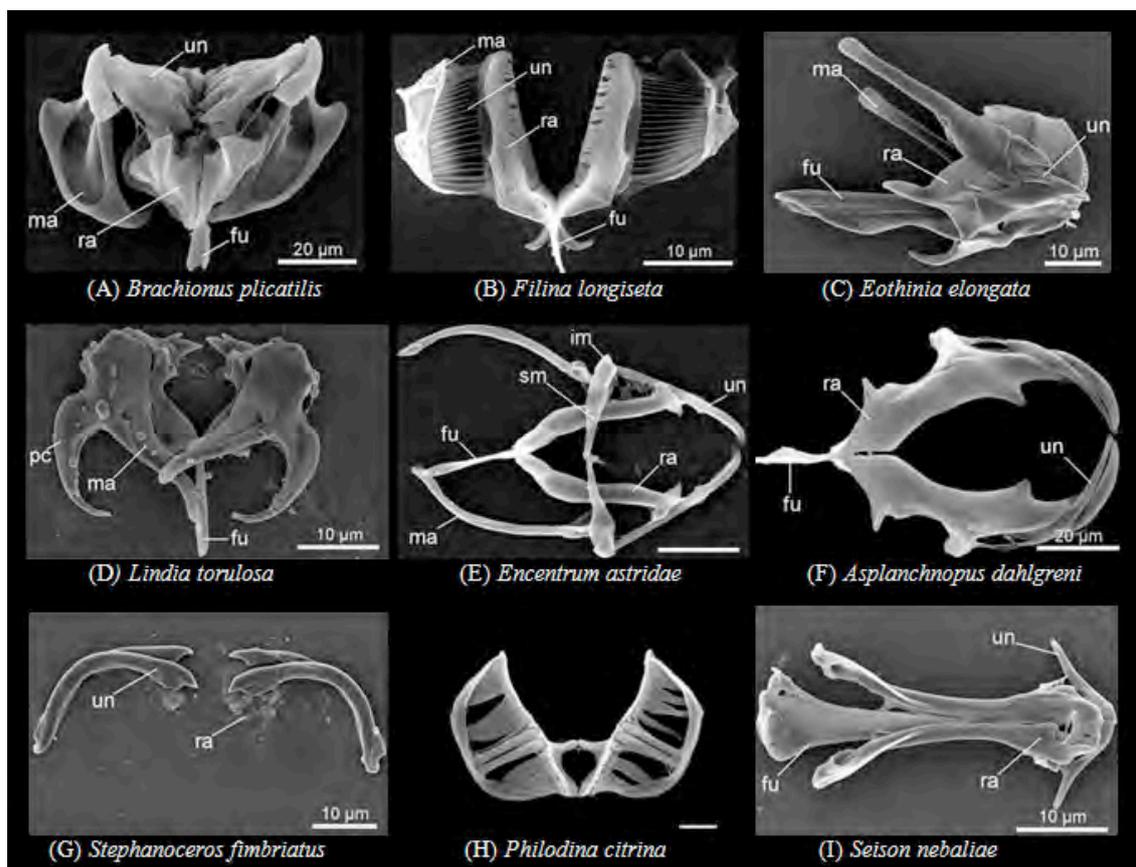


Figura 5. Fotografías de microscopía electrónica de Barrido (SEM) de los nueve diferentes tipos de trofi. (A) **Maleado** de *Brachionus plicatilis*. (B) **Maleoramado** de *Filinia longiseta*. (C) **Virgado** de *Eothinia elongata*. (D) **Cardado** de *Lindia torulosa*. (E) **Forcipado** de *Ecentrum astridae*. (F) **Incudado** de *Asplanchnopus dahlgreni* (G) **Uncinado** de *Stephanoceros fimbriatus*. (H) **Ramado** de *Philodina citrina*. (I) **Fulcrado** de *Seison nebaliae*. Abreviaciones: fu: fulcrum; ma: manubrio; im: intramalleus; pc: manubrio posterior; ra: rami, sm: supramanubrio; un: unci. Tomado y modificado de: Sørensen, 2002; Melone & Fontaneto, 2005 y Sørensen & Giribet, 2006.

**Región intermedia:** En ella se encuentran: el intestino, los protonefridios y el aparato reproductor. El intestino es corto, dirigido hacia el extremo posterior del animal que desemboca al exterior a través del ano, el cual se encuentra en el extremo de una cloaca que consiste en una región donde desemboca el intestino, los conductos excretores y los gonoductos.

El sistema excretor está formado por un par de protonefridios (*protos*: primer, *nephros*: riñón) localizados a cada lado del cuerpo y se encuentran compuestos de un par de túbulos en donde desemboca un número determinado de células en flama, cuyo número oscila entre cuatro y hasta más de cien dependiendo de la especie. Dichas células en flama poseen numerosos cilios hacia la luz del túbulo, con los cuales se crean corrientes hacia el interior de los túbulos. Estos túbulos se llenan de líquido a través de pequeños retículos de citoplasma localizados cerca de donde se inserta cada una de las células en flama. El líquido es transportado a una vejiga que desemboca en la parte posterior del intestino (en la cloaca).

En algunos géneros de rotíferos no hay vejiga y cada conducto desemboca directamente en la cloaca. La principal función del aparato excretor es mantener el equilibrio hídrico del organismo, ya que al ser la mayoría dulceacuícolas y coleccionar un gran volumen de agua en el interior del organismo, ésta debe ser reabsorbida y expulsada.

El aparato reproductor masculino está formado por un testículo a nivel del tronco de donde parte un espermiducto o conducto eferente dirigido a la región posterior, en el cual se encuentran glándulas prostáticas. Éste puede ser evaginado cumpliendo la función de un pene. En el extremo posterior se encuentra el orificio genital del organismo.

El aparato reproductor femenino se compone de uno o dos germovitelarios, un ovario y vitelario (interviene en la formación de vitelo). El término germovitelario se refiere a que el ovario (óvulos) y el vitelario (nutrientes para el huevo) están envueltos dentro de una misma bolsa. El ovario da origen a 20 óvulos, sin embargo el número puede variar dependiendo del número de núcleos que presenta el ovario.

**Región posterior:** Está compuesta por espinas o por un pie que contiene un órgano de fijación tubular que secreta sustancias adherentes. El pie es un órgano que se encuentra en la parte posterior ventral del cuerpo. Posee glándulas pedales las cuales tienen conductos de salida cerca de los dedos o proyecciones del pie. Puede presentar uno o seis dedos, los cuales pueden estar parcialmente fusionados. Su función es la adhesión temporal del organismo a algún sustrato (Wallace & Snell, 1991).

En este tipo de organismos los órganos respiratorios no están diferenciados por lo que el intercambio gaseoso se produce a través de la pared exterior del cuerpo, razón por la cual son incapaces de vivir en medios anaerobios. Tampoco presentan un sistema circulatorio, por lo que el transporte interno de nutrientes y aire se lleva a cabo mediante los líquidos del pseudoceloma.

La musculatura está compuesta de bandas de músculo liso y estriado arreglados longitudinalmente e insertados en el tegumento o en las vísceras. Estas bandas pueden arreglarse de forma compleja y actúan en conjunto con el líquido contenido en la cavidad del cuerpo para dar origen a los movimientos del animal.

Los movimientos rápidos y vigorosos de algunas especies están dados por las proyecciones del cuerpo en forma de hojas deslizantes o espinas, las cuales se encuentran asociadas con músculos en la base del cuerpo lo que les permite desplazarse hasta 100 veces más rápido al promedio durante la natación habitual.

Los órganos sensoriales, como las antenas se localizan en la región dorsal, lateral o caudal del organismo, mientras que las focetas ciliadas, las cuales son receptores de estímulos químicos, se localizan cerca de la corona. Los fotorreceptores, como los ocelos, que presentan pigmento rojo o negro, generalmente se localizan en la parte dorsal del organismo.

La alimentación de los rotíferos consiste principalmente de material detrítico, bacterias y microalgas. Sin embargo también existen rotíferos depredadores, los cuales se alimentan de copépodos y pulgas de agua e incluso algunos son caníbales. Algunas especies pueden ser parásitas de lombrices de tierra alojadas en el tubo digestivo o en crustáceos alojados en el homocelo.

Su distribución es potencialmente cosmopolita, sin embargo existen especies muy restringidas a ciertas regiones geográficas.

### ***Ciclo de Vida***

Por sus características reproductivas los rotíferos se clasifican en: dioicos (reproducción sexual), hembras partenogénicas (reproducción asexual) y hembras partenogénicas que en un momento de su ciclo dan origen a machos (reproducción sexual y asexual).

En la familia Brachionidae se presenta una estrategia reproductiva en la cual se alterna la reproducción sexual y asexual. La reproducción asexual se lleva a cabo mediante un proceso de partenogénesis, en el cual las hembras llamadas amícticas producen huevos amícticos (diploides, cromosomas  $2n$ ), los cuales se desarrollan nuevamente en hembras. Este tipo de reproducción es la más eficiente para la producción intensiva de los rotíferos y se presenta cuando el organismo se encuentra en condiciones óptimas de temperatura, salinidad y alimento.

Cuando existen condiciones ambientales desfavorables se presenta el tipo de reproducción sexual, en donde las hembras amícticas que se reproducen por partenogénesis producen un nuevo tipo de huevos que dan origen a hembras llamadas mícticas, capaces de procrear machos bajo cambios repentinos en las condiciones ambientales provocadas por variaciones en la temperatura, salinidad o en las condiciones alimenticias, es decir, cuando las condiciones ambientales sean nuevamente favorables.

Las hembras amícticas producen huevos haploides (cromosomas  $n$ ) y las larvas que son incubadas fuera de estos huevos mícticos infértiles se desarrollan en diminutos machos haploides. Estos machos miden aproximadamente un cuarto del tamaño de la hembra. No poseen tracto digestivo ni vesícula por lo cual sólo sobreviven por periodos muy cortos. Dichos machos presentan un testículo grande, con semen útil para la fecundación de los huevos mícticos producidos por las hembras. Los huevos mícticos fertilizados por los machos son más grandes y consisten de una capa externa gruesa y débilmente granulada. Estos son huevos latentes y dan origen a hembras amícticas (ver Figura 6).

Aunque el mecanismo de reproducción sexual-asesexual no está totalmente comprendido, se propone que la producción de huevos latentes de resistencia es inducida por factores desfavorables como la sequía, el frío, falta de alimento, etc. (Kirk, 1999).

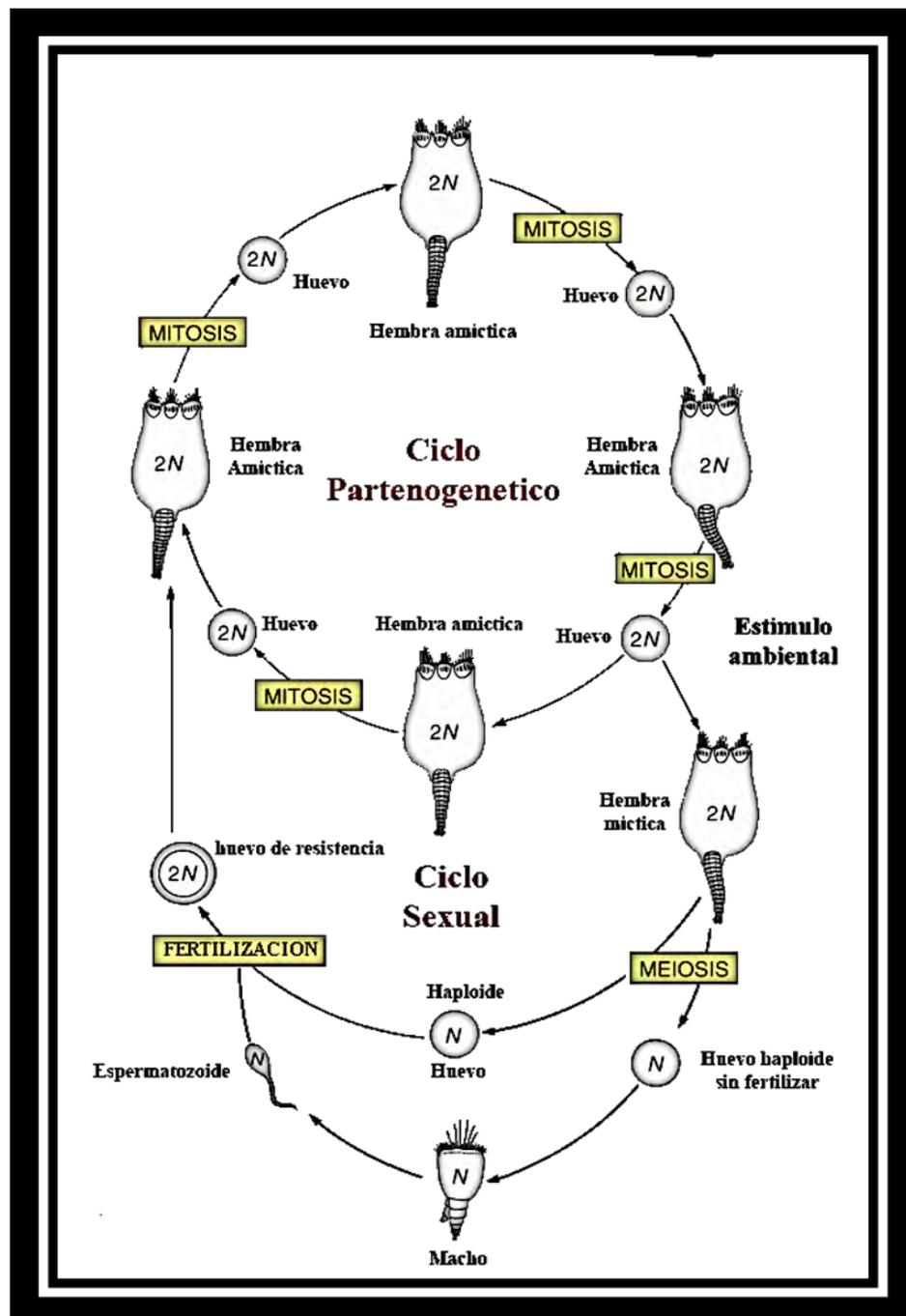


Figura 6. Ciclo de vida de la familia Brachionidae. N: haploide, 2N: diploide.

***Importancia ecológica y económica***

Los rotíferos son de gran importancia ecológica, ya que forman parte de las cadenas tróficas, son consumidores primarios y responsables en gran medida de la productividad secundaria en sistemas acuáticos. Esto significa que son un eslabón fundamental entre los productores primarios (el fitoplancton) y los consumidores secundarios (crustáceos, peces, etc). Así mismo, estos organismos juegan un papel importante en la transferencia de carbono entre la cadena alimentaria microbiana, consumiendo partículas detríticas de tamaño pequeño (bacterias, flagelados y ciliados) y la cadena de algas, crustáceos y peces (Ooms, 1998). Unas pocas especies pueden ser depredadoras de otras especies de rotíferos. Adicionalmente, estos organismos son de gran utilidad ecológica ya que descomponen la materia orgánica, registrando hasta el 50% de la producción del zooplancton en algunos cuerpos de agua dulce.

Los rotíferos también son utilizados como alimento vivo en cultivos de peces (estadios juveniles) donde aportan de vitaminas, minerales y proteínas (Lubzens, 1987). Cabe mencionar a los quimiostatos, que son cultivos continuos de rotíferos en donde las condiciones ambientales permanecen constantes para su mantenimiento por varios años. La importancia de los quimiostatos radica en la producción de forma automatizada de la biomasa con fines de uso en acuicultura o para estudios detallados del flujo de energía e interacciones tróficas en sistemas acuáticos.

Algunas especies del género *Brachionus* han sido usadas como bioindicadores de calidad del agua (Janssen *et al.*, 1993). Un análisis cuantitativo y cualitativo de las especies que se encuentran presentes en un sistema acuático nos da una idea certera del grado de contaminación orgánica que se presenta en el medio.

Estos organismos se utilizan también en pruebas de toxicidad, para lo cual se colocan en contenedores con diluciones conocidas de algún tóxico y con ello se establece la dosis en que mueren la mitad de los organismos. A partir de este valor estandarizado se conoce que tan tóxica resulta alguna sustancia soluble en agua. En la actualidad se cuenta con sistemas bien desarrollados para monitorear la calidad del agua en algunos países europeos altamente industrializados. En los Estados Unidos de América la EPA, (Environmental protection Agency) agencia encargada de cuidar el medio ambiente, ha utilizado a estos organismos para el monitoreo de su calidad de agua.

La importancia evolutiva del grupo de rotíferos Monogonontos es la alternancia de la reproducción sexual y asexual en su ciclo de vida, predominando la asexual la mayor parte del tiempo. Esto es relevante ya que anteriormente muchos científicos habían creído que la reproducción sexual era necesaria para la especiación, a causa de la importancia del cruzamiento para explicar la especiación en los organismos sexuales. Se sabe que en este grupo de monogonontos los machos carecen de aparato digestivo y sólo duran pocas horas después de su eclosión predominando la mayor parte del tiempo las hembras partenogenéticas.

Los rotíferos son un modelo potencial para investigar los mecanismos de envejecimiento, homeostasis, regeneración celular y los efectos de tipos de reproducción sexual y asexual en la longevidad. Esto es de suma importancia ya que los rotíferos, como metazoarios basales, podrían compartir algunos genes involucrados en estos procesos con los humanos, ayudando a identificar genes evolutivamente conservados, los cuales podrían ser blanco atractivo para la intervención farmacológica en la longevidad de los mamíferos.

Otro grupo interesante es el de los rotíferos Bdelloideos, los cuales presentan un fenómeno denominado anhidrobiosis, en el cual estos organismos en ambientes con ausencia de agua permanecen latentes (deshidratados) hasta que las condiciones ambientales sean favorables nuevamente, reparando el daño sufrido al DNA y siendo viables nuevamente (Nogrady *et al.*, 1993; Ricci y Melone, 2000). Este fenómeno es sujeto de estudio para Instituciones como la NASA con el fin de una posible colonización en otros planetas.

### ***Taxonomía y sistemática de Rotífera***

Los primeros trabajos en los que se clasificaron a los grupos taxonómicos *inferiores* en rotíferos fueron los de Ehrenberg (1832), Leydig (1855) y Gosse (1856), siendo este último el primero en estudiar la morfología del trofi, tratando de recalcar su importancia y algunas generalidades en la estructura. En estos estudios se abordó la filogenia de los rotíferos basado en teoremas y métodos antiguos. El primer escenario evolutivo “moderno” a nivel de familias y géneros fue presentado en 1909 por de Beauchamp y 55 años más tarde por Sudzuki (1964), el cual infirió las relaciones filogenéticas a nivel de especie.

Como bien señala Sørensen (2002), estos trabajos a pesar de haber tenido gran impacto en su época, ahora se consideran antiguos ya que no incorporan las principales reglas de la filogenia moderna y el cladismo introducido por Hennig (1953, 1966a,b). De acuerdo a estos principios, la reconstrucción de las relaciones filogenéticas deben estar basadas en caracteres derivados apomórficos y en grupos monofiléticos, los cuales comparten un mismo ancestro común. Sin embargo, trabajos como los de

Beauchamp y Sudzuki basaron sus estudios en los grupos parafiléticos, los basados en caracteres ancestrales (plesiomorfias).

Estudios posteriores (Wallace & Colburn, 1989 y Melone *et. al.*, 1998) se basaron en los grupos taxonómicos mayores de clase y orden. En su trabajo de 1989, Wallace y Colburn dilucidaron las relaciones filogenéticas de los rotíferos con un mayor énfasis en la sistemática intraespecífica del género *Notholca*.

Algunos años mas tarde, Melone *et. al.*, (1998) publicaron un artículo en el cual se analizan las relaciones evolutivas de las familias de la clase Bdelloidea utilizando 60 caracteres morfológicos, embriológicos y bioquímicos. Con estos resultados, los autores concluyen que la clase Monogononta es parafilética (Seisonidea, (Collothecacea, (Flosculariaceae, (Ploimida, (Bdelloidea))))), lo cual puede deberse a la gran cantidad de caracteres polimorficos dentro del orden Ploimida. Así mismo se agrupa a la clase Bdelloidea con Monogononta en el clado Eurotatoria, que a su vez integra a Seisonidea en el clado llamado Rotifera (Figura 7).

Esto demuestra la monofilia de Rotifera (S(Bd,M)), contrario a lo que apoyan los trabajos de Garey *et. al.*, en 1996 y 1998, los cuales, basados en un número limitado de taxa y análisis de algunos genes, colocan al grupo Bdelloidea como grupo hermano de Acanthocephala. Por dicha controversia, Melone *et. al.*, (1998) hacen incapie en la importancia de incluir mas estudios para resolver las relaciones evolutivas dentro de la clase Monogononta.

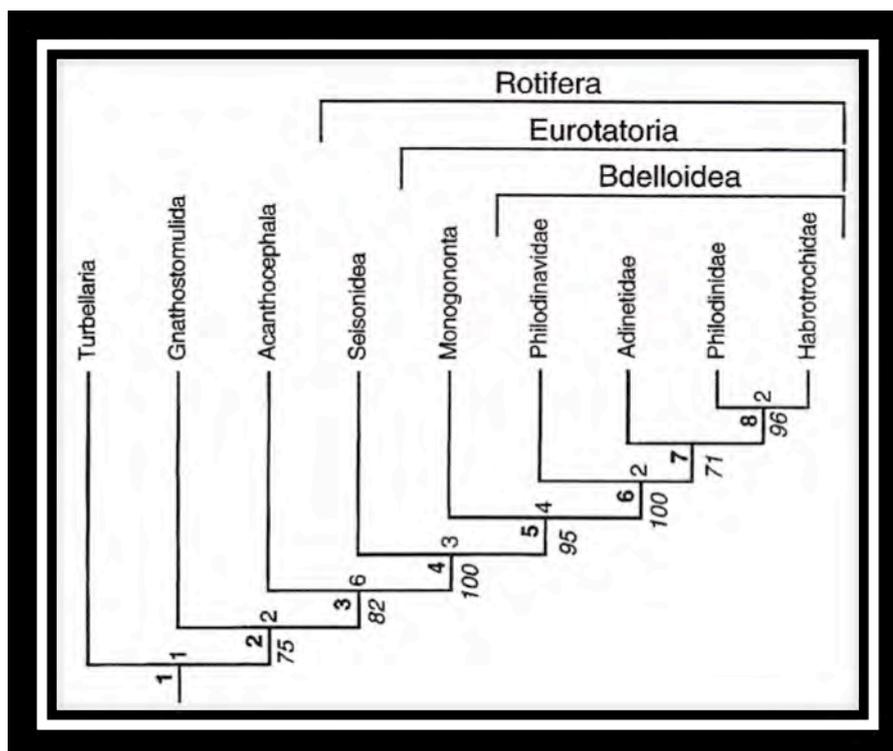


Figura 7. Relaciones evolutivas del grupo Rotifera según Melone *et. al.*, (1998) basado en caracteres morfológicos, embriológicos y bioquímicos.

Hasta 2002 solo existían tres trabajos acerca de las relaciones evolutivas de los grupos Bdelloidea y/o Monogononta basados en las reglas de la filogenia moderna. Uno de estos trabajos es el de Melone *et. al.* (1998), los cuales se enfocaron en las relaciones filogenéticas de los bdelloideos, mientras que Markevich (1989) y Sørensen, (2002) incluyeron taxones representantes de la mayoría de las familias de rotíferos. Ambos estudios son congruentes en las relaciones evolutivas, diversidad y riqueza dentro de los monogonontos del clado Ploima, pero difieren en que el de Markevich basa sus conclusiones en la idea que los bdelloideos presentan los rasgos de los caracteres ancestrales, mientras que Sørensen polariza los caracteres basado en la comparación de los grupos externos, con lo que coloca a los bdelloideos como grupo hermano de los monogonontos dentro del clado Eurotatoria, y a Seisonidea, como grupo hermano de dicho clado (Figura 8). Ambos autores recalcan las dificultades en la

comparación de la morfología de algunos taxa y señalan que los resultados obtenidos dependen en gran medida de las interpretaciones y la codificación de los caracteres.

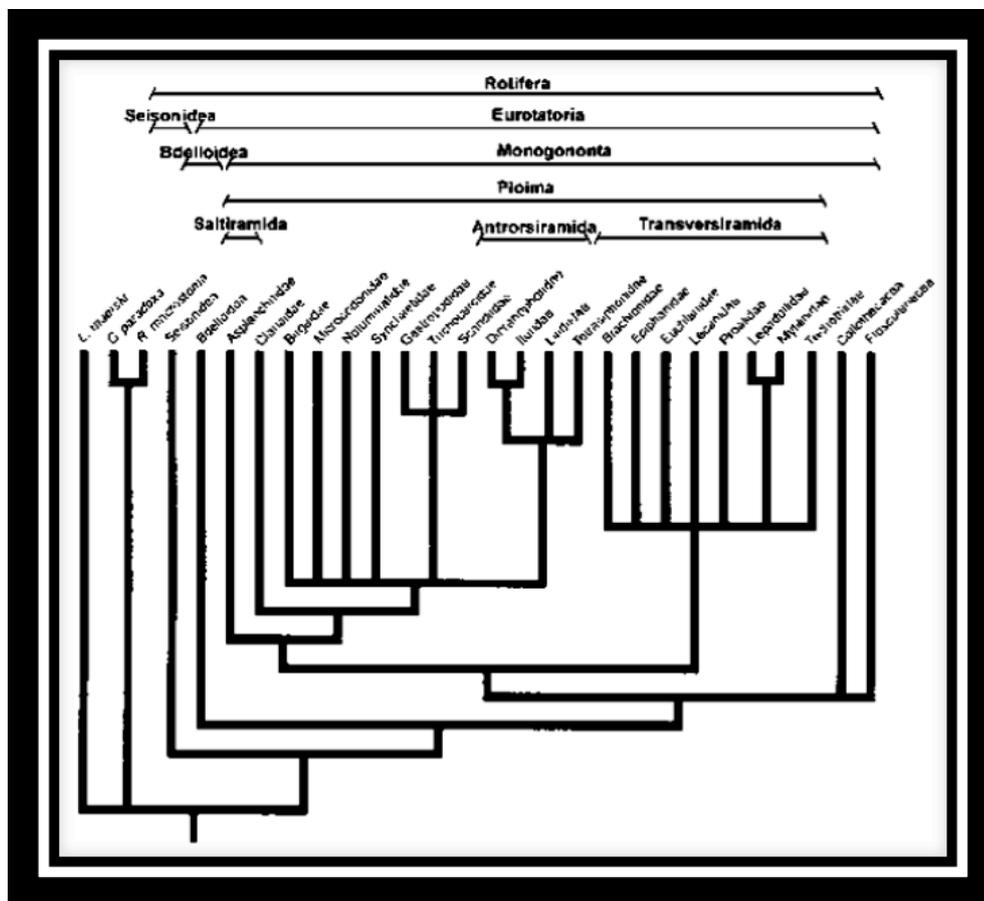


Figura 8. Relaciones filogenéticas del grupo Monogononta y Bdelloidea según Sørensen 2002.

Un estudio más reciente de Sørensen & Giribet (2006) integra los tres puntos clave que según Wallace (2002) hacían falta en los estudios de la sistemática de los rotíferos; incluir más taxa (53 spp), nuevos caracteres y adicionar más secuencias en los análisis moleculares (4 loci). Con ello analizaron las relaciones evolutivas entre los principales clados de rotíferos y dentro del grupo Monogononta. También probaron la monofilia del grupo Rotifera con respecto al grupo Acanthocephala y Micrognathozoa.

Los resultados obtenidos de los análisis de Parsimonia y Bayesianos basados en caracteres morfológicos y/o moleculares apoyan la división de Rotifera en dos principales clados, el primero contiene a la clase Monogononta y el segundo agrupa a Bdelloidea, Seisonidea y Acanthocephala (Figura 9).

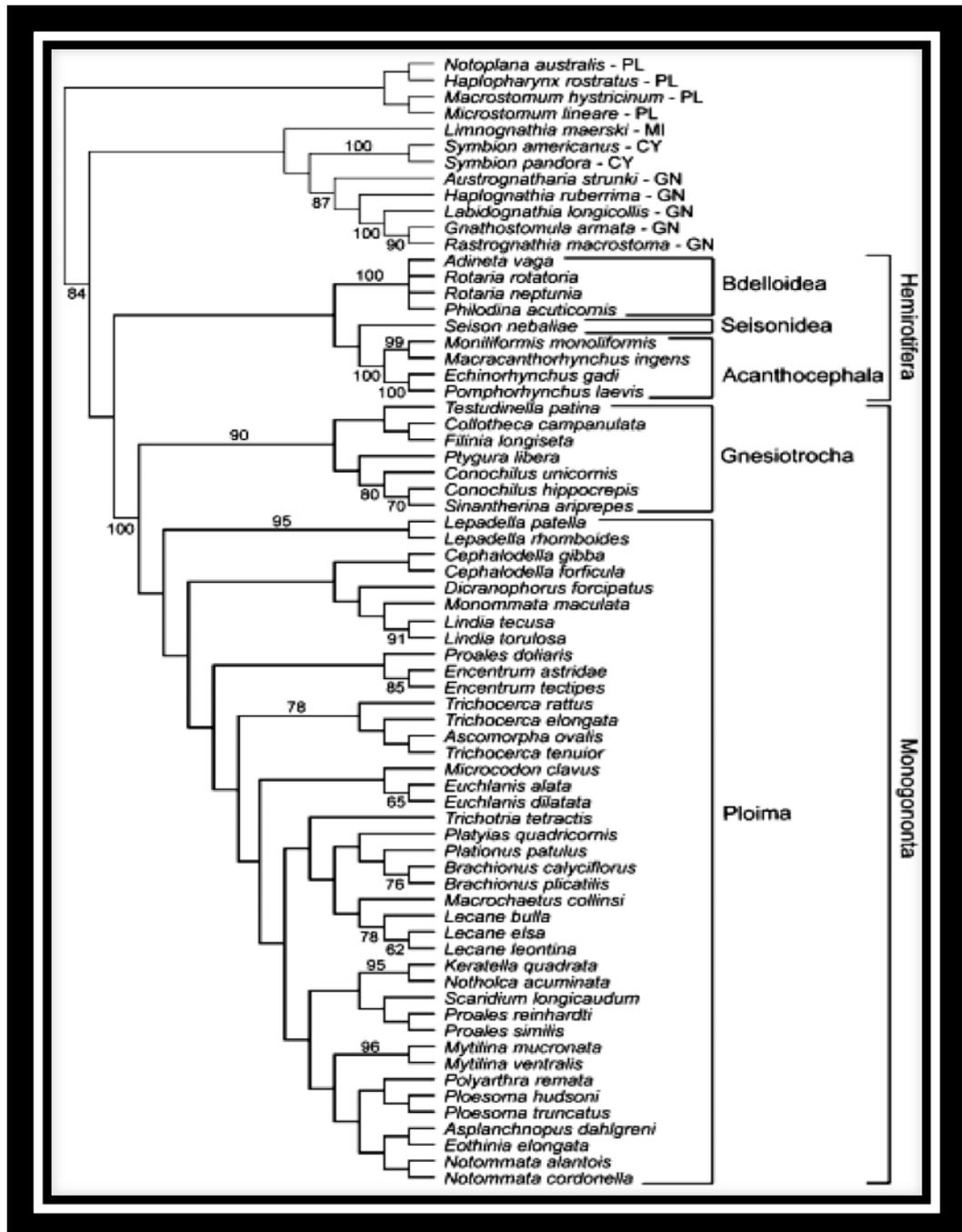


Figura 9. Relaciones evolutivas de las tres clases del grupo Rotifera (Monogononta, Bdelloidea, y Seisonidea) y al grupo Acanthocephala.

Cabe señalar que en todos los análisis morfológicos, moleculares y combinados de dicho trabajo, se apoya la monofilia de la Clase Monogononta, lo cual corresponde a lo encontrado en estudios previos (Wallace & Colburn, 1989; Nogrady *et. al.*, 1993; Melone *et. al.*, 1998; Sørensen, 2002).

En cuanto a la monofilia de Rotifera, ésta no se apoya en algún análisis, en contraste, la mayoría de los resultados ratifican al clado Hemirotifera (Bdelloidea, Seisonidea y Acanthocephala) como grupo hermano de Monogononta, con lo cual los autores proponen la inclusión del grupo Acanthocephala con Rotifera.

En el trabajo más reciente de la filogenia de rotíferos, Min & Park (2009) con base en secuencias del genoma mitocondrial, apoya la hipótesis que los bdelloideos comparten un ancestro común con los acantocéfalos mas que con los monogonontos (0).

Actualmente, las distinciones de los rotíferos a nivel de taxa están bien definidas y con poca ambigüedad. Sin embargo, las variaciones por debajo del nivel de género (especie) son tan grandes que la designación de especies es extremadamente difícil, lo cual es debido principalmente a la variación fenotípica (dieta, depredación, polimorfismos inducidos, diferencias en los huevos de resistencia y enanismo en machos) y a las especies crípticas, entre otras (Ruttner-Kolisko, 1963).

Para resolver las controversias en cuanto a las relaciones filogenéticas dentro del grupo Rotifera, es necesaria la reconstrucción de hipótesis filogenéticas basadas en un mayor número de genes. Algunos genes utilizados en la reconstrucción de hipótesis filogenéticas en rotíferos son: el mitocondrial 16S rRNA, el cual aportó información consistente para separar a las especies crípticas y la estructura poblacional a nivel microgeográfico en la especie *B. plicatilis* (Papakostas *et. al.*, 2005).

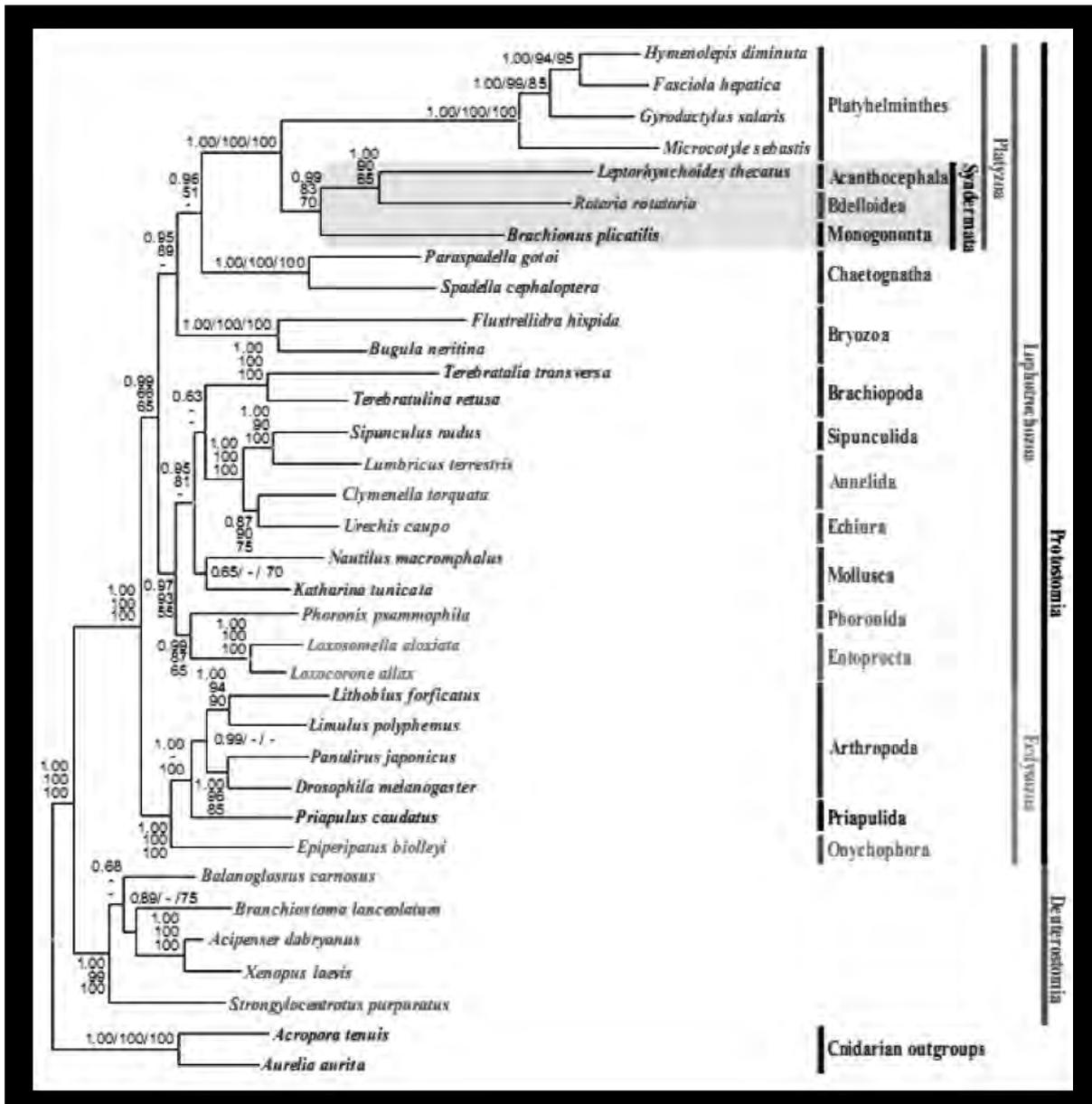


Figura 10. Relaciones evolutivas del grupo Monogononta, Bdelloidea y Acanthocephala basado en secuencias del genoma mitocondrial completo (Gi-Sik Min & Joong-Ki Park, 2009).

El gen nuclear histona H3 se utilizó para resolver los eventos evolutivos más recientes en dicho grupo (Sørensen & Giribet 2006). Los análisis de los microsatélites del gen nuclear ITS1 y el gen mitocondrial *Cox1*, proveen información en la estructura poblacional, los patrones filogeográficos y las relaciones filogenéticas de los complejos de especies en el rotífero *Brachionus plicatilis* (Gómez *et. al.*, 2000; 2002).

### ***Relación del Phylum Rotifera con otros phyla***

Tradicionalmente el grupo Rotifera comprende a tres taxa: Seisonidea (ectoparásitos bisexuales de crustáceos), Monogononta (partenogénesis cíclica con machos enanos haploides, sin órganos digestivos) y Bdelloidea (supuestamente asexuales, todo el clado de hembras). La relación de grupos hermanos entre bdelloideos y monogonontos como grupo Eurotatoria fue validada con un gran número de caracteres morfológicos (Melone *et. al.*, 1998) sugiriendo una tendencia evolutiva a la pérdida de la sexualidad, culminando en su completa ausencia en los bdelloideos.

