

Informe final* del Proyecto HE009
Códigos de barras de la vida en peces y zooplancton de México

Responsable: Dr. Manuel Elías Gutiérrez
Institución: El Colegio de la Frontera Sur
Unidad Chetumal
Dirección: Av Centenario km 5.5, Chetumal, Qroo, 77900 , México
Correo electrónico: melias@ecosur.mx
Teléfono, fax Tel: 01 983 835 0440 ext. 4313
Fecha de inicio: Marzo 31, 2009
Fecha de término: Marzo 25, 2014
Principales resultados: Base de datos, Código de barras, fotografías, Informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Elías Gutiérrez, M. 2013. Códigos de barras de la vida en peces y zooplancton de México. El Colegio de la Frontera Sur. Unidad Chetumal. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. HE009.** México D.F.
Resumen:

Recientemente Hebert et al. (2003), propuso que un fragmento de un gen estandarizado, constituido por aproximadamente 640 pares de bases del DNA mitocondrial, y codifica para la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria, es distinto y único en cada especie animal de nuestro planeta (llamado COI o más coloquialmente códigos de barras, barcodes en inglés), por lo que puede utilizarse como un marcador universal para el reconocimiento de las especies.

A partir de esta propuesta se ensambló el proyecto iBOL (International Barcode Of Life, por sus siglas en inglés), el cual es una excelente oportunidad para apresurar el entendimiento de la biodiversidad a nivel mundial. Considerando el acelerado deterioro de los ecosistemas y la cantidad de especies que se encuentran en peligro de extinción, la necesidad de conocer a las especies y su descripción representa una tarea prioritaria, antes de que desaparezcan. Además, la posibilidad de conocer estas especies facilita la labor de conservación y puede permitir que se desarrollen instrumentos valiosos de decisión entre el público en general, administradores de la gestión ambiental y agencias gubernamentales, cuyas responsabilidades involucran el monitoreo de plagas, especies invasivas, seguridad alimentaria y otros aspectos relacionados.

En el caso de México, surge MEXBOL, el cual a su vez se integra dentro de la iniciativa internacional (iBOL) a la que se han amalgamado la Comunidad Europea, Estados Unidos, Canadá, China, Australia y muchos otros países. La participación de México es vital, debido a su megabiodiversidad, su desarrollo en taxonomía y sistemática, y por la importancia de poder realizar una caracterización más específica de la biodiversidad que en nuestro país existe. Como parte de este proyecto, ya se tiene en funcionamiento la campaña para realizar los códigos de barras de los peces del mundo (FISH BOL, www.fishbol.org), en el cual Martha Valdez, Lourdes Vásquez ya se encuentran involucradas. De hecho Martha Valdez es Vice-chair para Centroamérica de esta campaña. Los grupos participantes deberán de recibir la tercera parte del apoyo financiero (50 millones USD en los 5 años del proyecto) para actividades de colecta y curatoriales de los ejemplares de respaldo, que se generarán en la ejecución del proyecto.

Este proyecto es entonces para México una oportunidad de dar un paso importante en la complementación de sus inventarios bióticos, además de proporcionar un valor agregado a las colecciones biológicas que actualmente se tienen, al generar los códigos de barras de las especies que en ellas se encuentran. Este proyecto identificará las colecciones científicas más importantes y activas de México para reforzar su acervo y condiciones de mantenimiento. Afortunadamente, en el caso de México, Manuel Elías Gutiérrez y Martha Valdez Moreno se integraron en el proyecto iBOL desde su concepción inicial en el año 2005, y ya cuentan con avances, pues se han realizado las

secuencias de unos 2000 ejemplares de peces (incluyendo etapas larvales y adultos) y 500 de microinvertebrados, lo cual representa 170 especies de peces y 100 del zooplancton en diversos sistemas acuáticos a lo largo y ancho del país. De hecho, ya realizaron la primera descripción de una nueva especie de cladóceros, con base a nuevos estándares que incluyen la secuencia del CO1 y una descripción morfológica detallada (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno 2008).

Este proyecto se enmarca en el contexto de la iniciativa mexicana para los códigos de barras.

- * 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 Técnico Final Actualizado del Proyecto HE009

“Códigos de Barras de la Vida en Peces y Zooplancton de México”

Participantes:

Manuel Elías Gutiérrez (Responsable)

Martha E. Valdez Moreno (Corresponsable)

Institución: El Colegio de la Frontera Sur

Julio 2013

Tabla de contenido

Introducción	3
Objetivos	7
Objetivos particulares	7
Metodología	8
Resultados	12
Publicaciones generadas a partir de los materiales procesadas en este proyecto.....	14
Publicaciones en proceso de elaboración.....	15
Premios	15
Tesis elaboradas con material de este proyecto	15
Premios a tesis.....	16
Problemáticas encontradas durante los muestreos y desarrollo del trabajo.....	17
Análisis General de los Resultados.....	19
Peces.....	19
Zooplancton	19
Análisis de los resultados del zooplancton	32
Rotíferos.....	33
Diversidad críptica	36
Cladocera	37
Copepoda	44
Ostracoda	47
Peces.....	49
Conclusiones Generales	55
Sobretiros de los artículos publicados.....	56
Tesis Finalizadas	144
Premios	468
Protocolos no públicos.....	471
Árbol de identificación de rotíferos	474
Árbol de identificación de cladóceros.....	481
Árbol de identificación de copépodos.....	489
Árbol de identificación de ostrácodos.....	494
Árbol de identificación de peces.....	497
Literatura citada	536

Introducción

Este proyecto se sometió con base a que es bien conocido que México es un país megabiódico. Aunque es el 14° en tamaño, es el 5° en biodiversidad a nivel mundial. Parte de su riqueza en biodiversidad se debe al alto grado de endemismo que poseemos en muchos grupos biológicos.

Por ejemplo, en un área comparativamente pequeña como es nuestro país, se presentan 2700 especies de peces marinos y de agua dulce *versus* 3000 que existen en los Estados Unidos y Canadá en conjunto. El dato se vuelve aún más interesante si comparamos los litorales, pues solamente Canadá tiene aproximadamente 300.000 kms y México cuenta con 10.000 kms

Por estas razones, el análisis de la biodiversidad en esta región representa un enorme reto y el descubrimiento de nuevas especies es notable. Solamente de peces, se han descrito en los últimos cinco años 14 nuevas especies para la ciencia, incluida una familia de bagres que habitan en la selva Lacandona, los Lacantunidae. Si nos enfocamos a los microinvertebrados de vida libre o parásitos, el número se multiplica. Por ejemplo, sólo en el caso de cladóceros y copépodos dulceacuícolas, que cuentan con menos de cinco especialistas dedicados a su estudio en México, se han descrito 35 nuevas especies de la segunda mitad de la década de los 90's a la actualidad, incluidos varios géneros (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno 2008; Elías-Gutiérrez et al. 2008b; Quiroz-Vazquez & Elías-Gutiérrez 2009). Este proyecto se constituyó en un avance notable en el conocimiento del zooplancton de aguas dulces y peces de México, pues se realizó la secuencia de un gen mitocondrial del ADN, conocido como códigos de barras y se depositaron los ejemplares en colecciones científicas de referencia para constatar las identificaciones realizadas. Estos códigos de barras se han convertido en una referencia a nivel mundial para el reconocimiento de las especies trabajadas.

Antecedentes

El punto de partida para la realización de este proyecto se puede ubicar con el trabajo de (Hebert et al. 2003a), quien propuso que un fragmento de un gen estandarizado, constituido por aproximadamente 640 pares de bases del DNA mitocondrial, y que codifica para la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria, es distinto y único en cada especie animal de nuestro planeta (llamado *COI* o más coloquialmente códigos de barras, barcodes en inglés), por lo que puede utilizarse como un marcador universal para el reconocimiento de las especies.

A partir de esta propuesta se ensambló el proyecto iBOL (International Barcode Of Life, por sus siglas en Inglés), el cual ha sido una excelente oportunidad para apresurar el entendimiento de la biodiversidad a nivel mundial. Considerando el acelerado deterioro de los ecosistemas y la cantidad de especies que se encuentran en peligro de extinción, la necesidad de conocer a las especies y su descripción representa una tarea prioritaria, antes de que desaparezcan. Además, la posibilidad de conocer estas especies facilita la labor de conservación y puede permitir que se desarrollen instrumentos valiosos de decisión entre el público en general, administradores de la gestión ambiental y agencias gubernamentales, cuyas responsabilidades involucran el monitoreo de plagas, especies invasivas, seguridad alimentaria y otros aspectos relacionados.

En el caso de México, surge MEXBOL, el cual a su vez se integra dentro de la iniciativa internacional (iBOL) a la que se han amalgamado la Comunidad Europea, Estados Unidos, Canadá, China, Australia y muchos otros países. La participación de México es vital, debido a su megabiodiversidad, su desarrollo en taxonomía y sistemática, y por la importancia de poder realizar una caracterización más específica de la biodiversidad que en nuestro país existe. Como parte de este proyecto, ya se tiene en funcionamiento la campaña para realizar los códigos de barras de los peces del mundo (FISH BOL, www.fishbol.org), en el cual Martha Valdez y Lourdes Vásquez ya se encuentran involucrados. De hecho Martha Valdez es Vice-chair para Centroamérica de esta campaña. Cabe señalar que en Junio del 2012, Martha Valdez presentó, en el marco de la Expo Mundial, celebrado en la ciudad de Yeosu, Corea los avances que se han dado en 7 años de FishBol en México, y el resultado ha sorprendido a todos los participantes, debido a lo limitado de los recursos que se han otorgado en este país a la campaña de peces, en comparación con otros como Corea, Alemania, Brasil, etc.

El proyecto iBOL también destaca la importancia de las colecciones científicas que se generarán o secuenciarán durante la ejecución del proyecto. Este proyecto es entonces para México una oportunidad de dar un paso importante en la complementación de sus inventarios bióticos, además de proporcionar un valor agregado a las colecciones biológicas que actualmente se tienen, al generar los códigos de barras de las especies que en ellas se encuentran. Este proyecto identificará las colecciones científicas más importantes y activas de México para reforzar su acervo y condiciones de mantenimiento.

Antes del inicio de este proyecto, los avances existentes se remontan al año 2005-2006. De entonces hasta antes de que iniciara este proyecto se tenían secuencias de unos 2000 ejemplares de peces (incluyendo etapas larvales y adultos), con los cuales se realizó la primera publicación para los peces de aguas dulces tropicales y subtropicales del continente americano y se demostró su utilidad para más de un 90% de las especies trabajadas así como las limitaciones que existen para las familias con rápidos procesos de especiación como son Atherinidae y Characidae (Valdez-Moreno et al. 2007). A partir de este trabajo pionero, se han realizado un gran número de publicaciones a nivel mundial, pues el tema ha sido de gran interés a nivel global, y han ido desde demostrar la utilidad de códigos de barras (Pereira et al. 2010), descripción de especies (Victor 2007) hasta la confirmación de registros en peces exóticos (Vasquez-Yeomans et al. 2011). Cabe señalar que los ejemplos presentados en este momento se limitan a regiones relacionadas con las áreas propuestas en este proyecto, pero la literatura sobre códigos de barras y peces es sumamente vasta en la actualidad, pues ya se ha secuenciado aproximadamente una cuarta parte de las especies conocidas (Becker et al. 2010).

En el caso de los 500 microinvertebrados que se tenían hasta ese momento, también se demostró por primera vez a nivel mundial, la utilidad de los códigos de barras para la determinación de 61 especies de cladocera y 21 de copepoda, de estos últimos principalmente del grupo de calanoideos (Elías-Gutiérrez et al. 2008a). En esta última publicación, se demostró primeramente que la mayoría de las especies. De hecho, ya realizaron las primeras descripciones de una nueva especie de dos cladóceros, con base a nuevos estándares que incluyen la secuencia del CO1 y una descripción morfológica detallada (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno 2008).

En México se ha despertado gran interés en trabajar con este marcador, lo cual se refleja en las contribuciones recientes, entre las que destacan un volumen especial en Mitochondrial DNA y una serie de estudios recientes con diferentes grupos de organismos, entre los que se pueden señalar parásitos y sanguijuelas, donde incluso han ayudado en el registro de nuevas especies (Leon-Regagnon 2010; Ocegüera-Figueroa et al. 2010; Martínez-Salazar & Leon-Regagnon 2010; García-Varela et al. 2011), en revisiones de poliquetos, donde han formado parte de la evidencia para la descripción de nuevas especies (Carrera-Parra & Salazar-Vallejo 2011; Tovar-Hernández & Carrera-Parra 2011), insectos, donde se han encontrado ampliaciones de ámbito y

también posible evidencia de nuevas especies, además por primera vez se logró establecer a nivel de especie etapas larvales de mariposas (Zaldivar-Riveron et al. 2010; Escalante et al. 2010; Prado et al. 2011), mamíferos donde permitieron distinguir dos especies muy similares de zarigüeyas (Cervantes et al. 2010). En el caso de plantas se han presentado resultados dispares, donde algunos grupos como las cícadas no son separados con efectividad (Nicolalde-Morejon et al. 2011), mientras en los aguacates aparentemente funcionan bien (Engstrand et al. 2010). Esta lista no es de ninguna manera exhaustiva y solo sirve para señalar la importancia que han ido cobrando los códigos de barras en el reconocimiento de la biodiversidad de nuestro país.

En cuanto al interés que a nivel mundial existe sobre este tema, se refleja no solamente en el megaproyecto iBOL, sino también a través de numerosas contribuciones individuales, de tal forma que una simple búsqueda en el Web of Knowledge, incluyendo las palabras barcod* and DNA arroja 2242 hits (consultado el 5 de julio del 2012) y si se agrupan por años, se observa un incremento de 450 en el 2010 a 537, mientras en 2012 van 263 publicaciones. Existen revistas que han abierto secciones especiales para los códigos de barras, como Molecular Ecology Resources o Mitochondrial DNA, por lo que podemos señalar que este tema es de actualidad y las aportaciones realizadas han sido sumamente significativas como se verá más adelante.

Objetivos

Al ser México el 5° país con mayor biodiversidad a nivel mundial, es una cuestión de seguridad nacional y soberanía el obtener un reconocimiento sistemático y preciso de ésta, por lo que el presente trabajo tuvo por objetivo generar una base con los códigos de barras de al menos 4000 especímenes (aproximadamente 400 especies) de peces marinos y dulceacuícolas, que incluyan aquellas de valor económico, y en lo posible sus etapas larvales, así como 1500 especímenes de microinvertebrados dulceacuícolas (150 especies de cladóceros y copépodos principalmente), siguiendo los estándares propuestos por iBOL y que actualmente se encuentran disponibles en el sitio Barcode of Life Database (BOLD, www.bolsystems.org)

Objetivos particulares

- 1.- Realizar la recolecta de material fresco, tanto de peces como invertebrados, necesarios para obtener sus secuencias.
- 2.- Realizar la labor curatorial y el alojamiento de los ejemplares en las colecciones respectivas de El Colegio de la Frontera Sur.
- 3.- Obtener el DNA genómico de los ejemplares, y realizar el alojamiento del mismo en El Colegio de la Frontera Sur de manera permanente.
- 4.- Realizar el PCR (Polymerase Chain Reaction) con el DNA genómico obtenido, con la finalidad de secuenciar el gen mitocondrial CO1
- 5.- Realizar el llenado de la base de datos, así como la toma de fotografías, de acuerdo a los lineamientos de BOLD.
- 6.- En el caso de nuevas especies, o problemas taxonómicos, priorizar e iniciar el proceso de descripción de los mismos.

Metodología

Este proyecto se ubicó como parte del marco de MEXBOL, el cual fue apoyado por el CONACYT para su financiamiento, y a su vez existir un compromiso institucional por parte de ECOSUR, no se solicitó apoyo económico para realizar recolectas de material y fue muy limitado lo que se solicitó para reactivos, a pesar de que se tuvieron que realizar miles de ensayos, como se verá más adelante.

Al tratarse de un proyecto de inventario generalizado para todas las especies, el ámbito geográfico incluyó todo el país y parte de Centro América, pero se enfocó con más énfasis al sureste y noreste, incluyendo las regiones hidrológicas marinas y dulceacuícolas prioritarias y fuera de las mismas, pues permitirá identificar o corroborar los vacíos y omisiones propuestos (CONABIO et al. 2007) y no propuestos o en elaboración.

En el caso de los peces, se recolectaron con métodos no invasivos como chinchorros, atarrayas, redes agalleras, etc. Debido al enorme interés que ha suscitado el proyecto Fish BOL en el caso de especies sometidas a explotación comercial, se realizaron muestreos de especies comerciales en los puertos de arribo pesquero de la península de Yucatán (Ciudad del Carmen, Campeche, Progreso e Isla Mujeres). También se tomaron muestras del centro de acopio más grande del país, el mercado de La Viga, localizado en el Distrito Federal. Para el caso de larvas, se cuenta con un cofinanciamiento de la NOAA, en colaboración con Lourdes Vasquez Yeomans. Los muestreos se realizaron ya en la porción del Caribe Mexicano y se cuenta con apoyo económico para la separación del material. Las muestras procesadas se incluirán en este proyecto y se plantea emparejar las etapas larvales e inmaduras con las adultas, lo cual dará una panorámica más completa de la biología de especies comerciales y no comerciales. También se aprovechó la base de datos generada y la metodología señalada para reconocer las larvas y juveniles de las principales especies depredadas por el pez león, un exótico invasor, que se ha vuelto un problema de gran magnitud en el Arrecife Mesoamericano. Finalmente también se tomaron muestras de las especies utilizadas en pesca deportiva, en torneos de Isla Mujeres, Cozumel y Mahahual para lo cual se estableció contacto con los organizadores de los principales Torneos de Pesca de la península de Yucatán. Cabe señalar la gran cooperación que siempre tuvieron para la obtención de este material. En el caso de material de importancia económica y especies deportivas, no se almacenaron vouchers en la colección, debido a las limitaciones impuestas por el tamaño y peso

de los ejemplares, lo que imposibilita su almacenamiento, pero se realizó un proceso fotográfico detallado para fines de documentación.

Finalmente, en el caso del zooplancton, se realizaron muestreos en los mismos cuerpos de agua que para los peces, además de sistemas temporales, con una cobertura geográfica similar a la indicada (ver sistematización geográfica). Cabe señalar que debido a la creciente inseguridad en el norte del país se tuvieron que suspender los muestreos en estas regiones de nuestro país. Sin embargo se realizó un muestreo extensivo en el centro y sureste del país, por lo que el material que se obtuvo se incluyó en este informe.

Los muestreos se realizaron por medio de arrastres verticales, horizontales y litorales en cada cuerpo de agua. Existieron variantes en la metodología en algunos detalles de la fijación y procesamiento de las muestras que no se incluirán en este informe, debido a que la comunicación científica con las mismas se encuentra en elaboración. En términos generales, el material fue fijado en etanol sin desnaturalizar al 95% para la extracción del DNA genómico, el cual se realizó de la siguiente manera:

La metodología utilizada ha sido ampliamente descrita en diversas fuentes (Hajibabaei et al. 2006; Ivanova et al. 2006) y los protocolos detallados se encuentran disponibles en el sitio web <http://www.ccdb.ca/page/research/protocols>. A continuación se da un resumen de los principales protocolos a estandarizar para obtener la secuenciación del gen mitocondrial CO1, objeto de este megaproyecto.

Se obtuvieron pequeñas piezas de tejido (1-3 mm³) del espécimen, el cual previamente fue identificado con los métodos tradicionales. En el caso de vertebrados, como los peces, fue tejido muscular, o en microcrustáceos y rotíferos se empleó todo el organismo en aquellos especímenes menores a 0.5 mm. En el caso de hembras con huevos o especímenes mayores (<0.5 mm) se tomaron uno o varios huevos y/o un pedazo de tejido muscular por debajo de la cutícula, conservando los apéndices torácicos y el abdomen como vouchers, que son los que presentan los caracteres taxonómicos. La pieza de tejido, en el caso de los peces se almacenó en cajas Matrix® con etanol al 95-100% en un ultracongelador a -70 °C como mínimo.

Para evitar contaminación cada vez que se utilizaron los instrumentos se esterilizaron con una flama de un mechero. Posteriormente se tomó una submuestra del tejido, no mayor a 1 mm³ y se depositó en cajas Eppendorf® de 96 celdas. El resto del espécimen se almacenó en la colección biológica como referencia.

En el caso de los microcurstáceos y rotíferos la variante fue que se colocaron en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml y se trituraron. El proceso de extracción se realizó, en términos generales (los detalles del protocolo también se encuentran en proceso de publicación) de acuerdo a la metodología propuesta y conocida popularmente como Hotshot (Montero-Pau et al. 2008). Este protocolo difiere totalmente del inicialmente propuesto en placas de fibra de vidrio y que es el que se utilizó para peces, como se describirá más adelante. En el caso de que se haya tenido que destruir el organismo completo, se conservaron integrantes de la misma población como referencia en las colecciones biológicas. Siempre que fue posible se incluyeron en el proceso cinco especímenes de cada especie.

Antes de pasar al proceso de extracción del DNA y amplificación, se subieron a la base de datos del Barcode of Life Data System (Ratnasingham & Hebert 2007) los datos correspondientes del espécimen, entre los que se destacan el número de acceso en la colección, taxonomía y localidad de colecta georreferenciada, así como una fotografía de alta resolución.

En términos generales, para los vertebrados, el proceso para extraer el DNA se inició agregando buffer de lisis para vertebrados con proteinasa K, dejándolo digerir durante una noche a 56°C. Posteriormente el DNA genómico se extrajo por el método de membranas de fibra de vidrio (Ivanova *et al.* 2006), utilizando un robot para el manejo de microfluidos Biomek NX®, utilizando placas de filtros AcroPrep 91 de 1 ml con medio de fibra de vidrio PALL de 1.0 µm (vertebrados) o 3.0 µm (invertebrados).

Para la amplificación del DNA se utilizará la técnica del PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para cada muestra se mezclarán 6.25 µl de estabilizador, 2 µl de agua pura, 1.25 µl de 10X PCR buffer, 0.625 µl de MgCl₂, 0.0625 µl de dNTPs, 0.0625 µl de polimerasa taq y 0.125 µl de los primer seleccionados.

Los primers que se utilizaron para peces fueron los desarrollados para este proyecto en general y que han dado un porcentaje de éxito cercano al 90% (Ivanova et al. 2007). En el caso de los rotíferos se utilizaron los generales para invertebrados (Folmer et al. 1994) y en el caso de los microcrustáceos se utilizaron unos específicamente diseñados y denominados ZplankF1-t1 y ZplankR1_t1. Las secuencias detalladas de éstos últimos se encuentran en proceso de publicación, por lo que no pueden ser incluidas en este informe.

A esta mezcla se le adicionaron 2 µl de DNA de cada muestra. Se centrifugó por 10 seg a 1000 revoluciones y se colocó en un Termociclador Mastercycler Eppendorf. El régimen termal general consistió en un primer paso de 2 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 0.5 min a 94°C, 0.5 min a 54°C y 1 min a 72°C seguido de un ciclo de 10 min a 72°C y finalmente se mantuvo la placa a 4°C, pero existieron algunas variantes, de acuerdo al grupo trabajado (Ivanova, com. pers.)

Los productos del PCR fueron revelados en geles de agarosa directamente, en el caso de los ensayos, sobre todo con microcrustáceos y rotíferos y una vez estandarizadas las técnicas se utilizaron placas preparadas (E-gel 96 System de Invitrogen, Carlsbad), aplicando una corriente por 6 minutos y los productos que más intensos fueron secuenciados bidireccionalmente.

Este último paso se realizó en Guelph. El proceso implicó lo siguiente: para cada muestra se utilizó la siguiente mezcla de sustancias: 1.875 µl de 5XSEQ buffer, 0.25 µl de Big Dye, 0.875 µl de agua ultrapurificada, 5 µl de estabilizador al 10%, 1 µl de la pareja de primers óptima, para llevar a cabo una lectura bidireccional, y finalmente de 1.5 a 2 µl de DNA amplificado.

Antes de someter el producto obtenido para la secuenciación, se realizó una limpieza por medio de un protocolo de precipitación en etanol y cama magnética, utilizando un robot de microfluidos Biomek FXP®.

Para leer las secuencias se utilizó un secuenciador ABI 3730 Analyzer (Applied Biosystems), el cual las realizó en forma bidireccional. El que la secuencia se analice bidireccionalmente dió la ventaja de producir un código de barras por consenso de las lecturas realizadas a través de un software especializado, lo cual permitió aumentar la calidad del código obtenido y aseguró que en

la mayoría de los casos se cumpliera con un mínimo de 550 pares de bases, para ganar la designación de código de barras (Hajibabaei et al. 2005).

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas, editadas y ensambladas mediante el programa SeqScape v. 2.1 (Applied Biosystem, Foster City) y/o Codon Code v. 4.0.

Los interferogramas originales (archivos traza, generados por el secuenciador), así como las secuencias alineadas se encuentran en cada proyecto correspondiente en la base de datos de BOLD (Ratnasingham *et al.* 2007), completando de esta forma el proceso para cada espécimen.

En el caso de especies de peces valor comercial y que ya estaban procesadas en filete o posta, se realizó la secuencia. Posteriormente se cruzó la secuencia obtenida con la base de datos existente para validar la especie a la que pertenece. Esto permitió realizar una evaluación de la identidad específica de los pescados procesados en mercados o centros de arribo de pescadores.

Finalmente, se utilizaron las herramientas provistas por BOLD para la validación de las identificaciones y se compararon con el material provisto por el resto del mundo.

Resultados

El total de especímenes secuenciados llegó a 5147, lo cual cubre un 93% del total de secuencias comprometidas en el proyecto. En total se procesaron 9608 ejemplares. El que se haya llegado a este número se debe a que raramente se obtienen secuencias del total de ejemplares sometidos al proceso. Este fenómeno tiene diversas causas y razones: Primeramente existe el factor de contaminación humana o de los equipos, sobre todo en el caso del uso de robots de microfluidos, pues el proceso involucra una limpieza absoluta del material, sin embargo el pcr es altamente volátil y puede contaminar cualquier elemento del proceso, incluso una ráfaga del acondicionador de aire puede provocar este problema. En segundo lugar, pese a que los reactivos tienen un proceso muy delicado en cuanto a su certificación, en ocasiones pueden estar contaminados. En algunos casos encontramos secuencias de cerdo, en vez de las que esperábamos y esto se debe a una contaminación, principalmente de los dntp's que se utilizan en el pcr. Finalmente también hay problemas al momento de fijar las muestras, pues inmediatamente después de la muerte del

organismo, unas enzimas, las exonucleasas empiezan a desnaturalizar el ADN. Es necesario detener este proceso antes de la destrucción total del ADN, y el problema en organismos con cutícula gruesa, como los microcrustáceos, se magnifica, por lo que se trabajó en protocolos para solucionarlo, y actualmente los detalles se encuentran en proceso de publicación.

En el caso de los rotíferos, el principal problema fue su tamaño pequeño y la fijación, como se mencionó en el párrafo anterior, sin embargo todos estos problemas se solucionaron y actualmente tenemos un éxito que oscila del 80 al 90% de los especímenes procesados. La base de datos que se entrega en este momento es la primera que se logra a nivel mundial para varios de los grupos aquí trabajados, entre los que destacan los rotíferos y copépodos ciclopoideos.

A continuación se detallan todos los proyectos en BOLD que emanaron de este apoyo, con el número de ejemplares totales y el número de los que se logró secuenciar. Cabe señalar que los ejemplares que no dieron secuencia ya no se trabajarán y serán removidos a los proyectos señalados como Fail, antes de que los proyectos originales se hagan públicos. A fines de evaluación del presente informe se dejarán de manera temporal todos los fallos, para que se pueda apreciar la magnitud del esfuerzo que involucró el desarrollo de las secuencias comprometidas inicialmente. Esto se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1.- Lista de proyectos que forman parte de este informe

Proyecto	Marcador	Ejemplares (% completo)	Especies (% completo)
Fish larvae of Mexico I	COI-5P	341 / 3341 (100%)	65 / 65 (100%)
Fish larvae of Mexico II	COI-5P	440 / 440 (100%)	117 / 117 (100%)
Fish larvae of Mexico III	COI-5P	516 / 516 (100%)	137 / 137 (100%)
Marine Fish of Mexico I	COI-5P	426 / 426 (100%)	92 / 92 (100%)
Marine Fish of Mexico II	COI-5P	182 / 182 (100%)	38 / 38 (100%)
Marine Fish of Mexico III	COI-5P	250 / 250 (100%)	77 / 77 (100%)
Marine Fish of Mexico IV	COI-5P	261 / 261 (100%)	96 / 96 (100%)
Marine Fish of Mexico V	COI-5P	404 / 404 (100%)	144 / 144 (100%)
Freshwater Fish of Mexico II	COI-5P	84 / 84 (100%)	8 / 8 (100%)
Freshwater Fish of	COI-5P	273 / 273 (100%)	37 / 37 (100%)

Mexico III			
Freshwater Fish of Mexico IV2010	COI-5P	303 / 303 (100%)	87 / 87 (100%)
MXLionfish	COI-5P	168 / 168 (100%)	41 / 41 (100%)
Adult Lionfish	COI-5P	30 / 30 (100%)	1 / 1 (100%)
Total peces		3678	
Zooplankton II	COI-5P	426 / 426 (100%)	70 / 70(100%)
Zooplankton III	COI-5P	239 / 239 (100%)	41 / 41 (100%)
Zooplankton IV	COI-5P	308 / 308 (100%)	59 / 59 (100%)
Zooplankton V	COI-5P	5 / 5 (100%)	3 / 3 (100%)
Freshwater Rotifera of North America	COI-5P	429 / 429 (100%)	89 / 89 (100%)
Ostracoda I	COI-5P	62 / 62 (100%)	10 / 10 (100%)
Totales		5147	1212

Los especímenes contaminados se ubicaron en los proyectos detallados en la Tabla 2. Estos deben mostrarse por separado, pues estos proyectos se excluyen de todos los procesos matemáticos que se realizan en BOLD.

Tabla 2.- Proyectos contenedores de muestras que definitivamente no salieron o tuvieron contaminación

Nombre del Proyecto	Código del Proyecto	Total
Mexican Fish Fail	MFMI	1644
Zooplankton II-V FAIL	FAMX	2821
Total		4465

Publicaciones generadas a partir de los materiales procesadas en este proyecto

Garcia-Morales, A. E. & M. Elias-Gutierrez (en prensa). DNA Barcoding freshwater Rotifera of Mexico: evidence of cryptic speciation in common rotifers, *Molecular Ecology Resources*

Valdez-Moreno, M., C. Quintal-Lizama, R. Gomez-Lozano & M. C. García-Rivas, 2012. An alien invasion: the lionfish and their prey in the coral reef of the Mexican Caribbean through DNA barcoding, *Plos One* In review.

Valdez-Moreno, M., L. Vázquez-Yeomans, M. Elías-Gutiérrez, N. V. Ivanova & P. D. N. Hebert, 2010. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management., *Marine and Freshwater Research* 61: 665-671.

Prosser, S., Martínez-Arce, A. & Elías-Gutiérrez, M.(en prensa). A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans

Publicaciones en proceso de elaboración

Gutiérrez-Aguirre M.A., Cervantes-Martínez A. & Elías-Gutiérrez M. An example how the barcodes can aid to speed up the discovering species. The case of the calanoid copepod *Mastigodiatomus albuquerquensis* (Herrick)

Vasquez-Yeomans, L., Acevedo-Reyes, D., Morales-Gutiérrez, S., Valdez-Moreno. M. & Martínez-Arce,A. (en elaboración). Using the barcodes to identify immature stages of Elapomorpha (Pisces: Asctinopteri) from the Mesoamerican reef.

En el anexo 1 se incluye una copia de los artículos publicados o manuscritos de los artículos generados por material que se trabajó con este proyecto.

Premios

La publicación

Valdez-Moreno, M., L. Vázquez-Yeomans, M. Elías-Gutiérrez, N. V. Ivanova & P. D. N. Hebert, 2010. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management., *Marine and Freshwater Research* 61: 665-671.

Obtuvo el premio al mejor trabajo de Investigación 2010 por parte del Consejo Quintanarroense de Ciencia y Tecnología (COQCyT)

Tesis elaboradas con material de este proyecto

Las siguientes tesis fueron elaboradas con material de este proyecto:

Maestría:

Cohuo Durán Sergio 2012. Revisión taxonómica (morfológica y molecular) de los ostrácodos dulceacuícolas del centro-sureste de México. Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Finalizada

García-Morales Alma Estrella. 2012. Diversidad genética y filogeografía comparada de algunas especies de rotíferos monogonontos del sureste mexicano, utilizando ADN mitocondrial. Doctorado. El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal. Finalizada

Premios a tesis

La presentación de la tesis de Sergio Cohuo Durán, obtuvo el primer lugar como presentación de tesis de maestría en la XVII Reunión Nacional y X Reunión Internacional de la Sociedad Mexicana de Planctología.

Problemáticas encontradas durante los muestreos y desarrollo del trabajo

Creemos necesario señalar que el proyecto llegó a buen fin, a pesar de una serie de inconvenientes que se presentaron para desarrollar los muestreos, sobre todo en el norte.

Aparte de los problemas de inseguridad, durante el año 2010 no se pudo muestrear adecuadamente debido a los problemas de inundaciones que se señalaron con detalle en el informe parcial y que incluyeron lo siguiente: todos los ríos de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas estaban sobrepasados de agua, se desbordaron, solo por citar unos ejemplos, el San Juan corría con más de 2000 m³ por segundo. El Río Santa Catarina, que normalmente es de 6 m de ancho y 1 de profundidad, llegó a 200 m de ancho y 6 m de profundidad. El Río Salado, que estaba seco en partes entre la Presa Don Martín y Anahuac, llegó a un desagüe de 2500 m³ por segundo, las 24 compuertas estaban abiertas en ambas presas. Lo mismo pasó con el Río San Carlos, Sabinas, San Juan (en Coahuila) y el Río Bravo. La Presa de la Amistad, estuvo igual, con más del 100 % de almacenamiento. La mayor parte de las ciudades fronterizas estaban incomunicadas porque se cayeron los puentes, y los caminos secundarios y de terracería estaban intransitables, lo que dificultó la llegada a las cabeceras, que es donde están las mejores comunidades de peces. Como El Pílon, Cabezones estaban con el 400 % de agua que dan al San Juan y Río Pablillo, Purificación con el 600 % de agua que dan a la Presa Cerro Prieto, estuvieron incolectables, no había remansos o lugares con aguas tranquilas y poca profundidad. En Nuevo León, todas las cabeceras de los ríos que se forman en la sierra madre oriental estaban incomunicadas. Se hicieron brechas colaterales para re-abrir el camino, mientras se construyen de nuevo los accesos de puentes y deslaves en carretera. En Tamaulipas la situación fue similar, hubo carreteras cerradas y todos los ríos con crecientes de agua. La presa del Azúcar se desbordó, con más de 1800 m³ de aforo.

Por otra parte, la introducción del uso de robots de microfluidos permitió incrementar el volumen de muestras manejadas, pues un solo robot de la marca Biomek puede procesar hasta 20 placas, cada una con 95 ejemplares a la vez. El problema es que cualquier error en un buffer o reactivo magnifica el resultado negativo. En el caso de micro-organismos como los crustáceos, la introducción de los robots redujo el éxito de un 30-40% (Elías-Gutiérrez et al., 2008) a cero, es decir placas enteras no produjeron una sola secuencia. La razón de este fallo es que la concentración de ADN era tan baja después del proceso de extracción, que incluso resultaba

indetectable para los dispositivos de lectura como el Nanodrop o incluso no se obtenía nada en los geles de bromuro de etidio.

Análisis General de los Resultados

Peces

El número de especies de peces llegó a 465, lo cual rebasa el número de especies comprometidas, que fue de 400, con un total de 3678 ejemplares secuenciados, 322 por debajo del total comprometido, sin embargo se procesaron más de 5000 especímenes, lo cual se aprecia en los proyectos con éxito y el FishFail, donde se pasaron los registros con contaminación o fallados. El éxito en total fue de un 90% y los fallos se encontraron principalmente en la secuenciación. Hemos notado que el uso de robots de microfluidos disminuye la eficiencia de secuencias obtenidas, pero debido a que procesan un enorme volumen de muestras se compensan los fallos. En la sección correspondiente se discutirán los detalles de los resultados obtenidos.

Zooplankton

En el caso del zooplankton se presentan 1469 secuencias, 31 por debajo del total prometido, con un porcentaje de éxito de 40% sobre el total procesado. Sin embargo es importante señalar que de este total solamente 1401 especímenes son de México y los restantes incluyen otros países, incluso algunos de Corea. La razón de lo anterior es que se utilizó parte de este material como comparación y para iniciar la comprobación de la hipótesis de que ninguna especie del zooplankton dulceacuícola tiene distribución intercontinental. En este caso definitivamente no se pueden usar robots para la extracción, pues el éxito decayó a cero, como ya se mencionó y hubo que esperar a que la facilidad de Chetumal fuera inaugurada en 2011 para empezar a obtener resultados. De hecho la tesista Alma Estrella García Morales realizó una estancia de cinco meses en la facilidad de Guelph (Canadá) para procesar sus rotíferos y el éxito fue de 32 secuencias de 344 especímenes que procesó durante ese tiempo. Después realizó una estancia de 3 meses en la UNAM, en la ciudad de México, donde el resultado fue cero secuencias. Finalmente, los primeros pcr positivos se lograron a finales de septiembre del 2010, para procesar el resto del material durante 2011. El éxito llegó a ser del 80-90%, sin embargo es uno de los grupos más difíciles de trabajar debido a su tamaño pequeño.

En general, se aplicaron tres protocolos de extracción diferentes: EL CCBD, que es el estándar, desarrollado por el Instituto de Biodiversidad de Ontario (BIO), se puede consultar en <http://www.ccbd.ca/page/research/protocols/extraction> .

El segundo protocolo ensayado fue la extracción en un medio con sal (NACL-Cloroformo). La metodología completa se detalla en el Anexo 4.

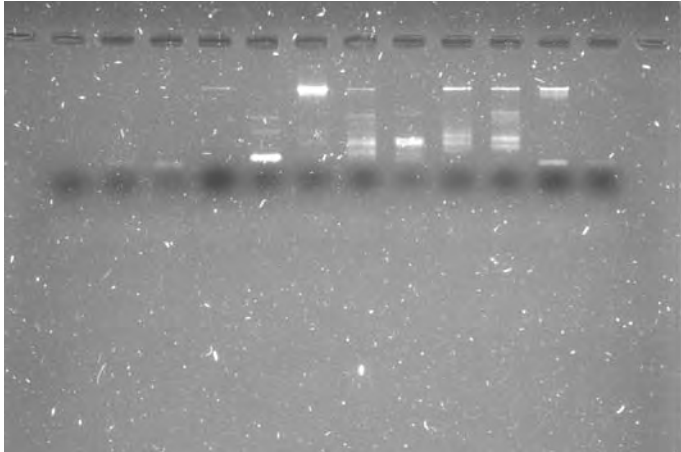
Finalmente se aplicó el método denominado HotShot (Montero-Pau et al. 2008), que fue el que se estandarizó, debido a los resultados positivos, como se muestra a continuación:

En la siguiente página se muestran los geles, una banda significa que el resultado fue positivo y obtuvimos un producto amplificado del gen que se requiere.

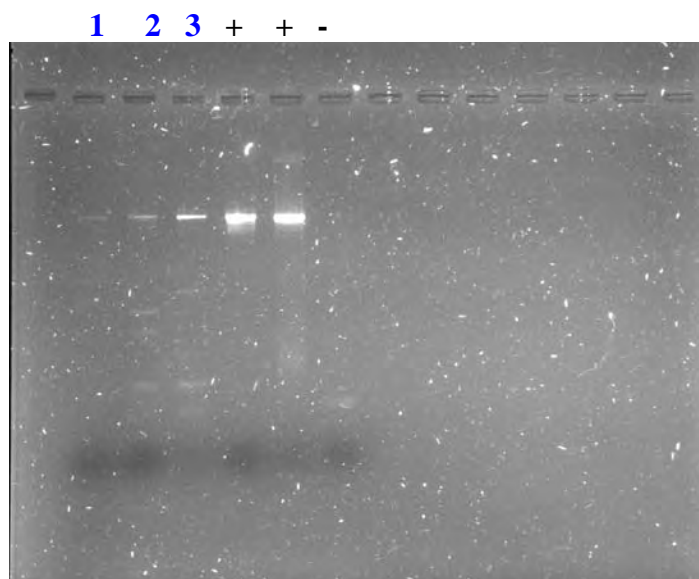
Geles generados en la unidad Chetumal con productos pcr. Los geles están precedidos por la fecha en que se realizaron, con la valoración de los productos inmediatamente abajo. Cada banda indica un producto del pcr. El número corresponde a la celda correspondiente y el símbolo “+” en el gel significa un control positivo. el símbolo “-“ significa un control negativo, ahí no debe haber banda.

06_09_2010 COI

81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 + -



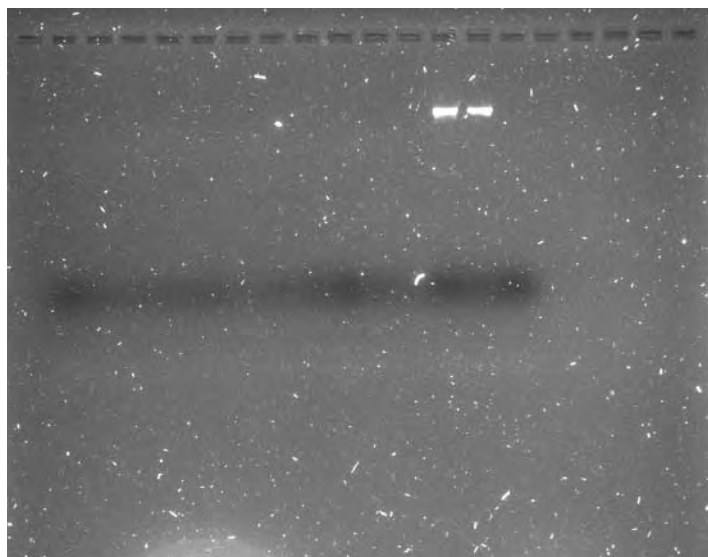
Numeración	Especie	Localidad	Fecha de colecta	Protocolo extracción	COI
81	<i>Thermocyclops inversus</i>			CCBD	-
82	<i>Mastigodiatomus cf mesus</i>			CCBD	-
83	<i>Mastigodiatomus alburquerqueensis</i>			CCBD	-
84	<i>Mastigodiatomus alburquerqueensis</i>			CCBD	+
85	<i>Termocyclops inversus</i>			CCBD	-
86	<i>Pontellopsis occidentalis</i>	Gulf of California	24/03/2010	CCBD	+
87	<i>Pontellopsis occidentalis</i>	Gulf of California	24/03/2010	CCBD	++
88	<i>Calanus pacificus</i>	Gulf of California	24/03/2010	CCBD	-
89	<i>Calanus pacificus</i>	Gulf of California	24/03/2010	CCBD	++
90	<i>Euchaeta longicornis</i>	Gulf of California	24/03/2010	CCBD	++



Numeración	Especie	Localidad	Fecha de colecta	Protocolo extracción	COI
1	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	+
2	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	+
3	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	+

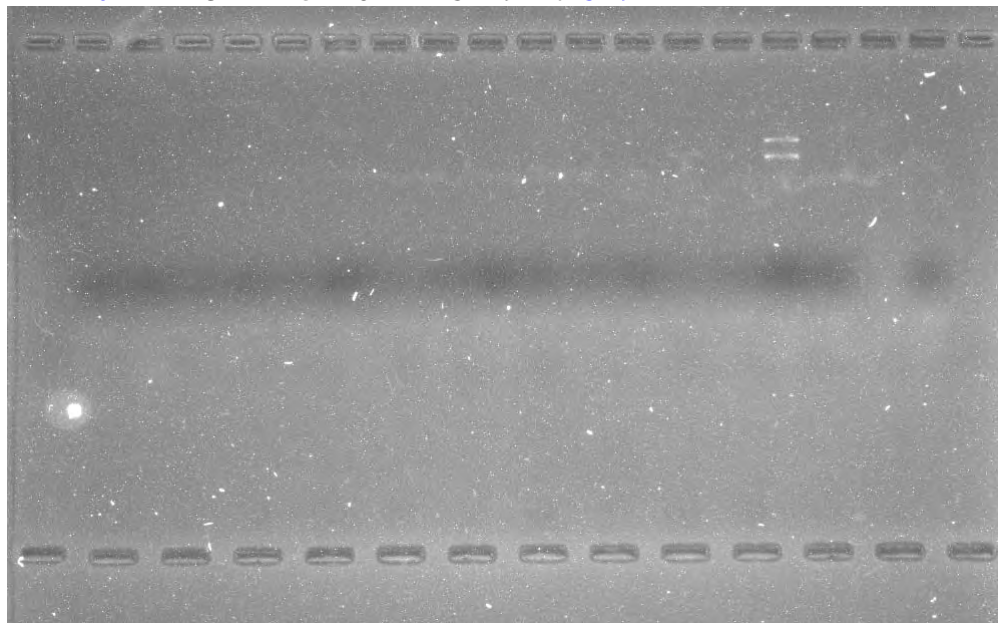
14_09_2010 COI

10 A2 A3 11 A5 A6 A7 A8 A9 A10 8 9 + -



Numera- ción	Especie	Localidad	Fecha de colecta	Protocolo extracción	CO I
10	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	-
A2	<i>Lecane ludwiigi</i>	Capulteol, Ver	28/08/2010	NaCl-cloroformo	-
A3	<i>Mytilina ventralis</i>	Capulteol, Ver	28/08/2010	NaCl-cloroformo	-
11	<i>Thermocyclops inversus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	-
A5	<i>Dipleuchlanis propatula</i>	Capulteol, Ver	28/08/2010	NaCl-cloroformo	-
A6	<i>Brachionus falcatus</i>	Cerca Kohunlich	05/11/2008	NaCl-cloroformo	-
A7	<i>Brachionus havanaensis</i>	Cerca Kohunlich	05/11/2008	NaCl-cloroformo	-
A8	<i>Lecane papuana</i>	Charco Usumacinta	17/06/2009	NaCl-cloroformo	-
A9	<i>Lecane curvicornis</i>	Kohunlich	05/10/2009	NaCl-cloroformo	-
A10	<i>Brachionus plicatilis</i>	Hacienda Mondaca II Isla Mujeres	24/05/2009	NaCl-cloroformo	-
8	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	+
9	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	-

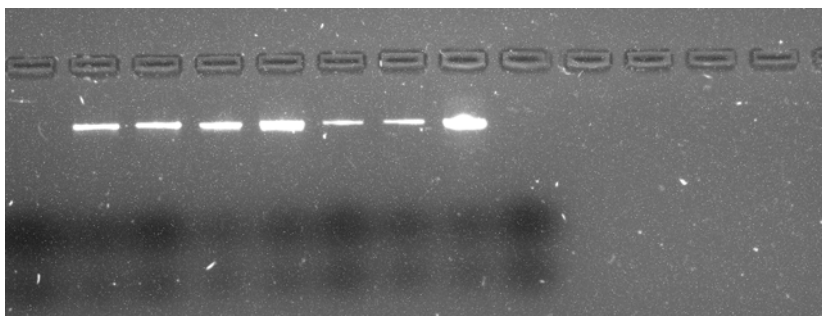
10 A2 A3 11 A5 A6 A7 A8 A9 A10 8 9 + + + -



Numeración	Especie	Localidad	Fecha de colecta	Protocolo extracción	16S
10	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	-
A2	<i>Lecane ludwiigi</i>	Capulteol, Ver	28/08/2010	NaCl-cloroformo	-
A3	<i>Mytilina ventralis</i>	Capulteol, Ver	28/08/2010	NaCl-cloroformo	-
11	<i>Thermocyclops inversus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	-
A5	<i>Dipleuchlanis propatula</i>	Capulteol, Ver	28/08/2010	NaCl-cloroformo	-
A6	<i>Brachionus falcatus</i>	Cerca Kohunlich	05/11/2008	NaCl-cloroformo	-
A7	<i>Brachionus havanaensis</i>	Cerca Kohunlich	05/11/2008	NaCl-cloroformo	-
A8	<i>Lecane papuana</i>	Charco Usumacinta	17/06/2009	NaCl-cloroformo	-
A9	<i>Lecane curvicornis</i>	Kohunlich	05/10/2009	NaCl-cloroformo	-
A10	<i>Brachionus plicatilis group</i>	Hacienda Mondaca II Isla Mujeres	24/05/2009	NaCl-cloroformo	-
8	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	-
9	<i>Mastigodiptomus cf nesus</i>	Minicenote	01/08/2010	NaCl-cloroformo	-

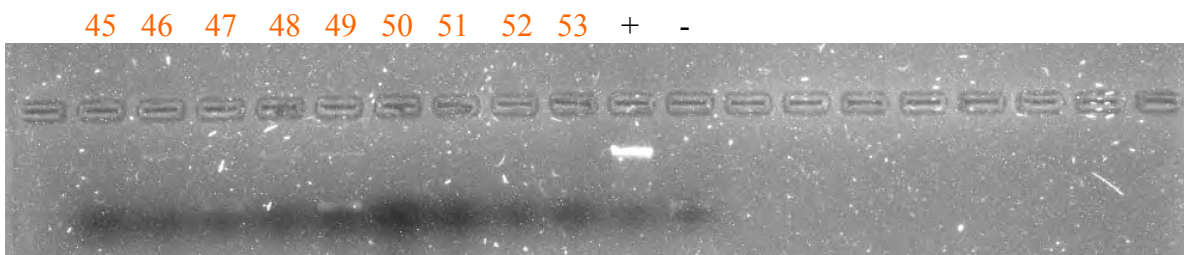
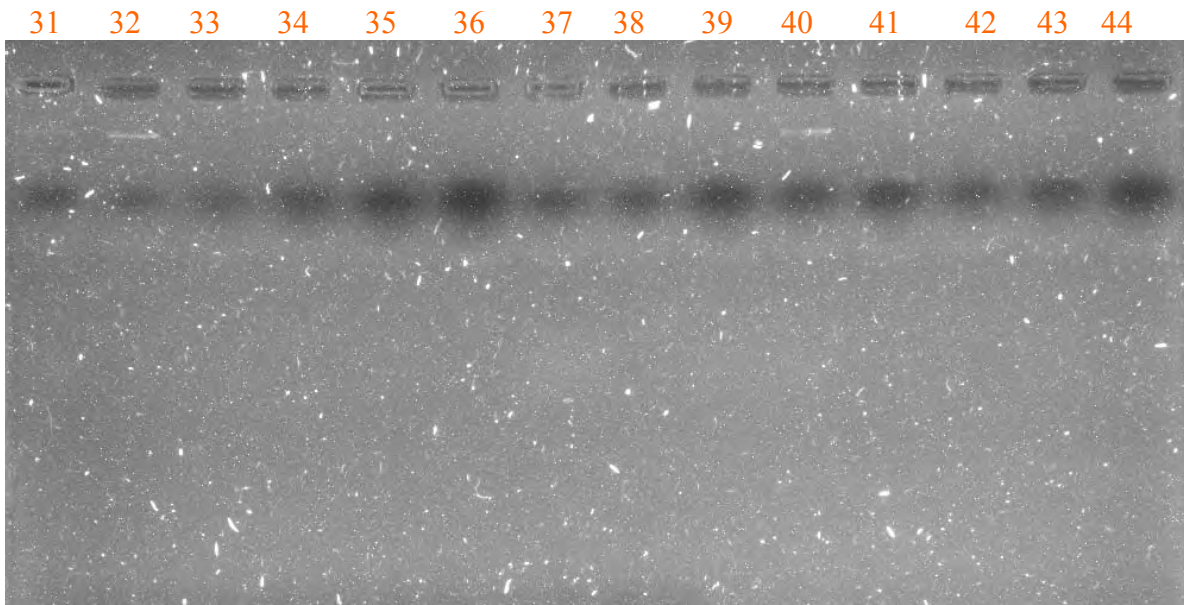
20_08_2010 COI

089 089 089 089 089 089 + -



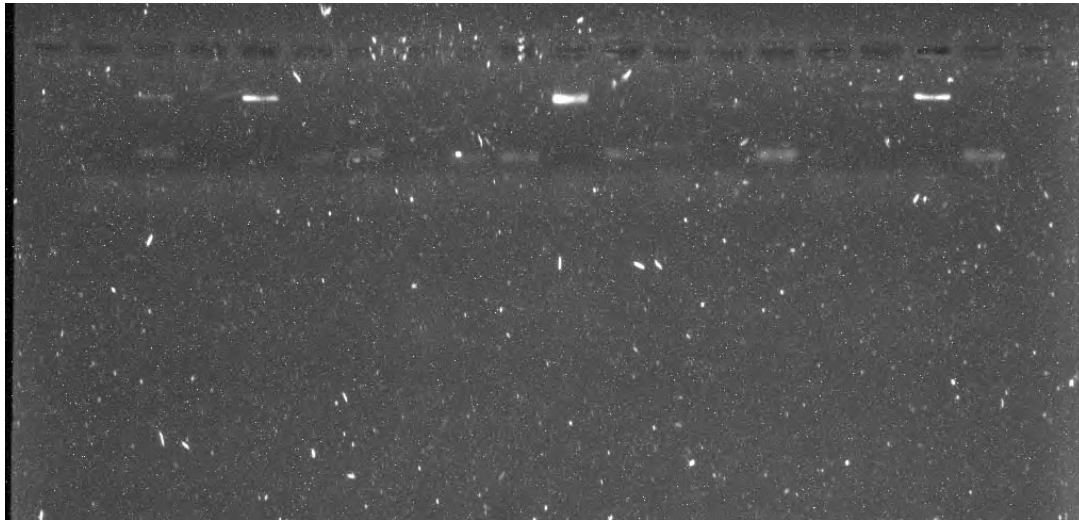
089	<i>Leptodiaptomus</i>	Lake Erie	02/07/2010	CCBD	+
089	<i>Leptodiaptomus</i>	Lake Erie	02/07/2010	CCBD	+
089	<i>Leptodiaptomus</i>	Lake Erie	02/07/2010	CCBD	+
089	<i>Leptodiaptomus</i>	Lake Erie	02/07/2010	CCBD	+
089	<i>Leptodiaptomus</i>	Lake Erie	02/07/2010	CCBD	+
089	<i>Leptodiaptomus</i>	Lake Erie	02/07/2010	CCBD	+

26_08_2010 COI



Numeración	Especie	Localidad	Fecha de colecta	Protocolo extracción	COI
31	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
32	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	+
33	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
34	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
35	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
36	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
37	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
38	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
39	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
40	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	+
41	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
42	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
43	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
44	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich 1	01/04/2009	CCBD	-
45	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich 1	01/04/2009	CCBD	-
46	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich 1	01/04/2009	CCBD	+
47	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich 1	01/04/2009	CCBD	-
48	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	+
49	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	+
50	<i>Arctodiptomus cf. dorsalis</i>	Lachua	05/03/2006	CCBD	-
51	<i>Arctodiptomus cf. dorsalis</i>	Lachua	05/03/2006	CCBD	-
52	<i>Arctodiptomus cf. dorsalis</i>	Lachua	05/03/2006	CCBD	-
53	<i>Arctodiptomus cf. dorsalis</i>	Lachua	05/03/2006	CCBD	-

