

Informe final* del Proyecto HB008
Códigos de barras del ADN de especies mexicanas del Phylum Rotifera: (Rotifera: Monogononta)

Responsable: Dr. Elias Piedra Ibarra
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
División de Investigación y Posgrado
Unidad de Biotecnología y Prototipos
Dirección: Av. de los Barrios # 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Mex, 54090 , México
Correo electrónico: pielias@unam.mx
Teléfono/Fax: (55) 56231131
Fecha de inicio: Enero 29, 2010.
Fecha de término: Septiembre 21, 2016.
Principales resultados: Código de barras, base de datos, fotografías, informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Piedra Ibarra, E. 2015. Códigos de barras del ADN de especies mexicanas del Phylum Rotifera: (Rotifera: Monogononta). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores-Iztacala. **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. HB008.** México D.F.

Resumen:

40 especies del Phylum rotífera (Rotifera:Monogononta) del Estado de México y Distrito Federal (Región Central de México), fueron fijadas con alcohol absoluto para la extracción de ADN y algunas especies serán cultivadas en el laboratorio para obtener poblaciones clonales. Se extraerá el ADN y se amplificará un fragmento de aproximadamente 680 pb correspondiente al gen mitocondrial que codifica la Citocromo Oxidasa Subunidad I para obtener el código de barras de secuencias de las especies mexicanas del Phylum rotífera, los cuales se incorporarán a la Base de Datos del proyecto BOL. De las especies seleccionadas se obtendrán microfotografías las cuales serán incluidas en la base de datos BOLD, y también serán incorporadas al acervo del Banco de Imágenes de la CONABIO.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

INFORME DEL PROYECTO HB008

**“Código de Barras del DNA de especies mexicanas de especies del Phylum Rotifera
(Monogononta)”**

**Apoyado financieramente por CONABIO dentro del programa “Proyectos para la
generación de Código de barras de especies mexicanas.**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México. 6 de Marzo del 2015.

1.- Introducción

Los organismos acuáticos pertenecientes al filo Rotifera, han sido agrupados en poco más de 2,000 especies, divididas en tres clases: Seisonidea, Bdelloidea y Monogononta (Wallace *et al.*, 2006) sus tallas varían entre 50 y 2000 μm e incluyen especies libres nadadoras, sésiles y algunas coloniales. El cuerpo de estos organismos es saquiforme, relativamente cilíndrico dividido en tres segmentos principales: una región anterior corta (cabeza), un tronco grueso que integra la mayor parte del cuerpo y un pie terminal (Ruttner-Kolisko, 1974; Wallace *et al.*, 2006; Segers, 2008). Se alimentan de diferentes especies de algas, y así pueden alterar a las especies dominantes de algas en un sistema acuático. A su vez, los rotíferos son fuente de alimento para microcrustáceos, larvas de insectos y peces; dado que son sensibles a cambios microambientales han sido usados como indicadores de la calidad del agua, y dado que también responden rápidamente a ciertos tipos de compuestos tóxicos (insecticidas y metales pesados), pueden ser usados como bioindicadores. En acuicultura se les ha empleado como alimento vivo para larvas de peces y crustáceos (como camarón y jaiba). Por ejemplo, organismos del género *Brachionus* son utilizados como alimento vivo en la producción de peces en Japón. Así, los rotíferos son utilizados en acuicultura, ecotoxicología, y estudios de comportamiento, particularmente en reconocimiento sexual y factores de atracción (Rico & Snell, 1996). El trabajo con este grupo de organismos impone problemas taxonómicos importantes dada la falta de claves de identificación, carencia de literatura sobre especies existentes en México, lo cual impone una fuerte dependencia de claves y material europeos. Estos problemas frecuentemente redundan en identificación taxonómica errónea, confusión en la identidad específica dado que pueden presentarse variaciones morfológicas inducidas por las condiciones ambientales. Estas variaciones se han asociado con algunos factores ambientales como la temperatura, características fisicoquímicas de los cuerpos de agua, así como la presencia de depredadores (Serranía, 1996). Las variaciones morfológicas inducidas por variaciones ambientales o plasticidad fenotípica son una propiedad que poseen algunos genotipos y que les permite responder diferencialmente ante estímulos ambientales específicos (Pigliucci *et al.*, 2006) la naturaleza de la respuesta va desde rasgos morfológicos, biología del desarrollo, fisiología, hasta el comportamiento (Tollrian, 2002), de esta manera la plasticidad fenotípica se convierte en un mecanismo fundamental para enfrentar a la heterogeneidad ambiental (Via *et al.*, 1995; Pigliucci, 2001). En los