La introducción de las técnicas moleculares ha hecho posible que se revisen las hipótesis filogenéticas dentro del grupo de los rotíferos revelando así mismo una relación con el grupo de los acantocéfalos (gusanos endoparásitos).

El nombre Syndermata, originalmente propuesto por Ahlrichs (1995; 1997), basado en caracteres morfológicos (espermatozoides y lámina intracitoplasmática) es en la actualidad ampliamente aceptado para un taxon que integra a los acantocéfalos, seisonideos, monogonontos y bdelloideos (Funch *et. al.*, 2005). La relación filogenética de este grupo ha recibido gran apoyo con base en estudios morfológicos (Lorenzen, 1985; Nielsen *et. al.*, 1996; Wallace *et. al.* 1996), secuencias de SSU rDNA (Winnepenninckx *et. al.* 1995; Garey *et. al.* 1996; Garey & Schmidt-Rhaesa, 1998), análisis combinados de caracteres morfológicos y moleculares (Giribet *et. al.* 2000; Sørensen & Giribet, 2006), análisis combinados de secuencias del DNA ribosomal SSU y LSU (Passamaneck & Halanych, 2006; García-Varela & Nadler, 2006) y análisis de genomas mitocondriales completos (Gi-Sik & Joong-Ki Park, 2009).

En contraste con la monofilia del grupo Syndermata, existen fuertes controversias en la comprensión de las relaciones filogenéticas entre los cuatro grupos que conforman dicho clado (Ricci, 1998; Garey *et al.* 1998; García-Varela & Nadler, 2006; Witek *et al.* 2008). Figura 11

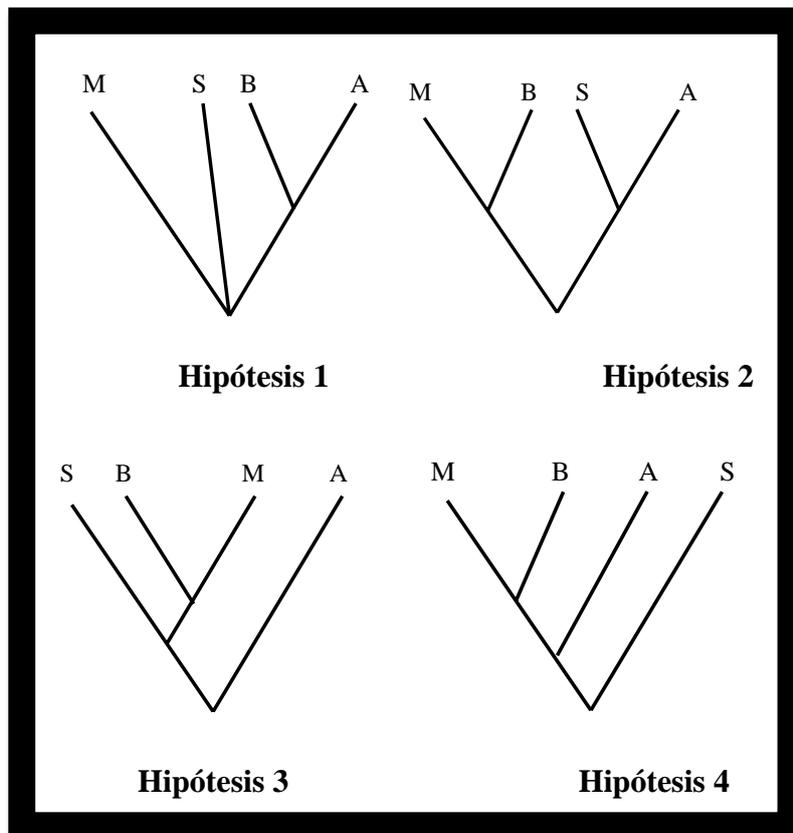


Figura 11. Relaciones filogenéticas propuestas para los grupos: Monogononta (M), Bdelloidea (B), Seisonidea (S) y Acanthocephala (A). Tomado de Garcia-Varela & Nadler (2006). **Hipótesis 1**, basada en morfología: presencia de los lemnisci y similitudes en la probosis. (Lorenzen, 1985). **Hipótesis 2**, basada en morfología de los espermatozoides, estructura fina de la epidermis y detalles en la estructura lacunar (Ahlrichs, 1995, 1997). **Hipótesis 3**, basada en morfología y presencia/ausencia de partenogenesis, impregnación hipodérmica, colágeno y dedos con glándulas adhesivas (Melone *et al.*, 1998; Nielsen, 1995; Wallace and Colburn, 1989). **Hipótesis 4**, basado en secuencias de la proteína “heat shock” de 82 kDa (Mark Welch, 2000).

Una de las principales controversias se enfoca en la comprensión de la monofilia o parafilia del grupo Eurotatoria (Monogononta y Bdelloidea) y la posición del grupo Seisonidea dentro de este clado. Así mismo, el entendimiento de las relaciones filogenéticas del grupo Eurotatoria con el grupo Acanthocephala es de suma importancia para entender la evolución y diversidad ecológica que presentan los grupos del clado Syndermata.

Desde 1985, Lorenzen reconoció al lemnisci (proyecciones de la epidermis del cuello dentro de la cavidad del cuerpo) y la probosis (parte evaginable en la región anterior del cuerpo) como los caracteres sinapomorficos que agrupan a Bdelloidea y Acanthocephala en el mismo clado. En 1996, Garey *et. al.* basados en estudios morfológicos y moleculares (secuencias del gen 18S rRNA), apoyaron la relación de los acantocéfalos como grupo hermano de Bdelloidea. Esto también ha sido sustentado en los trabajos basados en los análisis moleculares de los genes; SSU+LSU+mtDNA y *Cox1* (García-Varela, 2006), SSU (Garey *et. al.*, 1996), SSU + mtDNA 16S (Garey & Schmidt-Rhaesa, 1998), SSU + LSU + histona H3 + mtDNA y *Cox1* (Giribet *et. al.*, 2004), librerías de EST (Witek *et. al.*, 2008) y DNA mitocondrial de 11 genes codificantes para proteínas (Gi-Sik & Joong-Ki, 2009).

Sin embargo, el estudio de Mark Welch (2000) basado en el análisis de secuencias de una región codificante del gen nuclear *hsp82* con métodos de distancia y parsimonia, propone una topología diferente retomando la idea en donde el grupo Acanthocephala es el taxon hermano del clado compuesto por Bdelloidea y Monogononta (Eurotatoria), lo cual concuerda con el trabajo de Herlyn *et. al.*, (2003).  
Figura 11, Hipótesis 4.

Los estudios que integran evidencia morfológica (Ahlrichs, 1995;1998), los cladistas de bases de datos morfológicos (Melone *et. al.*, 1998; Wallace & Colburn, 1989 & Sørensen, 2002), los moleculares de una secuencia parcial de la proteína *hsp82* (Mark-Welch, 2000), los de secuencias del SSU rDNA (García-Varela *et. al.*, 2000) y los combinados de *hsp28* + SSU (Mark-Welch, 2005) sugieren la monofilia de Eurotatoria (Monogononta+Bdelloidea) con al clado Seisonidea y Acanthocephala como grupo hermano (Figura 11, Hipótesis 2).

Los análisis basados en la morfología de los espermatozoides, la estructura de la epidemis y los detalles en la estructura lacunar (Ahlrichs, 1996, 1997), así como los de la subunidad menor (SSU) del rDNA (Herlyn *et. al.*, 2003; Zrzavy, 2001) relacionan al grupo Acanthocephala con la clase Seisonidea y a la clase Bdelloidea con Monogononta.

Otra alternativa es la existencia del grupo Hemirotifera (Bdelloidea, Seisonidea y Acanthocephala) como grupo hermano de los monogonontos (Sørensen & Giribet, 2006).

Por otro lado, los trabajos basados en caracteres morfológicos como la presencia/ausencia de partenogénesis, impregnación hipodérmica, presencia de colágeno y de glándulas adhesivas en el pie, apoyan la monofilia de cada grupo (Melone *et. al.*, 1998; Nielsen, 1995; Wallace & Colburn, 1989).

En uno de los trabajos más recientes (Min & Park, 2009), se infirieron las relación del grupo Eurotatoria (Monogononta + Bdelloidea) con el grupo Acanthocephala basado en secuencias de genes mitocondriales completos, dando como resultado filogenias mejor soportadas y mejor comprensión del arreglo genéticos entre los principales grupos de metazoarios. Los resultados de la comparación de secuencias de aminoácidos y patrones en el arreglo genético del mtADN apoyan la hipótesis que

Bdelloidea comparte una ancestría en común con el grupo Acanthocephala más que con Monogononta, apoyando la parafilia de Eurotatoria (Figura 11, Hipótesis 1). Con esto, se puede inferir que la asexualidad obligatoria de los bdelloideos se pudo originar de forma secundaria, derivada de otra condición previamente existente en el linaje de los rotíferos. Sin embargo, dichas hipótesis filogenéticas e inferencia de patrones evolutivos del grupo Syndermata requieren la secuenciación del genoma mitocondrial del grupo Seisonidea.

El artículo más reciente, (Fontaneto & Jondelius, 2011), que aborda la filogenia de Syndermata concluye que todavía no se resuelve la relación filogenética de los grupos dentro de dicho grupo. Esto a pesar que los autores trataron de cubrir la limitante de los trabajos anteriores, el pobre muestreo de los taxones, incluyendo 1,000 secuencias del *Cox1*. Los resultados obtenidos apoyan la monofilia del clado Syndermata con altos valores de bootstrap, sin embargo la relación basal de los cuatro grupos no está resuelta bajo ningún tipo de reconstrucción filogenética (Máxima Verosimilitud y Bayesiano). A pesar de ello se logra un buen apoyo para el clado conformado por Acanthocephala y Bdelloidea, lo que concuerda con las filogenias de análisis ribosomales y EST.

### ***VII. 3. Clase Monogononta***

Monogononta es la más diversa de las tres clases de rotíferos. Se encuentra representada por 1,570 especies clasificadas en tres ordenes: Ploima, Flosculariaceae y Collothecaceae y 22 familias (Segers, 2007). Son organismos libres nadadores, semi-sésiles y sésiles. En la mayoría de las especies el cuerpo no está segmentado y la

corona de cilios presenta diversas formas; como un disco ancho o estrecho, con lóbulos auriculares o con cilios reducidos y setas largas.

Todas las especies de monogonontos son dioicos y con una sola gónada (Wallace & Snell, 1991) En muchas especies no se han observado a los machos, los cuales presentan un sistema digestivo reducido (intestino rudimentario) y son más pequeños que las hembras. Estos machos solo se encuentran presentes en la población por unos días o semanas cada año. Por otra parte las hembras poseen un solo ovario con vitelario.

El ciclo de vida de los monogonontos es del tipo de partenogénesis cíclica, donde predomina la reproducción asexual pero ocasionalmente se presenta la reproducción sexual (Wallace & Snell 1991) Figura 6. El tipo de reproducción de partenogénesis cíclica ha hecho más difícil resolver las relaciones filogenéticas en los rotíferos debido principalmente a las diferencias fenotípicas y la genética poblacional inducido por las condiciones ambientales mas que a las diferencias en los genotipos (Gómez *et. al.* 1995). Como se mencionó con anterioridad, en algunas especies todavía no se han encontrado a los machos en ninguna de las poblaciones y dicha ausencia genera problemas para delimitar a las especies bajo los conceptos tradicionales de especies.

La corona en este grupo varía considerablemente, ya que puede presentarse como un disco ancho o estrecho, como lóbulos auriculares o con una ciliatura reducida y largas setas.

#### **VII. 4. Familia Brachionidae**

##### ***Características de los géneros***

Dentro del orden Ploima se encuentra la familia Brachionidae, compuesta por siete géneros: *Brachionus*, *Platylas*, *Plationus*, *Notholca*, *Keratella*, *Kellicottia* y *Anuraeopsis* (Reyna-Fabián *et. al.* 2010). Las especies de esta familia se caracterizan por presentar un cuerpo loricado, cuyas extensiones del cuerpo son mas delgadas. Se ha demostrado que el integumento de *Brachionus plicatilis* esta compuesto por proteínas parecidas a la queratina unidas a puentes disulfuro (Bender & Kleinow, 1988).

La lórica de los miembros de esta familia se distingue por la ausencia de surcos, canales, sulci o placa anterior dorsal. Sin embargo estas características son de poco valor taxonómico ya que las formas loricadas también se encuentran presentes en otras familias como en Euchlanidae y Lecanidae.

Otra de las características importantes en los brachionidos es el trofi maleado, el cual consiste de un incus bien desarrollado y un par de mallei. El incus contiene a un fulcrum pequeño y un par de rami masivos equipados de dientes a lo largo de margen interior y cada malleus esta compuesto de un manubrium y un par de uncus con cuatro a siete dientes largos (Koste & Shiel, 1986; Figura 12).

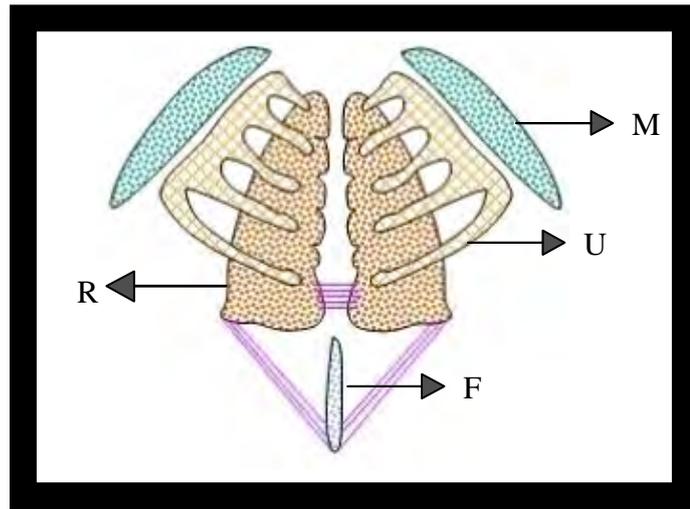


Figura 12. Partes que componen al trofi maleado, R: rami, F: fulcrum, U: uncus y M: manubrium

En cuanto a los hábitos alimentarios son filtradores no selectivos y pueden ingerir partículas de 20-30  $\mu\text{m}$ . Su alimento se basa principalmente en microalgas, bacterias, levaduras y protozoarios.

La variación morfológica dentro de la familia Brachionidae puede ser el resultado de una gran variedad de factores no genéticos. El principal de ellos es la ciclomorfosis, fenómeno en el cual el aspecto físico del organismo como el tamaño del cuerpo, de las espinas y la ornamentación varían a lo largo del tiempo (Wallace & Snell, 1991). Dichos cambios fenotípicos se deben a factores ambientales externos que produce la modificación en las siguientes generaciones. Por ejemplo, las variaciones morfológicas en el género *Keratella* se deben a cambios estacionales en la temperatura del agua, como es el caso de la especie *Keratella cochlearis*, en la cual un decremento en la temperatura del agua da lugar a un aumento en la longitud de la lórica (Hillbricht-Ilkowska, 1983).

El género *Brachionus* Pallas, 1766, está compuesto de 56 especies y algunas variedades (Segers, 2007). Se caracterizan por tener de cero a seis espinas anteriores, de cero a dos espinas posteriores y un pie segmentado. Sin embargo existe una gran variabilidad en el largo de las espinas en respuesta a factores ambientales. El número de espinas anteriores se presenta de manera constante y es de gran utilidad como carácter taxonómico para identificar a las especies (Koste, 1978; Koste & Shield, 1986).

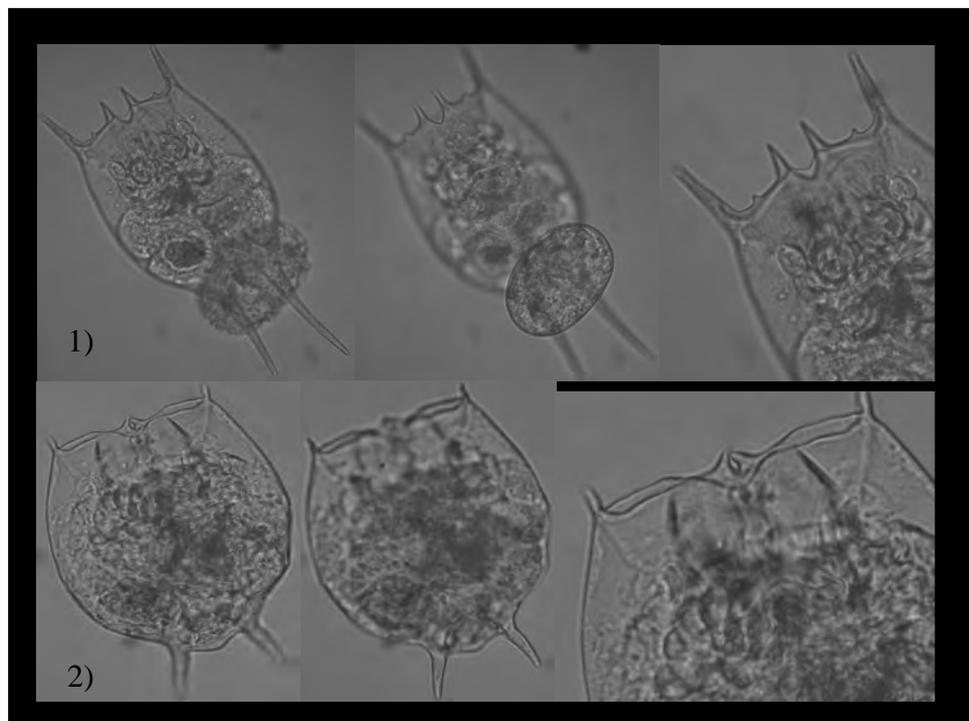


Figura 13. *Brachionus havanensis*, 2) *Brachionus caudatus*

El género *Platyias* (Harring, 1913) cuenta con tres especies (Segers, 2007), las cuales presentan un pie segmentado, dos blunt medial spines en la region final anterior y dos espinas pointed de longitud variable en la parte final posterior. Las tres especies presentan facetas en la placa dorsal, las cuales son utilizadas para distinguir a las especies (Wulfert, 1965; Koste, 1978; Koste & Shield, 1986).

Los representantes del género *Plationus* se distinguen de los otros géneros por tres características principales; una lorica insertada terminalmente, presencia de los procesos anteriores del rami y las cavidades del manubrium cerradas (Segers *et al.*, 1993). El género incluye a 4 especies y una subespecie (Reyna-Fabián *et. al.* 2010).

El género *Notholca* Gosse 1886, integrado por 38 especies (Segers, 2007) se caracterizan por tener de cuatro a seis espinas cortas de forma triangular en la región anterior. Sin embargo, también se han identificado organismos sin espinas o con dos medias y posteriores, las cuales varían en longitud y amplitud (Koste & Shield, 1986). La lórica del cuerpo es elongada, con una placa dorsal estriada longitudinalmente y cuyos bordes posteriores y laterales se encuentran redondeados y en algunas ocasiones con espinas (Figura 14) .



Figura 14. Fotografía de *Notholca acuminata*, tomada de Michael Plewka, 2011.

Existe gran controversia acerca de la clasificación de las especies de este género debido principalmente a que no existen patrones claros en los caracteres morfológicos (Wallace & Colburn, 1989; Nogrady & Wallace, 1993). A pesar de ello, algunos autores han tratado de dilucidar la taxonomía compleja del grupo sugiriendo que es necesario un estudio exhaustivo para reconocer a los organismos a nivel de especie.

El género *Keratella* Bory de St. Vincent, 1822, incluye a 45 especies (Segers, 2007) caracterizadas por una lóricas compuesta de dos placas inmóviles fusionadas lateralmente, cuya forma es amplia y en forma de óvalo elongado. El borde dorsal con seis espinas cortas anteriores y con dos, una o ninguna espinas laterales posteriores. En caso de no existir espinas laterales se presenta una espina media posterior. Así mismo, la longitud de las espinas posteriores (medias y laterales) varían con los factores ambientales. Las especies de este género son limnéticas o planctónicas y presentan ciclomorfosis. La superficie de la lóricas dorsal con un patrón poligonal de facetas (Figura 15).

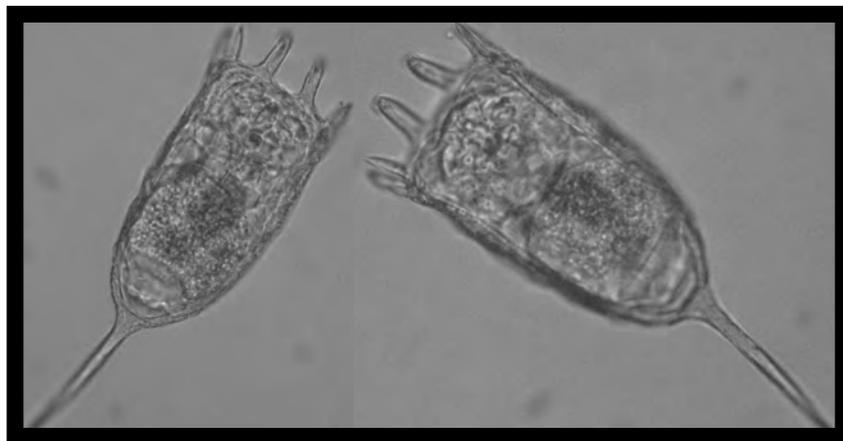


Figura 15. Ejemplares de la especie *Keratella sp*

Las dos especies (Segers, 2007) del género *Kellicottia* Ahlstrom 1938, se caracterizan por presentar de cuatro a seis espinas asimétricas y largas en la región anterior y una espina larga y fina en la región posterior (Koste, 1978; Koste & Shiel, 1986). Su lóricas es espinosa y compuesta de dos placas inmóviles fusionadas lateralmente. Las dos especies son limnéticas y una de ellas es muy común en el medio (Figura 16).



Figura 16. Ejemplar de representante de la especie *Kellicottia longispina*

En el género *Anuraeopsis* (Lauterborn 1900) se han reconocido a diez especies (Segers, 2007) distinguidas por una lórica sin espinas. El cuerpo está compuesto de dos placas unidas en la región dorsal, en donde la placa ventral está aplanada y la dorsal arqueada (Koste, 1978; Koste & Shiel, 1986). Los márgenes laterales de las placas dorsal y ventral están conectadas por pliegues cuticulares. Son organismos con dedos y pie siempre ausentes y con un mastax maleado.

La gran variabilidad morfológica que se presenta en la familia puede deberse a una serie de factores no genéticos. Uno de ellos es la ciclomorfosis, fenómeno en el cual el aspecto morfológico como el tamaño del cuerpo, la longitud de las espinas y la ornamentación del organismo varía a lo largo del tiempo (Wallace & Snell, 1991). Un ejemplo bien documentado se presenta en la especie *Keratella cochlearis*, la cual tiene un incremento en la longitud de la lórica con el decremento de la temperatura en el medio acuático (Hillbricht-Ilkowska, 1983).

Estos mecanismos adaptativos de ciclomorfofosis han dado lugar a problemas en la diferenciación de los distintos morfotipos que en ocasiones son considerados diferentes especies (Ahlstrom, 1940; Ahlstrom, 1943; Pejler, 1957).

El segundo factor que influye en la variabilidad morfológica de los brachionidos es el enanismo. En este fenómeno se da una reducción del tamaño y ausencia de las espinas posteriores, lo cual es inducido por factores abióticos como temperaturas altas, carencia de alimento, escaso drenado de la superficie de agua y altas concentraciones de salinidad. Debido a que pueden existir individuos enanos y normales en una misma muestra, este fenómeno puede ser difícil de distinguir ya que suelen confundirse con individuos jóvenes (Green, 1977).

Otro factor que induce variabilidad fenotípica es el polimorfismo inducido por depredadores (Wallace & Snell, 1991; Nogrady *et. al.*, 1993), en donde la variación en las estructuras del cuerpo se debe a factores externos como la presencia de depredadores. Se cree que el factor inductor de estas variaciones es una proteína que se libera desde el cuerpo de los depredadores hacia el agua. Un ejemplo de este fenómeno se observa en la especie *Brachionus calyciflorus*, el cual en presencia del depredador *Asplanchna* tiene espinas corporales cortas y cuando la densidad poblacional del depredador aumenta, las nuevas generaciones de *Brachionus* nacen con espinas más largas (Gilbert, 1966).

***Distribución en México***

Los primeros trabajos taxonómicos de rotíferos en México son de los años 30's y 40's (Sámamo, 1931, 1936; Ahlstrom, 1932; Carlin, 1935; Hoffman & Sámamo, 1938a, 1938b; Uéno, 1939; Ahlstrom, 1940; Rioja, 1940; Osorio, 1942; Rioja, 1942). En el trabajo de Ahlstrom (1932) se reportaron 62 especies de rotíferos de cuatro distintas localidades de México, siendo esta una de las primeras aportaciones y mas importantes contribuciones al conocimiento de rotíferos de México. En 1932 Brehm describió a *Keratella stipitata* y otras especies en el Lago de Patzcuaro. Posteriormente Sámamo (1931, 1936) y Hoffman y Samano (1938) trabajaron en la región central de México registrando 14 nuevos registros de rotíferos. Osorio (1942), en un estudio extenso de diversas localidades de México, describió a 122 taxa (especies, formas y variedades) y destacó la importancia del género *Brachionus* en México debido a su frecuencia y variaciones en tamaño y forma (Rico-Martínez & Silva-Briano, 1993). Desde ese tiempo se publicaron muy pocos estudios de la diversidad de rotíferos en nuestro país, hasta 1982 cuando Pourriot retoma el análisis de la fauna de rotíferos en México en una recopilación de la biota planctónica de esta localidad, concluyendo que la fauna de México tiene una gran afinidad con la fauna de América del Sur (Serranía-Soto, 2006).

Los trabajos con los se cuenta en la actualidad sobre la distribución de los rotíferos de la familia Brachionidae en México se enlistan en la Tabla 2 e incluyen cuerpos de agua dulce y salobre.

ANTECEDENTES

*Familia Brachionidae: Distribución en México*

Autor	Localidad	Especies encontradas de la familia Brachionidae
Vilaclara & Slàdecek. 1989	Valle de Bravo, Estado de México	34 especies y describieron una nueva para Valle de Bravo: <i>Collotheca riverai</i> .
Silva B. & Segers, H. 1992	Aguascalientes	Se reporta una nueva especie: <i>Brachionus josefinae</i> .
Suarez-Morales, B. et. al., 1993.	Presa Alzate, Toluca.	Se reportan 7 especies de rotíferos de los cuales 2 pertenecen a la familia Brachionidae: <i>Brachionus calyciflorus</i> y <i>B. quadridentatus</i> .
Rico-Martínez & Silva Briano, M. 1993.	Ciudad de México, Guanajuato, Jalisco, Aguascalientes, Zacatecas, Tabasco, Michoacán, Colima y Sinaloa	96 especies de las cuales 41 son nuevos registros para México.
Kutikova, L. A. & Silva-Briano, M. 1995.	Cuerpo de agua a 7 km de Palo alto en el estado de Aguascalientes	<i>Keratella mexicana</i> .
Serranía-Soto, C. 1996.	Ocho cuerpos de agua de las cuencas de los ríos Lerma y Pánuco (Centro y Norte del Estado de México)	86 especies de las cuales 26 se reportan por primera vez en México.
Sarma, S. S. S., Elías-Gutiérrez, M. & Serranía-Soto, C. 1996.	Lagos cráter del Nevado de Toluca.	34 especies de las cuales las 3 que pertenecen a la familia Brachionidae son: <i>Brachionus bidentatus</i> , <i>Kellicottia bostoniensis</i> y <i>Keratella tropica</i> .
Sarma, S. S. S. & Elías-Gutiérrez, M. 1997.	En 8 localidades del Estado de México.	123 taxa de los cuales 28 fueron nuevos registros para México y 16 pertenecen a la familia Brachionidae ( <i>Brachionus bidentatus</i> , <i>B. budapestinensis</i> , <i>B. calyciflorus</i> , <i>B. caudatus</i> , <i>B. pterodinoides</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>B. rubens</i> , <i>B. urceolaris</i> , <i>Plationus patulus</i> , <i>Kellicottia bostoniensis</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> , <i>K. serrulata</i> , <i>K. tropica</i> , <i>Paranuraeopsis quadriantennata</i> y <i>Platyias quadricornis</i> ).
Sarma, S. S. S. & Elías-Gutiérrez, M. 1998.	Cuerpo de agua localizado en el km28 de la carretera Federal Ixtlahuaca-Jilotepec, Estado de México	78 especies de las cuales 8 pertenecen a la familia Brachionidae ( <i>Anuraeopsis fissa</i> , <i>Brachionus bidentatus</i> , <i>B. caudatus</i> , <i>Plationus patulus</i> , <i>Kellicottia bostoniensis</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> y <i>K. tropica</i> ).
Torres-Orozco, B. et. al. 1998.	Lago de Catemaco.	Se encontraron 14 especies de rotíferos de los cuales 4 pertenecen a la familia Brachionidae: <i>Brachionus angularis</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>B. havanaensis</i> y <i>Keratella cochlearis</i> .
Silva Briano, M. & Adabache-O. A. 1999.	104 localidades de Aguascalientes	De las 104 localidades muestreadas solo en 10 se encontró a <i>Keratella mexicana</i> y su distribución en México.
Sarma, S. S. S. & Elías-Gutiérrez, M. 1999a.	12 localidades de la península de Yucatán.	Se registran 102 especies de las cuales 11 pertenecen a la familia Brachionidae: <i>Anuraeopsis fissa</i> , <i>Brachionus angularis</i> , <i>B. budapestinensis</i> , <i>B. falcatus</i> , <i>B. havanensis</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>Plationus patulus</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> , <i>K. lenzi</i> y <i>Platyias quadricornis</i> .
Sarma, S. S. S. & Elías-Gutiérrez, M. 1999b.	4 localidades en el estado de Michoacán.	110 especies de las cuales 8 pertenecen a la familia Brachionidae: <i>Brachionus bidentatus</i> , <i>B. pterodinoides</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>B. urceolaris</i> , <i>Plationus patulus</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> y <i>Platyias quadricornis</i> .
Sarma, S. S. S. 1999.	Recopilación de los trabajos hasta 1999 de diversas localidades en México.	Reporta 283 especies de rotíferos en México hasta 1999 de los cuales los 36 que pertenecen a la familia Brachionidae son: <i>Anuraeopsis fissa</i> , <i>Brachionus angularis</i> , <i>B. bidentatus</i> , <i>B. budapestinensis</i> , <i>B. calyciflorus</i> , <i>B. caudatus</i> , <i>B. dimidiatus</i> , <i>B. durgae</i> , <i>B. dolabratus</i> , <i>B. falcatus</i> , <i>B. havanensis</i> , <i>B. josefinae</i> , <i>B.</i>

		<i>variabilis</i> , <i>B. plicatilis</i> , <i>B. polyacanthus</i> , <i>B. pterodinoides</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>B. rotundiformis</i> , <i>B. Rubens</i> , <i>B. urceolaris</i> , <i>Plationus patulus</i> , <i>Kellicottia bostonensis</i> , <i>K. longispina</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> , <i>K. lenzi</i> , <i>K. mexicana</i> , <i>K. padulosa</i> , <i>K. serrulata</i> , <i>K. tropica</i> , <i>K. valga</i> , <i>Notholca foliacea</i> , <i>N. striata</i> , <i>Paranuraeopsis quadriantennata</i> , <i>Platyias quadricornis</i> y <i>Platyias leloupi</i> .
Silva, B. & Adabache-O. 2000.	Checklist del estado de Aguascalientes, en 44 localidades.	Reportan 10 especies del género <i>Brachionus</i> y se encuentra <i>Brachionus josefinae</i> descrita en 1992.
Sarma, S. S. S. & M. Elías-Gutiérrez. 2000.	De 4 localidades sobre la carretera México-Michoacán.	Se encontraron 77 especies de las cuales las XX que pertenecen a la familia Brachionidae son: <i>Brachionus bidentatus</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>B. urceolaris</i> , <i>Plationus patulus</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> , <i>K. serrulata</i> , <i>K. tropica</i> y <i>Platyias quadricornis</i> .
Sarma, S. S. S. & Martínez-Figueroa, J. 2000.	Parque Tezozomoc, D. F.	Encontraron 19 especies de las cuales 6 pertenecen a la familia Brachionidae: <i>Brachionus angularis</i> , <i>B. bidentatus</i> , <i>B. calyciflorus</i> , <i>B. caudatus</i> , <i>B. havanensis</i> y <i>B. quadridentatus</i> .
Sarma, S. S. S. et. al., 2000.	Laguna salobre de Mecoacán, Tabasco.	37 especies y 14 pertenecen a la familia Brachionidae: <i>Anuraeopsis fissa</i> , <i>B. angularis</i> , <i>B. budapestinensis</i> , <i>B. calyciflorus</i> , <i>B. caudatus</i> , <i>B. falcatus</i> , <i>B. havanensis</i> , <i>B. plicatilis</i> , <i>B. rotundiformis</i> , <i>B. urceolaris</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> , <i>K. tropica</i> y <i>Platyias leloupi</i> .
Ramírez, G. et. al., 2002	Valle de Bravo, Estado de México.	Reportan 25 especies de rotíferos de los cuales 3 pertenecen a la familia Brachionidae ( <i>Plationus patulus</i> , <i>Keratella cochlearis</i> y <i>Platyias quadricornis</i> ).
Serranía-Soto, C. & S. S. S. Sarma. 2003.	Rotíferos de la parte central de México (Tlaxcala, Hidalgo, Estado de México, Veracruz y D.F.)	Se encontraron 88 especies de rotíferos, siendo <i>Keratella morenoi</i> un nuevo registro para México. Se registran 20 especies pertenecientes a la familia Brachionidae: <i>Brachionus angularis</i> , <i>B. bidentatus</i> , <i>B. budapestinensis</i> , <i>B. calyciflorus</i> , <i>B. caudatus</i> , <i>B. dimidiatus</i> , <i>B. havanensis</i> , <i>B. plicatilis</i> , <i>B. polyacanthus</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>B. rubens</i> , <i>B. urceolaris</i> , <i>Plationus patulus</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> , <i>K. mexicana</i> , <i>K. tecta</i> , <i>K. tropica</i> , <i>K. morenoi</i> y <i>Platyias quadricornis</i> .
Flores-Burgos, J. et. al., 2003.	Lago de Xochimilco.	Se determinaron un total de 54 especies de rotíferos, siendo la familia Brachionidae la mas representada con 17 especies: <i>Brachionus angularis</i> , <i>B. bidentatus</i> , <i>B. budapestinensis</i> , <i>B. calyciflorus</i> , <i>B. caudatus</i> , <i>B. dimidiatus</i> , <i>B. durgae</i> , <i>B. havanensis</i> , <i>B. leydigi</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>B. Rubens</i> , <i>B. urceolaris</i> , <i>Plationus patulus</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> , <i>K. tropica</i> y <i>platyias quadricornis</i> .
Garza, M. G. et. al., 2003.	Zona chinampera del Lago de Xochimilco.	Reportan 13 especies del género <i>Brachionus</i> .
García-Morales, A. E. & Elías-Gutiérrez, M. 2004.	Muestras litorales y pelágicas de 36 sistemas acuáticos del sureste de México (Veracruz, Chiapas y Tabasco) y la Península de Yucatán.	128 especies de las cuales el orden Ploimida tiene el mayor numero de familias (15) incluyendo a Brachionidae como una de las mas diversas. <i>Brachionus</i> es uno de los géneros mejor representados con 10 taxa.
Fernández-Araiza, M. A. et. al., 2005.	Cuatro especies de <i>Brachionus</i> de las cuales 3 son del la ciudad de México (Lago de Chapultepec, Lago Aragón y Lago de Xochimilco), y 1 del Estado de México (Reserva de Santa Elena).	Se realizaron experimentos con 4 especies de <i>Brachionus</i> : <i>Brachionus calyciflorus</i> , <i>Brachionus rubens</i> , <i>Brachionus havanaensis</i> y <i>Brachionus patulus</i> colectados en México.
Nandini, S. et. al.,	Lago de Xochimilco.	Se encontraron 62 especies de rotíferos durante un año

2005		de muestreo. De éstas, las 15 que pertenecen a la familia Brachionidae son: <i>Anuraeopsis fissa</i> , <i>Brachionus angularis</i> , <i>B. budapestinensis</i> , <i>B. calyciflorus</i> , <i>B. caudatus</i> , <i>B. durgae</i> , <i>B. havanensis</i> , <i>B. patulus</i> , <i>B. plicatilis</i> , <i>B. quadridentatus</i> , <i>B. rubens</i> , <i>Keratella americana</i> , <i>K. cochlearis</i> , <i>K. tropica</i> y <i>Platyias quadricornis</i> .
Sarma, S. S. S., Serranía-Soto, C. R. & S. Nandini.	Recopilación de 24 localidades del estado de México y 5 cuerpos de agua de esta zona que no se habían estudiado.	Registro de 210 especies de las cuales 13 se reportan por primera vez para México.
Serranía- Soto, C. R., 2006. Tesis de Maestría.	Parte Central de México: Estado de México  Estado de Tlaxcala.  Hidalgo.  Ciudad de México.    Estado de Morelos.	Se reportan 105 taxa, 10 nuevos registros para el Estado y uno nuevo para México. Se registran 20 especies, un nuevo registro para México. Se reportan 112 especies. 52 especies para Xochimilco, 37 para el Club España, 20 especies para el Lago Tezozomoc y 15 especies en la pista de canotaje y 5 especies para el Lago de Chapultepec. Se registran 50 especies, 12 del orden Ploimida
Silva-Briano, M. et. al., 2007.	Aguascalientes y Sonora	Descripción de la nueva especie <i>Brachionus araceliae</i> en México
Talonia, C. M. et. al., 2007.	Rotíferos de la laguna de Zumpango.	En total se registran 10 especies de las cuales <i>Brachionus caudatus</i> , <i>Keratella cochlearis</i> , <i>Keratella tropica</i> y <i>Keratella quadrata</i> pertenecen a la familia Brachionidae
Wallace et. al., 2008.	36 localidades en los Desiertos de Chihuahua y San Luis Potosi	Se encontraron 106 taxa, siendo Brachionidae una de las familias dominantes (11.4%).
Walsh, et. al., 2008.	48 cuerpos de agua en el Desierto de Chihuahua.	Se encuentran un total de 57 especies de rotíferos monogonontos, de los cuales 6 pertenecen a la familia Brachionidae.

Tabla 2. Estudios de la distribución de rotíferos de la familia Brachionidae en México.