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

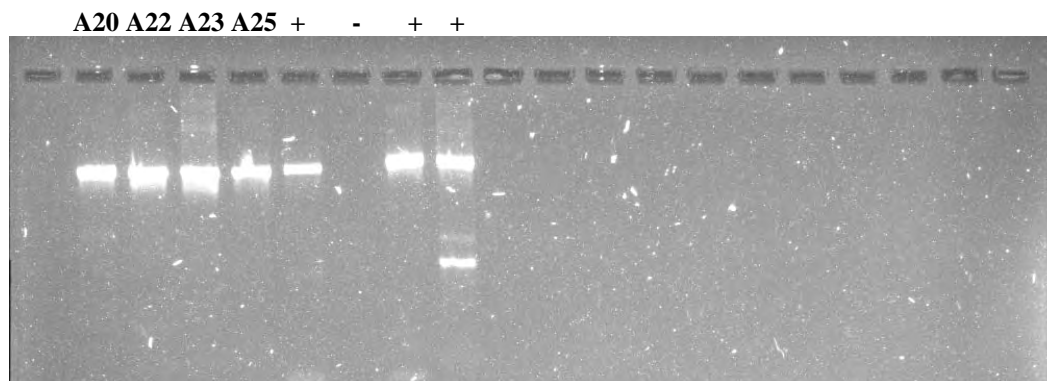


49 50 51 52 53 + -



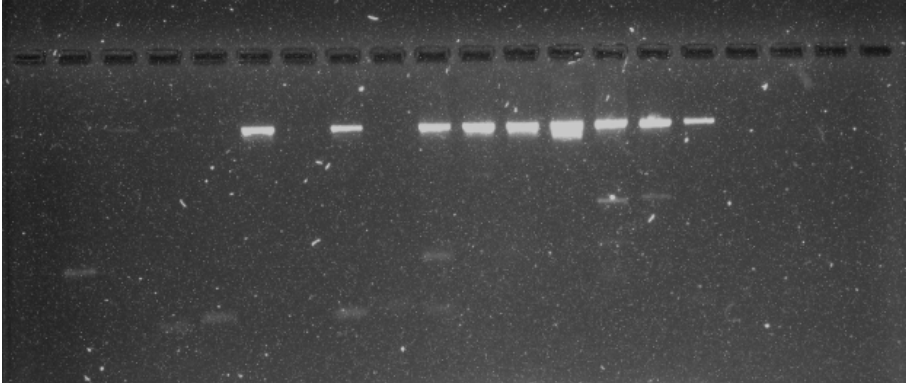
Numeración	Especie	Localidad	Fecha de colecta	Protocolo extracción	16S
31	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
32	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	+
33	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
34	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	+
35	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
36	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
37	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich	31/06/2005	CCBD	-
38	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
39	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
40	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	+
41	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
42	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
43	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
44	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich 1	01/04/2009	CCBD	-
45	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich 1	01/04/2009	CCBD	+
46	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich 1	01/04/2009	CCBD	+
47	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich 1	01/04/2009	CCBD	-
48	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
49	<i>Mastigodiptomus cf. reidae</i>	Kohunlich A	01/04/2009	CCBD	-
50	<i>Arctodiptomus cf. dorsalis</i>	Lachua	05/03/2006	CCBD	-
51	<i>Arctodiptomus cf. dorsalis</i>	Lachua	05/03/2006	CCBD	-
52	<i>Arctodiptomus cf. dorsalis</i>	Lachua	05/03/2006	CCBD	-
53	<i>Arctodiptomus cf. dorsalis</i>	Lachua	05/03/2006	CCBD	-

28_09_2010 COI



Numeración	Especie	Localidad	Fecha de colecta	Protocolo extracción	COI
A20	<i>Platyas quadricornis</i>	Canal Frente a Bachilleres 2, Chetumal	19/09/2010	Hot shot	+
A22	<i>Lecane bulla</i>	Canal Frente a Bachilleres 2, Chetumal	19/09/2010	Hot shot	+
A23	<i>Lecane bulla</i>	Canal Frente a Bachilleres 2, Chetumal	19/09/2010	Hot shot	+
A25	<i>Lecane leontina</i>	Canal Frente a Bachilleres 2, Chetumal	19/09/2010	Hot shot	+

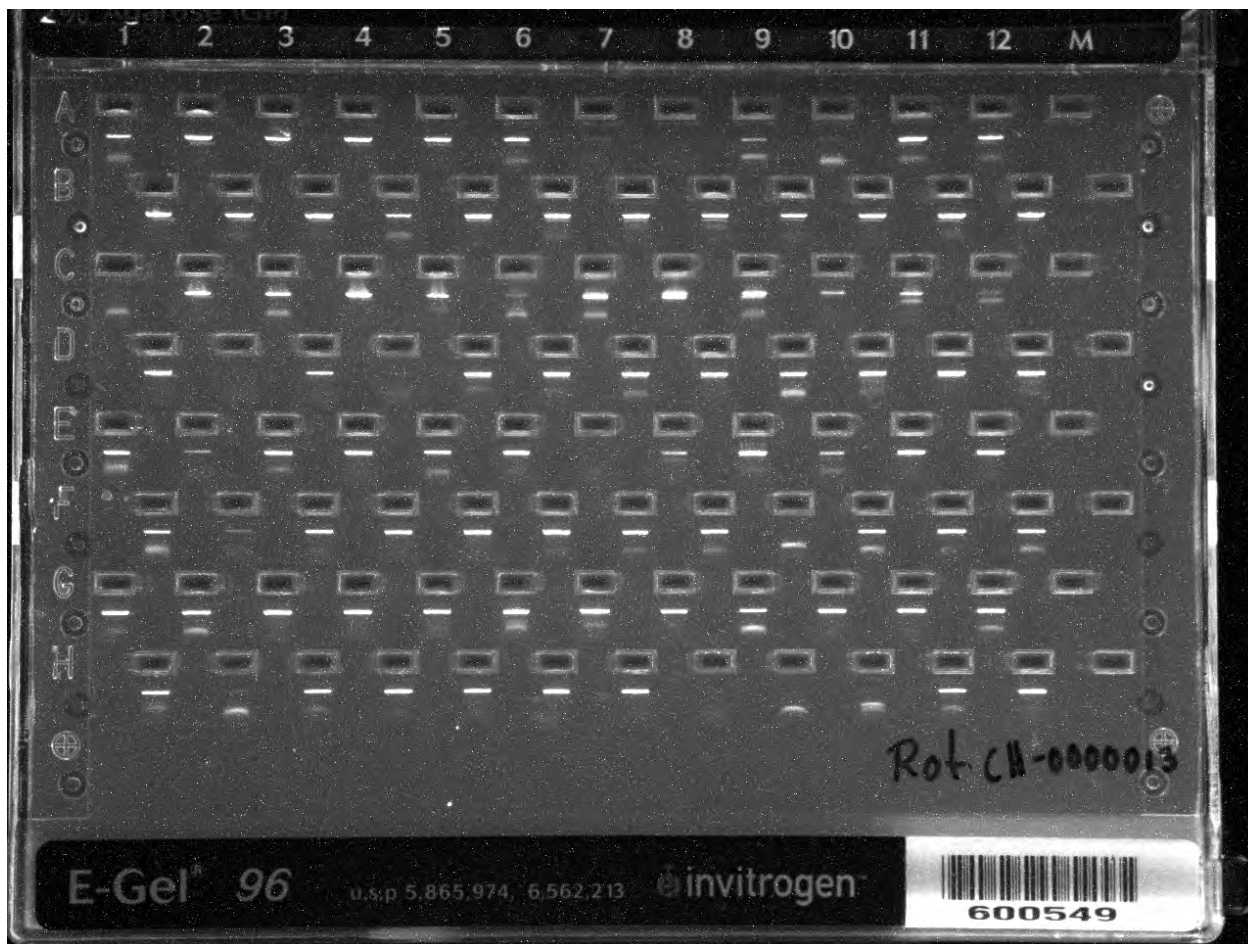
22 23 24 25 A19 + + - A21 A24 A26 + + + +



Numeración	Especie	Localidad	Fecha de colecta	Protocolo extracción	COI
22	<i>Mastigodiptomus albuquerquensis</i>	San Pablo Xuchitl	06/04/2007	CCBD	+
23	<i>Mastigodiptomus albuquerquensis</i>	San Pablo Xuchitl	06/04/2007	CCBD	+
24	<i>Mastigodiptomus albuquerquensis</i>	San Pablo Xuchitl	06/04/2007	CCBD	+
25	<i>Mastigodiptomus albuquerquensis</i>	San Pablo Xuchitl	06/04/2007	CCBD	+
A19	<i>Platyas quadricornis</i>	Canal Frente a Bachilleres 2, Chetumal	19/09/2010	CCBD	-

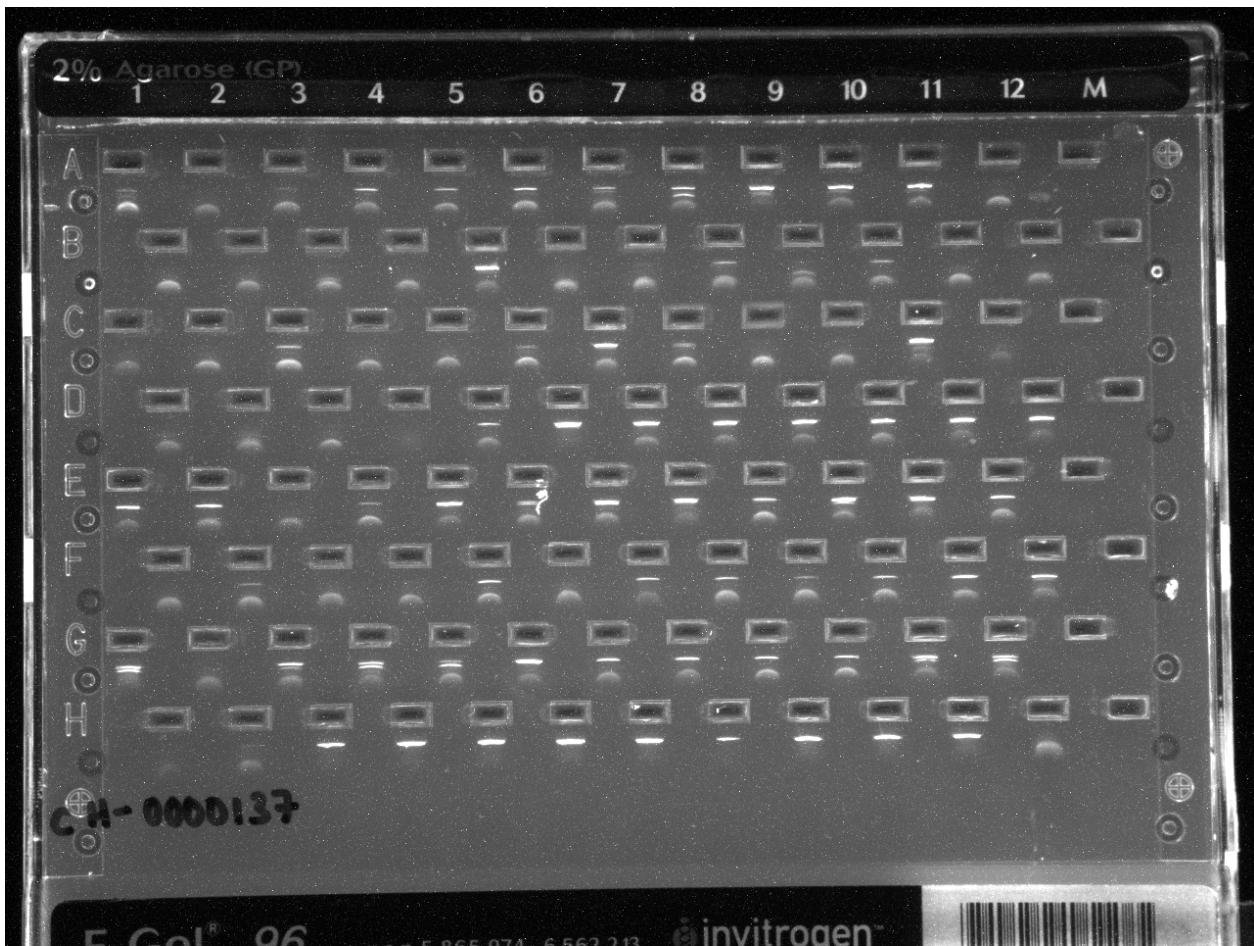
De los resultados obtenidos se pudo concluir que la mejor técnica para extraer ADN de copépodos aparentemente fue la del CCBD, mientras que para rotíferos fue la del Hot Shot. Estos productos se pudieron secuenciar finalmente. Como se mencionó anteriormente, para el trabajo de alto volumen y debido a su bajo costo se estandarizó la técnica de Hotshot para todo el zooplancton (NOTA: CCBD hace referencia a protocolos del sitio WEB <http://www.ccdb.ca/page/research/protocols>)

Esto permitió un porcentaje de éxito cercano al 90%, tal como se muestra en el siguiente Egel, con 95 especímenes de rotíferos procesado en la Unidad Chetumal



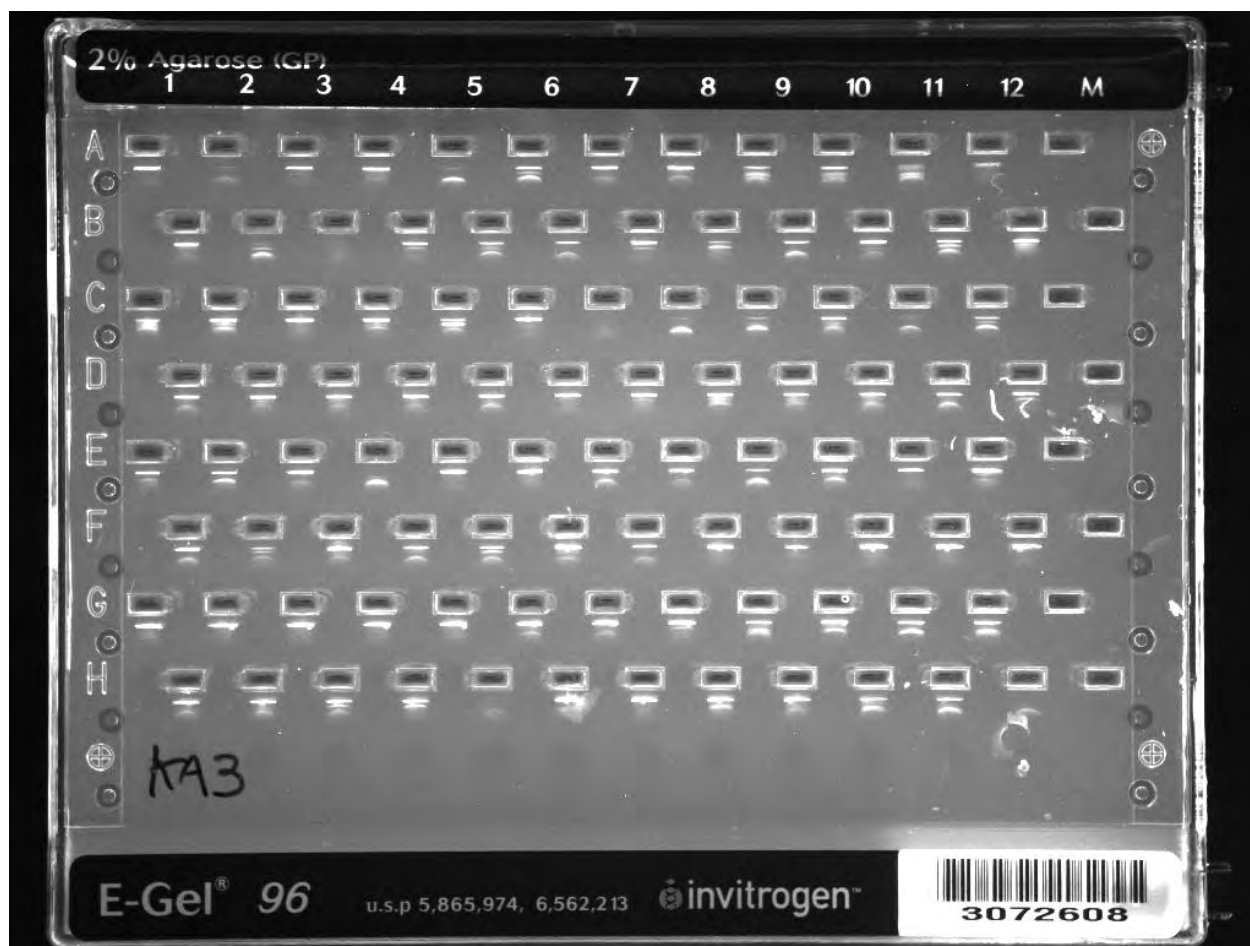
En esta fotografía se muestra el primer Gel procesado en la Unidad Chetumal del ECOSUR con rotíferos donde se aprecian 81 bandas fuertes (85%) y 7 bandas débiles (7%). esta últimas pueden dar resultados positivos al secuenciar también. El total positivo en esta placa es un 92%, un resultado que ningún laboratorio había logrado hasta este momento.

Con la fijación mejorada, este protocolo modificado y estandarizado y los oligos tradicionales el resultado en microcrustáceos mejoró en un promedio de 30-40% a más del 65%, como se aprecia en la siguiente fotografía de un Egel, donde es posible observar 60 bandas fuertes y 7 bandas débiles, dando un total de 67 (70% de éxito).



Utilizando las técnicas anteriores y los nuevos oligos denominados ZplankF1-t1 y ZplankR1_t1 se mejoró el resultado hasta obtener 85 (89.5%) bandas fuertes y 6 (7%) bandas débiles, dando un total de 95% de éxito. Solo en 4 pozos no se aprecia un producto. Este tipo de resultados nunca había sido obtenido con microcrustáceos anteriormente, pero esto se logró hasta finales del año 2011 y principios del 2012. El resultado se aprecia en la fotografía del Egel de la página siguiente, marcado como KA3.

Cabe señalar que como estos resultados apenas se han logrado y posiciona nuestro laboratorio como uno de los más avanzados a nivel mundial, junto con el de Guelph en Canadá, no podemos incluir todos los detalles en este informe. En el momento en que sean publicados se hará del conocimiento de la CONABIO la publicación final con todos los detalles incluidos.



Análisis de los resultados del zooplancton

El árbol de secuencias del zooplancton se encuentra en los Anexos 4 a 7 y las hojas de Excel que acompañan este informe. En esta sección se discutirán algunos de los resultados sobresalientes, aunque no se trabajará al nivel del detalle de los artículos publicados.

En general, los resultados obtenidos incluyen aproximadamente 161 especies determinadas. Sin embargo hay que hacer notar que varios de los nombres a especie son interinos, debido a que los códigos de barras aparentemente permiten el descubrimiento de especies crípticas. Esto aparentemente ha ocurrido con un nivel más generalizado en el zooplancton, donde el fenómeno ha sido descrito en detalle (Elías-Gutiérrez et al. 2008a) y a partir de esta primera hipótesis se ha demostrado al menos en tres casos (de veinte señalados), que efectivamente se trata de especies crípticas y además son las primeras descripciones que incluyen como uno de los caracteres

importantes a los códigos de barras, en combinación con otros, apuntando hacia un nuevo tipo de taxonomía denominado taxonomía integrativa (Dayrat 2005; Will et al. 2005). Es así que en México es el primer país a nivel mundial donde especies del zooplancton se han descrito: *Leberis chihuahuensis* Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2008; *Scapholeberis duranguensis* Quiroz-Vázquez & Elías-Gutiérrez, 2009 (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno 2008; Quiroz-Vazquez & Elías-Gutiérrez 2009). Así mismo se pudo hacer válido a *Leptodiptomus garciai* (Osorio-Tafall, 1942), un microendémico del lago Alchichica en Puebla (Montiel-Martínez et al. 2008), sinonimizado con *Leptodiptomus novamexicanus* desde la década de los 50's.

De la lectura de los artículos señalados con las nuevas descripciones, es posible apreciar que existen nuevos microcaracteres que permiten distinguir a las especies, y estas tres apenas marcan el inicio de un nuevo conocimiento sobre una diversidad desconocida hasta el momento, pero parece indicar que las especies de agua dulce tienen una distribución mucho más limitada de lo que se pensaba, por ejemplo solamente 5 especies de cladóceros se han registrado desde México al norte de Canadá (Jeffery et al. 2011). Aunado al uso de microcaracteres, también se empiezan a utilizar caracteres eco-fisiológicos y experimentos de hibridación (Montiel-Martínez et al. 2008), lo que hace aún más ardua la descripción de las especies. Por esta razón hasta el momento solamente se han descrito 3 especies de las 20 posibles señaladas en el trabajo pionero de Elías-Gutiérrez et al. (2008).

A continuación se revisará con más detalle la información generada para cada grupo mayor del zooplancton:

Rotíferos

Este grupo siempre ha representado un reto para su estudio, debido a su tamaño pequeño y la enorme plasticidad fenotípica que presentan en respuesta a cambios en el medio ambiente y la presencia de depredadores, tal como lo señalaron García-Morales & Elías-Gutiérrez (en prensa). Los diferentes morfotipos se han designado como especies diferentes, subespecies o formas, una práctica habitual con este grupo, sin embargo hasta muy recientemente se ha señalado la presencia de endemismos en estos organismos (Segers & De Smet 2008).

En esta sección se comentarán los resultados de manera general. Un análisis más detallado se puede revisar en la publicación generada por García-Morales & Elías-Gutiérrez, a partir de este proyecto y aceptada en este mes para ser publicada en *Molecular Ecology Resources*, pero es importante destacar lo siguiente:

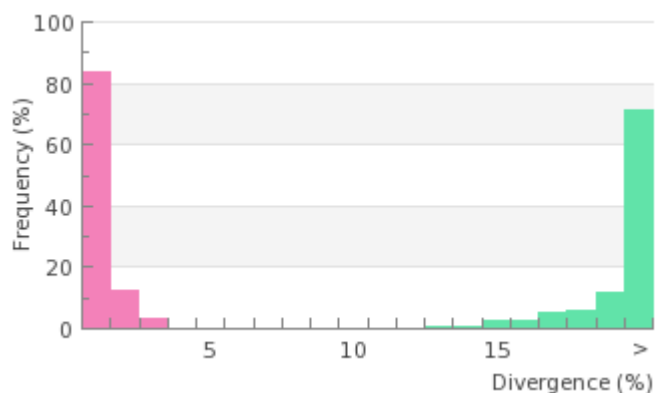
Este es el primer estudio a nivel mundial, que abarca un número amplio de este grupo pues otros trabajos se han centrado en una sola especie (o complejo de especies), como *Brachionus plicatilis*, uno de los más estudiados (Campillo et al. 2005; Suatoni et al. 2006; Gomez et al. 2007; Alcántara-Rodríguez et al. 2012). Otro ejemplo es el caso de *Lecane bulla*, que también es un complejo bien conocido (Walsh et al. 2009a).

La evidencia obtenida hasta el momento, indica que el COI es un buen marcador para distinguir las especies de rotíferos monogonontos. En este estudio, de un total de 417 especímenes revisado, se distinguieron 63 morfoespecies, siendo los géneros más especiosos *Brachionus* y *Lecane* con 13 y 19 taxa, respectivamente. Sin embargo, se observó que existe una posible especiación críptica en 14 taxa, que además presentan una consistencia en cuanto a su distribución geográfica, aunque existen algunas que se detectaron en simpatria, como es el caso de *Lecane bulla* en Quintana Roo. En el árbol del Anexo 5 y en la base de datos BOLD, todas las especies crípticas recibieron nombres interinos y para poder asignarles un nombre definitivo se requiere que sean descritas formalmente, sin embargo la tarea que sigue es sumamente ardua, pues involucra analizar en el microscopio electrónico de barrido la morfología externa de cada haplotipo diferente, extraer al mástax y analizarlo con la misma técnica, todo esto con la finalidad de encontrar microcaracteres específicos. Además, se ha visto la necesidad de cultivar cada haplotipo diferente, con el objeto de inducir los machos de manera artificial (Stelzer & Snell 2003) revisar sus microcaracteres y realizar experimentos de hibridación para establecer si existe aislamiento reproductivo en los haplotipos detectados, lo cual solamente se ha hecho recientemente en rotíferos del género *Ephipanes*, que es considerado un complejo (Schroder & Walsh 2010) y cuenta con pocos antecedentes en otros grupos del zooplancton. Esto ha permitido establecer límites entre algunas especies que son indistinguibles a partir de las hembras partenogénicas, pues en el caso de los machos si existen caracteres mejor definidos para establecer los límites de las especies. También existen trabajos experimentales, que muestran diferencias significativas en especies muy emparentadas (Ciros-Perez et al. 2001a; Ma et al.

2010). Todo lo anterior permitirá una mejor descripción de cada especie, dentro del marco que se ha mencionado constituye la taxonomía integrativa.

Es importante mencionar que en términos generales se ha asignado un nuevo nombre interino, cuando el sistema de BOLD asigna un Barcode Identification Number (BIN, por sus siglas en inglés) diferente a los haplotipos encontrados. Esto generalmente se presenta cuando existe un umbral de divergencia del 2% o más entre dos haplotipos. Cabe señalar que cuando se presenta un BIN diferente no necesariamente se trata de especies distintas, sino de una hipótesis a comprobar. Lo mismo ocurre de manera inversa, cuando especies recientes o en proceso de diferenciación, no son distinguidas por los códigos de barras, tal como fue demostrado en peces de agua dulce del altiplano mexicano y la familia Characidae (Valdez-Moreno et al. 2007). Sin embargo, no se ha detectado este último caso en el zooplancton de aguas dulces. Todo el trabajo señalado en el párrafo que antecede a este, sería para comprobar estas hipótesis y requiere, como se ha señalado, una investigación exhaustiva de cada caso.

Por otro lado, la divergencia intraespecífica en todos los casos fue menor a 1% y la divergencia interespecífica tuvo valores promedio del 20.8%, sin embargo osciló desde un mínimo de 6.5% (entre *Brachionus quadridentatus* f. *cluniorbicularis* y *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*AEG1) hasta un máximo de 30.8% (entre *Trichocerca longiseta* y *T. stylata*). No existió solapamiento entre las divergencias intraespecíficas e interespecíficas, tal como lo muestra la siguiente gráfica:



Gráfica 1.- Muestra las divergencias intraespecíficas (en rojo) vs las divergencias interespecíficas (en verde).

Estos niveles de divergencia son similares a los encontrados por otros estudios que han abarcado solo un género o complejo de especies (Gomez et al. 2002; Gilbert & Walsh 2005; Schröder &

Walsh 2007; Walsh et al. 2009b; Xiang et al. 2010), sin embargo podríamos señalar que todavía falta mucho para conocer la variabilidad genética de los rotíferos.

Del análisis del árbol presentado en el Anexo 5, se desprende que fueron pocas las especies que mostraron una distribución muy amplia, entre estas cabe destacar a *Brachionus havanaensis*, que además mostró gran plasticidad fenotípica y *Keratella americana*.

Mención aparte merece *Brachionus plicatilis*, que representa un complejo de al menos 14 especies crípticas, de las cuales solo se han descrito formalmente tres (Segers 1995; Ciro-Perez et al. 2001b). En este estudio encontramos tres poblaciones dentro de este complejo de especies. Los sistemas donde se detectaron se consideran salinos, aunque geográficamente están muy alejados y son de origen diferente: la laguna de Sontecomapan (Veracruz), una laguna interna en Isla Mujeres y la Laguna de Cuitzeo (Michoacán). Las tres poblaciones formaron un solo grupo con una divergencia relativamente baja (1.5%). Al comparar estas secuencias con otras depositadas en el GenBank, resultó que estos organismos se corresponden con una variedad conocida como “Almenara” descrita en España y detectada en algunas partes de los Estados Unidos. Es muy posible que esta variedad haya sido introducida a causa de las actividades humanas, pues la baja divergencia genética entre regiones tan alejadas permite inferir una colonización muy rápida y reciente. Estos casos han sido demostrados con otros rotíferos (Segers 2001).

Por otro lado, también es significativo que, de acuerdo con los códigos de barras, el género *Plationus*, propuesto desde 1993 (Segers & Murugan 1993) es válido y no un sinónimo de *Brachionus* y que diferentes autores se han negado a reconocer (Sarma et al. 2009), aunque ha sido corroborado también por otros medios (Reyna-Fabián et al. 2010).

Diversidad críptica

Como ya se mencionó, se considera a varias especies de rotíferos como grupos de especies. Entre éstas destaca *Lecane bulla*, del cual en este estudio analizamos 18 poblaciones, en las cuales pudimos detectar 8 grupos genéticamente divergentes (en promedio 14.7% de divergencia). Otros

autores han encontrado algo similar en el norte de nuestro país (Walsh, et al., 2009), sin embargo hasta el momento no se ha descrito formalmente ninguna especie de este complejo.

Otras especies de este género que representan complejos de dos o tres especies son *L. cornuta*, *L. curvicornis*, *L. crepida*, *L. lunaris* y *L. hastata*. Todas estas especies se han considerado cosmopolitas, sin embargo, a la luz de los resultados presentados, tal vez se trate de complejos de especies con distribuciones más restringidas.

Otras especies que mostraron diferentes haplotipos fueron *Keratella cochlearis*, *Brachionus calcyflorus*, *B. quadridentatus*, *Mytilina ventralis*, *Ascomorpha ovalis*, *Platyas quadricornis* y *Testudinella patina*.

Como ya se mencionó, el establecer formalmente si se trata de especies crípticas realmente requerirá un análisis detallado que tomará varios años, pues la mayoría de los taxa registrados se consideran cosmopolitas. Esto vuelve aún más difícil discriminar la especie original, ya que es necesario secuenciar especímenes de o cerca de la localidad tipo original, además del análisis morfológico detallado. Todo parece indicar que efectivamente se trata de especies diferentes, por lo cual es urgente que se lleven a cabo medidas de protección y uso sustentable en la mayor parte de los sistemas dulceacuícolas naturales de nuestro país, pues aparte de proveer un recurso indispensable para la vida, constituyen un acervo en cuanto a biodiversidad aún mayor de lo que actualmente se conoce y que es consistente con las diferentes regiones geográficas de nuestro país, desde las selvas tropicales en el sureste hasta las regiones semidesérticas del norte. Es así que la fauna de rotíferos muestra un gradiente latitudinal y altitudinal consistente y específico para cada región. Solamente unas cuantas especies se distribuyen ampliamente en toda la geografía de México, tal como se señaló anteriormente con el ejemplo de *Brachionus havanaensis* y *Keratella americana*.

Cabe señalar que los resultados obtenidos fueron generados por Alma Estrella García Morales, quien los utilizó para realizar su tesis doctoral titulada “Códigos de barras y análisis filogeográfico de rotíferos (Monogononta, Ploima) del sureste mexicano”.

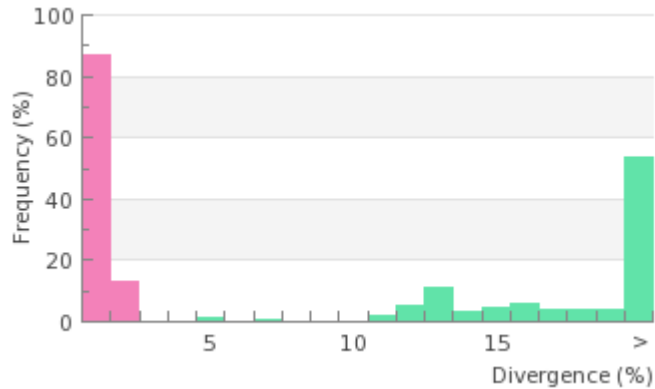
Cladocera

Al igual que los rotíferos, este es un grupo que actualmente ha tenido muchos cambios, debido a la detección de nuevos géneros (Van Damme et al. 2010; Van Damme & Sinev 2011; Sinev & Atroschenko 2011) y especies (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno 2008; Quiroz-Vazquez & Elias-Gutierrez 2009; Kotov & Taylor 2010; Kotov & Alonso 2010; Korovchinsky & Sheveleva 2011; Korovchinsky & Timms 2011) en todo el mundo, incluyendo nuestro país. Además existen nuevas inferencias filogenéticas (Forro et al. 2008a; Kotov & Elias-Gutierrez 2009), que han permitido especular sobre una diversidad mucho mayor de la conocida (Korovchinsky 1996; Adamowicz & Purvis 2005; Forro et al. 2008b), por lo que cada vez se requieren análisis más detallados que incluyan a los machos (Kotov 2008; Kotov et al. 2009), los cuales no se encuentran fácilmente en la naturaleza, por lo que requieren que hembras partenogénicas sean cultivadas en el laboratorio y se lleve a cabo la inducción artificial de los machos (Kim et al. 2006). Esta labor representa un enorme reto, como ya se vió con los rotíferos y requiere de un trabajo a largo plazo. A pesar de lo anterior, la base de datos que se presenta es la más completa que existe a nivel mundial sobre este grupo. El árbol con las especies identificadas se presenta en el Anexo 6.

Por las razones señaladas anteriormente, también se han presentado una serie de nombres interinos en varios casos, que a continuación se analizarán. En otros como *Ceriodaphnia dubia* se ha utilizado el nombre asignado por especialistas desde hace varios años (Berner 1986), pero es posible que cambie en un futuro, debido a que, por ejemplo, esta especie fue originalmente descrita en Sumatra (Richard 1894) y hasta el momento no ha sido posible comparar con topotipos todo el material procedente de Norteamérica.

A continuación se realizará una revisión de los principales resultados obtenidos por género en el grupo de cladóceros. Esta revisión se realizará con un poco más de detalle que en rotíferos, ya que no se ha elaborado hasta este momento una publicación de los resultados obtenidos. Es importante señalar que existen casos de los denominados “singletones” o “dobletones”, que son grupos formados por uno o dos ejemplares en el árbol. Estos no serán discutidos, debido a que solo están representados por uno o dos ejemplares. Se requiere atención específica para cada uno de esos casos y es necesario secuenciar más material procedente de la misma población para verificar si efectivamente se trata de haplotipos y por lo tanto especies diferentes.

La distancia intraespecífica promedio fue de 0.518 con una interespecífica de 19.002, por lo que se considera que este marcador es excelente para identificar las especies de cladóceros. No hubo un solapamiento entre ambos valores como se aprecia en la Gráfica 2.



Gráfica 2.- Muestra los valores de divergencia intraespecífica (rosa) e interespecífica (verde). Como se aprecia las barras verdes no se traslapan con las rosas, lo que indica una correcta separación de las especies. El valor mínimo en la secuencia interespecífica alrededor de 5.0 se debe al complejo que representa *Moina micrura*.

Orden Ctenopoda
Familia Sididae

Diaphanosoma

Se detectaron 8 especies de *Diaphanosoma* con los códigos de barras. En México se reconocen 5 especies registradas (Elías-Gutiérrez et al. 2008b), por lo que las otras tres posiblemente sean nuevas para la ciencia, por eso se designaron como “sp”. Aparentemente se encontraron al menos dos especies más dentro de lo que se ha designado como el complejo *birgei* por Elías-Gutiérrez et al. (2008) y otra más que aparentemente es una nueva especie en el norte del país (*Diaphanosoma* sp1).

Diaphanosoma spinulosum se registró por primera vez en México y es una especie cuya distribución original se limitaba a Sudamérica (Korovchinsky 1992).

Latonopsis

Korovchinsky (1992) reconoce dos especies de este género, pero en uno de ellos es un complejo reconocido (*L. australis*). Recientemente se describió una nueva especie de este género, pero es

necesaria una revisión exhaustiva, pues en el caso de México se encontraron dos especies pertenecientes al complejo *australis* en el sureste.

Sarsilatona

De este género se encontró solamente una especie, *Sarsilatona serricauda*, previamente registrada por (Korovchinsky & Elías-Gutiérrez 2000) en el sureste.

Anomopoda

Familia Daphnidae

Esta familia incluye varios géneros sumamente complejos para su estudio, como *Daphnia*. Por ejemplo *Daphnia pulex* es una de las especies más estudiada desde diversos puntos de vista que van desde ecológicos, toxicológicos, genéticos, etc (Steiner 2004; Matthes 2004; Nandini et al. 2005; Mergeay et al. 2005; Gelinas et al. 2007; Sarma et al. 2007; Pena-Aguado et al. 2008). A pesar de lo anterior, no se ha establecido claramente la identidad de esta especie. Una búsqueda sencilla en BOLD, o en GenBank arroja al menos 5 o 6 haplotipos diferentes, todos denominados *Daphnia pulex*. Jeffery et al. (2011) reconocen a esta especie como un complejo, todavía sin definir.

En el caso de México, se encontró una de las pocas especies distribuidas desde aquí hasta Canadá y que fue denominada *Daphnia cf. pulex* sp.2 por Jeffery et al. (2011). Otra especie dentro del mismo complejo descrita por (Hebert & Finston 1996) son *Daphnia cheraphila*, distribuida del centro al norte del país y muy probablemente hasta el sur de Canadá y *Daphnia schodleri*, un taxa sumamente enigmático y posiblemente también compuesto por un complejo de especies crípticas. Otras especies del género son *Daphnia laevis*, que posiblemente represente dos especies, una de ellas descrita como subespecie, procedente del Lago de Pátzcuaro (Kraus 1986), y *Daphnia ambigua*, la cual forma un grupo consistente y similar al ya descrito para Norteamérica (Hebert et al. 2003b).

Ceriodaphnia

Este género representa un verdadero reto para su análisis. Existen numerosos complejos de especies y algunas indescritas, reconocidas previamente por Elías-Gutiérrez et al. (2008). Al

inicio de esta sección ya se habló un poco de *Ceriodaphnia dubia*, que además es una de las especies con más amplia distribución en nuestro país. Probablemente se trata de un taxa no descrito hasta el momento. Otro complejo es el que representa el grupo *cornuta-rigaudi*, que hasta el momento no se ha estudiado con detenimiento. Dentro de este complejo solo registramos *C. cf. rigaudi* desde el Estado de México a Campeche, pero posiblemente existen 2 especies distintas en nuestro país, una bien definida en el norte y la otra del centro al sureste. Finalmente, otra tres especies muy importantes en el centro del país son *C. cf. laticaudata*, otra posiblemente no descrita, relacionada con *C. dubia*, pero restringida al Estado de Puebla, probablemente originada en la zona de los axalapascos, de una forma similar a como ocurrió con *Leptodiptomus garciai* Osorio Tafall, por lo que se podría tratarse también de una especie endémica. Finalmente existe una tercera, denominada *C. cf. reticulata* también limitada al centro del país y con un solo registro procedente de Chiapas.

Simocephalus

Es un género cuya revisión global (Orlova-Bienkowskaja 2001) requiere numerosos ajustes, pues también existen numerosos taxas inciertos. Además los caracteres utilizados por esta autora son bastante limitados, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas características morfológicas que definan a las especies. Las especies más representativas fueron *S. exspinosus* y un taxa, posiblemente indescrito (*Simocephalus* sp.), limitado al centro del país.

Scapholeberis

Se registraron los dos taxa previamente registrados (Elías-Gutiérrez et al., 2008), *S. armata freyi* y *S. duranguensis* Quiroz-Vázquez & Elías-Gutiérrez, 2009, que amplió su ámbito de distribución del norte al centro del país.

Moinidae

En este caso, se confirmó y amplió la distribución de *Moina macrocopa* en el centro del país, con registros en Puebla y Aguascalientes. Previamente solo había sido registrada en el Lago de Texcoco. Este cladócero también tiene una distribución muy amplia, hasta el norte de Canadá. Otro caso muy complejo es el que representa el grupo de *Moina micrura*, la cual ya conforma un grupo de cinco posibles especies, todas indescritas hasta el momento. Esto ya fue discutido por Elías-Gutiérrez et al. (2008).

Bosminidae

Este es un grupo, que a pesar de las revisiones globales (Kotov et al. 2009), aun requieren de un análisis. En el caso de México se encontró que la familia forma un grupo bastante compacto, lo que confirma su probable origen monofilético, compuesto por *Bosmina* cf. *liederi*, *Bosmina huaronensis* y *Bosmina tubicen*, esta última con dos haplotipos en el sureste del país, que muestran una consistencia geográfica y con una divergencia muy baja para ser considerados como especies distintas.

Familias Ilyocryptidae y Macrothricidae

Ilyocryptus

En este caso se tienen dos especies ya secuenciadas. Actualmente se reconocen 28 dentro del género (Kotov & Stifter 2006) a nivel mundial y en México se han registrado 5 especies, por lo que todavía faltan algunas por trabajar. En dos casos, el de *I. nevadensis* e *I. paranaensis inarmatus*, se requiere visitar las localidades tipo: Laguna de El Sol en el Nevado de Toluca y un estanque en Tabasco para obtener material original. Es necesario comparar *I. agilis* del sureste con material del norte para establecer si efectivamente se trata de esta especie o una especie similar.

En el caso de *Macrothrix* y todos los integrantes de Macrothricidae, han resultado uno de los grupos más difíciles de secuenciar. En este informe se incluyen dos especies del sureste *Macrothrix spinifer* y *M. elegans*, ambas con distribución hacia Sudamérica. Este género está representado por 13 especies en México, pero ha sido un problema obtener secuencias de todas. Es muy probable que se requiera el desarrollo de oligonucleótidos específicos para este género.

Familia Chydoridae

Subfamilia Aloninae

Esta subfamilia es una de las más complicadas dentro del grupo de cladocera. Solamente del género *Alona*, se han reconocido 140 especies de casi 240 descritas, y el rompecabezas aún está lejos de resolverse (Van Damme et al. 2010). En este caso existen variso géneros más que todavía

están en proceso de reconocimiento y por lo tanto es difícil establecer claramente los nombres definitivos de miembros de esta subfamilia.

Alona

Como ya se mencionó es uno de los géneros más complejos y en esta parte se realizarán solamente algunas acotaciones respecto a los taxa encontrados. En primer lugar es interesante mencionar *Alona cf. affinis* y *Alona pectinata*, ambas especies en revisión y proceso de separación del género *Alona* (Van-Damme et al., 2010). Lo interesante es que estas dos especies forman un grupo bastante compacto junto con *Karualona penuelasi* y estos tres grupos habían sido considerados un género aparte, *Biapertura*, debido a la presencia de solo dos poros cefálicos (Smirnov 1974). Es posible que en realidad este género si exista o incluso se trate de una combinación de varios géneros. En el caso de *A. pectinata* se describió en la zona de Calakmul del vecino estado de Campeche (Elias-Gutierrez & Suarez-Morales 1999) y se encuentra ampliamente distribuída en Quintana Roo, al igual que *Karualona penuelasi* y *Alona cf. affinis*. Dentro del género *Alona* s. str. están *A. cf. setulosa* y *A. cf. setulosa* 1, sin embargo es necesario revisar con detalle ambas especies para asignar un nombre definitivo.

Oxyurella

Se han registrado dos especies en este género: *O. longicaudis* y *O. ciliata*, ambas del sureste (Elias-Gutierrez et al. 2006). Solo se ha secuenciado con varios especímenes a *O. longicauda* y existe un singleton que se separa del grupo, este requiere un análisis cuidadoso.

Leydigipsis

De este género solo una especie *L. brevis* ha sido registrada en el sureste mexicano.

Kurzia

En el D.F. se registró *Kurzia cf. media*, una especie del viejo continente. Es necesario comparar con material de Europa, pues la especie no ha quedado claramente definida, pues se encuentra restringida a Europa (Hudec 2000).

Graptoleberis

Solo existe una especie reconocida *G. testudinaria*, sin embargo se especula que se trata de un complejo de especies (Hudec 1988). El material de este proyecto servirá de base para comparar con otras regiones del mundo.

Chydorinae

Pleuroxus

Es uno de los géneros más confusos y complicados para su taxonomía (Smirnov 1996). De este género se registraron tres especies, una de ellas con 7 ejemplares de diversas regiones, que no pudieron ser identificadas hasta este momento. Se consultará con otros colegas para su identificación final.

Chydorus

Este género estuvo representado por varios singletons, la única especie del género que se pudo identificar sin problema fue *C. brevilabris*, que se encuentra ampliamente distribuída en México.

Dunhevedia crassa

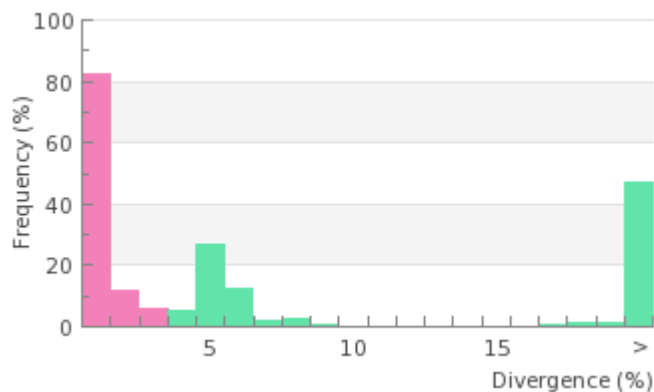
Esta especie se restringió al centro de México. Su identificación es relativamente sencilla. Posiblemente a nivel mundial se trate de otro complejo de especies crípticas pues se ha registrado en todo el mundo, e incluso se han señalado varias subespecies que podrían ser especies (Smirnov 1974).

Copepoda

Al igual que los grupos anteriores, el marcador COI ha resultado excelente para diferenciar las especies de copepoda, y en términos generales cada género mostró un grupo con mucha consistencia. Es así que *Arctodiaptomus*, *Mastigodiaptomus* y *Leptodiaptomus* en los calanoideos formaron cada uno un grupo bien definido con todas las especies secuenciadas. En el árbol del Anexo 7 se aprecian los resultados obtenidos.

En el caso de los copépodos calanoideos existen dos casos interesantes que hacen que los valores de divergencia intraespecífica suba a un promedio de 1.45%. El primero es *Mastigodiaptomus*

montezumae, que al parecer está separándose en dos entidades diferentes, por lo que tiene divergencias intraespecíficas altas, que llegan cerca de 2% pero no llegan a 3%. El otro caso es el complejo de *Arctodiaptomus*, donde la divergencia entre las especies del mismo género va de alta a muy baja, este complejo de especies requiere un análisis detallado para explicar si efectivamente se trata de un grupo que está especiando o simplemente tiene una alta variabilidad de haplotipos. Por esta razón la divergencia interespecífica se acerca a la divergencia intraespecífica, a pesar de lo anterior ambos valores no se traslapan, como se aprecia en la Gráfica 3.



Gráfica 3.- Divergencia intraespecífica (rosa) vs divergencia interespecífica (verde) en copépodos.

Calanoida

Los códigos de barras han señalado varias posibles especies crípticas en este grupo de copépodos que es necesario demostrar. Entre estas destacan *Leptodiaptomus novamexicanus*, complejo del cual ya fue demostrado que *L. garciai* Osorio-Tafall, 1942 es válido (Montiel-Martínez et al. 2008). Otros posibles complejos se encuentran en los casos de *Arctodiaptomus dorsalis*, el cual ha resultado con al menos 4 posibles especies, *Mastigodiaptomus albuquerquensis* con tres posibles especies, una de ellas denominada en este trabajo como *M. patzcuarensis*, ya discutida al inicio de esta sección. Se decidió otorgar este nombre porque consideramos que es válido y no una subespecie como fue propuesto (Kiefer 1938). Cabe señalar que tres especímenes secuenciados corresponden a la localidad tipo, el lago de Pátzcuaro (CTM0092, CTM0093 y CTM0094), pero al parecer la especie se distribuye en el Estado de México y llega hasta Puebla.

Otro caso interesante es *Mastigodiaptomus montezumae*, compuesto al parecer por dos especies sumamente similares, y que se encuentran en la misma área geográfica, pero nunca en simaptría.

El caso de *M. nesus* fue discutido con cierto detalle por Elías-Gutiérrez et al. (2008) y al parecer es otro grupo de especies, ya que la localidad tipo se encuentra en las Islas Caimán, y existe una diferencia notoria en cuanto a tamaños entre los especímenes del continente (Cervantes-Martínez et al. 2005), que puede no deberse a la alimentación.

También es importante señalar que se encontró un posible *Leptodiptomus* que no ha sido identificado en el altiplano de México, es necesario realizar un análisis más detallado, pues podría tratarse de un nuevo registro.

Los ejemplares de *Leptodiptomus siciloides* tienen una identificación provisional, pues es necesario comparar con material de la localidad tipo, en este caso los Grandes Lagos de Norteamérica. De confirmarse su identidad, sería el único copépodo calanoideo con una distribución tan amplia

Cyclopoida

Podemos señalar que con respecto a este grupo de copéodos se tiene la base de datos más amplia a nivel global, y apenas se está iniciando. No tenemos antecedentes de ningún grupo de trabajo que haya logrado el éxito que nosotros hemos obtenido con este grupo. Hasta el momento hemos podido identificar dos clusters compuestos por organismos que con los caracteres morfológicos tradicionales serían identificados como *Tropocyclops aztequei*. En este momento no ha sido posible diferenciar ambos, por lo que a uno se le asignó un nombre provisional.

Por otro lado también hemos identificado otra especie que aparentemente es *Acanthocyclops robustus*. Todos los expertos concluyen que este es un grupo de especies (Elías-Gutiérrez et al. 2008b), a partir del que se han ido describiendo otras, por ejemplo *A. rebecca* Reid & Suárez-Morales, 1999.

Otra especie muy común en Quintana Roo fue *Thermocyclops inversus*, que ya ha sido secuenciada con anterioridad (Elías-Gutiérrez et al., 2008)

Macrocyclops albidus forma dos haplotipos bien definidos, sin llegar a un umbral para ser considerados como especies diferentes, pero con consistencia geográfica, uno del sureste y otro del altiplano mexicano.

De los restantes ciclopoideos no ha sido posible identificar las especies, pues es sumamente complejo realizar este trabajo y todas las secuencias obtenidas son recientes. Se irá actualizando la base de datos conforme se identifiquen los especímenes y se validen con expertos en el tema, pues como se mencionó al inicio esta es la primera vez que un grupo amplio de especies se logra secuenciar. La enorme ventaja es que la mayoría de estas secuencias se obtuvieron a partir de fragmentos de los especímenes, o bien los huevos que portaban las hembras, quedando los apéndices en su totalidad como vouchers, de tal forma que cada espécimen que se muestra se encuentra depositado en la colección de referencia, y no como en el caso de los rotíferos, que se trata de individuos diferentes, de la misma población y recolecta, pues es necesario utilizar todo el ejemplar para obtener su secuencia.

Ostracoda

En este caso, aunque el resultado es modesto, pues solo se tienen 62 especímenes secuenciados y de estos solamente 46 tienen más de 500 pares de bases, es la primera vez que se logran secuenciar ostrácodos de agua dulce (Karanovic, com. pers.). El árbol con las especies encontradas se encuentra en el Anexo 8. De hecho se nos han enviado especímenes de otros países para iniciar el trabajo con ellos y 4 de las 62 secuencias mostradas son de Corea, y constituyen el punto de partida de material que se nos ha enviado para procesar.

Aparentemente el mayor problema es que se requiere diseñar oligonucleótidos específicos para ese grupo, por lo que actualmente estamos trabajando en este tema. A pesar de que tenemos 16 especímenes que no alcanzarán la categoría de “Códigos de Barras de Conformidad”, servirán para corroborar en lo futuro las identificaciones de este grupo, pues se ha demostrado que una secuencia de hasta 100 pares de bases puede tener un 90% de confiabilidad para utilizarse como un identificador (Meusnier et al. 2008), que de hecho es el marcador universal que se propone para el futuro, pues con la tecnología actual es posible obtener estas mini-secuencias en menos de un día.

Los datos de estas secuencias fueron utilizados para elaborar la tesis de Sergio Cohuo Durán, titulada “Revisión Taxonómica (morfológica y molecular) de los ostrácodos dulceacuícolas del Centro-sureste de México” y cuya exposición recibió el primer lugar en la XVII Reunión Nacional y X Reunión Internacional de la Sociedad Mexicana de Planctología celebrada el pasado mes de abril de este año, como ya se mencionó.

El análisis de códigos de barras nos permitió comprobar las identificaciones morfológicas, con lo que se prueba que esta técnica es confiable para la identificación de los ostrácodos e incluso reveló la posible existencia de especies crípticas.

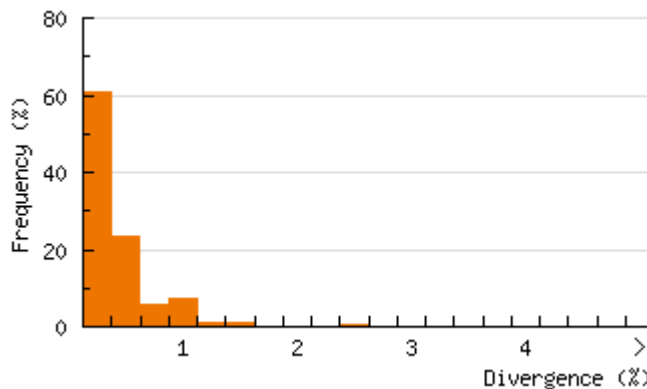
El análisis de las familias Darwinulidae y Limnocytheridae (Timiriaseviinae), nos permitió observar una discriminación muy clara. En el caso de Cypridopsis y Cyprinotinae el código de barras indicó la existencia de posibles especies crípticas dentro de ambos géneros, que deberán ser analizadas a detalle más adelante. Cabe señalar que el análisis preliminar de los morfotipos de las mismas es coincidente con el análisis molecular. Por otro lado las subfamilias Cyprettinae y Cyclocypridinae, también se discriminaron correctamente de los demás grupos de especies mexicanas. Los resultados obtenidos fueron también coincidentes con el origen geográfico del material estudiado. Esto se ve claramente con el género Cypridopsis, que fue la especie que contó con mayor número de secuencias.

Peces

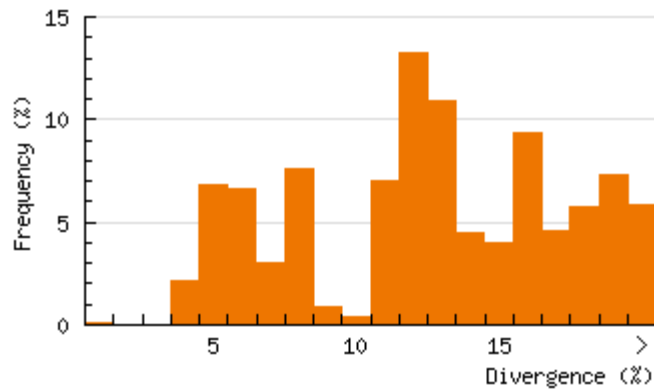
Del total de especímenes, el 94.7% de ellos fueron depositados en El Colegio de la Frontera Sur, unidad Chetumal, el resto de los ejemplares fueron depositados en El Centro de Investigaciones y de Estudios avanzados, Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto Politécnico Nacional, México, Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo y en el American Museum Of Natural History (Fig. 1).

En términos generales, los códigos de barras han sido excelentes para identificar a los peces en todo el mundo y en este caso se confirma para los peces de México (Ver árbol en el Anexo 9). Se ha demostrado que tienen más de un 90% de eficiencia en la discriminación de las especies (Ward 2009; Wong et al. 2009; Steinke et al. 2009; Valdez-Moreno et al. 2010a). Esto ocurre principalmente con las especies marinas. En el caso de las dulceacuícolas, existen grupos de reciente evolución, donde no es posible discriminar las especies con esta metodología, como se explicará más adelante. Además una explicación más detallada de este problema se trata en el trabajo de Valdez-Moreno et al. (2007).

La divergencia intraespecífica promedio fue de 0.27%, mientras que la interespecífica fue de 12.12% promedio, lo que indica que esta metodología funciona adecuadamente para el reconocimiento de la gran mayoría de las especies de peces. Además no existe traslape entre la divergencia intraespecífica e interespecífica, como se muestra en las Gráficas 5 y 6



Gráfica 5.- Muestra los valores de divergencia intraespecífica en peces.



Gráfica 6.- Muestra los valores de divergencia interespecífica en peces. Como se aprecia, no tienen los mismos porcentajes de divergencia comparados con los de la Gráfica 5

Es importante señalar que en los proyectos que forman parte de este informe, 57 especímenes carecen de georeferencias, en la mayoría de los casos se debió a que las muestras de tejido fueron obtenidas de mercados, por lo que no se sabe de donde fueron recolectadas exactamente. El resto se debió a que algunos investigadores que tomaron muestras, no nos enviaron estos datos a pesar de que en repetidas veces se les ha solicitado. También faltan 331 fotografías, es importante mencionar que cerca del 80% de las faltantes, son filetes de pescado o muestras de tejido a los cuales no se les tomaron fotografías, el resto serán subidas en el transcurso de esta revisión.

A continuación se desglosan a grandes rasgos los resultados del proyecto. Para detalles se puede consultar las publicaciones generadas con datos de estos proyectos (Valdez-Moreno et al. 2010a; Valdez-Moreno et al. 2012) y otras previas (Valdez-Moreno et al. 2009a; Victor et al. 2010; Pereira et al. 2010; Vasquez-Yeomans et al. 2011) .