rotíferos, la plasticidad fenotípica ha sido reconocida como una de las posibles causas del polimorfismo del grupo (Ge *et al.*, 2012), se ha manifestado en cambios en el tamaño de las espinas o de la lorica como respuesta a diversos factores fisicoquímicos tales como temperatura, abundancia del alimento, calidad del mismo, o bien debido a factores biológicos, ecológicos o demográficos como la competencia con cladóceros y depredación por invertebrados como copépodos o *Asplanchna* (Stemberger y Gilbert, 1984; Serra y Miracle, 1987; 1993; Nandini y Rao, 1998; Pavón-Meza *et al.*, 2007; Kennari *et al.*, 2008). Dado que la identificación taxonómica basada en caracteres fenotípicos enfrenta problemas de índole práctica y biológica evolutiva, desde hace tiempo, gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular y de la informática, se han aplicado diversas estrategias metodológicas que permiten definir límites entre organismos de distinta especie, posibilitan la aproximación a la historia evolutiva o filogenia a través de la obtención y análisis de secuencias de aminoácidos o nucleótidos de proteínas y ácidos nucleicos respectivamente. La obtención de secuencias del gen COI y su conversión a código de barras de especies de invertebrados ha sido ampliamente utilizada en el mundo, particularmente en México se ha utilizado para dilucidar diferencias específicas entre organismos de algunos grupos (Polychaeta, Branchiopoda, Ostracoda, Maxillopoda, Nematoda y rotífera) donde, a pesar de variaciones fenotípicas, habían sido reconocidos como de la misma especie (García-morales and Elías-Gutiérrez, 2013; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014). Por lo anterior, este trabajo se obtuvieron muestras de zooplancton de varios cuerpos de agua pertenecientes a la cuenca hidrología del Río Lerma (rio más largo del país donde de acuerdo con los estudios de rotíferos del Estado de México y del Distrito Federal se encuentran aproximadamente 250 especies de rotíferos, que representan el 77% de las especies reportadas en México) de donde se obtuvieron poblaciones monoclonales para obtener la secuencia de un fragmento específico de su genoma, incorporarlo a la base de datos del sistema Bold para transformarlo en un código de barras, reconociendo que la obtención de esta información y su sistematización es un elemento muy importante para el diseño e implementación de estrategias para la protección y conservación de la biodiversidad tanto a nivel local como global.

Objetivos

Generales:

- Obtener códigos de barras de la secuencia nucleotídica del gen mitocondrial COI (que codifica la subunidad I de la Citocromo Oxidasa) de 40 especies mexicanas del Phylum Rotifera a partir de ejemplares de poblaciones clonales que se cultivan en el laboratorio de Zoología Acuática de la FES Iztacala UNAM.
- Incorporar al Catálogo de Códigos de Barras del proyecto BOL las secuencias correspondientes a las especies de rotíferos mexicanos cultivados en el Laboratorio de Zoología Acuática.

Particulares:

- Determinar taxonómicamente a la especie de los rotíferos cultivados en el Laboratorio de Zoología Acuática mediante el análisis de estructuras diagnósticas (mástarx, pie, dedos, lórica y huevos de resistencia).
- Obtener microfotografías en el óptico de los organismos completos que serán integradas en la base de datos.
- Extraer ADN de especímenes pertenecientes a 40 especies de rotíferos Monogonontos del Estado de México y Distrito Federal.
- Amplificar y secuenciar un fragmento del gen COI del ADN mitocondrial de las especies cultivadas en el Laboratorio de Zoología Acuática.
- Incorporar cada secuencia al sistema BOLD para generar los códigos de barras.

2. Materiales y métodos

Desarrollo de cultivos monoclonales

En el laboratorio, con ayuda de un microscopio estereoscópico Nikon SMZ600, se aislaron hembras adultas. En todos los casos se aislaron 10 hembras adultas, el criterio empleado para distinguirlas fue siempre que presentaran un huevo amíctico en su útero. Cada una se colocó en un vaso de precipitado de 100 ml, con 50 ml de medio EPA, y una muestra de *Anuraeopsis fissa* (10 ind. ml⁻¹) como presa y *Chlorella vulgaris* (0.5 × 10⁶ células/ml¹) como alimento para las presas. Cada vaso fue considerado como un cultivo monoclonal por lo que en lo sucesivo se le denominará de esta forma o clon. Por cada cuerpo de agua se

iniciaron 10 cultivos monoclonales tratando de conservar la mayoría de ellos, sin embargo, en ninguno de los casos se pudo cumplir esa meta. Con algunas excepciones se lograron mantener al menos 3 cultivos monoclonales. Dependiendo del crecimiento poblacional de cada cultivo, al tercer o quinto día se realizó la identificación taxonómica empleando las claves especializadas de Koste (1978), Salt *et al.*, (1978), Nogrady *et al.* (1993) y Nogrady y Segers (2002). Finalmente, para evitar problemas de contaminación entre los cultivos monoclonales y entre las poblaciones los cultivos se mantuvieron en espacios separados y el material (mallas, pipetas, etc.) empleado en su mantenimiento fue exclusivo para cada uno de los cultivos.

Amplificación del gen mitocondrial COI por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los cultivos monoclonales de cada localidad se emplearon para los análisis moleculares. De cada monocultivo se extrajeron tantas hembras cómo fue posible, fueron aisladas y colocadas en inanición durante 12 h en medio EPA con la finalidad de vaciar su tracto digestivo, y así evitar la contaminación ya que algunas especies corresponden con depredadores y se alimentan de otros rotíferos.