Los estudios de la distribución en México de los rotíferos han sido escasos (Sarma, et. al., 2000; Rico-Martínez & Silva-Briano, 1993; García-Morales & Elías-Gutiérrez. 2004) y muchos de ellos se han enfocado en el estudio de la diversidad de especies y dinámica de comunidades (Sarma et. al., 2002). Los pocos trabajos que existen se han enfocado a estudiar su distribución en el sureste, centro y algunos en el norte de el país. Debido a ello, es necesario un muestreo que incluya muestreos representativos de las zonas que no han sido estudiadas.

### ***VII.5. Clasificación de la familia***

Orden Ploimia

Clase Monogononta

Familia Brachionidae Ehrenberg, 1838

Género *Platylas* Haring, 1913. Contiene a 3 especies.

Género *Brachionus* Pallas, 1766. Contiene a 56 especies y algunas variedades.

Género *Plationus* Segers Murugan & Dumont, 1993. Contiene a 4 especies y 1 subespecie.

Género *Keratella* Bory de St. Vincent, 1822. Contiene a 45 especies.

Género *Kellicottia* Ahlstrom, 1938. Contiene a 2 especies.

Género *Notholca* Gosse, 1886. Contiene a 38 especies.

Género *Anuraeopsis* Lauterborn, 1900. Contiene a 10 especies.

## VIII. JUSTIFICACIÓN

Los géneros de esta familia son utilizados como alimento vivo en cultivos de peces, bioindicadores de calidad del agua y en pruebas de toxicidad, además de su importancia en las cadenas tróficas siendo dominantes en el zooplankton de las comunidades de agua dulce. Dicha importancia ecológica y económica, y debido a que hasta la fecha no se cuenta con una información evolutiva del grupo, nos motivaron a realizar un análisis filogenético usando marcadores moleculares y morfológicos. Así mismo, la facilidad en cuanto al cultivo masivo de las especies que representan los géneros: *Brachionus*, *Keratella* y *Platytias* es una oportunidad inmejorable para realizar el estudio evolutivo, ya que prácticamente todos los géneros de la familia Brachionidae se encuentran distribuidos en México.

El análisis filogenético derivado de nuestros estudios también nos permitirá resolver problemas taxonómicos a nivel genérico. Por ejemplo, *Platytionus* (con 3 especies distribuidas en México) es un género considerado una transición entre los géneros *Brachionus* y *Platytias* (Koste, 1987 y Turner, 1990), y alternativamente las tres especies de este género son clasificadas como miembros de *Brachionus* o *Platytias* o como un género diferente (Segers, 1992).

## IX. OBJETIVOS

### General

- Construir la filogenia de la familia Brachionidae basada en secuencias de los genes nucleares (28S del DNA Ribosomal) y mitocondriales (citocromo oxidasa subunidad 1).

### Particulares

- Secuenciar la región del *Cox1* y del 28S de 20 o más especies representantes de los 8 géneros de la familia Brachionidae y de otros grupos usados como grupos externos.
- Proponer nuevos modelos taxonómicos para la familia Brachionidae, particularmente en los géneros *Plationus*, *Brachionus*, *Platyias* y *Paraneuroopsis*, usando caracteres moleculares y morfológicos.
- Analizar las estructuras del diagnósticas de los géneros y especies con el fin de conocer su evolución dentro del grupo.
- Construir una filogenia de los genes; *Cox1* y 28S, y compararla con la combinada.

## **X. METODOLOGÍA**

### *Colecta del material biológico y cultivo*

En un periodo de dos años se colectaron 21 especies de rotíferos representantes de la familia Brachionidae, con la ayuda de una red de zooplancton de 50 µm. Los especímenes fueron mantenidos en agua del medio de donde se colectaron en frascos de vidrio claro sin tapa. Las muestras se analizaron bajo un microscopio estereoscópico y se aislaron las diferentes especies encontradas. Se separaron y traspasaron individuos de cada especie. Cada individuo fue colocado en un vaso con solución EPA y alga (*Chlorella*) en concentración de  $1 \times 10^6$  para su reproducción y cultivo durante 10-15 días dependiendo de la especie. Se aislaron preferentemente individuos jóvenes y con huevos. La solución de EPA y alga se cambió cada dos días.

### *Aislamiento del ADN genómico*

Una vez que cada muestra tenía entre 50-100 individuos de los organismos se concentraron en 200 microlitros de agua destilada. De estos se tomó una muestra de 10-15 individuos, la cual se incubó a 56°C en la solución con 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub> EDTA (pH 8.0), 1% Sarkosyl y 0.1 mg/ml proteinasa K. El ADN se extrajo del sobrenadante usando DNazol (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) de acuerdo al protocolo descrito en el manual.

### ***Amplificación y secuenciación del ADN***

La amplificación de los genes nucleares (18S y 28S del rRNA) se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos amplificados por PCR fueron separados y observados en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio al 1% en un buffer de Tris-Boratos. Los productos de PCR de las bandas que contenían el DNA amplificado se limpiaron usando filtros Milipore. Estos productos purificados, se clonaron por ligación en el vector pGEM-T (Promega, Madison, Wisconsin) con una enzima ligasa (Promega) e incubados a 14°C toda la noche para ser transfectados en bacterias *Escherichia coli* (JM109). Las clonas positivas (con el inserto) se identificaron mediante una selección de color, blancas/azules y el tamaño del inserto en la clona se confirmó por PCR. Dichas clonas positivas se crecieron en cultivos líquidos con medio Luria y 50µg/ml de ampicilina.

Posteriormente se purificó el ADN de los plásmidos mediante un *kit* comercial basado en filtros de columna (Qiaprep, Qiagen, Valencia, California). Se secuenciaron al menos dos plasmidos de cada ligación para ambas cadenas utilizando oligonucleótidos universales (vector) e internos. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo por el método de interrupción de cadena con ABI Big Dye (PE Applied Biosystems, Boston, Massachusetts) y cuyos productos fueron separados y detectados con un secuenciador de capilar (ABI 310).

Los electroferogramas resultantes de las reacciones de secuenciación se exportaron al programa de cómputo Codoncode Corporation, con el cual se evaluó cada uno de los picos del electroferograma.

### ***X.1. Validez del género *Plationus****

#### ***Alineamientos múltiples y análisis filogenético***

Se alinearon las secuencias de ambos genes (*Cox1* y 28S, región D2-D3) por separado con el programa de computo PSalign (Sze et. al., 2006) para 21 taxa, cuatro de las cuales corresponden al grupo externo. Con el fin de corregir regiones pobremente alineadas se realineó la base de datos del 28S con el programa MAFFT ver. 6.611b (Kato et. al., 2005), implementando un alineamiento pareado L-INS-i (-localpair-maxiterate 1000).

El alineamiento inicial para *Cox1* incluyó 658 sitios para 12 taxa. Sin embargo se removieron 40 sitios del alineamiento original debido a que las secuencias obtenidas de la base de datos Genbank de otros nueve taxa fueron parciales (618 sitios). El segundo alineamiento contenía 618 sitios para 21 taxa. Esta segunda base de datos fue traducida a proteínas para detectar cualquier posible error en el marco de lectura. El programa Geneious Pro ver. 4.0.4 (Drummond et. al., 2009) se utilizó para combinar las bases de datos 28S + *Cox1*.

El mejor modelo evolutivo para cada base de datos y el combinado de ambos genes se infirió usando el criterio de información Akaike (AIC) mediante el programa Modeltest version 3.7 (Posada & Crandall, 1998).

Los análisis de Máxima Verosimilitud de las tres bases de datos se realizaron en el programa GARLI 0.96 (Zwickl, 2006) y los análisis de Bootstrap se llevaron a cabo con el programa GARLI y el sistema de computo Grid (Cummings & Huskamp,

2005) a través del proyecto Lattice (Bazinet & Cummings, 2009), el cual incluye grupos de computadoras de escritorio en un sistema global (Myers et. al., 2008).

Se desarrolló el sistema de GRID para GARLI utilizando una librería especial y las herramientas asociadas (Bazinet et. al. 2007). Basados en el modelo de Cummings et. al., (2003) en donde se utiliza un sistema de computo anterior de Grid (Myers & Cummings, 2003) distribuimos los archivos de interés en cientos de computadoras en donde sellevó acabo el análisis en paralelo.

El soporte de las ramas fue evaluado por remuestreo de *Bootstrap* con 2,000 (MV) réplicas para cada una de las bases de datos y el combinado de ambas. Los árboles fueron ilustrados y editados en el programa FigTree (FigTree program versión v1.1.2). Las distancias pareadas sin corregir se calcularon en PAUP\* (Swofford, 2000).

Con la finalidad de comparar la topología obtenida con hipótesis filogenéticas alternativas, las topologías forzadas se definieron en el árbol obtenido de la base de datos combinada (*Cox1+28S*) con el análisis de Máxima Verosimilitud. Posteriormente se evaluaron las diferencias entre los árboles no forzados (el mejor) y los forzados, los cuales representan las hipótesis alternativas, con la prueba de Shimodaira & Hasegawa (Shimodaira & Hasewaga, 1999) y se calcularon los resultados en PAUP\*.

Finalmente, para determinar la heterogeneidad de las frecuencias nucleotídicas entre taxa se estimó una prueba de  $\chi^2$  para la base de datos combianada con la opción “basefreq” implementada en PAUP\*.

## ***X.2. Filogenia de la familia Brachionidae***

### ***Alineamientos múltiples y Análisis filogenético***

La reconstrucción de las hipótesis filogenéticas se realizó mediante el análisis de Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI). Los análisis filogenéticos para los alineamientos de las bases de datos del 28S y *Cox1* se realizaron de forma independiente para cada método. Adicionalmente se analizó la base de datos combinada de los genes *Cox1*+28S por los mismos métodos de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

Los análisis de MP se llevaron a cabo mediante el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) con una búsqueda heurística de 10,000 réplicas, con adición de secuencias al azar y un algoritmo de bisección del árbol y reconexión (Tree bisection and reconnection, TBR), proceso por el cual se divide el árbol en dos subárboles, dividiendo una rama entre dos nodos. Los dos subárboles son conectados eligiendo una rama de cada uno, comprobando al final de la búsqueda todas las posibles divisiones y conexiones.

Para el análisis de evolución de cada base de datos, se eligió el programa computacional jModel- Test v. 0.1.1 (Posada, 2008) para seleccionar el mejor modelo de sustitución de DNA que se ajusta mejor a los datos. El mejor modelo elegido fue GTR+I+G, basado en el criterio de información de Akaike (AIC) para las dos bases de datos independientes (*Cox1* y 28S).

El análisis de ML se llevó a cabo con el programa GARLI (Zwickl, 2006) con el modelo de familia (6 categorías de tasas de sustitución), categorías de tasas gamma de 4 y la frecuencia de bases de estado y el número de sitios invariables estimado por el programa. Los árboles de ML fueron seleccionados después de 10,000 generaciones si no se observa una mejoría en el valor de verosimilitud, con un nivel de mejoría significativa implementada en 0.01 (primera condición para terminarse); la última solución fue seleccionada cuando la mejoría total en el valor de verosimilitud sea de 0.05, comparado con la última solución obtenida. Todos los demás parámetros involucrados en el algoritmo de GARLI fueron los predefinidos por el programa, por recomendaciones del autor (Zwickl, 2006).

Los análisis Bayesianos se llevaron a cabo con el programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Los análisis se repitieron por duplicado para  $10 \times 10^6$  generaciones para las bases de datos *Cox1* y 28S independientemente y para  $20 \times 10^6$  generaciones para la base de datos combinada. Este número de generaciones llevan a una convergencia en todos los análisis como se estimó por las frecuencias divididas (P 0.01). El muestreo de las muestras se hizo cada 100 generaciones. Para establecer los valores óptimos de *burn-in*, se utilizó el programa computacional Tracer v1.5.0 (Rambaut and Drummond, 2008) para todos los parámetros muestreados en las cadenas.

El primer 10% de los árboles muestreados se estimó como un *burn-in* para la base de datos del *Cox1* y 28S independientemente y de 12.5% para la base de datos combinada (*Cox1*+28S). De los árboles remanentes se produjo un árbol consenso de mayoría del 50%, representando la distribución de las probabilidades potenciales.

Finalmente para el apoyo de las ramas (bootstrap) para los análisis de MP para las bases de datos *Cox1*, 28S y la combinada de *Cox1*+28S se llevó a cabo un análisis

en el programa PAUP con 10,000 réplicas y para ML se desarrollaron en Garli para las bases de datos *Cox1* y 28S por separado con 1,000 réplicas.

Las diferencias entre los árboles *constrain* (forzados) y los no forzados (mejores) que representan las hipótesis alternativas fueron evaluados utilizando la prueba Shimodaira & Hasegawa (HS; Shimodaira & Hasegawa, 1999) y fue calculada en PAUP\*.

## XI. RESULTADOS

### *XI.1. Validez del género Plationus*

Se amplificaron, clonaron y secuenciaron los fragmentos del *Cox1* y 28S (D2-D3) de 21 taxa representantes de 5 géneros de la familia Brachionidae: *Anuraeopsis* (1sp), *Brachionus* (6spp y 2 poblaciones), *Keratella* (3spp y 2 poblaciones), *Plationus* (1sp; 3 poblaciones y 1 subespecie) y *Platyias* (1sp), más 4 especies del orden Ploima Hudson & Gosse, 1886, utilizadas como grupo externo (Ver Tabla 3).

La longitud de los productos amplificados de todas las especies dentro de la familia Brachionidae fue entre 505 a 766 pares de bases (pb) para 28S y de 658 pb para *Cox1*. Sin embargo, para nueve secuencias del *Cox1* obtenidas de la base de datos Genebank solo se obtuvieron 618 pb. En el análisis final, se removieron algunas bases al inicio y al final del alineamiento con el fin de comparar los mismos sitios entre todas las secuencias, obteniendo una base de datos de 618 pb.

Las frecuencias nucleotídicas para la base de datos combinada (*Cox1*+28S) fueron las siguientes: 0.244 (A), 0.144 (C), 0.222 (G) y 0.387 (T) y la heterogeneidad de estas frecuencias entre los diferentes taxa fue de  $\chi^2=48.997$ ,  $p= 0.28$ . Estos muestran que las frecuencias nucleotídicas no son significativamente heterogéneas entre los taxa, lo cual es ventajoso ya que los métodos de inferencia de ML funcionan mejor cuando las frecuencias nucleotídicas son homogéneas (Omilian & Taylor, 2001).

Todas las secuencias se depositaron en la base de datos en el Genebank (números de acceso en la Tabla 3).

RESULTADOS  
Validez del género *Plationus*

Family	Specie	Localidad	Coordenadas Norte	Este	Genbank Access LSU	Genbank Access cox 1
Brachionidae	<i>Anuraeopsis fissa</i>	Lago de Patzcuaro, Michoacan	19° 32' 50.41''	101° 38' 31.2''	*GQ8904 51	*GQ8904 49
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Lago de Chapultepec, D. F.	19° 25' 18.5''	99° 11' 06.7''	*GQ8904 52	*DQ6645 04
	<i>Brachionus havanaensis</i>	Lago de Xochimilco, D. F.	19° 16' 20.55''	99° 06' 18.9''	*GQ8904 53	*DQ6645 05
	<i>Brachionus plicatilis</i>	Golfo de Mexico, Veracruz	18°28'18.9''	92°39'14.9''	*GQ8904 54	*DQ6645 07
	<i>Brachionus rubens</i>	Lago Aragon, D. F.	18° 59' 3.56''	91° 58' 0.3''	*GQ8904 55	*DQ6645 06
	<i>Brachionus falcatus</i>	Lago Rodeo, Cuernavaca.	20° 54' 15.5''	90° 20' 34.4''	*GQ8904 56	*DQ6645 08
	<i>Brachionus urceolaris</i> <sup>1</sup>	Nd	Nd	Nd	DQ08972 6	DQ08974 0
	<i>Brachionus urceolaris</i> <sup>2</sup>	Nd	Nd	Nd	DQ08974 0	DQ08972 6
	<i>Keratella quadrata</i> <sup>1</sup>	Lago de Xochimilco, D. F.	19° 16' 20.55''	99° 06' 18.9''	*GQ8904 62	*GQ8904 50
	<i>Keratella quadrata</i> <sup>2</sup>	Nd			DQ29773 5	DQ29777 4
	<i>Keratella americana</i>	Lago de Xochimilco, D. F.	19° 16' 20.55''	99° 06' 18.9''	*GQ8904 57	*GQ8904 46
	<i>Keratella tropica</i>	Lago de Xochimilco, D. F.	19° 16' 20.55''	99° 06' 18.9''	*GQ8904 58	*GQ8904 47
	<i>Platyias quadricornis</i>	Chimalipan, Estado de México	24° 29' 00''	97° 45' 00''	*GQ8904 59	*GQ8904 48
	<i>Plationus patulus</i> <sup>3</sup>	Nd	Nd	Nd	DQ29775 0	DQ29778 6
	<i>Plationus patulus</i> <sup>1</sup>	Santa Elena, Estado de México	19° 53' 55''	99° 32' 9.9'	AY82908 4	AF41699 5
	<i>Plationus patulus</i> <sup>2</sup>	Lago Chicoasen, Chiapas	16° 56' 9.51''	93° 06' 9.90''	*GQ8904 60	*DQ6645 03
	<i>Plationus patulus macracanthus</i>	Morelia, Mexico	18° 42' 13.4''	95° 45' 27.9''	*GQ8904 61	*DQ6645 02
Mytilinidae	<i>Mytilina ventralis</i>	Nd	Nd	Nd	DQ29774 7	DQ29778 3
Notommatidae	<i>Notommata allantois</i>	Nd	Nd	Nd	DQ29774 8	DQ29778 4
Lepadellidae	<i>Lepadella rhomboides</i>	Nd	Nd	Nd	DQ29774 0	DQ29777 9
	<i>Lepadella patella</i>	Nd	Nd	Nd	DQ29773 9	DQ29777 8

Tabla 3. Especies analizadas en este estudio. Nd= No determinado, \* número de acceso del GeneBank.

La divergencia genética que se estimó de la base de datos combinada (Cox1+28S) entre las poblaciones fue entre 0.07 y 9.8%, entre especies congenéricas entre 8.6 y 13.9% y entre genera entre 9.6 y 19.3%.

### *Análisis filogenético*

#### *Cox1*

La base de datos *Cox1* incluyó a 21 taxa con 618 pb. El mejor modelo de evolución para esta base fue el “General Time Reversible” (GTR) (Rodríguez et. al., 1990), con una proporción de sitios invariables de 0.3176 y una distribución gamma de 0.2696 (+G) (Yang, 1994). Con los análisis de Máxima Verosimilitud (MV) se obtuvo un solo árbol con un valor de verosimilitud  $-\ln$  de 5720.0786 (Figura 17).

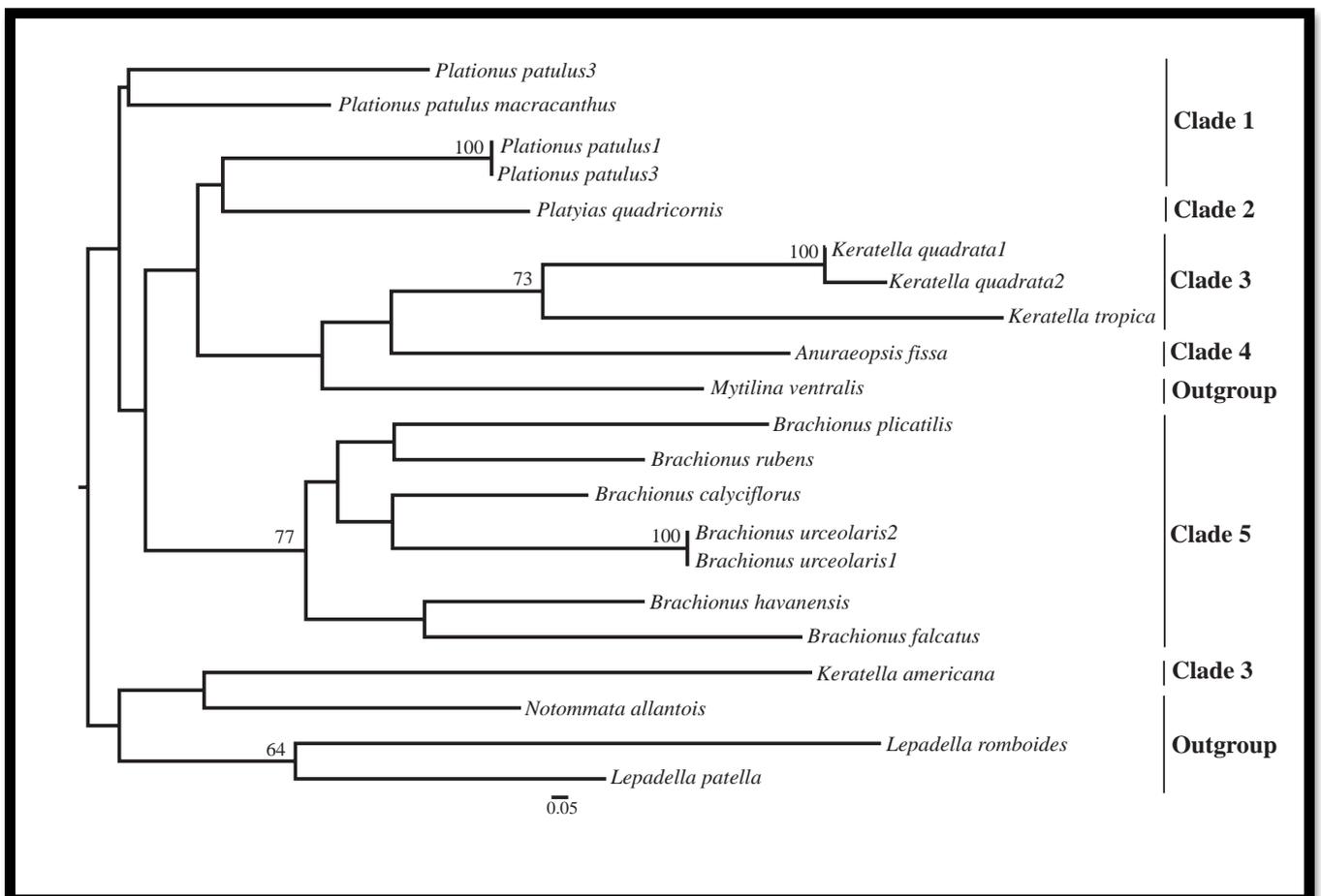


Figura 17. Árbol de Máxima Verosimilitud ( $-\ln$  verosimilitud de 5720.1) inferido de la base de datos *Cox1*. Los números cerca de los nodos internos muestran el valor de las frecuencias de apoyo (bootstrap) de los clados.

Este árbol muestra a Brachionidae como un grupo monofilético con valores de apoyo (bootstrap) <50%. El género *Plationus* está compuesto de dos clados. El primero contiene a *Plationus patulus macracanthus* + *Plationus patulus*<sup>3</sup> y el segundo contiene a las dos poblaciones de *Plationus patulus* de México. Sin embargo, ambos clados están apoyados por bajos valores de apoyo (<50%). Las seis especies de *Brachionus* son un grupo monofilético con un valor de apoyo de 59%.

La divergencia genética estimada entre especies congéntricas es de 14.5 a 22.3% y de 16.9 a 25.8% entre los géneros de la familia Brachionidae.

### **28S (D2+D3)**

La base de datos del 28S (D2+D3) incluyó a 21 taxa con 766 pb. El mejor modelo de sustitución fue el GTR con una proporción de sitios invariables de 0.4706 y una distribución gamma de 0.7473 (+G). Con el análisis de Máxima Verosimilitud se obtuvo el mejor árbol con un valor de  $-\ln$  verosimilitud de 3791.0747 (Figura 18).

En este árbol se observa a la familia Brachionidae como monofilética pero con un valor de apoyo bajo (<50%). El género *Anuraeopsis*, *Brachionus*, *Keratella*, *Plationus* y *Platyias* son monofiléticos con valores de apoyo que van desde 77 hasta 96%.

La divergencia genética estimada entre poblaciones va de 0.14 a 3.14%, de 1.1 a 8.5% entre especies congéntricas y entre 4.5 hasta 15.2% entre los diferentes géneros de Brachionidae.

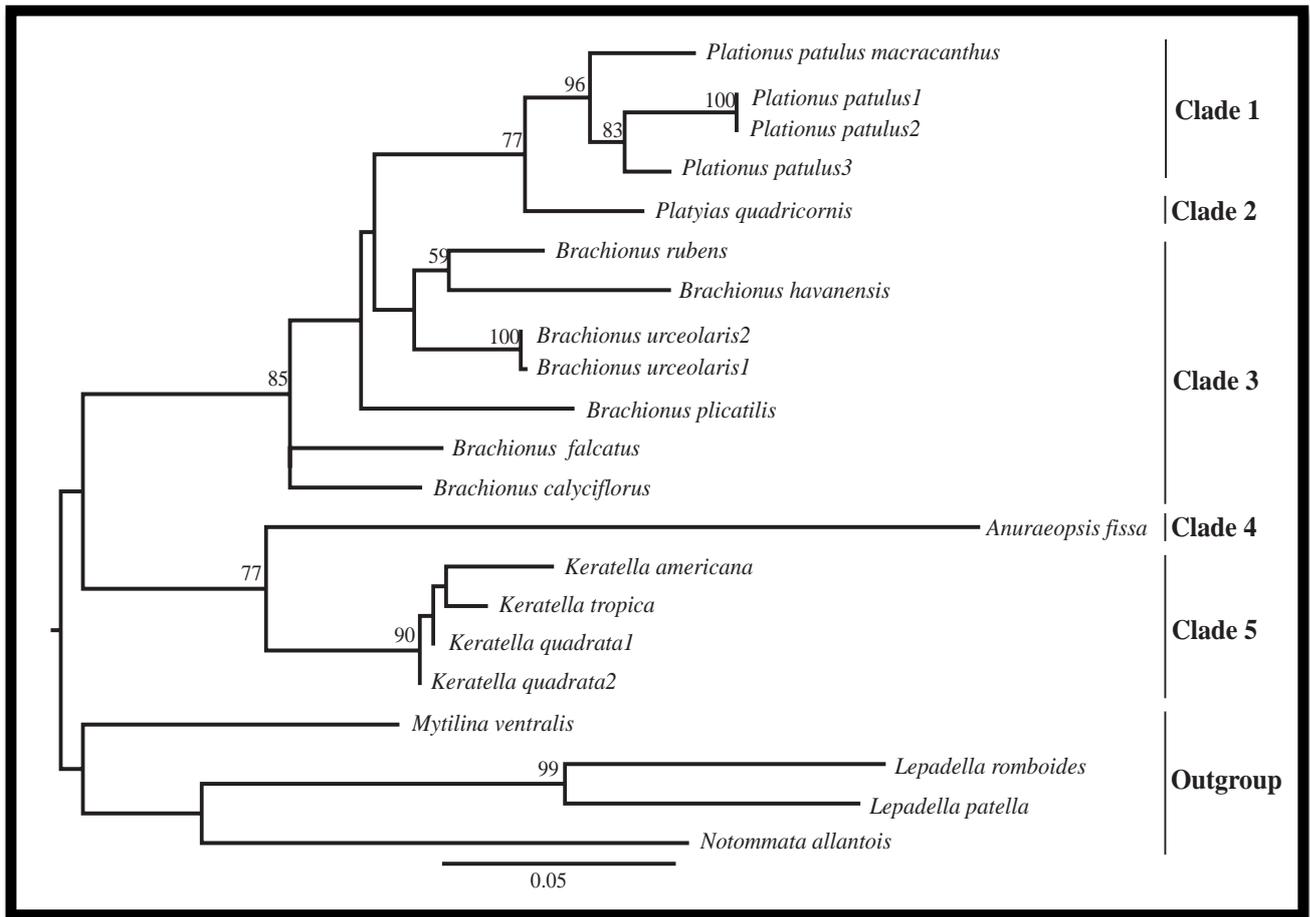


Figura 18. Árbol de Máxima Verosimilitud (-ln verosimilitud de 3791.0) inferido de la base de datos 28S. Los números cerca de los nodos internos muestran el valor de las frecuencias de apoyo (bootstrap) de los clados.

### *Cox1 + 28S (D2+D3)*

La base de datos combinada de *Cox1 + 28S (D2+D3)* incluyó a 21 taxa con 1,348 pb. El mejor modelo de sustitución para esta base de datos fue el GTR, con una proporción de sitios invariables de 0.495 y una distribución gamma de 0.908(+G).

El análisis de Máxima Verosimilitud mostró el mejor árbol con un valor de -ln verosimilitud de 9809.5 (Figura 19). Este árbol tiene la misma topología que el árbol del 28S (Figura 18) pero con los nodos mejor resueltos y con un mayor valor de apoyo.

El clado 1 se compone por tres poblaciones de *Plationus patulus*+ *Plationus patulus macracanthus* con un valor de apoyo del 90%. El clado 2 tiene una sola especie de *Platytias* cuyo valor de apoyo es de 85%. El tercer clado incluye a seis especies de *Brachionus* con un valor de apoyo de 98%. El cuarto clado integra a una sola especie de *Anuraeopsis* con un valor de apoyo de 91%. Finalmente, el clado 5 contiene a tres especies del género *Keratella*, el cual tiene un valor de apoyo de 100%.

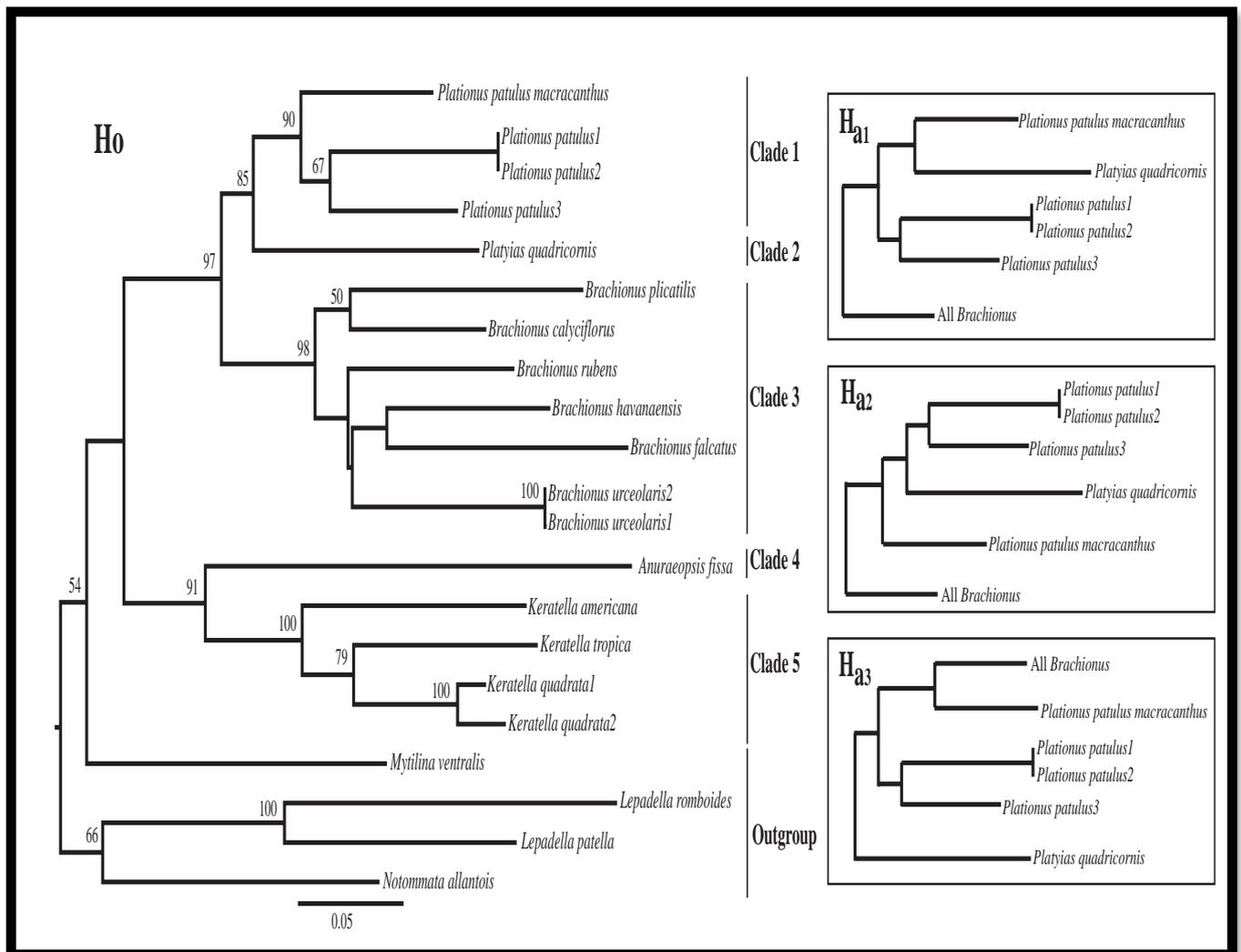


Figura 19. Árbol de Máxima Verosimilitud de la base de datos combinada *Cox1*+28S,  $H_0$  (valor  $-\ln$  verosimilitud de 9809.5). Los números cerca de los nodos internos muestran el valor de las frecuencias de apoyo (bootstrap) de los clados. Las diferencias entre las tres hipótesis alternativas:  $H_{a1}$  (valor de  $-\ln$  verosimilitud de 9818.98;  $p=0.055^*$ ),  $H_{a2}$  (valor de  $-\ln$  verosimilitud de 9819.05;  $p=0.052^*$ ) y  $H_{a3}$  (valor de  $-\ln$  verosimilitud de 9812.65;  $p=0.178^*$ ),  $*p>0.05$  no son estadísticamente significativas.

## ***XI.2. Filogenia de la familia Brachionidae***

### ***Analisis filogenético***

Se amplificaron, clonaron y secuenciaron los fragmentos del *Cox1* y 28S de 15 taxa representantes de los siete géneros que existen en la familia Brachionidae: *Anuraeopsis* (1sp), *Brachionus* (6spp), *Keratella* (3spp), *Plationus* (1sp y 1 subespecie), *Platyias* (1sp), *Notholca* (1sp) y *Kellicottia* (1sp), más cinco especies del orden Ploima Hudson & Gosse, 1886, utilizadas como grupo externo (Ver Tabla 4).

La longitud de los productos amplificados de todas las especies dentro de la familia Brachionidae fue entre 989 a 2893 pb para 28S y de 619 pb para *Cox1*. En el análisis final de la base de datos del *Cox1*, se removieron algunas bases al inicio y al final del alineamiento con el fin de comparar los mismos sitios entre todas las secuencias, obteniendo una base de datos de 619 pb.

Las frecuencias nucleotídicas para la base de datos combinada (*Cox1*+28S) fueron las siguientes: 0.2443 (A), 0.1947 (C), 0.2666 (G) y 0.294 (T), con un promedio de contenido de GC (%) de 0.5054.

Todas las secuencias se depositaron en la base de datos en el Genbank (números de acceso en la Tabla 4)

RESULTADOS  
Filogenia de la familia Brachionidae

Family	Specie	Localidad	Coordenadas Norte	Este	Genbank Access 28S	Genbank Access cox 1
Brachionidae	<i>Anuraeopsis fissa</i>	Lago de Patzcuaro, Michoacan	19° 32' 50.41''	101° 38' 31.2''	*GQ89045 1	*GQ8904 49
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Lago de Chapultepec, D. F.	19° 25' 18.5''	99° 11' 06.7''	*GQ89045 2	*DQ6645 04
	<i>Brachionus havanaensis</i>	Lago de Xochimilco, D. F.	19° 16' 20.55''	99° 06' 18.9''	*GQ89045 3	*DQ6645 05
	<i>Brachionus plicatilis</i>	Golfo de Mexico, Veracruz	18°28'18.9''	92°39'14.9''	*GQ89045 4	*DQ6645 07
	<i>Brachionus rubens</i>	Lago Aragon, D. F.	18° 59' 3.56''	91° 58' 0.3''	*GQ89045 5	*DQ6645 06
	<i>Brachionus falcatus</i>	Lago Rodeo, Cuernavaca.	20° 54' 15.5''	90° 20' 34.4''	*GQ89045 6	*DQ6645 08
	<i>Brachionus urceolaris</i> <sup>1</sup>	Nd	Nd	Nd	DQ089726	DQ08974 0
	<i>Keratella quadrata</i> <sup>1</sup>	Lago de Xochimilco, D. F.	19° 16' 20.55''	99° 06' 18.9''	*GQ89046 2	*GQ8904 50
	<i>Keratella americana</i>	Lago de Xochimilco, D. F.	19° 16' 20.55''	99° 06' 18.9''	*GQ89045 7	*GQ8904 46
	<i>Keratella tropica</i>	Lago de Xochimilco, D. F.	19° 16' 20.55''	99° 06' 18.9''	*GQ89045 8	*GQ8904 47
	<i>Platytias quadricornis</i>	Chimalipan, Estado de México	24° 29' 00''	97° 45' 00''	*GQ89045 9	*GQ8904 48
	<i>Platyonus patulus</i>	Lago Chicoasen, Chiapas	16° 56' 9.51''	93° 06' 9.90''	*GQ89046 0	*DQ6645 03
	<i>Platyonus patulus macracanthus</i>	Morelia, Mexico	18° 42' 13.4''	95° 45' 27.9''	*GQ89046 1	*DQ6645 02
	<i>Notholca acumminata</i>					
	<i>Kellicottia longispina</i>					
Mytilinidae	<i>Mytilina ventralis</i>	Nd	Nd	Nd	DQ297747	DQ29778 3
Notommatidae	<i>Notommata allantois</i>	Nd	Nd	Nd	DQ297748	DQ29778 4
Lepadellidae	<i>Lepadella rhomboides</i>	Nd	Nd	Nd	DQ297740	DQ29777 9
	<i>Lepadella patella</i>	Nd	Nd	Nd	DQ297739	DQ29777 8

Tabla 4. Especies analizadas en este estudio. Nd= No determinado, \* número de acceso del GeneBank.

### Cox1

La base de datos del Cox1 incluyó a 20 taxa con 619 pb. El análisis de Máxima Parsimonia utilizó 316 caracteres informativos del total de los 619 alineados. El

resultado de la búsqueda mostró dos árboles igualmente parsimoniosos de 1,342 pasos, con un índice de consistencia de 0.45 y un índice de retención de 0.35 (Tabla 5).

El árbol consenso que se representado en la Figura 20 muestra a Brachionidae como un grupo que no es monofilético.