El total de organismos secuenciados incluyó 34 órdenes, de los cuales 31 fueron de peces óseos, dos fueron de tiburones y uno pertenece al grupo de las rayas (Tabla 3)

Tabla 3.- Muestra los órdenes de peces que se procesaron durante este proyecto.

Ordenes	No de individuos secuenciados	No de especies
Peces óseos		
Albuliformes	303	5
Anguilliformes	68	13
Ariidae	36	4

Atheriniformes	64	9
Aulopiformes	16	7
Batrachoidiformes	11	2
Beloniformes	44	6
Beryciformes	15	7
Characiformes	153	6
Clupeiformes	160	12
Cypriniformes	79	16
Cyprinodontiformes	387	39
Elopiformes	19	2
Gadiformes	6	2
Gobiesociformes	12	2
Lepisosteiformes	1	1
Lophiiformes	14	5
Mugiliformes	35	4
Myctophiformes	10	4
Ophidiiformes	11	3
Perciformes	1803	248
Pleuronectiformes	68	15
Polymixiiformes	1	1
Salmoniformes	2	1
Scorpaeniformes	62	7
Stomiiformes	3	2
Synbranchiformes	20	2
Syngnathiformes	24	6
Tetraodontiformes	89	21
Tiburones		
Carcharhiniformes	35	7
Lamniformes	3	1
Rayas		
Torpediniformes	6	1

Como se aprecia en esta tabla, los órdenes con mayor número de especies fueron:

Perciformes (248 especies)

Cyprinodontiformes (39 especies)

Tetraodontiformes (21 especies)

Cypriniformes (16 especies)

Pleuronectiformes (15 especies)

Anguilliformes (13 especies)

Clupeiformes (13 especies)

Atheriniformes (9 especies)

En cuanto a los peces óseos, se identificaron 118 familias, 179 géneros y 438 especies que incluyen peces marino-estuarinos y dulceacuícolas (Ver Anexo 9).

Las familias con mayor número de especies se enlistan en la Tabla 4:

Familia	No de especies	No de ejemplares
Gobiidae	22	137
Cichlidae	19	173
Serranidae	17	106
Poeciliidae	16	212
Carangidae	15	87
Cyprinidae	14	67
Lutjanidae	14	142
Labridae	12	108
Haemulidae	12	98
Gerreidae	11	277
Sciaenidae	11	63
Pomacentridae	11	90
Cyprinodontidae	10	149
Labrisomidae	11	42
Scombridae	10	87
Clupeidae	9	125

El resto de las familias están representadas por 9 a una especie.

Los casos de las especies donde los códigos de barras no funcionaron de manera adecuada, como se mencionó, porque presentaron valores menores a un 2.5% de divergencia fueron las siguientes:

Familia Characidae:

Astyanax mexicanus, *Astyanax altior*, *Astyanax aeneus*, *Bramocharax caballeroi* y *Bramocharax baileyi*

Familia Atherinopsidae:

Poblana alchichica, *Poblana letholepis* y *Poblana squamata*

Familia Cyprinodontidae:

Cyprinodon artifrons, *Cyprinodon beltrani*, *Cyprinodon simus* y *Cyprinodon maya*. Estos son parte del complejo de *Cyprinodon* de la Laguna de Chichancanab.

Familia Polynemidae

Polydactylus virginicus y *Polydactylus octonemus*

Familia Mugilidae

Mugil curema y *Mugil trichodon*

Familia Labrisomidae

Malacoctenus gilli y *Malacoctenus macropus*

Familia Cyprinidae

Gila conspersa y *Campostoma*

Familia Sciaenidae

Umbrina y Sciaenidae

Familia Sciaenidae

Pareques y *Equetus lanceolatus*

En los primeros tres casos todas las especies que conforman cada grupo a pesar de que existen caracteres morfológicos que los pueden distinguir, presentan códigos de barras muy similares debido a que su divergencia evolutiva es reciente. Actualmente están siendo analizadas para validar su estatus taxonómico, para mayor información ver la discusión de los artículos de peces dulceacuícolas y marinos publicados para México (Valdez-Moreno et al. 2009b; Valdez-Moreno et al. 2010b)

En el caso de Polynemidae, Mugilidae, Labrisomidae, Cyprinidae y Scianidae dos especies formaron un solo grupo, por lo que requieren una revisión detallada para saber si se trata de sinónimos o bien la divergencia de haplotipos es muy alta, y sería de los pocos ejemplos en que este fenómeno se presenta en Actinopterygii.

Otros casos (por ejemplo, *Strongylura timucu* y *Bagre marinus*) presentaron dos grupos bien definidos con nombres iguales, por lo que requieren una revisión profunda para decidir cual de ambos tiene el nombre correcto y si se trata de especies diferentes.

Es importante mencionar que hay ejemplares que se dejaron identificados solamente a nivel de orden (Perciformes), de familia Molidae, Gobiidae Batrachoididae, Syngnathidae, Emmelichthyidae, Scorpaenidae) o género (*Atherinella*, *Haemulon Acanthocybium*, *Hirundichthys*, *Ophisternon*, *Opsanus*, *Albula*, *Microdesmus*, *Caranx*, *Decapterus*, *Diaphus*, *Apogon*, *Enneanectes*, *Ctenogobius*, *Serranus*, *Elacatinus Barbulifer*, *Menidia*, *Elacatinus*, *Liopropoma*, *Eucinostomus*, *Cubiceps*, *Calamos*, *Bregmaceros*, entre otros), debido a que requieren un análisis sumamente detallado que no fue posible realizar hasta este momento. En términos generales los principales problemas para identificar este material fue que necesitan una revisión más exhaustiva, o se trata de larvas y/o juveniles y se necesita el adulto. También hay casos de tejidos de filetes obtenidos en mercados, o bien no se ha colectado la especie por nadie más y por lo tanto no hay forma de comparar. Conforme se vayan resolviendo se irá corrigiendo la base de datos.

Finalmente, considerando que existen 2600 especies de peces óseos descritas en México, este trabajo representa el 16% del total reconocido para nuestro país.

En el caso de elasmobranquios, en este proyecto se comenzó a trabajar por vez primera con tiburones y rayas de México. Los códigos de barras separaron bien las especies del grupo. Se secuenciaron 8 familias, 12 géneros y 11 especies, siendo el grupo de los Carcarínidos el mejor representado con 6 especies (Ver árbol en el Anexo 9). La mayoría de las muestras provinieron de filetes, por lo que es necesario trabajar más con este grupo.

Conclusiones Generales

En términos generales esta técnica tiene más de un 90% de confiabilidad para reconocer a las especies desde el zooplancton hasta peces, tal como se ha confirmado con otros grupos. Al ser mayores las bases de datos, la confiabilidad de esta metodología es cada vez más sólida.

Los códigos de barras han permitido reconocer una diversidad críptica de la cual no se sabía su existencia. De ser así, la importancia de nuestro país como un acervo genético y de biodiversidad será aún más relevante de lo que actualmente es.

Es necesario realizar un trabajo detallado con las especies interinas, sin embargo la forma tradicional para describir una especie ya no se puede continuar. Es necesario realizar trabajos de taxonomía integrativa donde se conjunten datos tradicionales con biogeográficos o distribucionales, moleculares, ecofisiológicos y experimentos de hibridación con especies sexuales. No siempre es posible realizar este volumen de trabajo, sin embargo los tres primeros mencionados ya se pueden extraer de las bases de datos generadas y junto con los especímenes depositados podrán facilitar el trabajo taxonómico futuro.

Actualmente México tiene una de las bases de datos más grandes a nivel mundial para ambos grupos trabajados en este proyecto (zooplancton y peces). Esto ha llevado a un reconocimiento internacional y en junio del 2012 se designó a nuestro país como sede para llevar a cabo la II Reunión Internacional de Fish-Bol en el año 2014, ya que la base de datos presentada durante la I Reunión celebrada en Seúl (Corea), donde 26 países y 500 delegados mostraron sus resultados (Lee, in litt.), fue la más grande, completa y diversa entre todos los participantes.

Es importante señalar que las bases de datos presentadas son proyectos vivos y en constante actualización, por esta razón hacemos el compromiso de avisar a la CONABIO cualquier cambio que se realice en éstas a partir de la fecha de aprobación del Informe Final de este proyecto.

ANEXO I

Sobretiros de los artículos publicados

DNA barcoding of freshwater Rotifera in Mexico: Evidence of cryptic speciation in common rotifers

A. E. GARCÍA-MORALES and M. ELÍAS-GUTIÉRREZ

El Colegio de la Frontera Sur, Av. Centenario km 5.5, Chetumal, Quintana Roo 77014, Mexico

Abstract

DNA barcodes are useful tools to identify and discover new species in a wide range of taxa. Here, we report the first barcode study of monogonont rotifers from fresh and brackish waters in Mexico, and discuss the taxonomic implications of this work. We used DNA barcodes based on the sequence of cytochrome oxidase I to examine patterns of divergence among 417 specimens that represented 63 morphological taxa of rotifers. The mean sequence divergence among conspecific rotifer individuals was 0.75%, whereas the mean sequence divergence among congeneric taxa was 20.8%. The barcodes could discriminate between all the morphospecies identified. Moreover, the barcoding data revealed the presence of possible cryptic species in *Ascomorpha ovalis*, *Lecane bulla*, *L. cornuta*, *L. curvicornis*, *L. crepida*, *L. lunaris*, *L. hastata*, *Platyias quadricornis*, *Keratella cochlearis*, *Brachionus calyciflorus* and *Testudinella patina*, as well as in some forms and varieties such as *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* and *Mytilina ventralis* var. *macracantha*. Barcode analysis also enabled some forms and varieties of common species to be identified as separate species. The results obtained support recent taxonomic revisions, such as the recognition of the genus *Plationus*, and the presence of cryptic speciation in *L. bulla*. This work shows that DNA barcoding identifies species effectively, can aid taxonomists by identifying cryptic species, and is an important tool for resolving taxonomic controversies.

Keywords: cryptic species, DNA barcoding, Mexico, rotifers

Received 15 December 2011; revision received 27 June 2012; accepted 4 July 2012

Introduction

Rotifera are a group of bilaterally symmetrical, eutelic, pseudocoelomates (Wallace 2002) that encompass approximately 2 000 taxa (Segers 2007). They are abundant, microscopic animals (50–2 000 μm) that are found in freshwater and brackish habitats, from large, permanent lakes to small temporary pools; they are also found in the soil and in association with lichens and mosses (Wallace *et al.* 2006). All rotifers possess three main features: an anterior ciliated corona, a specialized pharynx (the mastax) with hard jaws called trophi and a stiff body wall called the lorica. In general, rotifers reproduce by parthenogenesis and produce small propagules. These propagules are resistant to harsh environmental conditions and are adapted to ensure their passive dispersal (Ricci & Balsamo 2000). Rotifers play a pivotal role in aquatic food webs by transferring energy from bacteria and algae to higher trophic levels, and in turn serve as prey for invertebrate predators and fish fry (Arndt 1993;

Ricci & Balsamo 2000; Wallace 2002). Owing to their passive dispersal, rapid reproduction and adaptability, rotifers have long been considered to be cosmopolitan organisms. However, this assumption might reflect the limited number of studies that have been conducted from a geographical perspective (Gómez 2005; Segers 2008). Data on the distribution, diversity and ecology of rotifers remain limited and are plagued by numerous cases of misidentification; in addition, most studies have focused on small, specific regions and few habitat types (Segers & De Smet 2008).

Compared with other freshwater micrometazoans, such as cladocerans and copepods, the true taxonomy of rotifers remains unclear (Wallace 2002; Segers & De Smet 2008). The causes of this are well known: very few taxonomists have sufficient training to compensate for the lack of knowledge about the systematics of rotifers (Segers 2008), and academic institutions often overlook the field of taxonomy when allocating resources. Although some proposals have been made to address the paucity of knowledge about rotifer taxonomy (Pearson *et al.* 2011), there are only a few specialists in the world who can identify a rotifer reliably. In addition, it is especially

Correspondence: Manuel Elías Gutiérrez, Fax: (983) 835 0454; E-mail: aegarcia@ecosur.mx; melias@ecosur.mx

difficult to identify most of the nonplanktonic taxa to the species level because of their small size; this is particularly the case for nonplanktonic taxa of rotifers that are interstitial and benthic (Ricci & Balsamo 2000; Mark Welch & Mark Welch 2005). Among monogonont rotifers, which represent almost 77% of species within the phylum (Segers 2007), the ability to discriminate between species on the basis of morphological characteristics is limited by the high level of phenotypic variation, which results from environmental factors, such as cyclomorphosis, and/or genetic factors (Serra *et al.* 1998; Wallace *et al.* 2006). Phenotypic plasticity is an important characteristic of monogonont rotifers, and different morphological variants have often been described as different species, subspecies, or forms (Segers & De Smet 2008). Consequently, several factors contribute to the continued uncertainty about the taxonomic status of certain morphotypes in some of the most common rotifer species (Derry *et al.* 2003; Walsh *et al.* 2009).

Molecular studies of the well-studied, commercially important rotifer *Brachionus plicatilis* have shown that this taxon is in fact a cryptic species complex that contains at least 14 genetically divergent lineages (Gómez *et al.* 2002b; Suatoni *et al.* 2006; Mills *et al.* 2007). The high levels of divergence (12%–22%), absence of hybridization, and extensive sympatry that were identified in these studies suggest that these genetic lineages constitute separate species. However, these cryptic taxa show remarkably little morphological difference. Therefore, these studies show that extensive genetic and ecological variation can occur alongside an apparent absence of morphological differentiation (Serra *et al.* 1997; Gómez *et al.* 2002a). It has been noted that such cryptic speciation is probably common in other rotifers. Many molecular studies have reported the presence of cryptic species in monogonont taxa, for example, in *Brachionus calyciflorus* (Gilbert & Walsh 2005; Xiang *et al.* 2010), *Epiphanes senta* (Schröder & Walsh 2007), *Keratella cochlearis* (Derry *et al.* 2003) and *Lecane bulla* in the Chihuahuan Desert (Walsh *et al.* 2009). In bdelloid rotifers, cryptic species have been found in the genera *Adineta*, *Rotaria* and *Philodina*. The cryptic diversity detected in the bdelloid rotifers is much higher than that in other taxonomic groups (Fontaneto *et al.* 2008, 2009, 2011). These studies provide ample evidence of how molecular techniques can be important tools for understanding the nature of genetic differentiation, which is also relevant to rotifer taxonomy.

DNA barcoding based on the sequence of the mitochondrial gene that encodes cytochrome oxidase I (COI) has been used to discriminate between species within many taxa, but it is also a useful tool to identify undescribed invertebrates (Blaxter *et al.* 2004; Hogg & Hebert 2004; Cywinska *et al.* 2006; Elías-Gutiérrez *et al.* 2008) and vertebrates (Borisenko *et al.* 2008; Clare *et al.* 2008;

Valdéz-Moreno *et al.* 2009). In recent reports, barcodes have been included among the features used to describe new cryptic vertebrate and invertebrate species from Mexico and elsewhere (Elías-Gutiérrez & Valdéz-Moreno 2008; Montiel-Martínez *et al.* 2008; Quiroz-Vázquez & Elías-Gutiérrez 2009; Lara *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011).

Notwithstanding the potential of COI DNA barcodes for taxonomic identification, their use has been demonstrated in only eight taxa of rotifers. Consequently, it is important to verify whether or not the application of such barcodes can deliver similar taxonomic resolution in rotifers to that obtained in other taxa. In the study reported herein, we examined sequence variation in the COI gene of monogonont rotifers to test the utility of COI barcodes in taxonomic identification for this taxon. At present, approximately 300 rotifer species have been reported in Mexico using traditional taxonomic approaches (Sarma 1999; García-Morales & Elías-Gutiérrez 2004; Walsh *et al.* 2009). However, this number could be an underestimate resulting from taxonomic problems that arise from the use of morphological characteristics alone.

Materials and methods

Sampling and species identification

Rotifers were collected with plankton nets at different localities in Mexico from December 2008 to September 2011 (Fig. 1; Data S1, Supporting information). For comparative purposes, we used a few individuals collected from Ontario, Canada. Different habitats were considered during the sampling (plankton, sediment, aquatic vegetation). Samples were fixed with 96% ethanol, replacing all water. In the laboratory, specimens were sorted from the samples and stored in PCR tubes with 96% ethanol until their DNA extraction. Each PCR tube contained one single rotifer to be processed. The size of the specimens ranged from 60 to 700 μm . Specialized literature was used to identify all material morphologically to the species level (Koste 1978; Koste & Shiel 1987, 1989; Segers 1995a), although a few specimens could only be identified to the genus level or higher. Voucher specimens were mounted on slides from the same clonal population representing each morphospecies, and deposited in the Reference Collection at El Colegio de la Frontera Sur unit Chetumal (hereafter Ecosur Chetumal). These specimens were mounted in a mix of glycerol and formalin, and sealed with Depex Mounting Medium. Photographs of the specimens, as well as collection data, are available in the project file 'Freshwater Rotifera from North America,' code AGROT on the Barcode of Life Data System (BOLD) at <http://www.barcodinglife.org> and GenBank (see Data S2, Supporting information).

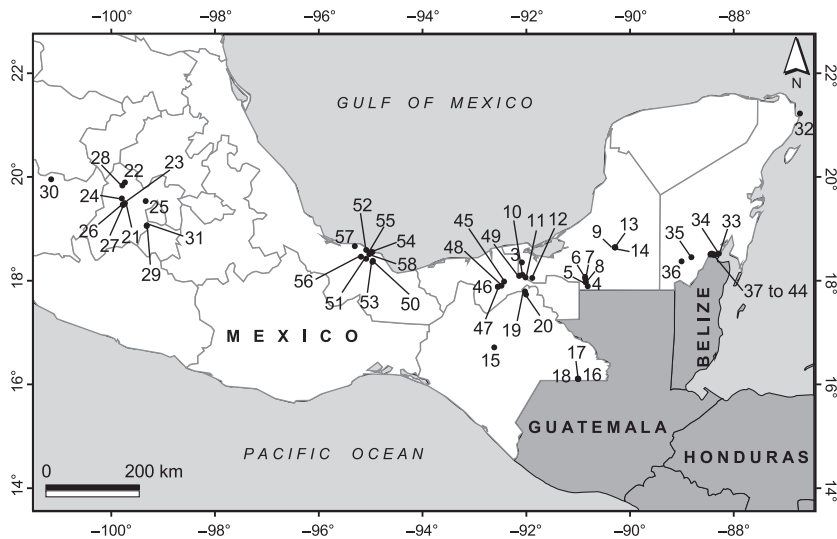


Fig. 1 Sampling sites for the taxa included in this study. Most samples were collected in Central and Southeast Mexico. The numbers correspond to the site names in Data S1 (Supporting information). Sites 1 and 2 from the Baja California peninsula are not shown.

DNA extraction, amplification, and sequencing

DNA extraction and PCR reactions were carried out at Ecosur Chetumal using the standardized protocols of this facility. DNA was extracted from the whole body in accordance with a modified HotShot protocol (Montero-Pau *et al.* 2008), and rotifers were digested using 30 μ L of alkaline lysis buffer (NaOH 25 mM, disodium EDTA 0.2 mM, pH 8.0) into 0.2-mL tubes and crushed against the sides in the bottom of the tube. Each sample was incubated at 95 $^{\circ}$ C for 30 min and stored on ice for 3–4 min. A further 30 μ L of neutralizing buffer was added to each tube and every sample was spun down. A 660-bp segment of COI was amplified using the primers LCO1490 and HCO2198 (Folmer *et al.* 1994). PCR amplifications were performed according to the standard Barcode of Life protocol (Hajibabaei *et al.* 2005). The PCR mix contained a final volume of 12.5 μ L, including 6.25 μ L of 10% trehalose, 2 μ L of ultrapure water, 1.25 μ L of 10 \times PCR buffer, 0.625 μ L of MgCl₂ (50 mM), 0.125 μ L of each primer (0.01 mM), 0.0625 μ L of each dNTP (0.05 mM), 0.06 μ L of TaqDNA polymerase (Platinum[®] Taq from Invitrogen), and 2.0 μ L of DNA template.

The PCR reactions were performed in 96-well plates using an Eppendorf thermal cycler. Thermocycling comprised an initial step of 1 min at 94 $^{\circ}$ C, 5 cycles of 40 s at

94 $^{\circ}$ C, 40 s at 45 $^{\circ}$ C and one min at 72 $^{\circ}$ C, followed by 35 cycles of 40 s at 94 $^{\circ}$ C, 40 s at 51 $^{\circ}$ C and 1 min at 72 $^{\circ}$ C, with a final step of 5 min at 72 $^{\circ}$ C. PCR products were observed in 2% agarose gels (E-Gels[®], Invitrogen) and the most intense products were selected for sequencing. Products were labelled with BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc.), and sequenced bidirectionally on an ABI 3770 automated sequencer. COI sequences were edited using SeqApp 1.9 sequence editor and aligned with CLUSTAL W (with default parameters). Sequence data for all specimens are available in the project on BOLD and the accession numbers to GenBank are provided in Data S2 (Supporting information). Sequencing was realized in the mega-facility of the Biodiversity Institute of Ontario at the University of Guelph, Canada.

Data analysis

The Kimura two-parameter (K2P) distance model was used to calculate genetic divergences (Kimura 1980). Genetic distances were calculated at the species and genus levels. A Neighbor-Joining (NJ) tree was created to provide a graphical representation of the patterns of COI divergences between rotifer species using the K2P model (Saitou & Nei 1987) and a simplified tree was constructed using the MEGA5 software (Kumar *et al.* 2004).

Table 1 Genetic divergences (K2P) at species and genus levels for the rotifer taxa included in this study

Comparisons within	Number of comparisons	Minimum (%)	Mean distance (%)	Maximum (%)	S.E.(%)
Species	1 181	0	0.75	2.99	0.026
Genera	14 181	6.51	20.85	30.84	0.028

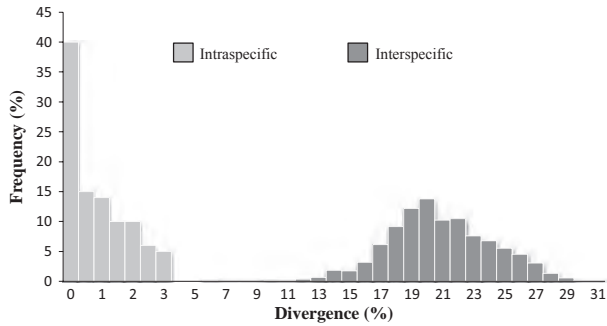


Fig. 2 Distribution of the genetic distances (K2P) within and between the rotifer species sampled.

Singletons (sole species or single specimen branches) were removed from the tree because we believe they deserve further studies with more sequencing from the same population. We used divergence values greater than 3% as the threshold for the delimitation of species (Hebert *et al.* 2003) and calculated identification success as the percentage of test specimens correctly placed in their taxon.

Results

A total of 417 specimens from 63 morphological taxa were sequenced. The morphological taxa that were identified in this study and additional information are shown in the Data S4 Table (Supporting information). The genera with the most species were *Brachionus* and *Lecane*, with 13 and 19 taxa respectively. The mean intraspecific and interspecific genetic distances for all taxa were 0.75% and 20.8% respectively (Table 1). Interspecific variation ranged from 6.5% (between *Brachionus quadridentatus f. cluniorbicularis* and *B. quadridentatus f. cluniorbicularis* AEG1) to 30.8% (between *Trichocerca longiseta* and *T. stylata*). No overlap occurred among species because intraspecific genetic variation was consistently lower than interspecific distances (Fig. 2).

In our simplified NJ tree, seven families formed cohesive groups (Fig. 3), but five of these families (Trichocercidae, Brachionidae, Lecanidae, Euchlanidae and Trichotriidae) formed several small subgroups (Fig. 3). For example, in the family Brachionidae, the genera *Platyias*, *Platyonus*, and *Brachionus* formed a single subgroup, whereas the genera *Notholca*, *Keratella* and *Kellicottia* formed three separate subgroups. In the family Euchlanidae, *Beauchampiella*, *Dipleuchlanis*, *Tripleuchlanis* and *Euchlanis* each formed a single subgroup and five subgroups were identified within the family Lecanidae. In general, the COI barcodes could successfully discriminate between rotifer species. Among the 63 morphospecies, 22% formed two or more clusters, which were analysed in detail as described in the following section.

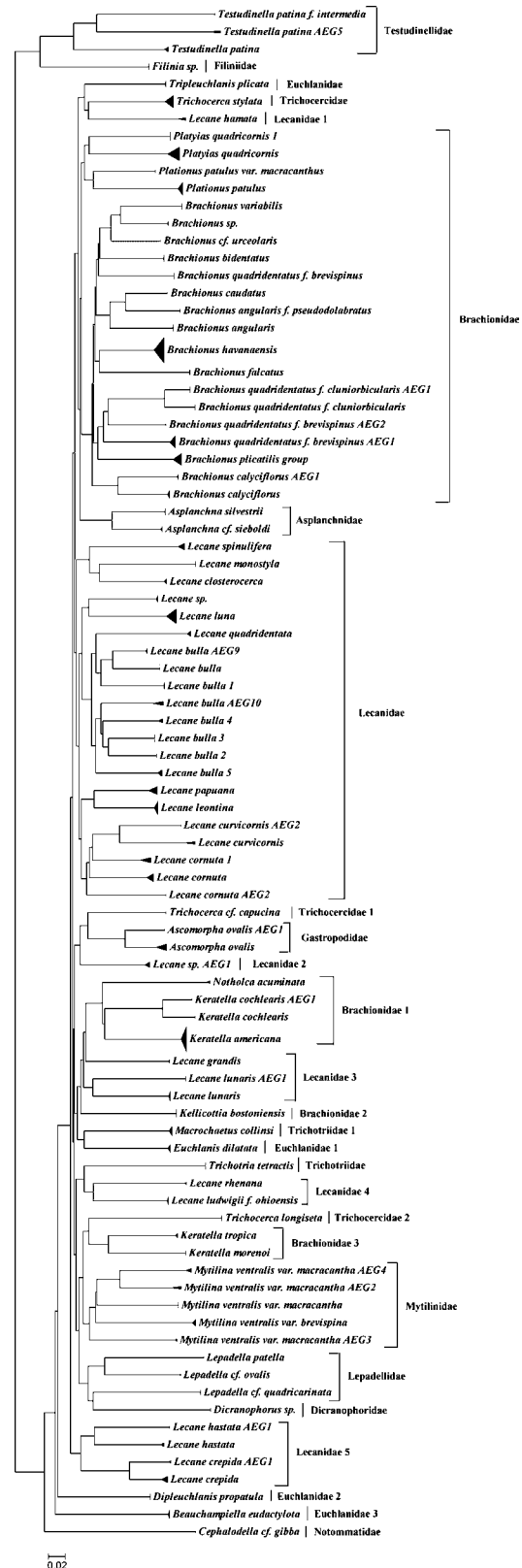


Fig. 3 Simplified NJ tree of 63 morphological taxa from Mexico. Tree is based upon K2P distances.

A full NJ tree for all 417 individuals showed that the taxa formed well-defined groups, and there was agreement between the molecular barcodes and morphological identifications (Data S3, Supporting information). Good resolution was observed in *Brachionus havanaensis*, the *B. plicatilis* complex and *Keratella americana*. The barcodes discriminated correctly between different populations of these species, and the variation followed the geographical distribution of the species. The divergence observed in the populations of *Platyonus patulus* that we examined corroborated the taxonomic position of *Platyonus* as a valid genus separate from *Brachionus* (Segers *et al.* 1993; Reyna-Fabián *et al.* 2010). However, cryptic speciation appeared to be an important factor in populations of 14 taxa (*Ascomorpha ovalis*, *Lecane bulla*, *L. cornuta*, *L. curvicornis*, *L. crepida*, *L. lunaris*, *L. hastata*, *Platyias quadricornis*, *Keratella cochlearis*, *Brachionus calyciflorus*, *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*, *Mytilina ventralis* var. *macracantha* and *Testudinella patina*). Members of these taxa showed high divergence (>3%) among populations and sometimes among individuals at the same location, as in the case of *L. bulla*. In the latter species, some individuals from the same water body in Quintana Roo State in the Yucatan Peninsula had a mean divergence of 15.6%. Conversely, in most cases, this cryptic speciation occurred only among populations at distinct geographical locations.

The levels of COI divergence among the sequenced cryptic species (mean, 20.85%) were similar to the 9%–23% levels of COI divergence found in other studies (Gómez *et al.* 2002b; Gilbert & Walsh 2005; Schröder & Walsh 2007; Walsh *et al.* 2009; Xiang *et al.* 2010). In addition, three forms of *Brachionus* (*Brachionus angularis* f. *pseudodolabratus*, *B. quadridentatus* f. *brevispinus* and *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*) and two varieties of *Mytilina* (*Mytilina ventralis* var. *macracantha* and *Mytilina ventralis* var. *brevispina*) had high levels of genetic divergence (means varied between 15.87% and 21.70%). The high levels of genetic divergence suggested that they are, in fact, different species with restricted distributions.

Discussion

This study is the first barcode survey of a large number of monogonont rotifers. The results demonstrate that the COI gene has the potential to be an effective taxonomic identification system for most rotifers, with the divergence among conspecific individuals being lower than 1%. The only exception was *Platyias quadricornis*, for which some specimens showed 2.9% divergence. Rates of divergence among genera (mean 20.8%) fall within the 9%–23% range reported for other monogonont and bdelloid rotifers (Gómez *et al.* 2002b; Gilbert & Walsh 2005;

Schröder & Walsh 2007; Walsh *et al.* 2009; Xiang *et al.* 2010; Fontaneto *et al.* 2011), and for other groups, such as freshwater Copepoda (mean, 17.8%), freshwater Cladocera (mean, 17.6%) (Elías-Gutiérrez *et al.* 2008), freshwater amphipods (4.4%–29.9%) (Witt *et al.* 2006) and Collembola (mean, 19%) (Hogg & Hebert 2004). Thus, the levels of divergence among rotifer taxa in this analysis were high and, as a result, species recognition was straightforward. Therefore, our data support the effectiveness of COI sequences for discriminating between species and detecting possible cryptic taxa.

The application of barcoding also grouped confamilial species, with 7 of the 12 families forming cohesive groups. The exceptions were the families Brachionidae, Euchlanidae, Lecanidae, Trichocercidae and Trichotriidae (Fig. 3), probably because of undersampling of the overall taxon diversity in these families (Hebert *et al.* 2003; Ball *et al.* 2005). Homoplasy is another possible cause of this failure to form cohesive groups, although Ball *et al.* (2005) have mentioned the low likelihood that very divergent taxa will converge on near-identical barcodes. Interestingly, results from a phylogenetic study by Sorensen & Giribet (2006), which combined molecular and morphological data, suggest that Brachionidae, Trichocercidae and Trichotriidae are not monophyletic families. Although Sorensen & Giribet (2006) identified Lecanidae and Euchlanidae as monophyletic groups, they only examined three *Lecane* species (*L. bulla*, *L. elsa*, and *L. leontina*) and two *Euchlanis* species (*E. alata* and *E. dilatata*). Additional phylogenetic analyses, including investigation of *Beauchampiella*, *Dipleuchlanis* and *Trip-leuchlanis*, will be necessary to elucidate the relationships within Euchlanidae. We think that limited sampling may account for the apparent lack of cohesiveness in Lecanidae. Nonetheless, given the high intraspecific variability of this family and the difficulty in ascertaining its true taxonomy, the relationships among species within Lecanidae remain unclear (Segers 1995a).

Hidden diversity

The possibility of cryptic speciation was revealed in *Lecane bulla sensu lato*, which is one of the most common and eurytopic species of the genus *Lecane* (Segers & Savatanelinton 2010). In this study, *L. bulla* was separated into eight genetically divergent clusters on the basis of the barcodes; the average divergence of these clusters was 14.69%. This finding is not surprising, given that *L. bulla* has been mentioned as one of the species that show intraspecific variability that surpasses the limits of the specific diagnosis developed to distinguish it from other species within the genus *Lecane* (Segers 1995a). In a recent molecular study that involved analysis of COI sequences, Walsh *et al.* (2009) reported cryptic

speciation (three genetic lineages) in 22 populations of *L. bulla* from the Chihuahuan Desert. These lines had mean genetic divergences that ranged from 0.9% to 16%. We analysed 18 populations of *L. bulla* from different types of freshwater systems from Central Mexico, the Gulf of Mexico and Southeast Mexico. These regions have very distinct environments and geological history. Thus, this morphologically variable taxon deserves further attention to confirm the extent of speciation within it.

In *L. cornuta*, we found three genetic groups that showed a mean divergence of 15.97%, whereas *L. curvicornis*, *L. crepida*, *L. lunaris* and *L. hastata* were each divided into two divergent lineages (mean divergences of 15.79%, 9.69%, 21.14% and 17.45% respectively). These five cosmopolitan species show intraspecific variation that is sufficiently high to have led to the description of several related taxa and frequent changes in their taxonomic classification (Segers 1995a). *Keratella cochlearis* is a taxon that shows morphological variation in the size and length of the caudal spine (Koste & Shiel 1987). In a recent molecular analysis, relatively high divergence (4.4%) was detected between spined and unspined forms of *K. cochlearis*, which suggests that they are different species (Derry *et al.* 2003). In this study, barcode analysis discriminated between two genetic clusters with a mean divergence of 7.49%. It is thought that this variability is correlated with environmental factors (Stemberger & Gilbert 1984; Koste & Shiel 1987).

The cosmopolitan species *Brachionus calyciflorus* shows considerable variation in morphology, particularly in terms of spine development (Koste & Shiel 1987). As a result, the true taxonomy in this taxon remains difficult to determine, with many described subspecies and variants. Consequently, this taxon is also in need of thorough revision (Segers 2007). Recent molecular studies demonstrated that this taxon is a complex of cryptic species (Gilbert & Walsh 2005; Xiang *et al.* 2010). For example, Gilbert & Walsh (2005) found three distinct groups that are genetically and morphologically consistent. In addition, these three groups were concordant with their geographical distribution and showed reproductive isolation. In this study, on the basis of the barcodes, *B. calyciflorus* was divided into two genetic clusters with a mean divergence of 13.93%. One cluster was from Tabasco, on the Gulf of Mexico, and the other was from the highlands of Central Mexico.

Another species that is considered to be both cosmopolitan and morphologically variable is *B. quadridentatus*. Diverse forms are known in this taxon, and its populations differ in terms of the lengths of the anterior-median and posterior spines. In the present study, we identified the forms *B. quadridentatus* f. *brevispinus* and *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*. The barcode analysis revealed

three divergent groups in *brevispinus* and two groups in *cluniorbicularis*, which showed mean divergences of 18.46% and 6.5% respectively. The *B. quadridentatus* f. *brevispinus* clusters were from Southeast Mexico and the *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* clusters were from the Baja California peninsula and Tabasco State, on the coast of the Gulf of Mexico.

Four genetic clusters were identified in *Mytilina ventralis* var. *macracantha*, three of which were from Southeast Mexico and one from Central Mexico. The mean divergence of these clusters was 20.19%. We observed some morphological differences in body shape and length of the spines among the specimens analysed (compare specimens CTM0017, ECOCHZ-AG0504, ECOCHZ-AG0735, ECOCHZ-AG0756, and ECOCHZ-AG0884 in the AGROT project in BOLD). *Ascomorpha ovalis* is a planktonic and cosmopolitan species that is found commonly in association with dinoflagellate blooms (Radwan & Bielanska-Grajner 2002). We collected the specimens of *A. ovalis* from two freshwater systems in which *Ceratium* sp. was present. The barcode analysis divided *A. ovalis* into two genetic groups, both from Central Mexico, at altitudes of 2 800 and 2 500 metres above sea level respectively. These two genetic clusters showed a mean divergence of 9.56%.

Testudinella patina and *Platyias quadricornis* belong to swimming-crawling animals that inhabit aquatic systems associated in general with plants (Koste & Shiel 1987). These planktobenthic species have a rounded shape and are flattened dorsoventrally. On the basis of our results, *P. quadricornis* was separated into two clusters that were clearly distinct and geographically consistent. One was from Veracruz on the Gulf Coast and the other from Quintana Roo, further to the southeast. The mean genetic distance between these two clusters was 20.67%. The specimens from Veracruz were smaller, more rounded and the distances between the posterior spines were not as far from each other as in the specimens from Quintana Roo (compare specimens CTM0001, CTM0007, CTM0038, CTM0045, CTM0056, ECOCHZ-AG0365, ECOCHZ-AG0366, ECOCHZ-AG0375, ECOCHZ-AG0381, ECOCHZ-AG0443, ECOCHZ-AG0521, and ECOCHZ-AG0531 in the AGROT project in BOLD). In *T. patina*, the barcode analysis revealed two divergent clusters with a mean divergence of 28.87%. The clusters were from Veracruz and Campeche on the Gulf of Mexico. We detected only slight morphological differences between them.

Remarks on some common genera

Genus Mytilina. *Mytilina* contains littoral and benthic species. *Mytilina ventralis* is the most common species in the genus and has been reported from all around the world. The shape and size of the lorica and spines in this

species are highly variable. Indeed, two varieties of *M. ventralis* have been described: the short-spined *brevispina* and the long-spined *macracantha* (Koste & Shiel 1989). In this study, specimens of *M. ventralis* var. *brevispina* from Ontario, Canada and Central Mexico showed a mean divergence of 21.70% from *M. ventralis* var. *macracantha* from Southeast Mexico. This large genetic difference indicates that these two taxa require a taxonomic revision to clarify their status.

Genus Plationus. Certain species in the genus *Plationus* (*Plationus patulus*, *P. patulus* var. *macracantha*, *P. polyacanthus* and *P. felicitas*) have been assigned alternatively to two genera, *Brachionus* and *Platyias*. In 1993, Segers and collaborators assigned these four taxa to the genus *Plationus* on the basis of scanning electron microscope images of the trophi. More recently, Reyna-Fabián *et al.* (2010) used analysis of the COI gene to investigate the taxonomic status of *Plationus*. Their results corroborated the validity of including *Plationus patulus* and *P. patulus* var. *macracanthus* within the genus *Plationus*. In this study, we have confirmed their conclusion. In our work, the mean of the genetic distances between *Plationus* and *Brachionus*, and that between *Plationus* and *Platyias* (18.97%), falls within the 16.9% to 25.8%, a similar range found by Reyna-Fabián *et al.* (2010) between different genera of Brachionidae. On the other hand, genetic divergences between our *P. patulus* sequences and those of *Plationus patulus* and *Plationus patulus macracanthus* isolate Mg11 sequences (accession numbers AF416995, DQ297786, DQ664502, and DQ664503) were 19% and 17% respectively. These values indicate the possibility that cryptic species occur within the two isolates. It should also be noted that whereas our *P. patulus* specimens were collected in South Mexico, the *Plationus patulus macracanthus* Mg11 specimens were collected in Central Mexico (Reyna-Fabián *et al.* 2010).

Genus Keratella. *Keratella americana* is a common species throughout the Americas. Within this species, the mean level of divergence within populations was 0.81%, in populations as distant as those from Baja California Sur, where there is a semi-desert environment, and those from the typical humid tropical environments of Quintana Roo. The low divergence among populations suggests a substantial capability of this species to disperse. In addition, its colonization of different areas probably occurred relatively recently. Given that the populations are very similar genetically, it is likely that dispersal occurred through migratory birds and wind.

Genus Brachionus. *Brachionus havanaensis*, which is also common in the Americas, showed relatively low

sequence divergence (mean divergence, 1.54%). However, on the basis of light microscopy and photographs, we noticed some clear morphological differences in terms of the length of the anterior and posterior spines among individuals sequenced in this study (specimens ECOCHZ-AG0461A, ECOCHZ-AG0428, ECOCH-AG0395 and ECOCHZ-AG0368 in the AGROT project in BOLD). It has been reported that this type of morphological variation in *B. havanaensis* is caused by differences in the presence of predators as well as variables such as availability of food and temperature (García *et al.* 2007; Pavón-Meza *et al.* 2007; Aránguiz-Acuña *et al.* 2010, 2011). The presence of predators, such as *Asplanchna* species, *Acanthocyclops robustus* and *Ambystoma mexicanum*, induces the development or growth of anterior and posterior spines and increases the lorica length and width in various species of rotifer (Garza-Mouriño *et al.* 2005; García *et al.* 2007; Gilbert 2009, 2011). The low level of congruence that was observed among the populations with respect to their barcode data is consistent with their high level of morphological variability.

Despite its commercial and scientific importance, the taxonomic status of *B. plicatilis* remains unclear because only 3 of 14 possible cryptic species have been described formally (Segers 1995b; Ciro-Pérez *et al.* 2001). We found three populations of the *B. plicatilis* complex in three different localities that are considered to be saline ecosystems (Alcocer & Hammer 1998): (i) an inland lagoon on Isla Mujeres, Quintana Roo; (ii) a tecto-volcanic lake (Cuitzeo) in Central Mexico; and (iii) a coastal marine lagoon (Sontecomapan) on the coast of the Gulf of Mexico. All the individuals sequenced in this study formed a single cluster with low divergence (mean divergence, 1.5%). Blast searches in the GenBank database confirmed the identity of the individuals analysed as the *Brachionus* sp. 'Almenara'. The mean genetic distance between our sequences and the isolates of *Brachionus* sp. 'Almenara' Indianrocks1, Lostlake1 and Pettaquamscutt1, 2 and 3 from the USA (Suatoni *et al.* 2006; Stelzer *et al.* 2011) was 1.2%. Our results support the view that this taxon has a high capability for long-distance dispersal and colonization of distant habitats because the 'Almenara' group was described originally in Spain. It was detected subsequently in the USA, and is now shown to occur also in Mexico. The identical or similar genetic makeup of these populations suggests that colonization events must have occurred relatively recently and rapidly. However, given that selection may also result in a similar genetic makeup, caution is warranted when attempting to draw any conclusions on this issue. We also cannot rule out the possibility of invasion of this species through human activities, such as in ballast water from ships, with subsequent dispersal by aquatic birds. For example, it has been reported that *Kellicottia bostoni*

ensis was introduced to Sweden through transfer of ballast water from North America (Arnemo *et al.* 1968), whereas *Keratella americana* and *Brachionus havanaensis* were introduced to Vietnam by ships and aircraft (Segers 2001).

The mean divergence between *B. angularis* f. *pseudolabratus* and *B. angularis* (15.87%) indicates that they are different species. The high genetic divergence (18.16%) between *B. quadridentatus* f. *brevispinus* and *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* also suggests that these two forms are different species. Whereas *B. quadridentatus* f. *brevispinus* has median-anterior and posterolateral spines that are shorter than the typical form, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* lacks caudal spines. Gilbert (2001) analysed spine development in *B. quadridentatus* females that were hatched from resting eggs collected in a billabong in Australia. He cultured some of these females for up to four generations and mentioned the possibility that two genotypes existed in the studied billabong: one that produced the basic phenotype (typical form with long spines) and another with short spines (possibly the *brevispinus* form). However, he could not establish whether these two categories reflected a genetic polymorphism within a single species or whether they were two separate sibling species.

It has been recognized that local environmental factors such as salinity and temperature might promote genetic differentiation in rotifers (Derry *et al.* 2003; Xiang *et al.* 2010). For example, populations of the *B. plicatilis* complex from saline lakes in Canada had a greater genetic diversity than was found in populations of the freshwater species *Keratella quadrata* (Derry *et al.* 2003). In addition, Alcántara-Rodríguez *et al.* (2012) reported the first population of the *B. plicatilis* complex that was adapted locally to low salinity in a freshwater crater lake in Central Mexico. Such populations are isolated genetically and reproductively from populations in Spain. However, the highest cryptic diversity has been found among bdelloid rotifers (up to 36 taxa in *Adineta vaga*) (Fontaneto *et al.* 2011). This extraordinary hidden diversity was attributed to habitat heterogeneity (different cryptic species were associated with different habitats), as well as strictly parthenogenetic reproduction and a high potential for dispersal (Fontaneto *et al.* 2009, 2011). Similarly, in this study, most of the cryptic taxa were associated with different habitats, although most were harboured within aquatic vegetation (see Data S4, Supporting information). It is likely that processes such as rapid population growth after a historical colonization event with persistent founder events in combination with rapid adaptation to the local conditions (monopolization hypothesis) (De Meester *et al.* 2002) contributed to the genetic differentiation among the populations included in this study.

Notes on biogeography. Most of the taxa that were analysed in this study are considered to comprise cosmopolitan species, and apparently show large distribution ranges. However, we found cryptic speciation in several of these cosmopolitan taxa. Dumont (1983) and Segers (1996, 2008) stated that the high proportion of widespread taxa observed in Rotifera is a result of insufficient taxonomic resolution to detect cryptic species. In addition, many habitat types and regions around the world, including Mexico, remain unstudied in terms of rotifers. Fontaneto *et al.* (2012) pointed out that the effect of sampling bias might mask distributional patterns of diversity, and concluded that this factor should be considered carefully when drawing conclusions from distributional analysis. In addition, there is a need for additional taxonomic studies throughout the world to understand the processes that drive global patterns of rotifer diversity. Indeed, recent studies have illustrated the complex patterns of diversity and distribution in this group (see Dumont 1983; Segers 1996, 2003; for more detail), which spans the spectrum from full cosmopolitanism to local endemism (Segers & De Smet 2008).

Although most of the taxa recorded in this study (40 taxa) comprise cosmopolitan species (see Data S4, in Supporting information), we detected some distributional patterns in a few of them. For example, eight species of *Lecane* analysed in this work are considered to be tropicopolitans and are distributed mainly in the Mexican tropical lowlands of the southeast of the country (Neotropical region). This pattern reflects a latitudinal gradient (tropical and subtropical) that was documented previously in this genus (Segers 1996). Other taxa, such as *Asplachna silvestrii*, *Brachionus havanaensis*, *Lecane spinulifera*, *Kellicottia bostoniensis*, *Keratella americana* and *K. morenoi*, are both Neotropical and Nearctic. In particular, *B. havanaensis* and *K. americana* are widespread throughout the Americas, although some isolated populations of these taxa have been found in the eastern hemisphere. It is likely that these findings are the result of introductions that result from human activities (Segers 2001). *Lecane spinulifera*, which was described originally in Haiti (Segers 1995a), has since spread to Brazil, Southern Mexico, and the Southern United States, which might reflect its temperature preferences.

In this study, the cosmopolitan *K. cochlearis* was found in temperate highlands. We discovered possible cryptic speciation in this species, and we suspect that topographical complexity within its range and/or local environmental conditions might account for this. In fact, this taxon has been recognized as a species complex, and it has been suggested that the diversity of this group is the result of its relatively recent radiation in North America (Segers & De Smet 2008).

Conclusions

The results of this study have shown that COI barcodes can be used to distinguish the majority of recognized rotifer species examined in this work. Barcodes can be used as a complementary tool to support species identification in Rotifera, but we emphasize that DNA barcoding should not be seen as a replacement for traditional taxonomic approaches. Barcodes are particularly useful to pinpoint cases of deep genetic divergence that may reveal previously overlooked species. The evidence for cryptic species and their apparent limited geographical distributions suggest that rotifer fauna and the processes that promote their diversity are still poorly understood. The potential underestimation of this biodiversity is particularly important because freshwater systems are threatened increasingly by human activities, including those thought to be responsible for climate change. Integrative studies that involve molecular, morphological, reproductive and ecological data are needed in order to understand this hidden diversity better. Finally, it is necessary to study larger geographical areas to elucidate the full extent of genetic differentiation of these interesting animals, which are one of the dominant groups in the continental waters of the world.

Acknowledgements

This study forms part of the doctoral studies of Alma E. García-Morales, supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant. The research was carried out as part of the Mexican Barcode of Life (MEXBOL) network through the National Laboratory for Barcodes, in particular the Chetumal Node, with the technical support of Arely Martínez Arce. Sequencing was supported by funding from the Government of Canada through Genome Canada and the Ontario Genomics Institute in support of the International Barcode of Life Project. Emerging Leaders for the Americas Program (ELAP) sponsored a fellowship to AEGM for training in the protocols and procedures of the Biodiversity Institute of Ontario. Additional support for AEGM to work at this facility was provided by Mexican Barcode of Life Network (MEXBOL) and the Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI-UNAM). The study was partially funded by CONABIO through project HE009: 'Códigos de barras de la vida en peces y zooplancton de México'. The authors thank Sarah Adamowicz, T. Ryan Gregory, Elias Piedra Ibarra, and Carmen Serranía Soto for their assistance in this research. They are also grateful to Hendrik Segers for his valuable comments on the manuscript. They thank Sergio Cohuo Durán and Giezi Yam Poot for their help with the field collections. Robert Wallace also kindly helped to revise the manuscript.

References

Alcántara-Rodríguez JA, Ciro-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Serranía-Soto C, Piedra-Ibarra E (2012) Local adaptation in populations of a

- Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshwater Biology*, **57**, 728–740.
- Alcocer J, Hammer UT (1998) Saline lake ecosystems of Mexico. *Aquatic Ecosystems Health and Management*, **1**, 291–315.
- Aránguiz-Acuña A, Ramos-Jiliberto R, Nandini S, Sarma SSS, Bustamante RO, Toledo V (2010) Benefits, costs and reactivity of inducible defenses: an experimental test with rotifers. *Freshwater Biology*, **55**, 2114–2122.
- Aránguiz-Acuña A, Ramos-Jiliberto R, Bustamante RO (2011) Experimental assessment of interaction costs of inducible defenses in plankton. *Journal of Plankton Research*, **33**, 1445–1454.
- Arndt H (1993) Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates)—a review. *Hydrobiologia*, **255/256**, 231–246.
- Arnemo R, Berzins B, Grönberg B, Mellgren I (1968) The dispersal in Swedish waters of *Kellicottia bostoniensis* (Rousselet) (Rotatoria). *Oikos*, **19**, 351–358.
- Ball SL, Hebert PDN, Burian SK, Webb J (2005) Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*, **24**, 508–524.
- Blaxter M, Elsworth B, Daub J (2004) DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades. *Proceedings of the Royal Society of London series B*, **271**, S189–S192.
- Borisenko AV, Lim BK, Ivanova NV, Hanner RH, Hebert PDN (2008) DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 471–479.
- Chen J, Li Q, Kong LF, Yu H (2011) How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: the case study of a poorly understood marine fauna. *PLoS ONE*, **6**, 1–9.
- Ciros-Pérez J, Gómez A, Serra M (2001) On the taxonomy of 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.
- Clare EL, Kerr KCR, von Königslöw TE, Wilson JJ, Hebert PDN (2008) Diagnosing mitochondrial DNA diversity: applications of a sentinel gene approach. *Journal of Molecular Evolution*, **66**, 362–367.
- Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDN (2006) Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**, 413–424.
- De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K (2002) The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, **23**, 121–135.
- Derry AM, Hebert PDN, Prepas EE (2003) Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. *Limnology and Oceanography*, **48**, 675–685.
- Dumont HJ (1983) Biogeography of rotifers. *Hydrobiologia*, **104**, 19–30.
- Elías-Gutiérrez M, Valdéz-Moreno M (2008) A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiológica*, **18**, 63–74.
- Elías-Gutiérrez M, Martínez F, Ivanova NV, Valdéz-Moreno M, Hebert PDN (2008) DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*, **1839**, 1–42.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular and Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–297.
- Fontaneto D, Boschetti C, Ricci C (2008) Cryptic diversification in ancient asexual: evidence from the rotifer *Philodina flaviceps*. *Journal for Evolutionary Biology*, **21**, 580–587.
- Fontaneto D, Kaya M, Herniou EA, Barraclough TG (2009) Extreme levels of hidden diversity in microscopic animals (Rotifera) revealed by DNA taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **53**, 182–189.
- Fontaneto D, Iakovenko N, Eyres I, Kaya M, Wyman M, Barraclough TG (2011) Cryptic diversity in the genus *Adineta* Hudson & Gosse, 1886 (Rotifera: Bdelloidea: Adinetidae): a DNA taxonomy approach. *Hydrobiologia*, **662**, 27–33.

- Fontaneto D, Barbosa AM, Segers H, Pautasso M (2012) The 'rotiferologist' effect and other global correlates of species richness in monogonont rotifers. *Ecography*, **35**, 174–182.
- García CE, Chaparro-Herrera DJ, Nandini S, Sarma SSS (2007) Life-history strategies of *Brachionus havanaensis* subject to kairomones of vertebrate and invertebrate predators. *Chemistry and Ecology*, **23**, 303–313.
- García-Morales AE, Elías-Gutiérrez M (2004) Rotifera from southeastern Mexico, new records and comments on zoogeography. *Anales del Instituto de Biología*, **75**, 99–120.
- Garza-Mouriño G, Silva-Briano M, Nandini S, Sarma SSS, Castellanos-Páez ME (2005) Morphological and morphometrical variations of selected rotifer species in response to predation: a seasonal study of selected brachionid species from lake Xochimilco (Mexico). *Hydrobiologia*, **546**, 169–179.
- Gilbert JJ (2001) Spine development in *Brachionus quadridentatus* from an Australian billabong: genetic variation and induction by *Asplanchna*. *Hydrobiologia*, **446/447**, 19–28.
- Gilbert JJ (2009) Predator-specific inducible defenses in the rotifer *Keratella tropica*. *Freshwater Biology*, **54**, 1933–1946.
- Gilbert JJ (2011) Induction of different defenses by two enemies in the rotifer *Keratella tropica*: response priority and sensitivity to enemy density. *Freshwater Biology*, **56**, 926–938.
- Gilbert JJ, Walsh EJ (2005) *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior 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, Adcock GJ, Lunt DH, Carvalho GR (2002a) The interplay between colonization history and gene flow in passively dispersing zooplankton: microsatellite analysis of rotifer resting egg banks. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**, 158–171.
- Gómez A, Serra M, Carvalho GR, Lunt DH (2002b) Speciation in ancient cryptic species complex: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, **56**, 1431–1444.
- Hajibabaei M, De Waard JR, Ivanova NV *et al.* (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences*, **360**, 1959–1967.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **270**, 313–321.
- Hogg ID, Hebert PDN (2004) Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, **82**, 749–754.
- Kimura M (1980) A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.
- Koste W (1978) *Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Ein Bestimmungswerk, begründet von Max. Vol 2 Tafelband. Voigt Überordnung Monogononta*. Germany. 673 pp.
- Koste W, Shiel RJ (1987) Rotifera from Australian inland waters II Ephyphaniidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Invertebrate Taxonomy*, **1**, 949–1021.
- Koste W, Shiel RJ (1989) Rotifera from Australian inland waters III Euchlanidae, Mytilinidae and Trichotriidae (Rotifera: Monogononta). *Transactions of the Royal Society of South Australia*, **113**, 85–114.
- Kumar S, Tamura K, Masatoshi N (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**, 150–163.
- Lara A, Ponce JL, Rodríguez R *et al.* (2010) DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 421–430.
- Mark Welch DB, Mark Welch JL (2005) The potential of genomic approaches to rotifer ecology. *Hydrobiologia*, **546**, 101–108.
- Mills S, Lunt DH, Gómez A (2007) Global isolation by distance despite strong regional phylogeography in a small metazoan. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 480–487.
- Montero-Pau J, Gómez A, Muñoz J (2008) Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods*, **6**, 218–222.
- Montiel-Martínez A, Ciroso-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Elías-Gutiérrez M (2008) Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiatomus garciai* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species. *Journal of Plankton Research*, **30**, 1079–1093.
- 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.
- Pearson D, Hamilton AL, Erwin TL (2011) Recovery plan for the endangered taxonomy profession. *BioScience*, **61**, 58–63.
- Quiroz-Vázquez P, Elías-Gutiérrez M (2009) A new species of the freshwater cladoceran genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Cladocera: Anomopoda) from the semidesert northern Mexico, highlighted by DNA barcoding. *Zootaxa*, **2236**, 50–64.
- Radwan S, Bielanska-Gräjner I (2002). Rotifera volume 6: Gastropodidae. In: *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. (Nogrady T & Segers Heds.), pp 28–54. Backhuys Publishers, The Netherlands.
- Reyna-Fabián ME, Laclette JP, Cummings MP, García-Varela M (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, Balsamo M (2000) The biology and ecology of lotic rotifers and gastrotrichs. *Freshwater Biology*, **44**, 15–28.
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-Joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406–425.
- Sarma SSS (1999) Checklist of Rotifera (rotifers) from Mexico. *Environment and Ecology*, **17**, 978–983.
- Schröder T, Walsh EJ (2007) Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species. *Hydrobiologia*, **593**, 129–140.
- Segers H (1995a) Rotifera volume 2: The Lecanidae (Monogononta). In: *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. (Dumont HJ & Nogrady Teds.), 226p. SPB Academic Publishing, The Netherlands.
- Segers H (1995b) Nomenclatural consequences of some recent studies on *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Brachionidae). *Hydrobiologia*, **313/314**, 121–122.
- Segers H (1996) The biogeography of littoral *Lecane* Rotifera. *Hydrobiologia*, **323**, 169–197.
- Segers H (2001) Zoogeography of the Southeast Asian Rotifera. *Hydrobiologia*, **446/447**, 233–246.
- Segers H (2003) A biogeographical analysis of rotifers of the genus *Trichocerca* Lamarck, 1801 (Trichocercidae, Monogononta, Rotifera), with notes on taxonomy. *Hydrobiologia*, **500**, 103–114.
- Segers H (2007) Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, **1564**, 1–104.
- Segers H (2008) Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 49–59.
- Segers H, De Smet WH (2008) Diversity and endemism in Rotifera: a review, and *Keratella* Bory de St Vincent. *Biodiversity Conservation*, **17**, 303–316.
- Segers H, Savatanelinton S (2010) A critical re-evaluation of the Lecanidae (Rotifera: Monogononta) of Thailand, with description of a new species. *International Review of Hydrobiology*, **95**, 343–351.
- Segers H, Murugan G, Dumont HJ (1993) On the taxonomy of Brachionidae: description of *Plationus* n. gen. (Rotifera, Monogononta). *Hydrobiologia*, **268**, 1–8.
- Serra M, Galiana A, Gómez A (1997) Speciation in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*, **358**, 63–70.