Posteriormente, los individuos fueron colocados en tubos Eppendorf (1.5 ml) y fijados con etanol al 96% y en los casos cuando la extracción de DNA no fue inmediata, las muestras fueron mantenidas en congelación (-70°C) hasta que fueron utilizados.

La extracción de ADN se realizó colocando 10 individuos (o menos cuando fue necesario) en tubos para PCR con capacidad para 200 µl con 30 µl de una solución alcalina (NaOH 10 N con pH 11) donde se maceraron ligeramente. Posteriormente el tubo con los organismos macerados se llevó a 94 °C durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se transfirió inmediatamente a hielo y se le colocaron 30 µl de una solución de neutralización (Tris-HCl 1 M pH 7) y se almacenó a -20 °C.

La amplificación de COI se llevo a cabo usando los iniciadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) mediante los cuales se obtiene un fragmento de aproximadamente 680 pb. La reacción de PCR se realizó con Ampliqon® Taq DNA Polymerase Master Mix RED 1.1x (82.5 mM Tris-HCl pH 8.5, 22 mM (NH₄)₂SO₄ 1.65, 11% Tween 20®; 0.22 mM dNTPs; 0.11 unidades/µl Ampliqon Taq polimerasa; colorante inerte rojo y estabilizador) de que se colocó 45 µl con 0.5 µl de cada primer y 4 µl de ADN molde para tener un

volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30s de desnaturalización, 52°C por 30s para alineamiento, 72°C por 1 min para la extensión, a l terminar un paso de extensión final a 72°C por 5 min. Para la amplificación del fragmento COI se emplearon los primers HCO2198_t1 (5'CAGGAAACAGCTATGACTAA ACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3') y LCO1490_t1 (5'TGTA AAAACGAC GGCCAGTGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3') (Floyd; Folmer *et al.* 1994; Messing, 1983). El producto de la reacción fue separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con 0.5 µg/ml de Bromuro de Etidio y visualizados en trans iluminador de luz UV.

Purificación y Secuenciación de productos de PCR.

La purificación de los amplicones se realizó con el Kit para purificación de productos de PCR a partir de geles de Agarosa (Qiagen) o con el Kit de purificación de productos de banda única Exo-Sap (USB, invitrogen) atendiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La secuenciación se realizó utilizando el kit sequencing Big Dye (Applied Biosystems), agregando entre 150 y 200ng de ADN purificado para realizar la reacción de secuenciación. Posteriormente la reacción se purificó en columnas de sephadex G-50-80 (Sigma Aldrich), para eliminar los primers y nucleótidos no incorporados. A continuación, se liofilizó y resuspendió en Hi-Fi Formamida (Applied Biosystems). La reacción se realizó en un secuenciador de capilares (marca Applied Biosystem, modelo 3100 Genetic Analyzer), en la unidad de secuenciación de la UNAM-FES Iztacala.

Incorporación de datos al sistema Bold

Las secuencias obtenidas se revisaron y editaron usando el programa Chromas 1.45 para definir residuos indecisos. Las secuencias, las fotografías y electroferogramas (así como la información solicitada) fueron depositados en la base de datos del sistema usando los formatos definidos por el sistema Bold. Una vez depositadas las secuencias, cuando el sistema reportó codones de paró prematuros, las secuencias fueron reeditadas usando secuencias reportadas como referencia para decidir la existencia de indels que pudieran alterar los marcos de lectura y generar los codones de paro.

Análisis bioinformático

Las secuencias fueron recuperadas de la base de datos, alineadas con ClustalW v 1.7, editadas o rasuradas con Seaview 4.5.0 y usadas para determinar distancias genéticas y elaborar un dendograma con base en las distancias genéticas (Kimura 2P) y el algoritmo Neighbourjoining usando el programa Mega 6.

3. Resultados y discusión de resultados.

La información depositada en la base de datos Boldsystem corresponde con organismos que fueron colectados en 16 municipios distribuidos en siete estados de nuestro país (Cuadro 1). La información detallada respecto al nombre del sitio exacto y las coordenadas geográficas del sitio de colecta se encuentran depositadas en el sistema Bold dentro del proyecto “Rotifers of Mexico”. El Estado de México es el estado mejor representado, siete municipios, dada su cercanía geográfica. En el Distrito Federal el Lago de Xochimilco es un sitio bien representado dado que los canales que lo conforman constituyen un sistema acuático con condiciones fisicoquímicas variables y que por tanto podría servir como nicho de poblaciones sujetas a presiones de selección divergentes.

Estado	Municipio
Distrito Federal	Miguel Hidalgo Xochimilco
Guerrero	Iguala de la Independencia
Hidalgo	Huichapan Tecoautla
Estado de México	Aculco Jilotepec Texcaltitlán Texcoco Tianguistenco Toluca Zumpango
Morelos	Huitzilac Texcaltitlán
Queretaro	San Juan del Rio
Tabasco	Centro

Cuadro 1. Estados y municipios de la República Mexicana fuente de las muestras biológicas.