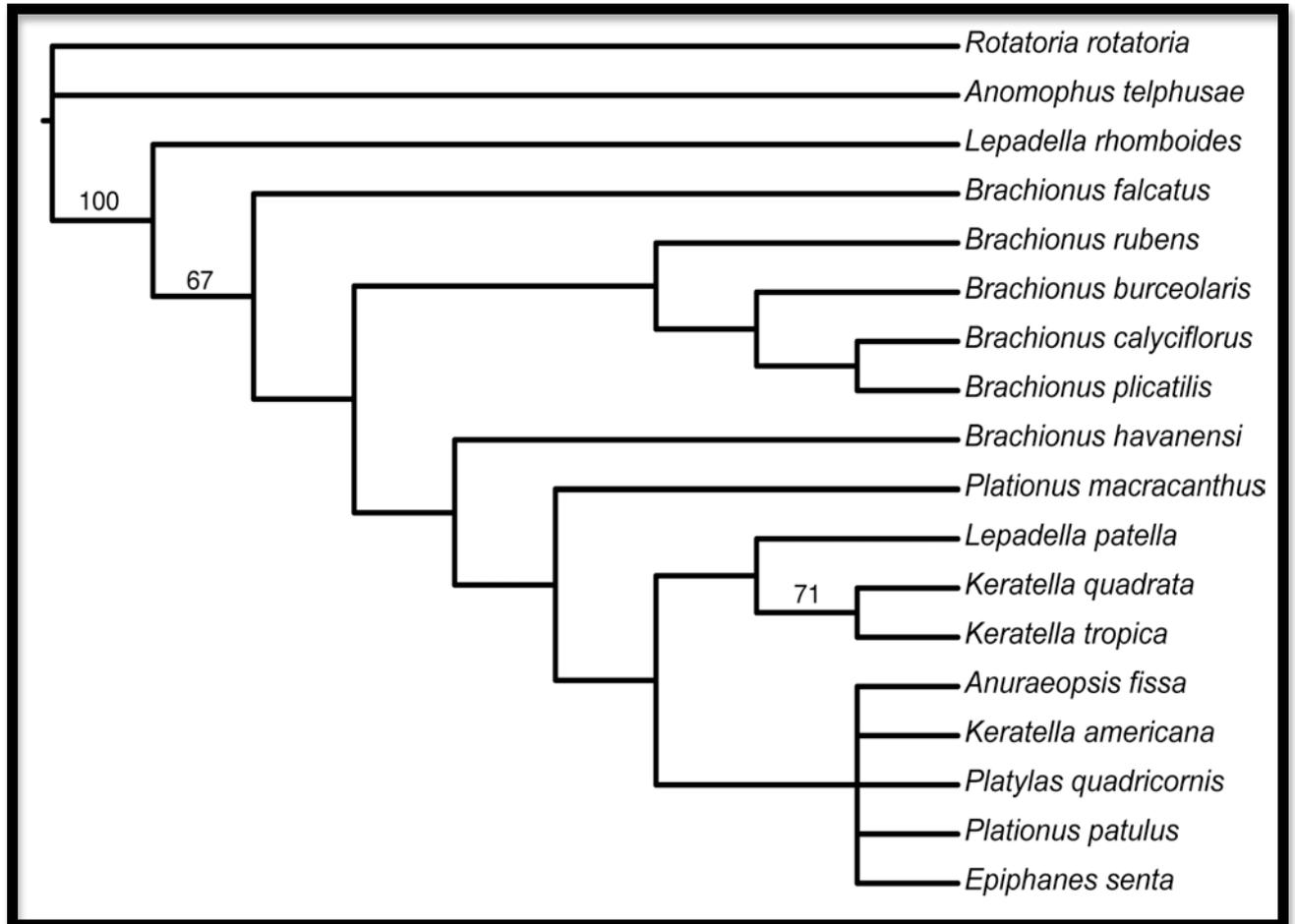


Figura 20. Árbol de Máxima Parsimonia (1,342 pasos) inferido de la base de datos del *Cox1*. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1,000 búsquedas de bootstrap.

Así mismo el género *Brachionus* resulta en una politomía de sus seis especies que lo conforman. Por otro lado el género *Keratella* se muestra como un grupo parafilético.

	Caract. totales	Caract. informativos	Caract. constantes	Caract. no informativos	Indice de Consistencia	Indice Retención	Long. del árbol	# de árboles
28S	2893	838	1885	170	0.76	0.78	1620	1
<i>Cox1</i>	619	316	265	38	0.45	0.35	1347	2
28s+ <i>Cox1</i>	3512	1154	2150	208	0.61	0.60	3001	1

Tabla 5. Información de las bases de datos utilizada en la reconstrucción de las hipótesis filogenéticas con el método de Máxima Parsimonia.

		Rates	Shape	Pinvar	ln likelihood
28S	GTR+G	gamma	0.18	0.0	-11413.8834
<i>Cox1</i>	GTR+I+G	gamma	0.1760	0.0290	-5808.828414
28S+ <i>Cox1</i>		-	-	-	-17356.020106

Tabla 6. Información de las bases de datos para la reconstrucción de hipótesis filogenéticas con el método de Máxima Verosimilitud.

La prueba de verosimilitud mostró que el mejor modelo de evolución para esta base de datos es el “*General Time Reversible*” (GTR) (Rodríguez et. al., 1990), tenía una proporción de sitios invariables de 0.029 y una distribución gamma de 0.1780 (+G) (Yang, 1994). El análisis de ML bajo este modelo mostró un árbol con un valor de Verosimilitud de  $:-\ln 5808.8284$  (Tabla 6).

En general, a pesar de los bajos valores de apoyo de las ramas (bootstrap <50%), la polifilia de la familia Brachionidae es apoyada por el valor mas alto de bootstrap (100%) como se muestra en la Figura 21.

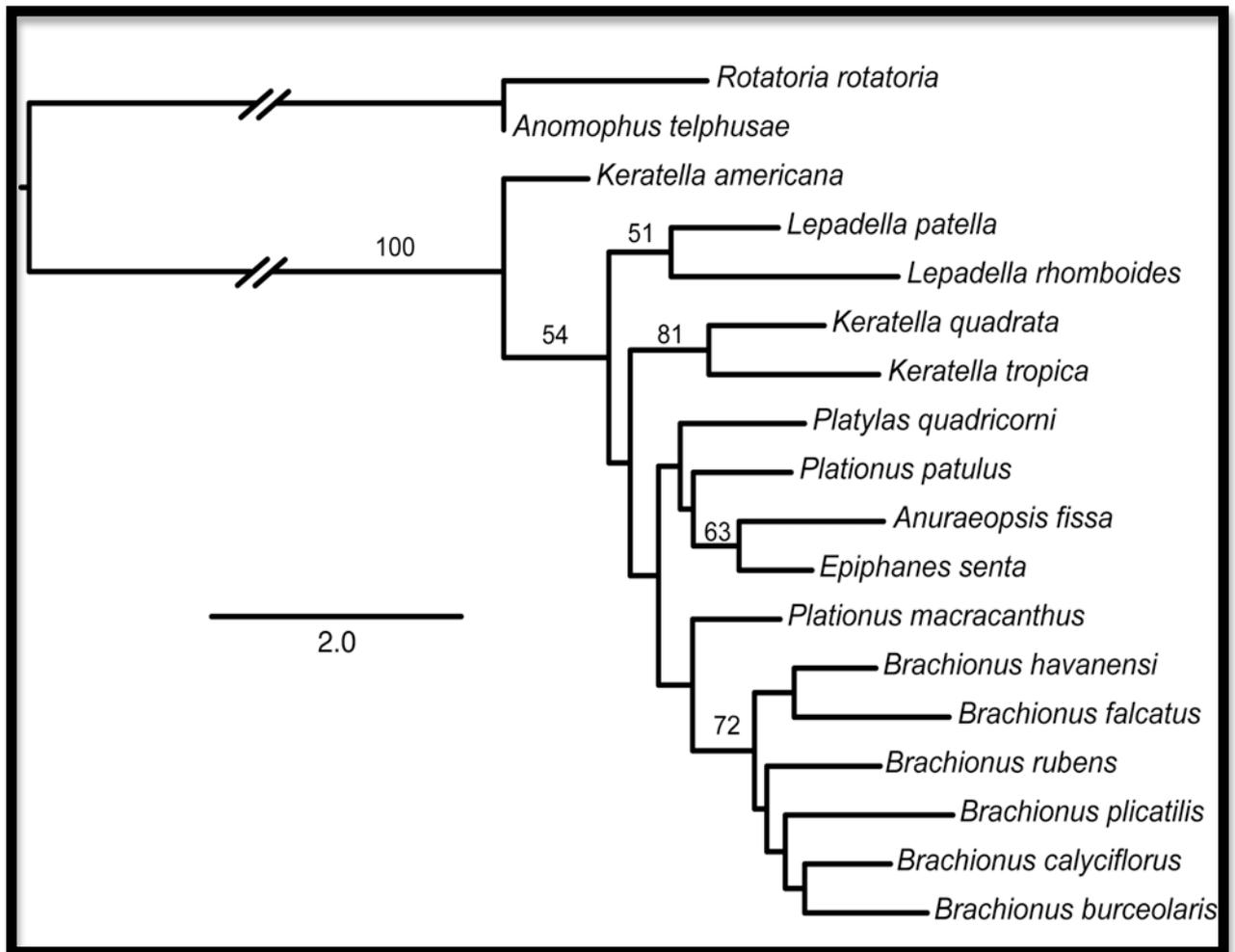


Figura 21. Árbol de Máxima Verosimilitud basado en secuencias del *Cox1* (-ln 5808.8284). El largo de las ramas es proporcional a la sustitución de nucleótidos. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1,000 búsquedas de bootstrap.

Por otra parte las seis especies del género *Brachionus* son un grupo monofilético con un valor de apoyo de 72%.

En el análisis de Inferencia Bayesiana la familia Brachionidae tampoco es un grupo monofilético (77% de apoyo de bootstrap) como en el caso del árbol obtenido por Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud.

El género *Brachionus*, al igual que en el análisis de Máxima Parsimonia muestra una politomía entre cuatro de las seis especies que lo conforman, Figura 22.

Dicha politomía también se presenta en el género *Keratella*, cuyos integrantes forman dos clados, uno, integrado por dos especies (*Keratella quadrata* y *Keratella tropica*) y el segundo por *Keratella americana*. Ambos clados están apoyados por valores altos de soporte de las ramas (100%).

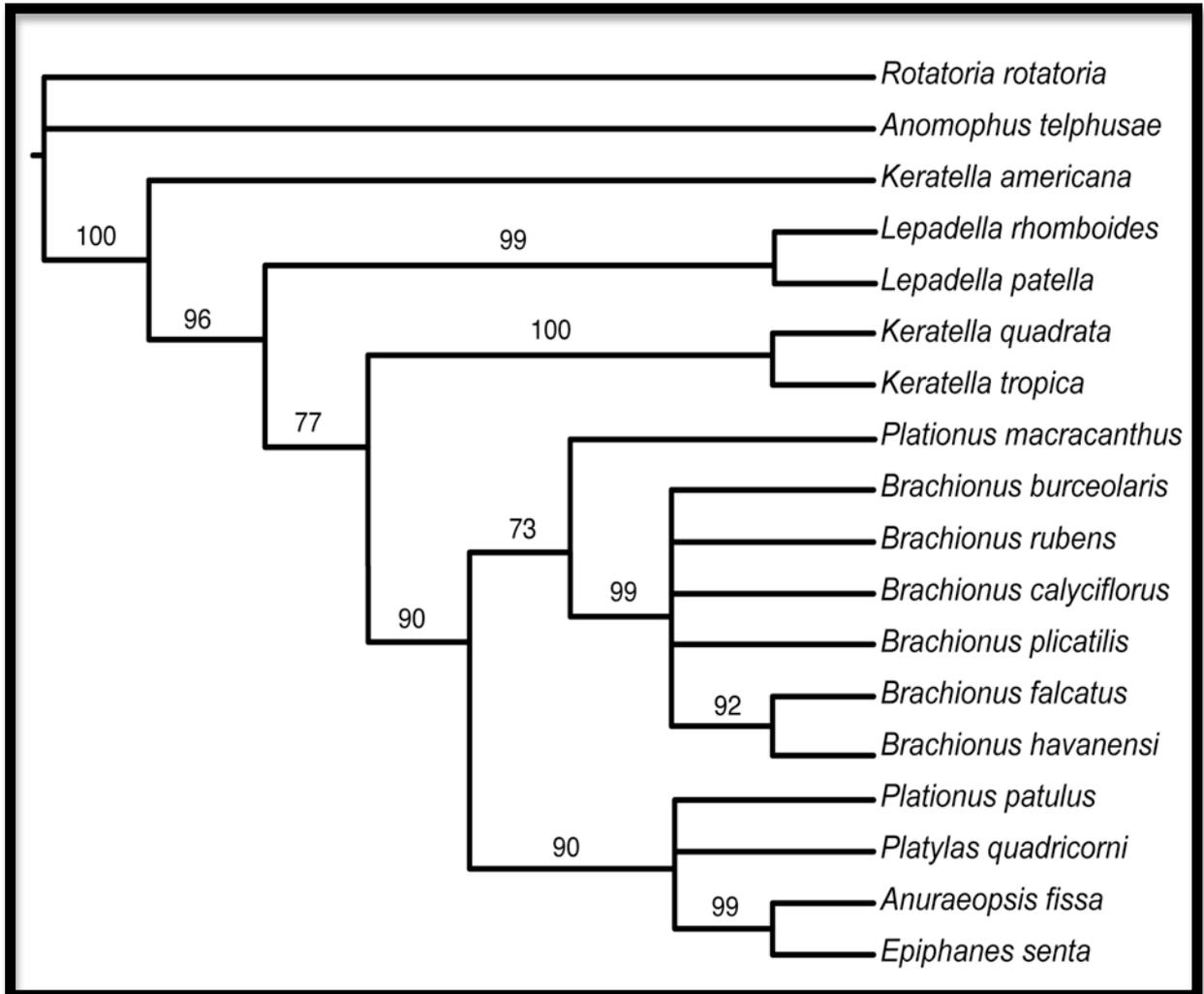


Figura 22. Inferencia Bayesiana con  $10 \times 10^6$  generaciones basada en 619pb. Los valores adyacentes a las ramas indican la probabilidad posterior para el clado.

28S

La base de datos del 28S incluyó a 20 taxa con 499-2,893 pb. El análisis de Máxima Parsimonia utilizó 838 caracteres informativos del total de los 2,893 alineados. El resultado de la búsqueda mostró un único árbol parsimonioso de 1,620 pasos, con un índice de consistencia de 0.76 y un índice de retención de 0.78 (Tabla 5).

En el árbol obtenido, al igual que los obtenidos por los tres métodos de reconstrucción filogenética basados en el análisis de *Cox1*, la familia Brachionidae resulta como un grupo polifilético con altos valores de bootstrap (77%). Figura 23

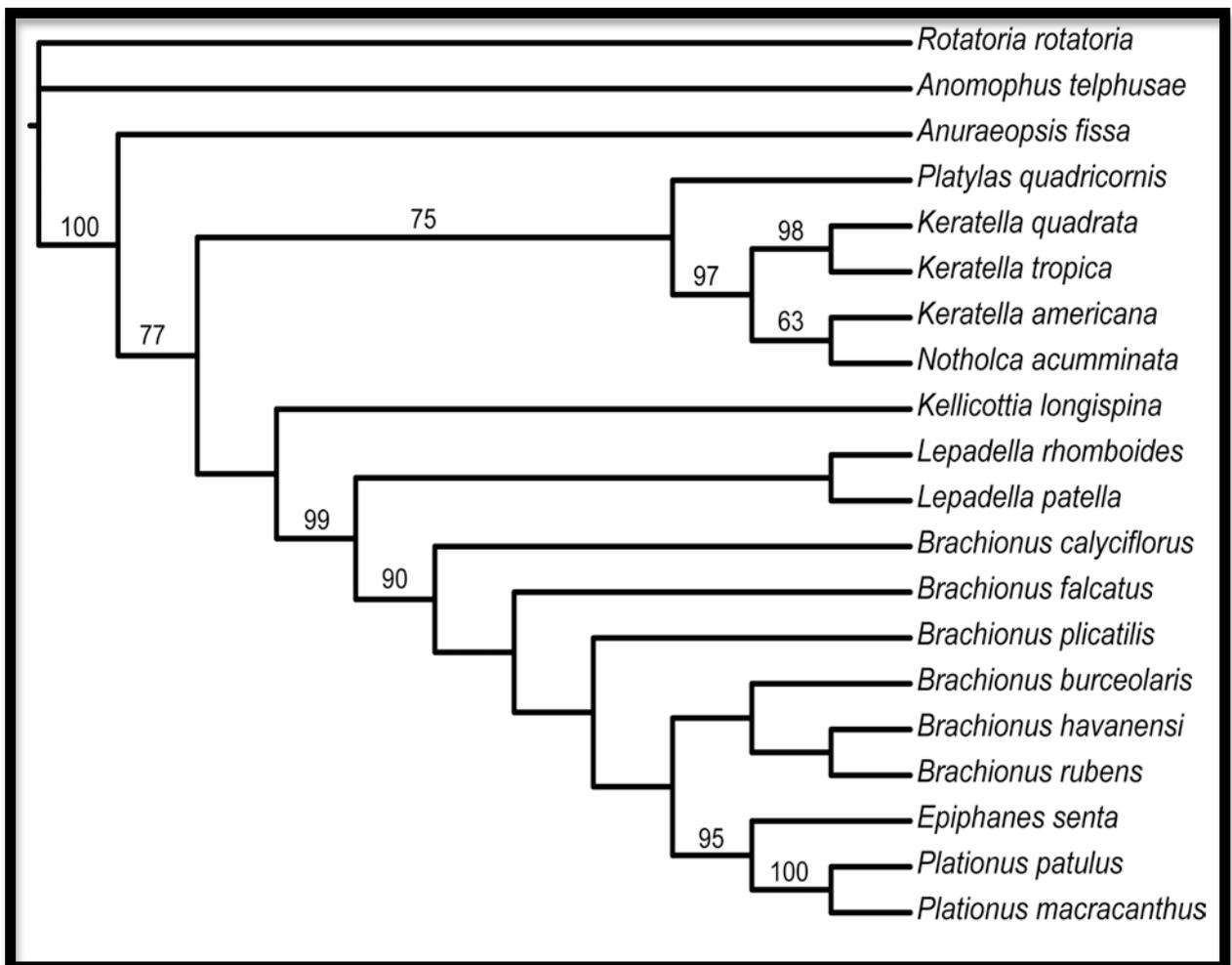


Figura 23. Árbol de Máxima Parsimonia (1,620 pasos) inferido de la base de datos del 28S. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1,000 búsquedas de bootstrap.

En este caso, ninguno de los siete géneros de la familia Brachionidae es un grupo monofilético y la mayoría de los valores de apoyo están por arriba del 70%. El género *Keratella* se conforma por dos clados que incluyen a la única especie que representa al género *Notholca* (*Notholca acumminata*). Las dos especies del género *Plationus* forman un clado monofilético bien apoyado con 100% de bootstrap.

En la prueba de Máxima Verosimilitud se encontró el mejor modelo de evolución para esta base de datos: “*General Time Reversible*” (GTR) (Rodríguez et. al., 1990), con sitios no variables (0.0) y una distribución gamma de 0.18 (+G) (Yang, 1994). El análisis de ML bajo este modelo mostró un árbol con un valor de Verosimilitud de :- 11413.8834 (Tabla 6).

En la topología encontrada por este método, al igual que en la de Parsimonia la familia Brachionidae aparece como un grupo polifilético integrado por todos los géneros de Brachionidae más la inclusión de los grupos externos *Lepadella patella*, *Lepadella rhomboides* y *Epiphanes senta* (Figura 24). El valor de apoyo para este clado es el más alto con 100% de bootstrap.

El género *Keratella* se conforma de dos clados; uno integrado por *Keratella quadrata* y *Keratella tropica* y el segundo por *Keratella americana* y *Notholca acumminata*, lo que coincide con el árbol de Máxima Parsimonia. De igual forma, el género *Brachionus* tampoco es monofilético e incluye a las dos especies del género *Plationus* (*Plationus patulus* y *Plationus p macracanthus*) y a la especie del grupo externo *Epiphanes senta*.

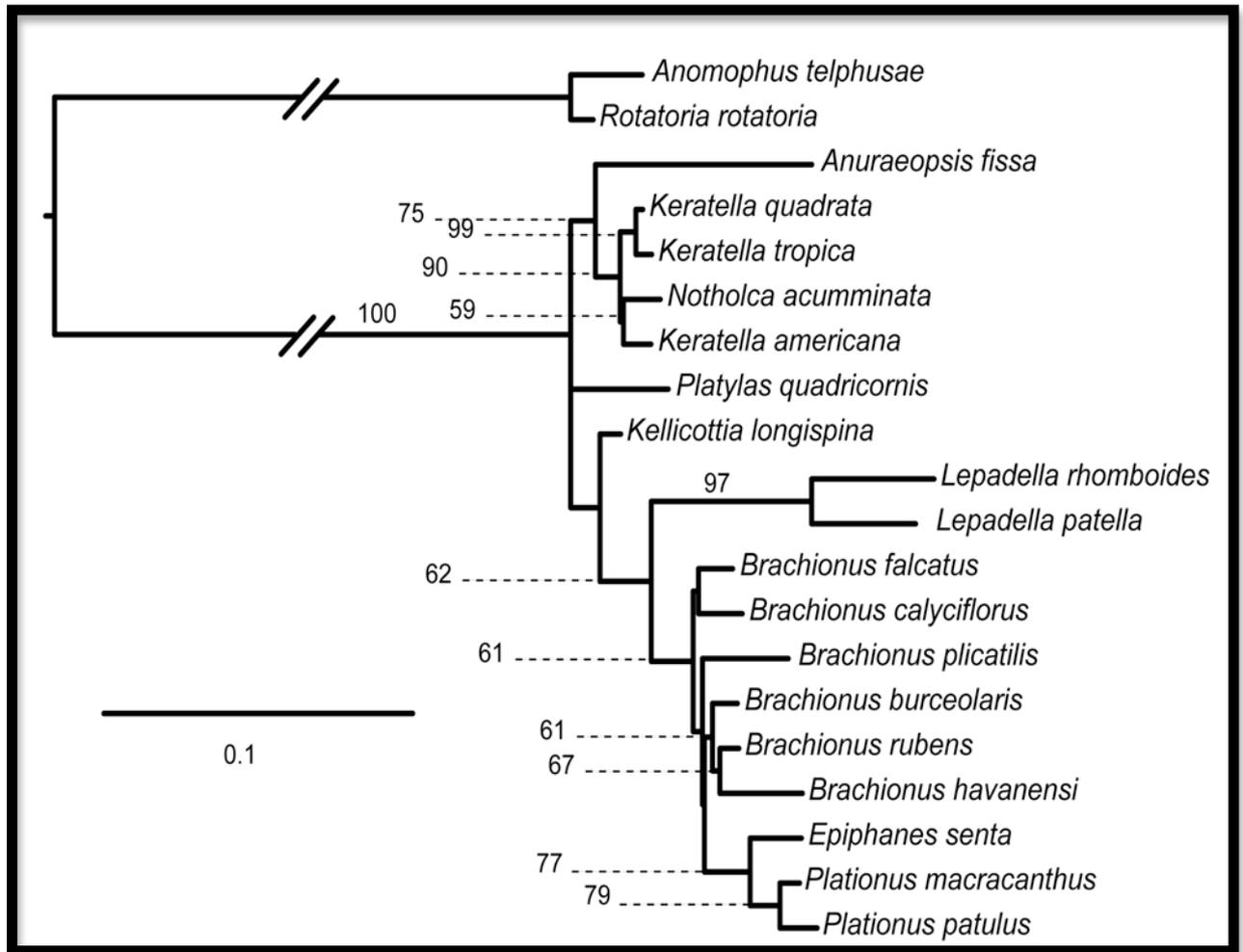


Figura 24. Árbol de Máxima Verosimilitud basado en secuencias del *Cox1* (-ln 11413.88). El largo de las ramas es proporcional a la sustitución de nucleótidos. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1,000 búsquedas de bootstrap.

En el análisis de Inferencia Bayesiana la familia Brachionidae resulta en un grupo polifilético (100 % bootstrap) incluyendo a las especies del grupo externo del género *Lepadella* (*Lepadella patella* y *Lepadella rhomboides*) y *Epiphanes senta*. Las especies de la familia Brachionidae se organizan en tres clados; el primero con las especies del género *Platylas*, *Anuraeopsis*, *Keratella* y *Notholca*, el segundo por *Brachionus* y *Plationus* y el último lo conforma *Kellicottia longispina*.

Las relaciones interespecíficas del género *Keratella* son iguales al árbol obtenido por el método de Máxima Verosimilitud en donde se agrupan dos clados



### ***Cox1+ 28S***

La base de datos del 28S incluyó a 20 taxa con 989-3,512 pb. El análisis de Máxima Parsimonia utilizó 1,154 caracteres informativos del total de los 3,512 alineados. El resultado de la búsqueda mostró un único árbol parsimonioso de 3,001 pasos, con un índice de consistencia de 0.61 y un índice de retención de 0.60 (Tabla 5).

Por el método de Máxima Parsimonia el árbol con el menor número de pasos muestra a la familia Brachionidae como parafilética ya que la especie del grupo externo *Epiphanes senta* se encuentra como grupo hermano de las especies del género *Plationus* (*Plationus patulus* y *Plationus macracanthus*). Figura 26. Al igual que en los árboles obtenidos con diferentes métodos de reconstrucción filogenética (MP, ML y Bayesianos) con la base de datos del 28S el género *Keratella* consta de dos clados que incluyen a *Notholca acumminata* como grupo hermano de *Keratella americana* y a *Keratella quadrata* y *Keratella trópica* + *Keratella quadrata* en el segundo clado. Sin embargo en esta topología obtenida con las dos bases de datos (*Cox1+28s*) se observa a las seis especies del género *Brachionus* como un complejo monofilético apoyado por altos valores de bootstrap (90%). Las dos especies del género *Plationus* forman un clado independiente a los seis géneros de la familia Brachionidae (98% bootstrap), sin embargo agrupan a la especie del grupo externo *Epiphanes senta*.

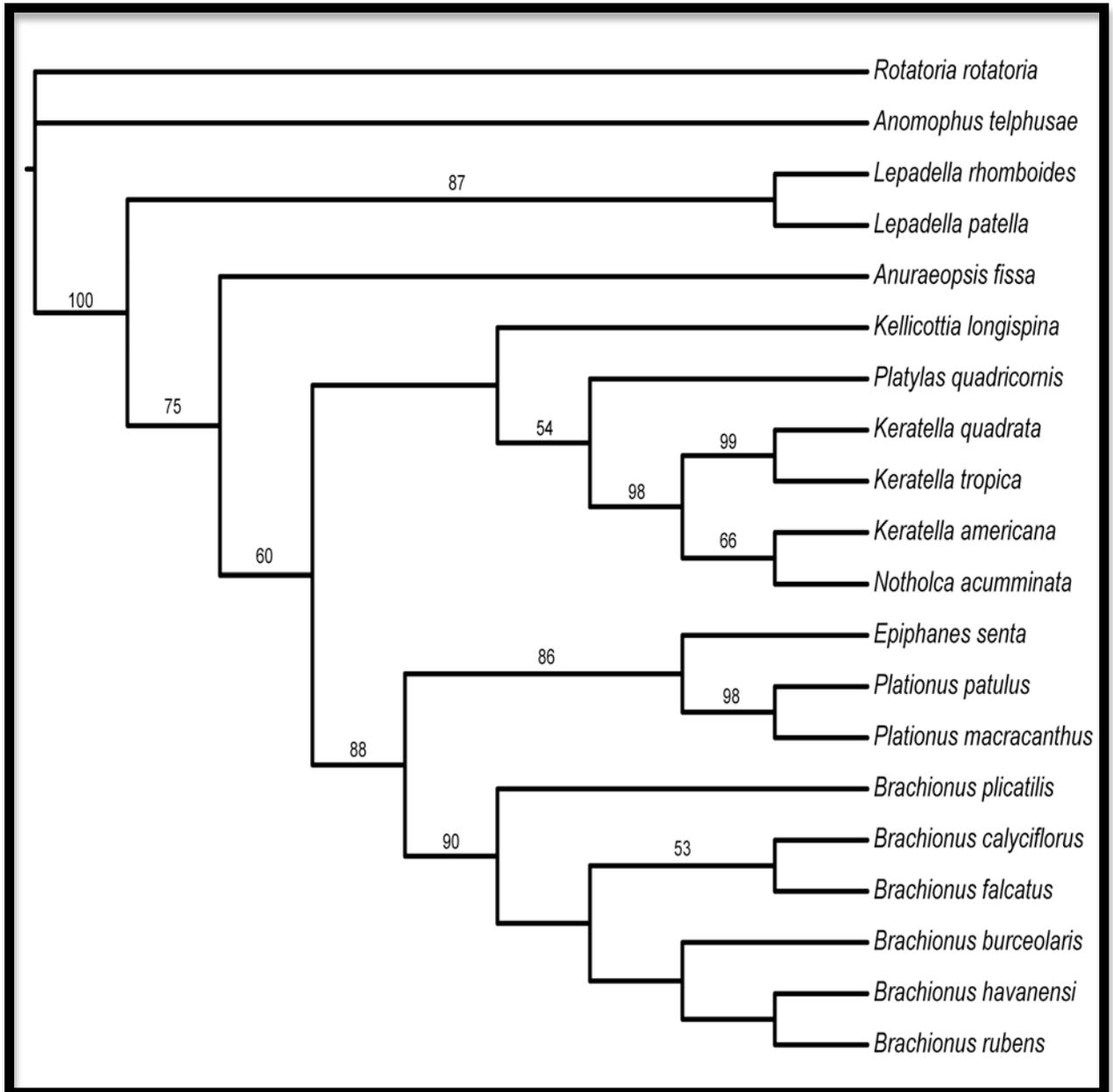


Figura 26. Árbol de Máxima Parsimonia (3,001pasos) inferido de la base de datos del *Cox1+28S*. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1,000 búsquedas de bootstrap.

En la prueba de Máxima Verosimilitud se encontró el mejor modelo de evolución para esta base de datos: “*General Time Reversible*” (GTR) (Rodríguez et. al., 1990), con sitios no variables (0.0). El análisis de ML bajo este modelo mostró un árbol con un valor de Verosimilitud de :- 17356.020 (Tabla 6). La topología resultante

coincide con la obtenida con el método de Máxima Parsimonia, donde la familia Brachionidae aparece como un grupo polifilético que incluye a la especie del grupo externo *E. senta*. Las dos especies del género *Lepadella* se encuentran como el grupo mas relacionado de *Brachionus*, *Plationus* y *Epiphanes* (GE), cuyas relaciones están apoyadas con bajos valores de bootstrap (<50%). Figura 27.

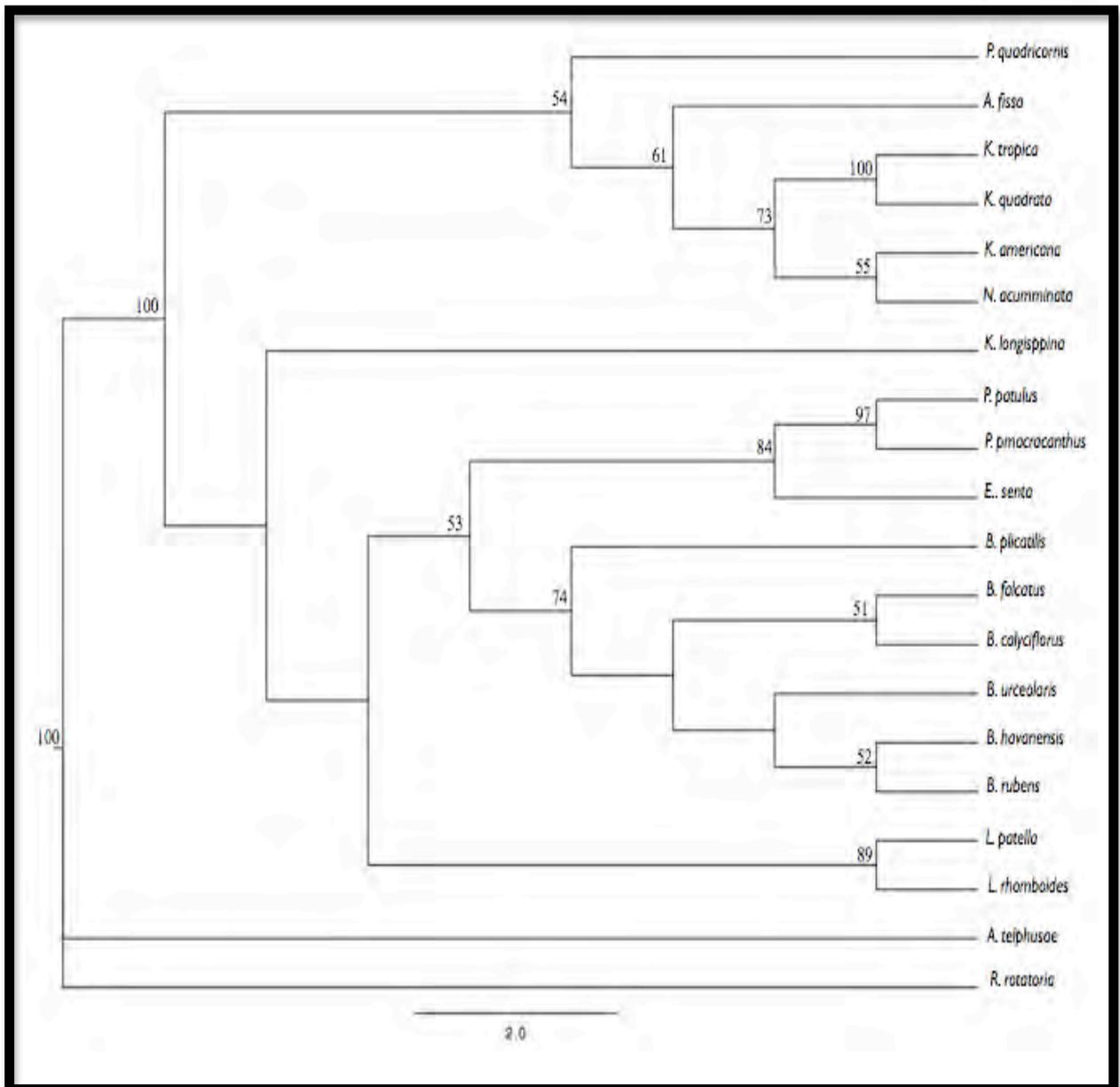


Figura 27. Árbol de Máxima Verosimilitud basado en secuencias del *Cox1+28S* (-ln 11413.88). El largo de las ramas es proporcional a la sustitución de nucleótidos. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1,000 búsquedas de bootstrap.

El género *Keratella* se conforma de dos clados que incluyen a la especie *Notholca* entre sus ramas. *Anuraeopsis* es el grupo hermano de dicho clado, que a su vez es hermano de *Platyias*. Sin embargo ambos valores de apoyo de esta topología son menores a 65%.

Mediante el análisis de Inferencia Bayesiana las relaciones de la familia Brachionidae con dos especies del grupo externo (*L. patella* y *L. rhomboides*) resultan en una politomía apoyada por altos valores de probabilidad posterior (100 % de apoyo de bootstrap). Figura 28. Con dicho método no se pueden establecer las relaciones de las seis especies de *Brachionus* ya que cuatro de ellas (*B. falcatus*, *B. urceolaris*, *B. havavensis* y *B. rubens*) forman una politomía.

De igual manera se observa que *Anuraeopsis fissa* es grupo hermano del complejo *Keratella* y *Notholca*, lo que se apoya con un valor de 90% de probabilidad posterior. Como grupo hermanos de estos clados mencionados se encuentra *Platyias quadricornis* (72% de probabilidad posterior). La última especie de la familia Brachionidae, *Kellicottia longispina* es el grupo hermano de los clados *Keratella+Notholca*, *Anuraeopsis* y *Platyias*.

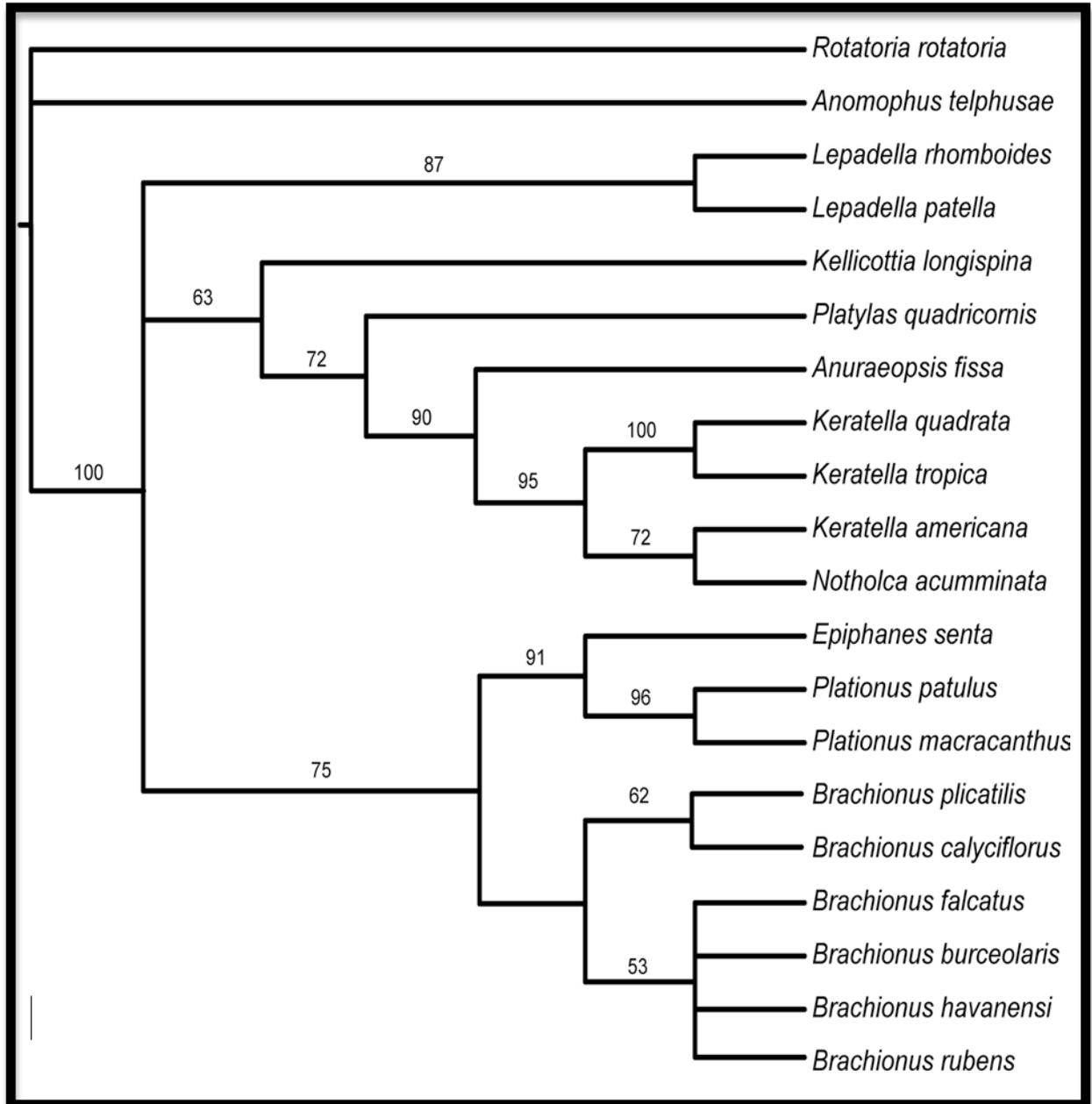


Figura 28. Árbol de inferencia Bayesiana de la base de datos *Cox1+28S* con  $20 \times 10^6$  generaciones basada en 3,512pb. Los valores adyacentes a las ramas indican la probabilidad posterior para el clado.