- Serra M, Gómez A, Carmona MJ (1998) Ecological genetics of *Brachionus* sympatric sibling species. *Hydrobiologia*, **387/388**, 373–384.
- Sorensen MV, Giribet G (2006) A modern approach to rotiferan phylogeny: combining morphological and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **40**, 585–608.
- Stelzer CP, Riss S, Stadler P (2011) Genome size evolution at the speciation level: the cryptic species complex *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 90–99.
- Stemberger RS, Gilbert JJ (1984) Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis*: induction by cyclopoid copepods and *Asplanchna*. *Freshwater Biology*, **14**, 639–647.
- Suatoni E, Vicario S, Rice S, Snell T, Caccone A (2006) An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 86–98.
- Valdéz-Moreno M, Ivanova NV, Elías-Gutiérrez M, Contreras-Balderas S, Hebert PDN (2009) Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*, **74**, 377–402.
- Wallace RL (2002) Rotifers: exquisite metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, **42**, 660–667.
- Wallace RL, Snell TW, Ricci C, Nogrady T (2006) Rotifera volume 1: Biology, ecology and systematics. In: *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. (Dumont HJ, Wallace RL, Snell TW, Ricci C & Nogrady Teds.), 2nd edition, 299 p. Kenobi Productions and Backhuys Publishers, The Netherlands.
- Walsh EJ, Schröder T, Wallace RL, Rico-Martinez R (2009) Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, **30**, 1046–1050.
- Witt JDS, Threlloff DL, Hebert PDN (2006) DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology*, **15**, 3073–3082.
- Xiang XL, Xi YL, Wen XL, Zhang JY, Ma Q (2010) Spatial patterns of genetic differentiation in *Brachionus calyciflorus* species complex collected from East China in summer. *Hydrobiologia*, **638**, 67–83.

The original idea came from both A.E.G-M. and M.E-G. A.E.G-M assembled and analysed the data. Both A.E.G-M and M.E-G drafted the manuscript.

Data Accessibility

GenBank Accessions: HM880040-HM880043, HM880047-HM880049, HM880051, HM880054-HM880056, HM880058-HM880060, HQ944301-HQ944324, HQ944326-HQ944336, HQ944338-HQ944343, HQ944345, HQ944348-HQ944350, HQ944352-HQ944359, JX216486-JX216835.

Please see Data S1 and S2 in the online supporting materials for sampling information and detailed GenBank accession numbers.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1 Sites, dates of sampling, and geographical coordinates of the water bodies sampled.

Data S2 BOLD and GenBank accession numbers for the 417 rotifers analysed in the study.

Data S3 Neighbor-joining tree with the 417 specimens examined in this study.

Data S4 Summary of the taxa identified, including number of individuals, mean intraspecific distance, habitat type, locations and distribution.

BOLD TaxonID Tree

Project : Freshwater Rotifera of North America [AGROT]
Date : 28-February-2012
Data Type : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Marker : COI-5P
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels : Country & Province, SampleID,
Filters : Length > 200
Colorization : [blue]=Stop Codons [red]=Contamination or misidentification

Sequence Count : 417
Species count : 87
Genus count : 22
Family count : 13
Unidentified : 0

Filinia sp. | ECOCHZ-AG0777 | Mexico.Mexico State
 Filinia sp. | ECOCHZ-AG0779 | Mexico.Mexico State
 Filinia sp. | ECOCHZ-AG0778 | Mexico.Mexico State
 Filinia sp. | ECOCHZ-AG0780 | Mexico.Mexico State
 Filinia sp. | ECOCHZ-AG0781 | Mexico.Mexico State
 Testudinella patina | CTM0016 | Mexico.Veracruz
 Testudinella patina | CTM0047 | Mexico.Veracruz
 Testudinella patina | CTM0035 | Mexico.Veracruz
 Testudinella patina | CTM0046 | Mexico.Veracruz
 Testudinella patina AEG5 | ECOCHZ-AG0697 | Mexico.Campeche
 Testudinella patina AEG5 | CTM0015 | Mexico.Veracruz
 Testudinella patina f. intermedia | ECOCHZ-AG0731 | Mexico.Mexico State
 Testudinella patina f. intermedia | ECOCHZ-AG0730 | Mexico.Mexico State
 Cephalodella cf. gibba | ECOCHZ-AG0828 | Mexico.Mexico State
 Cephalodella cf. gibba | ECOCHZ-AG0826 | Mexico.Mexico State
 Dicranophorus sp. | ECOCHZ-AG0580 | Mexico.Chiapas
 Dicranophorus sp. | ECOCHZ-AG0577 | Mexico.Chiapas
 Dicranophorus sp. | ECOCHZ-AG0581 | Mexico.Chiapas
 Lepadella cf. quadricarinata | ECOCHZ-AG0327 | Canada.Ontario
 Lepadella cf. quadricarinata | ECOCHZ-AG0338 | Canada.Ontario
 Lepadella cf. quadricarinata | ECOCHZ-AG0337 | Canada.Ontario
 Lepadella cf. quadricarinata | ECOCHZ-AG0318 | Canada.Ontario
 Lepadella cf. ovalis | ECOCHZ-AG0566 | Mexico.Chiapas
 Lepadella cf. ovalis | ECOCHZ-AG0768 | Mexico.Chiapas
 Lepadella patella | ECOCHZ-AG0723 | Mexico.Mexico State
 Lepadella patella | ECOCHZ-AG0724 | Mexico.Mexico State
 Mytilina ventralis var. macracantha AEG3 | ECOCHZ-AG0756 | Mexico.Campeche
 Mytilina ventralis var. macracantha AEG3 | ECOCHZ-AG0958.1 | Mexico.Campeche
 Mytilina ventralis var. brevispina | ECOCHZ-AG0736 | Mexico.Mexico State
 Mytilina ventralis var. brevispina | ECOCHZ-AG0340 | Canada.Ontario
 Mytilina ventralis var. brevispina | ECOCHZ-AG0336 | Canada.Ontario
 Mytilina ventralis var. brevispina | ECOCHZ-AG0343 | Canada.Ontario
 Mytilina ventralis var. brevispina | ECOCHZ-AG0342 | Canada.Ontario
 Mytilina ventralis var. macracantha | CTM0017 | Mexico.Veracruz
 Mytilina ventralis var. macracantha | CTM0054 | Mexico.Veracruz
 Mytilina ventralis var. macracantha | ECOCHZ-AG0377 | Mexico.Veracruz
 Mytilina ventralis var. macracantha | ECOCHZ-AG0520 | Mexico.Veracruz
 Mytilina ventralis var. macracantha | ECOCHZ-AG0376 | Mexico.Veracruz
 Mytilina ventralis var. macracantha AEG2 | ECOCHZ-AG0771 | Mexico.Chiapas
 Mytilina ventralis var. macracantha AEG2 | ECOCHZ-AG0884 | Mexico.Quintana Roo
 Mytilina ventralis var. macracantha AEG4 | ECOCHZ-AG0735 | Mexico.Mexico State
 Mytilina ventralis var. macracantha AEG4 | ECOCHZ-AG0817 | Mexico.Mexico State
 Mytilina ventralis var. macracantha AEG4 | ECOCHZ-AG0734 | Mexico.Mexico State
 Keratella morenoi | ECOCHZ-AG0804 | Mexico.Mexico State
 Keratella morenoi | ECOCHZ-AG0786 | Mexico.Mexico State
 Keratella morenoi | ECOCHZ-AG0785 | Mexico.Mexico State
 Keratella morenoi | ECOCHZ-AG0783 | Mexico.Mexico State
 Keratella tropica | ECOCHZ-AG0919.1 | Mexico.Quintana Roo
 Keratella tropica | ECOCHZ-AG0537 | Mexico.Quintana Roo
 Keratella tropica | ECOCHZ-AG0533 | Mexico.Quintana Roo
 Trichocerca longiseta | ECOCHZ-AG0738 | Mexico.Mexico State
 Trichocerca longiseta | ECOCHZ-AG0739 | Mexico.Mexico State
 Trichocerca longiseta | ECOCHZ-AG0740 | Mexico.Mexico State
 Trichocerca longiseta | ECOCHZ-AG0737 | Mexico.Mexico State
 Lecane ludwigii f. ohioensis | ECOCHZ-AG0714 | Mexico.Campeche
 Lecane ludwigii f. ohioensis | CTM0068 | Mexico.Veracruz
 Lecane ludwigii f. ohioensis | CTM0067 | Mexico.Veracruz
 Lecane ludwigii f. ohioensis | CTM0066 | Mexico.Veracruz
 Lecane ludwigii f. ohioensis | CTM0014 | Mexico.Veracruz
 Lecane ludwigii f. ohioensis | CTM0065 | Mexico.Veracruz
 Lecane rhenana | ECOCHZ-AG0907.1 | Mexico.Campeche
 Lecane rhenana | ECOCHZ-AG0909.1 | Mexico.Campeche
 Trichotria tetractis | ECOCHZ-AG0726 | Mexico.Mexico State
 Trichotria tetractis | ECOCHZ-AG0742 | Mexico.Morelos
 Trichotria tetractis | ECOCHZ-AG0725 | Mexico.Mexico State
 Trichotria tetractis | ECOCHZ-AG0729 | Mexico.Mexico State
 Trichotria tetractis | ECOCHZ-AG0728 | Mexico.Mexico State
 Trichotria tetractis | ECOCHZ-AG0727 | Mexico.Mexico State
 Euchlanis dilatata | ECOCHZ-AG0345 | Mexico.Veracruz
 Euchlanis dilatata | CTM0013 | Mexico.Veracruz
 Euchlanis dilatata | ECOCHZ-AG0519 | Mexico.Veracruz
 Euchlanis dilatata | CTM0036 | Mexico.Veracruz
 Euchlanis dilatata | CTM0034 | Mexico.Veracruz
 Euchlanis dilatata | CTM0039 | Mexico.Veracruz
 Macrochaetus collinsi | ECOCHZ-AG0881 | Mexico.Quintana Roo
 Macrochaetus collinsi | ECOCHZ-AG0861 | Mexico.Quintana Roo
 Macrochaetus collinsi | ECOCHZ-AG0862 | Mexico.Quintana Roo
 Macrochaetus collinsi | ECOCHZ-AG0479 | Mexico.Campeche
 Macrochaetus collinsi | ECOCHZ-AG0883 | Mexico.Quintana Roo
 Macrochaetus collinsi | ECOCHZ-AG0882 | Mexico.Quintana Roo
 Macrochaetus collinsi | ECOCHZ-AG0705 | Mexico.Campeche
 Kellicottia bostoniensis | ECOCHZ-AG0611 | Mexico.Mexico State
 Kellicottia bostoniensis | ECOCHZ-AG0605 | Mexico.Mexico State
 Kellicottia bostoniensis | ECOCHZ-AG0612 | Mexico.Mexico State

Kellicottia bostoniensis|ECOCHZ-AG0611|Mexico.Mexico State
 Kellicottia bostoniensis|ECOCHZ-AG0605|Mexico.Mexico State
 Kellicottia bostoniensis|ECOCHZ-AG0613|Mexico.Mexico State
 Kellicottia bostoniensis|ECOCHZ-AG0612|Mexico.Mexico State
 Kellicottia bostoniensis|ECOCHZ-AG0614|Mexico.Mexico State
 Kellicottia bostoniensis|ECOCHZ-AG0745|Mexico.Morelos
 Kellicottia bostoniensis|ECOCHZ-AG0746|Mexico.Morelos
 Lecane lunaris|ECOCHZ-AG0484|Mexico.Campeche
 Lecane lunaris|ECOCHZ-AG0500|Mexico.Campeche
 Lecane lunaris|ECOCHZ-AG0482|Mexico.Campeche
 Lecane lunaris|ECOCHZ-AG0480|Mexico.Campeche
 Lecane lunaris|ECOCHZ-AG0506|Mexico.Campeche
 Lecane lunaris|ECOCHZ-AG0481|Mexico.Campeche
 Lecane lunaris|ECOCHZ-AG0483|Mexico.Campeche
 Lecane lunaris AEG1|ECOCHZ-AG0834|Mexico.Quintana Roo
 Lecane lunaris AEG1|ECOCHZ-AG0833|Mexico.Quintana Roo
 Lecane lunaris AEG1|ECOCHZ-AG0847|Mexico.Quintana Roo
 Lecane lunaris AEG1|ECOCHZ-AG0855|Mexico.Quintana Roo
 Lecane grandis|ECOCHZ-AG0875|Mexico.Quintana Roo
 Lecane grandis|ECOCHZ-AG0874|Mexico.Quintana Roo
 Lecane grandis|ECOCHZ-AG0876|Mexico.Quintana Roo
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0585|Mexico.Quintana Roo
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0417|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0416|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0414|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0418|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0415|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0517|Mexico.Baja California Sur
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0518|Mexico.Baja California Sur
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0510|Mexico.Baja California Sur
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0570|Mexico.Chiapas
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0386|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0387|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0388|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0393|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0392|Mexico.Veracruz
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0848|Mexico.Quintana Roo
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0837|Mexico.Quintana Roo
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0838|Mexico.Quintana Roo
 Keratella americana|ECOCHZ-AG0850|Mexico.Quintana Roo
 Keratella cochlearis|ECOCHZ-AG0801|Mexico.Mexico State
 Keratella cochlearis|ECOCHZ-AG0796|Mexico.Mexico State
 Keratella cochlearis AEG1|ECOCHZ-AG0789|Mexico.Mexico State
 Keratella cochlearis AEG1|ECOCHZ-AG0790|Mexico.Mexico State
 Notholca acuminata|ECOCHZ-AG0321|Canada.Ontario
 Notholca acuminata|ECOCHZ-AG0322|Canada.Ontario
 Lecane sp. AEG1|ECOCHZ-AG0587|Mexico.Quintana Roo
 Lecane sp. AEG1|ECOCHZ-AG0872|Mexico.Quintana Roo
 Lecane sp. AEG1|ECOCHZ-AG0603A.1|Mexico.Campeche
 Lecane sp. AEG1|ECOCHZ-AG0471|Mexico.Campeche
 Ascomorpha ovalis|ECOCHZ-AG0633|Mexico.Mexico State
 Ascomorpha ovalis|ECOCHZ-AG0635|Mexico.Mexico State
 Ascomorpha ovalis|ECOCHZ-AG0632|Mexico.Mexico State
 Ascomorpha ovalis|ECOCHZ-AG0631|Mexico.Mexico State
 Ascomorpha ovalis|ECOCHZ-AG0634|Mexico.Mexico State
 Ascomorpha ovalis AEG1|ECOCHZ-AG0748|Mexico.Morelos
 Ascomorpha ovalis AEG1|ECOCHZ-AG0749|Mexico.Morelos
 Trichocerca cf. capucina|ECOCHZ-AG0624|Mexico.Mexico State
 Trichocerca cf. capucina|ECOCHZ-AG0623|Mexico.Mexico State
 Lecane cornuta AEG2|ECOCHZ-AG0555|Mexico.Campeche
 Lecane cornuta AEG2|ECOCHZ-AG0755|Mexico.Campeche
 Lecane cornuta|ECOCHZ-AG0547|Mexico.Chiapas
 Lecane cornuta|ECOCHZ-AG0569|Mexico.Chiapas
 Lecane cornuta|CTM0043|Mexico.Veracruz
 Lecane cornuta|CTM0070|Mexico.Veracruz
 Lecane cornuta|CTM0042|Mexico.Veracruz
 Lecane cornuta|CTM0041|Mexico.Veracruz
 Lecane cornutal|ECOCHZ-AG0602A.1|Mexico.Campeche
 Lecane cornutal|ECOCHZ-AG0470|Mexico.Campeche
 Lecane cornutal|ECOCHZ-AG0508|Mexico.Campeche
 Lecane cornutal|ECOCHZ-AG0917.1|Mexico.Campeche
 Lecane curvicornis|ECOCHZ-AG0553|Mexico.Campeche
 Lecane curvicornis|ECOCHZ-AG0554|Mexico.Campeche
 Lecane curvicornis AEG2|ECOCHZ-AG0766|Mexico.Chiapas
 Lecane curvicornis AEG2|ECOCHZ-AG0568|Mexico.Chiapas
 Lecane leontina|ECOCHZ-AG0918.1|Mexico.Campeche
 Lecane leontina|ECOCHZ-AG0894.1|Mexico.Campeche
 Lecane leontina|CTM0020|Mexico.Quintana Roo
 Lecane leontina|CTM0021|Mexico.Quintana Roo
 Lecane leontina|ECOCHZ-AG0351|Mexico.Veracruz
 Lecane leontina|CTM0025|Mexico.Quintana Roo
 Lecane leontina|ECOCHZ-AG0435|Mexico.Quintana Roo
 Lecane leontina|CTM0004|Mexico.Quintana Roo
 Lecane leontina|ECOCHZ-AG0844|Mexico.Quintana Roo
 Lecane leontina|ECOCHZ-AG0830|Mexico.Quintana Roo
 Lecane papuana|ECOCHZ-AG0675|Mexico.Tabasco

Lecane leontina|ECOCHZ-AG0830|Mexico.Quintana Roo
 Lecane papuana|ECOCHZ-AG0675|Mexico.Tabasco
 Lecane papuana|ECOCHZ-AG0442|Mexico.Quintana Roo
 Lecane papuana|ECOCHZ-AG0562|Mexico.Chiapas
 Lecane papuana|ECOCHZ-AG0440|Mexico.Quintana Roo
 Lecane papuana|ECOCHZ-AG0441|Mexico.Quintana Roo
 Lecane papuana|ECOCHZ-AG0683|Mexico.Campeche
 Lecane bulla5|ECOCHZ-AG0886|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla5|ECOCHZ-AG0846|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla5|ECOCHZ-AG0858|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla5|ECOCHZ-AG0857|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla5|ECOCHZ-AG0472|Mexico.Campeche
 Lecane bulla2|ECOCHZ-AG0373|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla2|ECOCHZ-AG0599A.1|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla2|ECOCHZ-AG0412|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla3|ECOCHZ-AG0526|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla3|ECOCHZ-AG0370|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla3|ECOCHZ-AG0937.1|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla3|ECOCHZ-AG0939.1|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla3|ECOCHZ-AG0527|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla3|ECOCHZ-AG0528|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla4|ECOCHZ-AG0556|Mexico.Campeche
 Lecane bulla4|CTM0002|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla4|CTM0011|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla AEG10|ECOCHZ-AG0404|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla AEG10|ECOCHZ-AG0821|Mexico.Mexico State
 Lecane bulla AEG10|ECOCHZ-AG0732|Mexico.Mexico State
 Lecane bulla1|CTM0006|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla1|ECOCHZ-AG0753|Mexico.Campeche
 Lecane bulla1|ECOCHZ-AG0754|Mexico.Campeche
 Lecane bulla1|ECOCHZ-AG0752|Mexico.Campeche
 Lecane bulla1|CTM0008|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla1|CTM0009|Mexico.Quintana Roo
 Lecane bulla|ECOCHZ-AG0598A.1|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla|ECOCHZ-AG0931.1|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla|ECOCHZ-AG0597A.1|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla|CTM0063|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla|CTM0062|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla|CTM0023|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla|ECOCHZ-AG0598|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla AEG9|ECOCHZ-AG0596|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla AEG9|ECOCHZ-AG0933.1|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla AEG9|ECOCHZ-AG0930.1|Mexico.Veracruz
 Lecane bulla AEG9|CTM0061|Mexico.Veracruz
 Lecane quadridentata|ECOCHZ-AG0895.1|Mexico.Campeche
 Lecane quadridentata|ECOCHZ-AG0859|Mexico.Quintana Roo
 Lecane quadridentata|ECOCHZ-AG0474|Mexico.Campeche
 Lecane quadridentata|ECOCHZ-AG0473|Mexico.Campeche
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0912.1|Mexico.Campeche
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0478|Mexico.Campeche
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0477|Mexico.Campeche
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0900.1|Mexico.Campeche
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0899.1|Mexico.Campeche
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0898.1|Mexico.Campeche
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0873|Mexico.Quintana Roo
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0877|Mexico.Quintana Roo
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0887|Mexico.Quintana Roo
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0878|Mexico.Quintana Roo
 Lecane luna|ECOCHZ-AG0879|Mexico.Quintana Roo
 Lecane sp.|ECOCHZ-AG0301|Canada.Ontario
 Lecane sp.|ECOCHZ-AG0300|Canada.Ontario
 Lecane sp.|ECOCHZ-AG0305|Canada.Ontario
 Lecane sp.|ECOCHZ-AG0304|Canada.Ontario
 Lecane sp.|ECOCHZ-AG0302|Canada.Ontario
 Lecane closteroerca|ECOCHZ-AG0495|Mexico.Campeche
 Lecane closteroerca|ECOCHZ-AG0494|Mexico.Campeche
 Lecane closteroerca|ECOCHZ-AG0915.1|Mexico.Campeche
 Lecane closteroerca|ECOCHZ-AG0496|Mexico.Campeche
 Lecane monostyla|CTM0052|Mexico.Veracruz
 Lecane monostyla|CTM0024|Mexico.Veracruz
 Lecane monostyla|CTM0040|Mexico.Veracruz
 Lecane monostyla|CTM0051|Mexico.Veracruz
 Lecane monostyla|ECOCHZ-AG0486|Mexico.Veracruz
 Lecane spinulifera|ECOCHZ-AG0865|Mexico.Quintana Roo
 Lecane spinulifera|ECOCHZ-AG0888|Mexico.Quintana Roo
 Lecane spinulifera|ECOCHZ-AG0863|Mexico.Quintana Roo
 Lecane spinulifera|ECOCHZ-AG0864|Mexico.Quintana Roo
 Lecane spinulifera|ECOCHZ-AG0867|Mexico.Quintana Roo
 Asplanchna cf. sieboldi|ECOCHZ-AG0669|Mexico.Tabasco
 Asplanchna cf. sieboldi|ECOCHZ-AG0670|Mexico.Tabasco
 Asplanchna cf. sieboldi|ECOCHZ-AG0671|Mexico.Tabasco
 Asplanchna cf. sieboldi|ECOCHZ-AG0667|Mexico.Tabasco
 Asplanchna silvestrii|ECOCHZ-AG0492|Mexico.Michoacan
 Asplanchna silvestrii|ECOCHZ-AG0269|Mexico.Michoacan
 Asplanchna silvestrii|ECOCHZ-AG0491|Mexico.Michoacan
 Asplanchna silvestrii|ECOCHZ-AG0493|Mexico.Michoacan

Asplanchna	silvestrii	ECOCHZ-AG0491	Mexico.Michoacan
Asplanchna	silvestrii	ECOCHZ-AG0493	Mexico.Michoacan
Asplanchna	silvestrii	ECOCHZ-AG0270	Mexico.Michoacan
Brachionus	calyciflorus	ECOCHZ-AG0608	Mexico.Mexico State
Brachionus	calyciflorus	ECOCHZ-AG0606	Mexico.Mexico State
Brachionus	calyciflorus	ECOCHZ-AG0609	Mexico.Mexico State
Brachionus	calyciflorus	ECOCHZ-AG0607	Mexico.Mexico State
Brachionus	calyciflorus	ECOCHZ-AG0610	Mexico.Mexico State
Brachionus	calyciflorus	ECOCHZ-AG0829	Mexico.Mexico State
Brachionus	calyciflorus	AEG1 ECOCHZ-AG0637	Mexico.Tabasco
Brachionus	calyciflorus	AEG1 ECOCHZ-AG0636	Mexico.Tabasco
Brachionus	calyciflorus	AEG1 ECOCHZ-AG0638	Mexico.Tabasco
Brachionus	calyciflorus	AEG1 ECOCHZ-AG0639	Mexico.Tabasco
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0357	Mexico.Veracruz
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0358	Mexico.Veracruz
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0359	Mexico.Veracruz
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0407	Mexico.Veracruz
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0356	Mexico.Veracruz
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0360	Mexico.Veracruz
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0265	Mexico.Michoacan
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0266	Mexico.Michoacan
Brachionus	plicatilis group	ECOCHZ-AG0559	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0422	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0423	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0421	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0420	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0419	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0663	Mexico.Tabasco
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0662	Mexico.Tabasco
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0666	Mexico.Tabasco
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG1 ECOCHZ-AG0665	Mexico.Tabasco
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG2 ECOCHZ-AG0684	Mexico.Campeche
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	AEG2 ECOCHZ-AG0686	Mexico.Campeche
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	ECOCHZ-AG0513	Mexico.Baja California Sur
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	ECOCHZ-AG0512	Mexico.Baja California Sur
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	ECOCHZ-AG0511	Mexico.Baja California Sur
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	ECOCHZ-AG0514	Mexico.Baja California Sur
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	ECOCHZ-AG0515	Mexico.Baja California Sur
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	AEG1 ECOCHZ-AG0672	Mexico.Tabasco
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	AEG1 ECOCHZ-AG0689	Mexico.Campeche
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	AEG1 ECOCHZ-AG0656	Mexico.Tabasco
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	AEG1 ECOCHZ-AG0654	Mexico.Tabasco
Brachionus	quadridentatus f. cluniorbicularis	AEG1 ECOCHZ-AG0653	Mexico.Tabasco
Brachionus	falcatus	ECOCHZ-AG0573	Mexico.Chiapas
Brachionus	falcatus	ECOCHZ-AG0575	Mexico.Chiapas
Brachionus	falcatus	ECOCHZ-AG0572	Mexico.Chiapas
Brachionus	falcatus	ECOCHZ-AG0574	Mexico.Chiapas
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0849	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0836	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0835	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0571	Mexico.Chiapas
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0461A	Mexico.Campeche
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0428	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0427	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0426	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0425	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0424	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0396	Mexico.Veracruz
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0408	Mexico.Veracruz
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0395	Mexico.Veracruz
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0397	Mexico.Veracruz
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0398	Mexico.Veracruz
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0403	Mexico.Veracruz
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0532	Mexico.Veracruz
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0368	Mexico.Veracruz
Brachionus	havanaensis	ECOCHZ-AG0409	Mexico.Veracruz
Brachionus	angularis	ECOCHZ-AG0523	Mexico.Veracruz
Brachionus	angularis	ECOCHZ-AG0522	Mexico.Veracruz
Brachionus	angularis	ECOCHZ-AG0524	Mexico.Veracruz
Brachionus	angularis	ECOCHZ-AG0525	Mexico.Veracruz
Brachionus	angularis	ECOCHZ-AG0379	Mexico.Veracruz
Brachionus	angularis f. pseudodolabratus	ECOCHZ-AG0429	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	angularis f. pseudodolabratus	ECOCHZ-AG0432	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	angularis f. pseudodolabratus	ECOCHZ-AG0431	Mexico.Quintana Roo
Brachionus	caudatus	CTM0048	Mexico.Veracruz
Brachionus	caudatus	CTM0037	Mexico.Veracruz
Brachionus	caudatus	ECOCHZ-AG0378	Mexico.Veracruz
Brachionus	caudatus	CTM0069	Mexico.Veracruz
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	ECOCHZ-AG0389	Mexico.Veracruz
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	ECOCHZ-AG0363	Mexico.Veracruz
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	ECOCHZ-AG0390	Mexico.Veracruz
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	ECOCHZ-AG0362	Mexico.Veracruz
Brachionus	quadridentatus f. brevispinus	ECOCHZ-AG0364	Mexico.Veracruz
Brachionus	bidentatus	ECOCHZ-AG0658	Mexico.Tabasco
Brachionus	bidentatus	ECOCHZ-AG0661	Mexico.Tabasco
Brachionus	bidentatus	ECOCHZ-AG0659	Mexico.Tabasco

Brachionus bidentatus|ECOCHZ-AG0656|Mexico.Tabasco
 Brachionus bidentatus|ECOCHZ-AG0661|Mexico.Tabasco
 Brachionus bidentatus|ECOCHZ-AG0659|Mexico.Tabasco
 Brachionus bidentatus|ECOCHZ-AG0657|Mexico.Tabasco
 Brachionus bidentatus|ECOCHZ-AG0660|Mexico.Tabasco
 Brachionus cf. urceolaris|ECOCHZ-AG0678|Mexico.Tabasco
 Brachionus cf. urceolaris|ECOCHZ-AG0677|Mexico.Tabasco
 Brachionus cf. urceolaris|ECOCHZ-AG0681|Mexico.Tabasco
 Brachionus cf. urceolaris|ECOCHZ-AG0682|Mexico.Tabasco
 Brachionus sp.|ECOCHZ-AG0691|Mexico.Campeche
 Brachionus sp.|ECOCHZ-AG0693|Mexico.Campeche
 Brachionus sp.|ECOCHZ-AG0692|Mexico.Campeche
 Brachionus variabilis|ECOCHZ-AG0810|Mexico.Mexico State
 Brachionus variabilis|ECOCHZ-AG0812|Mexico.Mexico State
 Brachionus variabilis|ECOCHZ-AG0814|Mexico.Mexico State
 Brachionus variabilis|ECOCHZ-AG0811|Mexico.Mexico State
 Brachionus variabilis|ECOCHZ-AG0813|Mexico.Mexico State
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0750|Mexico.Campeche
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0751|Mexico.Campeche
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0385|Mexico.Veracruz
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0350|Mexico.Veracruz
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0348|Mexico.Veracruz
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0372|Mexico.Veracruz
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0346|Mexico.Veracruz
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0349|Mexico.Veracruz
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0367|Mexico.Veracruz
 Plationus patulus|ECOCHZ-AG0347|Mexico.Veracruz
 Plationus patulus var. macracanthus|ECOCHZ-AG0711|Mexico.Campeche
 Plationus patulus var. macracanthus|ECOCHZ-AG0712|Mexico.Campeche
 Plationus patulus var. macracanthus|ECOCHZ-AG0700|Mexico.Campeche
 Platyias quadricornis|ECOCHZ-AG0446|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|ECOCHZ-AG0521|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|CTM0038|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|CTM0044|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|ECOCHZ-AG0375|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|ECOCHZ-AG0531|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|ECOCHZ-AG0530|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|ECOCHZ-AG0381|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|ECOCHZ-AG0365|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis|ECOCHZ-AG0366|Mexico.Veracruz
 Platyias quadricornis1|ECOCHZ-AG0444|Mexico.Quintana Roo
 Platyias quadricornis1|CTM0007|Mexico.Quintana Roo
 Platyias quadricornis1|CTM0012|Mexico.Quintana Roo
 Platyias quadricornis1|CTM0056|Mexico.Quintana Roo
 Platyias quadricornis1|CTM0005|Mexico.Quintana Roo
 Platyias quadricornis1|CTM0001|Mexico.Quintana Roo
 Platyias quadricornis1|ECOCHZ-AG0443|Mexico.Quintana Roo
 Lecane hamata|ECOCHZ-AG0590|Mexico.Quintana Roo
 Lecane hamata|ECOCHZ-AG0509|Mexico.Campeche
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0843|Mexico.Quintana Roo
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0842|Mexico.Quintana Roo
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0841|Mexico.Quintana Roo
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0840|Mexico.Quintana Roo
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0839|Mexico.Quintana Roo
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0646|Mexico.Tabasco
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0649|Mexico.Tabasco
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0650|Mexico.Tabasco
 Trichocerca stylata|ECOCHZ-AG0647|Mexico.Tabasco
 Tripleuchlanis plicata|CTM0029|Mexico.Quintana Roo
 Tripleuchlanis plicata|CTM0030|Mexico.Quintana Roo
 Tripleuchlanis plicata|ECOCHZ-AG0434|Mexico.Quintana Roo
 Tripleuchlanis plicata|CTM0031|Mexico.Quintana Roo
 Lecane crepida|ECOCHZ-AG0854|Mexico.Quintana Roo
 Lecane crepida|ECOCHZ-AG0475|Mexico.Campeche
 Lecane crepida|ECOCHZ-AG0476|Mexico.Campeche
 Lecane crepida|ECOCHZ-AG0902.1|Mexico.Campeche
 Lecane crepida|ECOCHZ-AG0536|Mexico.Campeche
 Lecane crepida AEG1|ECOCHZ-AG0901.1|Mexico.Campeche
 Lecane crepida AEG1|ECOCHZ-AG0516|Mexico.Campeche
 Lecane hastata|ECOCHZ-AG0582|Mexico.Chiapas
 Lecane hastata|ECOCHZ-AG0702|Mexico.Campeche
 Lecane hastata|ECOCHZ-AG0704|Mexico.Campeche
 Lecane hastata AEG1|ECOCHZ-AG0703|Mexico.Campeche
 Lecane hastata AEG1|ECOCHZ-AG0710|Mexico.Campeche
 Dipleuchlanis propatula|CTM0071|Mexico.Veracruz
 Dipleuchlanis propatula|CTM0053|Mexico.Veracruz
 Dipleuchlanis propatula|CTM0049|Mexico.Veracruz
 Dipleuchlanis propatula|CTM0033|Mexico.Veracruz
 Dipleuchlanis propatula|CTM0072|Mexico.Veracruz
 Beauchampiella eudactylota|ECOCHZ-AG0706|Mexico.Campeche
 Beauchampiella eudactylota|CTM0027|Mexico.Quintana Roo
 Beauchampiella eudactylota|CTM0026|Mexico.Quintana Roo
 Beauchampiella eudactylota|CTM0028|Mexico.Quintana Roo
 Beauchampiella eudactylota|CTM0019|Mexico.Quintana Roo
 Beauchampiella eudactylota|CTM0018|Mexico.Quintana Roo

Data S2. BOLD and GenBank accession numbers for the 417 rotifers used in the study.

GenBank accession number	BOLD sequence number	Taxa	Country	State/Province	Locality
JX216489	AGROT629-11	<i>Ascomorpha ovalis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216488	AGROT630-11	<i>Ascomorpha ovalis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216486	AGROT631-11	<i>Ascomorpha ovalis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216490	AGROT632-11	<i>Ascomorpha ovalis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216487	AGROT633-11	<i>Ascomorpha ovalis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216491	AGROT746-11	<i>Ascomorpha ovalis</i> AEG1	Mexico	Morelos	Laguna Zempoala 2, vertical
JX216492	AGROT747-11	<i>Ascomorpha ovalis</i> AEG1	Mexico	Morelos	Laguna Zempoala 2, vertical
JX216496	AGROT665-11	<i>Asplanchna</i> cf. <i>sieboldi</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216493	AGROT667-11	<i>Asplanchna</i> cf. <i>sieboldi</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216494	AGROT668-11	<i>Asplanchna</i> cf. <i>sieboldi</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216495	AGROT669-11	<i>Asplanchna</i> cf. <i>sieboldi</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
HM880042	AGROT269-10	<i>Asplanchna silvestrii</i>	Mexico	Michoacan	Cuitzeo lake
HM880043	AGROT270-10	<i>Asplanchna silvestrii</i>	Mexico	Michoacan	Cuitzeo lake
JX216498	AGROT482-11	<i>Asplanchna silvestrii</i>	Mexico	Michoacan	Cuitzeo lake
JX216497	AGROT483-11	<i>Asplanchna silvestrii</i>	Mexico	Michoacan	Cuitzeo lake
JX216499	AGROT484-11	<i>Asplanchna silvestrii</i>	Mexico	Michoacan	Cuitzeo lake
HQ944313	CTM018-10	<i>Beauchampiella eudactylota</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944314	CTM019-10	<i>Beauchampiella eudactylota</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944319	CTM026-10	<i>Beauchampiella eudactylota</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944320	CTM027-10	<i>Beauchampiella eudactylota</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944321	CTM028-10	<i>Beauchampiella eudactylota</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216500	AGROT704-11	<i>Beauchampiella eudactylota</i>	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216505	AGROT379-10	<i>Brachionus angularis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon

JX216501	AGROT513-11	<i>Brachionus angularis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216502	AGROT514-11	<i>Brachionus angularis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216503	AGROT515-11	<i>Brachionus angularis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216504	AGROT516-11	<i>Brachionus angularis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216506	AGROT429-10	<i>Brachionus angularis</i> f. <i>pseudodolabratus</i>	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216508	AGROT431-10	<i>Brachionus angularis</i> f. <i>pseudodolabratus</i>	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216507	AGROT432-10	<i>Brachionus angularis</i> f. <i>pseudodolabratus</i>	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216512	AGROT655-11	<i>Brachionus bidentatus</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216511	AGROT656-11	<i>Brachionus bidentatus</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216510	AGROT657-11	<i>Brachionus bidentatus</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216513	AGROT658-11	<i>Brachionus bidentatus</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216509	AGROT659-11	<i>Brachionus bidentatus</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216515	AGROT604-11	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216514	AGROT605-11	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216516	AGROT606-11	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216517	AGROT607-11	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216518	AGROT608-11	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216519	AGROT827-11	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mexico	Mexico State	Presa la Isla de las Aves
JX216522	AGROT634-11	<i>Brachionus calyciflorus</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216520	AGROT635-11	<i>Brachionus calyciflorus</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216521	AGROT636-11	<i>Brachionus calyciflorus</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216523	AGROT637-11	<i>Brachionus calyciflorus</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216524	AGROT378-10	<i>Brachionus caudatus</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944329	CTM037-10	<i>Brachionus caudatus</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944338	CTM048-10	<i>Brachionus caudatus</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944356	CTM069-10	<i>Brachionus caudatus</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol

JX216526	AGROT675-11	<i>Brachionus cf. urceolaris</i>	Mexico	Tabasco	Humedal cerca de Miguel Hidalgo
JX216525	AGROT676-11	<i>Brachionus cf. urceolaris</i>	Mexico	Tabasco	Humedal cerca de Miguel Hidalgo
JX216527	AGROT679-11	<i>Brachionus cf. urceolaris</i>	Mexico	Tabasco	Humedal cerca de Miguel Hidalgo
JX216528	AGROT680-11	<i>Brachionus cf. urceolaris</i>	Mexico	Tabasco	Humedal cerca de Miguel Hidalgo
JX216530	AGROT573-11	<i>Brachionus falcatus</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, limnetica
JX216531	AGROT574-11	<i>Brachionus falcatus</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, limnetica
JX216532	AGROT575-11	<i>Brachionus falcatus</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, limnetica
JX216529	AGROT576-11	<i>Brachionus falcatus</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, limnetica
JX216544	AGROT523-11	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216534	AGROT395-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Catemaco lake, limnetic
JX216535	AGROT396-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Catemaco lake, limnetic
JX216536	AGROT397-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Catemaco lake, limnetic
JX216537	AGROT398-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Catemaco lake, limnetic
JX216538	AGROT403-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Catemaco lake, limnetic
JX216549	AGROT424-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216548	AGROT425-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216547	AGROT426-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216546	AGROT427-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216545	AGROT428-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216550	AGROT368-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216542	AGROT572-11	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, limnetica
JX216539	AGROT847-11	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Encantada vertical
JX216541	AGROT833-11	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216540	AGROT834-11	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216543	AGROT550-11	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Campeche	Las Golondrinas
JX216533	AGROT408-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Poza Reyna, littoral
JX216551	AGROT409-10	<i>Brachionus havanaensis</i>	Mexico	Veracruz	Poza Reyna, littoral
HM880040	AGROT265-10	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Michoacan	Cuitzeo lake
HM880041	AGROT266-10	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Michoacan	Cuitzeo lake

JX216558	AGROT557-11	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Quintana Roo	Hacienda Mundaca estacion 2
JX216552	AGROT407-10	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Veracruz	Poza de los Enanos, limnetic
JX216557	AGROT356-10	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Veracruz	Sontecomapan lagoon, limnetic
JX216556	AGROT357-10	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Veracruz	Sontecomapan lagoon, limnetic
JX216555	AGROT358-10	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Veracruz	Sontecomapan lagoon, limnetic
JX216554	AGROT359-10	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Veracruz	Sontecomapan lagoon, limnetic
JX216553	AGROT360-10	<i>Brachionus plicatilis</i> group	Mexico	Veracruz	Sontecomapan lagoon, limnetic
JX216560	AGROT362-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216562	AGROT363-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216563	AGROT364-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216561	AGROT389-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216559	AGROT390-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216571	AGROT419-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216566	AGROT420-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216569	AGROT421-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216564	AGROT422-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216568	AGROT423-10	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon
JX216565	AGROT660-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216567	AGROT661-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion

JX216572	AGROT663-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216570	AGROT664-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216573	AGROT682-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG2	Mexico	Campeche	Charco 1 carr. Jonuta-Escarcega
JX216574	AGROT684-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG2	Mexico	Campeche	Charco 1 carr. Jonuta-Escarcega
JX216577	AGROT502-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	Mexico	Baja California Sur	El Rosario I, charco
JX216576	AGROT503-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	Mexico	Baja California Sur	El Rosario I, charco
JX216575	AGROT504-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	Mexico	Baja California Sur	El Rosario I, charco
JX216578	AGROT505-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	Mexico	Baja California Sur	El Rosario I, charco
JX216579	AGROT506-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	Mexico	Baja California Sur	El Rosario I, charco
JX216580	AGROT687-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AEG1	Mexico	Campeche	Charco 1 carr. Jonuta-Escarcega
JX216584	AGROT651-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216583	AGROT652-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216582	AGROT654-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216581	AGROT670-11	<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AEG1	Mexico	Tabasco	Rio de Ciudad Pemex
JX216586	AGROT689-11	<i>Brachionus</i> sp.	Mexico	Campeche	Charco 2 carr. Jonuta-Escarcega
JX216587	AGROT690-11	<i>Brachionus</i> sp.	Mexico	Campeche	Charco 2 carr. Jonuta-Escarcega
JX216585	AGROT691-11	<i>Brachionus</i> sp.	Mexico	Campeche	Charco 2 carr. Jonuta-Escarcega

JX216588	AGROT808-11	<i>Brachionus variabilis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, limnetica
JX216591	AGROT809-11	<i>Brachionus variabilis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, limnetica
JX216589	AGROT810-11	<i>Brachionus variabilis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, limnetica
JX216592	AGROT811-11	<i>Brachionus variabilis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, limnetica
JX216590	AGROT812-11	<i>Brachionus variabilis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, limnetica
JX216594	AGROT824-11	<i>Cephalodella cf. gibba</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Emiliano Zapata
JX216593	AGROT826-11	<i>Cephalodella cf. gibba</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Emiliano Zapata
JX216597	AGROT566-11	<i>Dicranophorus sp.</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, litoral
JX216596	AGROT578-11	<i>Dicranophorus sp.</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, litoral
JX216595	AGROT581-11	<i>Dicranophorus sp.</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, litoral
HQ944326	CTM033-10	<i>Dipleuchlanis propatula</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944339	CTM049-10	<i>Dipleuchlanis propatula</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944342	CTM053-10	<i>Dipleuchlanis propatula</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944358	CTM071-10	<i>Dipleuchlanis propatula</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944359	CTM072-10	<i>Dipleuchlanis propatula</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216598	AGROT345-10	<i>Euchlanis dilatata</i>	Mexico	Veracruz	Encantada lagoon
JX216599	AGROT510-11	<i>Euchlanis dilatata</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944311	CTM013-10	<i>Euchlanis dilatata</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944327	CTM034-10	<i>Euchlanis dilatata</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944328	CTM036-10	<i>Euchlanis dilatata</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944331	CTM039-10	<i>Euchlanis dilatata</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216600	AGROT775-11	<i>Filinia sp.</i>	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216602	AGROT776-11	<i>Filinia sp.</i>	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216601	AGROT777-11	<i>Filinia sp.</i>	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216603	AGROT778-11	<i>Filinia sp.</i>	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216604	AGROT779-11	<i>Filinia sp.</i>	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216610	AGROT743-11	<i>Kellicottia bostoniensis</i>	Mexico	Morelos	Laguna Zempoala 2, vertical
JX216611	AGROT744-11	<i>Kellicottia bostoniensis</i>	Mexico	Morelos	Laguna Zempoala 2, vertical
JX216605	AGROT603-11	<i>Kellicottia bostoniensis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho

JX216606	AGROT609-11	<i>Kellicottia bostoniensis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216607	AGROT610-11	<i>Kellicottia bostoniensis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216608	AGROT611-11	<i>Kellicottia bostoniensis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216609	AGROT612-11	<i>Kellicottia bostoniensis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216613	AGROT386-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216619	AGROT387-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216622	AGROT388-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216625	AGROT392-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216624	AGROT393-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216618	AGROT571-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, limnetica
JX216620	AGROT585-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna en el ejido Tres Garantias
JX216616	AGROT846-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Encantada vertical
JX216630	AGROT848-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Huay-Pix litoral
JX216623	AGROT835-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216629	AGROT836-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216612	AGROT414-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Majahual lagoon, littoral
JX216628	AGROT415-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Majahual lagoon, littoral
JX216627	AGROT416-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Majahual lagoon, littoral
JX216626	AGROT417-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Majahual lagoon, littoral
JX216621	AGROT418-10	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Veracruz	Majahual lagoon, littoral
JX216617	AGROT501-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Baja California Sur	Presa La Buena Mujer, vertical
JX216615	AGROT508-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Baja California Sur	Presa La Buena Mujer, vertical
JX216614	AGROT509-11	<i>Keratella americana</i>	Mexico	Baja California Sur	Presa La Buena Mujer, vertical
JX216632	AGROT794-11	<i>Keratella cochlearis</i>	Mexico	Mexico State	Laguna km 25 Toluca-Atacomulco
JX216631	AGROT799-11	<i>Keratella cochlearis</i>	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, litoral
JX216633	AGROT787-11	<i>Keratella cochlearis</i> AEG1	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216634	AGROT788-11	<i>Keratella cochlearis</i> AEG1	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216638	AGROT781-11	<i>Keratella morenoi</i>	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216637	AGROT783-11	<i>Keratella morenoi</i>	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan

JX216636	AGROT784-11	<i>Keratella morenoi</i>	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan
JX216635	AGROT802-11	<i>Keratella morenoi</i>	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, limnetica
JX216641	AGROT524-11	<i>Keratella tropica</i>	Mexico	Quintana Roo	Aguada cerca aeropuerto, Kohunlich
JX216639	AGROT528-11	<i>Keratella tropica</i>	Mexico	Quintana Roo	Aguada cerca aeropuerto, Kohunlich
JX216640	ROTI034-11	<i>Keratella tropica</i>	Mexico	Quintana Roo	Aguada cerca aeropuerto, Kohunlich
JX216645	AGROT596-11	<i>Lecane bulla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944316	CTM023-10	<i>Lecane bulla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944349	CTM062-10	<i>Lecane bulla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944350	CTM063-10	<i>Lecane bulla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216643	ROTI046-11	<i>Lecane bulla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216644	ROTI052-11	<i>Lecane bulla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216642	ROTI053-11	<i>Lecane bulla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944305	CTM006-10	<i>Lecane bulla</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944307	CTM008-10	<i>Lecane bulla</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944308	CTM009-10	<i>Lecane bulla</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216646	AGROT751-11	<i>Lecane bulla</i> 1	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, equiseto
JX216647	AGROT752-11	<i>Lecane bulla</i> 1	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, equiseto
JX216648	AGROT750-11	<i>Lecane bulla</i> 1	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, litoral
JX216649	AGROT373-10	<i>Lecane bulla</i> 2	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216651	AGROT412-10	<i>Lecane bulla</i> 2	Mexico	Veracruz	Majahual lagoon, littoral
JX216650	ROTI062-11	<i>Lecane bulla</i> 2	Mexico	Veracruz	Majahual lagoon, littoral
JX216653	AGROT517-11	<i>Lecane bulla</i> 3	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216656	AGROT518-11	<i>Lecane bulla</i> 3	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216657	AGROT519-11	<i>Lecane bulla</i> 3	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216652	AGROT370-10	<i>Lecane bulla</i> 3	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216654	ROTI055-11	<i>Lecane bulla</i> 3	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon

JX216655	ROTI057-11	<i>Lecane bulla</i> 3	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
HQ944302	CTM002-10	<i>Lecane bulla</i> 4	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944309	CTM011-10	<i>Lecane bulla</i> 4	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216658	AGROT551-11	<i>Lecane bulla</i> 4	Mexico	Campeche	Manantial 2
JX216663	AGROT463-11	<i>Lecane bulla</i> 5	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216661	AGROT855-11	<i>Lecane bulla</i> 5	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216660	AGROT856-11	<i>Lecane bulla</i> 5	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216662	AGROT844-11	<i>Lecane bulla</i> 5	Mexico	Quintana Roo	Laguna Encantada litoral
JX216659	AGROT884-11	<i>Lecane bulla</i> 5	Mexico	Quintana Roo	Laguna Puente Milagros 1
JX216664	AGROT404-10	<i>Lecane bulla</i> AEG10	Mexico	Veracruz	Catemaco lake, limnetic
JX216665	AGROT819-11	<i>Lecane bulla</i> AEG10	Mexico	Mexico State	Laguna Emiliano Zapata
JX216666	AGROT730-11	<i>Lecane bulla</i> AEG10	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216667	AGROT594-11	<i>Lecane bulla</i> AEG9	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944348	CTM061-10	<i>Lecane bulla</i> AEG9	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216669	ROTI045-11	<i>Lecane bulla</i> AEG9	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216668	ROTI048-11	<i>Lecane bulla</i> AEG9	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216671	AGROT485-11	<i>Lecane closterocerca</i>	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc
JX216672	AGROT486-11	<i>Lecane closterocerca</i>	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc
JX216673	AGROT487-11	<i>Lecane closterocerca</i>	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc
JX216670	ROTI030-11	<i>Lecane closterocerca</i>	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc
JX216675	AGROT570-11	<i>Lecane cornuta</i>	Mexico	Chiapas	Canal Loma Bonita
HQ944333	CTM041-10	<i>Lecane cornuta</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944334	CTM042-10	<i>Lecane cornuta</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944335	CTM043-10	<i>Lecane cornuta</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944357	CTM070-10	<i>Lecane cornuta</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216674	AGROT539-11	<i>Lecane cornuta</i>	Mexico	Chiapas	Parque Los Humedales charco 5
JX216678	AGROT499-11	<i>Lecane cornuta</i> 1	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre I
JX216679	ROTI032-11	<i>Lecane cornuta</i> 1	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc
JX216676	ROTI073-11	<i>Lecane cornuta</i> 1	Mexico	Campeche	Rio Pedro Baranda

JX216677	AGROT461-11	<i>Lecane cornuta</i> 1	Mexico	Campeche	Río Pedro Baranda
JX216680	AGROT549-11	<i>Lecane cornuta</i> AEG2	Mexico	Campeche	Aguada de la lagartera
JX216681	AGROT753-11	<i>Lecane cornuta</i> AEG2	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, equiseto
JX216682	AGROT466-11	<i>Lecane crepida</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216683	AGROT467-11	<i>Lecane crepida</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216686	AGROT527-11	<i>Lecane crepida</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216685	ROTI017-11	<i>Lecane crepida</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216684	AGROT852-11	<i>Lecane crepida</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216688	AGROT507-11	<i>Lecane crepida</i> AEG1	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre I
JX216687	ROTI016-11	<i>Lecane crepida</i> AEG1	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216689	AGROT547-11	<i>Lecane curvicornis</i>	Mexico	Campeche	Aguada de la lagartera
JX216690	AGROT548-11	<i>Lecane curvicornis</i>	Mexico	Campeche	Aguada de la lagartera
JX216692	AGROT565-11	<i>Lecane curvicornis</i> AEG2	Mexico	Chiapas	Canal Loma Bonita
JX216691	AGROT764-11	<i>Lecane curvicornis</i> AEG2	Mexico	Chiapas	Canal Loma Bonita
JX216694	AGROT872-11	<i>Lecane grandis</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216693	AGROT873-11	<i>Lecane grandis</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216695	AGROT874-11	<i>Lecane grandis</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216697	AGROT500-11	<i>Lecane hamata</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre I
JX216696	AGROT589-11	<i>Lecane hamata</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna en el ejido Tres Garantias
JX216698	AGROT700-11	<i>Lecane hastata</i>	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216700	AGROT702-11	<i>Lecane hastata</i>	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216699	AGROT582-11	<i>Lecane hastata</i>	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, litoral
JX216701	AGROT701-11	<i>Lecane hastata</i> AEG1	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216702	AGROT708-11	<i>Lecane hastata</i> AEG1	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216708	AGROT435-10	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944303	CTM004-10	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944315	CTM020-10	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216706	CTM021-10	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944318	CTM025-10	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2

JX216703	ROTI009-11	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216707	AGROT351-10	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Veracruz	Encantada lagoon
JX216705	AGROT842-11	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Encantada litoral
JX216709	AGROT828-11	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra litoral
JX216704	ROTI033-11	<i>Lecane leontina</i>	Mexico	Campeche	Rio Pedro Baranda
JX216710	AGROT712-11	<i>Lecane ludwigii</i> f. <i>ohioensis</i>	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
HQ944312	CTM014-10	<i>Lecane ludwigii</i> f. <i>ohioensis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944352	CTM065-10	<i>Lecane ludwigii</i> f. <i>ohioensis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944353	CTM066-10	<i>Lecane ludwigii</i> f. <i>ohioensis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944354	CTM067-10	<i>Lecane ludwigii</i> f. <i>ohioensis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944355	CTM068-10	<i>Lecane ludwigii</i> f. <i>ohioensis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216715	ROTI027-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre I
JX216713	AGROT468-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216714	AGROT469-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216718	ROTI013-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216717	ROTI014-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216716	ROTI015-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216712	AGROT871-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216719	AGROT875-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216720	AGROT876-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216721	AGROT877-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216711	AGROT885-11	<i>Lecane luna</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Puente Milagros 1
JX216724	AGROT497-11	<i>Lecane lunaris</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre I
JX216725	AGROT471-11	<i>Lecane lunaris</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216726	AGROT472-11	<i>Lecane lunaris</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216727	AGROT473-11	<i>Lecane lunaris</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216728	AGROT474-11	<i>Lecane lunaris</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216722	AGROT475-11	<i>Lecane lunaris</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216723	AGROT491-11	<i>Lecane lunaris</i>	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc

JX216732	AGROT853-11	<i>Lecane lunaris</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216731	AGROT845-11	<i>Lecane lunaris</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Laguna Encantada litoral
JX216730	AGROT831-11	<i>Lecane lunaris</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra litoral
JX216729	AGROT832-11	<i>Lecane lunaris</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra litoral
JX216733	AGROT477-11	<i>Lecane monostyla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944317	CTM024-10	<i>Lecane monostyla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944332	CTM040-10	<i>Lecane monostyla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944340	CTM051-10	<i>Lecane monostyla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944341	CTM052-10	<i>Lecane monostyla</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216734	CTM096-10	<i>Lecane papuana</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216737	CTM097-10	<i>Lecane papuana</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216735	CTM098-10	<i>Lecane papuana</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216739	AGROT681-11	<i>Lecane papuana</i>	Mexico	Campeche	Charco 1 carr. Jonuta-Escarcega
JX216736	AGROT559-11	<i>Lecane papuana</i>	Mexico	Chiapas	Rio Lacanju
JX216738	AGROT673-11	<i>Lecane papuana</i>	Mexico	Tabasco	Rio Usumacinta en Jonuta
JX216743	AGROT464-11	<i>Lecane quadridentata</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216740	AGROT465-11	<i>Lecane quadridentata</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216741	ROTI010-11	<i>Lecane quadridentata</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216742	AGROT857-11	<i>Lecane quadridentata</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216744	ROTI022-11	<i>Lecane rhenana</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216745	ROTI024-11	<i>Lecane rhenana</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216749	AGROT304-10	<i>Lecane sp.</i>	Canada	Ontario	grassland in Arboretum Park
JX216748	AGROT305-10	<i>Lecane sp.</i>	Canada	Ontario	grassland in Arboretum Park
JX216746	AGROT300-10	<i>Lecane sp.</i>	Canada	Ontario	wetland in Arboretum Park
JX216747	AGROT301-10	<i>Lecane sp.</i>	Canada	Ontario	wetland in Arboretum Park
JX216750	AGROT302-10	<i>Lecane sp.</i>	Canada	Ontario	wetland in Arboretum Park
JX216752	ROTI076-11	<i>Lecane sp.</i> AEG1	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre I
JX216754	AGROT462-11	<i>Lecane sp.</i> AEG1	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216753	AGROT870-11	<i>Lecane sp.</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros

JX216751	AGROT587-11	<i>Lecane sp.</i> AEG1	Mexico	Quintana Roo	Laguna en el ejido Tres Garantias
JX216756	AGROT861-11	<i>Lecane spinulifera</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216757	AGROT862-11	<i>Lecane spinulifera</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216758	AGROT863-11	<i>Lecane spinulifera</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216759	AGROT865-11	<i>Lecane spinulifera</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216755	AGROT886-11	<i>Lecane spinulifera</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Puente Milagros 1 veg.
JX216760	AGROT563-11	<i>Lepadella cf. ovalis</i>	Mexico	Chiapas	Poza en el rio del sendero Ruinas
JX216761	AGROT766-11	<i>Lepadella cf. ovalis</i>	Mexico	Chiapas	Poza en el rio del sendero Ruinas
HM880055	AGROT337-10	<i>Lepadella cf. quadricarinata</i>	Canada	Ontario	lagoon 2, Hanlon Creek Park
HM880056	AGROT338-10	<i>Lepadella cf. quadricarinata</i>	Canada	Ontario	lagoon 2, Hanlon Creek Park
HM880047	AGROT318-10	<i>Lepadella cf. quadricarinata</i>	Canada	Ontario	stream in Hanlon Creek Park
HM880051	AGROT327-10	<i>Lepadella cf. quadricarinata</i>	Canada	Ontario	stream in Hanlon Creek Park
JX216762	AGROT721-11	<i>Lepadella patella</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216763	AGROT722-11	<i>Lepadella patella</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216764	AGROT470-11	<i>Macrochaetus collinsi</i>	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II
JX216770	AGROT703-11	<i>Macrochaetus collinsi</i>	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216768	AGROT859-11	<i>Macrochaetus collinsi</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216767	AGROT860-11	<i>Macrochaetus collinsi</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216765	AGROT879-11	<i>Macrochaetus collinsi</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216769	AGROT880-11	<i>Macrochaetus collinsi</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216766	AGROT881-11	<i>Macrochaetus collinsi</i>	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
HM880054	AGROT336-10	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>brevispina</i>	Canada	Ontario	lagoon 2, Hanlon Creek Park
HM880058	AGROT340-10	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>brevispina</i>	Canada	Ontario	lagoon 2, Hanlon Creek Park
HM880059	AGROT342-10	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>brevispina</i>	Canada	Ontario	lagoon 2, Hanlon Creek Park
HM880060	AGROT343-10	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>brevispina</i>	Canada	Ontario	lagoon 2, Hanlon Creek Park
JX216771	AGROT734-11	<i>Mytilina ventralis</i> var.	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal

		<i>brevispina</i>			
JX216775	AGROT376-10	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216772	AGROT377-10	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216773	AGROT511-11	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216774	CTM017-10	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944343	CTM054-10	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216777	AGROT882-11	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG2	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros
JX216776	AGROT769-11	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG2	Mexico	Chiapas	Poza en el rio del sendero Ruinas
JX216779	ROTI081-11	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG3	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc
JX216778	AGROT754-11	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG3	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, equiseto
JX216781	AGROT815-11	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG4	Mexico	Mexico State	Charco Presa Ignacio Ramirez
JX216782	AGROT732-11	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG4	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216780	AGROT733-11	<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG4	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
HM880048	AGROT321-10	<i>Notholca acuminata</i>	Canada	Ontario	stream in Hanlon Creek Park
HM880049	AGROT322-10	<i>Notholca acuminata</i>	Canada	Ontario	stream in Hanlon Creek Park
JX216783	AGROT346-10	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Veracruz	Encantada lagoon
JX216792	AGROT347-10	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Veracruz	Encantada lagoon
JX216785	AGROT348-10	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Veracruz	Encantada lagoon
JX216788	AGROT349-10	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Veracruz	Encantada lagoon

JX216786	AGROT350-10	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Veracruz	Encantada lagoon
JX216789	AGROT367-10	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216784	AGROT372-10	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216787	AGROT385-10	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216790	AGROT748-11	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, litoral
JX216791	AGROT749-11	<i>Platyonus patulus</i>	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, litoral
JX216795	AGROT698-11	<i>Platyonus patulus</i> var. <i>macracanthus</i>	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216793	AGROT709-11	<i>Platyonus patulus</i> var. <i>macracanthus</i>	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216794	AGROT710-11	<i>Platyonus patulus</i> var. <i>macracanthus</i>	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216801	AGROT381-10	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216799	AGROT521-11	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216798	AGROT522-11	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon
JX216796	AGROT365-10	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216803	AGROT366-10	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon
JX216802	AGROT375-10	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216800	AGROT512-11	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944330	CTM038-10	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944336	CTM044-10	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216797	CTM102-10	<i>Platyias quadricornis</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
HQ944301	CTM001-10	<i>Platyias quadricornis</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944304	CTM005-10	<i>Platyias quadricornis</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944306	CTM007-10	<i>Platyias quadricornis</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944310	CTM012-10	<i>Platyias quadricornis</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944345	CTM056-10	<i>Platyias quadricornis</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216805	CTM099-10	<i>Platyias quadricornis</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
JX216804	CTM100-10	<i>Platyias quadricornis</i> 1	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2

JX216806	CTM016-10	<i>Testudinella patina</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216807	CTM035-10	<i>Testudinella patina</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216809	CTM046-10	<i>Testudinella patina</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216808	CTM047-10	<i>Testudinella patina</i>	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216813	AGROT728-11	<i>Testudinella patina</i> f. <i>intermedia</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216812	AGROT729-11	<i>Testudinella patina</i> f. <i>intermedia</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216810	AGROT695-11	<i>Testudinella patina</i> AEG5	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega
JX216811	CTM015-10	<i>Testudinella patina</i> AEG5	Mexico	Veracruz	Laguna en Capulteol
JX216815	AGROT621-11	<i>Trichocerca</i> cf. <i>capucina</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216814	AGROT622-11	<i>Trichocerca</i> cf. <i>capucina</i>	Mexico	Mexico State	Presa Danxho
JX216819	AGROT735-11	<i>Trichocerca longiseta</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216816	AGROT736-11	<i>Trichocerca longiseta</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216817	AGROT737-11	<i>Trichocerca longiseta</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216818	AGROT738-11	<i>Trichocerca longiseta</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216825	AGROT837-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216824	AGROT838-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216823	AGROT839-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216822	AGROT840-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216820	AGROT841-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical
JX216821	AGROT644-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216828	AGROT645-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216826	AGROT647-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216827	AGROT648-11	<i>Trichocerca stylata</i>	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion
JX216830	AGROT740-11	<i>Trichotria tetractis</i>	Mexico	Morelos	Laguna Zempoala 2, litoral
JX216831	AGROT723-11	<i>Trichotria tetractis</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216829	AGROT724-11	<i>Trichotria tetractis</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216834	AGROT725-11	<i>Trichotria tetractis</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal

JX216833	AGROT726-11	<i>Trichotria tetractis</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216832	AGROT727-11	<i>Trichotria tetractis</i>	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal
JX216835	AGROT434-10	<i>Tripleuchlanis plicata</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944322	CTM029-10	<i>Tripleuchlanis plicata</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944323	CTM030-10	<i>Tripleuchlanis plicata</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2
HQ944324	CTM031-10	<i>Tripleuchlanis plicata</i>	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2

Data S1. Sites, dates of sampling and geographical coordinates of the water bodies sampled.

IDSite	Collection Date	Country	State/Province	Site	Lat	Lon
1	20-Jan-2011	Mexico	Baja California Sur	Presa La Buena Mujer, vertical	24.086	-110.19
2	21-Jan-2011	Mexico	Baja California Sur	El Rosario I, charco	23.753	-110.09
3	24-Mar-2010	Mexico	Campeche	Aguada de la lagartera	18.348	-92.091
4	25-Mar-2010	Mexico	Campeche	Las Golondrinas	17.89	-90.819
5	25-Nov-2010	Mexico	Campeche	Manantial 2	17.966	-90.862
6	06-Feb-2011	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre I	18.074	-90.871
7	06-Feb-2011	Mexico	Campeche	Carretera rumbo al Tigre II	18.04	-90.871
8	06-Feb-2011	Mexico	Campeche	Rio Pedro Baranda	17.968	-90.862
9	07-Feb-2011	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc	18.64	-90.296
10	26-Jun-2011	Mexico	Campeche	Charco 1 carr. Jonuta-Escarcega	18.109	-92.078
11	26-Jun-2011	Mexico	Campeche	Charco 2 carr. Jonuta-Escarcega, Santa Lucia	18.063	-92.017
12	26-Jun-2011	Mexico	Campeche	Charco 3 carr. Jonuta-Escarcega	18.048	-91.888
13	26-Jun-2011	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, equisetos	18.64	-90.289
14	26-Jun-2011	Mexico	Campeche	Laguna Silvituc, litoral	18.642	-90.294
15	03-Dec-2009	Mexico	Chiapas	Parque Los Humedales charco 5	16.709	-92.617
16	13-Apr-2011	Mexico	Chiapas	Canal Loma Bonita	16.099	-91
17	14-Apr-2011	Mexico	Chiapas	Poza en el rio del sendero Ruinas	16.108	-91.015
18	14-Apr-2011	Mexico	Chiapas	Rio Lacanju	16.102	-91.015
19	15-Apr-2011	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, limnetica	17.786	-92.025
20	15-Apr-2011	Mexico	Chiapas	Laguna de Catazaja, litoral	17.728	-92.015
21	22-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Charco junto a Presa Ignacio Ramirez	19.464	-99.774
22	22-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Charco Timilpan	19.887	-99.739
23	22-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Laguna del km 25 carr. Toluca-Atzacmulco	19.487	-99.735
24	22-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Laguna Emiliano Zapata, vegetacion	19.584	-99.797
25	22-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Presa Danxho	19.529	-99.337
26	22-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, limnetica	19.46	-99.777
27	22-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Presa Ignacio Ramirez, litoral	19.462	-99.78
28	22-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Presa la Isla de las Aves	19.827	-99.79
29	23-Jun-2011	Mexico	Mexico State	Laguna Zempoala Principal, vegetacion	19.051	-99.316
30	29-Dec-2008	Mexico	Michoacan	Cuitzeo arrastre 2	19.955	-101.16
31	23-Jun-2011	Mexico	Morelos	Laguna Zempoala 2, litoral	19.055	-99.316
32	24-May-2009	Mexico	Quintana Roo	Hacienda Mundaca estacion 2	21.219	-86.726
33	19-Sep-2010	Mexico	Quintana Roo	Canal frente a Bachilleres 2, Av. Constituyentes	18.525	-88.294
34	29-Oct-2010	Mexico	Quintana Roo	Ecological Park lagoon, littoral	18.507	-88.319
35	03-Feb-2011	Mexico	Quintana Roo	Aguada cerca entrada del aeropuerto, Kohunlich	18.447	-88.825
36	22-May-2011	Mexico	Quintana Roo	Laguna en el ejido Tres Garantias	18.369	-89.013
37	07-Sep-2011	Mexico	Quintana Roo	Laguna Encantada litoral, Subteniente Lopez	18.498	-88.39
38	07-Sep-2011	Mexico	Quintana Roo	Laguna Encantada vertical, Subteniente Lopez	18.499	-88.39

39	07-Sep-2011	Mexico	Quintana Roo	Laguna Huay-Pix litoral	18.511	-88.422
40	07-Sep-2011	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra litoral, Subteniente Lopez	18.498	-88.393
41	07-Sep-2011	Mexico	Quintana Roo	Laguna Negra vertical, Subteniente Lopez	18.5	-88.394
42	14-Sep-2011	Mexico	Quintana Roo	Humedal Puente Milagros	18.518	-88.434
43	14-Sep-2011	Mexico	Quintana Roo	Laguna Puente Milagros 1, arrastre	18.503	-88.451
44	14-Sep-2011	Mexico	Quintana Roo	Laguna Puente Milagros 1, vegetacion	18.509	-88.447
45	25-Jun-2011	Mexico	Tabasco	Humedal cerca de Miguel Hidalgo, litoral	17.976	-92.43
46	25-Jun-2011	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion, horizontal	17.877	-92.55
47	25-Jun-2011	Mexico	Tabasco	Laguna Vernet 2a seccion, litoral	17.877	-92.55
48	25-Jun-2011	Mexico	Tabasco	Rio de Ciudad Pemex	17.9	-92.483
49	25-Jun-2011	Mexico	Tabasco	Rio Usumacinta en Jonuta, vertical	18.086	-92.14
50	27-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Apompal lagoon	18.376	-94.963
51	27-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Catemaco lake, limnetic	18.417	-95.092
52	27-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Escondida lagoon	18.592	-95.088
53	27-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Poza Reyna, littoral	18.364	-94.969
54	28-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Laguna en el poblado de Capulteol	18.549	-94.968
55	28-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Sontecomapan lagoon, limnetic	18.553	-94.992
56	29-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Encantada lagoon	18.458	-95.192
57	29-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Majahual lagoon, littoral	18.659	-95.306
58	29-Aug-2010	Mexico	Veracruz	Poza de los Enanos, limnetic	18.509	-95.033
59	13-Apr-2010	Canada	Ontario	grassland in Arboretum Park, Guelph	43.5361	-80.219
60	13-Apr-2010	Canada	Ontario	wetland in Arboretum Park, Guelph	43.5353	-80.219
61	18-Apr-2010	Canada	Ontario	lagoon 2 in Hanlon Creek Park, Guelph	43.5135	-80.23
62	18-Apr-2010	Canada	Ontario	stream in Hanlon Creek Park, Guelph	43.5139	-80.227

Data S4. Summary of the taxa identified, including number of individuals, mean intraspecific distance, habitat type, locations and distribution.

Taxa	No. individuals	Mean intraspecific distance	Habitat ^a	Locality ^b	Distribution ^c
ORDER FLOSCULARIACEAE					
FAMILY FILINIIDAE					
1. <i>Filinia sp.</i>	5	0	limnetic	22	
FAMILY TESTUDINELLIDAE					
2. <i>Testudinella patina</i>	4	0.51	submerged hydrophytes	54	Cosmopolitan
<i>Testudinella patina</i> AEG5 ★	2	2.67	littoral-limnetic, submerged hydrophytes	12, 54	
3. <i>Testudinella patina f. intermedia</i>	2	0	submerged hydrophytes	29	Cosmopolitan
ORDER PLOIMA					
FAMILY ASPLANCHNIDAE					
4. <i>Asplanchna cf. sieboldi</i>	4	0.3	limnetic	46	Cosmopolitan
5. <i>Asplanchna silvestrii</i>	5	0.1	limnetic	30	Nearctic and Neotropical
FAMILY BRACHIONIDAE					
6. <i>Brachionus angularis</i>	5	0.075	emergent hydrophytes	50	Cosmopolitan
7. <i>Brachionus angularis f. pseudodolabratus</i>	3	0	littoral	34	Nearctic, Neotropical, African
8. <i>Brachionus bidentatus</i>	5	0.075	aquatic lily	47	Cosmopolitan
9. <i>Brachionus calyciflorus</i>	6	0.39	limnetic	25, 28	Cosmopolitan
<i>Brachionus calyciflorus</i> AEG1 ★	4	0.2	limnetic	46	
10. <i>Brachionus caudatus</i>	4	0	emergent hydrophytes	54	Cosmopolitan
11. <i>Brachionus cf. urceolaris</i>	4	0	wetland	45	Cosmopolitan
12. <i>Brachionus falcatus</i>	4	0.15	limnetic	19	Cosmopolitan
13. <i>Brachionus havanaensis</i>	19	1.73	limnetic, submerged hydrophytes, littoral, emergent hydrophytes	51, 4, 52, 53, 34, 50, 41, 38, 19	Nearctic and Neotropical
14. <i>Brachionus plicatilis</i> group	9	1.51	limnetic	32, 30, 55, 58	Cosmopolitan

15. <i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	5	0	submerged hydrophytes	52	Cosmopolitan
<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1 ★	9	0.9	aquatic lily, littoral	47, 34	
<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG2 ★	2	0	littoral-limnetic	10	
16. <i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	5	0	littoral-limnetic	2	Cosmopolitan
<i>Brachionus quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AEG1 ★	5	0	aquatic lily, limnetic, littoral	47, 48, 10	
17. <i>Brachionus</i> sp.	3	0.1	littoral-limnetic	11	
18. <i>Brachionus variabilis</i>	5	0	limnetic	26	Cosmopolitan
19. <i>Kellicottia bostoniensis</i>	7	0.13	limnetic	25, 31	Nearctic and Neotropical
20. <i>Keratella americana</i>	19	0.85	limnetic, submerged hydrophytes, littoral	36, 52, 1, 57, 41, 39, 38, 19	Nearctic and Neotropical
21. <i>Keratella cochlearis</i>	2	0.2	littoral, limnetic	27, 23	Cosmopolitan
<i>Keratella cochlearis</i> AEG1 ★	2	0	limnetic	22	
22. <i>Keratella morenoi</i>	4	0	limnetic	22, 26	Nearctic and Neotropical
23. <i>Keratella tropica</i>	3	0.46	benthic	35	Cosmopolitan
24. <i>Notholca acuminata</i>	2	0.83	stream	62	African, Palearctic
25. <i>Plationus patulus</i>	10	0.83	submerged hydrophytes, littoral	56, 52, 14	Cosmopolitan
26. <i>Plationus patulus</i> var. <i>macracanthus</i>	3	0.075	littoral-limnetic	12	African, Australian, Neotropical, Oriental
27. <i>Platyias quadricornis</i>	10	1.8	submerged hydrophytes, emergent hydrophytes	54, 52, 50	Cosmopolitan
<i>Platyias quadricornis</i> 1 ★	7	0	algae zone	33	
FAMILY DICRANOPHORIDAE					
28. <i>Dicranophorus</i> sp.	3	0	littoral	20	
FAMILY EUCHLANIDAE					
29. <i>Beauchampiella eudactylota</i>	6	0.15	algae zone, littoral	33, 12	Cosmopolitan
30. <i>Dipleuchlanis propatula</i>	5	0	emergent hydrophytes	54	Cosmopolitan
31. <i>Euchlanis dilatata</i>	6	0.32	submerged hydrophytes, emergent hydrophytes	56, 54	Cosmopolitan
32. <i>Tripleuchlanis plicata</i>	4	0.075	algae zone	33	Cosmopolitan
FAMILY GASTROPODIDAE					

33. <i>Ascomorpha ovalis</i>	5	0	limnetic	25	Cosmopolitan
<i>Ascomorpha ovalis</i> AEG1 ★	2	0	limnetic	31	
FAMILY LECANIDAE					
34. <i>Lecane bulla</i>	7	0	emergent hydrophytes	54	Cosmopolitan
<i>Lecane bulla</i> 1 ★	6	0.075	algae zone, littoral, <i>Equisetum</i>	33, 14, 13	
<i>Lecane bulla</i> 2 ★	3	0	submerged hydrophytes, littoral	52, 57	
<i>Lecane bulla</i> 3 ★	6	0	submerged hydrophytes, emergent hydrophytes	52, 50	
<i>Lecane bulla</i> 4 ★	3	0.51	littoral-limnetic, algae zone	5, 33	
<i>Lecane bulla</i> 5 ★	5	0.61	littoral, submerged hydrophytes, wetland, limnetic	7, 37, 42, 43	
<i>Lecane bulla</i> AEG9 ★	4	0	submerged hydrophytes	54	
<i>Lecane bulla</i> AEG10 ★	3	1.66	limnetic, submerged hydrophytes, emergent hydrophytes	51, 29, 24	
35. <i>Lecane closterocerca</i>	4	0.32	littoral	9	Cosmopolitan
36. <i>Lecane cornuta</i>	6	1.07	wetland, emergent hydrophytes, algae zone	15, 54, 16	Nearctic, Neotropical, Palearctic
<i>Lecane cornuta</i> 1 ★	4	1.71	littoral	8, 6, 9	
<i>Lecane cornuta</i> AEG2 ★	2	0	littoral, <i>Equisetum</i>	3, 13	
37. <i>Lecane crepida</i>	5	0.65	littoral, wetland	7, 42	Tropicopolitan
<i>Lecane crepida</i> AEG1 ★	2	0.61	littoral	6, 7	
38. <i>Lecane curvicornis</i>	2	2.3	littoral	3	Tropicopolitan
<i>Lecane curvicornis</i> AEG2 ★	2	0	algae zone	16	
39. <i>Lecane grandis</i>	3	0.075	wetland	42	Tropicopolitan
40. <i>Lecane hamata</i>	2	1.7	littoral	6, 36	Cosmopolitan
41. <i>Lecane hastata</i>	3	0.95	littoral-limnetic	12, 20	Tropicopolitan
<i>Lecane hastata</i> AEG1 ★	2	0.18	littoral-limnetic	12	
42. <i>Lecane leontina</i>	10	0.74	algae zone, submerged hydrophytes, Nymphaea leaves, littoral	33, 56, 40, 37, 7, 8	Tropicopolitan
43. <i>Lecane ludwigii</i> f. <i>ohioensis</i>	6	0.15	submerged hydrophytes, littoral	54, 12	Cosmopolitan
44. <i>Lecane luna</i>	11	1.64	wetland, littoral, limnetic	42, 6, 7, 43	Cosmopolitan
45. <i>Lecane lunaris</i>	7	0.53	littoral	6, 7, 9	Cosmopolitan
<i>Lecane lunaris</i> AEG1 ★	4	0	wetland, Nymphaea leaves	42, 40, 37	
46. <i>Lecane monostyla</i>	5	0	submerged hydrophytes	54	Tropicopolitan

47. <i>Lecane papuana</i>	6	1.39	algae zone, limnetic, littoral	33, 49, 10, 18	Tropicopolitan
48. <i>Lecane quadridentata</i>	4	0.77	littoral, wetland	7, 42	Cosmopolitan
49. <i>Lecane rhenana</i>	2	0.36	littoral	7	Tropicopolitan
50. <i>Lecane sp.</i>	5	0	wetland	60, 59	
51. <i>Lecane sp.</i> AEG1	4	0.77	littoral, wetland, limnetic	6, 7, 42, 36	
52. <i>Lecane spinulifera</i>	5	1.47	wetland, littoral	42, 44	Nearctic and Neotropical
FAMILY LEPADELLIDAE					
53. <i>Lepadella cf. ovalis</i>	2	0	limnetic	17	Cosmopolitan
54. <i>Lepadella cf. quadricarinata</i>	4	0	stream, littoral	62, 61	Cosmopolitan
55. <i>Lepadella patella</i>	2	0	submerged hydrophytes	29	Cosmopolitan
FAMILY MYTILINIDAE					
56. <i>Mytilina ventralis</i> var. <i>brevispina</i>	5	0.38	littoral, submerged vegetation	61, 29	Cosmopolitan
57. <i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i>	5	0	submerged hydrophytes	54	Cosmopolitan
<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG2 ★	2	2.34	limnetic, wetland	17, 42	
<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG3 ★	2	0.31	littoral, <i>Equisetum</i>	9, 13	
<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG4 ★	3	1.03	submerged hydrophytes, littoral	29, 21	
FAMILY NOTOMMATIDAE					
58. <i>Cephalodella cf. gibba</i>	2	0	emergent hydrophytes	24	Cosmopolitan
FAMILY TRICHOCERCIDAE					
59. <i>Trichocerca cf. capucina</i>	2	0.16	limnetic	25	Cosmopolitan
60. <i>Trichocerca longiseta</i>	4	0.31	submerged hydrophytes	29	Cosmopolitan
61. <i>Trichocerca stylata</i>	9	1.2	limnetic	46, 41	Cosmopolitan
FAMILY TRICHOTRIIDAE					
62. <i>Macrochaetus collinsi</i>	7	0.63	wetland, littoral, littoral-limnetic	42, 7, 12	Cosmopolitan
63. <i>Trichotria tetractis</i>	6	0.085	littoral, submerged vegetation	31, 29	Cosmopolitan

★ Cryptic species revealed from the present study.

a: habitat type where samples were taken,

b: the number correspond to the IDSite in the Data S1 and Figure 1.

c: distributions according to Segers (1996, 2007).

Tropicopolitans= occur in tropical and subtropical latitudes, but can occasionally be found in suitable habitats in temperate regions.

A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans

SEAN PROSSER,* ARELY MARTÍNEZ-ARCE† and MANUEL ELÍAS-GUTIÉRREZ‡

*Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G2W1, Canada, †El Colegio de la Frontera Sur, Av. Centenario km 5.5, Chetumal 77014, Mexico

Abstract

Despite the contribution of DNA barcoding towards understanding the biodiversity and distribution of species, the success of COI amplification has been quite variable when it comes to freshwater zooplankton (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno 2008; Jeffery *et al.* 2011). Some genera of microcrustaceans seem to be more difficult to amplify than others. For example, *Macrothrix*, *Scapholeberis*, *Diaphanosoma* and cyclopoids have yielded limited results. Among several possible reasons for the inability to barcode freshwater microcrustaceans is that there does not exist a specific set of primers for COI amplification. To this end, we developed a zooplankton – specific set of primers, which significantly increased average amplification success (20% increase). With these primers, we observed an overall success of over 70% for Sididae and Chydoridae, and more than 80% for Daphniidae, Moinidae, Bosminidae, Macrothricidae, Ilyocryptidae and Diaptomidae. We also demonstrate a simple alteration to a common specimen fixation method that increases the overall recovery of barcodes from freshwater zooplankton. Collectively, we believe our results will greatly aid the recovery of barcodes from these difficult groups.

Keywords: Cladocera, copepoda, DNA barcodes

Received 31 January 2013; revision received 30 May 2013; accepted 4 June 2013

Introduction

Although many invertebrate groups comprise freshwater zooplankton, three of them are dominant: Cladocera, Copepoda and Rotifera. Currently, little is known about the diversity of these groups (Korovchinsky 1996; Stoch 2001; Adamowicz & Purvis 2005).

At present, DNA barcoding has become a common practice and has proved itself an important tool in the study of freshwater microcrustaceans, mainly water fleas (cladocerans) and copepods (Elías-Gutiérrez *et al.* 2008a; Jeffery *et al.* 2011). These molecular techniques have become widespread and important, because they not only provide a fast and reliable method for identification, but have also highlighted cryptic species that have subsequently been formally described using a more integrative approach, and have been used for studies on phylogeography and to understand speciation patterns (Suatoni *et al.* 2006; Rowe *et al.* 2007; Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno 2008; Montiel-Martínez *et al.* 2008; Quiroz-Vazquez & Elías-Gutiérrez 2009; Xiang *et al.* 2011; Alcántara-Rodríguez *et al.* 2012). As a result, in recent years microcrustaceans have received great

attention from taxonomists (Elías-Gutiérrez *et al.* 2008b), in part due to these new approaches and the revelation of unexpected restricted distribution of many of them, as well as other taxa such as rotifers (Elías-Gutiérrez *et al.* 2008a; Jeffery *et al.* 2011; García-Morales & Elías-Gutiérrez 2013).

DNA barcoding has also been used to ascertain a more realistic measure of the branchiopod biodiversity in previously studied regions, such as Churchill, Manitoba, Canada, where this technique, together with more intensive sampling, has almost doubled the number of known species (from 25 to 42) (Jeffery *et al.* 2011).

Despite the allure of DNA barcoding as a tool for analysing the biodiversity and distribution of zooplankton species, the success of cytochrome *c* oxidase I (COI or COXI) amplification has been variable in this group. One possible explanation is that a specific set of primers do not exist. Currently, COI amplification in copepods and cladocerans has been performed using 'Folmer' or 'Folmer-tailed' primers (Folmer *et al.* 1994). To our knowledge, there have been no published attempts to develop freshwater zooplankton-specific primers.

Some genera seem to be more difficult to amplify than others. For example, only few specimens of *Macrothrix*,

Correspondence: Manuel Elías Gutiérrez, Fax: 52(983) 8350440; E-mail: melias@ecosur.mx

Scapholeberis and *Diaphanosoma* have yielded results (Elías-Gutiérrez *et al.* 2008a). Furthermore, other species such as *Holopedium*, which has a global distribution, have been described based on allozyme and COI analysis (Rowe *et al.* 2007), but it has been almost impossible to obtain results from this group at the Churchill region of Canada (Jeffery *et al.* 2011). Such mixed results are quite common in different, or even the same, laboratories.

The aim of this work was to develop a new and specific primer set that would reliably amplify COI from copepods and cladocerans. We also demonstrate a slight modification in the fixation process for biological samples that improves the overall success rate for the major families of cladocerans and copepods and may explain the previously observed inconsistencies regarding zooplankton barcoding.

Materials and methods

Fixation of samples

The samples ($n = 1053$) used to test a modified fixation method consisted of two large groups of microcrustaceans: cladocerans and copepods (Datas S1 and S2). After collection, the water was drained from the samples, which were then preserved in 96% ethanol. We compared different (but possibly critical) fixation methods: Following the addition of ethanol, the samples were immediately stored at either (i) room temperature; or (ii) on ice for at least 72 h before processing for DNA extraction.

Primer design

The complete mitochondrial genome sequences from 20 individuals consisting of Branchiopoda, Maxillopoda and Ostracoda (Table 1) were downloaded from GenBank, and the COI genes were excised and aligned using online EBI CLUSTAL W2 software (Larkin *et al.* 2007) (Data S3). New primers were then manually designed based on the 'Folmer' primer binding sites within the zooplankton COI genes. The resulting primers were tailed with modified M13 sequences (Messing 1983) (Table 2).

DNA Extraction

To recover the minimal amount of DNA required for efficient COI amplification, total DNA was extracted from whole individuals in the case of small specimens (i.e. cladocerans <0.3 mm) or from a tissue sample (i.e. eggs from the embryonic chambers in cladocerans or egg sacs from copepods) in the case of large specimens.

Table 1 Mitochondrial genome sequences used to design zooplankton-specific primers

Class	Genus	Species	GenBank Accession
Maxillopoda	<i>Eucalanus</i>	<i>bungii</i>	47457831
Maxillopoda	<i>Neocalanus</i>	<i>cristatus</i>	47457840
Maxillopoda	<i>Sinergasilus</i>	<i>polycolpus</i>	EU621723.1
Maxillopoda	<i>Caligus</i>	<i>rogercresseyi</i>	HQ157565.1
Maxillopoda	<i>Caligus</i>	<i>clemensi</i>	HQ157566.1
Maxillopoda	<i>Lepeophtheirus</i>	<i>salmonis</i>	71647022
Maxillopoda	<i>Tigriopus</i>	<i>japonicus</i>	21327728
Maxillopoda	<i>Tigriopus</i>	<i>californicus</i>	237688441
Maxillopoda	<i>Capitulum</i>	<i>mitella</i>	120586780
Maxillopoda	<i>Tetraclita</i>	<i>japonica</i>	47777266
Maxillopoda	<i>Megabalanus</i>	<i>volcano</i>	52221052
Maxillopoda	<i>Pollicipes</i>	<i>polymerus</i>	49146590
Maxillopoda	<i>Argulus</i>	<i>americanus</i>	49147414
Maxillopoda	<i>Armillifer</i>	<i>armillatus</i>	49147368
Branchiopoda	<i>Daphnia</i>	<i>melanica</i>	87083767
Branchiopoda	<i>Daphnia</i>	<i>pulex</i>	5835848
Branchiopoda	<i>Triops</i>	<i>cancriformis</i>	27383535
Branchiopoda	<i>Triops</i>	<i>longicaudatus</i>	50812131
Branchiopoda	<i>Artemia</i>	<i>franciscana</i>	5835051
Ostracoda	<i>Vargula</i>	<i>hilgendorffii</i>	40458405

Approximately 500 specimens were processed using standard glass fiber methods (Ivanova *et al.* 2006), and the rest was processed using the HotSHOT technique (Montero-Pau *et al.* 2008).

PCR and Sequencing

Following DNA extraction, 2 μ L of DNA was added to a PCR (final volume of 12.5 μ L, including DNA) consisting of 10% D-(+)-trehalose dihydrate (Sigma Analytical), 1 \times PlatinumTaq buffer (Invitrogen), 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 10 mM dNTP (KAPA Biosystems), 10 μ M of each primer and 0.3 U of PlatinumTaq (Invitrogen). The reactions were then cycled at 95 °C for 1 min, followed by five cycles of [94 °C for 40 s, 45 °C for 40 s, 72 °C for 1 min], then 35 cycles of [94 °C for 40 s, 51 °C for 40 s, 72 °C for 1 min] and a final extension of 72 °C for 5 min. PCR products were visualized on a 2% agarose gel using an E-Gel95 Precast Agarose Electrophoresis System (Invitrogen). Visually positive PCR products were selected for sequencing.

Positive PCR products were cycle sequenced using a modified (Hajibabaei *et al.* 2005) BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc.) and sequenced bi-directionally on an ABI 3730XL automated sequencer. PCR products amplified with Folmer primers were sequenced with Folmer primers, while those amplified by zooplankton-specific primers were sequenced with M13F and M13R. Sequences were edited

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Reference
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> 1994;
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> 1994;
ZplankF1_t1	tgtaaacgacggccagt TCTASWAATCATAARGATATTGG	This study
ZplankR1_t1	caggaacagctatgac TTCAGGRTGRCCRAARAATCA	This study
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT	Messing, 1983
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Messing, 1983

M13 tails are shown in lowercase bold font.

Table 3 PCR success rates of zooplankton families fixed at room temperature or with cold ethanol

Family	Species number	Room temperature fixation		Cold ethanol fixation	
		Total specimens	Success rate (%)	Total specimens	Success rate (%)
Sididae	7	77	49.35	34	85.29
Daphniidae	12	255	52.16	58	87.93
Moinidae	4	90	76.67	35	82.86
Bosminidae	3	71	52.11	25	72.0
Macrothricidae	2	28	50.0	34	79.41
Ilyocryptidae	2	10	20.0	4	75.0
Chydoridae	7	153	58.82	62	75.81
Diaptomidae	5	44	95.45	35	97.14
Cyclopidae	2	28	100	5	100
Average			56.82*		81.93*

Primers used: Folmer *et al.* (1994).

*Average was calculated excluding Cyclopidae.

using CodonCode v. 3.0.1 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts) and uploaded to BOLD under the projects 'Zooplankton II' (ZPII), 'Zooplankton III' (ZMIII) and 'Zooplankton IV' and GenBank (accession numbers KC616763-KC617186; KC617187-KC617425; KC617426-KC617733).

Statistical Analysis

All statistical analyses of our fixation method results were performed using the Mann-Whitney Rank Sum Test for independent samples. For primer comparisons, statistics were calculated using a paired t-test after a normality test. All statistical analyses were performed with the program Sigma Stat Vers. 3.1.

Results

Comparison of two fixation methods: room temperature and on ice

To compare the effects of keeping samples on ice prior to DNA extraction vs. keeping them at room temperature (the most traditional), we processed 1053 specimens, 756

at room temperature and 297 on ice (Datas S1 and S2). All COI amplifications were performed using traditional Folmer primers (LCO1490/HCO2198). Table 3 shows the overall PCR success rates associated with each treatment for each group of zooplankton. Excluding cyclopoida, where there was a significant difference between treatments. PCR success ranged from 20.0% (Ilyocryptidae) to 95.45% (Diaptomidae) with a mean of 56.82% (SD = 22%) for samples that were fixed at room temperature. Fixation on ice resulted in a statistically significant ($P = 0.02$) increase in PCR achievement, which ranged from 72.0% (Bosminidae) to 97.44% (Diaptomidae) with a mean of 81.78% (SD = 8.13%). Success rates varied depending on the family analysed, but an increase in positive results in all groups (except Cyclopidae) was observed when the ice method was used (see Table 3).

Comparison of primers: traditional Folmer and new zooplankton-specific primers

Because fixation on ice was found to significantly increase our success rate, we use that method on all specimens for subsequent experiments. To compare the efficacy of our new primer set to traditional Folmer primers,

Table 4 Comparison of PCR results between Folmer *et al.* (1994) and zooplankton-specific primers

Family	Total Specimens (number of species)	% PCR positive (Folmer)	% PCR positive (Zplank)
Sididae	37 (5)	75.68	81.08
Daphniidae	67 (11)	71.64	97.01
Moinidae	42 (2)	69.05	92.86
Bosminidae	20 (3)	55.00	95.00
Macrothricidae	36 (2)	63.89	91.67
Ilyocryptidae	4 (2)	100.00	100.00
Chydoridae	93 (8)	64.52	83.87
Diptomidae	73 (7)	78.08	93.15
Cyclopidae	113 (6)	64.60	84.07
Average		71.38	90.97

The total number of specimens and corresponding number of species identified morphologically are shown for each family. Percentages were calculated on the basis of results to total individuals processed.

we extracted DNA from 529 specimens of the following families: Sididae (suborder Ctenopoda); Daphniidae, Monidae, Bosminidae, Macrothricidae, Ilyocryptidae and Chydoridae (suborder Anomopoda); and Diptomidae and Cyclopidae (subclass Copepoda). Data S4 includes a detailed list of 529 individuals divided into six 96-well plates. The DNA extracted from each specimen was amplified using both Folmer and the new zooplankton-specific primer sets, keeping all other variables constant.

PCR success rates for each primer set are shown in Data S4 and Table 4. The new zooplankton-specific primers increased the average PCR success rate by approximately 20%. The increase in PCR success rates was statistically significant (*t*-test, $P = 0.001$).

Discussion

Comparison of room temperature and ice fixation methods

Large-scale DNA barcoding studies of freshwater zooplankton are lacking, largely due to poor COI amplification success. The success rate appears to range anywhere from 0% to 40%, and with a few exceptions (Elías-Gutiérrez *et al.* 2008a; Jeffery *et al.* 2011), success rates above 50% have not been reported due to low amplification rates. Under most circumstances, adding 96% ethanol directly to a live specimen is enough to preserve it down to the molecular level, at least for short-term storage; however, preserving specimens at low temperatures can benefit subsequent molecular analysis. One of the genera to have completely failed all barcoding

attempts (*Holopedium*) by Jeffery *et al.* (2011) was previously successfully barcoded by Rowe *et al.* (2007), who preserved all samples immediately with liquid nitrogen. The main limitation of using liquid nitrogen is the propensity for physical degradation of the specimen. The use of ethanol and/or the restriction of analysis to a subsample of the specimen (e.g. the eggs from the brood pouch) allows for the retention of the taxonomically diagnostic tissues for morphological analysis and subsequent species corroboration. The use of ethanol in combination with low temperatures offers the best of both worlds, as demonstrated by our results.

Comparison of traditional Folmer and new zooplankton-specific primers

Our new zooplankton-specific primers were found to significantly improve the overall results compared with traditional Folmer primers. While the differences between the forward (LCO1490 and ZplankF1_t1) and reverse (HCO2198 and ZplankR1_t1) primers are minimal, there are a few potentially critical differences that may explain the significantly better performance of the zooplankton-specific primers. At nucleotide (nt) position 9 (measured from the 3' end), LCO1490 has an 'A' at this position, but approximately 25% of the zooplankton sequences (included in our primer design alignment) have a 'G' at the same location. Therefore, ZplankF1_t1 was designed with an 'R' ('A' or 'G') at nt 9. Similarly, HCO2198 has a 'T' at nt 6, 9 and 12, while approximately 25% of the zooplankton sequences have C's at these positions, necessitating the use of 'Y's ('C' or 'T') at the corresponding positions in ZplankR1_t1. We speculate that the inclusion of these degenerate bases in the zooplankton-specific primers is at least partially responsible for their increased efficacy.

It is also possible that, unlike the Folmer primers, the zooplankton-specific primers avoid coamplifying contaminating DNA; however, because we have not tested the zooplankton-specific primers on other phyla, we cannot say that they will not also function across a wide range of taxa. Regardless, a combination of primer binding efficiency and primer specificity may explain the overall performance differences we observed between the Folmer and zooplankton-specific primer sets.

In conclusion, the use of our fixation method in concert with our zooplankton-specific primers allows for specimens to be compared morphologically and the findings combined with DNA barcoding data, which is the basis of the new approach of integrative taxonomy (Dayrat 2005). Such an approach will undoubtedly be the key to unravelling the real diversity of the aquatic microfauna, of which we have only begun to scratch the surface.

Acknowledgements

Part of the analytical resources in Mexico were funded by Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad (CONABIO, Grant HE-009) and Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) through the Mexican Barcode of Life Network (MEXBOL). Sequencing was supported by funding from the Government of Canada through Genome Canada and the Ontario Genomics Institute in support of the International Barcode of Life Project.

References

- Adamowicz SJ, Purvis A (2005) How many branchiopod crustacean species are there? Quantifying the components of underestimation *Global Ecology and Biogeography*, **14**, 455–468.
- Alcántara-Rodríguez JA, Ciros-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Serranía-Soto C, Piedra-Ibarra E (2012) Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshwater Biology*, **57**, 728–740.
- Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**, 407–415.
- Elías-Gutiérrez M, Valdez-Moreno M (2008) A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiología*, **18**, 63–74.
- Elías-Gutiérrez M, Martínez-Jerónimo F, Ivanova NV, Valdez-Moreno M (2008a) DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*, **1849**, 1–42.
- Elías-Gutiérrez M, Suárez-Morales E, Gutiérrez-Aguirre M, Silva-Briano M, Granados-Ramírez JG, Garfias-Espejo T (2008b) *Guía ilustrada de los microcrustáceos (Cladocera y Copepoda) de las aguas continentales de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 367.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (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-Morales AE, Elías-Gutiérrez M (2013) DNA Barcoding freshwater Rotifera of Mexico: evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12080. [Epub ahead of print].
- Hajibabaei M, DeWaard JR, Ivanova NV *et al.* (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **360**, 1959–1967.
- Ivanova NV, DeWaard JR, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 998–1002.
- Jeffery NW, Elías-Gutiérrez M, Adamowicz SJ (2011) Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *PLoS ONE*, **6**, e18364.
- Korovchinsky NM (1996) How many species of Cladocera are there? *Hydrobiologia*, **321**, 191–204.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947–2948.
- Messing J (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology*, **101**, 20–78.
- Montero-Pau J, Gómez A, Muñoz J (2008) Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography-Methods*, **6**, 218–222.
- Montiel-Martínez A, Ciros-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Elías-Gutiérrez M (2008) Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiaptomus* *García* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species. *Journal of Plankton Research*, **30**, 1079–1093.
- Quiroz-Vázquez P, Elías-Gutiérrez M (2009) A New Species of the Freshwater Cladoceran Genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Cladocera: Anomopoda) from the Semidesert Northern Mexico, Highlighted by DNA Barcoding. *Zootaxa*, **2236**, 50–64.
- Rowe CL, Adamowicz SJ, Hebert PDN (2007) Three new cryptic species of the freshwater zooplankton genus *Holopedium* (Crustacea: Branchiopoda: Ctenopoda), revealed by genetic methods. *Zootaxa*, **1646**, 1–49.
- Stoch F (2001) How many species of Diacyclops? New taxonomic characters and species richness in a freshwater cyclopoid genus (Copepoda, Cyclopoida) *Hydrobiologia*, **453**, 525–531.
- Suatoni E, Vicario S, Rice S, Snell T, Caccone A (2006) An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer – *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 86–98.
- Xiang XL, Xi YL, Wen XL, Zhang G, Wang JX, Hu K (2011) Genetic differentiation and phylogeographical structure of the *Brachionus calyciflorus* complex in eastern China. *Molecular Ecology*, **20**, 3027–3044.

M.E.G. wrote the manuscript. S.W.J.P., A.M.A. edited and contributed to the manuscript. M.E.G. collected and identified all the specimens. A.M.A., S.W.J.P. performed all molecular laboratory work. S.W.J.P. designed specific zooplankton primers. M.E.G., A.M.A., S.W.J.P. analysed and interpreted results.

Data Accessibility

GenBank Accessions: KC616763-KC617186; KC617187-KC617425; KC617426-KC617733.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Material with 'normal' fixation, no ice after ethanol addition.

Data S2. Material preserved on ice immediately after ethanol addition.

Data S3. Specimens used to compare Folmer and new zooplankton-specific primers.

Data S4. Comparison of individual results for PCR and sequencing using Folmer and zooplankton-specific primers.

Monitoring an Alien Invasion: DNA Barcoding and the Identification of Lionfish and Their Prey on Coral Reefs of the Mexican Caribbean

Martha Valdez-Moreno^{1*}, Carolina Quintal-Lizama¹, Ricardo Gómez-Lozano², María del Carmen García-Rivas³

1 El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Quintana Roo, Mexico, **2** Parque Nacional Arrecifes de Cozumel, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Chetumal, Quintana Roo, Mexico, **3** Reserva de la Bisofera Banco Chinchorro, Parque Nacional Arrecifes de Xcalak Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Chetumal, Quintana Roo, Mexico

Abstract

Background: In the Mexican Caribbean, the exotic lionfish *Pterois volitans* has become a species of great concern because of their predatory habits and rapid expansion onto the Mesoamerican coral reef, the second largest continuous reef system in the world. This is the first report of DNA identification of stomach contents of lionfish using the barcode of life reference database (BOLD).

Methodology/Principal Findings: We confirm with barcoding that only *Pterois volitans* is apparently present in the Mexican Caribbean. We analyzed the stomach contents of 157 specimens of *P. volitans* from various locations in the region. Based on DNA matches in the Barcode of Life Database (BOLD) and GenBank, we identified fishes from five orders, 14 families, 22 genera and 34 species in the stomach contents. The families with the most species represented were Gobiidae and Apogonidae. Some prey taxa are commercially important species. Seven species were new records for the Mexican Caribbean: *Apogon mosavi*, *Coryphopterus venezuelae*, *C. thrix*, *C. tortugae*, *Lythrypnus minimus*, *Starksia langi* and *S. ocellata*. DNA matches, as well as the presence of intact lionfish in the stomach contents, indicate some degree of cannibalism, a behavior confirmed in this species by the first time. We obtained 45 distinct crustacean prey sequences, from which only 20 taxa could be identified from the BOLD and GenBank databases. The matches were primarily to Decapoda but only a single taxon could be identified to the species level, *Euphausia americana*.

Conclusions/Significance: This technique proved to be an efficient and useful method, especially since prey species could be identified from partially-digested remains. The primary limitation is the lack of comprehensive coverage of potential prey species in the region in the BOLD and GenBank databases, especially among invertebrates.

Citation: Valdez-Moreno M, Quintal-Lizama C, Gómez-Lozano R, García-Rivas MdC (2012) Monitoring an Alien Invasion: DNA Barcoding and the Identification of Lionfish and Their Prey on Coral Reefs of the Mexican Caribbean. PLoS ONE 7(6): e36636. doi:10.1371/journal.pone.0036636

Editor: Brian Gratwicke, Smithsonian's National Zoological Park, United States of America

Received: January 5, 2012; **Accepted:** April 4, 2012; **Published:** June 1, 2012

Copyright: © 2012 Valdez-Moreno et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Genome Canada through the Biodiversity Institute of Ontario supported sequencing. Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO HE009) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT thru Mexican Barcode of Life, MEXBOL) funded this project. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mvaldez@ecosur.mx

Introduction

Since the first appearance of the exotic lionfish in the western Atlantic [1], there has been great concern about the potential impact on coral reefs in the Caribbean region. A number of studies have recently been published on the lionfish invasion, in particular, the geographical distribution [2], the feeding behavior in the Bahamas [3], an analysis of cytochrome B mtDNA sequences to examine founder effects and for species identifications [4], establishing a molecular phylogeny [5], use of nursery habitats such as mangroves, [6], and evaluating native predator species [7].

Two species of lionfishes have been recorded as invaders in the western Atlantic: *Pterois volitans* (Linneo, 1758) and *Pterois miles* (Bennet, 1828). Although once considered to be synonyms, sequence differences in cytochrome b have confirmed the separation of the two species [8]. Nevertheless, despite cytochrome

b is an important marker for species determination and it was successfully used to discriminate both, the barcodes, based in sequences of the cytochrome oxidase I, are becoming a wider standard in species identification (see www.fishbol.org).

At present, the lionfish invasion has spread to all along the coastal Yucatan Peninsula, including the entire Mesoamerican coral reef and has been recorded throughout the Caribbean as far as Venezuela [2,9]. Recently, and for the first time, a larval lionfish was collected and reported in the Atlantic Ocean [10]. In the beginning, seem to this species was introduced as an ornamental fish, and later it escaped from an aquarium located in Florida [1,2,11].

DNA barcodes have proven to be more than 90% successful in the identification of marine fish species in studies from Australia [12] and Mexico, where they also were used to connect

Table 1. *Pterois volitans* COI sequences composition (from 30 samples).

Sequence composition (%)	Min	Mean	Max	SE
Guanine	18.96	19.75	20.19	0.028
Citocyne	26.66	26.98	27.01	0.009
Adenine	23.16	23.22	23.61	0.017
Tyrosine	29.7	30.06	30.41	0.013
Guanine-Citocyne	45.97	46.73	46.97	0.024
Guanine-Citocyne codon position 1	54.2	56.07	56.13	0.047
Guanine-Citocyne codon position 2	41.86	42.81	44.01	0.041
Guanine-Citocyne codon position 3	40.03	40.83	41.52	0.047

doi:10.1371/journal.pone.0036636.t001

developmental stages unidentified with adults [13]. One of the first and more important applications of this technique has been to detect exotic species in a fast, reliable and cost-effective way [14]. For example, exotic moths have been detected among field-caught populations [15] and an invasive microcrustacean, as the cladoceran *Daphnia lumholtzi*, has been discovered in Mexican freshwaters [16]. Another useful application of this method is the analysis of dietary habits. This approach has recently been used for an analysis of bat feces, since DNA barcoding permits the identification of prey in the absence of morphological evidence after digestion [17]. In case of fishes, two previous studies have used this technique, one to analyze herbivorous fish diets [18], and the other confirming the utility of the technique for piscivorous fishes, but in the laboratory [19].

In this study, we apply the DNA barcoding method to analyze the prey composition for the carnivorous lionfish. The material studied comes from several collections of lionfish in Cozumel, along the Mexican portion of the Mesoamerican Coral Reef. Our primary goals were to establish, based on DNA barcodes, which species of *Pterois* is present on the Mexican Caribbean reef and which species comprise the diet of lionfish, based on the analysis of stomach contents.

Results

This study is the first report of the application of DNA barcoding to determine the prey composition for the invasive lionfish in the Atlantic Ocean. Partially-degraded biological material, such as stomach contents, can yield small PCR DNA

fragments, sometimes less than 200 bp in length. Nevertheless, DNA barcoding can identify species with fragments as short as 100 bp with at least 90% efficiency [20]. The development of these mini-barcodes permits the species identification. This opens a great possibility to obtain sequences from short DNA fragments, quickly and cheaply [21].

DNA Barcode Identification of Lionfish Adults

Pterois volitans and *P. miles* overlap in most morphological and meristic characters but do have different DNA sequences [8]. All sequences we obtained from 30 adult lionfish in the Mexican Caribbean matched with Indo-Pacific *Pterois volitans* with over 99% similarity. The average K2P distance among individuals was 0.054%. The mean sequence composition was guanine 19.75%, cytosine 26.98%, adenine 23.22%, tyrosine 30.06%, GC 46.73%. GC% Codon position 1, 56.07, GC% Codon position 2, 42.81 and GC% Codon position 3, 40.83 (Table 1).

Identification of Prey Based in DNA Barcoding

Of the 157 stomachs examined, 144 had measurable contents (Table 2). In total 330 prey items were obtained but about 90% were mostly digested specimens. These included fish, typically only body parts or fragments of skeleton and tissue. As a result, most prey items were impossible to visually identify, even to order level. Some crustaceans were almost complete and could be identified before barcoding. All of the prey tissue fragments were barcoded, but only 168 yielded readable sequences. The read lengths in the majority (85%) were more than 600 bp long, while the remaining sequences had segments between 500 and 300 bp (mainly crustaceans) and only two sequences were less than 200 bp. There were no insertions, deletions or stop codons in any sequence. The sequences were compared to the reference library of sequences in the Barcode of Life Database (BOLD). Of the 168 sequences, 125 matched with fishes and 43 with crustaceans. In case of the fish sequences, 94% matched with greater than 99.38% similarity to reference sequences in BOLD, allowing identification to the species level. The remaining 6% could be identified only to genus (Table 3).

Five orders of fishes comprising 14 families, 22 genera and 34 species were identified. The families with the greatest number of species were Gobiidae (7) and Apogonidae (6) followed by Scaridae (4), Labrisomidae (3), Labridae, Pomacentridae, Tripterygiidae, Serranidae (2), Holocentridae, Grammatidae, Haemulidae, Scorpaenidae, and Monacanthidae (1) (Figure 1, Table 3).

The total fishes species identified in the stomach contents (Table 3, Figure 1) include 27 species previously reported in the

Table 2. Lionfish (*Pterois volitans*) specimens collected in the different localities from Mexican Caribbean.

Locality	Specimens collected	Specimens with stomach content	Collecting date (year)	Min-Max length of the specimens (mm)
Cozumel	58	47	2009	28–216
Xcalak	59	54	2009, 2010	40–262
Mahahual	35	21	2010	70–320
Isla Contoy	10	6	No data	10–90
Banco Chinchorro	13	11	2009	60–282
Puerto Morelos	1	1	2009	76–308
Playa del Carmen	2	1	2009	330
Isla Mujeres	9	3	No data	20–70

doi:10.1371/journal.pone.0036636.t002

Table 3. List of fishes prey identified in the stomach content of lionfish (*Pterois volitans*) by DNA barcoding analysis.