Los registros de este proyecto en el sistema bold corresponden con 29 especies distribuidas en 14 géneros de 8 familias del orden Monogononta (Figura 1 y Cuadro 2). La familia Asplachnidae y Brachionidae son las especies más representadas con 6 especies cada una. Vale la pena aclarar que esta diversidad específica no corresponde con la riqueza de especies de los sitios muestreados dado que en muchas ocasiones se aislaron hembras y se iniciaron cultivos sin embargo, no se logró su incremento y por tanto no se obtuvieron secuencias de nucleótidos del fragmento COI.

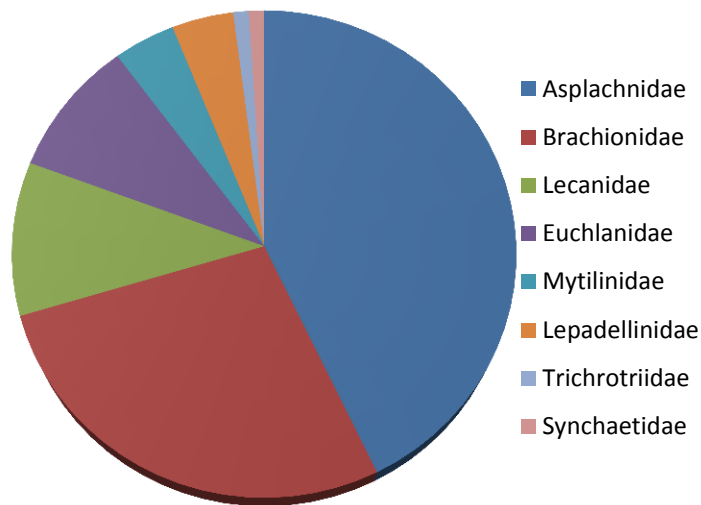


Figura 1. Representación relativa de las familias de rotíferos incluidas en los registros de Boldsystem del proyecto “Rotifers of Mexico”.

Finalmente se depositaron 82 secuencias del fragmento del gen que codifica la subunidad larga de la Citocromo Oxidasa, (83% de los registros), como ya se mencionó en algunas ocasiones el producto de la reacción de secuenciación careció de la suficiente calidad para arrojar resultados confiables por lo que no fueron depositadas en las bases de datos (Cuadro 3).

Familia	Género	Especie	
Asplanchnidae	Asplanchna	<i>A. brightwelli</i>	
		<i>A. girodi</i>	
		<i>A. multiceps</i>	
		<i>A. sieboldi</i>	
		<i>A. silvestrii</i>	
Brachionidae	Anuraeopsis	<i>A. fissa</i>	
		Brachionus	<i>B. bidentatus</i>
	<i>B. budapestanensis</i>		
	<i>B. calicyflorus</i>		
	<i>B. caudatus</i>		
	<i>B. plicatilis</i>		
	<i>B. rubens</i>		
	Epiphanes		<i>E. clavulata</i>
	Keratella		<i>K. americana</i>
		<i>K. cochlearis</i>	
Euchlanidae	Plationus	<i>P. patulus</i>	
	Platyias	<i>P. quadricornis</i>	
	Euchlanis	<i>E. dilatata</i>	
		<i>E. incisa</i>	
		<i>E. leontina</i>	
Lecanidae	Lecane	<i>L. bulla</i>	
		<i>L. cornuta</i>	
		<i>L. leontina</i>	
		<i>L. quadridentata</i>	
		<i>L. patella</i>	
Lepadellidae	Lepadella	<i>L. rhomboides</i>	
		<i>L. salpina</i>	
Mytilinidae	Lophocharis	<i>M. ventralis</i>	
	Mytilina	<i>P. dolichoptera</i>	
Synchaetidae	Polyarthra	<i>T. tetractis</i>	
Trichotriidae	Trichotria		

Cuadro2. Especies, géneros y familia de los organismos cultivados mediante poblaciones clonales registrados en la base de datos del proyecto “Rotifers of Mexico” de Boldsystem.

	Specimens (% complete)		Species (% complete)	
COI-5P	82 / 98	(83.7%)	23 / 30	(76.7%)
28S	6 / 98	(6.1%)	2 / 30	(6.7%)
16S	6 / 98	(6.1%)	2 / 30	(6.7%)

Cuadro 3. Secuencias depositadas en la base de datos Boldsystem correspondientes al proyecto “Rotifers of Mexico”.

Como se indica en materiales y métodos, antes de depositar las secuencias se revisaron los electroferogramas y los residuos indecisos fueron analizados y editados individualmente. Adicionalmente, aquellas secuencias que el sistema reportó con señales de paro prematuro fueron recuperadas y alineadas con múltiples secuencias reportadas para el grupo correspondiente de manera que los residuos que provocaban las señales de paro fueron revisadas y corregidas en la medida de lo posible. Mediante este proceso de edición manual se logró que el 100% de las secuencias tuviera una calidad elevada (Cuadro 4).

Sequence Quality Stats				
	High (<1% Ns)	Medium (<2% Ns)	Low (<4% Ns)	Unreliable (>4% Ns)
COI-5P	100	0	0	0
16S	100	0	0	0
28S	100	0	0	0

Trace Quality Stats					
	High(%)	Medium(%)	Low(%)	Failed(%)	Total
COI-5P	53.94	21.21	6.67	18.18	165

Cuadro 4. Calidad de las secuencias y de electroferogramas depositados en los registros del proyecto “Rotifers of Mexico” en la base de datos de Boldsystem. La evaluación se realizó con el algoritmo diseñado por ese sistema.