Con el fin de evaluar si la familia Brachionidae es monofilética, se realizó un forzado de las ramas *constrain* con el fin de proponer y evaluar hipótesis alternativas  $H_a$ . Estas hipótesis se analizaron por el método de ML con las bases de datos *Cox1*, 28S y la combinada (*Cox1+28S*). Los resultados que obtuvimos basados en la prueba de Shimodaira & Hasegawa (1999) implementada en PAUP\* son los siguientes:

**Cox1:** el valor de verosimilitud de la hipótesis alternativa ( $H_a$ ), en la cual la familia Brachionidae es forzada a ser un grupo monofilético es de  $-\ln 5824.33310$  con una  $p=0.75$  ( $p>0.05$ , no significativa; 0), lo que indica que la hipótesis alternativa ( $H_a$ ) es significativamente peor que nuestro mejor árbol ( $H_o$ ) que se presenta en la Figura 21.

**28S:** el valor de verosimilitud de la hipótesis alternativa ( $H_a$ ), en la cual la familia Brachionidae es forzada a ser un grupo monofilético es de  $-\ln 11466.76609$  con una  $p=0.010$  ( $p<0.05$ , es significativa; Tabla 8), lo que indica que no hay forma de rechazar  $H_o$ , la prueba no puede rechazar la hipótesis que Brachionidae sea monofilético.

**Cox1+28S:** el valor de verosimilitud de la hipótesis alternativa ( $H_a$ ), en la cual la familia Brachionidae es forzada a ser un grupo monofilético es de  $-\ln 17954.56912$  con una  $p=0.010$  ( $p<0.05$ , es significativa; Tabla 9), lo que indica al igual que en la prueba con 28S que no hay forma de rechazar  $H_o$ , la prueba no puede rechazar la hipótesis que Brachionidae sea monofilético.

**Cox1**

Árbol	$-\ln L$	Diferencias en L	$p$
Ha	5824.33310	13.95567	0.75
Ho	5810.37743	(best)	

Tabla 7. Prueba de Shimodaira & Hasegawa (HS). Ha: forzando a Brachionidae como grupo monofilético. Ho: y nuestro mejor árbol obtenido de la base de datos Cox1.

**28S**

Árbol	-ln L	Diferencias en L	<i>p</i>
Ha	11466.76609	33.04679	0.010*
Ho	11433.71930	(best)	

Tabla 8. Prueba de Shimodaira & Hasegawa (HS). Ha: forzando a Brachionidae como grupo monofilético. Ho: y nuestro mejor árbol obtenido de la base de datos 28S. \* $p < 0.05$ .

**Cox1+28S**

Árbol	-ln L	Diferencias en L	<i>p</i>
Ha	17954.56912	29.07770	0.037*
Ho	17925.49142	(best)	

Tabla 9. Prueba de Shimodaira & Hasegawa (HS). Ha: forzando a Brachionidae como grupo monofilético. Ho: y nuestro mejor árbol obtenido de la base de datos Cox1+28S. \* $p < 0.05$ .

## **XII. DISCUSIÓN**

### ***XII.1. Validez del género Plationus***

El árbol de máxima verosimilitud de la base de datos combinada (*Cox1*+28S; D2+D3); Figura 18, el cual incluye a cinco de los siete géneros reconocidos en la familia Brachionidae, apoya que esta familia es monofilética pero con bajos valores de apoyo *bootstrap* (<50%). Esta hipótesis filogenética es diferente a las inferidas con anterioridad basadas en caracteres morfológicos y moleculares, las cuales sugieren que dicha familia es parafilética pero también con valores <50% de apoyo (Sørensen & Giribet, 2006). Por ello es necesario adicionar un mayor número de especies, así como otros genes nucleares y mitocondriales para resolver la monofilia/parafilia de Brachionidae.

El género *Plationus* fue descrito por Segers et al. (1993) e incluye a tres especies; *Plationus patulus*, *P. polyacanthus* y *P. macracanthus*, las cuales han sido asignadas alternativamente en *Brachionus* o en *Platyias* (Müller, 1786; Ahlstrom, 1940; Bartos, 1959; Rudescu, 1960; Kutikova, 1970; Kotikova et al., 2005; Xian- Ling et al. 2006; Nandini et al., 2007; Kennari et al., 2008; Sarma et al., 2008). Posteriormente se agregaron los dos *P. patulus patulus* y *P. felicitas* taxa al género *Plationus* (Segers, 2007).

En este estudio se analizaron a dos taxa que representan al género *Plationus*, incluyendo a tres poblaciones de la especie tipo *P. patulus* y a la subespecie *P. patulus macracanthus*. La divergencia genética estimada dentro de las tres poblaciones de *P. patulus* fue de 0 a 17.4% para *Cox1* y de 0 a 3.1% para 28S y entre las tres poblaciones

de *P. patulus* con la subespecie *P. patulus macracanthus* fue de 14.5 a 17.4% para *Cox1* y de 3.1 a 4.2% para 28S (D2+D3). La divergencia genética encontrada para *Cox1* es similar a otras comparaciones congénicas encontradas dentro de la familia, por ejemplo, la divergencia genética entre especies de *Keratella* fue hasta del 12% (Gómez et al., 2002; Gómez, 2005), y de 20 a 25% entre especies de *Brachionus* (Derry, 2003). Los dos taxa de *Plationus* que fueron analizados en este trabajo se observan como un grupo monofilético, consistente con la clasificación como un género separado. Sin embargo, con la finalidad de probar la validez taxonómica de *Plationus* se propusieron tres hipótesis alternativas, las cuales fueron evaluadas a través del análisis de ML con la base de datos combinada (*Cox1*+28S; D2+D3). Los resultados de la prueba de Shimodaira & Hasegawa (1999) desarrollada en PAUP\*, muestran que las tres hipótesis alternativas ( $Ha_1$ ,  $Ha_2$ , y  $Ha_3$ ) son significativamente peores que el mejor árbol encontrado ( $Ho$ ), representado en la Figura 19.

La posición taxonómica tan cercana de *Plationus* con *Brachionus* y *Platyias* mostrada en nuestro árbol combinado es apoyada en un estudio filogenético publicado anteriormente basado en caracteres morfológicos y moleculares (Sørensen & Giribet, 2006).

La cercana relación filogenética de los géneros *Brachionus*, *Plationus* y *Platyias* se apoya por tres sinapomorfias morfológicas; pie pseudosegmentado, presencia de un ojo y un trofi especializado (Wulfert 1965; Segers et al., 1993). La posición sistemática de *Plationus* como un género independiente dentro de la familia Brachionidae encontrado en nuestro análisis filogenético, fue apoyado por tres sinapomorfias en trabajos anteriores (lórica insertada terminalmente, presencia del proceso anterior del rami y la cavidad proximal del manubrio cerrada) (Segers et al., 1993).

El género *Brachionus* es un grupo de organismos que habitan en una gran variedad de sistemas de agua dulce y salobres. La variación en la forma y tamaño de la lórica (cuerpo), y el número, forma y tamaño de las espinas anteriores han sido caracteres usados tradicionalmente para reconocer y separar a las especies (Segers, 2002). Además con la ayuda de información genética se ha detectado un complejo de especies crípticas (Ciros-Pérez et al., 2001; Gómez et al., 2002; Suatoni et al., 2006). En este trabajo se generaron secuencias del *Cox1* para cinco especies de *Brachionus*, las cuales se alinearon con otra especie congénica reportada previamente. La divergencia genética estimada entre las seis especies de *Brachionus* para *Cox1* fue de 14.8 a 22.3%, y dentro de las dos poblaciones de *B. urceolaris* fue de 0%.

Este marcador molecular ya se había utilizado con anterioridad para separar a otras especies congénicas de *Brachionus*, las cuales mostraron una divergencia genética de más de 12% (Gómez et al., 2002; Gómez, 2005), así como en un rango de 20 a 25% en el trabajo de Derry (2003).

La divergencia genética estimada entre las dos poblaciones de *B. urceolaris* fue de 0.14%, y entre las especies de *Brachionus* va desde 3.5 hasta 8.5% para el 28S (D2+D3), lo cual fue de gran utilidad para separar a las especies congénicas.

El árbol filogenético obtenido de la base de datos combinada (*Cox1*+28S; D2+D3) muestra la monofilia de las seis especies congénicas de *Brachionus*. Este clado fue apoyado con altos valores de apoyo *bootstrap* de 98% (Figura 19).

*Keratella* es un género cosmopolita compuesto aproximadamente por 53 especies (Segers, 2007). Las tres especies que fueron secuenciadas en este trabajo (*K. americana* Carlin, 1943; *K. tropica* Apstein, 1907; *K. quadrata* Müller, 1786) se alinearon con otra población de *Keratella quadrata*, lo cual mostró una divergencia genética entre especies de 20.3 a 22.6% para *Cox1* y de 1.1 a 2.8% para 28S (D2+D3).

El rango de la divergencia genética estimada entre las especies congénéricas de *Keratella* para la base de datos *Cox1* es muy similar a la reportada para otras especies de *Keratella* de Canada, cuya divergencia es de 23 a 27% (Derry, 2003).

La divergencia genética estimada entre las dos poblaciones de *K. quadrata* fue de 7% para *Cox1* y de 0.28% para 28S (D2+D3). En su estudio de 2003, Derry encontró una distancia genética de 4.4% para *Cox1* entre los morfotipos con espinas y sin espinas de *K. cochlearis* Gosse, 1851, lo que sugiere que estos morfotipos son un complejo de especies. La filogenia obtenida con 28S (D2+D3) y la base de datos combinada indican que las tres especies congénéricas de *Keratella* comprenden un clado con altos valores de apoyo ( Figura 18 y Figura 19).

Cabe señalar que en este estudio se estudio por primera vez el gen nuclear ribosomal (28S) como un marcador molecular para determinar as diferencias/similitudes entre las especies de la familia Brachionidae. Además el árbol obtenido de esta base de datos (Figura 18) muestra una mejor resolución y valores de apoyo en los cinco clados y dentro de las poblaciones comparada con el árbol del *Cox1* (Figura 17).

De acuerdo a nuestros resultados, una explicación a este fenómeno se debe al hecho de que el gen *Cox1* evoluciona 1.81 veces mas rápido que el 28S (D2+D3). De hecho en el árbol del *Cox1* (Figura 17) los nodos que agrupan a la familia Brachionidae y a los géneros no estan bien resueltos. Debido a la rápida evolución de este gen, podría ser un buen marcador para estudiar poblaciones o detectar complejos de especies en los rotíferos (Gómez, 2005; Gómez et al., 2007).

Por otro lado, un gen que evoluciona mas lento como el 28S, es mejor para resolver las relaciones filogenéticas a nivel de género y de familia. Por lo tanto, cuando combinamos ambos genes (*Cox1* +28S; D2+D3), la resolución a nivel genérico y el

apoyo de los nodos es mayor que cuando se infiere con los genes *Cox1* y 28S (D2+D3) por separado, ya que el que evoluciona más rápido (*Cox1*) resuelve las ramas internas y el que evoluciona más lento (28S; D2+D3) ayuda a resolver los clados mayores como género y familia.

### ***XII.2. Filogenia de la familia Brachionidae***

Existen pocos trabajos que abordan el tema de la filogenia de las familias de rotíferos de la clase Monogononta y en especial de la familia Brachionidae. Algunos trabajos que incluyen especies de los géneros de la familia Brachionidae están enfocados a inferir las relaciones evolutivas del grupo Syndermata (Rotifera + Acanthocephala); Garey et. al., 1996, 1998; Giribet et. al., 2000, 2004; Mark-Welch, 2005; García-Varela & Nadler, S. A. 2006, y de las tres clases del grupo de los rotíferos (Bdelloidea, Monogononta y Seisonidea). Dichos estudios no incluyen más de siete especies de la familia Brachionidae (Melone et. al., 1998; Sørensen, 2002; Sørensen & Giribet, G, 2006; Gi-Sik & Joong-Ki, 2009). Asimismo, hasta la fecha se han publicado pocos trabajos que abordan el tema de las relaciones filogenéticas a nivel de géneros e interespecífica de los miembros de la familia Brachionidae (Wallace & Colburn, 1989; Derry et. al., 2003; Papakostas et, al., 2005; Sørensen & Giribet, G, 2006).

Por un lado, nuestros análisis de las bases de datos de los genes *Cox1* y 28S de manera independiente muestran a la familia Brachionidae como un grupo parafilético, sin importar el método de reconstrucción filogenética utilizado para cada una de las bases de datos (Figura 21, Figura 23). Estos resultados coinciden con los estudios encontrados por Giribet et. al., 2004 basados en secuencias de los genes: 18S rRNA,



Otro trabajo más reciente realizado por Sørensen & Giribet en el 2006 que incluye a seis especies de Brachionidae representando a cinco de los siete géneros (*B. calyciflorus*, *B. plicatilis*, *K. quadrata*, *N. Acuminata*, *P. patulus* y *Platylas quadricornis*) basados en morfología y secuencias parciales de los genes 18S, 28S, Histona H3 y *Cox1* determina en el análisis combinado por los métodos de Máxima Verosimilitud y Bayesianos, que la familia Brachionidae es un clado polifilético y se compone de dos clados; el primero conformado por los géneros *Keratella* y *Notholca* y el segundo por *Platylas*, *Platylas* y *Brachionus* (Figura 30).

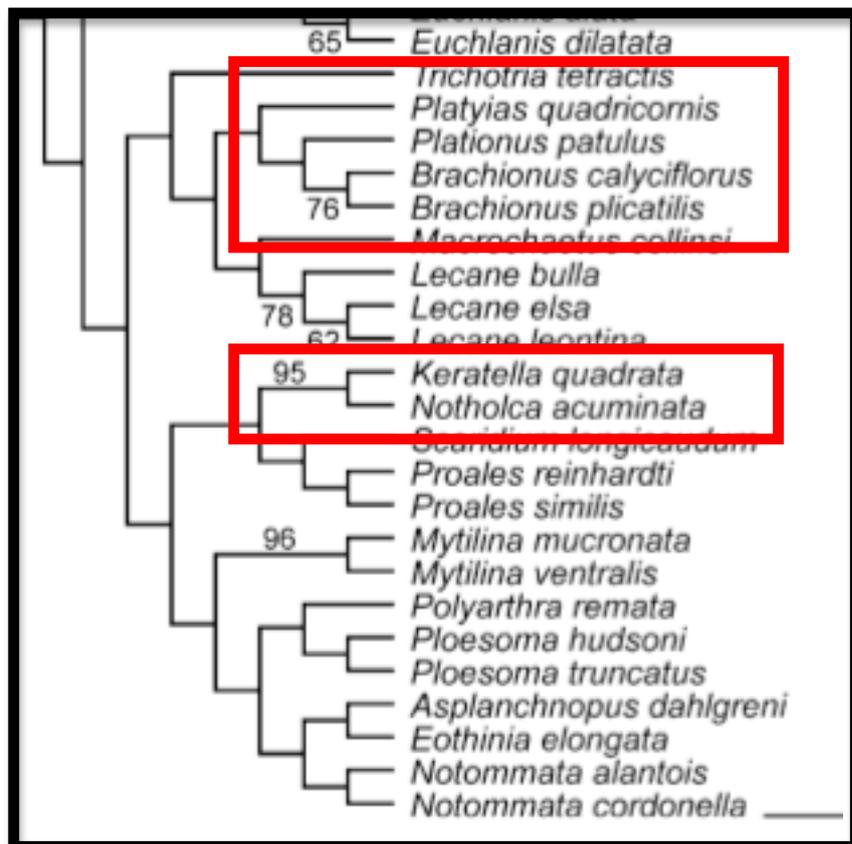


Figura 30. Árbol tomado y recortado para fines de visualización de Sørensen & Giribet, 2006 basado en caracteres morfológicos y moleculares mostrando las relaciones filogenéticas de cinco especies de la familia Brachionidae. Los cuadros en rojo muestran la posición polifilética de dichas especies.

Esto es similar a los resultados obtenidos en el presente estudio en el que el análisis combinado de ambos genes (*Cox1*+28S) basado en un mayor número de representantes de los géneros muestra a Brachionidae como una familia parafilética que incluye los dos clados que se describen en el trabajo de Sørensen & Giribet en el 2006. Cabe señalar que en el mismo trabajo de Sørensen & Giribet utilizando únicamente los caracteres morfológicos, las seis especies de Brachionidae resultan en un clado monofilético, aunque las relaciones interespecíficas no se encuentran bien resueltas ya que existe una politomía en los clados (Figura 31).

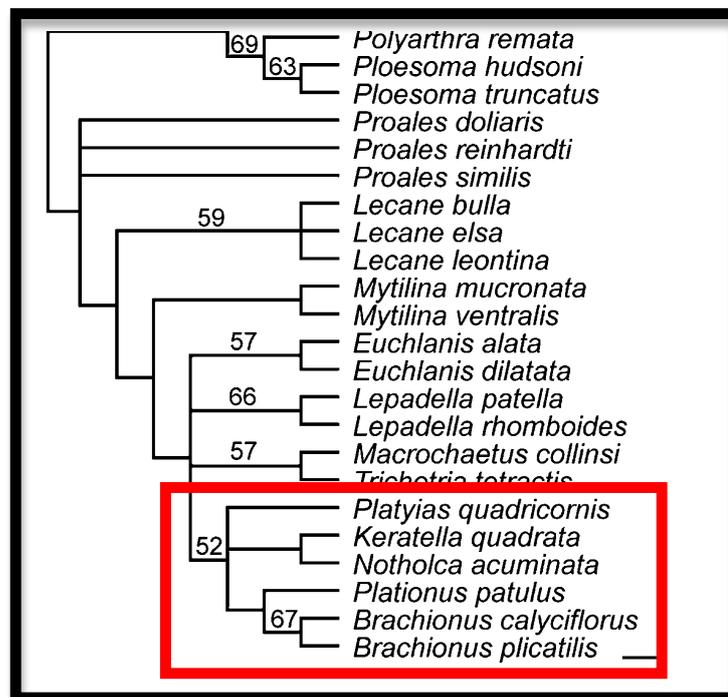


Figura 31. Árbol tomado y recortado para fines de visualización de Sørensen & Giribet, 2006 basado en caracteres morfológicos mostrando las relaciones monofiléticas de cinco especies de la familia Brachionidae. El cuadro en rojo muestran la posición de dichas especies.

Por otro lado, en todos nuestros árboles obtenidos por cualquiera de los métodos de reconstrucción filogenética (MP, MV y Bayesiano) y base de datos (*Cox1*, 28S y *Cox1*+28S), Figura 20- Figura 28, la especie *Epiphanes senta* se agrupa dentro de la familia Brachionidae dentro del clado *Platyonus*. Esto es interesante ya que

algunos estudios como el de Sørensen, 2002 y García-Varela & Nadler, 2006 muestran una topología semejante. El trabajo de Sørensen del 2002 esta basado en el análisis de los trofi por microscopía electrónica de barrido (SEM) de 100 especies de rotíferos pertenecientes a 48 géneros y 22 familias, y cuyos resultados muestran a la familia Brachionidae en una politomía con las familias Epiphaniidae y Proalidae (Figura 32).

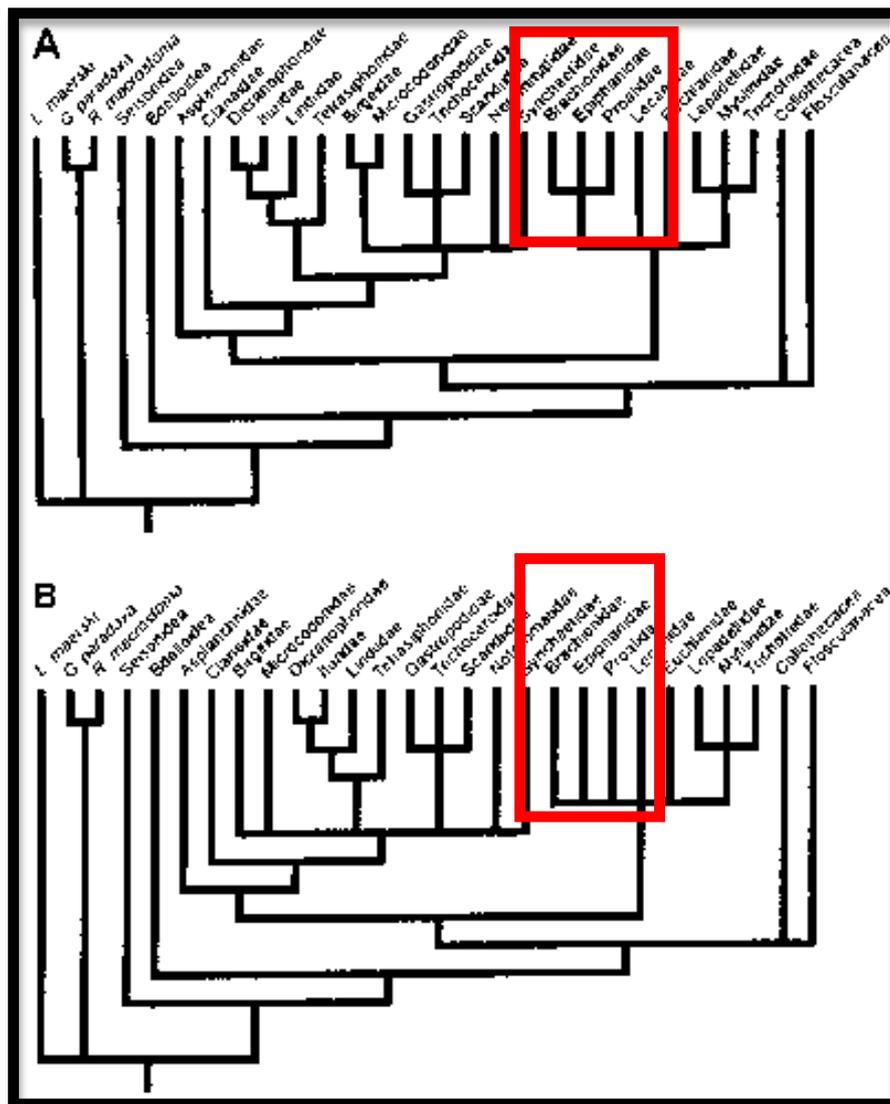


Figura 32. Árbol tomado de Sørensen, 2002 basado el análisis de los caracteres que conforman el trofi y el cual muestra una politomía en el clado de la familia Brachionidae, Epiphaniidae y Proalidae señalado con rojo.

Este clado es apoyado también por los caracteres morfológicos: similitud en las fenestras del rami (Figura 33a) y la presencia de un subuncus esclerofilar (Figura 33b). Especialmente el tamaño, la forma y la localización del basifenestrado en *Brachionus stylata* (Figura 33c), *Epiphanes senta* (Figura 33d) y *Kellicottia longispina* son muy similares pero los polimorfismos en los caracteres de estos tres taxa son muy grandes, por lo que es necesario hacer un mayor muestreo de las especies que conforman a estos géneros (Sørensen, 2002).

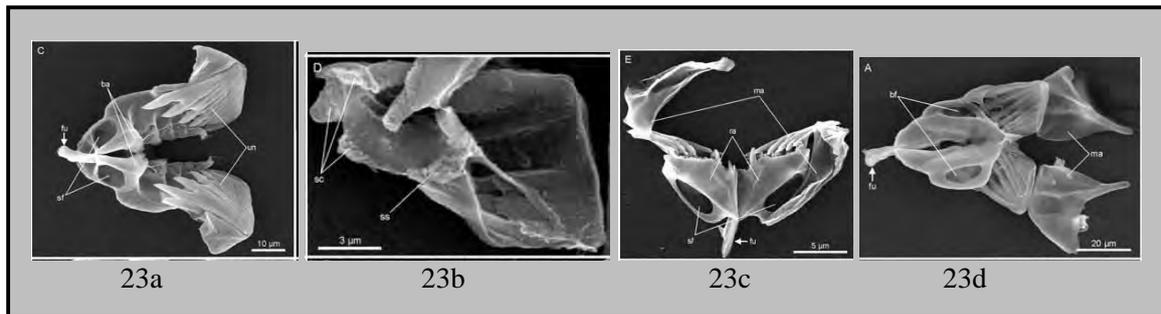


Figura 33. Caracteres morfológicos que comparten las especies de la familia Brachionidae y Epiphanidae. Tomado de Sørensen, 2002. a) *E. Senta*, rami fenestrado, b) subuncus esclerofilar, c) *B. stylata* d) *E. Senta*.

La publicación de García-Varela & Nadler años mas tarde (2006) incluye el análisis de dos especies del género *Brachionus* y de la especie del GE *Epiphanes senta* basados en secuencias de los genes *Cox1*, 18S rDNA y 28S rDNA, y muestra resultados similiares a los presentados en el trabajo de Sørensen (2002), con respecto a la politomia y/o cercanía de las dos especies de *Brachionus* pertenecientes a la familia Brachionidae con *E. senta* (Figura 34).

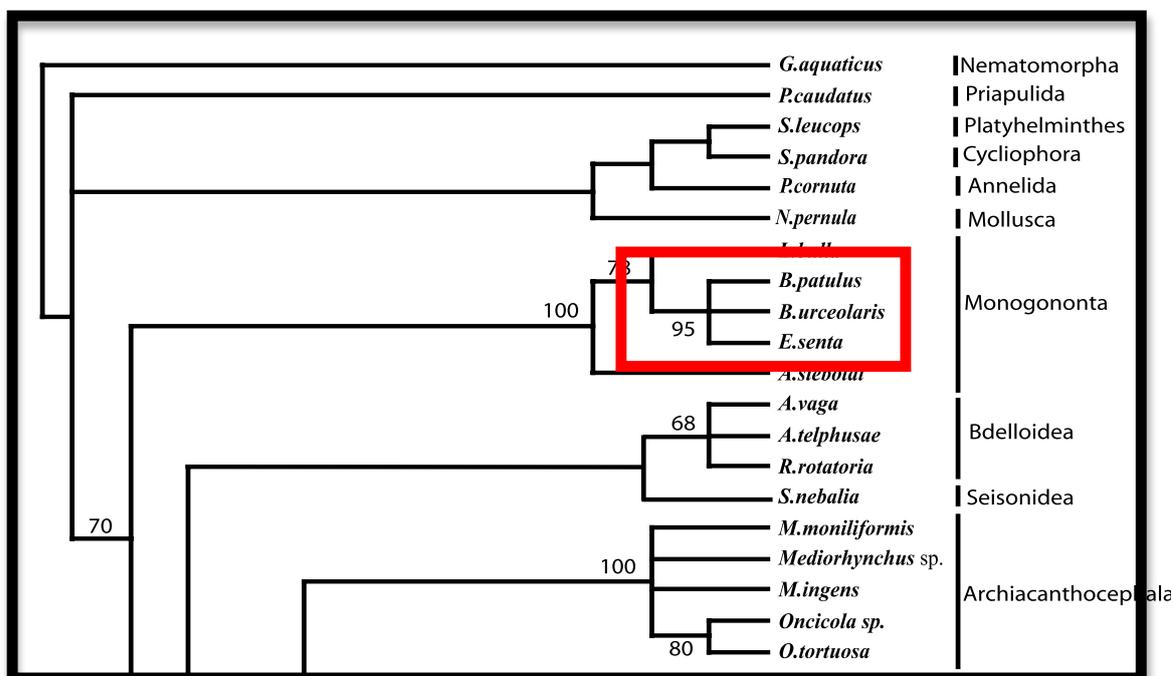


Figura 34. Árbol tomado y recortado para fines de visualización de García-Varela, 2006 basado en bases de datos de caracteres moleculares. Se observan en rojo las relaciones entre las especies del género *Brachionus* y *Ephipanes*.

### *Relaciones filogenéticas dentro de los géneros de Brachionidae*

Existen muy pocos trabajos moleculares que aborden el tema de las relaciones interespecíficas de la familia Brachionidae. Algunos intentos por resolver dichas relaciones se enfocaron en el análisis de algunas especies a nivel intraespecífico para solucionar problemas filogenéticos de los géneros *Notholca*, *Brachionus* y *Keratella* principalmente. Desde 1989, Wallace & Colburn realizaron un estudio para dilucidar las relaciones filogenéticas del género *Notholca*, en el cual estudiaron nueve caracteres de la morfología de 37 especies. Los resultados obtenidos en el estudio concluyen que las relaciones entre las diferentes especies de *Notholca* basados en datos morfológicos son difíciles de distinguir debido a la gran plasticidad fenotípica de las especies como

la forma y el tamaño del cuerpo que varía de acuerdo al estado nutricional y la época del año (Björklund, 1972). En nuestros árboles evolutivos basados en la base de datos combinados (*Cox1+28S*) analizada por MP, MV y Bayesianos, se encontró a la especie del género *Notholca* (*Notholca acumminata*) como grupo hermano del clado *Keratella*, topología también apoyada por altos valores de bootstrap y probabilidad posterior (>95%). Esto sugiere que la gran plasticidad fenotípica y genotípica (Wallace & Colburn, 1989) que presentan las especies del género *Notholca* y *Keratella* puede ser influenciada por factores ambientales y genéticos (Ge et. al., 2012). Por lo tanto, es indispensable analizar un mayor número de especies de cada grupo con la finalidad de entender las relaciones evolutivas de éstos ya que existen pocos trabajos en donde se aborda el tema de la filogenia de estos grupos.

Por otro lado, las topologías obtenidas en este estudio, resultado de los análisis de la base de datos combinados (*Cox1+28S*), usando los tres distintos métodos de reconstrucción filogenética, muestran resultados similares entre sí, en cuanto a la monofilia de las especies del género *Brachionus*. Estos resultados son similares a los obtenidos por el análisis de las distintas bases de datos moleculares basadas en los genes: ITS1 (Xian-Ling et. al., 2006; Ge et. al., 2012), 16S (Derry et. al., 2003) y *Cox1* (Gómez, 2005). El trabajo de Derry et. al., (2003) basado en el estudio de los genes *Cox1* y 28S por el método de Parsimonia muestra una topología en donde *Brachionus* y *Keratella* son un clado monofilético. Sin embargo no fue posible resolver las relaciones taxonómicas en los clados intraespecíficos a diferencia de nuestros análisis en los cuales se resuleven las relaciones intraespecíficas del género *Brachionus* y *Keratella* (Ver Figura 26 y Figura 28).

En la mayoría de las topologías encontradas (Figura 23- Figura 28) se corrobora al género *Plationus* como un clado independiente a *Brachionus* y *Platyias* apoyando la hipótesis que *Plationus patulus*, *P. p macracanthus* y *P. polyacanthus* son un género independiente (Segers et. al., 1993).

En cuanto al género *Platyias* este se encuentran dentro del clado de la familia Brachionidae y como grupos hermanos del clado conformado por *Keratella* y *Notholca*. El género *Kellicottia* es a su vez el grupo hermano del clado *Platyias+Keratella+Nothoca* (Figura 28). Por otra parte el género *Anuraeopsis* se ubica dentro de la topología de la familia Brachionidae como grupo hermano del clado *Keratella+Notholca* (Figura 27) o bien como el grupo hermano del clado compuesto por todos los demás géneros de Brachionidae (Figura 26). Es importante señalar que para el mejor entendimiento de estos géneros es indispensable incluir a mas de dos especies para ver su relación con todos los géneros de Brachionidae.

En la tabla de distancias genéticas interespecíficas (Tabla 10) se muestra en el triangulo superior las obtenidas con la base de datos del 28S, y en el inferior las corresponden al *Cox1*. En dicha tabla se observa que los géneros dentro del clado de la familia Brachionidae con las menores distancias genéticas para el 28S son: *P.quadricornis* vs *Keratella* (2%), *Plationus* vs *E. senta* (7%), *N. acumminata* vs *K. longispina*, *P. quadrocornis*, *Keratella* (4%), *E. senta* vs *Brachionus* (10%) y *Plationus* vs *Brachionus* (10%). Esto genera gran controversia ya que *E. senta* representa a nuestro grupo externo, sin embargo, el género ha sido sujeto de gran polémica en su relación filogenética con otros grupos de rotíferos (Sørensen, 2002, García-Varela & Nadler, 2006).

	<i>Rrotatori</i>	<i>Atelphusa</i>	<i>Lepadella</i>	<i>A. fissa</i>	<i>Brachionus</i>	<i>Keratella</i>	<i>P. quadricornis</i>	<i>K. longispina</i>	<i>N. acuminat</i>	<i>Plationus</i>	<i>E. senta</i>
<i>Rrotatori</i>	-	0.08	0.75	0.71	0.72	0.72	0.72	0.69	0.69	0.70	0.70
<i>Atelphusa</i>	0.17	-	0.74	0.75	0.75	0.75	0.77	0.72	0.73	0.71	0.70
<i>Lepadella</i>	0.46	0.45	-	0.18	0.17	0.16	0.16	0.16	0.15	0.17	0.18
<i>Afissa</i>	0.53	0.53	0.26	-	0.17	0.14	0.13	0.14	0.13	0.17	0.18
<i>Brachionus</i>	0.49	0.45	0.25	0.27	-	0.12	0.12	0.13	0.13	0.10	0.10
<i>Keratella</i>	0.53	0.50	0.26	0.26	0.27	-	0.02	0.05	0.04	0.12	0.12
<i>P. quadricornis</i>	0.49	0.50	0.25	0.24	0.24	0.28	-	0.04	0.04	0.12	0.13
<i>K. longispina</i>	*	*	*	*	*	*	*	-	0.04	0.13	0.12
<i>N. acuminata</i>	*	*	*	*	*	*	*		-	0.13	0.12
<i>Plationus</i>	0.50	0.48	0.23	0.24	0.23	0.25	*	*	0.22	-	0.07
<i>E. Senta</i>	0.49	0.44	0.25	0.20	0.23	0.25	*	*	0.21	0.20	-

Tabla 10. Distancias genéticas interespecíficas de los géneros de la familia Brachionidae. El \* géneros cuyas distancias no se evaluaron debido ya que solo cuentan con una especie.

En cuanto a las distancias genéticas del *Cox1*, los géneros que presentan las mas pequeñas son: *E. senta* con *A. fissa* (20%), mientras que las mayores dentro de los géneros de la familia Brachionidae pertenecen a *P. quadricornis* con *Keratella* .

En general las distancias genéticas interespecíficas del 28S son muy pequeñas comparadas con las del *Cox1* ya que este último evoluciona muy rápido tal como se ha visto en otros estudios (Reyna-Fabián et. al., 2010).

### **XIII. CONCLUSIONES**

La familia Brachionidae es un grupo con una gran historia de controversias. Las relaciones dentro de los representantes de esta familia han sido estudiadas con caracteres morfológicos y moleculares (Sørensen & Giribet, 2006). Sin embargo en este estudio se incluyó un mayor número de representantes de la familia (los 7 géneros). Los resultados del estudio revelan que analizando a 5 de los 7 géneros de la familia Brachionidae este es un grupo monofilético con bajos valores de apoyo de los clados (<50%). Sin embargo cuando se incluyen representantes de los 7 géneros se presenta una parafilia/polifilia de la familia, dependiendo el gen estudiado. Es necesario hacer un muestreo intensivo de las especies relacionadas con la familia Brachionidae con el fin de aclarar las relaciones con otros grupos del orden Ploima.

Cabe mencionar que el grupo externo *E. senta* se agrupa dentro de la familia Brachionidae dentro del clado *Plationus*, lo cual es interesante ya que algunos estudios como el de Sørensen, 2002 y García-Varela y Nadler, 2006 muestran una topología semejante.

Las topologías obtenidas en este estudio, resultado de los análisis de la base de datos combinados (*Cox1+28S*), usando los tres distintos métodos de reconstrucción filogenética, muestran resultados similares en cuanto a la monofilia de las especies del género *Brachionus*. Estos resultados son similares a los obtenidos por el análisis con distintas bases de datos moleculares basadas en los genes: ITS1 (Xian-Ling et. al., 2006; Ge et. al., 2012), 16S (Derry et. al., 2003) y *Cox1* (Gómez, 2005).

Por otro lado, se logró aportar una base sólida para resolver el problema de la validez del género *Plationus*, el cual fué y en algunas ocasiones sigue siendo objeto de controversia de su existencia como un grupo natural.

Tanto para resolver el problema de la validez taxonómica de *Plationus* como la filogenia de Brachionidae las topologías mejor resueltas y con los mejores valores de apoyo o probabilidad son aquellas obtenidas de la base de datos combinados (*Cox1+28S*) sin importar el método de reconstrucción filogenética utilizado. Esto puede deberse a que el *Cox1* evoluciona muy rápido comparado con el 28S. Sin embargo parece haber una mejor resolución de los clados a nivel de familia y géneros cuando se analizan los genes combinados (*Cox1+28S*). Debido a la rápida evolución del *Cox1*, este puede utilizarse en estudios de poblaciones o para detectar complejos de especies en rotíferos.

#### **XIV. PERSPECTIVAS**

Es necesario un muestreo mas exhaustivo de las especies de la familia Brachionidae ya que algunas especies presentan una alta variabilidad fenotípica y genotípica, lo cual dificulta su análisis.

Aunque los genes nucleares (rDNA 28S) y mitocondriales (*Cox1*) han sido de gran utilidad en dilucidar las relaciones filogenéticas a nivel de género y familia, es necesario integrar una mayor cantidad de marcadores moleculares para apoyar los resultados obtenidos en este estudio como la parafilia/polifilia de la familia y las relaciones interespecíficas de los siete géneros que la conforman.