Order	Family	Genus	Species	No. of specimens	Similarity (%)
Beryciformes	Holocentridae	<i>Sargocentron</i>	<i>Sargocentron coruscum</i>	1	100
Perciformes	Apogonidae	<i>Apogon</i>	<i>Apogon lachneri</i>	2	100
Perciformes	Apogonidae	<i>Apogon</i>	<i>Apogon maculatus</i>	2	100
Perciformes	Apogonidae	<i>Apogon</i>	<i>Apogon mosavi*</i>	1	99.68
Perciformes	Apogonidae	<i>Apogon</i>	<i>Apogon townsendi</i>	2	100
Perciformes	Apogonidae	<i>Astrapogon</i>	No match found	1	
Perciformes	Apogonidae	<i>Astrapogon</i>	<i>Astrapogon puncticulatus</i>	1	99.84
Perciformes	Gobiidae	<i>Coryphopterus</i>	<i>Coryphopterus venezuelae*</i>	6	99.69
Perciformes	Gobiidae	<i>Coryphopterus</i>	<i>Coryphopterus eidolon</i>	2	100
Perciformes	Gobiidae	<i>Coryphopterus</i>	<i>Coryphopterus hyalinus</i>	2	100
Perciformes	Gobiidae	<i>Coryphopterus</i>	<i>Coryphopterus thrix*</i>	2	99.85
Perciformes	Gobiidae	<i>Coryphopterus</i>	<i>Coryphopterus tortugae*</i>	6	100
Perciformes	Gobiidae	<i>Priolepis</i>	<i>Priolepis hipoliti</i>	1	99.69
Perciformes	Gobiidae	<i>Lythrypnus*</i>	<i>Lythrypnus minimus*</i>	6	99
Perciformes	Grammatidae	<i>Gramma</i>	<i>Gramma loreto</i>	3	99.84
Perciformes	Haemulidae	<i>Haemulon</i>	<i>Haemulon flavolineatum</i>	3	100
Perciformes	Labridae	<i>Halichoeres</i>	<i>Halichoeres garnoti</i>	22	100
Perciformes	Labridae	<i>Thalassoma</i>	<i>Thalassoma bifasciatum</i>	11	100
Perciformes	Labrisomidae	<i>Malacoctenus</i>	<i>Malacoctenus triangulatus</i>	2	99.69
Perciformes	Labrisomidae	<i>Starksia</i>	<i>Starksia ocellata*</i>	1	99.38
Perciformes	Labrisomidae	<i>Starksia</i>	<i>Starksia langi*</i>	1	99
Perciformes	Pomacentridae	<i>Abudefduf</i>	<i>Abudefduf saxatilis</i>	1	100
Perciformes	Pomacentridae	<i>Stegastes</i>	<i>Stegastes partitus</i>	6	99.85
Perciformes	Scaridae	<i>Scarus</i>	<i>Scarus iseri</i>	2	100
Perciformes	Scaridae	<i>Scarus</i>	<i>Scarus taeniopterus</i>	1	100
Perciformes	Scaridae	<i>Sparisoma</i>	<i>Sparisoma aurofrenatum</i>	8	100
Perciformes	Scaridae	<i>Sparisoma</i>	<i>Sparisoma viride</i>	2	100
Perciformes	Serranidae	<i>Cephalopholis</i>	<i>Cephalopholis cruentata</i>	3	100
Perciformes	Serranidae	<i>Liopropoma</i>	<i>Liopropoma rubre</i>	2	100
Perciformes	Tripterygiidae	<i>Enneanectes</i>	<i>Enneanectes altivelis</i>	3	100
Perciformes	Tripterygiidae	<i>Enneanectes</i>	<i>Enneanectes boehlkei</i>	1	100
Pleuronectiformes	Bothidae	<i>Bothus</i>	<i>Bothus lunatus</i>	1	100
Scorpaeniformes	Scorpaenidae	<i>Pterois</i>	<i>Pterois volitans</i>	16	100
Tetraodontiformes	Monacanthidae	<i>Monacanthus</i>	<i>Monacanthus tuckeri</i>	1	100

Also is showing percent of closest matches to reference sequences on BOLD.

*New range extension for Mexican Caribbean.

doi:10.1371/journal.pone.0036636.t003

Mexican Caribbean: *Sargocentron coruscum*, *Apogon lachneri*, *A. maculatus*, *A. townsendi*, *Astrapogon puncticulatus*, *Coryphopterus eidolon*, *C. hyalinus*, *Priolepis hipoliti*, *Gramma loreto*, *Haemulon flavolineatum*, *Halichoeres garnoti*, *Thalassoma bifasciatum*, *Malacoctenus triangulatus*, *Abudefduf saxatilis*, *Stegastes partitus*, *Scarus iseri*, *S. taeniopterus*, *Sparisoma aurofrenatum*, *S. viride*, *Cephalopholis cruentata*, *Liopropoma rubre*, *Enneanectes altivelis*, *Enneanectes boehlkei*, *Bothus lunatus*, *Pterois volitans*, *Monacanthus tuckeri*, and seven species unreported before: *Apogon mosavi*, *Coryphopterus venezuelae*, *C. thrix*, *C. tortugae*, *Lythrypnus minimus*, *Starksia langi* and *S. ocellata*.

In terms of percent composition by number (%N) fishes dominated the lionfish diet (74.4%). The fish families with highest %N were Labridae (26.4%), comprising *Halichoeres garnoti* (17.6%) and *Thalassoma bifasciatum* (8.8%); Gobiidae (20%), comprising

Coryphopterus venezuelae (4.8%), *C. tortugae* (4.8%), *Lythrypnus* (4.8%), *C. eidolon* (1.6%), *C. hyalinus* (1.6%), *C. thrix* (0.8%), and *Priolepis hipoliti* (0.8%); Scorpaenidae (12.8%) comprised the one species *Pterois volitans*; and Scaridae (10.4%) comprising *Sparisoma aurofrenatum* (6.4%), *Scarus iseri* (1.6%), *S. viride* (1.6%), and *S. taeniopterus* (0.8%).

The overall percent composition by number of crustaceans in lionfish stomach contents was 25.6%, with Decapoda the most frequent prey (93%) followed by Stomatopoda (4.6%) and Euphausiacea (2.4%). Of the 43 crustacean prey sequences, we identified 20 different taxa of which twelve were decapods. Only four showed more than a 90% similarity to reference sequences on BOLD, while the remainder showed similarities between 79 and 89% (Table 4). Three crustacean orders were identified: Euphausiacea with only one species, *Euphausia americana*; Stoma-

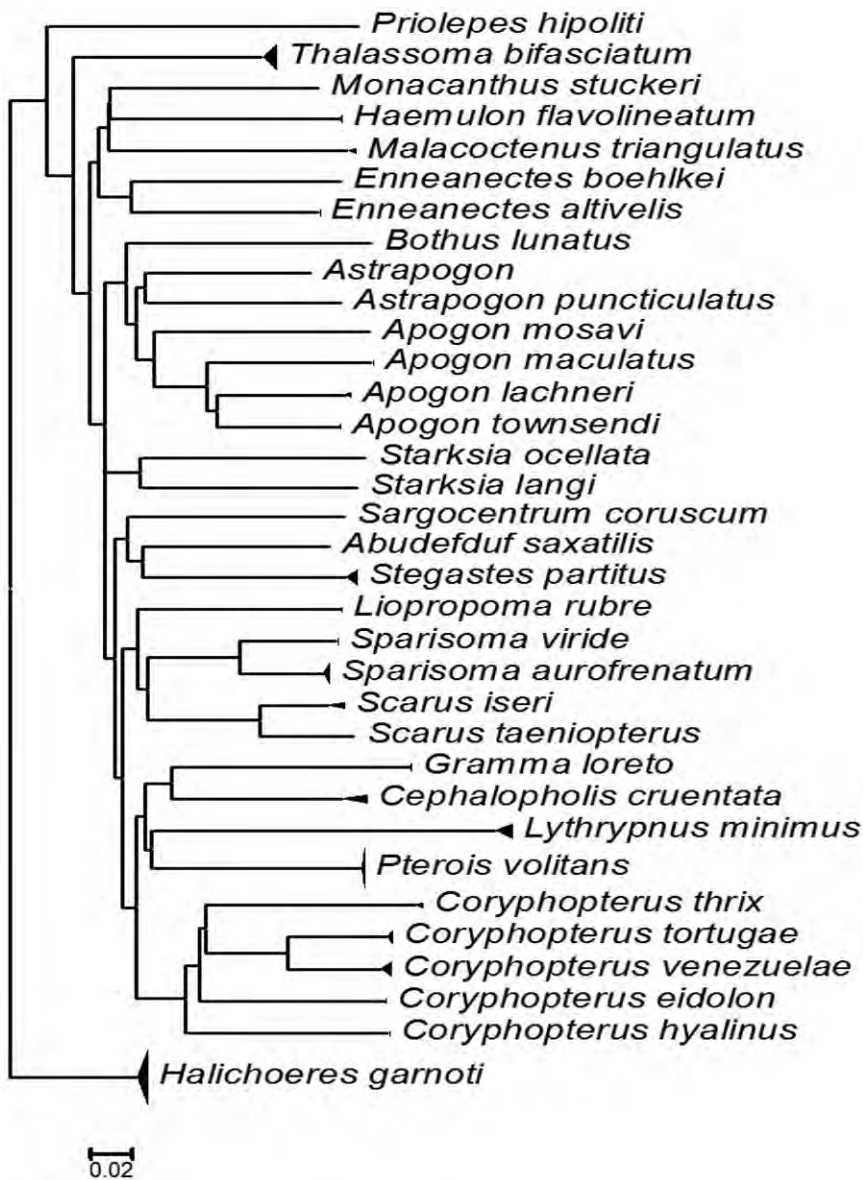


Figure 1. Neighbour joining tree for 34 fish species found in the stomach contents of the lionfish. Tree is based on genetic distances (K2P) for the COI gene; the base of the triangle gives a rough idea of the most consumed preys.
doi:10.1371/journal.pone.0036636.g001

topoda with two samples that apparently belong to Gonodactylidae and Pseudosquillidae, and the remaining matches were all to Decapoda. Among the latter, one specimen matched the genus *Synalpheus*, another matched to Hippolytidae and two groups, of three and seven specimens respectively, matched to two clades within Palemonidae. All remaining taxa could not be resolved to a finer level beyond Decapoda (Figure 2).

Discussion

Adults

It is possible to distinguish nine species of *Pterois*, including *P. miles* and *P. volitans* from the reference sequences of COI mtDNA in the BOLD database. All of our specimens matched with *Pterois volitans* and the low divergence values among them are consistent with a recent invasion from a small number of specimens. Our results supports the idea that *P. volitans* is the

only species which has spread into the Caribbean, including the Mexican region [4,9,10,22–24].

Prey Composition

In the Mexican Caribbean the lionfish (*Pterois volitans*) feeds on a wide diversity of prey, primarily reef-fish species and secondarily crustaceans. These results are concordant with the findings for prey composition of lionfish in the Bahamas [3,22,25].

Our values of %N in fishes and crustaceans are similar to those reported by Morris and Adkins in the Bahamas, who found that fishes comprised 71% of the prey items and crustaceans comprised 28.5% [3].

Seven of the identified species constitute range extensions into this area: *Apogon mosavi*, *Coryphopterus venezuelae*, *C. thrix*, *C. tortugae*, *Lythrypnus minimus*, *Starksia langi* and *S. ocellata*. The first five species are listed for the western and eastern Caribbean even in Belize [26–28], so their presence in this region is expected. The lionfish

Table 4. List of crustaceans prey identified in the stomach content of lionfish (*Pterois volitans*) by DNA barcoding analysis.

Order	Family	Genus	Specie	Similarity (%)
Decapoda	Alpheidae	<i>Synalpheus</i>	*	99.24
Decapoda	Hyppolytidae	<i>Thor</i>	*	93.18
Decapoda	Palaemonidae	*	*	88
Decapoda	Palaemonidae	*	*	88.24
Decapoda	*	*	*	84.30
Decapoda	*	*	*	84
Decapoda	*	*	*	85.71
Decapoda	*	*	*	86.2
Decapoda	*	*	*	85.63
Decapoda	*	*	*	85.34
Decapoda	*	*	*	83.3
Decapoda	*	*	*	82.83
Decapoda	*	*	*	82.82
Decapoda	*	*	*	96.52
Decapoda	*	*	*	*
Decapoda	*	*	*	79.22
Euphausiacea	Euphausiidae	<i>Euphausia</i>	<i>Euphausia americana</i>	100
Stomatopoda	Gonodactylidae	*	*	87.2
Stomatopoda	Pseudosquillidae	<i>Pseudosquilla</i>	*	95.39

Also is showing percent of closest matches to reference sequences on BOLD.

*Unable to match with any records in BOLD database.

doi:10.1371/journal.pone.0036636.t004

whose stomach contents included *C. tortugae* were collected from Banco Chinchorro and Xcalak. Recently we collected two adults of this specie in the same locality confirming the presence of this species here. *Coryphopterus venezuelae* were detected in three lionfish stomachs from Xcalak. Vásquez Yeomans (Pers. comm.) collected a larva of this species in 2006 in East Cayo Centro, Chinchorro, confirming the presence of this fish in this area. Our six specimens of *Lythrypnus* matched in BOLD with *L. minimus*, one adult from Dominica (LIDMA 726-11) identified by Benjamin Victor (Pers. comm.) and 62 more *Lythrypnus* unidentified sequences. *S. langi* was described recently and is the Belizean species for the species complex of *S. sluiteri* [29] therefore their presence in the Mexican Caribbean is also expected. Finally, *Starksia ocellata* is part of a species complex, named *S. occidentalis* in the Caribbean and the Western Caribbean [30]. This species is a representative with a known range from North Carolina to Florida and the northern Gulf of Mexico. In Mexico there is only a single report in the literature, from Isla Contoy, but there is no voucher specimen. [31].

In the list of prey species, there are five fishes economically important in local markets: *Haemulon flavolineatum* (Chak-chi or French grunt), *Scarus iseri* (loro listado or striped parrotfish), *Sparisoma aurofrenatum* (loro manchado or red band parrotfish), *S. viride* (loro brillante or stoplight parrotfish) and *Cephalopholis cruentata* (cabrilla, cherna enjambre or graysby). Although these species have not high value in the markets, they are an important source of food for local people.

The yellowhead wrasse, *Halichoeres garnoti* was the most frequent species in the analyzed stomachs, no doubt reflecting its common occurrence in the region [31]. In contrast, *Coryphopterus hyalinus* and *Gramma loreto* have been reported as the most frequent prey of

lionfish in the Bahamas, likely reflecting habitat differences in the two locations. [3].

The barcoding of prey species revealed 16 specimens of *Pterois volitans*, although the majority of the samples showed a high degree of digestion (incomplete skeletons with little tissue). Nevertheless, we found one specimen (MXIV868) almost completely intact and morphologically identifiable as *Pterois*. This is the first confirmation of cannibalism among invasive lionfish, a phenomenon that had been previously suggested as likely but with an absence of evidence [22]. The lionfish specimens found in the stomachs were small the intact specimen measured 25 mm SL indicating a preference for juveniles (Figure 3).

Only one specimen in the prey list did not match to any species in the BOLD or GenBank databases. It could be identified to the genus *Astrapogon*. This genus is represented in the Caribbean by three species, all are sequenced in BOLD: *A. punctulatus* was found in the prey samples in this study and the other species, *A. stellatus* and *A. alutus* did not match our sequence, raising the possibility of a cryptic species of *Astrapogon* in the region.

Prior studies in the Bahamas recorded 50 species of fishes in the diet of lionfish based on morphological examination of stomach contents as well as field observations [3,22,23]. We found 31 of those species and 17 not previously recorded. Considering the sampling effort for morphological and behavioral analyses, it is evident that DNA barcoding is a more efficient technique, limited for the present only by the incompleteness of the reference databases.

Among crustaceans, the only euphausiid identified was *Euphausia americana* (CRU124.1) from a fish collected in Mahahual (Figure 2). This species has been reported from Xcalak to north of Cozumel Island [32,33]. Two specimens were identified as stomatopods. The sample CRU198 from Playa del Carmen,

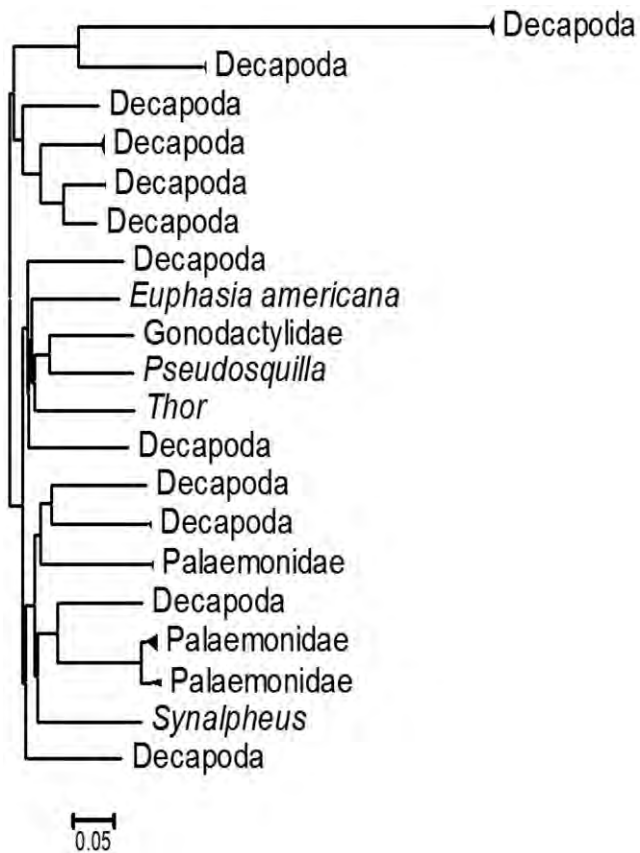


Figure 2. Neighbour joining tree for 20 clades representing crustaceans in the stomach contents of the lionfish. Each clade represents a different species, only one could be identified with no doubts; the base of the triangle gives a rough idea of the most consumed crustaceans.
doi:10.1371/journal.pone.0036636.g002

matched (95% similarity) near the species *Pseudosquilla ciliate*, but with more than 3% divergence, the specimen was considered *Pseudosquilla* sp. The species reported in the Mexican Caribbean are *P. ciliate* [34,35] and *P. oculata* (IBUNAM:CNCR: CR10740) in the database of the National Collection of Crustaceans from the National Autonomous University of Mexico (UNAM, <http://test.unibio.unam.mx>), therefore it is possible that this specimen represents *P. oculata*. The other stomatopod (CRU238 from Contoy Island), matched 87.2% nearest to the Gonodactylidae.

There are three species reported in the literature of this family in Quintana Roo [34,35] and the National Collection of Crustaceans in UNAM, *Neogonodactylus bredini* and *N. oerstedii* are in the BOLD database but do not match this sequence, therefore the specimen may represent the third species *N. spinulosus*.

The most frequent crustacean order preyed on by lionfish was decapods, comprising 95% of the crustaceans. Most of the decapods sequences did not match closely to sequences in the reference databases (Table 3), in which case we applied “strict criteria” [36]. Only one sample (CRU 118) was 93% similar to *Thor amboinensis*, and thus considered *Thor* sp. Four species of this genus have been reported in the Mexican Caribbean: *T. amboinensis*, *T. dobkini*, *T. floridanus* and *T. manningi* [34,37,38]. The sample CRU120 was assigned to the snapping shrimp genus *Synalpheus* (with 99% of similarity), in the Mexican Caribbean there are six species: *Synalpheus fritzmuelleri*, *S. hemphilli*, *S. longicarpus*, *S. minus*, *S. townsendi* and *S. apioceros* [35,39]. There are 19 genera of snapping shrimps in BOLD, none of which matched with our specimen. Two sets of sequences matched to Palaemonidae with 88% similarity (CRU136, 138 and 140 and CRU 107, 153, 155, 202,101,141,213). Little is known of the palaemonid fauna of this region and about 32 species of these shrimps have been reported from the shallow waters from Quintana Roo [38].

Crustaceans are an important component of stomach contents studied in most marine fishes, but their identification using morphology is difficult. For example, from 264 crustaceans found in lionfish stomachs from the Bahamas, 246 could not be identified [3]. In contrast, we could identify our 45 crustacean samples to at least the order level. Species level identifications are usually not feasible because of the present incomplete state of the reference databases.

In this study, the methodology yielded 51% efficiency for sequencing. However, most specimens of lionfish were placed into ethanol, with no injection into the viscera or thick muscle. Then, tissues of stomach contents were subsampled one year later, for per amplification. In contrast, from 35 tissues taken directly from fresh stomach contents, 29 of them gave good quality sequences, i.e. 83% efficiency, indicating the importance of the fixation process for the samples.

Our results suggest that lionfish are mostly opportunistic predators, eating any prey of appropriate size, consistent with findings from the native range in the Indo-Pacific [40,25] and including cannibalistic predation on smaller conspecifics as well.

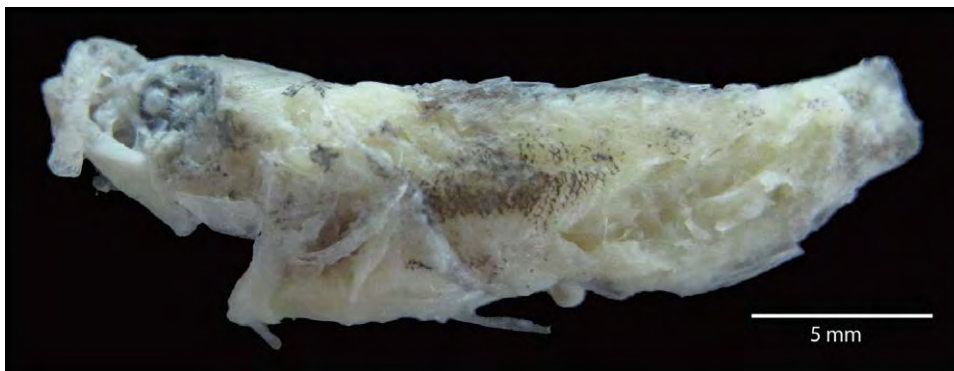


Figure 3. Specimen morphologically identifiable as a lionfish, from the stomach content.
doi:10.1371/journal.pone.0036636.g003

Materials and Methods

For determination of the *Pterois* species, a small piece (about 1–3 mm³) of muscle was removed from 30 specimens collected from Cozumel (25), Xcalak (2), Puerto Morelos (2) and Playa del Carmen (1) and placed in 100% ethanol. To avoid DNA contamination, all tools were flame sterilized before sampling each specimen. The remainder of each fish was retained as a reference voucher in the Fish Collection of El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal Unit (ECOCHP).

For the stomach contents analysis, we extracted the stomach from 122 lionfish from whole specimens previously fixed in alcohol, from Banco Chinchorro, Cozumel, Isla Contoy, Isla Mujeres, Puerto Morelos, Playa del Carmen, Xcalak. In case of Mahahual, the digestive tract from 35 fresh lionfish were dissected and placed in 96% ethanol and kept on ice. In total 157 stomachs were analyzed (Table 2). The specimens were collected by personnel from Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, Mexico) working in protected areas or volunteers. Collecting methods varied from hand nets, harpoons to plastic bags.

From all stomach contents 1 mm³ tissue plugs were extracted from all recognizable material as a prey item under a binocular microscope, after that, the tissue was cleaned with alcohol to avoid contamination from other material.

To extract DNA, the plugs were placed in vertebrate lysis buffer with Proteinase K and digested overnight at 56°C. Genomic DNA was subsequently extracted using a membrane-based approach on the Biomek FX© liquid handling station and AcroPrep 96,1 mL filter plates with 1.0 µM PALL glass fiber media [41]. A 652–658 bp segment of COI was amplified using different fish primers: FishF1, FishR1, FishF2, FishR2 (Ward et al. 2005) or a M13-tailed fish primer cocktail [42].

The 12.5 µL PCR reaction mixes included 6.25 µL of 10% trehalose, 2 µL of ultrapure water, 1.25 µL of 10× PCR buffer, 0.625 µL of MgCl₂ (50 mM), 0.125 µL of each primer (0.01 mM), 0.0625 µL of dNTP mix (10 mM), 0.625 µL of Taq polymerase (New England Biolabs or Invitrogen), and 2.0 µL of DNA template. Amplification protocols followed those described in earlier publications [43]. PCR products were visualized on pre-cast agarose gels (E-Gels©, Invitrogen) and the positives, represented by a band were selected for sequencing.

Products were labelled by using the BigDye© Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc.) as described [43] and sequenced bidirectionally using an ABI 3730 capillary sequencer following manufacturer's instructions. Sequence data, electropherograms, trace files, primer details, photographs and collection localities for specimens are available within the project MXLionfish in BOLD (<http://www.barcodinglife.org>). Sequencing protocols were carried out at the Canadian Centre for DNA

Barcoding using standard protocols [43]. Sequences were aligned using SEQSCAPE v.2.1.1 software (Applied Biosystems, Inc.). All COI sequences have also been deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, See Table S1 for accession numbers).

The sequences obtained were submitted and identified with the ID engine provided in the Barcode of Life Database (BOLD; www.boldsystems.org) to establish whenever possible the identification of the ingested material. Sequence divergences were calculated using the tools provided by BOLD, the Kimura two parameter (K2P) distance model [44]. Neighbour-joining (NJ) trees based on K2P distances were created to provide a graphic representation of the patterning of divergence between species [45] and a simplified tree was constructed using the MEGA 3 software [46]. The criteria to assign identification to a specie level, was based on less than 3% divergence between the unknown and the reference sequence.

When a sequence match was not found in the DNA barcode reference library, we applied the method for visualization of two trees and based our taxonomical assignment following the strict criteria proposed, and consist in nesting the “unknown” within a clade comprising of members of a single taxon. This criterion was used previously only with moths and 75% of the queries were correctly assigned to genus [36].

Supporting Information

Table S1 accession codes from specimens of the public database in BOLD and GenBank (XLS).
(XLS)

Acknowledgments

We thank Priscila Alvarado Villareal from Instituto Tecnológico de Chetumal, for help in the samples process, Aseneth Ureña Ramón and Marines Millet Encalada for their dedicated work as collectors. DNA sequencing was carried out at the Biodiversity Institute of Ontario, (BIO) University of Guelph. We thank Dirk Steinke for help in the processing of the material submitted to BIO. This paper represents a contribution from the Mexican Barcode of Life (MEXBOL) network and the Chetumal node where the sample DNA was extracted and amplified by Arelly Martínez Arce. Benjamin Victor and Sheilla Morrell kindly reviewed the final English version of the manuscript. The former also included several comments that improved our original version, and especially to Paul Hebert for his support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MVM. Performed the experiments: MVM CQL. Analyzed the data: MVM CQL. Contributed reagents/materials/analysis tools: CQL RGL MCGR. Wrote the paper: MVM CQL RGL MCGR.

References

- Whitfield PE, Gardner T, Vives SP, Gilligan MR, Courtenay WR, et al. (2002) Biological invasion of the Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* along the Atlantic coast of North America. *Marine Ecology-Progress Series* 235: 289–297.
- Schofield PJ (2009) Geographic extent and chronology of the invasion of non-native lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus 1758] and *P. miles* [Bennett 1828]) in the western north Atlantic and Caribbean Sea. *Aquatic Invasions* 4: 473–479.
- Morris JA, Akins JL (2009) Feeding ecology of invasive lionfish (*Pterois volitans*) in the Bahamian archipelago. *Environmental Biology of Fishes* 86: 389–398.
- Hamner RM, Freshwater DW, Whitfield PE (2007) Mitochondrial cytochrome b analysis reveals two invasive lionfish species with strong founder effects in the western Atlantic. *Journal of Fish Biology* 71: 214–222.
- Kochzius M, Soller R, Khalaf MA, Blohm D (2003) Molecular phylogeny of the lionfish genera *Dendrochirus* and *Pterois* (Scorpaenidae, Pteroinae) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 396–403.
- Barbour AB, Montgomery ML, Adamson AA, Diaz-Ferguson E, Silliman BR (2010) Mangrove use by the invasive lionfish *Pterois volitans*. *Marine Ecology-Progress Series* 401: 291–294.
- Maljkovic A, Van Leeuwen TE, Cove SN (2008) Predation on the invasive red lionfish, *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae), by native groupers in the Bahamas. *Coral Reefs* 27: 501.
- Freshwater D, Hamner RM, Parham S, Wilbur AE (2009) Molecular Evidence That the Lionfishes *Pterois Miles* and *Pterois Volitans* Are Distinct Species. *Journal of the North Carolina Academy of Science* 125: 39–46.
- Aguilar-Perera A, Tuz-Sulub A (2010) Non-native, invasive red lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus, 1758]: Scorpaenidae), is first recorded in the southern Gulf of Mexico, off the northern Yucatan Peninsula, Mexico. *Aquatic Invasions* 5: 9–12.
- Vásquez-Yeomans L, Carrillo L, Morales S, Malca E, Morris JA, et al. (2011) First larval record of *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae) collected from the ichthyoplankton in the Atlantic. *Biological Invasions* 13: 2635–2640.

11. Ruiz-Carus R, Matheson RE, Roberts DE, Whitfield PE (2006) The western Pacific red lionfish, *Pterois volitans* (Scorpaenidae), in Florida: Evidence for reproduction and parasitism in the first exotic marine fish established in state waters. *Biological Conservation* 128: 384–390.
12. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 360: 1847–1857.
13. Valdez-Moreno M, Vásquez-Ycomans L, Elías-Gutiérrez M, Ivanova NV, Hebert PDN (2010) Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research* 61: 665–671.
14. Armstrong KF, Ball SL (2005) DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 360: 1813–1823.
15. Dewaard JR, Landry JF, Schmidt BC, Derhousoff J, Mclean JA, et al. (2009) In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. *Biodiversity and Conservation* 18: 3825–3839.
16. Elías-Gutiérrez M, Martínez-Jerónimo F, Ivanova NV, Valdez-Moreno M (2008) DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa* 1849: 1–42. pp 1–42.
17. Zeale MR, Butlin RK, Barker GL, Lees DC, Jones G (2011) Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources* 11: 236–244.
18. Budarf A, Burfeind D, Loh W, Tibbetts I (2011) Identification of seagrasses in the gut of a marine herbivorous fish using DNA barcoding and visual inspection techniques. *Journal of Fish Biology* 79: 112–121.
19. Carreon-Martínez L, Johnson T, Ludsin S, Heath D (2011) Utilization of stomach content DNA to determine diet diversity in piscivorous fishes. *Journal of Fish Biology* 78: 1170–1182.
20. Meunier I, Singer G, Landry JF, Hickey DA, Hebert P (2008) A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*. pp 1–4.
21. Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, et al. (2006) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6: 959–964.
22. Albins MA, Hixon MA (2008) Invasive Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* reduce recruitment of Atlantic coral-reef fishes. *Marine Ecology-Progress Series* 367: 233–238.
23. Côté IM, Maljkovic A (2010) Predation rates of Indo-Pacific lionfish on Bahamian coral reefs. *Marine Ecology-Progress Series* 404: 219–225.
24. Arias-González EJ, González-Gandara C, Cabrera JL, Christensen V (2011) Predicted impact of the invasive lionfish *Pterois volitans* on the food web of a Caribbean coral reef. *Environmental Research* 111: 917–925.
25. Fishelson L (1997) Experiments and observations on food consumption, growth and starvation in *Dendrochirus brachypterus* and *Pterois volitans* (Pteroinae, Scorpaenidae). *Environmental Biology of Fishes* 50: 391–403.
26. Floeter SR, Rocha LA, Robertson DR, Joyeux JC, Smith-Vaniz WF, et al. (2008) Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* 35: 22–47.
27. Froese R, Pauly D (2012) FishBase. World Wide Web electronic publication. Available: www.fishbase.org. Accessed: 2011 Dec 20.
28. Lavett SC, Tyler JC, Davis PW, Jones SR, Smith GD, et al. (2003) Fishes of the Pelican Cays, Belize. *Atoll Research Bulletin* 497: 1–88.
29. Baldwin CC, Castillo CI, Weigt LA, Victor BC (2011) Seven new species within western Atlantic *Starksia atlantica*, *S. lepicoelia*, and *S. sluiteri* (Teleostei, Labrisomidae), with comments on congruence of DNA barcodes and species. *Zookeys* 21–72.
30. Greenfield DW (1979) A Review of the Western Atlantic *Starksia ocellata*-Complex (Pisces: Clinidae) with the description of Two New Species and Proposal of Superspecies Status. *Fieldiana Zoology* 73: 9–48.
31. Schmitter-Soto JJ, Vásquez-Ycomans L, Caballero-Vázquez J (2000) Lista de peces marinos del Caribe mexicano. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México* 71: 143–177.
32. Castellanos-Osorio I (1998) Distribución y abundancia de los eufáusidos del estrato superficial del Mar Caribe mexicano. *Caribbean Marine Studies* 6: 1–11.
33. Castellanos-Osorio I, Gasca R (2002) Eufáusidos (Crustacea: Malacostraca) del centro y sur del Mar Caribe mexicano. *Revista de Biología Tropical* 50: 77–85.
34. Markhan JC, Donath-Hernández FE, Villalobos-Hiriart JL, Cantú Diaz-Barriga A (1990) Notes on the shallow-water marine Crustacea of the Caribbean coast of Quintana Roo, Mexico. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 61: 405–446.
35. García-Madrugal MS, Campos-Vázquez C, González NE (2002) Sección de crustáceos de la colección de referencia de bentos costero de ECOSUR. *Universidad y Ciencia* 18: 140–148.
36. Wilson JJ, Rougerie R, Schonfeld J, Janzen DH, Halwachs W, et al. (2011) When species matches are unavailable are DNA barcodes correctly assigned to higher taxa? An assessment using sphingid moths. *BMC Ecology* 11–18.
37. Román-Contreras R, Martínez-Mayén M (2009) Shallow water hippolytid shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) from the Mexican Caribbean coast. *Hidrobiológica* 19: 119–128.
38. Román-Contreras R, Martínez-Mayén M (2010) Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) from the shallow waters from Quintana Roo, Mexican Caribbean coast. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 43–51.
39. Román-Contreras R, Martínez-Mayén M (2010) Notes on some alpheid shrimps (Decapoda: Caridea) of *Thalassia testudinum* meadows, from the Central-Southern Mexican Caribbean. *Hidrobiológica* 20: 222–229.
40. Whitfield PE, Hare JA, David AW, Harter SL, Muñoz RC, et al. (2007) Abundance estimates of the Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans*/miles complex in the Western North Atlantic. *Biological Invasions* 9: 53–64.
41. Ivanova NV, De Waard JR, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998–1002.
42. Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7: 544–548.
43. Hajibabaei M, DeWaard JR, Ivanova NV, Ratnasingham S, Dooh R, et al. (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 360: 1959–1967.
44. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
45. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
46. Kumar S, Tamura K, Masatoshi N (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150–163.

Supporting Information

Identification	Sample ID	Museum ID	Processid	Storing	GenBank
Pterois volitans	MXIV186	ECOCH	MXIV186-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379920
Pterois volitans	MXIV185	ECOCH6369	MXIV185-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379919
Pterois volitans	MXIV184	ECOCH6369	MXIV184-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379918
Pterois volitans	MXIV182	ECOCH6369	MXIV182-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966006
Pterois volitans	MXIV176	ECOCH6369	MXIV176-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379915
Pterois volitans	MXIV175	ECOCH6369	MXIV175-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379914
Pterois volitans	MXIV171	ECOCH6369	MXIV171-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379911
Pterois volitans	MXIV170	ECOCH6369	MXIV170-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379910
Pterois volitans	MXIV169	ECOCH6369	MXIV169-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379909
Pterois volitans	MXIV168	ECOCH6372	MXIV168-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379908
Pterois volitans	MXIV167	ECOCH6372	MXIV167-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379907
Pterois volitans	MXIV166	ECOCH6371	MXIV166-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379906
Pterois volitans	MXIV153	ECOCH6369	MXIV153-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379897
Pterois volitans	MXIV152	ECOCH6370	MXIV152-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379896
Pterois volitans	MXIV148	ECOCH6369	MXIV148-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379894
Pterois volitans	MXIV147	ECOCH6369	MXIV147-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379893
Pterois volitans	MXIV146	ECOCH6369	MXIV146-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379892
Pterois volitans	MXIV145	ECOCH6369	MXIV145-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379891

Pterois volitans	MXIV144	ECOCH6369	MXIV144-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379890
Pterois volitans	MXIV143	ECOCH6369	MXIV143-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379889
Pterois volitans	MXIV141	ECOCH6369	MXIV141-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379888
Pterois volitans	MXIV140	ECOCH6369	MXIV140-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379887
Pterois volitans	MXIV139	ECOCH6369	MXIV139-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379886
Pterois volitans	MXIV138	ECOCH6369	MXIV138-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379885
Pterois volitans	MXIV137	ECOCH6369	MXIV137-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379884
Pterois volitans	MXIV0202	ECOCH6416	MXIV202-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966011
Pterois volitans	MXIV0201	ECOCH6416	MXIV201-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966010
Pterois volitans	MXIV0200	ECOCH6416	MXIV200-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966009
Pterois volitans	MXIV0199	ECOCH6416	MXIV199-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Pterois volitans	MXIV0198	ECOCH6416	MXIV198-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966008
Abudefduf saxatilis	MXIV0263	ECOCH6416	MXIV263-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966044
Apogon lachneri	MXIV0880	ECOCH7009	MXIV502-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN311701
Apogon lachneri	MXIV174	ECOCH	MXIV174-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379913
Apogon maculatus	MXIV0260	ECOCH6416	MXIV260-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966043
Apogon maculatus	MXIV0259	ECOCH6416	MXIV259-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966042
Apogon mosavi	MXIV159	ECOCH	MXIV159-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379902
Apogon townsendi	MXIV0232	ECOCH6416	MXIV232-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966025

Apogon townsendi	MXIV173	ECOCH	MXIV173-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379912
Astrapogon	MXIV0926	ECOCH7009	MXIV548-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Astrapogon puncticulatus	MXIV0886	ECOCH7009	MXIV508-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN311702
Bothus lunatus	MXIV0850	ECOCH7009	MXIV472-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Cephalopholis cruentata	MXIV0878	ECOCH7009	MXIV500-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN313791
Cephalopholis cruentata	MXIV0264	ECOCH6416	MXIV264-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Cephalopholis cruentata	MXIV0866	ECOCH7009	MXIV488-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Coryphopterus eidolon	MXIV0265	ECOCH6416	MXIV265-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966045
Coryphopterus eidolon	MXIV0252	ECOCH6416	MXIV252-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966037
Coryphopterus hyalinus	MXIV0266	ECOCH6416	MXIV266-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Coryphopterus hyalinus	MXIV0191	ECOCH6416	MXIV191-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Coryphopterus thrix	MXIV181	ECOCH	MXIV181-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379917
Coryphopterus thrix	MXIV163	ECOCH	MXIV163-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379904
Coryphopterus tortugae	MXIV0939	ECOCH7009	MXIV561-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN311883
Coryphopterus tortugae	MXIV0932	ECOCH7009	MXIV554-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN311882
Coryphopterus tortugae	MXIV0908	ECOCH7009	MXIV530-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN311880
Coryphopterus tortugae	MXIV0215	ECOCH6416	MXIV215-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Coryphopterus tortugae	MXIV0448	ECOCH7009	MFIV354-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN311877
Coryphopterus tortugae	MXIV0914	ECOCH7009	MXIV536-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN311881

Coryphopterus venezuelae	MXIV0256	ECOCH6416	MXIV256-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966041
Coryphopterus venezuelae	MXIV0253	ECOCH6416	MXIV253-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966038
Coryphopterus venezuelae	MXIV0881	ECOCH7009	MXIV503-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Coryphopterus venezuelae	MXIV155	ECOCH	MXIV155-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379899
Coryphopterus venezuelae	MXIV156	ECOCH	MXIV156-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379900
Coryphopterus venezuelae	MXIV157	ECOCH	MXIV157-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379901
Decapoda	CRU0110	ECOCH6416	CRM108-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0115	ECOCH6416	CRM113-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0197	ECOCH7009	CRM219-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0196	ECOCH7009	CRM218-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0216	ECOCH7009	CRM238-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0234	ECOCH7009	CRM256-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0193	ECOCH7009	CRM215-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0191	ECOCH7009	CRM213-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0232	ECOCH7009	CRM254-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0156	ECOCH6416	CRM154-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0220	ECOCH7009	CRM242-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0221	ECOCH7009	CRM243-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0104	ECOCH6416	CRM102-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	

Decapoda	CRU0130	ECOCH6416	CRM128-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0134	ECOCH6416	CRM132-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0227	ECOCH7009	CRM249-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0149	ECOCH6416	CRM147-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0229	ECOCH7009	CRM251-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0235	ECOCH7009	CRM257-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0200	ECOCH7009	CRM222-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0201	ECOCH7009	CRM223-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0128.1	ECOCH6416	CRM296-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0132.1	ECOCH6416	CRM298-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0152.1	ECOCH6416	CRM289-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0237	ECOCH7009	CRM259-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0217	ECOCH7009	CRM239-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0106	ECOCH6416	CRM104-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Decapoda	CRU0113	ECOCH6416	CRM111-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Enneanectes altivelis	MXIV0217	ECOCH6416	MXIV217-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966017
Enneanectes altivelis	MXIV0216	ECOCH6416	MXIV216-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966016
Enneanectes altivelis	MXIV160	ECOCH	MXIV160-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379903
Enneanectes boehlkei	MXIV0237	ECOCH6416	MXIV237-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	

Euphausia americana	CRU0124.1	ECOCH6416	CRM294-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Gonodactylidae	CRU0238	ECOCH7009	CRM260-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Gramma loreto	MXIV0883	ECOCH7009	MXIV505-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Gramma loreto	MXIV0862	ECOCH7009	MXIV484-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Gramma loreto	MXIV0869	ECOCH7009	MXIV491-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Haemulon flavolineatum	MXIV0270	ECOCH6416	MXIV270-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966046
Haemulon flavolineatum	MXIV0245	ECOCH6416	MXIV245-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Haemulon flavolineatum	MXIV0271	ECOCH6416	MXIV271-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966047
Halichoeres garnoti	MXIV0455	ECOCH7009	MFIV361-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN313635
Halichoeres garnoti	MXIV0896	ECOCH7009	MXIV518-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0895	ECOCH7009	MXIV517-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0451	ECOCH7009	MFIV357-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN313634
Halichoeres garnoti	MXIV0900	ECOCH7009	MXIV522-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV854.1	ECOCH7009	MXIV583-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0236	ECOCH6416	MXIV236-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966029
Halichoeres garnoti	MXIV154	ECOCH	MXIV154-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379898
Halichoeres garnoti	MXIV0471	ECOCH7009	MFIV377-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN313638
Halichoeres garnoti	MXIV0193	ECOCH6416	MXIV193-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966007
Halichoeres garnoti	MXIV0907	ECOCH7009	MXIV529-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	

Halichoeres garnoti	MXIV0898	ECOCH7009	MXIV520-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0905	ECOCH7009	MXIV527-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0213	ECOCH6416	MXIV213-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966014
Halichoeres garnoti	MXIV0904	ECOCH7009	MXIV526-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0891	ECOCH7009	MXIV513-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0903	ECOCH7009	MXIV525-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0902	ECOCH7009	MXIV524-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0873	ECOCH7009	MXIV495-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0233	ECOCH6416	MXIV233-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966026
Halichoeres garnoti	MXIV0917	ECOCH7009	MXIV539-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Halichoeres garnoti	MXIV0445	ECOCH7009	MFIV351-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN313633
Liopropoma rubre	MXIV861.1	ECOCH7009	MXIV576-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Liopropoma rubre	MXIV853.1	ECOCH7009	MXIV578-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Lythrypnus	MXIV0223	ECOCH6416	MXIV223-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966020
Lythrypnus	MXIV164	ECOCH	MXIV164-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379905
Lythrypnus	MXIV0224	ECOCH6416	MXIV224-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966021
Lythrypnus	MXIV0214	ECOCH6416	MXIV214-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966015
Lythrypnus	MXIV0222	ECOCH6416	MXIV222-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966019
Lythrypnus	MXIV0221	ECOCH6416	MXIV221-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966018

Malacoctenus triangulatus	MXIV0240	ECOCH6416	MXIV240-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966032
Malacoctenus triangulatus	MXIV0916	ECOCH7009	MXIV538-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Monacanthus tuckeri	MXIV150	ECOCH	MXIV150-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379895
Palaemonidae	CRU0107	ECOCH6416	CRM105-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0213	ECOCH7009	CRM235-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0202	ECOCH7009	CRM224-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0153.1	ECOCH6416	CRM290-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0155	ECOCH6416	CRM153-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0141.1	ECOCH6416	CRM285-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0140	ECOCH6416	CRM138-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0138	ECOCH6416	CRM136-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0136	ECOCH6416	CRM134-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Palaemonidae	CRU0101	ECOCH6416	CRM099-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Priolepis hipoliti	MXIV161	ECOCH	MXIV161-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966005
Pseudosquilla	CRU0198	ECOCH7009	CRM220-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Pterois volitans	MXIV0244	ECOCH6416	MXIV244-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966035
Pterois volitans	MXIV0242	ECOCH6416	MXIV242-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966033
Pterois volitans	MXIV0243	ECOCH6416	MXIV243-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966034
Pterois volitans	MXIV0879	ECOCH7009	MXIV501-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	

Pterois volitans	MXIV0209	ECOCH6416	MXIV209-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966013
Pterois volitans	MXIV0876	ECOCH7009	MXIV498-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Pterois volitans	MXIV0226	ECOCH6416	MXIV226-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966022
Pterois volitans	MXIV0467	ECOCH7009	MFIV373-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Pterois volitans	MXIV0230	ECOCH6416	MXIV230-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966023
Pterois volitans	MXIV0254	ECOCH6416	MXIV254-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966039
Pterois volitans	MXIV0238	ECOCH6416	MXIV238-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966030
Pterois volitans	MXIV0865	ECOCH7009	MXIV487-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Pterois volitans	MXIV0255	ECOCH6416	MXIV255-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966040
Pterois volitans	MXIV870.1	ECOCH7009	MXIV569-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Pterois volitans	MXIV0250	ECOCH6416	MXIV250-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966036
Pterois volitans	MXIV0868	ECOCH7009	MXIV490-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Sargocentron coruscum	MXIV0921	ECOCH7009	MXIV543-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Scarus iseri	MXIV0887	ECOCH7009	MXIV509-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Scarus iseri	MXIV0890	ECOCH7009	MXIV512-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312305
Scarus taeniopterus	MXIV0858	ECOCH7009	MXIV480-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Sparisoma aurofrenatum	MXIV0457	ECOCH7009	MFIV363-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312362
Sparisoma aurofrenatum	MXIV0456	ECOCH7009	MFIV362-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312361
Sparisoma aurofrenatum	MXIV0450	ECOCH7009	MFIV356-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312360

Sparisoma aurofrenatum	MXIV0447	ECOCH7009	MFIV353-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312358
Sparisoma aurofrenatum	MXIV0444	ECOCH7009	MFIV350-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312357
Sparisoma aurofrenatum	MXIV0867	ECOCH7009	MXIV489-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Sparisoma aurofrenatum	MXIV0877	ECOCH7009	MXIV499-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Sparisoma aurofrenatum	MXIV0889	ECOCH7009	MXIV511-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312363
Sparisoma viride	MXIV0443	ECOCH7009	MFIV349-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312356
Sparisoma viride	MXIV178	ECOCH	MXIV178-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HM379916
Sparisoma viride	MXIV0449	ECOCH7009	MFIV355-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	JN312359
Starksia	MXIV0231	ECOCH6416	MXIV231-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966024
Starksia ocellata	MXIV0925	ECOCH7009	MXIV547-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Stegastes partitus	MXIV871.1	ECOCH7009	MXIV568-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Stegastes partitus	MXIV0235	ECOCH6416	MXIV235-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966028
Stegastes partitus	MXIV0882	ECOCH7009	MXIV504-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Stegastes partitus	MXIV0874	ECOCH7009	MXIV496-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Stegastes partitus	MXIV0851	ECOCH7009	MXIV473-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Stegastes partitus	MXIV0872	ECOCH7009	MXIV494-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Synalpheus	CRU0120	ECOCH6416	CRM118-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Thalassoma bifasciatum	MXIV857.1	ECOCH7009	MXIV582-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Thalassoma bifasciatum	MXIV0909	ECOCH7009	MXIV531-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	

Thalassoma bifasciatum	MXIV0234	ECOCH6416	MXIV234-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966027
Thalassoma bifasciatum	MXIV0859	ECOCH7009	MXIV481-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Thalassoma bifasciatum	MXIV860.1	ECOCH7009	MXIV566-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Thalassoma bifasciatum	MXIV0207	ECOCH6416	MXIV207-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966012
Thalassoma bifasciatum	MXIV855.1	ECOCH7009	MXIV577-11	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Thalassoma bifasciatum	MXIV0915	ECOCH7009	MXIV537-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Thalassoma bifasciatum	MXIV0929	ECOCH7009	MXIV551-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	
Thalassoma bifasciatum	MXIV0239	ECOCH6416	MXIV239-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	HQ966031
Thor	CRU0118	ECOCH6416	CRM116-10	El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal	

Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management

Martha Valdez-Moreno^{A,C}, Lourdes Vásquez-Yeomans^A,
Manuel Elías-Gutiérrez^A, Natalia V. Ivanova^B
and Paul D. N. Hebert^B

^AEl Colegio de la Frontera Sur, Avenida Centenario km 5.5, Chetumal 77014, Quintana Roo, México.

^BBiodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada.

^CCorresponding author. Email: mvaldez@ecosur.mx

Abstract. Barcoding has proven a useful tool in the rapid identification of all life stages of fish species. Such information is of critical importance for fisheries management and conservation, especially in high-diversity regions, such as Mexico's marine waters, where more than 2200 species occur. The present study reports the barcode analysis of 1392 specimens from the Yucatan Peninsula, corresponding to 610 adults and juveniles, 757 larvae and 25 eggs, representing 181 species (179 teleosts and 2 rays), 136 genera and 74 families. Barcoding results revealed major range extensions and overlooked taxa, including three sympatric species of *Albula* (one likely undescribed) and a new taxon of *Floridichthys*. In total, six species of eggs and 34 species of larvae were identified through their barcode match with adults. These cases enabled the first discrimination of the larvae of four species of *Eucinostomus*, and new information about spawning locality and time was obtained from egg records for the hogfish, *Lachnolaimus maximus*, which is one of the most commercially important species in the Mexican Caribbean. Also, barcodes revealed mistakes in species recognition during a sport-fish contest. In the future, barcodes will help avoid similar errors and protect rare or endangered species, and will aid regulation of fisheries quotas.

Additional keywords: COI, *coxI*, Cytochrome *c* oxidase, identification, mitochondrial DNA.

Introduction

Since the pioneering study by Ward *et al.* (2005) on DNA barcodes of Australian fishes, more than 20 fish-barcoding studies have been published, confirming the effectiveness of this technique in the identification of fishes in different regions. For example, Rock *et al.* (2008) analysed 35 fish species from the Scotia Sea, reporting that COI (cytochrome oxidase subunit I gene) provided effective species-level discrimination that was unaffected by broad geographic sampling. Schlei *et al.* (2008) reported similar results in their study of eight coregonine species with distributional overlap in Alaska. Barcode comparisons of fish populations from North Atlantic, Mediterranean and Australasian waters showed no significant spatial genetic differentiation in 13 of 15 species, whereas two other species included two highly divergent barcode clusters, suggesting that they were each likely to be a species pair (Ward *et al.* 2008a). In a study examining patterns of sequence divergence among populations of 35 major commercial fish species from the opposite sides of the Indian Ocean (Australia, South Africa), Zemlak *et al.* (2009) concluded that current taxonomic systems

substantially underestimate species diversity. Steinke *et al.* (2009) used DNA barcodes to examine 391 fish species important in the ornamental fish trade and also reported several cases of overlooked species. Of other genes, Cytochrome *b* has been the DNA marker most used in fish, proving highly reliable for species identification (Teletchea 2009). However, currently more than 7205 species of fish have been barcoded with the COI (Barcode of Life Database (BOLD), www.boldsystems.org, verified 24 November 2009).

Aside from their role in species discovery and identification, DNA barcodes will play an increasingly important role in the identification of fish larvae and eggs. Egg-based identifications can play a major role in fisheries management (Fox *et al.* 2005). The early stages of most fish are unknown, and the larvae of different species are often quite similar (Leis and Carson-Ewart 2000; Richards 2006; Baldwin *et al.* 2009). Furthermore, larvae are so delicate that they are often badly damaged during collection, and fixation regularly causes the loss of pigmentation patterns important for identification (Smith 1995). An obvious solution to these problems involves the identification of egg and

larval stages through matching with reference sequence libraries established through the barcode analysis of adults. Work on both the Great Barrier Reef (Pegg *et al.* 2006) and in the Antarctic (Webb *et al.* 2006) has shown the effectiveness of this approach. Aside from monitoring programs, barcode analysis is acceptance importance in life-history descriptions. For example, Baldwin *et al.* (2009) described the early stages of six species in two genera (*Phaeoptyx* and *Astrapogon*) and Victor (2007, 2008) and Victor *et al.* (2009) described larvae and adults of two new species of *Coryphopterus* and *Lutjanus cyanopterus* from the Caribbean.

Although the identification of fish larvae is difficult, the task is even more problematic for eggs, because of their small size (<1 mm) and similarity among species (Richards 2006). Currently, there are descriptions to a species level for only 4% of the known fish species (Richards 1985; Kendall and Matarese 1994). This gap needs to be resolved because it is crucial to identify eggs to recognise and protect spawning areas for commercially important or endangered species. Despite much effort (Moser 1996; Leis and Carson-Ewart 2000; Richards 2006; Fahay 2007), the identification of early stages remains one of the major limitations in studies of the ichthyoplankton. For example, Kendall and Matarese (1994) found that only 10% of the Indo-Pacific species have a description for even one of their different larval stages. Barcodes will aid the advance of fisheries science by providing a rapid, reliable system for the identification of specimens by non-taxonomists, regardless of the life stage. They also aid taxonomists by revealing overlooked diversity (Gregory 2005; Zemlak *et al.* 2009) and speeding the description of new species by allowing specialists to concentrate in highlighted problems after the barcoding (e.g. see Quiroz-Vázquez and Elías-Gutiérrez 2009). Finally, the capacity of barcodes to identify eggs and larvae will help ensure sustainable fisheries, allowing the protection of nurseries, for economically important species. Other practical applications involve the identification of processed fish in the marketplace to avoid substitution of species (Moura *et al.* 2008; Smith *et al.* 2008; Ward *et al.* 2008b; Wong and Hanner 2008).

The only prior barcode study on Mexican fish examined 61 freshwater taxa and revealed more than 90% success in species discrimination (Valdez-Moreno *et al.* 2009). No previous study has examined the 2200 fish species known from Mexican marine ecosystems (Escobar-Fernández and Siri 1997; Schmitter-Soto *et al.* 2000). Our study sought to (1) test the ability of barcodes to distinguish marine species from the Yucatan coastline, (2) connect eggs and larvae to adults by using barcodes and (3) assess how correct identifications can aid fisheries management and conservation.

Materials and methods

Fish specimens (juveniles and adults) were collected from diverse environments on the shores of the Yucatan peninsula (18°27'–21°44'N, 86°41'–90°34'W) with seine nets, gill-nets, cast nets, harpoons and line fishing. Eggs and larvae of marine fish were collected with light traps and channel nets from the inshore waters of Quintana Roo and with multiple opening and closing net environmental sensing system (MOCNESS) nets offshore from Quintana Roo to Belize. Details on collection localities and dates are available within the project files 'Marine Fishes of

Mexico I and II' and 'Mexican Fish Larvae I and II' on the BOLD (Ratnasingham and Hebert 2007). DNA sequences have been submitted to GenBank (Accession Nos GU224295–GU225688). From the total specimens identified to species level, 116 species were represented by three or more specimens, 15 species were represented by two specimens and 50 species were represented by one specimen.

A small piece (~1–3 mm³) of muscle was removed from each adult or juvenile fish and placed in 100% ethanol. To avoid DNA contamination, all tools were flame-sterilised before sampling each specimen. The remainder of each fish was ordinarily retained as a reference voucher in the Fish Collection of El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal Unit (ECOCHP). Larvae were immediately preserved in 96% ethanol and DNA was subsequently extracted from a small piece of tissue from its right side. The remainder of each specimen was deposited in the Fish Larvae Collection (ECOCHLP) in the same institution and Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV, IPN), Mérida Unit. When possible, we sampled five adults of each species. All identifications were based on specialised literature and consultation with specialist taxonomists in cases when identification was particularly difficult. Names follow Fish Base (Froese and Pauly 2006).