El sistema bold evaluó la calidad de los trazos y, como se indica en el Cuadro 4, 54% cumplió con los requisitos para ser considerado como de alta calidad, 2% con calidad intermedia, cerca del 7% con calidad baja y alrededor del 18% como sin la calidad suficiente. Sin embargo cabe mencionar que aún esos trazos permitieron obtener secuencias para realizar el análisis que se describe a continuación.

Familia Asplachnidae

Del total de las secuencias depositadas 22 corresponden con la especie *A. brighthwelli*. Estos organismos fueron colectados sistemáticamente en 5 localidades: Distrito Federal, Estado de México, Guerrero y estado de Tabasco. Las coordenadas geográficas y el nombre del sitio exacto de la colecta se presentan en el Cuadro 5.

Estado	Municipio	Sitio Exacto	Lat	Lon	Elev
Tabasco	Centro	Laguna de las Ilusiones, Villa Hermosa	18.0152	-92.93	55
Guerrero	Iguala de la Independencia	Presa Valerio Trujano	18.306	-99.457	800
Edo. de México	Texcaltitlán	Sultepec	18.879	-98.983	1330
	Zumpango	Laguna de Zumpango	19.782	-99.138	1200
Distrito Federal	Xochimilco	Antiguo Canal de Cuemanco	19.286	-99.102	2240

Cuadro 5. Ubicación geográfica precisa de los sitios donde se colectó *A. brighwelli*.

El análisis bioinformático de las secuencias de *A. Brighwelli* muestran que la distancia intraespecífica (0.047) supera el umbral del 3% asignado a los organismos que pertenecen a la misma especie, por lo tanto sugiere que en este grupo la selección divergente podría haber generado grupos que pertenecerían a especies biológicas distintas. Con estos datos se construyó una representación gráfica (Figura 2), en la cual se observa que esas secuencias forman cuatro grupos definidos 21 forman cuatro grupos, uno formado por secuencias provenientes de localidades del Estado de México (Zumpango y Texcaltitlán). En este grupo la distancia genética promedio de 0.021. Otro Grupo está formado por secuencias Iguala Guerrero y la distancia dentro de este grupo es 0.0012, el tercer grupo lo constituyen las secuencias de los organismos de tabasco, en este caso todos los genotipos corresponden al mismo haplotipo, finalmente el grupo integrado por secuencias de Xochimilco incluye una de Zumpango las cuales comparten el mismo haplotipo. Así, puede observarse que en todos los casos, la distancia genética es menor al umbral asignado empíricamente a los organismos que pertenecen a la misma especie. Los valores de distancia genética entre los grupos se presenta en el Cuadro 6, ahí se observa que algunas poblaciones muestran divergencia genética promedio que supera el umbral del 3%. Lo cual sugiere que el aislamiento geográfico y la selección divergente ha favorecido la adaptación a condiciones locales y probablemente estemos tratando con un grupo de especies biológicas en lugar de una especie cosmopolita. De esta manera el poder resolutivo del fragmento COI podría evidenciar divergencia poblacional en este grupo.

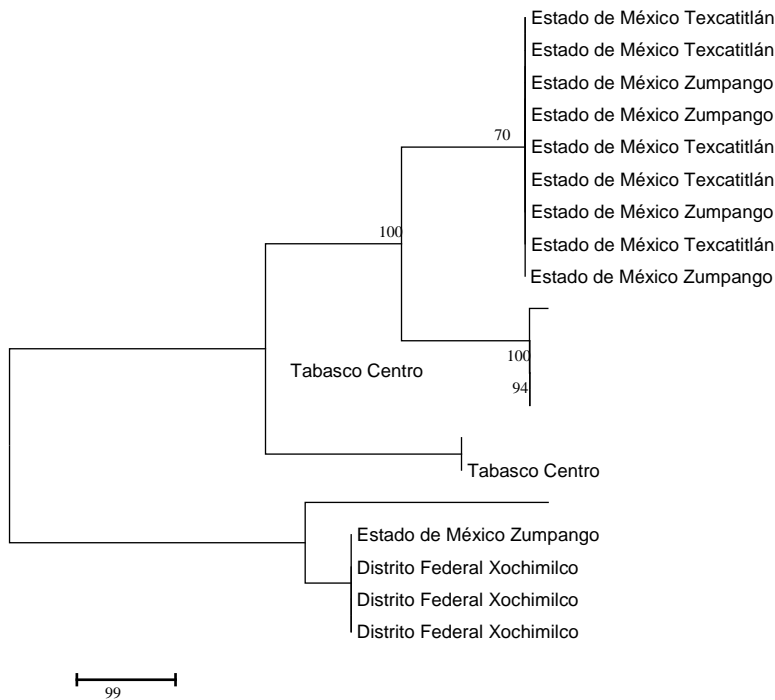


Figura 2. Dendrograma construido con la secuencia del Fragmento COI utilizando un Modelo de Distancia Genética (K2P).