De igual forma, es necesaria la inclusión de una mayor cantidad de especies del grupo externo *Epiphanes*, ya que la especie *E. senta* se agrupa dentro de la familia Brachionidae en la mayoría de los clados obtenidos con distintas bases de datos y métodos de reconstrucción filogenética.

Dentro del orden Ploima, además de la familia Brachionidae, es necesario el estudio de otras familia que cuentan con una gran cantidad de representantes con una historia de controversias interesantes.

## **XV. REFERENCIAS**

- Ahlrichs, W. H. 1996. Ultrastruktur und Phylogenie von *Seison nebaliae* (Grube 1859) und *Seison annulatus* (Claus 1876). *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, 88: 155.
- Ahlrichs, W. H. 1997. Epidermal ultrastructure of *Seison nebaliae* and *Seison annulatus*, and a comparison of epidermal structures within the Gnathifera. *Zoomorphology*, 117(1): 41-48.
- Ahlrichs, W. H. 1998. Spermatogenesis and ultrastructure of the spermatozoa of *Seison nebaliae* (Syndermata). *Zoomorphology*, 118(4): 255-261.
- Ahlstrom, E. H. 1940. A revisión of the rotatorian genera *Brachionus* and *Platyias* with descriptions of one new species and two new varieties. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 77:143-184.
- Ahlstrom, E. H. 1943. A revisión of the rotatorian genus *Keratella* with descriptions of three new species and five new varieties. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 80: 411-457.
- Bazinet, A. L., and M. P. Cummings. 2009. The Lattice Project: a Grid research and production environment combining multiple Grid computing models. Pages 2-13. In Weber, M. H. W. (Ed.) *Distributed & Grid Computing - Science Made Transparent for Everyone. Principles, Applications and Supporting Communities*. Rechenkraft.net, Marburg.
- Bazinet, A. L., D. S. Myers., J. Fuetsch & M. P. Cummings. 2007. Grid services base library: a high-level, procedural application program interface for writing Globus-based grid services. *Future Generation Computer Systems* 23:1311-1328.

- Bender, K & W. Kleinow. 1988. Chemical properties of the lorica and related parts from the integument of *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physio*, 89B 483-487.
- Birky, C., Wolf, C., Maughan, H., Herbertson, L. & E. Henry. 2005. Speciation and selection without sex. *Hydrobiologia*, 546: 29-45.
- Birky, C. W. 2007. Workshop on barcoded DNA: application to rotifer phylogeny, evolution, and systematics. *Hydrobiologia*, 593(1): 175-183.
- Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acid Research*, 27(8): 1767- 1780.
- Boore, J. L. & W. M. Brown. 1994. Mitochondrial genomes and the phylogeny of mollusks. *Nautilus*, 108(2): 61-78.
- Ciros-Pérez, J., A. Gómez & M. Serra, 2001. On the taxonomy of the three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *Journal of Plankton Research* 23: 1311–1328.
- Crowe, J. H. 1971. Anhydrobiosis: an unsolved problem. *Am. Nat*, 105(946): 563–573.
- Cummings, M. P., S. A. Handley, D. S. Myers, D. L. Reed, A. Rokas & K. Winka, 2003. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. *Systematic Biology* 52: 477–487
- Cummings, M. P. & J. C. Huskamp. 2005. Grid computing. *Educase Review* 40: 116-117.
- Derry, M. A., 2003. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. *Limnology and Oceanography* 48: 675–685.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer

- T, Wilson A (2011) Geneious v5.4. Available from <http://www.geneious.com/>
- Ehrenberg, C. G. 1832. Über die Entwicklung und Lebensdauer der Infusionsthier; nebst ferneren Beiträgen zu einer Vergleichung ihrer organischen Systeme. Berlin: Abh. Akad. Wiss., 1-154 pp.
- Eliosa, L. H. & M. del C. N. Carbajal. 2005. La sistemática en México. *Elementos* 57: 13-19.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*, 3 (5): 294- 299.
- Funch, P., Sørensen, M. V. & M. Obst. 2005. On the phylogenetic position of Rotifera-have we come any further? *Hydrobiologia*, 546: 11-28.
- Fontaneto, D & U. Jondelius. 2011. Broad taxonomic sampling of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I does not solve the relationships between Rotifera and Acanthocephala. *Journal of Comparative Zoology*. 250 (1): 80-85.
- García-Morales A. E. & M. Elías-Gutiérrez. 2004. Rotifera from southeastern Mexico, new records and comments on zoogeography. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología*. 75:99-120
- García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G., De la Torre, P., Cummings, M. P., Sarma, S. S. S. & J. P. Laclette. 2000. Phylogenetic relationships of acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol*, 50: 532-540.
- García-Varela, M., & S. A. Nadler. 2005. Phylogenetic relationships of palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *J. Parasitol*, 91 (6) :1401-1409

- García-Varela, M., & S. A. Nadler. 2006. Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 40: 61-72.
- Garey, R. J., Near, T. J., Nonnemacher, M. R. & S. A. Nadler. 1996. Molecular evidence for Acanthocephala as a subtaxon of Rotifera. *J. Mol. Evol.* 43: 287-292.
- Garey, R. J. & A. Schmidt-Rhaesa. 1998. The essential role of “minor” phyla in molecular studies of animal evolution. *Amer Zool*, 38: 907-917.
- Gilbert, J. J. 1966. Rotifer ecology and embryological induction. *Science* 151:1234-1237.
- Giribet, G., Sørensen, M.V., Funch, P., Kristensen, R. M. & W. Sterrer. 2004. Investigations into the phylogenetic position of Micrognathozoa using four molecular loci. *Cladistics*, 20, 1-13.
- Gladyshev, E. & M. Meselson. 2008. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *PNAS*. 105(13): 5139
- Gómez, A., Temprano, M & M Serra. 1995. Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats. *J. Evol. Biol.* 6: 601-622.
- Gómez, A., Carvalho, G. R & D. H. Lunt. 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankton: mtDNA variation of rotifer resting egg banks. *Proc. R. Soc. Lond, B.* 267:2189-2197.
- Gómez, A., Serra, M. Carvalho, G. R & D. H. Lunt. 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution* 56: 1431-1444.
- Gómez, A., 2005. Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation. *Hydrobiologia* 546: 83–99.

- Gómez, A., J. Montero-Pau, D. H. Lunt, M. Serra & S. Campillo, 2007. Persistent genetic signatures of colonization in *Brachionus manjavacas* rotifers in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 16: 3228–3240.
- Gosse, P. H. 1856. On the structure, functions and homologies of the manducatory organs in the class Rotifera. *Phil. Trans. R. Soc., London* 146:419-452.
- Gray, M. W., Lang, B. F., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T. G., Plante, I., Rioux, P., Saint-Louis, D., Zhu, Y. & G. Burger. 1998. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acid Res* 15: 865-878.
- Green, J. 1977. Dwarfing of rotifers in tropical crater lakes. *Archiv für Hydrobiologie Beiheft* 8: 232-236.
- Hammond, P. 1992. Species inventory. In *Global biodiversity: status of the earth's living resources* (ed. B. Groombridge), 17-39 pp. London: Chapman & Hall.
- Hawksworth, D. L. & Kalin-Arroyo, M. T. 1995. Magnitude and distribution of biodiversity. In *Global biodiversity assessment*. (ed. V. H. Heywood), 107-191pp. Cambridge University Press.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B*, **270**: 313-321.
- Hebert, P. D. N. & T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *System. Biol*, 54: 852-859.
- Hennig, W. 1953. Kritische Bemerkungen zum phylogenetischen system der Insekten. *Beitr. Ent.* 3: 1-85.
- Hennig W. 1966a. *Phylogenetic Systematis*. Champaign, Urbana: Univ. III. Press, 263pp.

- Hennig W. 1966b. Phylogenetic Systematics. *Annu Rev. Entomol.* 10: 97-116.
- Herlyn, H., Piskurek, O., Schmitz, J., Ehlers, U., Zischler, H., 2003. The syndermata phylogeny and the evolution of acanthocephalan endoparasitism as inferred from 18S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26:155–164.
- Hillbricht-Ilkowska A 1983 Morphological variation of *Keratella cochlearis* (Gosse) in Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia* 104: 297–305.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetics inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Version 3.0b4. Distributed by the author. Department of Biology, University of Rochester.
- Irene Goyenechea, I., Bueno-Villegas, J., Manríquez, N. L. & J. Márquez. 2009. Sistemática: La base del conocimiento de la biodiversidad. *Herreriana* 5(2): 1-4.
- Janssen C. R., D. F. Rodrigo and G Persccone.1993. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. 1. Conceptual framework and application. *Hydrobiologia* 255/256: 21-32.
- Katoh, K., K. Kuma., H. Toh & T. Miyata. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research.* 33: 511-518.
- Kishino, H., Hasegawa, M., 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from sequence data and branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* 229:170-179.
- Keilin, D. 1959. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. Roy. Soc. London*, 150: 149–191.

- Kleinow, W & H. Wratil. 1995. SEM of internal structures of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Hydrobiologia*. 313-314 (1): 129-132.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *A. Rev. Ecol. Syst.* 24:189-216.
- Koste, W. 1978. Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. 2 vols, Gébrüder Borntraeger, Berlin.
- Koste, W & R. J. Shiel. 1986. Rotifera from Australian inland waters. I. Bdelloidea (Rotifera: Digononta). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 37: 765-792.
- Kutikova, L. A. & M. Silva-Briano. 1995. *Keratella mexicana* nov. sp., a new planktonic rotifer from Aguascalientes, México. *Hydrobiol.* 310: 119-122.
- Levings, C. S., III & I. K. Vasil. 1995. The Molecular Biology of Plant Mitochondria. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Leydig, F. 1855. On the structure and systematic position of the Rotifera. *Quart. J. Micr. Sci. London* 3:136-142.
- Littlewood, J. T. D., Telford, M. J., Clough, K. A., Rohde, K., 1998. Gnathostomulida an enigmatic metazoan phylum from both morphological and molecular perspectives. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9: 72-79.
- Lorenzen, S. 1985. Phylogenetic aspects of pseudocoelomate evolution. In: The origins and relationships of lower invertebrates. Edited by Conway Morris, S., George, J. D., Gibson, R., Platt, H. M. Oxford: Oxford University Press. 210-22.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147: 245-255.
- Mallatt, J. M., Garey, J. R. & j, W. Shultz. 2004. Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Mol Phylogenet Evol.* 31(1):178-91.

- Mark Welch, D. B. 2000. Evidence from a protein-coding gene that acanthocephalans are rotifers. *Invert. Biol.* 119:17-26.
- Markevich, G. I., 1985. Ultrathin morphology of mastax of rotifers. I. Bdelloida [in Russian]. *Bulletin of the Institute for the Biology of Inland Waters* 68: 31–35.
- Markevich, G. I. & L. A. Kutikova. 1989. Mastax morphology under SEM and its usefulness in reconstructing rotifer phylogeny and systematics. *Hydrobiologia*. 186/187: 285-289.
- Melone, G., Riccii, C., Segers, H. & R. Wallace.1998. Phylogenetic relationships of phylum Rotifera with emphasis on the families of Bdelloidea. *Hydrobiologia* 387/388, 101-107.
- Min, G. S & J. K. Park. 2009. Eurotatorian paraphyly: Revisiting phylogenetic relationships based on the complete mitochondrial genome sequence of *Rotaria rotatoria* (Bdelloidea: Rotifera: Syndermata). *BMC Genomics* 10: 533.
- Morris SC. 1993. The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature*. 361:219-225.
- Myers, D. S. & M. P. Cummings. 2003. Necessity is the mother of invention: a simple grid computing system using commodity tools. *Journal of Parallel and Distributed Computing*. 63:578-589.
- Myers, D. S., A. L. Bazinet & M. P. Cummings. 2008. Expanding the reach of Grid computing: combining Globus- and BOINC- based systems. In Tabli, E. G. & A. Zomaya (eds), *Grids for Bioinformatics and Computational Biology*. Wiley, New York: 71-85.
- Müller, O. F. 1786., *Animacula Infusoria fluviatilia et marina, quae detexit, systematice descripsit et ad vivum delineari curativ sistit opus hoc posthumum quod cum*

- tabulis aenis L. in lucem tradit vidua ejus nobilissima, cura Othonis Fabricii. Haunia, LVI. 367 pp.
- Nielsen, C., 1995. Animal Evolution. Interrelationships of the Living Phyla. Oxford University Press, Oxford. 467 pp.
- Nielsen C, Scharff N, Eibye-Jacobsen D: Cladistic analyses of the animal kingdom. *Biol J Linnean Soc* 1996, 57:385-410.
- Nogrady, T., R. T. Wallace & T. W. Snell. 1993. Guides to the identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World. Rotifera 1. Biology, Ecology and Systematics. SBP Academic Publishers, The Hague, Netherlands. 142 pp.
- Omilian, A. R. & D. J. Taylor, 2001. Rate acceleration and long-branch attraction in a conserved gene of cryptic Daphniid (Crustacea) species. *Molecular Biology and Evolution* 18: 2201–2212
- Ooms, W. A. L., 1998. On the food uptake and population dynamics of rotifers in a shallow eutrophic lake. *Netherlands*. 6-7 pp.
- Paquin, B., Laforest, M. J., Forget, L., Roewer, I., Wang, Z., Longcore, J. & B. F. Lang. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondria genomes and their gene expression. *Curr. Genet* 31: 380-395.
- Papakostas, S., Triantafyllidis, A., Kappas, I & T. J. Abatzopoulos. 2005. The utility of the 16S gene in investigating cryptic speciation within the *Brachionus plicatilis* species complex. *Marine Biology*. **147**: 1129-1139.
- Passamanek, Y & K. M. Halanych. 2006. Lophotrochozoan phylogeny assessed with LSU and SSU data: evidence of lophophorate polyphyly. *Mol Phylogenet Evol*. 40: 20-28.

- Patterson, C., Williams, D. M. & C. J. Humphries. 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24:153-188.
- Pejler, B. 1957. Taxonomical and ecological studies on planktonic Rotatoria from Northern Swedish Lapland. *Kungl. Svensk, Vetensk. Akad. Handl. Ser. 6:* 1-68.
- Pfenninger, M. & K. Schwenk. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology.* 7:121
- Nogrady, T., Wallace, R. L & T. W. Snell. 1993. Rotifera. Vol. 1.: Biology, Ecology
- Posada, D., Crandall. K. A., 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution *Bioinformatics.* 14 (9):817-818.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25(7): 1253-1256.
- Reyna-Fabián, M. E., Laclette, J. P., Cummings, M. P. & M. García-Varela. 2010. Validating the systematic position of *Plationus*
- Segers, Murugan & Dumont, 1993 (Rotifera: Brachionidae) using sequences of the large subunit of the nuclear ribosomal DNA and of cytochrome C oxidase. *Hydrobiologia* 644: 361-370.
- Ricci, C. 1998. Are lemnisci and proboscis present in the Bdelloidea?. *Hydrobiologia.*387/388: 93-96.
- Ricci C & G. Melone. 2000. Key to the identification of the genera of bdelloid rotifers. *Hydrobiologia.* 418(1): 73-80.
- Rico-Martínez, R. & M. Silva-Briano. 1993. Contribution to the knowledge of the Rotifera of Mexico. *Hydrobiologia.* 255: 467-474.
- Rodríguez, F., J. F. Oliver., A. Marin & J. R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology.*142:817-818.

- Ruppert, E. E. & R. D. Barnes. 1994. *Invertebrate Zoology*, 6th Ed., Saunders College Publ., Fort Worth, 1056 pp.
- Sanderson, M. J., Donoghue, M. J., Piel, W., Eriksson, T., 1994. TreeBASE: A prototype database of phylogeny analyses and an interactive tool for browsing the phylogeny of life. *Ame. J. Bot.* 81, 183.
- Sarma, S. S. S., Elías-Gutiérrez, M. & C. R. Serranía Soto. 1996. Rotifers from high altitude crater-lakes at the Nevado de Toluca Volcano. México. *Hidrobiol.* 6(1-2): 33- 38.
- Sarma, S. S. S. & M. Elías-Gutiérrez. 1997. Taxonomic studies of freshwater rotifers (Rotifera) from Mexico. *Polskie Archiwum Hydrobiologii.* 44:341-357.
- Sarma, S. S. S. & M. Elías-Gutiérrez. 1998. Rotifer diversity in a central Mexican pond. *Hydrobiol.* 187/388:47-54.
- Sarma, S. S. S. 1999. Checklist of rotifers (Rotifera) from México. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 44(3): 341-357.
- Sarma, S. S. S. & M. Elías-Gutiérrez. 1999a. A survey on the rotifer (Rotifera) fauna of the Yucatan Peninsula (México). *Rev. Biol. Trop.* 47(1): 187-196.
- Sarma, S. S. S. & M. Elías-Gutiérrez. 1999b. Rotifers (Rotifera) from four natural water bodies of central México. *Limnol.* 29:475-483.
- Sarma, S. S. S. & M. Elías-Gutiérrez. 2000. Rotifers from Mexico: new records in high altitude ponds. *The Southwestern Naturalist.* 45(3): 366-373.
- Sarma, S. S. S. & J. Martínez-Figueroa. 2000. Morfometría de *Filinia cornuta* (Weisse, 1847) (Rotifera: Filinidae) en el estanque del Parque Tezozomoc (México). *Tip. Rev. Espec. Cienc. Quim. Biol.* 3(2): 75-78.

- Sarma, S. S. S. & J. Martínez. 2000. Morfometría de *Filina cornuta* (Weisse, 1847) (Rotifera: Filinidae) en el estanque del parque Tezozomoc (México). 3(2): 75-78.
- Sarma, S. S. S., Nandini, S., Ramírez, P. G. & J. E. M. Cortés. 2000. New records of brackish water Rotifera and Cladocera from Mexico. *Hidrobiológica*.10:121-124.
- Sarma, S. S. S., Elguea-Sánchez, B. & S. Nandini. 2002. Effect of salinity on competition between the rotifers *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff and *Hexarthra jenkiniae* (De Beauchamp) (Rotifera). *Hydrobiologia*. 474:183-188.
- Sarma, S. S. S., Serranía. S. C. R. & S. Nandini. 2005. Diversidad del phylo Rotifera en el Estado de México. Checar la revista.
- Sarma, S. S. S., P. Brena-Bustamante & S. Nandini, 2008. Body size and population growth of *Brachionus patulus* (Rotifera) in relation to heavy metal (copper and mercury) concentrations. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 43(5): 547–553
- Segers, H. & G. Melone. 1998. A comparative study of trophi morphology in Seisonidea (Rotifera). *Journal of Zoology*. 244: 201-207.
- Segers H. 2002. The nomenclature of the Rotifera: annotated checklist of valid family and genus-group names. *Journal of Natural History* 36: 631-640.
- Segers, H., 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa* 1546: 1–104.
- Serranía, S. C. R. 1996. Diversidad de rotíferos monogonontos en algunos sistemas acuáticos del estado de México. Tesis Profesional. UNAM. Campus Iztapalapa. 74 pp.

- Serranía, S. C. R. & S. S. S. Sarma. 2003. Some taxonomical aspects of rotifera from central Mexico. *Scientia Naturae*. 6(1): 53-61.
- Serranía, S. C. R. 2006. Diversidad de los rotíferos monogonontos de la parte central de México. Tesis de Maestría. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 117pp.
- Shimodaira, H. & M. Hasewaga. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*. 16:114-1116.
- Silva, B. M. & H. Segers. 1992. Una nueva especie del género *Brachionus* (Rotifera: Monogononta) del estado de Aguascalientes, México. *Hydrobiol.* 25:283-285.
- Silva, B. M. & A. Adabache-O. 1999. On the taxonomy and distribution of the rotifer *Keratella mexicana*, Kutikova & Silva-Briano, 1995. *Annals Limnol.* 35(2): 105-109.
- Silva, B. M. & Adabache-O. 2000. *Brachionus* species in Aguascalientes State, México. Aquatic Ecosystems of México: status and scope. Munawar, S., Lawrence, G., Munawar, I. F. & D. F. Malley. Netherlands. 203-211pp.
- Silva-Briano, M., Galván-De la Rosa, R., Pérez-Legaspi, I. A. & R. Rico-Martínez. 2007. On the description of *Brachionus araceliae* sp. nov. A new species of freshwater rotifer from Mexico. *Hidrobiológica*. 17(2): 179-183.
- Smith, M. J., Arndt, A., Gorski, S. & E. Fajber. 1993. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *J. Mol. Evol.* 36: 545-554.
- Sørensen, M. V. 2002. On the evolution and morphology of the rotiferan trophi, with a cladistic analysis of Rotifera. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 40:129-154.

- Sørensen, M.V., 2002. On the evolution and morphology of the rotiferan trophi, with a cladistic analysis of Rotifera. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 40:129–154
- Sørensen, M. V., Funch, P., Hooge, M. & Tyler, S. 2003. Musculature of *Notholca acuminata* (Rotifera: Ploima: Brachionidae) revealed by confocal scanning laser microscopy. *Invertebrate Biology* 122:223-230.
- Sørensen, M. V. & G. Giribert. 2006. A modern approach to rotiferan phylogeny: combining morphological and molecular data. *Mol Evol Phylogenet.* 40 (2):585-608.
- Storch, V. & U. Welsch. 1969. Über den Aufbau des Rotatorienintegumentes. *Z. Zellforsch.* 95:405-414.
- Suarez-Morales, B., Vázquez-Mazy, A. & E. Solís. M. 1993. On the zooplankton community of a mexican eutrophic reservoir, a seasonal survey. *Hidrobiológica.* 3(1-2): 71-80.
- Suatoni, E., S. Vicario, S. Rice, T. W. Snell & A. Caccone, 2006. Phylogenetic and biogeographic patterns in the salt water rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 86–98
- Sudzuki, M. 1964. New systematical approach to the Japanese planktonic Rotatoria. *Hydrobiologia* 23: 1-124.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP 4.0b10. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sze, S. H., Y. Lu & Q. Yang. 2006. A polynomial time solvable formulation of multiple sequence alignment. *Journal of Computational Biology.* 13:309-319.
- Talonia, C. M., & Lagunes-Guillén, A. E. y E. Escudero-Montiel. 2007. Rotíferos de la Laguna de Zumpango. *Herreriana, Revista de Divulgación de la Ciencia.* 3(2): 11.

- Templeton, A. R. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the humans and apes. *Evolution* 37:221-224.
- Torres-Orozco B., Roberto, E. & S. A. Zanatta. 1998. Species composition, abundance and distribution of zooplankton in a tropical eutrophic lake: Lake Catemaco, México. *Rev. Biol. Tro.* [revista en la Internet]. 46(2): 285-296.
- Tunnacliffe, A., Lapinski, J. & B. McGee. 2005. A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* 546: 314-321.
- Vilaclara, G. & V. Sládecek. 1989. Mexican rotifers as indicator of water quality with description of *Collotheca riverai*, new species. *Arch. Hidrobiol.* 115: 257-264.
- Wallace, R. L. 1980. Ecology of sessile rotifers. *Hydrobiologia* 73: 181–193.
- Wallace, R. L. 1987. Coloniality in the phylum Rotifera. *Hydrobiologia* 147:141–155.
- Wallace, R. L. & R. A. Colburn. 1989. Phylogenetic relationships within the phylum Rotifera: orders and genus *Notholca*. *Hydrobiologia*. 186/187: 311-318.
- Wallace, R. L & R. A. Colburn. 1989. Phylogenetic relationships within phylum Rotifera: orders and genus *Notholca*. *Hydrobiologia* 186/187: 311-318
- Wallace, R. L & T. W. Snell. 1991. Rotifera, In: J. H. Thorp y A. P. Covich (Comps). Ecology and classification of North American freshwaters Invertebrates. Academic Press, London. 187- 248 pp.
- Wallace, R. L., Ricci, C. & G. Melone. 1996. A cladistic analysis of pseudoceolomate (aschelminth) morphology. *Invert. Biol.* 115: 104–112.
- Wallace, R. L. 1998. Rotifera. In E. Knobil and J. D. Neil (eds.), Encyclopedia of reproduction, Vol. 4, pp. 118–129. Academic Press, San Diego.

- Wallace, R. L. and T. W. Snell. 2001. Phylum Rotifera. In J. Thorpe and A. Covich (eds.), Ecology and classification of North American freshwater invertebrates, 2nd ed., pp. 195–254. Academic Press, San Diego.
- Wallace, R. L. 2001. Encyclopedia of Life sciences. John Wiley & Sons. Online Library. 1-4pp.
- Wallace, R. L. and C. Ricci. 2002. Rotifera. In S. D. Rundle, A. L. Robertson, and J. M. Schmid-Araya (eds.), Freshwater meiofauna: Biology and ecology, pp. 15–44. Backhuys Publishers, Leiden.
- Wallace, R.L., 2002. Rotifers: exquisite metazoans. *Integr. Comb. Biol.* 42: 660–667
- Wallace, R., Snell, T., Ricci, C. & T. Nogardy. 2006. "ROTIFERA: Biology, ecology and systematic. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world". 2<sup>da</sup> Edicion. Numero 23. Backhuys Publishers, Leiden. The Netherlands.
- Wallace, R. L., Walsh, E. J., Schröder, T., Rico-Martínez, R. & J. V. Ríos-Arana. 2008. Species composition and distribution of rotifers in Chihuahuan Desert waters of México: is everything everywhere?. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* Vol 1 (Part 1): 73-76.
- Wainwright, P. O., Hinkle, G., Sogin, M. L. & S. K. Stickel. 1993. Monophyletic origin of the metazoan: An evolution link with Fungy. *Science.* 260: 340-342.
- Walsh, E. J., Schröder, T., Wallace, R. L., Ríos-Arana, J. V. & R. Rico-Martínez. 2008. Rotifers from selected inland saline waters in the Chihuahuan Desert of México. *Saline Systems.* 4:7.
- Welch, M. D. B. 2005. Bayesian and maximum likelihood analyses of rotifer-acanthocephalan relationships. *Hydrobiologia* 546: 47-54.

- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., Mackey, L. Y., Brooks, J. M., De Wachter, R., Kumar, S., Garey, J. R., 1995. 18S rRNA data indicate that the Aschelminthes are polyphyletic in origin and consist of at least three distinct clades. *Mol. Biol. Evol.* 12:1132-1137.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T & R. De Wachter.1995. Phylogeny of protostome worms derived from 18SrRNAsequences. *Mol. Biol. Evol.* 12(4):641-649.
- Witek, A., Herlyn, H., Meyer, A., Boell, L., Bucher, G. & T. Hankeln. 2008. EST based phylogenomics of Syndermata questions monophyly of Eurotatoria. *BMC Evol. Biol.* 8: 345.
- Woese C.R .1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
- Wulfert, K. 1965. Rädertiere aus einigen afrikanischen Gewässern. *Limnologica* (Berlin), 3(3): 347-366.
- Yang, Z., 1994. Estimating the patterns of nucleotides substitution. *Journal of Molecular Evolution* 39: 105–111.
- Zrzavy, J., 2001. The interrelationships of metazoan parasites: a review of phylum and higher-level hypotheses from recent morphological and molecular phylogenetic analyses. *Folia. Parasitol.* 48:81–103.
- Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence data-sets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. thesis. Texas University, Austin.
- and Systematics in: Dumont, H. J.Ed. Guide to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world SPB. Academic Publishers by, the Hague. The Netherlands. 142 pp.

## **XVI. ANEXOS**

### **Artículos publicados durante el doctorado**

## Validating the systematic position of *Plationus* Segers, Murugan & Dumont, 1993 (Rotifera: Brachionidae) using sequences of the large subunit of the nuclear ribosomal DNA and of cytochrome C oxidase

Miriam E. Reyna-Fabián · Juan Pedro Laclette · Michael P. Cummings · Martín García-Varela

Received: 7 January 2010 / Revised: 17 February 2010 / Accepted: 24 February 2010 / Published online: 12 March 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** Members of the family Brachionidae are free-living organisms that range in size from 170 to 250 microns. They comprise part of the zooplankton in freshwater and marine systems worldwide. Morphologically, members of the family are characterized by a single piece loricated body without furrows, grooves, sulci or dorsal head shields, and a malleate trophi. Differences in these structures have been traditionally used to recognize 217 species that are classified into seven genera. However, the validity of the species, *Plationus patulus*, *P. patulus macracanthus*, *P. polyacanthus*, and *P. felicitas* have been confused because they were alternatively assigned in *Brachionus* or *Platyias*, when considering only morphological and ecological characters. Based on

scanning electron microscope (SEM) images of the trophi, these taxa were assigned in a new genus, *Plationus*. In this study, we examined the systematic position of *P. patulus* and *P. patulus macracanthus* using DNA sequences of two genes: the cytochrome oxidase subunit 1 (*cox1*) and domains D2 and D3 of the large subunit of the nuclear ribosomal RNA (LSU). In addition, the *cox1* and LSU sequences representing five genera of Brachionidae (*Anuraeopsis*, *Brachionus*, *Keratella*, *Plationus*, and *Platyias*) plus four species of three families from the order Ploima were used as the outgroup. The maximum likelihood (ML) analyses were conducted for each individual gene as well as for the combined (*cox1* + LSU) data set. The ML tree from the combined data set yielded the family Brachionidae as a monophyletic group with weak bootstrap support (<50%). Five main clades in this tree had high (>85%) bootstrap support. The first clade was composed of three populations of *P. patulus* + *P. patulus macracanthus*. The second clade was composed of a single species of *Platyias*. The third clade was composed of six species of *Brachionus*. The fourth clade included a single species of the genus *Anuraeopsis*, and the fifth clade was composed of three species of the genus *Keratella*. The genetic divergence between *Plationus* and *Platyias* ranged from 18.4 to 19.2% for *cox1*, and from 4.5 to 4.9% for LSU, and between *Brachionus* and *Plationus*, it ranged from 16.9 to 23.1% (*cox1*), and from 7.3 to 9.1% (LSU). Morphological evidence, the amount of genetic divergence, the

Handling editor: K. Martens

M. E. Reyna-Fabián · J. P. Laclette  
Department of Immunology, Institute for Biomedical Research, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México

M. P. Cummings  
Center for Bioinformatics and Computational Biology, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA

M. García-Varela (✉)  
Department of Zoology, Institute of Biology, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México  
e-mail: garciav@servidor.unam.mx

systematic position of *Plationus* within the family Brachionidae, and the position of *Plationus* as a sister group of *Brachionus* and *Platyias* support the validity of *Plationus patulus* and *P. patulus macracanthus* into the genus *Plationus*.

**Keywords** *Plationus* · *Cox1* · LSU · Maximum likelihood · Phylogeny

## Introduction

The family Brachionidae Ehrenberg, 1838 (Monogononta) is one of the most diverse groups of rotifers with approximately 217 species classified into seven genera: *Anuraeopsis* Lauterborn, 1900, *Brachionus* Pallas, 1766, *Keratella* Bory de St. Vincent, 1822, *Notholca* Gosse, 1886, *Kellicotia* Ahlstrom, 1938, *Plationus* Segers, Murugan & Dumont, 1993 and *Platyias* Haring, 1913 (Segers, 2007). This family is diagnosed by a loricated body without furrows, grooves, sulci or dorsal head shields, lorica formed by one piece without covering all the body, a malleate trophi that consists of a pair of mallei and each malleus formed by a manubrium and a paired uncus with 4–7 teeth. The taxonomic position of some Brachionidae species has been controversial due to high phenotypic plasticity of their diagnostic morphological characters, which has impaired a robust phylogenetic hypothesis (Stelzer, 2002; Gilbert & Walsh, 2005; Gómez, 2005; Van der Stap et al., 2007). In particular, the validity of *Plationus patulus* (Müller, 1786), *P. patulus macracanthus* (Daday, 1905), and *P. polyacanthus* (Ehrenberg, 1834) has been questioned when only morphological characters are considered. These three taxa were originally described in the genus *Brachionus* and confirmed by subsequent morphological studies (Turner, 1940; Wulfert, 1965; Koste, 1978; Koste & Shiel, 1987). However, Ahlstrom (1940), Bartos (1959), Rudescu (1960), and Kutikova (1970) analyzed the taxonomic validity of *P. patulus*, *P. patulus macracanthus*, and *P. polyacanthus* and placed these taxa within *Platyias* because they present a foot with three pseudosegments as in the genus *Platyias*. A study based on ultrastructural characters placed these three taxa neither in *Platyias* nor *Brachionus*, but in the genus *Plationus* (Segers et al., 1993). In the most recent revision of Rotifera, the genus *Plationus*

contains three species, *Plationus felicitas* (Wulfert, 1965), *P. patulus*, and *P. polyacanthus*, and two subspecies, *P. patulus patulus* and *P. patulus macracanthus* (Segers, 2007). However, some studies do not recognize the validity of these species and subspecies as members of *Plationus*, and still classify them with *Brachionus* or *Platyias* (Kotikova et al., 2005; Xian-Ling et al., 2006; Nandini et al., 2007; Kennari et al., 2008; Sarma et al., 2008). The aim of this study was to develop a phylogeny for five genera of Brachionidae with a particular interest in the systematic position of *Plationus patulus* and *P. patulus macracanthus* based on gene sequences of cytochrome oxidase subunit 1 (*cox1*) and domains D2 and D3 of the large subunit of the nuclear ribosomal RNA (LSU).

## Materials and methods

### Specimen collection

Rotifers were isolated from different water bodies in México (Table 1) and cultured from a single parthenogenetic female, which was maintained in EPA medium prepared by dissolving 96 mg NaHCO<sub>3</sub>, 60 mg CaSO<sub>4</sub>, 60 mg MgSO<sub>4</sub>, and 4 mg KCl in a final volume of 1 l of distilled water. The cultures were transferred to new EPA medium every 3 days using plankton meshes with a pore size of 50 µm. All the species were maintained on a diet of algae *Chlorella vulgaris*, which was cultured axenically in the laboratory in transparent bottles using Bold's basal medium. Algae in the log-phase of their growth were harvested, centrifuged, and resuspended in distilled water. The algae density was estimated using a hemocytometer. The food level used for maintenance of the rotifers was 1 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>.

### DNA isolation

Rotifers were washed thoroughly in sterile distilled water, and pelleted by centrifugation prior to DNA extraction. Fifteen rotifers were digested overnight at 56°C in a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl<sub>2</sub>, 100 mM EDTA (pH 8.0), 1% Sarkosyl, and 0.1 mg/ml proteinase K. Following digestion, DNA was extracted from the supernatant

**Table 1** Specimen information and Genbank accesses

Family	Species	Locality	Coordinates		Genbank access LSU	Genbank access <i>cox1</i>
			North	West		
Brachionidae	<i>Anuraeopsis fissa</i>	Patzcuaro Lake, Michoacan	19°32' 50.41"	101°38' 31.2"	*GQ890451	*GQ890449
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Chapultepec Lake, Mexico City	19°25' 18.5"	99°11' 06.7"	*GQ890452	*DQ664504
	<i>Brachionus havanaensis</i>	Xochimilco Lake, Mexico City	19°16' 20.55"	99°06' 18.9"	*GQ890453	*DQ664505
	<i>Brachionus plicatilis</i>	Gulf of Mexico, Veracruz	18°28' 18.9"	92°39' 14.9"	*GQ890454	*DQ664507
	<i>Brachionus rubens</i>	Aragon Lake, Mexico City.	18°59' 3.56"	91°58' 0.3"	*GQ890455	*DQ664506
	<i>Brachionus falcatus</i>	Rodeo Lake, Cuernavaca.	20°54' 15.5"	90°20' 34.4"	*GQ890456	*DQ664508
	<i>Brachionus urceolaris</i> <sup>1</sup>	Nd	Nd	Nd	DQ089726	DQ089740
	<i>Brachionus urceolaris</i> <sup>2</sup>	Nd	Nd	Nd	DQ089740	DQ089726
	<i>Keratella quadrata</i> <sup>1</sup>	Xochimilco Lake, Mexico City.	19°16' 20.55"	99°06' 18.9"	*GQ890462	*GQ890450
	<i>Keratella quadrata</i> <sup>2</sup>	Nd			DQ297735	DQ297774
	<i>Keratella americana</i>	Xochimilco Lake, Mexico City.	19°16' 20.55"	99°06' 18.9"	*GQ890457	*GQ890446
	<i>Keratella tropica</i>	Xochimilco Lake, Mexico City	19°16' 20.55"	99°06' 18.9"	*GQ890458	*GQ890447
	<i>Platylabus quadricornis</i>	Chimalipan, State of Mexico.	24° 29' 00"	97°45' 00"	*GQ890459	*GQ890448
	<i>Platylabus patulus</i> <sup>3</sup>	Nd	Nd	Nd	DQ297750	DQ297786
	<i>Platylabus patulus</i> <sup>1</sup>	Santa Elena, State of Mexico	19° 53' 55"	99°32' 9.9"	AY829084	AF416995
	<i>Platylabus patulus</i> <sup>2</sup>	Chicoasen Lake, Chiapas	16°56' 9.51"	93°06' 9.90"	*GQ890460	*DQ664503
	<i>Platylabus patulus macracanthus</i>	Morelia, Mexico	18°42' 13.4"	95°45' 27.9"	*GQ890461	*DQ664502
Mytilinidae	<i>Mytilina ventralis</i>	Nd	Nd	DQ297747	DQ297783	
Notommatidae	<i>Notommata allantois</i>	Nd	Nd	DQ297748	DQ297784	
Lepadellidae	<i>Lepadella rhomboides</i>	Nd	Nd	DQ297740	DQ297779	
	<i>Lepadella patella</i>	Nd	Nd	DQ297739	DQ297778	

Sequences marked with an asterisk were obtained in this study

Nd not determined

using the DNAzol reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) according to the manufacturer's instructions.

#### Amplification and sequencing of DNA

The two genes, *cox1* and LSU were amplified using the polymerase chain reaction (PCR). A fragment of the mitochondrial *cox1* (618 bp) was amplified using the forward 5'-AGTTCTAATCATAA(R)GATAT(Y)GG-3' and the reverse primer 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' (Folmer et al., 1994).