Sequence analysis was carried out at the Canadian Centre for DNA Barcoding by using standard protocols (Hajibabaei *et al.* 2005). DNA was extracted from 1-mm³ tissue plugs that were placed in vertebrate lysis buffer with proteinase K and digested overnight at 56°C. Genomic DNA was subsequently extracted using a membrane-based approach on the Biomek FX (Biomek FX, Brea, CA, USA) liquid handling station and AcroPrep 96 (AcroPrep 96, Pall Co., Port Washington, NY, USA) filter plates with 1.0 µM PALL glass-fibre media (Ivanova *et al.* 2006). A 652–658-bp segment of COI was amplified with different fish primers, including FishF1, FishR1, FishF2, FishR2 (Ward *et al.* 2005) or a M13-tailed fish-primer cocktail (Ivanova *et al.* 2007).

The 12.5-µL PCR reaction mixes included 6.25 µL of 10% trehalose, 2 µL of ultrapure water, 1.25 µL of 10× PCR buffer, 0.625 µL of MgCl₂ (50 mM), 0.125 µL of each primer (0.01 mM), 0.0625 µL of dNTP mix (10 mM), 0.625 µL of *Taq* polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA or Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 2.0 µL of DNA template. Amplification protocols followed those described in earlier publications (Hajibabaei *et al.* 2005). PCR products were visualised on pre-cast agarose gels (E-Gels[®], Invitrogen) and the positives, represented by a band, were selected for sequencing.

Products were labelled by using the BigDye[®] Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) as described in Hajibabaei *et al.* (2005), and sequenced bidirectionally with an ABI 3730 capillary sequencer (ABI, Carlsbad, CA, USA), following manufacturer's instructions. Sequence data, electropherograms, trace files, primer details, photographs and collection localities for specimens are available within the four project files already mentioned (see <http://www.barcodinglife.org>).

Sequences were aligned using SEQSCAPE v.2.1.1 software (Applied Biosystems). Sequence divergences were calculated using the Kimura two-parameter (K2P) distance model (Kimura 1980). Neighbour-joining (NJ) trees of K2P distances were created to provide a graphic representation of the patterning of

divergence among species (Saitou and Nei 1987). Divergence values were obtained from BOLD (Ratnasingham and Hebert 2007).

Results

In total, 1392 marine-fish specimens were sequenced, including 610 adults and juveniles, 757 larvae and 25 eggs. These individuals corresponded to representatives of 181 species (179 teleosts and 2 rays), 136 genera and 74 families. In all, 1.8% (11 of 610) of the adults and juveniles could not be identified to a species level through morphology or barcodes. Most of the larvae and eggs were identified, whereas 137 specimens failed to gain identification because there are no matching sequences on BOLD (see Accessory publication).

Read lengths were all more than 600 bp long and there were no insertions, deletions or stop codons. The full K2P–NJ tree is provided as an Accessory Publication, and Table 1 provides an overview of the patterning of sequence divergences. The average K2P distance (Table 1) among conspecific individuals was 0.31%, whereas congeneric species showed a far higher average divergence (13.88%).

We sequenced 25 fish eggs, and barcode results enabled the identification of five eggs to species level (*Caranx bartholomaei*, *Haemulon plumieri*, *Lachnolaimus maximus*, *Mugil cephalus*, *Acanthurus bahianus*). The rest could not be identified because they failed to match any barcode records from adult fish.

In total, 34 species of larvae could be matched (with <2% divergence) with their adult stage, five species had barcodes coincident between adults and eggs, and two more species matched larvae with eggs (again, with <2% divergence) (Fig. 1). The remaining larvae belonged to 75 different barcode lineages, with no close correspondence to any species in our adult collections. However, probable generic assignments, on the basis of the BOLD system to identify a specimen, were possible in some cases, including the following: *Acyrtops*, *Albula* sp. 1 (Species F), *Apogon*, *Caranx*, *Ceratoscopelus*, *Chlopsis*, *Cyclosetta*, *Decapterus*, *Elops*, *Enneanectes*, *Eucinostomus*, *Haemulon*, *Hygophum*, *Jenkinsia*, *Lobianchia*, *Myrophis*, *Ogilbia*, *Ophichthus*, *Pseudomyrophis*, *Rhynchoconger*, *Saurida*, *Scorpaena*, *Sparisoma* sp. 2, *Sparisoma* sp. and *Sphoeroides*.

Discussion

Adult fish

Barcoding revealed evidence for overlooked taxa in several genera, including the bonefish (*Albula*), an important component of the recreational fishery. Our barcode results strongly

suggested that three *Albula* species are sympatric in the southern Mexican Caribbean because three barcode clusters showing more than 5% of divergence were detected (see Fig. 1). So far, only *A. vulpes* has been reported from this region (Schmitter-Soto 1998; Schmitter-Soto *et al.* 2000), although *A. nemoptera* occurs in nearby Belize (Lavett *et al.* 2003). Two species of *Albula* occur in Hawaii, on the basis of allozyme studies (Shaklee and Tamaru 1981). A global study of Cytochrome *b* sequences revealed eight genetically divergent lineages; three corresponded with known species (*A. vulpes*, *A. glossodonta*, *A. neoguinaica*), whereas the five new ones received interim names (Species A–E) (Colborn *et al.* 2001). The following three of these taxa have now been described: Species C, which occurs in the Mexican Pacific, was named *Albula esuncula* (Pfeiler *et al.* 2008); Species D, which occurs in the Indian Ocean, was described as *A. oligolepis* (Hidaka *et al.* 2008); and Species E, which occurs from Baja California to Ecuador, was named *A. pacifica* (Pfeiler 2008). Species B from the Caribbean has been assigned to *A. garcia*, but this is a *nomen nudum* (see Vásquez-Yeomans *et al.* 2009), and Species A from the Gulf of California awaits description (Colborn *et al.* 2001; Adams *et al.* 2007; Bowen *et al.* 2007). On the basis of these results, we conclude that our three species are *A. vulpes* and *A. garcia*, represented only by larvae, and *Albula* sp. 1, a new species which we designate as Species F, following the established interim naming system (Colborn *et al.* 2001). We first presumed that *Albula* sp. F was *A. nemoptera* which occurs in Belize (Lavett *et al.* 2003); however, the juvenile of Species F lacks the distinctive characters for *A. nemoptera*, namely a prolonged last ray of the dorsal and anal fins and a large mouth (Rivas and Warlen 1967).

We also studied barcode diversity in members of the Istiophoridae, another important family of game fish, examining tissues from 15 specimens caught in a contest involving 250 boats at Cozumel Island. From nine specimens identified by the judges as blue marlin (*Makaira nigricans*) and six as white marlin (*Kajikia albida*), the barcode results and a careful retrospective examination of photographs revealed that only one specimen was actually a blue marlin, whereas 14 were white marlins.

Species of the family Gerreidae ('mojarra') are economically important in Mexico, especially in the Caribbean region. Seven of the nine species known from our sampling region (Schmitter-Soto *et al.* 2000) were represented in our collections and all but one comprised a tight sequence cluster, supporting established species boundaries. The sole exception, *Eucinostomus gula*, was split into two groups showing a little more than

Table 1. Genetic divergences (K2P) at different taxonomic levels for marine fish

Comparisons	No. of comparisons	Distance			
		Minimum (%)	Mean (%)	Maximum (%)	s.e.
Within species	12 671	0	0.308	3.246	0.003
Within genera	16 999	1.875	13.881	28.23	0.032
Within families	13 276	2.03	19.605	29.041	0.041
Within orders	372 293	10.659	23.457	33.604	0.004
Within class	537 172	11.893	26.266	38.914	0.005

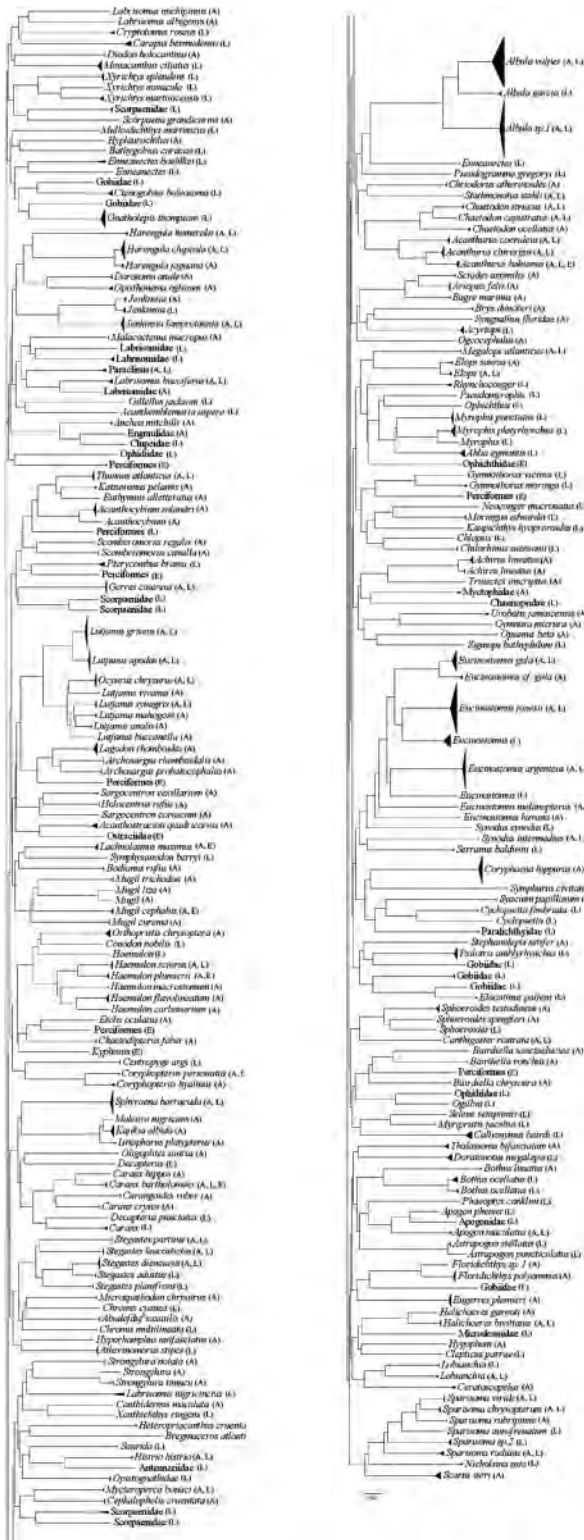


Fig. 1. Neighbour-joining tree (K2P distance) of 1392 COI sequences from 181 marine fish species, including 179 teleosts and two rays. Triangle size behind the name gives a rough idea about the number of specimens barcoded (▲ or bigger, ≤ 3 specimens were sequenced; smaller or no triangle, less than three specimens sequenced). Species included adult and juvenile stages (A), pre-juvenile and larvae stages (L) and eggs (E).

3% divergence, coincident with collection locality, with some specimens coming from the north-western coast of the Yucatan Peninsula (Gulf of Mexico) and other ones from Quintana Roo (Mexican Caribbean).

The mullet family (Mugilidae) includes 17 genera and 72 species (Froese and Pauly 2006; Nelson 2006); however, only two of these species, namely *Mugil curema* and *M. cephalus*, are known from the Mexican Caribbean (Schmitter-Soto et al. 2000). We initially assigned 17 mullets (some of them juveniles) to these two species; however, our barcode results indicated five highly divergent groups. Morphological re-examination of the specimens indicated the presence of three additional species. *M. liza* has been recorded from Belize (Lavett et al. 2003), *M. trichodon* from Chetumal Bay (Schmitter-Soto et al. 2009) and the third taxon clearly represents a new species for the region; however, it could not be identified because only the head was retained as a voucher. This case makes clear the critical importance in retaining complete vouchers of all sequenced specimens. In the latter case, high-resolution photographs taken with attention to taxonomic characters can provide critical information about species identity.

One adult (ECOCH-5494D), in another family, the Cyprinodontidae, remains more or less a taxonomic enigma. It was assigned to *Floridichthys* sp., even though it is 7% divergent from the sole member of this genus known from Mexico (*F. polyommus*). This large divergence suggests that it is likely to represent a new species, although further specimens are required to validate this conclusion. The single specimen named *Labrisomus nuchipinnis* (MX055) is another interesting case. On the basis of certain morphological characters and a communication from Benjamin Victor (in litt.), it is likely to be *L. cricota* Sazima, Gasparini & Moura, 2002. If so, this specimen represents a major range extension from Brazil to Mexico. Unfortunately, key diagnostic features were lost in our specimen, so more material is required to confirm its identity.

We found two more cases of large divergences within a single species. *Achirus lineatus* splits into two groups (2.2–2.7% divergence) consistent with their geographic origins, Gulf of Mexico and the Caribbean. The majority of our specimens were juveniles, and there were no observable morphological differences between the two groups. A second species, *Elops saurus*, included two barcode clusters showing 2.4–2.8% divergence, results concordant with Smith's (1989) discovery of two morphs in the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. A recent study corroborated the presence of two morphs in these geographic regions; *E. saurus* was found in the western North Atlantic and Gulf of Mexico, whereas *Elops* sp. occurred in the Caribbean (McBride and Horodysky 2004).

All of these cases of important sequence divergence show how barcode data can speed the discovery of overlooked species, by allowing taxonomists to focus on specific problem cases.

In contrast to these cases of large divergence, we discovered only a single case where two different species had a low divergence (<2%), namely *Harengula jaguana* and *H. clupeiola*. Some specialists recognise they are difficult to identify (Castro-Aguirre et al. 1999), probably because they are young species, as occurred with the characids in a previous study on freshwater fish (Valdez-Moreno et al. 2009).

Matching eggs and larval stages with adults

Our results have provided, for the first time, some idea of the spawning time and areas for these species, data critical for fisheries management. For example, we recovered three eggs from the hogfish, *L. maximus*, in January. Before the present study, there was no information on the breeding localities or season for this species in the Yucatan region, although it is the most commercially important species in the Mexican Caribbean after snappers and groupers (E. Sosa, pers. comm.).

As noted earlier, barcoding revealed three lineages of bonefish larvae from the coastal waters of the Mexican Caribbean. One of these groups (represented by 32 larvae) was *A. vulpes*, a species common in the region (24 adults and juveniles), whereas *A. garcia* was represented only by five larvae. The third lineage, *Albula* sp. F, dominated the larval population (67 larvae), but was represented only by a single juvenile. These results have important management implications, because current sport-fishing regulations presume that there is just a single species, *A. vulpes*. Fishing pressure is considerable because it is one of the most important tourist attractions (Adams *et al.* 2007; Ault *et al.* 2007; Vásquez-Yeomans *et al.* 2009) and even catch-and-release may result in fish individuals being more vulnerable to predation (Danylchuk *et al.* 2007).

Larval descriptions for the Gerreidae in the western central North Atlantic are nearly lacking and meristic characters cannot distinguish among the species of *Eucinostomus*, except for *E. lefroyi*, which has two anal spines, whereas others possess three anal spines. As a result, all larvae in this genus are simply assigned to the *E. argenteus-gula* complex (Powell and Greene 2006). A description of larval development is available only for one member of this genus, *E. currani* (see Jiménez-Rosenberg *et al.* 2006). By contrast, our barcode results enabled the identification of larvae of four of the nine species in this region (Fig. 1), all previously unknown. Formal descriptions are now in progress. Two more species could be identified as *E. harengulus* and *E. lefroyi*, described from the Mexican Caribbean (Schmitter-Soto 1998; Schmitter-Soto *et al.* 2000), although we did not collect their adults.

From the biogeographical perspective, it will be important to ascertain whether the larvae detected in the present study were derived from local populations or whether they were transported by oceanic currents. We believe that larvae of *A. garcia* and *Albula* sp. F were likely to have been transported from a distant spawning location, because they have a long planktonic life (mean 56 days) (Mojica *et al.* 1995). Some studies have indicated that a longer larval life gives more possibilities for a widespread distribution (Sponaugle *et al.* 2002; Carrillo *et al.* 2008). This will be known when the COI database is more complete.

Among the range extensions, it is important to note that *Gymnura micrura* and *Bairdiella chrysoura*, previously recorded only from Yucatan (Gulf of Mexico), were now found in the Quintana Roo coast (Caribbean). Similarly, the new record for *Mugil liza* extends the range of this species to Quintana Roo, whereas the range of *Canthidermis maculata* is now extended into the Mexican Caribbean in contrast to prior reports from the western Caribbean (Floeter *et al.* 2008).

Conclusion and general remarks

The present study has reinforced the conclusions reached in earlier DNA-barcoding studies of fish, which have demonstrated 98% success in the identification of marine species (Ward *et al.* 2009), by extending results to a new biogeographic region, the Caribbean. Many prior DNA-barcoding studies have revealed evidence of large genetic divergences among lineages that had been regarded as single species. The present investigation has reinforced this trend, revealing overlooked taxa in several genera, including some with considerable economic importance. Our study has also validated the utility of DNA barcoding in the identification of egg and larval fish specimens, a task that is otherwise extremely challenging in marine settings. On the basis of the present results, we expect that DNA barcoding will soon be a routine tool in fisheries management, aiding in efforts to protect nurseries and spawning areas, especially for species with economical or sport interest (Moura *et al.* 2008; Ward *et al.* 2008a). Currently, prices have dropped to about US\$5.00 for reagents from ADN extraction to sequencing in a high-throughput facility, such as the Biodiversity Institute (Ontario), and we expect that they will be even lower in the near future. With progress in technology and lower costs, these techniques will be readily available for a large-scale use. In the near future, pyrosequencing will allow us to obtain sequences for each species in mixed samples. However, to realise the full potential of these applications, there is a critical need for the comprehensive registry of fish barcodes (www.fishbol.org, verified 29 May 2010, see Ward *et al.* 2009) that is currently under assembly.

Finally, as this library becomes more comprehensive, uncertainties such as the unidentified larval forms that we encountered in the present study, will be eliminated with further identification.

Acknowledgements

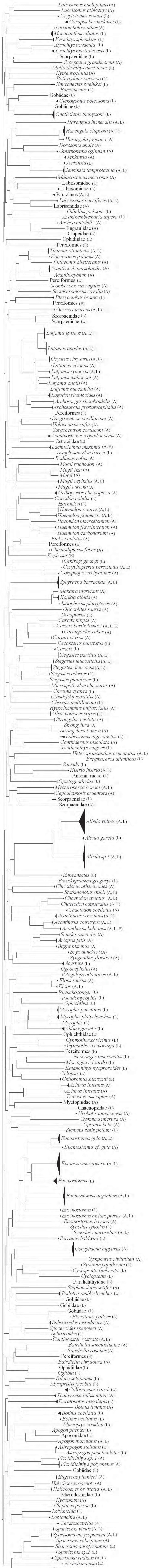
We thank Carolina Quintal Lizama and Dalia Cazarez for their dedicated work as collectors and parataxonomists. Roberto Herrera and José Angel Cohuo also assisted in field collections. Most specimen photographs were taken by Humberto Bahena Basave and José Angel Cohuo. Juan Jacobo Schmitter Soto assisted with the identification of adult fish, while María Eugenia Vega and Víctor García from CINVESTAV Mérida kindly donated specimens from the Yucatan coast and helped with their identification. Margarita Ornelas and Uriel Ordóñez from CINVESTAV aided with some larval identifications. Part of this work was carried out during a sabbatical leave of Martha Valdez-Moreno and Manuel Elías-Gutiérrez at the Department of Integrative Biology, University of Guelph. We thank all members of this Department, especially Tyler Zemplak, Dirk Steinke and Gregory Downs, for discussions about molecular techniques. NOAA/UM project 517/04 supported the larval collections, while María del Carmen García, director of the National Park 'Arrecifes de Xcalak', assisted with the permits required to work in this area. All of the larval collections comprise part of the Ph.D. Thesis of Lourdes Vásquez-Yeomans, supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT Grant 38516). DNA sequencing was carried out at the Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, supported by grants to PDNH from Genome Canada through the Ontario Genomics Institute, and from NSERC. Part of this work was supported through Grant HE009 from Comisión Nacional Para el Uso y Conservación de la Biodiversidad (CONABIO). This paper represents a contribution from the Mexican Barcode of Life (MEXBOL) network. Comments from two anonymous referees improved the initial draft of this manuscript.

References

- Adams, A. J., Wolfe, R. K., Tringali, M. D., Wallace, E., and Kellison, G. T. (2007). Rethinking the status of *Albula* spp. biology in the Caribbean and western Atlantic. In 'The Biology and Management of the World Tarpon and Bonefish Fisheries'. (Ed. J. S. Ault.) pp. 203–214. (CRC Press: Boca Raton, FL.)
- Ault, J. S., Humston, R., Larkin, M. F., Perusquia, E., Farmer, N. A., et al. (2007). Population dynamics and resource ecology of Atlantic tarpon and bonefish. In 'The Biology and Management of the World Tarpon and Bonefish Fisheries'. (Ed. J. S. Ault.) pp. 215–256. (CRC Press: Boca Raton, FL.)
- Baldwin, C. C., Mounts, J. H., Smith, D. G., and Weigt, L. A. (2009). Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean *Phaeoptyx* and *Astrapogon* (Teleostei: Apogonidae) with comments on identification of adult *Phaeoptyx*. *Zootaxa* **2008**, 1–22.
- Bowen, B. W., Karl, S. A., and Pfeiler, E. (2007). Resolving evolutionary lineages and taxonomy of bonefishes (*Albula* spp.). In 'The Biology and Management of the World Tarpon and Bonefish Fisheries'. (Ed. J. S. Ault.) pp. 147–154. (CRC Press: Boca Raton, FL.)
- Carrillo, L., Vásquez-Yeomans, L., and de Jesús Navarrete, A. (2008). La incierta vida de las larvas marinas. *Ecofronteras* **34**, 18–20.
- Castro-Aguirre, J. L., Espinosa-Pérez, H., and Schmitter-Soto, J. J. (1999). 'Ictiofauna Estuarina Lagunar y Vicaria de México.' (Noriega-Limusa/IPN: México, D.F.)
- Colborn, J., Crabtree, R. E., Shaklee, J. B., Pfeiler, E., and Bowen, B. W. (2001). The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula* spp.): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. *Evolution* **55**, 807–820. doi:10.1554/0014-3820(2001)055[0807:TEEOBA]2.0.CO;2
- Danylchuk, S., Danylchuk, A. J., Cooke, S. J., Goldberg, T. L., Koppelman, J., and Philipp, D. P. (2007). Effects of recreational angling on the post-release behavior and predation of bonefish (*Albula vulpes*): the role of equilibrium at the time of release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **346**, 127–133. doi:10.1016/J.JEMBE.2007.03.008
- Escobar-Fernández, R., and Siri, M. (1997). 'Nombres Vernáculos y Científicos de los Peces del Pacífico Mexicano.' (Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Sociedad Ictiológica Mexicana, A.C.: México.)
- Fahay, M. P. (2007). 'Early Stages of Fishes in the Western North Atlantic Ocean (Davis Strait, Southern Greenland and Flemish Cap to Cape Hatteras).' (Northwest Atlantic Fisheries Organization: Nova Scotia, Canada.)
- Floeter, S. R., Rocha, L. A., Robertson, D. R., Joyeux, J. C., Smith-Vaniz, W. F., et al. (2008). Atlantic reef fish biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* **35**, 22–47.
- Fox, C. J., Taylor, M. I., Pereyra, R., Villasana, M. I., and Rico, C. (2005). TaqMan DNA technology confirms likely overestimation of cod (*Gadus morhua* L.) egg abundance in the Irish Sea: implications for the assessment of the cod stock and mapping of spawning areas using egg-based methods. *Molecular Ecology* **14**, 879–884. doi:10.1111/J.1365-294X.2005.02439.X
- Froese, R., and Pauly, D. (2006). FishBase. Available at <http://www.fishbase.org> [accessed August 2009].
- Gregory, T. R. (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* **434**, 1067. doi:10.1038/4341067B
- Hajibabaei, M., deWaard, J. R., Ivanova, N. V., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Kirk, S. L., Mackie, P. M., and Hebert, P. D. N. (2005). Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **360**, 1959–1967. doi:10.1098/RSTB.2005.1727
- Hidaka, K., Iwatsuki, Y., and Randall, J. E. (2008). A review of the Indo-Pacific bonefishes of the *Albula argentea* complex, with a description of a new species. *Ichthyological Research* **55**, 53–64. doi:10.1007/S10228-007-0010-5
- Ivanova, N. V., de Waard, J. R., and Hebert, P. D. N. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* **6**, 998–1002. doi:10.1111/J.1471-8286.2006.01428.X
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., and Hebert, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* **7**, 544–548. doi:10.1111/J.1471-8286.2007.01748.X
- Jiménez-Rosenberg, S. P. A., González-Navarro, E. A., and Saldierna-Martínez, R. J. (2006). Larval, prejuvenile and juvenile development of *Eucinostomus currani*. *Journal of Fish Biology* **69**, 28–37. doi:10.1111/J.0022-1112.2006.01029.X
- Kendall, A. W., and Matarese, A. C. (1994). Status of early life history descriptions of marine teleosts. *Fishery Bulletin* **92**, 725–736.
- Kimura, M. (1980). A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111–120. doi:10.1007/BF01731581
- Lavett, S. C., Tyler, J. C., Davis, P. W., Jones, S. R., Smith, G. D., and Baldwin, C. A. (2003). Fishes of the Pelican Cays, Belize. *Atoll Research Bulletin* **497**, 1–88.
- Leis, J. M., and Carson-Ewart, B. M. (2000). 'The Larvae of Indo-Pacific Coastal Fishes: An Identification Guide to Marine Fish Larvae.' (Brill: Leiden, The Netherlands.)
- McBride, R. H., and Horodysky, A. J. (2004). Mechanisms maintaining sympatric distributions of two ladyfish (Elopidae: *Elops*) morphs in the Gulf of Mexico and western North Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography* **49**, 1173–1181.
- Mojica, R., Shenker, J. M., Harnden, C. W., and Wagner, D. E. (1995). Recruitment of bonefish, *Albula vulpes* around Lee Stocking Island, Bahamas. *Fishery Bulletin* **93**, 666–674.
- Moser, H. G. (1996). 'The Early Stages of Fishes in the California Current.' (CALCOFI Atlas: La Jolla, CA.)
- Moura, T., Silva, M. C., Figueiredo, I., Neves, A., Muñoz, P. D., Coelho, M. M., and Gordo, L. S. (2008). Molecular barcoding of north-east Atlantic deep-water sharks: species identification and application to fisheries management and conservation. *Marine and Freshwater Research* **59**, 214–223. doi:10.1071/MF07192
- Nelson, J. S. (2006). 'Fishes of the World.' 3rd edn. (J. Wiley and Sons: New York.)
- Pegg, G. G., Sinclair, B., Briskey, L., and Aspden, W. J. (2006). MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Scientia Marina* **70**, 7–12.
- Pfeiler, E. (2008). Resurrection of the name *Albula pacifica* (Beebe, 1942) for the shafted bonefish (Albuliformes: Albulidae) from the eastern Pacific. *Revista de Biología Tropical* **56**, 839–844.
- Pfeiler, E., Bitler, B. G., Ulloa, R., van der Heiden, A. M., and Hastings, P. A. (2008). Molecular identification of the bonefish *Albula esuncula* (Albuliformes: Albulidae) from the tropical eastern Pacific, with comments on distribution and morphology. *Copeia* **2008**, 763–770. doi:10.1643/CG-07-113
- Powell, A. B., and Greene, M. D. (2006). Gerreidae: Mojarras. In 'Early Stages of Atlantic Fishes: An Identification Guide for Western Central North Atlantic'. (Ed. W. J. Richards.) pp. 1591–1596. (CRC Press: Boca Raton, FL.)
- Quiroz-Vázquez, P., and Elías-Gutiérrez, M. (2009). A new species of the freshwater cladoceran genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Cladocera: Anomopoda) from the semidesert northern Mexico, highlighted by DNA barcoding. *Zootaxa* **2236**, 50–64.
- Ratnasingham, S., and Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* **7**, 355–364. doi:10.1111/J.1471-8286.2007.01678.X
- Richards, W. J. (1985). Status of the identification of the early life stages of fishes. *Bulletin of Marine Science* **37**, 756–760.

- Richards, W. J. (2006). 'Early Stages of Atlantic Fishes: An Identification Guide for Western Central North Atlantic.' (Taylor and Francis: Boca Raton, FL.)
- Rivas, L. R., and Warlen, M. (1967). Systematics and biology of the bonefish, *Albula nemoptera* (Fowler). *US Fishery Bulletin* **66**, 251–258.
- Rock, J., Costa, F. O., Walker, D. I., North, A. W., Hutchinson, W. F., and Carvalho, G. R. (2008). DNA barcodes of fish of the Scotia Sea, Antarctica, indicate priority groups for taxonomic and systematics focus. *Antarctic Science* **20**, 253–262. doi:10.1017/S0954102008001120
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406–425.
- Schlei, O. L., Crete-Lafreniere, A., Whiteley, A. R., Brown, R. J., Olsen, J. B., Bernatchez, L., and Wenburg, J. K. (2008). DNA barcoding of eight North American coregonine species. *Molecular Ecology Resources* **8**, 1212–1218. doi:10.1111/J.1755-0998.2008.02350.X
- Schmitter-Soto, J. J. (1998). 'Catálogo de los Peces Continentales de Quintana Roo.' (El Colegio de la Frontera Sur: San Cristóbal de las Casas, México.)
- Schmitter-Soto, J. J., Vásquez-Yeomans, L., Aguilar-Pereira, A., Curiel-Mondragón, C., and Caballero Vázquez, J. A. (2000). Lista de peces marinos del Caribe mexicano. *Anales del Instituto de Biología Serie Zoología* **71**, 143–177.
- Schmitter-Soto, J. J., Vásquez-Yeomans, L., Pimentel-Cadena, E., Herrera-Pavón, R., Paz, G., and García-Téllez, N. (2009). In 'El sistema ecológico de la bahía de Chetumal/Corozal: Costa occidental del Mar Caribe (2009)'. (Eds J. Espinoza, G. Islebe and H. Hernández.) pp. 102–114. (ECOSUR: Chetumal, México.)
- Shaklee, J. B., and Tamaru, C. S. (1981). Biochemical and morphological evolution of Hawaiian bonefishes (*Albula*). *Systematic Zoology* **30**, 125–146. doi:10.2307/2992412
- Smith, D. G. (1989). Order Elopiformes; Families Elopidae, Megalopidae, and Albulidae: Leptocephali. In 'Fishes of the Western North Atlantic'. (Ed. E. B. Böhlke.) pp. 961–972. (Allen Press: Lawrence, KS.)
- Smith, D. G. (1995). Preservation of color in larval fishes. *American Society Ichthyology and Herpetology Curation Newsletter* **11**, 5–6.
- Smith, P. J., Steinke, D., Stewart, A. L., Mcveagh, S. M., Stewart, A. L., Struthers, C. D., and Roberts, C. D. (2008). Molecular analysis of Southern Ocean skates (*Bathyraja*) reveals a new species of Antarctic skate. *Journal of Fish Biology* **73**, 1170–1182. doi:10.1111/J.1095-8649.2008.01957.X
- Sponaugle, S., Cowen, R. K., Shanks, A., Morgan, S. G., Leis, J. M., et al. (2002). Predicting self-recruitment in marine populations: biophysical correlates and mechanisms. *Bulletin of Marine Science* **70**, 341–375.
- Steinke, D., Zemlak, T. S., and Hebert, P. D. N. (2009). Barcoding Nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *PLoS ONE* **4**, e6300. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0006300
- Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **19**, 265–293. doi:10.1007/S11160-009-9107-4
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S., and Hebert, P. D. N. (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology* **74**, 377–402. doi:10.1111/J.1095-8649.2008.02077.X
- Vásquez-Yeomans, L., Sosa-Cordero, E., Lara, M., Adams, A., and Cohuo, J. A. (2009). Patterns of distribution and abundance of bonefish larvae *Albula* spp. (Albulidae) in the western Caribbean and adjacent areas. *Ichthyological Research* **56**, 266–275. doi:10.1007/S10228-009-0098-X
- Victor, B. C. (2007). *Coryphopterus kuna*, a new goby (Perciformes: Gobiidae: Gobiinae) from the western Caribbean, with the identification of the late larval stage and an estimate of the pelagic larval duration. *Zootaxa* **1526**, 51–61.
- Victor, B. C. (2008). Redescription of *Coryphopterus tortugae* (Jordan) and a new allied species *Coryphopterus bol* (Perciformes: Gobiidae: Gobiinae) from the tropical western Atlantic Ocean. *Journal of the Ocean Science Foundation* **1**, 1–19.
- Victor, B. C., Hanner, R., Shivji, M., Hyde, J., and Caldwell, C. (2009). Identification of the larval and juvenile stages of the cubera snapper, *Lutjanus cyanopterus*, using DNA barcoding. *Zootaxa* **2215**, 24–36.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., and Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **360**, 1847–1857. doi:10.1098/RSTB.2005.1716
- Ward, R. D., Costa, F. O., Holmes, B. H., and Steinke, D. (2008a). DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. *Aquatic Biology* **3**, 71–78. doi:10.3354/AB000668
- Ward, R. D., Holmes, B. H., White, W. T., and Last, P. R. (2008b). DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* **59**, 57–71. doi:10.1071/MF07148
- Ward, R. D., Hanner, R., and Hebert, P. D. N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* **74**, 329–356. doi:10.1111/J.1095-8649.2008.02080.X
- Webb, K. E., Barnes, D. K. A., Clark, M. S., and Bowden, D. A. (2006). DNA barcoding: a molecular tool to identify Antarctic marine larvae. *Deep-Sea Research. Part II, Topical Studies in Oceanography* **53**, 1053–1060. doi:10.1016/J.DSR2.2006.02.013
- Wong, E. H. K., and Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International* **41**, 828–837. doi:10.1016/J.FOODRES.2008.07.005
- Zemlak, T. S., Ward, R. D., Connell, A. D., Holmes, B. H., and Hebert, P. D. N. (2009). DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources* **9**, 237–242. doi:10.1111/J.1755-0998.2009.02649.X

Manuscript received 7 September 2009, accepted 11 December 2009

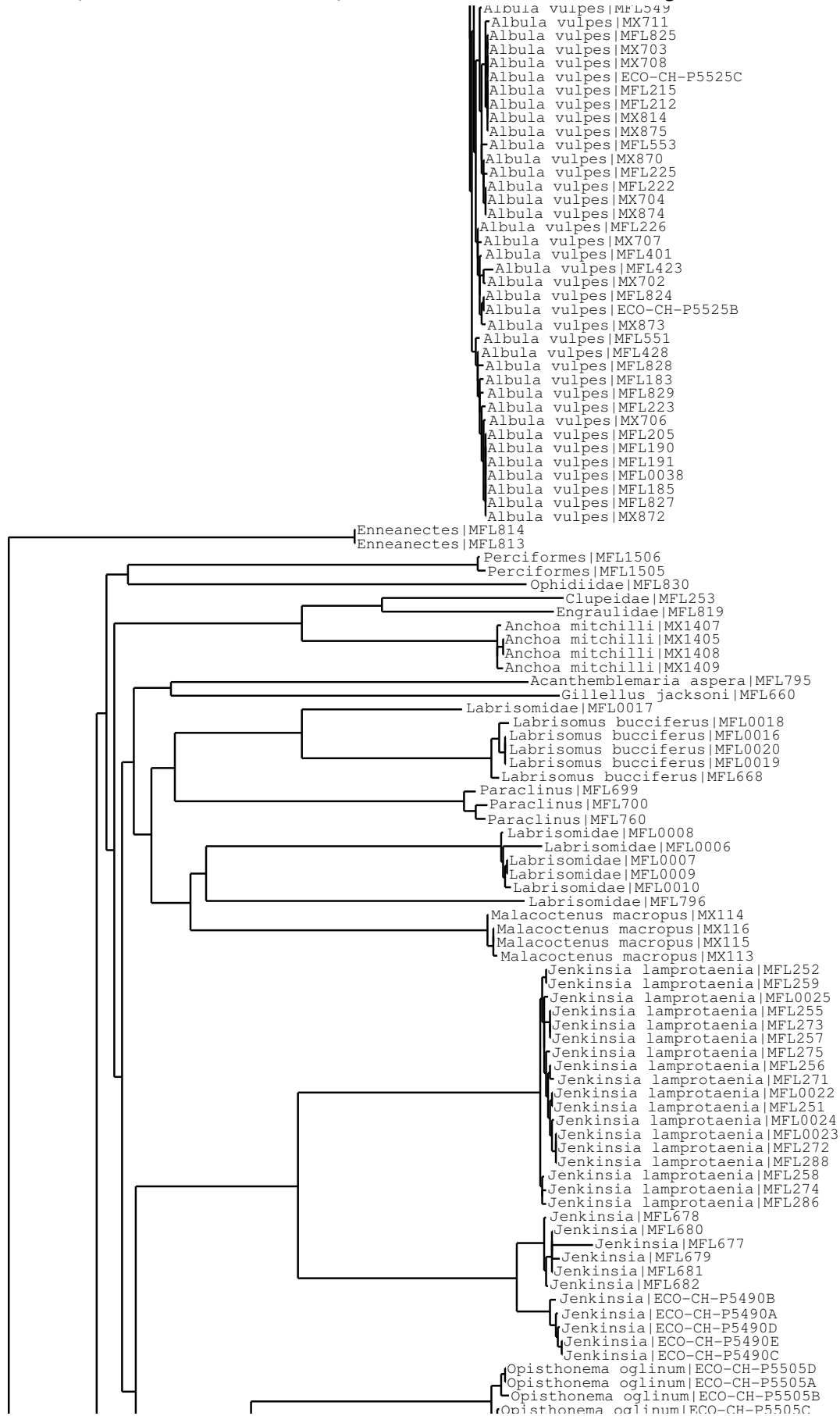


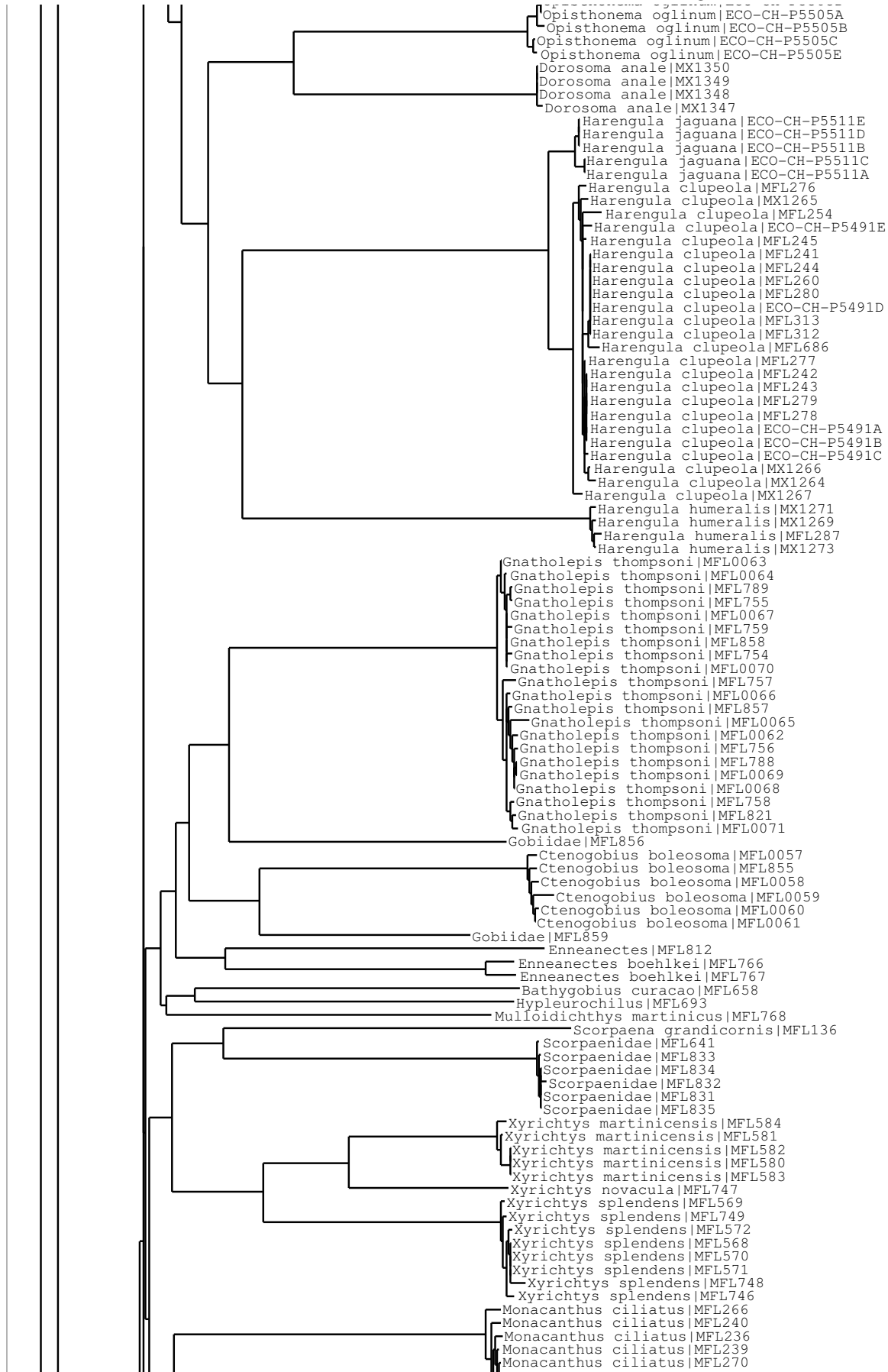
BOLD TaxonID Tree

Project : MERGED: {MFL,MFLII,MEFM,MXII}
Subprojects : Fish Larvae of Mexico I[MFL]
Fish Larvae of Mexico II[MFLII]
Marine Fish of Mexico I[MEFM]
Marine Fish of Mexico II[MXII]
Date : 24-November-2009
Data Type : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels : SampleID,
Colorization :

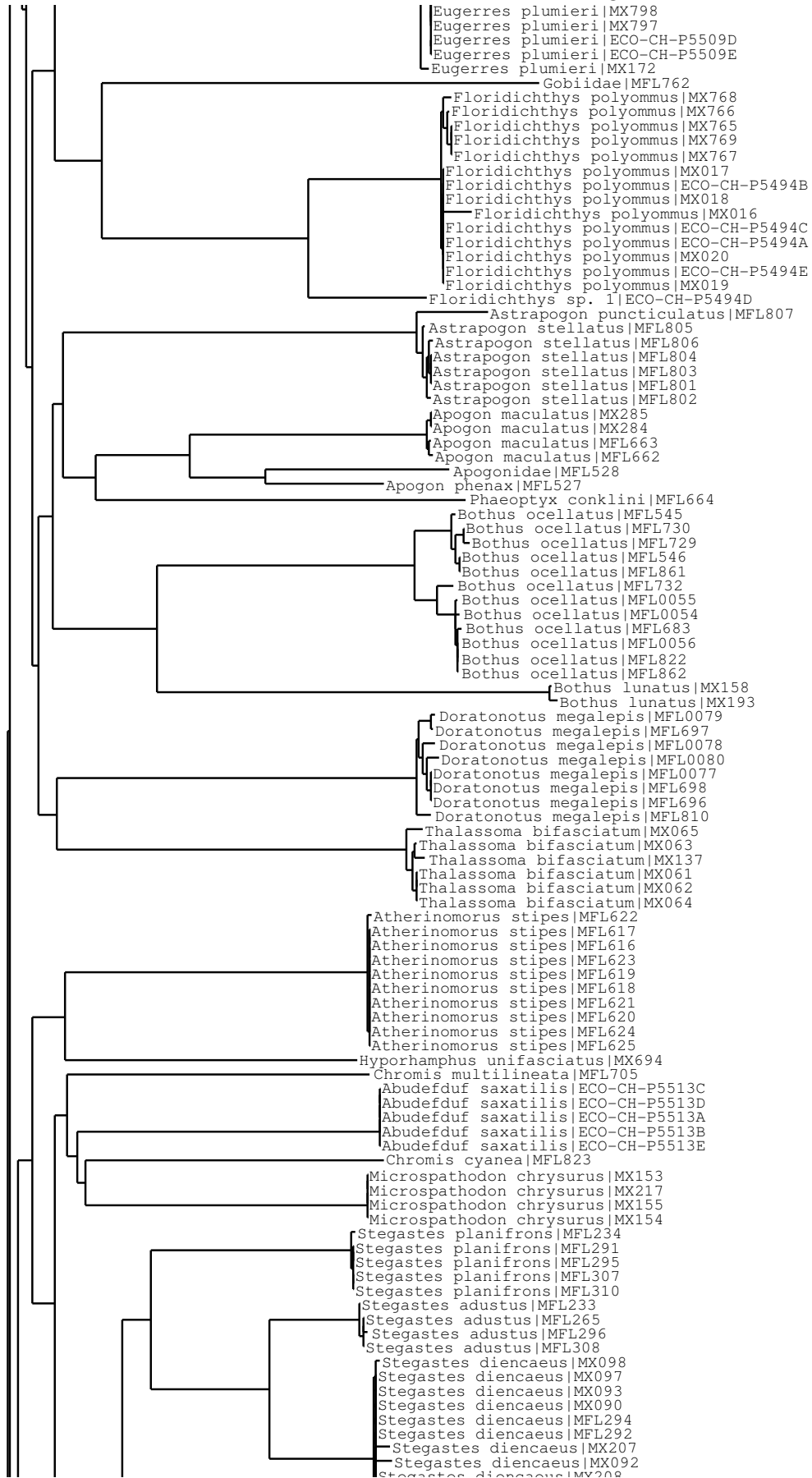
Sequence Count : 1392
Species count : 181
Genus count : 136
Family count : 74
Unidentified : 137