Grupos	Zumpango Texcatitlán	Xochimilco Zumpango	Iguala
Xochimilco Zumpango	0.090953		
Iguala	0.026011	0.091896	
Tabasco	0.045075	0.084620	0.047812

Cuadro 6. Distancias genéticas (Kimura 2P) entre los grupos del dendrograma formado por las secuencias de *A. brighwelli*.

Los ejemplares de *A. girodi* incluidos en la base de datos fueron colectados en 6 localidades de nuestro país, el Cuadro 7 proporciona la información de sitio exacto las coordenadas geográficas correspondientes.

Estado	Localidad	Sitio Exacto	Lat	Lon	Ele
Querétaro	San Juan del Rio	Laguna	20.469	-100.013	2450
Edo.de México	Zumpango	Laguna de Zumpango	19.782	-99.138	1200
	Toluca	Nevado de Toluca	19.111	-99.758	4500
Distrito Federal	Xochimilco	Antiguo Canal Cuemanco	19.286	-99.102	2240
	Miguel Hidalgo	Antigua Refinería 18 de Marzo	19.47	-99.194	2240
Morelos	Huitzilac	Lagunas de Zempoala	19.05	-99.314	2600

Cuadro 7. Ubicación geográfica precisa de los sitios donde se colectó *A. girodi*.

El análisis bioinformático de las secuencias de *A. girodi* muestran que la distancia intraespecífica (0.029) no supera el umbral del 3% asignado empíricamente a los organismos que pertenecen a la misma especie, por lo tanto sugiere que los integrantes de este grupo pertenecen a la misma especie biológica. Con estos datos se construyó una representación gráfica (Figura 3), en la que, las secuencias provenientes de organismos de Toluca junto con una extraída de Xochimilco se separan del grupo, aun cuando la distancia promedio es menor al 3. Por lo que se calculó la distancia genética entre y dentro de los grupos, los resultados se muestran en el Cuadro 8 y 9. Esos datos muestran que las poblaciones de Xochimilco y de Toluca presentan divergencia genética que podría sugerir procesos de diversificación y probablemente de especiación (en particular la población del Nevado de Toluca). De comprobarse este fenómeno, el fragmento COI poseería la capacidad de evidenciar procesos de diversificación genética producto de procesos evolutivos durante periodos de tiempo relativamente recientes.

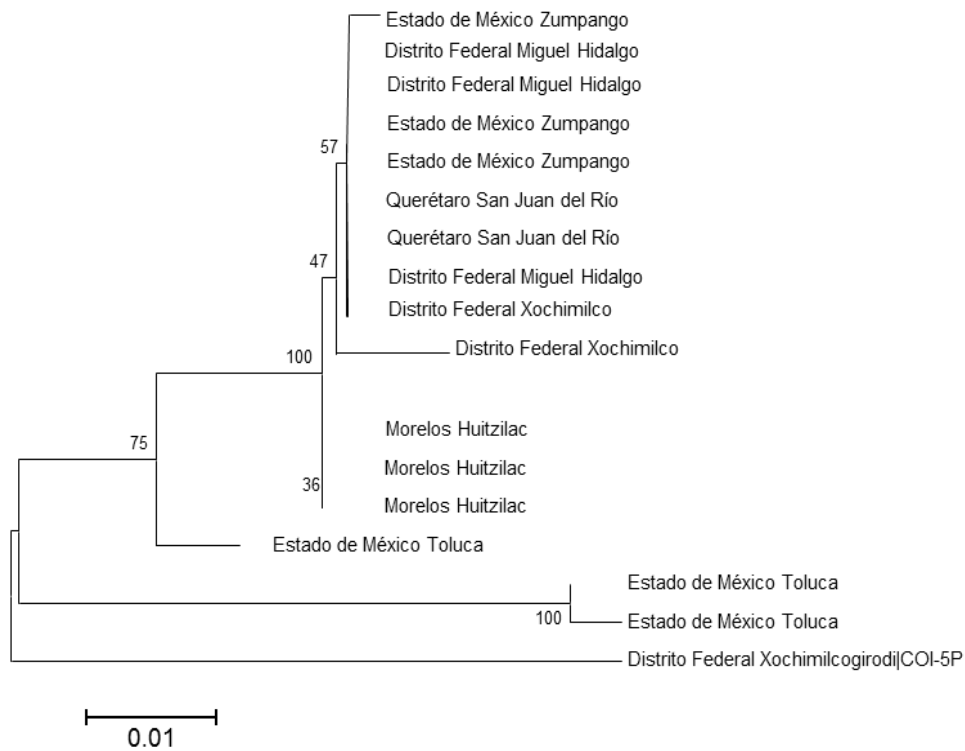


Figura 3 Dendrograma construido con la secuencia del Fragmento COI de *A. girodi* utilizando un Modelo de Distancia Genética (K2P).

	Zumpango	Xochimilco	Toluca1
Xochimilco	0.072815		
Toluca	0.070831	0.092350	
Toluca 2	0.021623	0.074858	0.051705

Cuadro 8. Distancia genética (K2P) entre los grupos de secuencias del dendrograma presentado en la Figura 3.