The domains D2 + D3 (766 bp) of the LSU rDNA were amplified using the forward 5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC-3' and the reverse primer 5'-GTCGATAGGACTCCCTTTG-3' (García-Varela & Nadler, 2005). The PCR reaction mixture (25 µl) consisted of 1 µl of 10 µM of each primer, 2.5 µl of 10× buffer, 1.5 µl of MgCl<sub>2</sub>, 15 Mm, 0.5 µl of dNTP's 10 mM, 14.25 µl of water, and 1 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, São Paulo, Brazil). PCR cycling parameters included denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, annealing at 40°C (*cox1*)

and 50°C (LSU) for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, followed by a post-amplification incubation at 72°C for 7 min. Each PCR product was purified using Millipore columns (Amicon, Billerica, Massachusetts). Purified products were cloned by ligation into pGEM-T vector (Promega, Madison, Wisconsin) and used to transform competent *Escherichia coli* (JM109). Positive clones were identified by blue/white selection, and clone (insert) size was confirmed by PCR of DNA extracts prepared from bacterial (clone) colonies. Liquid cultures for minipreps were grown in Luria medium containing 50 µg/ml of ampicillin. Plasmids for DNA sequencing were prepared using commercial miniprep kits (Qiaprep, Qiagen, Valencia, California). At least two plasmids of each ligation were sequenced for both DNA strands using universal (vector) and internal primers. Sequencing reactions were performed using ABI Big Dye (PE Applied Biosystems, Boston, Massachusetts) terminator-sequencing chemistry, and reaction products were separated and detected using an ABI 310 capillary DNA sequencer. Contigs were assembled, and base-calling differences were resolved using Codoncode Aligner version 3.0.1 (Codoncode Corporation, Dedham, Massachusetts). All the sequences have been deposited in the Genbank (access numbers in Table 1).

#### Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis

Sequences of the *coxI* and LSU generated in this study were aligned with four additional sequences downloaded from Genbank. These four sequences represented outgroup taxa, and the resulting data sets included 21 taxa each. Both the *coxI* and LSU data sets were aligned using PSalign (Sze et al., 2006), and the LSU data set was re-aligned with MAFFT ver. 6.611b (Katoh et al., 2005) to correct for the poorly aligned regions. The L-INS-i pairwise alignment settings (–localpair–maxiterate 1000) were implemented for MAFFT. The initial *coxI* alignment included 658 sites for 12 taxa. However, 40 sites were removed from the initial alignment because the sequences obtained from the Genbank for another nine taxa were partial (618 sites). The second alignment contained 618 sites for all the 21 taxa. This second *coxI* data set was translated to protein sequences to detect any possible reading frame errors. Geneious Pro 4.0.4 (Drummond et al., 2009) was used to combine LSU and *coxI* data sets.

The best fit-model for each data set and the combined data set of both genes (*coxI* + LSU) were inferred using the Akaike information criterion (AIC) with Modeltest version 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Maximum likelihood (ML) analyses for the three data sets were conducted using GARLI 0.96 (Zwickl, 2006). Bootstrap analyses were conducted using GARLI and Grid computing (Cummings & Huskamp, 2005) through “The Lattice Project” (Bazinet & Cummings, 2009) which includes clusters and desktop computers in one encompassing system (Myers et al., 2008). A Grid service for GARLI was developed using a special programming library and associated tools (Bazinet et al., 2007). Based on the model of Cummings et al. (2003) who used an earlier Grid computing system (Myers & Cummings, 2003), we distributed required files among hundreds of computers, where the analyses were then conducted asynchronously in parallel. Clade support was assessed by bootstrap resampling with 2,000 (ML) bootstrap replicates for each data set and the combination of both data sets. The trees were illustrated using FigTree (FigTree program version v1.1.2). Uncorrected pairwise distances were calculated in PAUP\* (Swofford, 2000). In order to compare trees representing specific alternative phylogenetic hypotheses, topological constraints were defined on the tree obtained from ML analysis of the combined (*coxI* + LSU) data set. Differences between unconstrained (best) and constrained trees representing alternative hypotheses were evaluated using the Shimodaira and Hasegawa (HS) test (Shimodaira & Hasegawa, 1999) and calculated in PAUP\*. A  $\chi^2$ -test was estimated for the combined data set to determine the heterogeneity of nucleotide frequencies across taxa using the “basefreq” option implemented in PAUP\*. All the alignments and data sets are available from the corresponding author on request.

## Results

### Base composition and genetic divergence

The DNA fragments of *coxI* and LSU were amplified, cloned, and sequenced for 21 taxa representing five genera: *Anuraeopsis* (1 sp), *Brachionus* (6 spp; 2 populations), *Keratella* (3 spp and 2 populations), *Platyonus* (1 sp; 3 populations and 1 subspecies) and

*Platylas* (1 sp) of Brachionidae plus four species from Order Ploima Hudson and Gosse, 1886, which were used as outgroups (See Table 1.). Length of the PCR products among congeneric species of Brachionidae ranged from 505 to 766 bp for LSU and was 658 bp for *cox1*. However, nine *cox1* sequences obtained from Genbank were 618 bp. In order to compare sites across all the sequences, we removed some sites at the beginning and the end of the alignment, resulting in a final alignment of 618 bp. Nucleotide frequencies for the combined (*cox1* + LSU) data set were 0.244 (A), 0.144 (C), 0.222 (G), and 0.387 (T). Heterogeneity of nucleotide frequencies across taxa was:  $\chi^2 = 48.997$ ,  $P = 0.28$ . This result indicated that rDNA nucleotide frequencies were not significantly heterogeneous across taxa, which was advantageous because ML inference methods perform optimally when nucleotide frequencies are homogeneous (Omilian & Taylor, 2001). The genetic divergence estimated from the combined (*cox1* + LSU) data set within populations ranged from 0.07 to 9.8%, among congeneric species it ranged from 8.6 to 13.9%, and among genera from 9.6 to 19.3%.

### Phylogenetic analysis

#### *cox1*

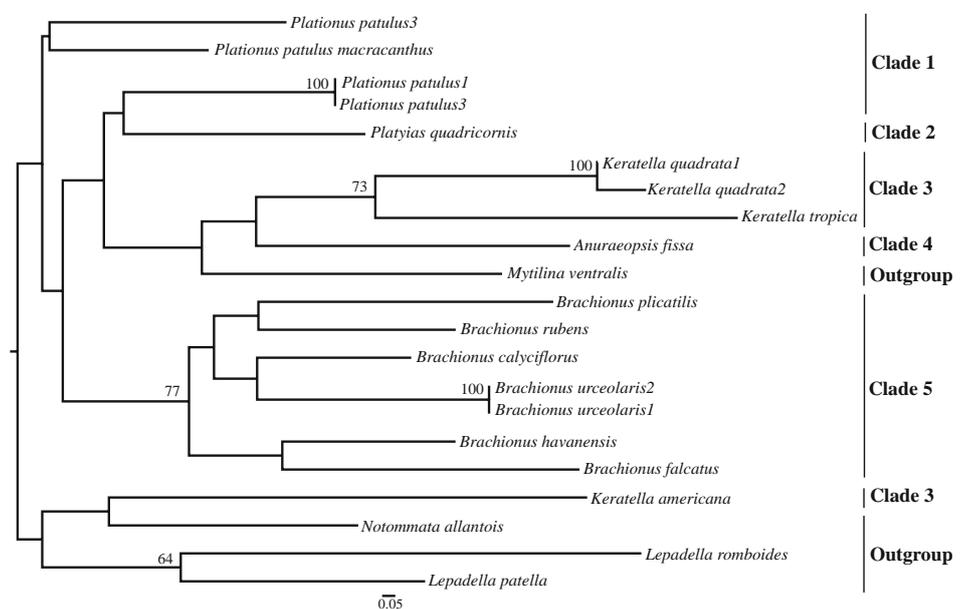
The *cox1* data set included 21 taxa with 618 bp. The best substitution model for this data set was the

General Time Reversible (GTR) (Rodríguez et al., 1990), with a proportion of invariable sites of 0.3176 and a gamma distribution of 0.2696 (+G) (Yang, 1994). The maximum likelihood analysis (ML) yielded a single best tree with a  $-\ln$  likelihood of 5720.0786 (Fig. 1). This tree yielded Brachionidae as a monophyletic assemblage with poor bootstrap support (<50%). The genus *Platlonus* was composed of two clades. The first contained *Platlonus patulus macracanthus* + *Platlonus patulus*<sup>3</sup> and the second contained two populations of *Platlonus patulus* from Mexico. However, both clades were poorly supported (<50% bootstrap). The six species of *Brachionus* were monophyletic and had a bootstrap support of 59%. The estimated genetic divergence ranged from 0 to 17.4% within populations, from 14.5 to 22.3% among congeneric species, and from 16.9 to 25.8% among genera of Brachionidae.

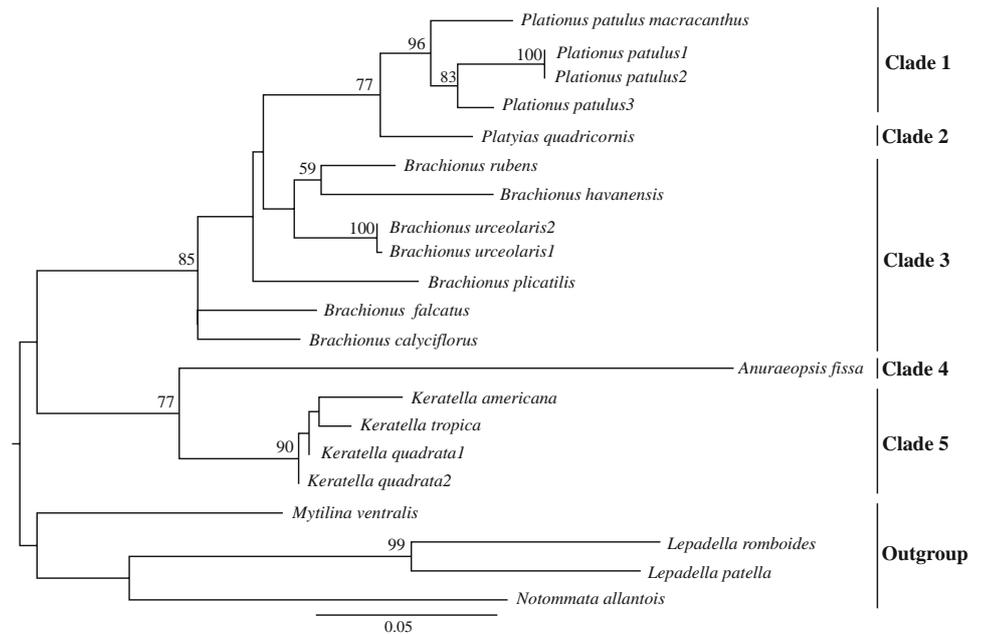
#### LSU

The LSU data set included 21 taxa with 766 bp. The best substitution model for this data set was the GTR, with a proportion of invariable sites of 0.4706 and a gamma distribution of 0.7473 (+G). The maximum likelihood analysis (ML) yielded a single best tree with a  $-\ln$  likelihood of 3791.0747 (Fig. 2). This tree yielded Brachionidae as monophyletic, but with weak bootstrap support (<50%). The genera *Anuraeopsis*, *Brachionus*, *Keratella*, *Platlonus*, and *Platylas* were

**Fig. 1** Maximum likelihood tree ( $-\ln$  likelihood of 5720.1) inferred from the *cox1* data set. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies



**Fig. 2** Maximum likelihood tree (–ln likelihood of 3791.0) inferred from the LSU data set. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies



monophyletic with high bootstrap support ranging from 77 to 96%. The estimated genetic divergence ranged from 0.14 to 3.14% within populations, from 1.1 to 8.5% among congeneric species and from 4.5 to 15.2% among genera of Brachionidae.

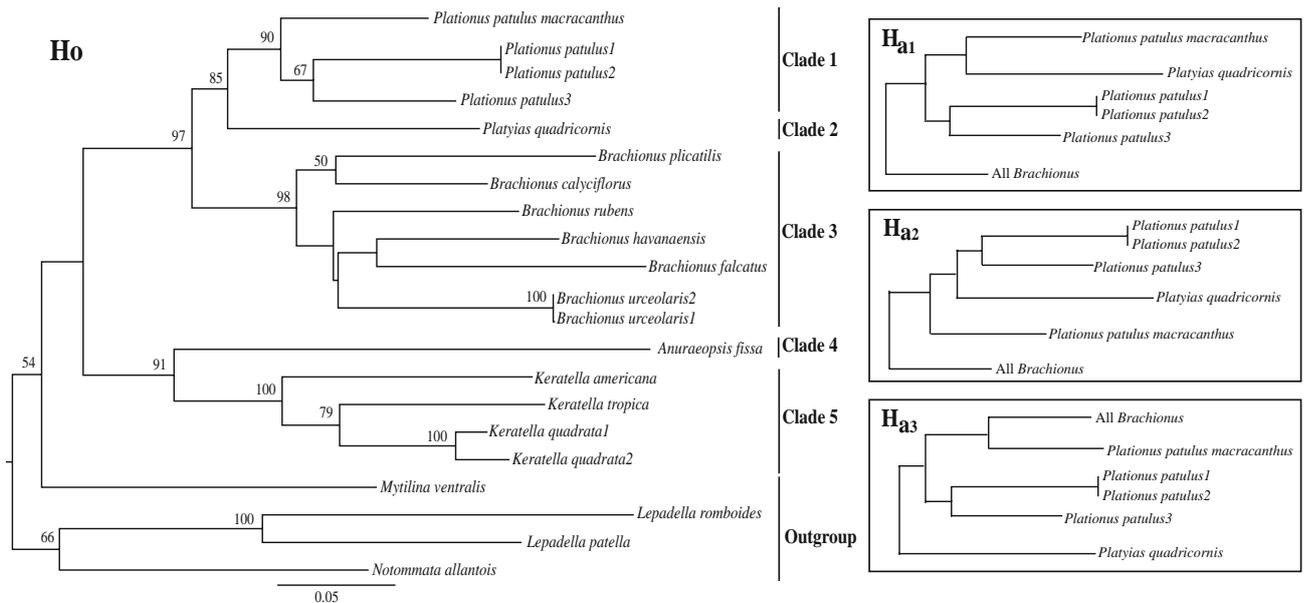
#### *cox1* + LSU

The combined (*cox1* + LSU) data set included 21 taxa with 1384 bp. The best substitution model for this combined data set was the GTR, with a proportion of invariable sites of 0.495 and a gamma distribution of 0.908 (+G). The ML analysis yielded a single tree with a –ln likelihood of 9809.5 (Fig. 3). This tree yielded the same general topology as the LSU tree (Fig. 2), but with more resolved nodes and higher bootstrap values. The first clade is composed of three populations of *P. patulus* + *P. patulus macracanthus* with a bootstrap support of 90%. The second clade was composed of a single species of *Platytias* with a bootstrap support of 85%. The third clade is composed of six species of *Brachionus* with a bootstrap support of 98%. The fourth clade included a single species of the genus *Anuraeopsis* with a bootstrap support of 91%. Finally, the fifth clade was composed of three species of the genus *Keratella*, which had a bootstrap support of 100%.

#### Discussion

The maximum likelihood tree (Fig. 3) inferred from a combined data set (*cox1* + LSU) that included five recognized genera of Brachionidae, suggested that this family is monophyletic albeit with poor bootstrap support (<50%). This phylogenetic hypothesis is in contrast with a previous study based on morphological and molecular characters, which suggested that Brachionidae is paraphyletic also with poor bootstrap values (Sorensen & Giribet, 2006). The inclusion of more species and sequences of another nuclear or mitochondrial genes would be necessary to clarify the monophyly or paraphyly of Brachionidae.

The genus *Plationus* was described by Segers et al. (1993) and included three species *Plationus patulus*, *P. polyacanthus*, and *P. macracanthus* which have been alternatively assigned to *Brachionus* or *Platytias* (Müller, 1786; Ahlstrom, 1940; Bartos, 1959; Rudescu, 1960; Kutikova, 1970; Kotikova et al., 2005; Xian-Ling et al. 2006; Nandini et al., 2007; Kennari et al., 2008; Sarma et al., 2008). Later another two taxa—*P. patulus patulus* and *P. felicitas*—were added to the genus *Plationus* (Segers, 2007). In this study, we analyzed two taxa representing the genus *Plationus*, including the type species *P. patulus* with three populations and the subspecies *P. patulus macracanthus*. The genetic divergence estimated within the three



**Fig. 3** Maximum likelihood tree,  $H_0$  ( $-\ln$  likelihood of 9809.5) inferred from combined *cox1* + LSU rDNA data set. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade values. Differences in  $-\ln$  likelihood among the three alternative

hypotheses:  $H_{a1}$  ( $-\ln$  likelihood of 9818.98;  $P = 0.055^*$ ),  $H_{a2}$  ( $-\ln$  likelihood of 9819.05;  $P = 0.052^*$ ), and  $H_{a3}$  ( $-\ln$  likelihood of 9812.65;  $P = 0.178^*$ ). \*  $P > 0.05$  not significant

populations of *P. patulus* ranged from 0 to 17.4% for *cox1* and from 0 to 3.1% for LSU, and among the three populations of *P. patulus* with the subspecies *P. patulus macracanthus* ranged from 14.5 to 17.4% for *cox1* and from 3.1 to 4.2% for LSU. This genetic divergence for *cox1* is similar to other congeneric comparisons within this family, for example, among species of *Keratella* divergence was as high as 12% (Gómez et al., 2002; Gómez, 2005), and from 20 to 25% among species of *Brachionus* (Derry, 2003). The two taxa of *Plationus* analyzed in this study were recovered as a monophyletic group, consistent with its recognition as a separate genus. However, in order to test the taxonomic validity of *Plationus*, three alternative hypotheses were proposed (Fig. 3). These hypotheses were evaluated through ML analyses using the combined data set (*cox1* + LSU). Based on the Shimodaira & Hasegawa (1999) test as executed in PAUP\*, the three alternative hypotheses ( $H_{a1}$ ,  $H_{a2}$ , and  $H_{a3}$ ) were significantly worse than the best tree ( $H_0$ ) represented in Fig. 3. The close phylogenetic position of *Plationus* with *Brachionus* and *Platytias* in our combined tree is consistent with a previous phylogenetic study inferred from molecular and morphological characters (Sorensen & Giribet, 2006). The close phylogenetic position of *Brachionus*,

*Plationus*, and *Platytias* has been supported by three morphological synapomorphies features (pseudosegmented foot, presence of an eye, and specialized trophi) (Wulfert 1965; Segers et al., 1993). The systematic position of *Plationus* as independent genera within Brachionidae in our phylogenetic analysis, was previously supported by three autapomorphies (lorica inserting terminally, anterior processes of the rami are present, and proximal cavities of the manubria closed) (Segers et al., 1993).

The genus *Brachionus* is a group of microscopic organisms that inhabit a variety of freshwater and marine systems. The variation of the shape and size of the lorica (body), and the number, shape, and size of the anterior spines have been traditionally used to recognize and separate species (Segers, 2002). Moreover, recently a complex of cryptic species has been detected using genetic information (Ciros-Pérez et al., 2001; Gómez et al., 2002; Suatoni et al., 2006). Sequences of the *cox1* were generated for five species of *Brachionus* and aligned with other congeneric species previously reported. The genetic divergence estimated among six species of *Brachionus* with *cox1* ranged from 14.8 to 22.3%, and within the two populations of *B. urceolaris* was 0%. This molecular marker has been previously used to

separate other congeneric species of *Brachionus*, which showed a genetic divergence up to 12% (Gómez et al., 2002; Gómez, 2005), as well as in the range from 20 to 25% (Derry, 2003). The genetic divergence estimated within the two populations of *B. urceolaris* was 0.14%, and among species of *Brachionus*, it ranged from 3.5 to 8.5% for LSU, which was useful to separate congeneric species. The phylogenetic tree inferred from a combined data set (*cox1* + LSU) showed the monophyly of the six congeneric species of *Brachionus*. This clade was supported with a bootstrap value of 98% (Fig. 3).

*Keratella* is a cosmopolitan genus composed of approximately 53 species (Segers, 2007). The three species sequenced here (*K. americana* Carlin, 1943; *K. tropica* Apstein, 1907; *K. quadrata* Müller, 1786) were aligned with another population of *Keratella quadrata* showing a genetic divergence among species from 20.3 to 22.6% for *cox1* and from 1.1 to 2.8% for LSU. The range of genetic divergence estimated among congeneric species of *Keratella* for *cox1* is similar to other reported for other *Keratella* species from Canada, which ranged from 23 to 27% (Derry, 2003). The genetic divergence estimated within the two populations of *K. quadrata* was 7% for *cox1* and 0.28% for LSU. Derry (2003) found a genetic divergence of 4.4% for *cox1* between the spined and unspined morphs of *K. cochlearis* Gosse, 1851, suggesting these morphs as a species complex. The phylogeny inferred with the LSU and combined data sets, indicated that the three congeneric species of *Keratella* comprise a clade with a strong bootstrap support (Figs. 2, 3).

In this study, a nuclear ribosomal gene (LSU) was used for the first time as a molecular marker to determine differences/similarities among the species of Brachionidae. The LSU tree (Fig. 2) showed better resolution and bootstrap support for the five clades and within populations than the *cox1* tree (Fig. 1). This phenomenon can be due to the fact that *cox1* evolves 1.81 times much faster than LSU according to the results of this study. In the *cox1* tree (Fig. 1), nodes pertaining to the family and genera were not resolved. The rapid evolving *cox1* gene can be better used for population studies or to detect species complexes in rotifers (Gómez, 2005; Gómez et al., 2007). It is likely that a more slowly evolving gene as the LSU region can be better to resolve the families

and genera relationships. Therefore, when combining both genes (*cox1* + LSU), the resolution at the generic level and support of the nodes were higher than the trees inferred with *cox1* and LSU genes alone.

## Conclusion

The family Brachionidae is composed of an assemblage of genera with a long history of controversies. Relationships among representatives of this family have been examined using morphological and molecular characters (Sorensen & Giribet, 2006). However, this study includes a more complete representation of the family (5 out of 7 genera sampled). The analysis of this study reveals that Brachionidae is a monophyletic assemblage with weak support (<50%) and is composed of five main clades representing the five genera (*Anuraeopsis*, *Brachionus*, *Keratella*, *Platyonus*, and *Platyias*). The morphological evidence, the amount of genetic divergence, the systematic position of *Platyonus* within the family Brachionidae, and the position of *Platyonus* as a sister group of *Brachionus* and *Platyias*, all these support the validity of *Platyonus patulus* and *P. patulus macracanthus* into the genus *Platyonus*. Nevertheless, what is still needed is the inclusion of more genera, such as *Notholca* and *Kellicottia* and more species of *Anuraeopsis*, to have a more comprehensive phylogeny of Brachionidae which will produce a robust classification scheme and a better understanding of these diverse group of rotifers.

**Acknowledgments** We thank Patricia de la Torre and Laura Márquez for their technical assistance on the sequencing of the plasmids. We are grateful to A. Bazinet, D. Ayres, and A. Y. Kawahara for their assistance in computational analyses. We are also grateful to S.S.S. Sarma and Nandini, S. for providing specimens of the genus *Brachionus* for this study. We also thank M. Ortega-Olivares and C. Serranía for their help in the field collection. Reyna-Fabián Miriam offers thanks to the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and to the program Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas and for the scholarship provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-203367). This research was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT No. IN230207), and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-No. 61334) to JPL, and PAPIIT-UNAM No. IN215709 and CONACYT-No. 102062 to MG.V.

## References

- Ahlstrom, E. H., 1940. A revision of the Rotatorian genera *Brachionus* and *Platytias* with description of one new species and two new varieties. Bulletin of the American Museum of Natural History 77: 143–184.
- Bartos, E., 1959. *Virniči-Rotatoria*. Fauna S R 15, Praha. 969 pp.
- Bazinet, A. L. & M. P. Cummings, 2009. The Lattice Project: a Grid research and production environment combining multiple Grid computing models. In Weber W. H. W. (ed.), Distributed & Grid Computing-Science Made Transparent for Everyone Principles, Applications and Supporting Communities Tectum. Marburg: 2–13.
- Bazinet, A. L., D. S. Myers, J. Fuetsch & M. P. Cummings, 2007. Grid services base library: a high-level, procedural application program interface for writing Globus-based grid services. Future Generation Computer Systems 23: 517–522.
- Ciros-Pérez, J., A. Gómez & M. Serra, 2001. On the taxonomy of the three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. Journal of Plankton Research 23: 1311–1328.
- Cummings, M. P. & J. C. Huskamp, 2005. Grid computing. Educause Review 40: 116–117.
- Cummings, M. P., S. A. Handley, D. S. Myers, D. L. Reed, A. Rokas & K. Winka, 2003. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. Systematic Biology 52: 477–487.
- Derry, M. A., 2003. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. Limnology and Oceanography 48: 675–685.
- Drummond, A. J., B. Ashton, M. Cheung, J. Heled, M. Kearse, R. Moir, S. Stones-Havas, T. Thierer & A. Wilson, 2009. Geneious v4.6. Available from <http://www.geneious.com/>.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoech, R. Lutz & R. Vrijenhoek, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3: 294–299.
- García-Varela, M. & S. A. Nadler, 2005. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rRNA gene sequences. Journal of Parasitology 91: 1401–1409.
- Gilbert, J. J. & E. J. Walsh, 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behaviour and genetic differentiation among four geographically isolated strains. Hydrobiologia 546: 257–265.
- Gómez, A., 2005. Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation. Hydrobiologia 546: 83–99.
- Gómez, A., M. Serra, G. R. Carvalho & D. H. Luna, 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). Evolution 56: 1431–1444.
- Gómez, A., J. Montero-Pau, D. H. Lunt, M. Serra & S. Campillo, 2007. Persistent genetic signatures of colonization in *Brachionus manjavacas* rotifers in the Iberian Peninsula. Molecular Ecology 16: 3228–3240.
- Katoh, K., K. Kuma, H. Toh & T. Miyata, 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Research 33: 511–518.
- Kennari, A. A., N. Ahmadifard & J. Seyfabadi, 2008. Comparison of growth and fatty acids composition of freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas, fed with two types of microalgae at different concentrations. Journal of the World Aquaculture Society 39(2): 235–242.
- Koste, W., 1978. Rotatoria in Die Rädertiere Mitteleuropas, Vol 2. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Koste, W. & R. J. Shiel, 1987. Rotifera from Australian inland waters. II. Epiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). Invertebrate Taxonomy 7: 949–1021.
- Kotikova, E. A., O. I. Raikoval, M. Reuter & M. K. S. Gustafsson, 2005. Rotifer nervous system visualized by FMRamide and 5-H immunocytochemistry and confocal laser scanning microscopy. Hydrobiologia 546: 239–248.
- Kutikova, L. A., 1970. Kolovratki fauny SSSR [The rotifer fauna of USSR]. In: Keys of the Fauna of USSR, Vol. 104. 744 pp.
- Müller, O. F. 1786., Animacula Infusoria fluviatilia et marina, quae detexit, systematice descripsit et ad vivum delineari curativ sistit opus hoc posthumum quod cum tabulis aenis L. in lucem tradit vidua ejus nobilissima, cura Othonis Fabricii. Hauniae, LVI + 367 pp.
- Myers, D. S. & M. P. Cummings, 2003. Necessity is the mother of invention: a simple grid computing system using commodity tools. Journal of Parallel and Distributed Computing 63: 578–589.
- Myers, D. S., A. L. Bazinet & M. P. Cummings, 2008. Expanding the reach of Grid computing: combining Globus- and BOINC-based systems. In Talbi, E. G. & A. Zomaya (eds), Grids for Bioinformatics and Computational Biology, Wiley Book Series on Parallel and Distributed Computing. Wiley, New York: 71–85.
- Nandini, S., D. de J. Chaparro-Herrera, S. L. Cardenas-Arriola & S. S. S. Sarma, 2007. Population growth of *Brachionus macracanthus* (Rotifera) in relation to cadmium toxicity: Influence of algal (*Chlorella vulgaris*) density. Journal of Environmental Science and Health – Part A 42(10): 1467–1472.
- Omilian, A. R. & D. J. Taylor, 2001. Rate acceleration and long-branch attraction in a conserved gene of cryptic Daphniid (Crustacea) species. Molecular Biology and Evolution 18: 2201–2212.
- Posada, D. & K. A. Crandall, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 9: 817–818.
- Rodríguez, F., J. F. Oliver, A. Marin & J. R. Medina, 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. Journal of Theoretical Biology 142: 817–818.
- Rudescu, L., 1960. Rotatoria. Fauna Republici Populare Romine, Trochelmintes, Vol II. Fascicula 2. Acad. Rep. Pop. Romine. 1192 pp (in Rumanian).
- Sarma, S. S. S., P. Brena-Bustamante & S. Nandini, 2008. Body size and population growth of *Brachionus patulus* (Rotifera) in relation to heavy metal (copper and mercury) concentrations. Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 43(5): 547–553.

- Segers, H., 2002. The nomenclature of the Rotifera: annotated checklist of valid family and genus group names. *Journal of Natural History* 36: 631–640.
- Segers, H., 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa* 1546: 1–104.
- Segers, H., G. Murugan & H. J. Dumont, 1993. On the taxonomy of the Brachinidae: description of *Platyonus* n. gen. (Rotifera, Monogononta). *Hydrobiologia* 268: 1–8.
- Shimodaira, H. & M. Hasegawa, 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1114–1116.
- Sorensen, M. V. & G. Giribet, 2006. A modern approach to rotiferan phylogeny: combining morphological and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 585–608.
- Stelzer, C. P., 2002. Phenotypic plasticity of body size at different temperatures in a planktonic rotifer: mechanisms and adaptive significance. *Functional Ecology* 16: 835–841.
- Suatoni, E., S. Vicario, S. Rice, T. W. Snell & A. Caccone, 2006. Phylogenetic and biogeographic patterns in the salt water rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 86–98.
- Swofford, D. L., 2000. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods) version 4.0 Sinauer Associates (eds). Sunderland, Massachusetts.
- Sze, S. H., Y. Lu & Q. Yang, 2006. A polynomial time solvable formulation of multiple sequence alignment. *Journal of Computational Biology* 13: 309–319.
- Turner, P., 1940. The rotifer genus *Platyias* Harring (1913) in the neotropics. *Acta Limnologica Brasiliensia* 3: 741–756.
- Van der Stap, I., M. Vos & W. M. Mooij, 2007. Inducible defenses and rotifer food chain dynamics. *Hydrobiologia* 593: 103–110.
- Wulfert, K., 1965. Revision der Rotatorien-Gattung *Platyias* Harring 1913. *Limnologica* 3: 41–64.
- Xian-Ling, X., X. Yi-Long & H. Hao-Yuan, 2006. Phylogenetic relationships of *Brachionus* rotifers based on rDNA ITS 1 gene sequences. *Current Zoology (formerly Acta Zoologica Sinica)* 52(6): 1067–1074.
- Yang, Z., 1994. Estimating the patterns of nucleotides substitution. *Journal of Molecular Evolution* 39: 105–111.
- Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. thesis. Texas University, Austin.

## DETECTING A COMPLEX OF CRYPTIC SPECIES WITHIN *NEOECHINORHYNCHUS GOLVANI* (ACANTHOCEPHALA: NEOECHINORHYNCHIDAE) INFERRED FROM ITSs AND LSU rDNA GENE SEQUENCES

Andrés Martínez-Aquino, Miriam E. Reyna-Fabián, Rogelio Rosas-Valdez, Ulises Razo-Mendivil, Gerardo Pérez-Ponce de León, and Martín García-Varela\*

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000; Ciudad Universitaria; C.P. 04510; Distrito Federal. México. e-mail: garciav@servidor.unam.mx

**ABSTRACT:** *Neoechinorhynchus golvani* is an intestinal parasite of freshwater and brackish water fishes distributed in Mexico. The genetic variability of 40 samples representing 12 populations from north, south, and central Mexico, and 1 from Costa Rica, was estimated by sequencing 2 nuclear genes (ITS1, 5.8S, ITS2, and LSU rDNA, including the domain D2 + D3). The length of both genes ranged from 700 to 779 base pairs (bp) and from 813 to 821 bp, for ITSs and LSU, respectively. The genetic divergence among populations ranged from 19.5 to 35.3% with ITSs and from 9.28 to 19.58% with LSU. Maximum likelihood and maximum parsimony analyses were performed for each data set and also for 2 combined data sets (ITSs + LSU rDNA with and without outgroups), showing strong similarities among trees, with high bootstrap support in all cases. Genetic divergence, in combination with phylogenetic analyses, suggested that the acanthocephalan *N. golvani* represents a complex of cryptic species, which is composed of at least 3 lineages. The first lineage, corresponding with *N. golvani*, shows a wide distribution, including localities from northeastern Mexico, southwards through central and southeastern Mexico, and further down to Costa Rica. This lineage is associated with cichlid fishes in strictly freshwater environments. Lineages 2 and 3 are distributed in brackish water systems along the Gulf of Mexico and Pacific slopes, respectively; both are associated with eleotrid fishes, and apparently represent 2 cryptic species. The diversification of the eleotrid and cichlid lineages seems to be the result of independent host-switching events from the ancestral population.

*Neoechinorhynchus* Stiles and Hassall, 1905 is 1 of the most speciose genera within Acanthocephala, and it is classified into 2 subgenera based on egg anatomy, i.e., *Hebesoma* Van Cleave, 1928 and *Neoechinorhynchus* (Amin, 2002). Variation and combination of morphological traits such as proboscis shape, number of hooks, proboscis receptacle shape, testes shape and location, kind of cement gland, and egg shape with or without prolongations has been traditionally used to diagnose and delimit the 92 congeneric species (Aho et al., 1992; Amin, 2002; Amin et al., 2003; Barger et al., 2004; Barger and Nickol, 2004; Amin and Christison, 2005; Mikhailova and Atrashkevich, 2008). Additionally, species of *Neoechinorhynchus* exhibit an indirect life cycle, involving ostracods as intermediate hosts, and either marine, freshwater, and brackish water fish, or freshwater turtles and frogs, as definitive hosts, and occur mostly in the Nearctic region (Bullock, 1970; Schmidt, 1985; Kennedy, 2006). However, some species have been found in South America, Europe, India, Asia, and Australia (see Bullock, 1970). In Mexico, only 4 species of *Neoechinorhynchus* have been described, mostly from the Neotropical region; 2 of these species occur in freshwater turtles, i.e., *Neoechinorhynchus schmidti* Barger, Thatcher and Nickol, 2004 and *Neoechinorhynchus emyditoides* Fisher, 1960, and 2 other species occur in brackish and freshwater water fishes, i.e., *Neoechinorhynchus roseum* Salgado-Maldonado, 1978 and *Neoechinorhynchus golvani*, Salgado-Maldonado, 1978, respectively.

*Neoechinorhynchus golvani* is widely distributed in central and southern Mexico, where is primarily associated with cichlid fishes (Vidal-Martinez et al., 2001; Salgado-Maldonado, 2006), and sporadically in 10 other families of fishes (Pérez-Ponce de León et al., 1996; Salgado-Maldonado, 2006; Violante-González et al., 2007). Additionally, even though specimens of *N. golvani* show some morphological variation in terms of body size, several other diagnostic characters (Salgado-Maldonado, 1978) are exhibited

by individuals from all populations irrespective of body size. Moreover, the geographic distribution of *N. golvani* is wide and fragmented, and therefore it is possible their populations may show genetic variation due to isolation and suppression of gene flow.

The main objective of the present research was to estimate the genetic divergence among some populations of *N. golvani* by using 2 nuclear genes, ITS1, 5.8S, ITS2 (ITSs), and the large subunit (LSU) of ribosomal DNA, including the D2 + D3 domains, as molecular markers, and to test for the possible presence of cryptic species.

### MATERIALS AND METHODS

#### Specimens and DNA isolation

Adult acanthocephalans were collected from the intestines of their definitive hosts in 12 localities of Mexico and 1 in Costa Rica (Table I; Fig. 1). Worms were washed 3 times in 0.9% (w/v) saline, preserved in absolute ethanol, and stored at 4 C. For taxonomic identification, some specimens were stained with Mayer's paracarmine, cleared with methyl salicylate, and mounted on permanent slides with Canada balsam. The acanthocephalans were identified by conventional morphological criteria following keys of Amin (2002) and were allocated to the species *N. golvani*. In addition, original and revised descriptions of the species (Salgado-Maldonado, 1978; Barger et al., 2004) were consulted as needed. Voucher specimens were deposited at the Colección Nacional de Helminthos (CNHE), Instituto de Biología, UNAM, Mexico City, México (Table I).

#### Morphometry

For morphometry, 33 acanthocephalans from 9 populations were examined. Body length and width; proboscis length and width; as well as the length and width of anterior, middle, and posterior hooks of proboscis were taken following Petrochenko (1956). Each hook was measured from the tip to the base according with Mikhailova and Atrashkevich (2008). A total of 10 characters were considered. Descriptive univariate statistics (mean values, standard deviations, range) for all variables were calculated and Student's *t*-tests ( $P < 0.005$ ) were used to test the equality of means for each variable. Statistical analyses were performed with the use of Microsoft Excel and PAST version 1.90 (Hammer et al., 2001).

#### Amplification and sequencing of DNA

Several specimens from each population were digested overnight at 56 C in a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl,

Received 24 October 2008; revised 14 December 2008, 23 March 2009; accepted 4 May 2009.

\* To whom correspondence should be addressed.

DOI: 10.1645/GE-1926.1

TABLE I. Specimen information. Sample number, specimens analyzed (S), host species, collection sites (CS), locality name, geographical coordinates, GenBank accession number, and catalog number (CNHE) for specimens studied in this work. Sequences marked with an asterisk were obtained in this study. Family of freshwater and brackish fishes host of *Neoechinorhynchus golvani* (C) = Cichlidae; (E) = Eleotridae; Nd = not determined. The sample number for each locality corresponds with the same numbers as in Figures 2 and 3.