Población	Estado	Distancia Genética intrapoblacional promedio
Huitzilac	Morelos	0
Miguel Hidalgo	D.F.	0
Sn. Juan del Río	Querétaro	0
Zumpango	Edo. México	0.001282053
Xochimilco	Distrito Federal	0.053781165
Toluca	Edo. México	0.035754753

Cuadro 9. Distancias genéticas de las poblaciones de *A. girodi* incluidas en la base de datos del proyecto “Rotifers of Mexico” en Boldsystem.

Familia Brachionidae

La familia Brachionidae está representada en la colección por 27 registros, los cuales representan 5 géneros (*Keratella*, *Epiphanes*, *Brachionus* y *Aneuropsis*). La distancia genética entre los géneros se presenta en el siguiente cuadro 10. Los datos muestran que la distancia intergenérica oscila en el 30%. Esta divergencia genética coincide con los valores reportados para invertebrados.

	Plationus	Keratella	Epiphanes	Brachionus
Keratella	0.289766			
Epiphanes	0.324051	0.297309		
Brachionus	0.259258	0.294113	0.292039	
Anuraeopsis	0.225593	0.251666	0.272988	0.263880

Cuadro 10. Distancias genéticas entre los géneros de la Familia Brachionidae representados en la colección del proyecto “Rotifers of Mexico”.

Brachionus es el género mejor representado en este grupo, las secuencias que fueron depositadas corresponden con: *B. bidentatus*, *B. calyciflorus*, *B. caudatus*, *B. plicatilis* y *B. Rubens*. Con estas secuencias se calculó la divergencia intragenérica (o interespecífica), los resultados se muestran en el Cuadro 11. Estas especies poseen divergencia genética considerable, de manera que el análisis del fragmento COI puede establecer de manera inequívoca y con suficiente confiabilidad la naturaleza específica de organismos de este género.

	B. plationus	B. rubens	B. plicatilis
B. rubens	0.250245		
B. plicatilis	0.263625	0.241134	
B. caudatus	0.267046	0.228638	0.194975

Cuadro 11. Divergencia genética (K2P) interespecífica calculada con el fragmento COI de los especímenes del género *Brachionus*.

La especie *B. Rubens* provienen de dos localidades, el cuadro 12 muestra la ubicación geográfica precisa de los sitios donde fueron tomadas las muestras.

Estado	Localidad	Sitio	Lat	Lon	Ele
Distrito Federal	Xochimilco	Antiguo Canal de Cuemanco	19.272	-99.105	2240
Hidalgo	Huichapan	Bordo Rancho Dandho	20.411	-99.708	2080

Cuadro 12. Ubicación geográfica precisa de los sitios donde se colectó *B. rubens*.

El análisis bioinformático de las secuencias de *B. rubens* muestran que la distancia intraespecífica (0.044) es superiora al umbral del 3% asignado empíricamente a los organismos que pertenecen a la misma especie, por lo tanto sugiere que los integrantes de este grupo pertenecen a distinta especie biológica. Sin embargo vale la pena hacer notar que tres de las cuatro secuencias de esta especie corresponden a una población del estado de Hidalgo (Danho) y solo una fue obtenida de Xochimilco. De esta manera las interpretaciones evolutivas deben tomarse con precaución y, en todo caso, proponer un análisis basado en el fragmento COI pero con una muestra más numeroso e incluso considerando organismos de distintas épocas del año.

Género	Divergencia intraespecífica
B. plationus	n/c
B. rubens	0.044578763
B. plicatilis	0.003851732
B. caudatus	0.154205248

Cuadro 13. Distancia genética (K2P) dentro de las especies del género *Brachionus* incorporadas en los registros del proyecto “Rotifers of Mexico”

La especie *B. caudatus* provienen de dos localidades, el cuadro 14 muestra la ubicación geográfica precisa de los sitios donde fueron tomadas las muestras.

Estado	Localidad	Sito exacto	Lat	Long	Ele
Distrito Federal	Xochimilco	Antiguo Canal de Cuemanco	19.2724	-99.1053	2240
Mexico State	Aculco	Aculco de Espinoza	20.1244	-99.8819	2450

Cuadro 14. Ubicación geográfica precisa de los sitios donde se colectó *B. Rubens*.

El análisis de estas secuencias evidencia que la distancia genética dentro del grupo es elevada (Cuadro 12) y supera el umbral para miembros de la misma especie (0.15). Esta observación, permitiría considerar que se trata de un complejo de especies más que una especie con amplia distribución. Sin embargo el número de organismos secuenciados obliga, como en el caso anterior, a tomar estas sugerencias con cuidado e invita a realizar un análisis que considere muestreos sistemáticos.

La secuencias de *B. plicatilis* fueron colectadas en dos sitios el cuadro 15 muestra la ubicación precisa de los sitios donde fueron colectadas las muestras.

Estado	Localidad	Sito exacto	Lat	Lon	Ele
Mexico State	Jilotepec	Ejido Jilotepec	19.903	-99.614	2600
Distrito Federal	Xochimilco	Antiguo Canal de Cuemanco	19.2724	-99.1053	2240

Cuadro 15. Ubicación geográfica precisa de los sitios donde se colectó *B. plicatilis*.

El análisis bioinformático de estas secuencias indica que la divergencia genética de estas especies es menor al 3% y por tanto sugiere que pertenecen a la misma especie.

Las secuencias de *B. caliciflorus* fueron obtenidas de organismos colectados en el Distrito Federal en el Lago de Xochimilco (19.272 y -99.105 latitud y longitud respectivamente). Las tres muestras corresponden al mismo haplotipo, es decir la distancia genética es igual a cero.

Las otras especies del genero *Brachionus* están representadas por solamente una o dos secuencias por lo tanto las inferencias respecto a la utilidad taxonómica y evolutiva del fragmento COI son limitadas.

Familia Lecanidae

Esta familia está representada en la colección de este proyecto por 19 secuencias que corresponden a 5 especies. Entre ellas las mejor representadas es *L. bulla* y *L. cornuta* con tres secuencias cada una. El análisis de la distancia genética promedio es 0.22 y 0.15 lo cual rebasa al umbral para organismos de la misma especie. Este resultado sugiere un análisis de el fragmento COI de organismos muestreados de poblaciones aisladas para establecer si a esa divergencia genética subyace diferenciación específica.

4. Conclusiones.

El fragmento del gen COI mostró capacidad de resolución mayor que los fragmentos de los genes ribosomales 16S y 18S, inclusive es capaz de evidenciar divergencia genética entre poblaciones aisladas de distintas especies de rotíferos. La Divergencia genética interpoblacional puede ser resultado de procesos de adaptación a ambientes divergentes o a diferencias en la composición genética de la población colonizadora. De cualquier manera, el análisis del fragmento COI no solo resuelve problemas taxonómicos a nivel de especie sino que además evidencia problemas de índole biológica que conducen a preguntas ecológicas e incluso fisiológicas.

Con la finalidad de responder a las preguntas formuladas, es importante considerar que el número de especímenes analizados debe ser mayor a 3 y que los organismos deben provenir de poblaciones con condiciones contrastantes.

5. Bibliografía

Ge YL, Xi YL, Ma J, Xu DD. 2012. rDNA ITS sequences among morphotypes of *Keratella cochlearis*, *Keratella quadrata* and *Brachionus forficula* (Rotifera). *Genetics and Molecular Research*. 11(1): 765-774.

Gutiérrez-Aguirre M.A., Cervantes-Martínez A., Elías-Gutiérrez M. (2014). An example of how barcodes can clarify cryptic species: the case of the calanoid copepod *Mastigodiptomus albuquerquensis* (Herrick). *Plos One*, 9(1): 1-11.

Gutiérrez-Morales A.E. and Elías-Gutiérrez E. (2013) DNA barcoding of Freshwater in Mexico: Evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Mol. Ecol. Resour.* 13(6):1097-20107.

Kennari AA, Ahmadifard N, Kapourchali MF, Seyfabadi J. 2008. Effect of two microalgae concentrations on body size and egg size of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Biologia*. 63/3: 407-411.

Nandini S, Rao TR. 1998. Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquatic Ecology* 31: 283-298.

Pavón-Meza EL, Sarma SSS, Nandini S. 2007. Combined effects of temperature, food (*Chlorella vulgaris*) concentration and predation (*Asplanchna girodi*) on the morphology of *Brachionus havanaensis* (Rotifera). *Hydrobiologia*. 593: 95-101.

Pigliucci M. 2001. *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J. Exp. Biol.* 209: 2362-2367.

Rico-Martinez R, Dingmann B, Snell TW. 1998. Mating behavior of eight rotifer species. *Hydrobiologia*. 356: 165-173.

Ruttner-Kolisko A. 1974. Plankton Rotifers Biology and taxonomy. *Die Binnengewässer*, XXVI/1 supp.

Segers H. 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*. 595: 49-59.

Serra M, Miracle MR. 1987. Biometric variation in three strains of *Brachionus plicatilis* as a direct response to abiotic variables. *Hydrobiologia*. 147: 83-89.

Serranía Soto C. 2006. Diversidad de rotíferos monogonontos de la parte central de México. Tesis de Maestría, UNAM.

Stemberger RS, Gilbert JJ. 1984. Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis*:

induction by cyclopoid copepods and *Asplanchna*. *Freshwater Biol.* 14: 639-647.

Stemberger RS, Gilbert JJ. 1987. Defenses of planktonic rotifers against predators. In Kerfoot WC, Sih A. (Eds.) *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. University Press of New England, Hanover.

Tollrian R. 2002. Phenotypic plasticity: Beyond nature and nurture. *Nature*. 416: 584-585.
Wallace RL, Snell WT, Nogrady T. 2006. *Rotifera Biology, Ecology and Systematics*. SPB. Academic Publishing.

Via S, Gomulkiewicz R, De Jong G, Scheiner SM, Schlichting CD, Van Tienderen PH. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology and Evolution*. 10: 212-217.

Wallace RL, Snell WT, Nogrady T. 2006. *Rotifera Biology, Ecology and Systematics*. SPB. Academic Publishing.