Sample no.	S	Host	CS	Locality	Coordinates		GenBank accession no.		Vouchers (CNHE)
					North	West	ITSs	LSU	
1–3	3	<i>Cichlasoma urophthalmus</i> (C)	1	Carrizal River, Tabasco	18°1'45"	92°55'00"	FJ388974*	FJ388993*	6754
							FJ968121*	FJ968134*	
							FJ968122*	FJ968135*	
4–7	4	<i>Vieja pearsei</i> (C)	2	Chicoasen Dam, Chiapas	16°56'02"	93°05'16"	FJ388976*	FJ388995*	6755
							FJ968118*	FJ968136*	
							FJ968119*	FJ968137*	
							FJ968120*	FJ968138*	
8–10	3	<i>V. pearsei</i> (C)	3	Nezahualcoyolt Dam, Malpaso, Chiapas	17°10'49"	93°36'49"	FJ388977*	FJ388996*	6756
							FJ968130*	FJ968141*	
							FJ968131*	FJ968142*	
11–13	3	<i>Parachromis friedrichstali</i> (C)	4	Canitzan Lake, Tenosique, Tabasco	17°28'57"	91°25'27"	FJ388975*	FJ388994*	6757
							FJ968126*	FJ968139*	
							FJ968127*	FJ968140*	
14–16	3	<i>C. urophthalmus</i> (C)	5	Las Ilusiones Lake, Tabasco	17°59'46"	92°56'17"	FJ388973*	FJ388992*	
							FJ968128*	FJ968143*	
							FJ968129*	FJ968144*	
17–19	3	<i>V. fenestrata</i> (C)	6	Catemaco Lake, Veracruz	18°25'	95°07'	FJ388967*	FJ388986*	601, 603,
							FJ968112*	FJ968145*	604, 606,
							FJ968113*	FJ968146*	631, 632
20	1	<i>Amatitlania nigrofasciata</i> (C)	7	Quebrada Puercos, Santa Rosa, Costa Rica	10°51'	85°34'	FJ388979*	FJ388998*	6757
21–23	3	<i>Herichthys cyanoguttatus</i> (C)	8	Axtlan de Terrazas, San Luis Potosí	21°26'1"	98°52'28"	FJ388983*	FJ389002*	6758
							FJ968132*	FJ968147*	
							FJ968133*	FJ968148*	
24–28	5	<i>C. urophthalmus</i> (C)	9	Papaloapan River, Tlacotalpan, Veracruz	18°36'	95°39'	FJ388968*	FJ388987*	6759
							FJ388969*	FJ388988*	
							FJ968123*	FJ968149*	
							FJ968124*	FJ968150*	
							FJ968125*	FJ968151*	
29–33	5	<i>Dormitator maculatus</i> (E)	10	Alvarado Lagoon, Veracruz	18°45'	95°45'	FJ388966*	FJ388985*	6760
							FJ968108*	FJ968152*	
							FJ968109*	FJ968153*	
							FJ968110*	FJ968154*	
							FJ968111*	FJ968155*	
34–38	5	<i>D. latifrons</i> (E)	11	Tres Palos Lagoon, Guerrero	16°47'47"	99°44'30"	FJ388972*	FJ388991*	4347–4348
							FJ968114*	FJ968156*	
							FJ968115*	FJ968157*	
							FJ968116*	FJ968158*	
							FJ968117*	FJ968159*	
39	1	<i>D. latifrons</i> (E)	12	Chamela Estuary, Jalisco	19°31'20"	104°04'53"	FJ388971*	FJ388990*	
40	1	<i>D. latifrons</i> (E)	13	Cuitzmala River, Jalisco	19°23'27"	104°58'28"	FJ388970*	FJ388989*	
<i>Neoechinorhynchus roseum</i> 1	1	<i>Achiurus mazatlanus</i>		El Caimanero Estuary, Sinaloa	25°36'30"	108°26'25"	FJ388980*	FJ388999*	6762
<i>N. roseum</i> 2	1	<i>Citharichthys gilbertei</i>		La Tovar Estuary, Nayarit	21°31'37"	105°14'29"	FJ388981*	FJ389000*	6763
<i>N. schmidti</i>	1	<i>Trachemys s. venusta</i>		Pantanos de Centla, Tabasco	18°28'18.9"	92°39'14.9"	FJ388982*	FJ389001*	6764
<i>N. saginatus</i>	1	Nd		Nd	Nd	Nd	FJ388984*	AY829091	

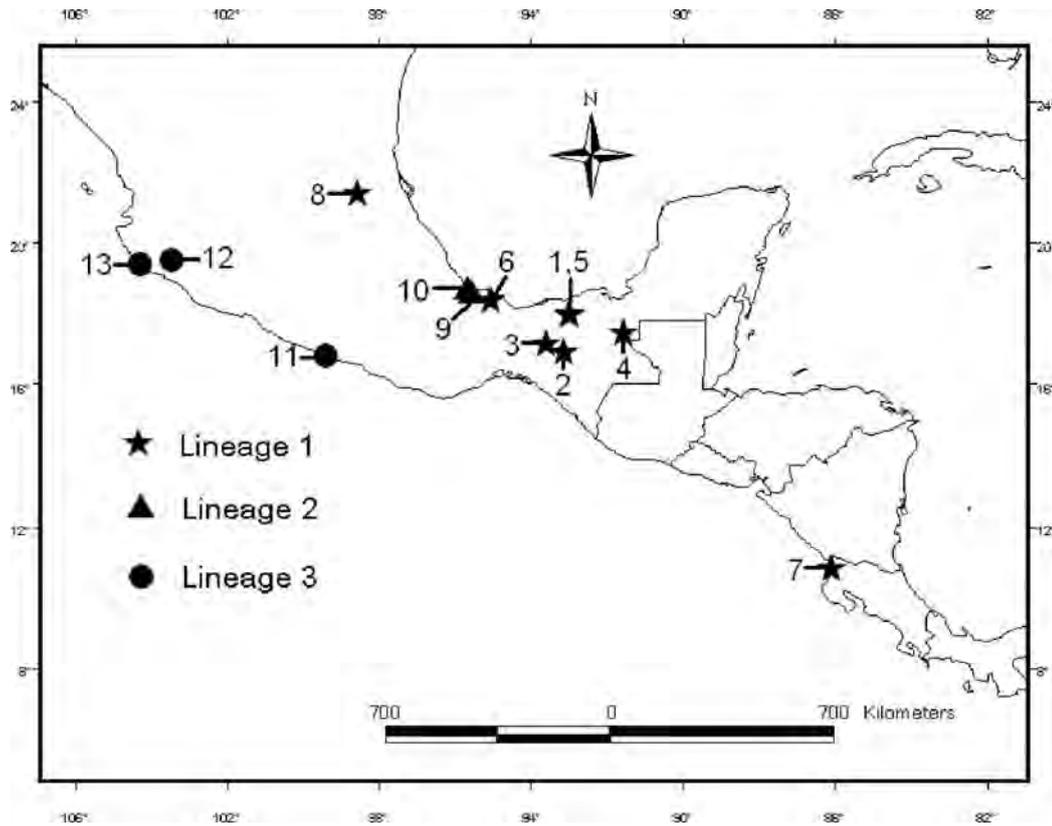


FIGURE 1. Sampling sites of specimens of *Neoechinorhynchus golvani* in Mexico and Costa Rica. Symbols correspond to the lineages uncovered through phylogenetic analyses as shown in Figures 2 and 3. Collection sites are numbered according to Table I.

100 mM Na<sub>2</sub> EDTA (pH 8.0), 1% Sarkosyl, and 0.1 mg/ml Proteinase K. Following digestion, DNA was extracted from the supernatant with the use of the DNAzol reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) according to the manufacturer's instructions.

Two regions of nuclear ribosomal DNA (rDNA) were amplified with the use of the polymerase chain reaction (PCR). The ITS1, 5.8S, and ITS2 (ITSs; ~800 bp) were amplified with the use of the forward primer 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGT-3' and reverse primer 5'-ACCGCTGAATTTAAGCATA-3' (Luton et al., 1992). The domains D2 + D3 (~900 bp) of LSU rDNA were amplified using the forward primer 5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC-3' and reverse primer 5'-GTCGATAGGACTCCCTTG-3' (García-Varela and Nadler, 2005). PCR reactions (25 µl) consisted of 10 µM of each primer, 2.5 µl of 10× buffer, 1.5 µl of 15 mM of MgCl<sub>2</sub>, and 1 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, São Paulo, Brazil). PCR cycling parameters for rDNA amplifications included denaturation at 94 C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 C for 1 min, annealing at 50 C for 1 min, and extension at 72 C for 1 min, followed by a postamplification incubation at 72 C for 10 min.

Each PCR product was purified with the use of Millipore columns (Amicon, Billerica, Massachusetts). Purified products were cloned by ligation into pGEM-T vector (Promega, Madison, Wisconsin) and used to transform competent *Escherichia coli* (JM109). Positive clones were identified by blue/white selection, and clone (insert) size was confirmed by PCR of DNA extracts prepared from bacterial (clone) colonies. Liquid cultures for minipreps were grown in Luria broth containing 50 µg/ml of ampicillin. Plasmids for DNA sequencing were prepared with the use of commercial miniprep kits (Qiaprep, Qiagen, Valencia, California). Plasmids were sequenced for both DNA strands with the use of universal (vector) and internal primers. Sequencing reactions were performed with the use of ABI Big Dye (PE Applied Biosystems, Boston, Massachusetts) terminator sequencing chemistry, and reaction products were separated and detected with the use of an ABI 310 capillary DNA sequencer.

Contigs were assembled and base-calling differences resolved with the use of Codoncode Aligner version 1.4.5 (Codoncode Corporation, Dedham, Massachusetts). All sequences have been deposited in the Genbank database (accession numbers in Table I).

#### Alignments and phylogenetic analyses

The ITSs and LSU data sets were aligned separately with the use of the software ProAlign version 0.5 (Loytynoja and Milinkovitch, 2003). For each alignment, a ProAlign guide tree was constructed with the use of corrected (for multiple hits) pairwise distances; this guide tree was used to estimate the hidden Markov model parameters ( $\delta$  and  $\alpha$ ) for progressive multiple alignment. Program (Java) memory and bandwidth were increased as required to complete the alignment. The minimum posterior probability of sites was used as the criterion for detecting and removing unreliably aligned sequences. To reduce the likelihood of excluding correctly aligned sites, the filter threshold was set to 60% minimum posterior probability. For the ITSs sequences, using ProAlign to detect and remove unreliably aligned sequences by their posterior probabilities excluded 644 of 991 sites. For the LSU data set, 161 of 842 sites were excluded based on posterior probability filtering. These (ITSs + LSU) combined data sets included 1,028 characters following removal of unreliably aligned sites. The initial alignment showed many ambiguous positional homology statements, particularly between the ingroups and outgroups. This problem was addressed by removing the outgroups from the ITSs and LSU data sets. For the ITSs data sets, 244 of 771 sites were excluded, and for the LSU data set, 27 of 830 sites were excluded based on a posterior probability filtering with the software ProAlign. A second combined (ITSs + LSU) alignment that contained only in-group taxa (40 samples of *N. golvani*), form a data set of 1,330 characters. The ITSs and LSU rDNA filtered alignments were analyzed independently and as a combined (ITSs + LSU) data set. Likewise, other combined (ITSs + LSU) data sets that include only 40 samples of *N. golvani* were also analyzed independently. Tree searches were conducted with the optimality criteria

TABLE II. Tree statistics for rDNA data sets. Combined (internal transcribed spacers [ITSs] + large-subunit [LSU]) data sets. Number of informative characters, consistency index, and tree length refer to parsimony inference. Pinv (proportion of invariable sites), Gd (shape of gamma distribution), and  $-\ln$  likelihood refer to maximum likelihood inference.

Data set	ITSs + LSU	ITSs + LSU (only ingroup)	LSU	ITSs
Total characters	1,028	1,330	681	347
Uninformative characters	39	16	18	21
Constant characters	595	916	406	189
Informative characters	394	398	257	137
Consistency index	0.83	0.93	0.84	0.84
Tree length	740	509	469	269
$-\ln$ likelihood	4701.54605	4227.33009	2985.05872	1658.14293
Pinv	0.5000	0	0.5325	0.4368
Gd	Equal	0.6111	Equal	Equal

of maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) with the use of PAUP\* 4.0b10 software (Swofford, 2002). For ML analyses, the Akaike Information Criterion (AIC) was used to assess the fit of GTR (general time reversible) nucleotide substitution models (Rodríguez et al., 1990) as implemented with the use of Modeltest version 3.0 (Posada and Crandall, 1998). The best ML model for each data set (ITSs and LSU, with and without outgroups) was used for likelihood analysis (Table II). For each data set, the best model with invariable sites (+I), and rate heterogeneity (+G; Yang, 1994) was used, but the estimated parameters varied by data set (Table II). Tree searches were performed with the use of 50 (ML) and 1,000 (MP) random addition heuristic searches with tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping. The support of the clades was assessed by bootstrap resampling, with 10,000 (MP) or 1,000 (ML) bootstrap replicates with the software PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002). Trees were drawn with the use of RETREE and DRAWGRAM from PHYLIP (Felsenstein, 1999). The genetic divergence among population and between congeneric species was estimated with the use of  $p$  distances with the program MEGA version 4 (Tamura et al., 2007). Congeneric species, i.e., *N. roseum*, *N. schmidti*, and *Neoechinorhynchus saginatus* Van Cleave and Bangham, 1949, were chosen as outgroups to conduct ML and MP analyses.

## RESULTS

### Base composition and genetic divergence

DNA fragments of the ITSs and LSU were amplified, cloned, and sequenced for 40 samples of *N. golvani* and 4 samples representing 3 congeneric species (2 of *N. roseum*, 1 of *N. schmidti*, and 1 of *N. saginatus*), which were used as outgroups. Length of the PCR products among *N. golvani* ranged from 700 to 749 bp and from 813 to 821 bp for ITSs and LSU, respectively, and among congeneric species ranged from 728 to 987 bp and 766 to 818 bp for ITSs and LSU, respectively.

Nucleotide frequencies for the combined (ITSs + LSU) data set that includes outgroups were 0.2656 (A), 0.1769 (C), 0.2802 (G), and 0.2771 (T). The heterogeneity of nucleotide frequencies across taxa was tested with the use of the “basefreq” option implemented in PAUP\* ( $\chi^2 = 23.4596$ ,  $P = 1$ ). This result indicates that rDNA nucleotide frequencies were not significantly heterogeneous across taxa, which is advantageous because MP and ML inference methods perform optimally when nucleotide frequencies are homogeneous (Omilian and Taylor, 2001). Total lengths of the alignments and number of constant and parsimony-informative characters for the ITSs, LSU, and combined (ITSs + LSU) data

TABLE III. Average of genetic divergence of the 3 major clades (lineages) and intraclade detected within *Neoechinorhynchus golvani*. Internal transcribed spacers (ITSs; upper matrix) and large-subunit (LSU; lower matrix). Uncorrected  $p$  distances are expressed as percentages.

ITSs/LSU	Lineage 1	Lineage 2	Lineage 3	Intraclade	
				ITSs	LSU
Lineage 1	—	35.3	34.7	2.1	1.6
Lineage 2	19.49	—	19.5	0.31	0.21
Lineage 3	19.58	9.28	—	0.2	0.1

sets are provided in Table II. The genetic divergence among populations from 3 major clades of *N. golvani* ranged from 9.28 to 19.58% with LSU, from 19.5 to 35.3% with ITSs (Table III), and from 26.9 to 31.6% with LSU and from 40.1 to 45.2% with ITSs among congeners (*N. roseum*, *N. schmidti*, and *N. saginatus*).

### Combined ITSs + LSU data set

The maximum likelihood tree inferred from the combined (ITSs + LSU) data set that includes 40 samples of *N. golvani* plus 3 congeneric species, yielded 1 tree with  $-\ln$  of 4701.54605. In this tree, 3 major clades are shown (Fig. 2A). The first clade was composed of 8 populations with 23 specimens of *N. golvani* that exhibit a wide geographic distribution. All these populations are found exclusively in cichlids, including a population from Catemaco, Veracruz (sample nos. 17–19), the type location. Clades 2 and 3 are composed of 10 and 7 specimens from populations distributed along the Gulf of Mexico and Pacific slopes, respectively, and are associated with cichlid and eleotrid fishes (Fig. 2A). The 3 major clades exhibited a relatively high bootstrap support value, ranging from 99 to 100%. Maximum parsimony analysis of the combined ITSs + LSU data set (Fig. 2B) yielded 5 trees with a CI = 0.83 and length of 740 steps (Table II). The strict consensus of 5 trees yielded the same general topology as the ML, with high bootstrap support (100%). The few topological differences between ML and MP trees involved some populations within clades with very short branches as inferred by ML and low bootstrap support (Fig. 2A, B). The second combined (ITSs + LSU) data set included 40 samples of *N. golvani* and 1,330 characters. This alignment was analyzed to explore the effect of including more characters, in this case those that are alignable among the in-group species, but are problematic when the out-group taxa are added due their high divergence. The maximum likelihood tree inferred from this combined data set (ITSs + LSU and no outgroups) yielded 1 tree with a  $-\ln$  of 4227.33009 (Fig. 3A). This tree also exhibited the same general topologies as ML and MP trees inferred from a combined data set that includes the outgroups (Fig. 2A, B). The nodes of the 3 major clades received high bootstrap support (100%). Maximum parsimony analysis of the combined ITSs + LSU data set without outgroups (Fig. 3B) yielded 12 trees with a CI = 0.93 and length of 509 steps (Table II). The strict consensus of 12 trees yielded the same general topology as the ML tree (Fig. 3A).

### LSU data set

Maximum likelihood analysis of the LSU data set (including the outgroups) yielded a tree with a  $-\ln$  of 2985.05872. This tree had a considerable similarity to the MP tree inferred from the

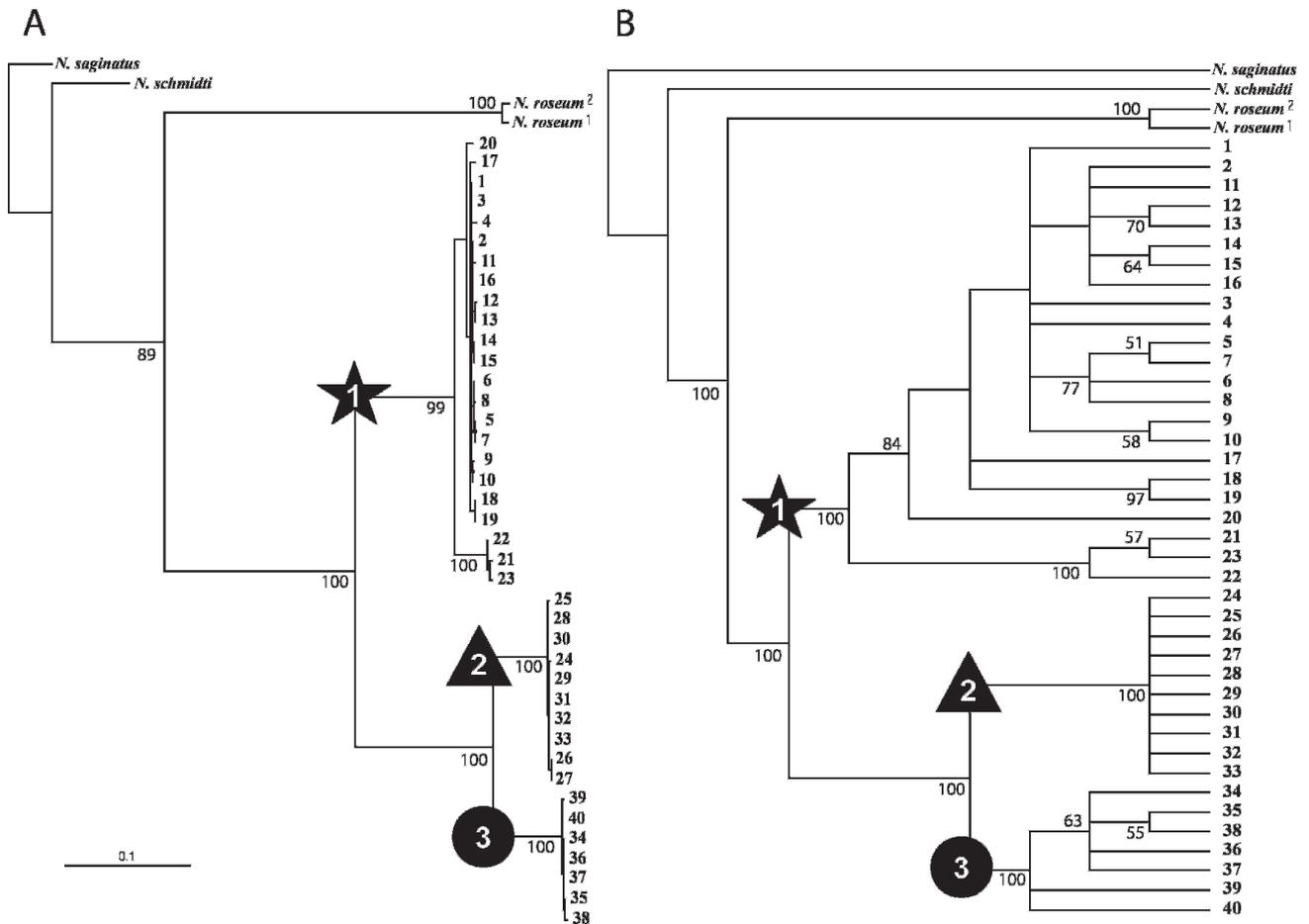


FIGURE 2. Trees recovered from analyses of the combined ITSs + LSU rDNA data set conformed by 40 samples of *Neoechinorhynchus golvani* plus 3 out-group species (1,028 characters). (A) Maximum likelihood (ML) tree ( $-\ln$  likelihood of 4701.54605) obtained from heuristic search with branch lengths scaled to the expected number of substitutions per site. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies. (B) Strict consensus of 5 equally parsimonious trees (740 steps) inferred from heuristic MP analysis. Numbers below internal nodes show maximum parsimony bootstrap clade frequencies. The 3 major lineages discussed in the text are indicated on the trees: Lineages 1 (★), 2 (▲), and 3 (●).

combined data set (with and without outgroups). The 3 major clades received strong bootstrap support (from 87 to 100%). The MP analysis of this data set yielded 150 trees with CI = 0.84 and a length of 469 steps. The strict consensus of 150 trees yielded the same general topology as ML tree inferred from LSU data set alone and the combination of both (ITSs + LSU) data sets with and without outgroups (trees not shown).

#### ITSs data set

Maximum likelihood analysis of the ITSs data set (including the outgroups) yielded a single tree with a  $-\ln$  of 1658.14293. This tree produced almost the same topology inferred with ML and MP trees from combined data sets (with and without outgroups) and the LSU data set alone. The MP analysis of this data set yielded 6 trees with CI = 0.84 and a length of 269 steps. The strict consensus of 6 trees revealed the same general topology as the MP trees inferred from LSU data set alone and the combination of both (ITSs + LSU) data sets with and without outgroups (trees not shown).

#### DISCUSSION

The genetic divergence estimated among populations of *N. golvani* analyzed in the current study ranged from 19.5 to 35.3% by ITSs. This molecular marker was previously used to separate populations of other acanthocephalan species such as *Pomphorhynchus leavis* Müller 1776, and *Leptorhynchoides thecatus* Linton, 1891, which showed a genetic divergence of 20% and between 1 and 8.7%, respectively (Perrot-Minnot, 2004; Steinauer et al., 2007). In the present study, a second nuclear gene (LSU) was used for the first time as molecular marker to determine differences/similarities among populations of acanthocephalans. We hoped that it would also be useful recognizing the presence of cryptic species. The genetic distances estimated for each gene, the reciprocal monophyly of the populations in the phylogenetic trees inferred from each data set, and the combined data set (ITSs + LSU) with and without outgroups, with the use of both ML and MP methods, clearly demonstrate the existence of a complex of cryptic species in *N. golvani*. This complex is composed of at least 3 lineages with evolutionary

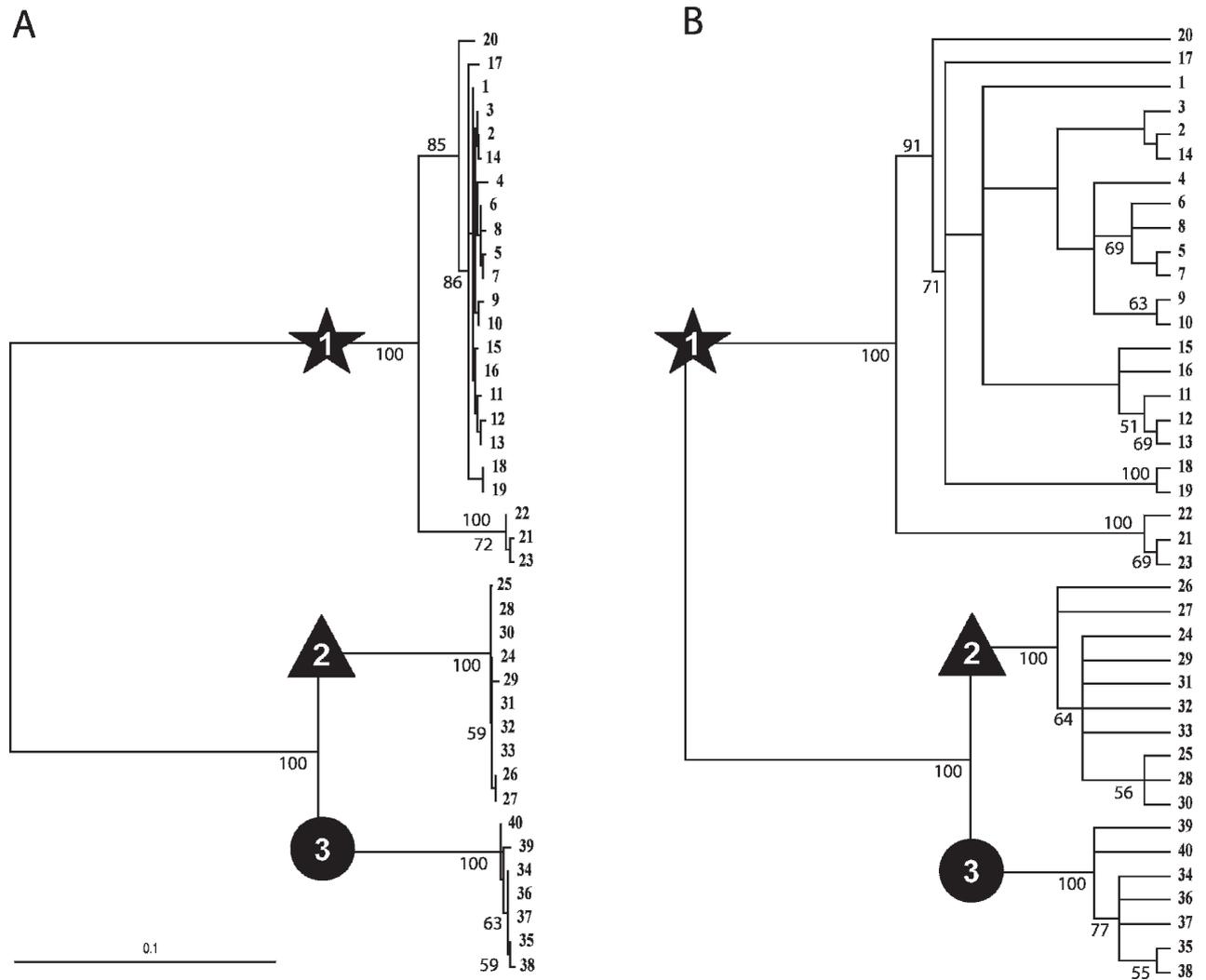


FIGURE 3. Trees recovered from analyses of the combined ITSs + LSU rDNA data set conformed by 40 samples of *N. golvani* (1,330 characters). (A) Maximum likelihood (ML) tree ( $-\ln$  likelihood of 4227.33009) obtained from heuristic search with branch lengths scaled to the expected number of substitutions per site. Numbers near internal nodes show ML bootstrap clade frequencies. (B) Strict consensus of 12 equally parsimonious trees (509 steps) inferred from heuristic maximum parsimony (MP) analysis. Numbers below internal nodes show MP bootstrap clade frequencies. The 3 major lineages discussed in the text are indicated on the trees: Lineages 1 (★), 2 (▲), and 3 (●).

independence, particularly when considering that the populations are fragmented.

Lineage 1, which includes *N. golvani* sensu stricto, included 23 specimens (sample nos. 1–23) from freshwater cichlids. This result corroborates the contention that *N. golvani* is a consistent component of the helminth fauna of cichlids (see Pérez-Ponce de León and Choudhury, 2005). The distribution area of lineage 1 (Fig. 1) in Middle America extends from southeastern Mexico to Costa Rica, and it can be explained as a result of the contemporary and historical biogeography of their cichlid hosts (Concheiro-Pérez et al., 2007). According to these authors, Middle American cichlids derive from South American lineages that expanded their distribution range northwards. Ancestors of Middle American cichlids experienced a diversification process while expanding their distribution into southeastern Mexico. The

presence of *N. golvani* in cichlids from such a wide distribution range, i.e., from Costa Rica to as far north as the Panuco River Basin in Mexico, indicates an ancient relationship and the fact that parasite distribution is closely tied to the historical biogeography of their hosts.

Lineages 2 and 3 of *N. golvani* are brackish water helminths represented by geographically restricted populations that are distributed in the Gulf of Mexico and the Pacific Ocean slopes, respectively. Moreover, lineage 2 is associated with both eleotrid and cichlid fishes. Meanwhile, the lineage 3 is associated strictly with eleotrid fishes. The genetic divergence between both lineages was 19.5% for ITSs and 9.8% for LSU. Steinauer et al. (2007) found a divergence level of 8.7% for populations of *Leptorhynchoides thecatus* Linton, 1891 with ITSs; their findings were used to postulate the existence of cryptic species for *L. thecatus*. Even

though the present observations may not necessarily represent a genetic yardstick for the group, the values of genetic divergence obtained in our study for clades 2 and 3 are large enough to speculate that both lineages are evolving independently. In addition, these populations have a vicariant distribution (Gulf of Mexico vs. Pacific Ocean slopes) and it seems unlikely that gene flow occurs between them, making it even more likely that they actually represent cryptic species.

Five samples from the Gulf of Mexico slope (lineage 2), were collected from an eleotrid *Dormitator maculatus* Bloch, 1792, (sample nos. 29–33) and another 5 samples were obtained from the cichlid *Cichlasoma urophthalmus* Günther, 1862 (sample nos. 24–28). It is currently known that the Papaloapan River is not considered part of the natural distributional range of *C. urophthalmus* (Miller et al., 2005), although it was recently introduced for aquacultural purposes (Espinosa-Pérez et al., 1993). Therefore, *C. urophthalmus* occurs in sympatry with eleotrids in the same hydrological system. In this scenario, when considering the very low genetic divergence among these individuals, i.e., 0.31% with ITSs and 0.21% with LSU, it can be concluded that they represent the same lineage and that the presence of this lineage in *C. urophthalmus* is due to host sharing or ecological host extension.

The specimens of *N. golvani* belonging to clade 3 were recovered from the eleotrid fish *Dormitator latifrons* Richardson, 1844 from Tres Palos Lagoon, on the Pacific slope of Mexico, (samples 34–38), where it co-occurs with fishes from other families such as Centropomidae, Cichlidae, Gerridae, Gobiidae, and Lutjanidae. Recently, Violante-González et al. (2007) recorded the presence of the acanthocephalan *N. golvani* in several species of brackish water fishes from that locality, including the eleotrid *D. latifrons*. The presence of this species of *Neoechinorhynchus* in fishes other than eleotrids can be explained either as a result of a host-sharing event, or even as an accidental infection, depending on the abundance and mean intensity values. Our prediction is that the acanthocephalans determined as *N. golvani* will correspond to the same lineage we uncovered. Future samplings of fresh specimens from all these hosts to extract DNA are necessary to test this hypothesis. Additionally, a more detailed morphological analysis is needed to look for characters that may corroborate the genetic distinction, probably characters only observed via scanning electron microscopy.

Morphological observations were made and meristic data of some of the diagnostic traits, including number of proboscis hooks as well as the size of anterior, middle, and posterior hooks, and body length and width, were taken from 33 specimens from the sampled populations, representing the 3 different clades. This information was used in a comparative framework, with respect to general morphology and measurements of previous published accounts (Salgado-Maldonado, 1985) in order to look for morphological characters that may indicate the presence of undescribed species. Measurements of our specimens in the current work were compared with 78 specimens from Veracruz and Tabasco, including the type locality. When mean values of individual variables were examined with the use of Student's *t*-tests, no significant statistical difference was found among specimens representing the 3 major clades ( $P < 0.005$ ). Based on these observations, our null hypothesis was that we were dealing with a single species, *N. golvani*. However, the genetic divergence plus the reciprocal monophyly of the 3 major clades in

all the phylogenetic analyses leads to detection of 3 cryptic species. These species are not herein described, because further molecular work needs to be conducted by sequencing at least a mitochondrial gene, and an even more detailed morphological examination needs to be undertaken to establish the proper description; that is, more data need to be gathered at this point to establish the species delimitation and description.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Montoya-Mendoza and L. García-Prieto for providing some specimens of *Neoechinorhynchus* they collected during their field work. The support of Patricia de la Torre and Laura Márquez with the molecular techniques Berenit Mendoza-Garfías with the scanning electron microscopy micrographs, and R. Pérez-Rodríguez by statistic analyses is greatly appreciated. We also thank B. Hernández-Baños and Juan J. Morrone for their comments on an earlier draft of this manuscript. A.M.A. thanks CONACyT for a scholarship to accomplish his Ms. Sc. degree. Specimens from Costa Rica were collected during a field trip of G.P.P.L. and Anindo Choudhury to the Area de Conservación de Guanacaste. Dr. Daniel R. Brooks sponsored G.P.P.L. for this field trip under operating grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), Canada, as coordinator of the inventory of eukaryotic parasites of vertebrates. This research was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN206906 and IN215709) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, through the program Apoyo Complementario a Investigadores en Proceso de Consolidación (CONACyT 52185) to M.G.V. and by grants from the program PAPIIT-UNAM IN220605 and 209608 and from CONACyT (83043) to G.P.P.L.

## LITERATURE CITED

- AHO, J. M., M. MULVEY, K. C. JACOBSEN, AND G. W. ESCH. 1992. Genetic differentiation among congeneric acanthocephalans in the yellow-bellied slider turtle. *Journal of Parasitology* **78**: 974–981.
- AMIN, O. M. 2002. Revision of *Neoechinorhynchus* Stiles & Hassall, 1905 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) with keys to 88 species in two subgenera. *Systematic Parasitology* **53**: 1–18.
- , M. A. S. ABDULLAH, AND F. T. MHAISEN. 2003. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *zabensis* sp. n. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from freshwater fish in northern Iraq. *Folia Parasitologica* **50**: 293–297.
- , AND W. K. CHRISTISON. 2005. *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *dorsovaginatus* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from the dusky kob *Argyrosomus japonicus* (Sciaenidae) on the southern coast of South Africa. *Systematic Parasitology* **61**: 173–179.
- BARGER, M. A., AND B. B. NICKOL. 2004. A key to the species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from turtles. *Comparative Parasitology* **71**: 4–8.
- , E. V. THATCHER, AND B. B. NICKOL. 2004. A new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from a red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Mexico. *Comparative Parasitology* **71**: 1–3.
- BULLOCK, W. L. 1970. The zoogeography and host relations of the acanthocephalan parasites of fishes. In *A symposium on diseases of fishes and shellfishes*, S. F. Snieszko (ed.). The American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, p. 162–173.
- CONCHEIRO-PÉREZ, G. A., O. RICAN, G. ORTÍ, E. BERMINGHAM, I. DOADRIO, AND R. ZARDOYA. 2007. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**: 91–110.
- ESPINOSA-PÉREZ, H., M. T. GASPARD-DILLANES, AND P. PUENTES-MATA. 1993. Listados faunísticos de México III. Los peces dulceacuicolas mexicanos. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico, 99 p.
- FELSENSTEIN, J. 1999. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.572. University of Washington, Seattle, Washington.

- GARCÍA-VARELA, M., AND S. A. NADLER. 2005. Phylogenetic relationships of Palaecanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology* **91**: 1401–1409.
- HAMMER, Ø., D. A. T. HARPER, AND P. D. RYAN. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaentologia Electronica* **4**: 9.
- KENNEDY, C. R. 2006. Ecology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 249 p.
- LOYTYNOJA, A., AND M. C. MILINKOVITCH. 2003. A hidden Markov model for progressive multiple alignment. *Bioinformatics* **19**: 1505–1513.
- LUTON, K., D. WALKER, AND D. BLAIR. 1992. Comparison of ribosomal internal transcribed spacer from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology* **56**: 323–328.
- MIKHAILOVA, E. I., AND G. I. ATRASHKEVICH. 2008. Description and morphological variability of *Neoechinorhynchus beringianus* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from north-eastern Asia. *Systematic Parasitology* **71**: 41–48.
- MILLER, R. R., W. L. MINCKLEY, AND S. M. NORRIS. 2005. Freshwater fishes of Mexico. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 490 p.
- OMILIAN, A. R., AND D. J. TAYLOR. 2001. Rate acceleration and long-branch attraction in a conserved gene of cryptic daphniid (Crustacea) species. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 2201–2212.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G., AND A. CHOUDHURY. 2005. Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: The search for patterns and process. *Journal of Biogeography* **32**: 645–659.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G., L. GARCÍA-PRÍETO, D. OSORIO-SARABIA, AND V. LEÓN-REGAGNON. 1996. Listados faunísticos de México VI. Helminthos parásitos de peces de aguas continentales de México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, 100 p.
- PERROT-MINNOT, M. J. 2004. Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomporhynchus laevis* (Acanthocephala). *International Journal for Parasitology* **34**: 45–54.
- PETROCHENKO, V. I. 1956. Acanthocephala of domestic and wild animals. Volumen I. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Vsesoyuznoe Obshchestvo Gel'mintologov, Moscow, Russia, 478 p.
- POSADA, D., AND K. A. CRANDALL. 1988. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **9**: 817–818.
- RODRÍGUEZ, F., J. F. OLIVER, A. MARIN, AND J. R. MEDINA. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* **142**: 817–818.
- SALGADO-MALDONADO, G. 1978. Acanthocéfalos de peces IV. Descripción de dos especies nuevas de *Neoechinorhynchus* Hamann, 1892 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) y algunas consideraciones sobre este género. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* **49**: 35–48.
- . 1985. Crecimiento alométrico y consideraciones taxonómicas sobre *Neoechinorhynchus golvani* Salgado-Maldonado, 1978 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) parásito de peces dulceacuicolas en Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* **3**: 57–66.
- . 2006. Checklist of helminth parasites of freshwater fishes from Mexico. *Zootaxa* **1324**: 1–357.
- SCHMIDT, G. D. 1985. Development and life cycles. In *Biology of Acanthocephala*, B. B. Nickol and D. W. T. Crompton (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U.K., p. 273–286.
- STEINAUER, M. L., B. B. NICKOL, AND G. ORTÍ. 2007. Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of variable acanthocephalan parasite. *Molecular Ecology* **16**: 4097–4109.
- SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP 4.0b10. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI, AND S. KUMAR. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596–1599.
- VIDAL-MARTÍNEZ, V., L. AGUIRRE-MACEDO, T. SCHOLZ, D. GONZÁLEZ-SOLÍS, AND E. MENDOZA-FRANCO. 2001. Atlas of the helminth parasites of cichlid fish of Mexico. Academia Press, Praha, Czech Republic, 165 p.
- VIOLANTE-GONZÁLEZ, J., M. L. AGUIRRE-MACEDO, AND E. F. MENDOZA-FRANCO. 2007. A checklist of metazoan parasites of fish from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *Parasitology Research* **102**: 151–161.
- YANG, Z. 1994. Estimating the patterns of nucleotide substitution. *Journal of Molecular Evolution* **39**: 105–111.