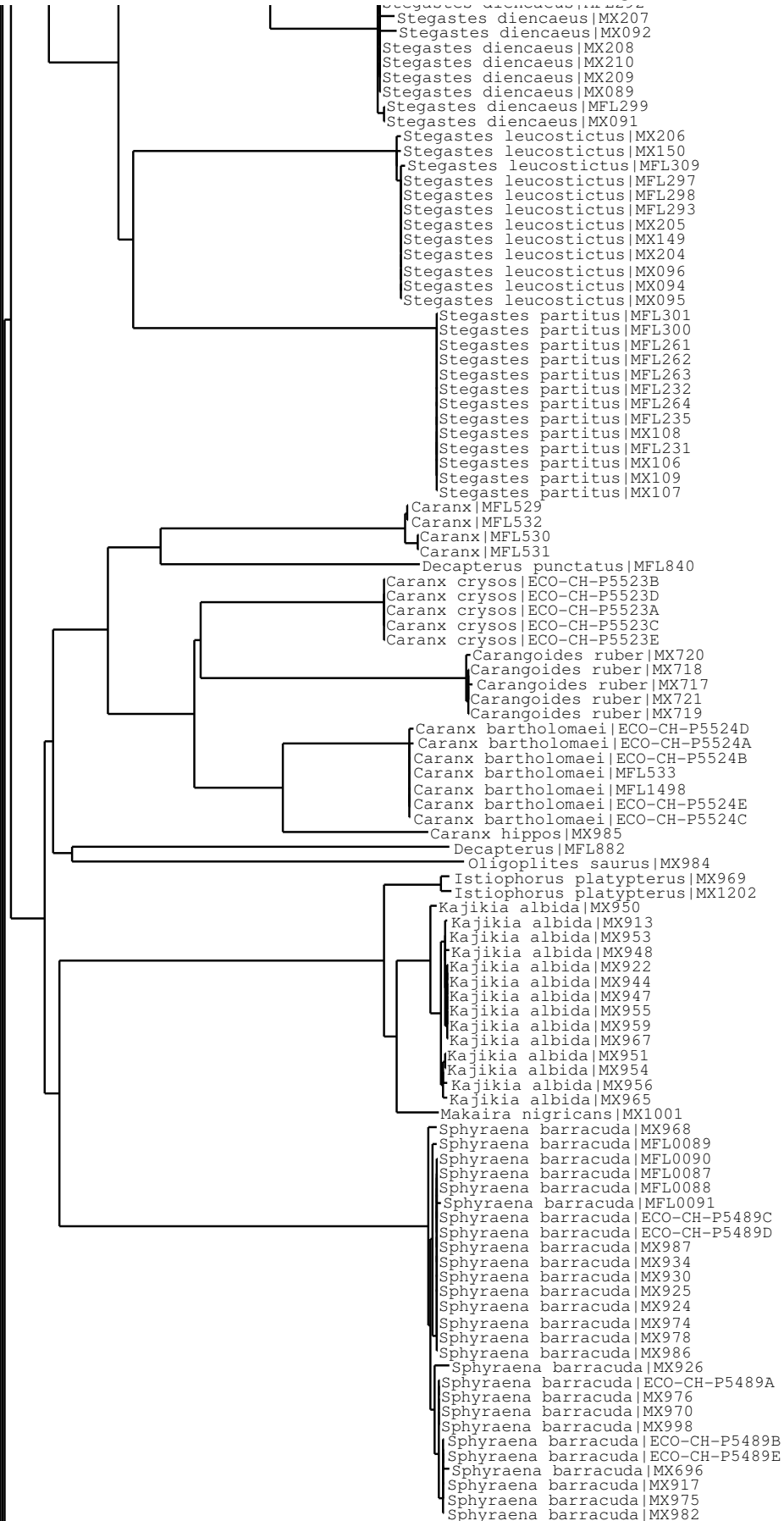


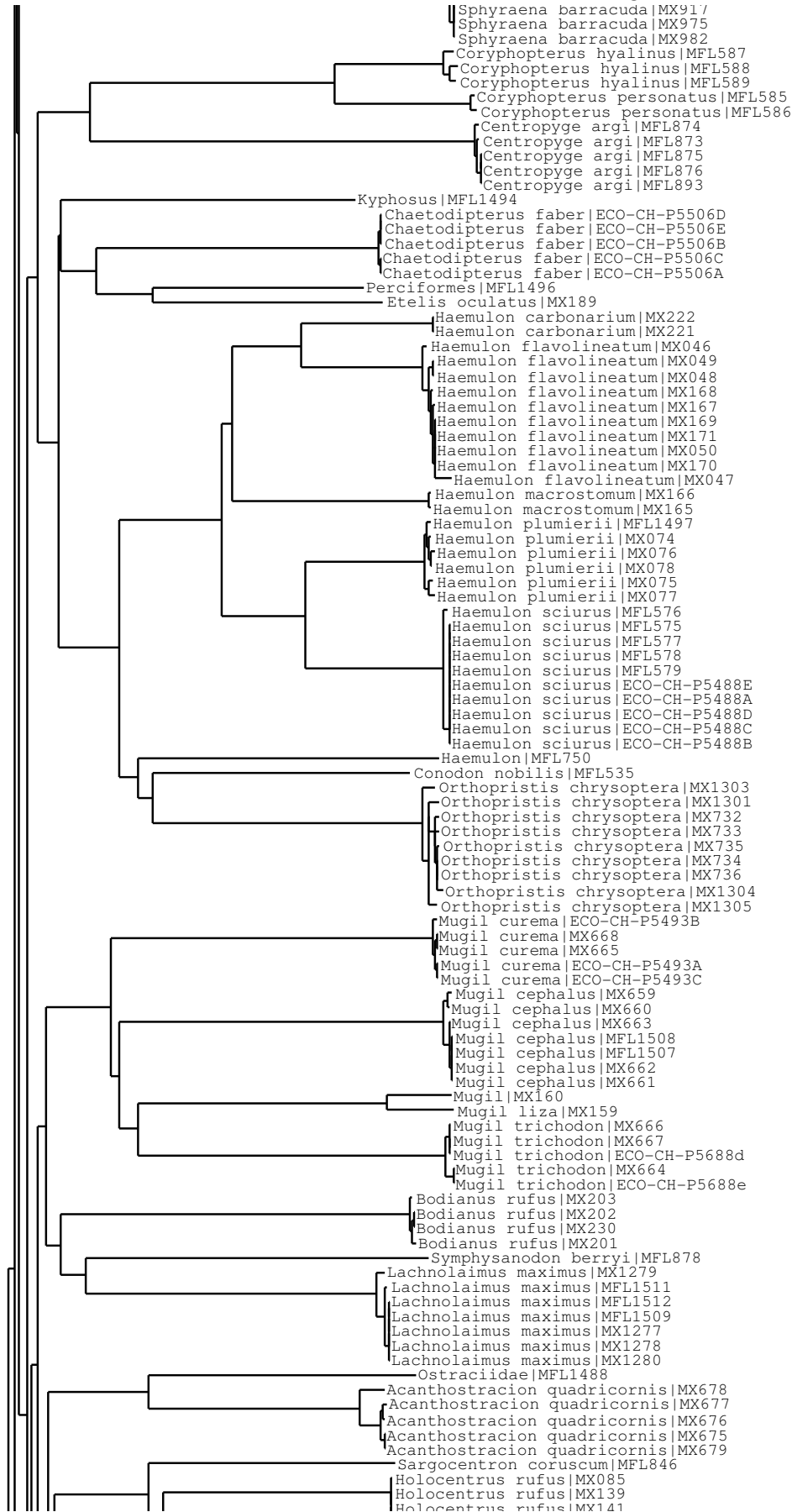


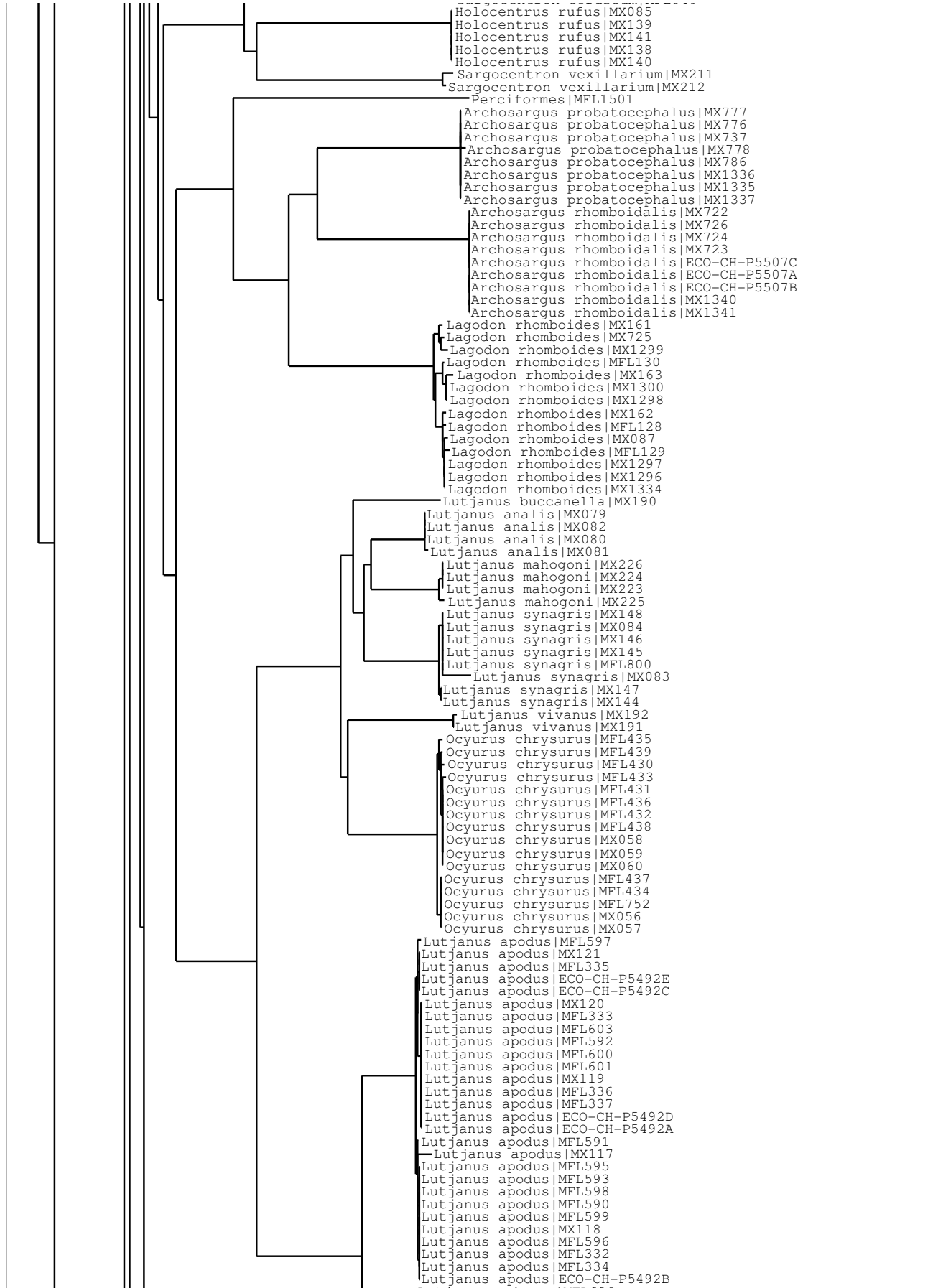




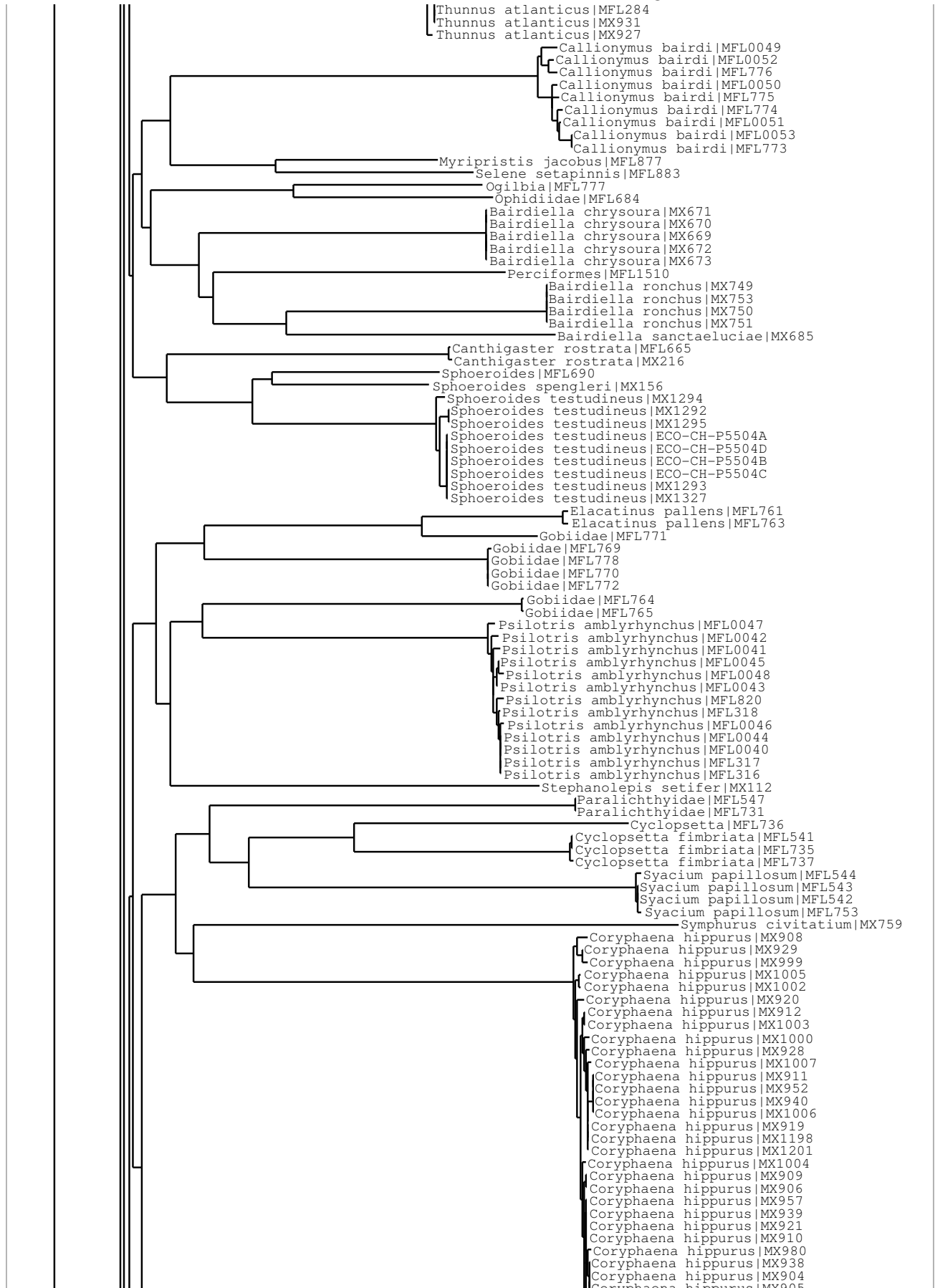


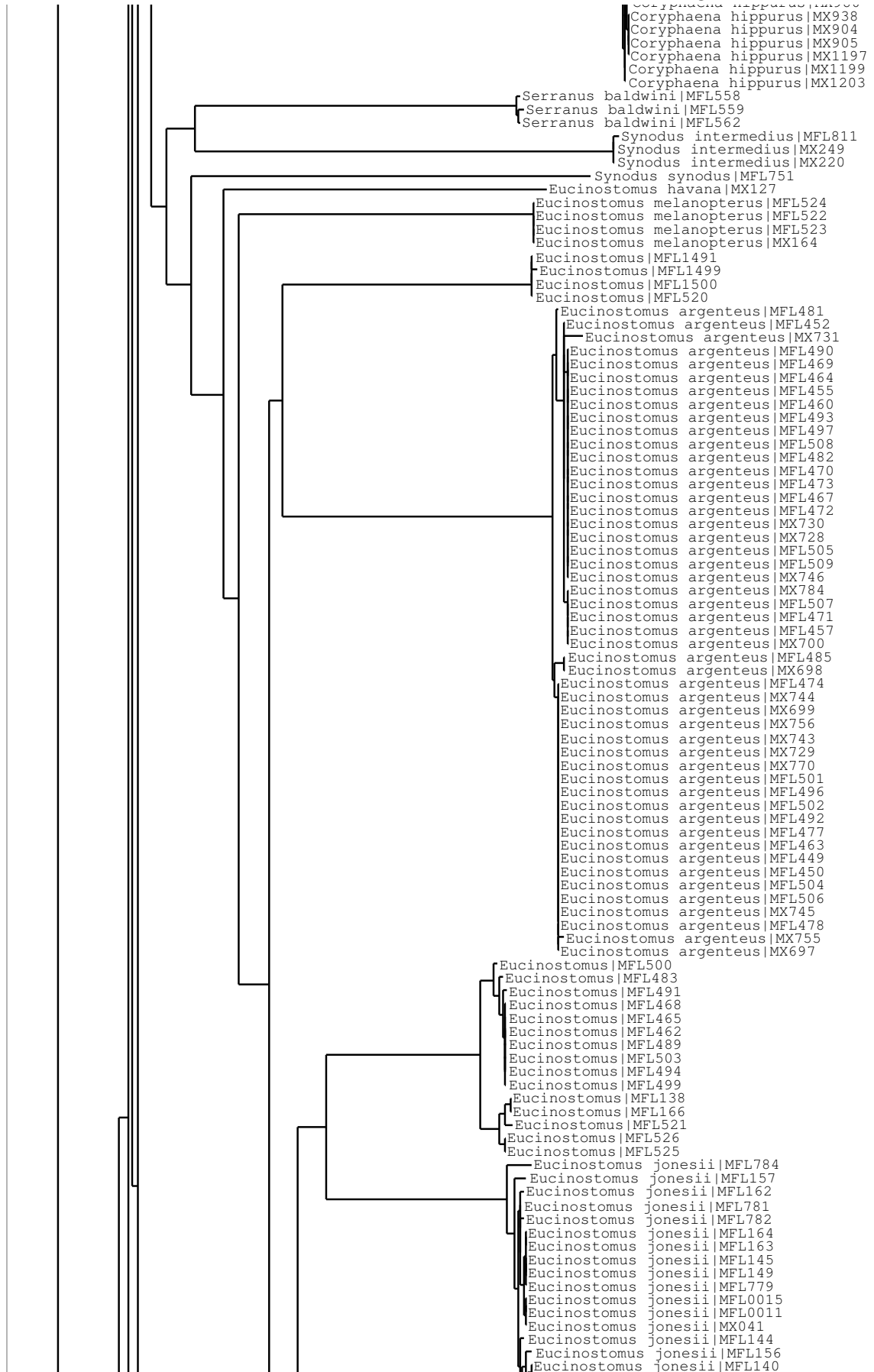


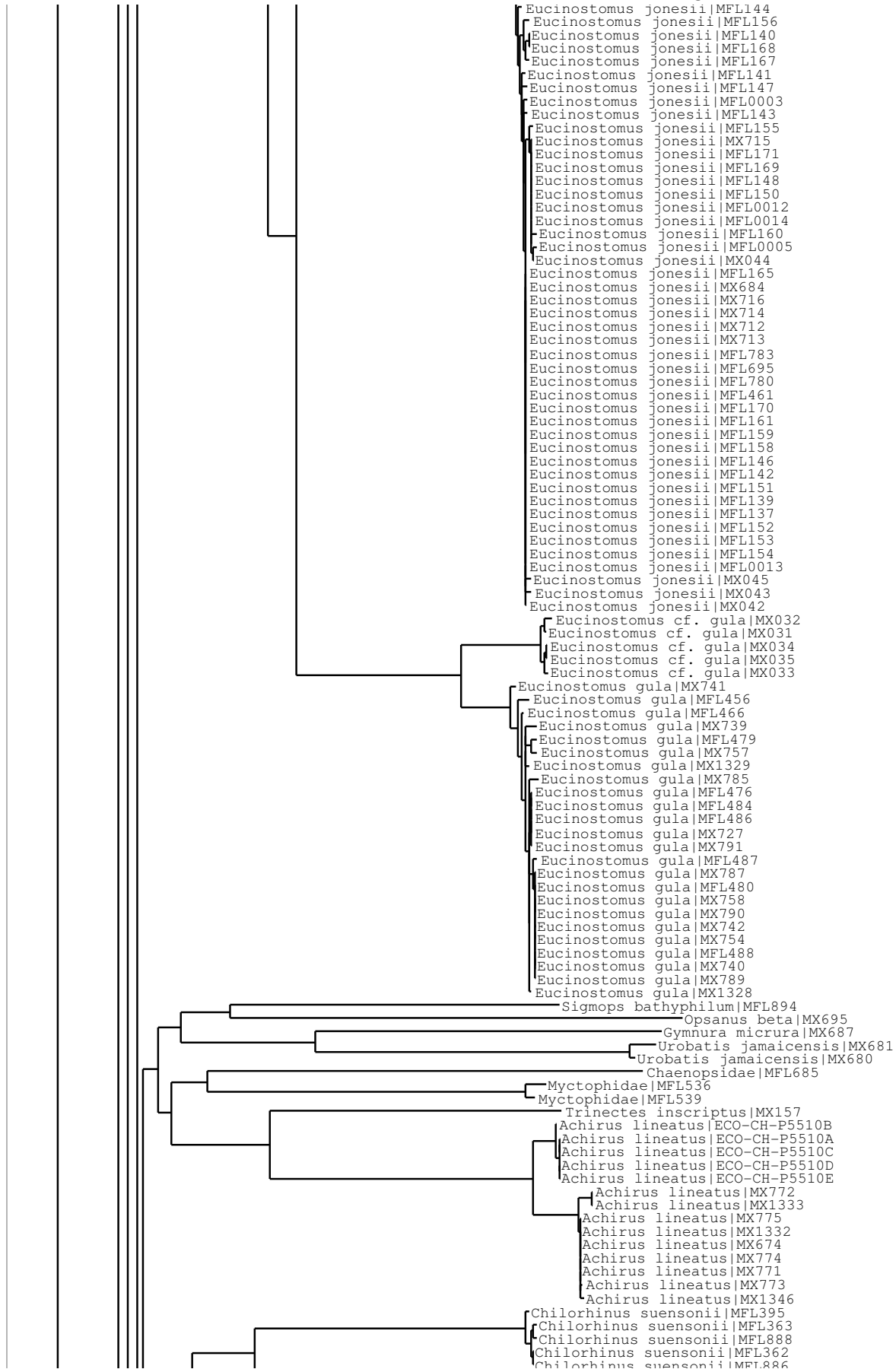


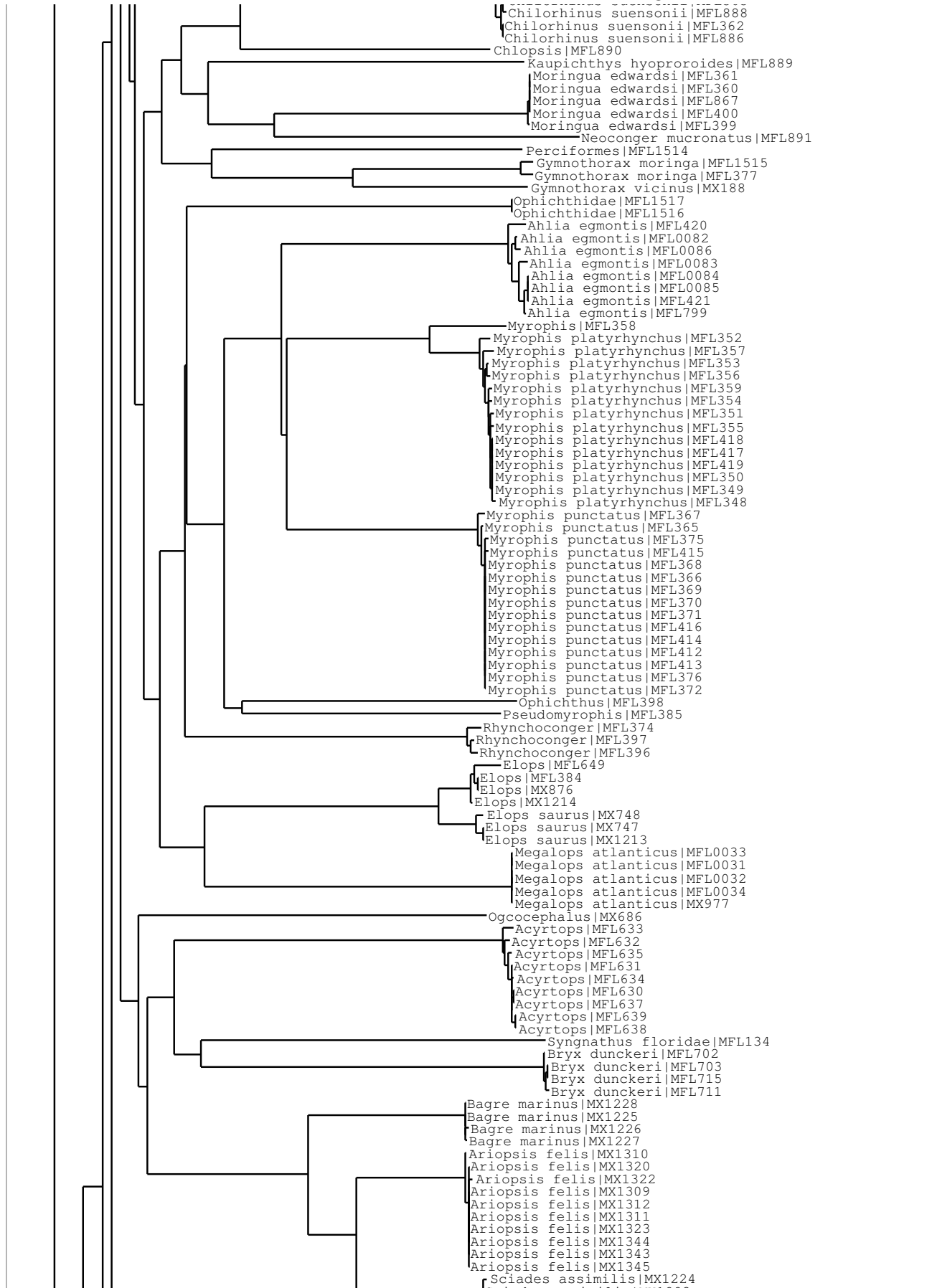


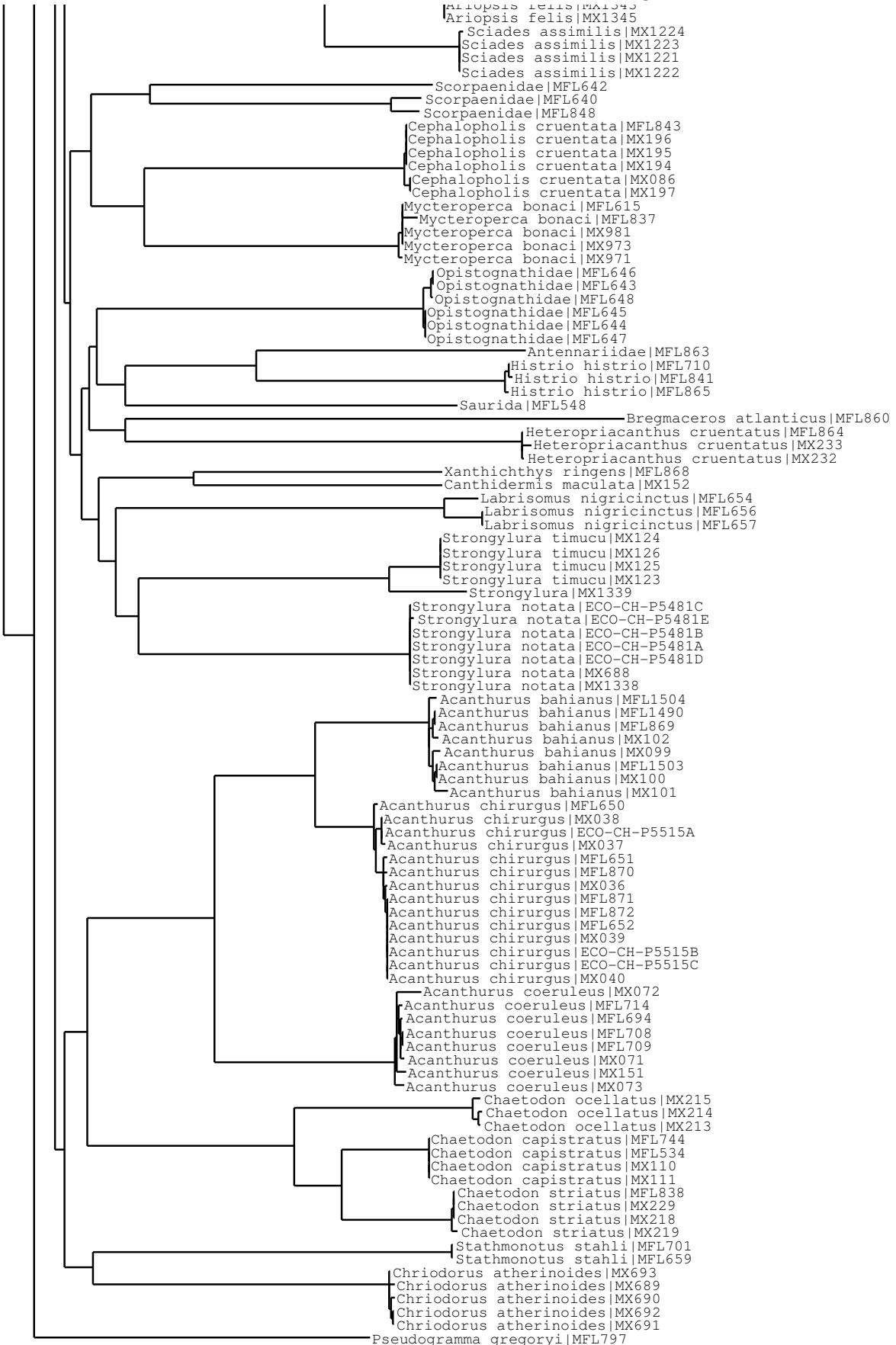












ANEXO II

Tesis Finalizadas



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



REVISIÓN TAXONÓMICA (MORFOLÓGICA Y MOLECULAR) DE LOS
OSTRÁCODOS DULCEACUÍCOLAS DEL CENTRO-SURESTE DE
MÉXICO

T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

Maestro en Ciencias del Mar y Limnología

P r e s e n t a

SERGIO COHUO DURÁN

Director de Tesis: DR. MANUEL ELÍAS GUTIÉRREZ

Comité tutorial: DRA. ANA LUISA CARREÑO

DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA

DRA. ELIZABETH ORTEGA MAYAGOITIA

DR. MARCELO SILVA BRIANO

Chetumal, Quintana Roo, Septiembre de 2012.

Agradecimientos

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo en su programa de maestría, por su apoyo institucional, académico e infraestructura para la realización de ésta tesis.

Al Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal y en particular al Laboratorio de Zooplancton por permitir el acceso a su Colección de Referencia y por las facilidades para desarrollar este trabajo en sus instalaciones e infraestructura.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca con número 246262 otorgada para la realización de esta tesis.

A la Conabio por su participación y soporte financiero dentro del proyecto HE-009 “Códigos de Barras de la vida en peces y zooplancton de México”.

A la Red Temática Códigos de Barras de la Vida (MEXBOL) por el apoyo económico brindado para la realización de la estancia en el laboratorio de Zooplancton de la Universidad de Hanyang, Corea del Sur.

Al laboratorio de Código de barras de la vida Nodo Chetumal y MEXBOL. Por facilitar sus instalaciones y material de trabajo para la extracción, amplificación y secuenciación de los ostrácodos.

Al consejo tutelar, integrado por el Dr. Manuel Elías Gutiérrez, Dra. Ana Luisa Carreño, Dr. Elías Piedra, Dra. Elizabeth Ortega, Dr. Marcelo Silva.

Al Dr. Manuel Elías, Alma Estrella, Ghiezi Poot por su apoyo en la colecta del material y trabajo de campo. A Arely por su participación activa en la parte molecular de este trabajo.

A Ivana Karanovic por la validación del material mexicano, su ayuda en el reconocimiento de estructuras de interés taxonómico en los Ostrácodos, el mejoramiento de las técnicas de disección y fijación y por brindar importante material bibliográfico para la conclusión de este trabajo.

Contenido

Introducción	1
Clasificación taxonómica actual de los ostrácodos, de acuerdo con Liebau (2005).	3
Biología General de Ostrácodos.....	3
Morfología general de Ostrácodos.	5
Valvas.....	5
Apéndices.....	9
Fisiología de Ostrácodos	14
Características físico-químicas de hábitats de distribución.....	16
Antecedentes	17
Hipótesis.....	20
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Área de estudio.....	22
Región sur-sureste	22
Región centro	22
Trabajo de campo	23
Trabajo de Laboratorio.....	24
Identificación de organismos	24
Extracción y secuenciación del ADN.....	25
Análisis de datos	26
Resultados	27
Familia Cyprididae Baird, 1845	32
Familia Candonidae Kaufmann, 1900.....	41
Familia Ilyocyprididae Kaufmann, 1900.....	45
Familia Darwinulidae Brady & Robertson, 1885.....	46
Familia Limnocytheridae Klie, 1938	48
Discusión.....	53
Regiones en el País.....	53
Distribución de las especies	59
Código de Barras.....	70
Conclusión.....	76

Literatura Citada.....	78
Anexo 1. Sitios de colecta.....	89
Anexo 2. Especies presentes en los sistemas analizados y número de colección.	93
Anexo 3. Caracterización de especies seleccionadas con incertidumbre taxonómica.	101
Anexo 4. Imágenes de valvas de Ostrácodos de México	126
Anexo 5. Secuencias obtenidas de Ostrácodos mexicanos.	131
Anexo 6. Artículo taxonómico sometido.	148

Índice de Ilustraciones

Figura 1. <i>Cypretta campechensis</i> n. sp. A, Valva izquierda vista interna y B, valva derecha vista externa.....	6
Figura 2. Apéndices de Ostrácodos. A, primera antena <i>Cyprididae</i> . B, primera antena <i>Cytheridae</i> . C, segunda antena <i>Cyprididae</i> . D, segunda antena <i>Cytheridae</i> . E, mandíbula. F. maxila.....	10
Figura 3. Apéndices de ostrácodos. A, primera pata torácica hembra <i>Cyprididae</i> . B, primera pata modificada em el macho <i>Cyprididae</i> . C, primera pata torácica <i>Cytheridae</i> . D, segunda torácica caminadora. E, tercera pata torácica <i>Cyprididae</i> . F, tercera pata torácica <i>Cytheridae</i> . G, UR <i>Cyprididae</i> . H. UR <i>Cytheridae</i>	12
Figura 4. Sitios de colecta y zonas de estudio en el País	23
Figura 5. Árbol de similitud de la fauna de ostrácodos de los sistemas analizados por el método de Ward (1963).	31
Figura 6. Mapa de distribución de especies identificadas a nivel de familia <i>Cyprididae</i>	33
Figura 7. Mapa de distribución de especies pertenecientes a <i>Cyprididae</i>	34
Figura 8. Mapa de distribución de especies pertenecientes a <i>Cyprididae</i>	35
Figura 9. Mapa de Distribución de especies pertenecientes a <i>Cyprididae</i>	36
Figura 10. Mapa de Distribución de especies pertenecientes a <i>Cyprididae</i>	37
Figura 11. Árbol de identificación de especies pertenecientes a <i>Cyprididae</i>	38
Figura 12. Mapa de distribución de especies pertenecientes a <i>Cyprididae</i>	39
Figura 13. Árbol de identificación de la familia <i>Cyprididae</i>	40
Figura 14. Mapa de distribución de <i>Prionocypris</i> cf. <i>longiforma</i>	41
Figura 15. Mapa de distribución de especies pertenecientes a <i>Candonidae</i>	42
Figura 16. Mapa de distribución de especies pertenecientes a <i>Cyclocyprididae</i>	43
Figura 17. Mapa de distribución de especies pertenecientes a <i>Dolerocypris</i>	44
Figura 18. Mapa de distribución de <i>Ilyocypris</i> sp.....	45
Figura 19. Mapa de distribución de especies pertenecientes a <i>Darwinulidae</i>	46
Figura 20. Árbol de identificación de especies pertenecientes a <i>Darwinulidae</i>	47
Figura 21. Mapa de distribución de especies pertenecientes a <i>Limnocythere</i>	49
Figura 22. Mapa de distribución de especies integrantes de <i>Timiriasevinae</i>	50
Figura 23. Árbol de identificación de especies integrantes de Cytheroidea.	51
Figura 24. Árbol de identificación de especies mexicanas.	52
Figura 25. <i>Cyprididae</i> sp 1, Tabasco. Hembra. A) Valva derecha; B) Valva izquierda; C) Endito del segundo proceso maxilar; D) Palpo maxilar; E) T1; F)T2; G) T3. Imágenes no a escala.	101
Figura 26. <i>Typhlocypris</i> cf. <i>annae</i> . Laguna Maravillas, Campeche. Macho. A) Valva Derecha; B) Valva Izquierda; C) Maxila; D) Palpo prensil izquierdo; E)T1derecho con exopodito transformado en Palpo prensil; F)Hemipene; G) T3; H)UR. Imágenes no a escala.	102
Figura 27. <i>Typhlocypris elliptica</i> . Tres Garantías, Quintana Roo. Macho. A) Maxila; B) Mandíbula; C) Hemipene; D) Palpo prensil izquierdo; E) T1 derecha con el exopodito transformado en palpo prensil; F) UR. Imágenes no a escala.	103
Figura 28. <i>Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco</i> n. sp. Alchichica, Puebla. Hembra. A) RV vista externa; B) LV vista externa; C) RV vista interna; D) LV vista externa; E) A1; A) A2; G) Mxl; H) Mxl con variación en el 4to endito; I) Palpo Maxilar.....	104
Figura 29. <i>Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco</i> n. sp. Alchichica, Puebla. Hembra. A) Md; B) Palpo Mandibular; C) T1; D) T2; E)T3; F) UR y cavidad sexual.....	105
Figura 30. <i>Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco</i> n. sp. Alchichica, Puebla. Macho. A) LV vista externa; B) RV vista externa; C) RV vista interna; D) LV vista interna; E) A1; F) T1; G) T2; H) T3; I) Hemipene.....	106

Figura 31. <i>Cypretta campechensis</i> n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) RV vista externa; B) LV vista externa; C) Valvas cerradas vista ventral; D) Valvas cerradas vista dorsal; E) RV vista interna; F) LV vista interna.....	107
Figura 32. <i>Cypretta campechensis</i> n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) A1; B) A2; C) Md; D) Palpo Mandibular; E) Palpo Maxilar.	108
Figura 33. <i>Cypretta campechensis</i> n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) Labio Superior y órgano de rastrillo; B) T1; C) T2; D) T3; E) UR; F) Soporte del UR.	109
Figura 34. <i>Cypretta campechensis</i> n. sp. Silvituc, Campeche. Macho. A) Valva derecha; B) Valva izquierda; C) A1; D) T1 izquierda con el endopodito transformado en palpo prensil; E) Palpo prensil derecho; G) Hemipene.....	110
Figura 35. <i>Cypretta spinosa</i> n. sp. Silvituc. Campeche. Hembra. A) RV vista externa; B) LV vista externa; C) Valvas cerradas vista ventral; D) Valvas cerradas vista dorsal; E) LV vista interna; F) RV vista interna.	111
Figura 36. <i>Cypretta spinosa</i> n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) A1; B) A2; C) Mandibula; D) Palpo mandibular; E) Palpo maxilar; F) Labio superior mostrando órganos rastrillo.	112
Figura 37. <i>Cypretta spinosa</i> n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) T1; B) T2; C) T3; D) UR; E) Estructura de soporte del UR.	113
Figura 38. <i>Cypretta maya</i> n. sp. Ramonal, Quintana Roo. Hembra. A) RV vista externa; B) LV vista externa; C) Valvas cerradas vista ventral; D) Valvas cerradas vista dorsal; E) LV vista interna; F) RV vista interna.	114
Figura 39. <i>Cypretta maya</i> n. sp. Ramonal, Quintana Roo. Hembra. A) A1; B) A2; C) Palpo maxilares; D) Labio superior mostrando los órganos de rastrillo.....	115
Figura 40. <i>Cypretta maya</i> n. sp. Ramonal, Quintana Roo. Hembra. A) Mandibula con palpo mandibular; B) T1; C) T2; D) T3; E) UR; F) Estructura de soporte de UR.....	116
Figura 41. <i>Ilyocypris</i> sp. Tlacolula, Veracruz. Hembra. A) A2; A') Protópodo de A2; B) Mandíbula y palpo mandibular; C) Mxp; D) T2; E) T3; F) UR y estructura de soporte. No a escala.	117
Figura 42. <i>Cypria</i> sp 2. Chichancanab. Q uintana Roo. Macho. A) A1; B) T1 con el palpo modificado; C) Palpo prensil izquierdo; D) T2; E) T3; F) UR con estructura de soporte. No a escala.	118
Figura 43. <i>Chlamydotheca arcuata</i> . Ramonal, Quintana Roo. Hembra. A) Mxp; B) T2; C) T3; D) UR; E) Estructura de soporte del UR. No a escala.....	119
Figura 44. <i>Cypridopsis</i> sp 1. Zempoala. Morelos. Hembra. A) A1; B) Mxp; C) T2; D) T3; E) UR setiforme.	120
Figura 45. <i>Dolerocypris</i> sp 1. Bacalar, Quintana Roo. Hembra. A) A2; B) T2; C) T3; D) UR con la estructura de soporte. No a escala.	121
Figura 46. <i>Metacypris</i> (Thaicythere) srisumoniae. Charco Coatzacolacos-Terranova, Veracruz. Hembra. A) A2; B) Md; C) Mdp; D) T2, E) T3. No a escala.	122
Figura 47. <i>Prionocypris</i> cf. <i>longiforma</i> . Chetumal. Quintana Roo. Hembra. A) Mxp; B) T1, C) T2; D) T3; E) UR con la estructura de soporte. No a escala.....	123
Figura 48. <i>Strandesia</i> cf. <i>elliptica</i> . Ramonal 2. Quintana Roo. Hembra. A) A2; B) Mxp; C) T2; D) T3; E) Estructura de soporte mostrando el lazo de Triebel; F) UR. No a escala.....	124
Figura 49. <i>Vestalenula</i> sp 1. Agua Azul, Chiapas. Hembra. A) A2; B) Mxp transformado en garra; C) T3; D) T2. No a escala.	125

Índice de Tablas

Tabla 1. Diversidad de Ostrácodos de México, de acuerdo a las regiones geográficas reconocidas por el método de Ward (1963).....	28
Tabla 2. Lugares de colecta y parámetros físico-químicos tomados de ellos.....	89
Tabla 3. Especies presentes en los sistemas analizados y número de colección.....	93

Resumen

En México los trabajos sobre ostrácodos iniciaron a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, con éstos, se describieron 18 especies en el país, sin embargo, a partir de entonces los estudios sobre diversidad y taxonomía de estos organismos han sido escasos. En este trabajo se revisaron las especies habitantes del centro-sureste de México, apoyándonos en los nuevos conceptos de la taxonomía integrativa. Se analizaron 198 de los principales sistemas acuáticos epicontinentales de la zona antes mencionada, a partir de los cuales se reconocieron 69 especies. El análisis morfológico, permitió postular que dieciséis especies son potencialmente nuevas para la ciencia, cuatro de ellas se encuentran en proceso de publicación. Las especies restantes (53) fueron identificadas morfológicamente y se encontró que existe una fauna única en México y que la mayoría de las especies se distribuyen en ámbitos muy limitados (microrregiones) entre las cuales no hay aparentemente intercambio de especies. La península de Yucatán fue reconocida como una de estas zonas con distribución limitada y en ella se observó adicionalmente un gradiente de diversidad que aumenta considerablemente de norte a sur, esto posiblemente producto de los procesos geológicos inherentes al proceso geológico de formación de ambas regiones (el sur es más antiguo). En el resto del país se reconocieron 10 microrregiones donde destacaron las faunas del centro del país, norte de Chiapas, norte de Veracruz, sur de Veracruz y Tabasco-Campeche. Producto de estas observaciones fue posible determinar que los ostrácodos son organismos que no tienen amplios ámbitos de distribución, como se creía en un principio. El análisis de códigos de barras nos permitió comprobar las identificaciones morfológicas, con lo que se prueba que esta técnica es confiable para la identificación de los ostrácodos e incluso reveló la posible existencia de especies crípticas, sin embargo se necesita todavía trabajar en la optimización de protocolos que permitan mejores resultados en la amplificación del gen, ya que fue una de las limitantes de este trabajo. Finalmente la zona estudiada fue muy rica en Ostrácodos y se identificó que el centro-sur del país, pudiera ser la zona de transición en la distribución geográfica de estos organismos. Este trabajo es un primer acercamiento a la fauna real del grupo y se requiere de un mayor esfuerzo y trabajo para reconocer con precisión la fauna de todo el país, así como la sucesión de especies en cada sistema.

Introducción

Los ostrácodos son crustáceos bivalvos que habitan en todos los ecosistemas acuáticos del planeta (marinos y dulceacuícolas) y algunas especies incluso en ambientes semiterrestres. Poseen una de las mayores diversidades específicas dentro del grupo de los Crustáceos (Danielopol *et al.* 1994), actualmente se estima que a nivel mundial existen descritas cerca de 6,000 especies marinas y 2,000 especies dulceacuícolas (Martens *et al.* 2008; Karanovic 2012), aunque su número real podría alcanzar entre 10 000 a 15 000 especies vivas entre ambas faunas (Meisch 2000).

Los ostrácodos son también considerados como uno de los taxa más antiguos en nuestro planeta, con características primitivas observables en varios géneros (Karanovic 2012). Aparecieron por primera vez durante el ordovícico hace 500 millones de años (m.a.) y durante el Paleozoico (hace 450-360 m.a.) se originaron los tres principales linajes de ostrácodos dulceacuícolas: Cytheroidea, Darwinuloidea y Cypridoidea (Martens *et al.* 2008; Karanovic 2012). Debido a su antigüedad, calcificación y el tamaño, las valvas de los ostrácodos son frecuentemente encontradas bien preservadas dentro de sedimentos antiguos y modernos de sistemas epicontinentales (Holmes 2002; Karanovic 2012). Con éstas ha sido posible realizar reconstrucciones paleolimnológicas, la determinación de contaminación en los sistemas de agua dulce como lagos y lagunas, además de estudiar el desarrollo evolutivo de los procesos reproductivos de las especies, pues ha sido posible detectar especies exclusivamente asexuales, sexuales y asexuales facultativos (Palacios-Fest *et al.* 2002; López 2007).

Clasificación taxonómica actual de los ostrácodos, de acuerdo con Liebau (2005).

Subphyllum: Mandibulata Clairville 1789

Clase: Crustacea Pennat 1777

Subclase: Ostracoda Latreille 1806

Orden: Palaeocopida Henningsmoen 1953

 Punciocopida Schallreuter 1968

 Platycopida Sars 1866

 Podocopida Sars 1866

 Suborden: Bairdiocopina Gründel, 1967

 Sigilliocopina Cohen *et al.*, 1998

 Cypridocopina Jones, 1901

 Darwinulocopina Sohn, 1988

 Healdiocopina n. [cf.: Metacopina s.s.]

 Cytherocopina Gründel, 1967

 Cypridinida Skogsberg, 1920

 Halocypridida Skogsberg, 1920

Biología General de Ostrácodos

Los ostrácodos habitan en prácticamente todos los sistemas acuáticos del planeta, por lo que es posible encontrar especies marinas, salobres, dulceacuícolas e incluso semiterrestres (Benson *et al.* 1961; Pinto *et al.* 2003). Cada una con características y requerimientos biológicos particulares (Tressler 1959; Victor 2002; Higuti *et al.* 2009). En general los ostrácodos dulceacuícolas, son organismos de vida libre, aunque es posible encontrar especies comensales (*Entocythere*) que desarrollan la mayor parte de su ciclo de vida en peces, isópodos, anfípodos y crustáceos (Tressler 1959; Hart & Hart 1974).

En los sistemas acuáticos epicontinentales, los ostrácodos de vida libre se distribuyen principalmente en el bentos o en la zona intersticial, en ambos casos requieren alta

porosidad y buena permeabilidad de los suelos (Delorme 1989). Existe también un gran número de especies que habitan en la columna de agua (*Physocypria*), debido a que han desarrollado adaptaciones locomotrices en antenas y anténulas (Victor 2002; Hunt *et al.* 2007). Es posible también encontrar ostrácodos en el pleuston y perifiton, asociados a tallos, raíces y hojas de vegetación parcial o totalmente sumergida (Higuti *et al.* 2007; Martens *et al.* 2008).

La alimentación de estos organismos esta basada en la filtración de material suspendido, detritos, microalgas y macroalgas (*Chara Fragilis*), algunas especies llegan a ser carnívoras, (alimentándose principalmente de moluscos, nemátodos y tejido en descomposición) y otras pueden ser comensales o parasíticas como se mencionó anteriormente (*Entocythere*) (Hart & Hart 1974; Roca *et al.* 1993; Cohen *et al.* 2007; Miranda 2008). A su vez los ostrácodos también pueden estar sujetos a parasitismo por copépodos, isópodos, nemátodos y ciliados (Cohen *et al.* 2007). Su tipo de alimentación va a depender del área de distribución y sus adaptaciones morfológicas particulares (Miranda 2008).

Los ostrácodos tienen dos formas de reproducción, la singámica que involucra la presencia de especies de ambos sexos, cópula y descendientes machos y hembras; las especies que presentan este tipo de reproducción, llegan a mostrar un dimorfismo sexual (Benson *et al.* 1961; Delorme 1989). La segunda forma es partenogenética, las especies con este tipo de reproducción, pueden ser totalmente asexuales (*Darwinuloidea*) o pueden ser partenogenéticas facultativas (*Cypridoidea*), es decir, bajo ciertas circunstancias ambientales (disponibilidad de alimento o aislamiento) pueden reproducirse de manera sexual o asexual a su conveniencia (Van Doninck *et al.* 2003; Martins *et al.* 2009). La mayoría de los ostrácodos producen dos o mas generaciones de organismos por año, principalmente en primavera y verano (Benson *et al.* 1961) y bajo ciertas circunstancias pueden alcanzar densidades de mayores a 20 000 individuos por metro cuadrado (Yozzo & Steineck 1994).

Morfología general de Ostrácodos.

Los ostrácodos son crustáceos que presentan todo su cuerpo contenido en un par de valvas calcificadas, que le proveen protección contra los depredadores y condiciones ambientales. El cuerpo es blando, débilmente segmentado. La cabeza y el abdomen están fusionados formando un cefalotórax con 7 pares de apéndices y el abdomen presenta solo un par de apéndices. A continuación se describen las principales características de valvas y apéndices.

Valvas

Las valvas de los ostrácodos son de forma, tamaño y ornamentación variable, dependiendo de la especie. En algunos casos, con base únicamente en las características de las valvas, será posible identificar familias o géneros. En los individuos, las valvas serán similares una de otra pero no exactamente iguales; en la mayoría de las especies las valvas serán desiguales, siendo una mayor que la otra, lo que provoca un solapamiento, que puede ser usado como carácter taxonómico (Victor 2002; Cohen *et al.* 2007).

Las valvas se componen, en dos partes principales:

1. Una capa dura de carbonato de calcio y
2. Una delgada capa celular, la epidermis.

La capa dura de carbonato de calcio es una estructura que puede llegar a fosilizarse y es la base para análisis de contaminación, estudios paleontológicos y paleoecológicos con ostrácodos (Bridgwater *et al.* 1999). Esta capa usualmente está compuesta de dos partes: la lamela externa y la duplicatura (Fig. 1A) (Benson *et al.* 1961).

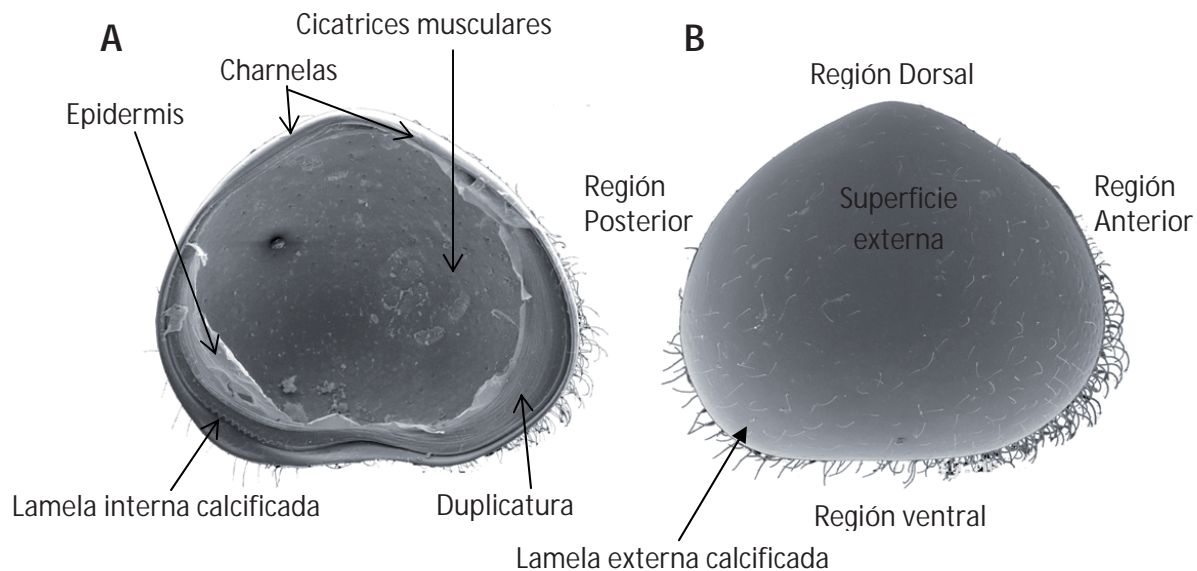


Figura 1. *Cypretta campechensis* n. sp. A, Valva izquierda vista interna y B, valva derecha vista externa.

Por su parte la epidermis (Fig. 1A) es una capa celular que se extiende debajo de la estructura dura de CaCO_3 y donde existen células especializadas en la precipitación del CaCO_3 , el cual se utiliza para sintetizar una nueva valva luego de la muda; se ha observado que estas células pueden llegar a acumular cantidades extras de CaCO_3 , de modo que pueden sintetizar sus valvas incluso en ausencia de este compuesto en el sistema (Benson *et al.* 1961).

Para fines taxonómicos, solamente se toma en cuenta la región calcificada de las valvas, las cuales se dividen en región externa e interna.

La región externa se subdivide en región ventral, región dorsal, región anterior, región posterior (Fig. 1B).

Región ventral

La región ventral (Fig. 1B), por lo general es cóncava y menos frecuente recta, en ocasiones se pueden encontrar proyecciones tipo labio, todas estas características van a depender de la

especie. En ésta área se encuentra el mecanismo de cerrado de las valvas, el cual puede ser simple o complejo dependiendo del tamaño y posición de la valva opuesta. En el mecanismo más simple, una cresta extendida se introduce en el surco de la valva opuesta (Benson *et al.* 1961). Cuando el mecanismo de cerrado es mas complejo, la epidermis en su parte proximal está calcificada, formando una estructura denominada duplicatura, en esta estructura se presentan una serie de crestas y surcos que son complementarios a las crestas y surcos de la duplicatura de la valva opuesta, permitiendo un cerrado uniforme de ambas valvas y brindando mayor protección al organismo (Benson *et al.* 1961).

Otras estructuras del área ventral son los denominados canales del poro, que son los canales de donde surgen las setas marginales; también están presentes falsos canales del poro, que son aberturas modificadas las cuales no presentan setas, en algunas especies se presentan además, sensilas quimiosensoriales y en ocasiones el área ventral presentará ornamentaciones, tales como tubérculos y menos frecuentemente aserraciones o espinas (Tressler 1959; Cohen *et al.* 2007).

Región dorsal

La región dorsal de las valvas (Fig. 1B) se caracteriza por ser convexo (en la mayoría de las especies) o recta, externamente es posible encontrar en esta región, el reborde (flange), que es una zona extendida de una valva y que sobrepasa el margen dorsal de la otra, en algunas ocasiones sobrelapándola. Menos frecuente, el reborde esta transformado en espina. Esta región internamente presenta estructuras de unión permanente de las valvas, las charnelas (Fig. 1A), que para algunas especies la longitud y forma tendrán importancia taxonómica. Las charnelas en Podocopida se pueden dividir en adonta, priodonta, lofodonta y más raramente en merodonta. Esta clasificación se basa en la localización, ordenamiento y estructura de las proyecciones en forma de dientes, cuya función es evitar que se deslice una valva sobre la otra, similar a la que se observa en los pelecípodos, (Benson *et al.* 1961; Karanovic 2012).

Región anterior

Esta región (Fig. 1B) se caracteriza por ser redondeada o cuadrada. En algunas especies del género Darwinulidae, la parte más ventral se encuentra modificada creando una abertura para la alimentación y locomoción, típica de este grupo. En la zona interna es posible encontrar denticulaciones sobre los márgenes, septos en la lamela interna, canales del poro, falsos canales del poro, la lamela interna calcificada y el epitelio periférico (Selvage) que en ocasiones se extiende más allá de los márgenes de las valvas. En la zona externa es posible apreciar el ojo y en la mayoría de las especies, mayor abundancia de setas marginales en comparación con la zona posterior, además de estructuras sensoriales y serraciones como ornamentación, cuya función se desconoce (Meisch 2000; Karanovic 2012).

Región Posterior.

Esta región (Fig. 1B) por lo general es ampliamente redondeada o cuadrada, en algunas especies (*Lymnocythere*) esta región puede estar proyectada hacia abajo, estar expandida (protección de huevos) y en otras presentar ornamentaciones en los márgenes como espinas bien desarrolladas (*Chlamydotheca unispinosa*) o serraciones (*Cypricercus* sp.). Internamente esta región se caracteriza por presentar una lamela interna calcificada de menor amplitud que la presente en la región anterior (en la mayoría de las especies) y pequeña denticulación en la región anterior de la lamela (Fig. 1A) (Bronshstein 1947; Meisch 2000).

Superficie externa

La superficie de las valvas (Fig. 1B) puede ser lisa o reticulada y en la mayoría de las especies ornamentada con una o varias de las siguientes características: gránulos, papilas, poros, estrías, costras, pelos, espinas, protuberancias (algunas veces modificadas en proyecciones denominadas alae). Estos caracteres dependen de la especie y de sus hábitos ecológicos (Tressler 1959; Benson *et al.* 1961). Esta región puede ser dividida para su estudio en: área anterior, posterior, ventral y dorsal, por lo que si se quiere ubicar un punto específico en ella, es posible crear subdivisiones como una zona posterodorsal, anteroventral, media dorsal, etc., útil en la descripción morfológica (Benson *et al.* 1961).

Región interna

Los caracteres más importantes de esta región de las valvas son las cicatrices del musculo aductor y mandibular (Fig. 1A), que se ubican en la mayoría de las especies en la parte media-anterior de la valva y en otras su posición puede ser variable. La cantidad, forma y disposición de las cicatrices en la valva puede ser no constante entre familias. Las formas mas comunes de estas cicatrices son redondeadas, ovales y elongadas; pueden llegar a tener una disposición determinada, como en forma de roseta, característica de Darwinuloidea, o vertical como en Cytheroidea. En algunos organismos, la cicatriz del musculo aductor es un carácter taxonómico importante para diferenciar familias y especies (Colin & Danielopol 1978; Ballent & Díaz 2011).

En muchos casos será difícil reconocer la zona anterior o posterior de las valvas, ya que dentro de los sistemas es común encontrar valvas libres, (sin las partes blandas del organismo que son el factor más importante para establecer la zonación en las valvas) para solventar este problema, es necesario recurrir a 5 caracteres principales dentro de las valvas (Benson *et al.* 1961): 1.-La posición del área ocular; 2.- determinación de la posición de las cicatrices del musculo aductor y principalmente de las cicatrices mandibulares; 3.- determinación de la máxima altura en las valvas, correspondiente por lo regular al aparato reproductor o zona de cuidado de huevos; 4.- Posición de las charnelas y 5.- posición de los canales del poro.

Apéndices

Los apéndices de los artrópodos están constituidos por segmentos denominados podómeros (Cohen *et al.* 2007). Los apéndices de los ostrácodos están compuestos de una base denominada protópodo, seguida de dos podómeros denominados coxa y basis. Donde el basis a su vez, está compuesto de una parte interior llamada endópodo y una parte exterior, el exópodo. Algunos apéndices no siguen este ordenamiento y en ocasiones la coxa y el basis están fusionados formando un solo podómero y otras ocasiones se puede observar un podómero extra en el protópodo denominado precoxa. En los apéndices de los ostrácodos,

la disposición y forma de los podómeros es variable, dependiendo del apéndice y especie estudiada.

En general los ostrácodos presentan 8 pares de apéndices, los cuales de la zona anterior a posterior son: Primeras antenas o anténulas (A1), segundas antenas (A2), mandíbulas (Md), maxilas o primeras maxilas (Mx1), primer apéndice torácico o segundas maxilas (T1), segundo apéndice torácico (T2), tercer apéndice torácico o limpiador (T3) y el ramo Uropodal (UR). En el caso de los machos, el primer apéndice torácico está modificado en el endópodo en palpos prensiles (Benson *et al.* 1961; Karanovic 2005). A continuación se describe cada uno de estos apéndices.

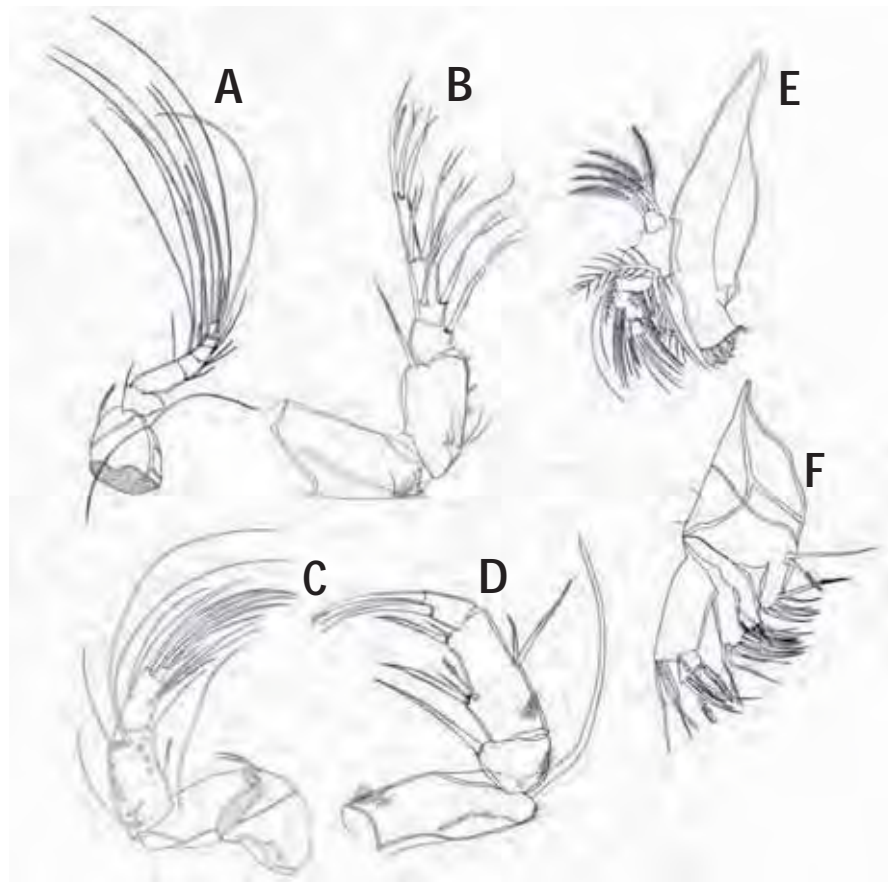


Figura 2. Apéndices de Ostrácodos. A, primera antena *Cyprididae*. B, primera antena *Cytheridae*. C, segunda antena *Cyprididae*. D, segunda antena *Cytheridae*. E, mandíbula. F. maxila

Las primeras antenas o anténulas (A1) son estructuras unirrámeas, que en la mayoría de las especies poseen de cinco a ocho podómeros, de los cuales, los distales están provistos de setas natatorias por lo regular bien desarrolladas que pueden llegar a extenderse fuera de las valvas cuando están abiertas, donde son agitadas para producir rápidas vibraciones y favorecer a la locomoción en la columna de agua (*Cyprididae*) (Fig. 2A). Este apéndice también puede llegar a ser rudimentario, para las especies de hábitos bentónicos (*Lymnocytheridae* (Fig. 2B) y *darwinulidae*). Las funciones principales de este apéndice son la locomoción (en columna de agua o sedimento), actividad sensorial y balance del organismo (Tressler 1959; Benson *et al.* 1961; Neale & Victor 1978; Victor 2002)

Las segundas antenas (A2), son estructuras birrámeas ubicadas a un lado del labio superior. En la mayor parte de las especies el exopodito esta reducido a pequeñas setas o bien ausente (*Cyprididae*) (Fig. 2C); en algunas especies de *Cytheridae* el exopodito esta desarrollado como una seta larga y hueca (Fig. 2D). Estos apéndices son estructuras que se pueden llegar a extenderse hacia afuera de las valvas y están provistas de setas de tamaños variables dependiendo de la especie para la natación en columna de agua o locomoción en sedimento (Tressler 1959). Las segundas antenas están dirigidas por lo regular hacia la región ventral por lo que se considera que además participan en el proceso de alimentación. Sus principales funciones son la locomoción (nadar, caminar, excavar o escalar), alimentación y actividad sensorial (Tressler 1959; Meisch 2000).

Las mandíbulas (Md) (Fig. 2E) son estructuras birrámeas que se encuentran situadas a ambos lados de la boca y que convergen para constituirse como aparatos de masticación, se constituyen de protópodo, endópodo y exópodo. La coxa del protópodo esta armada en la parte ventral por dientes, el exópodo en algunas especies es delgado y pequeño pero en otras es grande y aplanado y se denomina plato branquial; el basis a su vez junto al endópodo forman el palpo mandibular (Fig. 2 E), el cual esta equipado con setas que se usan para cavar, rascar, atrapar alimento de movimientos rápidos y para cortarlo en piezas una vez atrapado (Benson *et al.* 1961; Karanovic 2012).

Las maxilas (Mx) (Fig. 2 F) son estructuras auxiliares en la captación de alimento y en la generación de corrientes de agua que favorecen la respiración. Están formadas de una parte basal muscular de donde se originan cuatro procesos, el primero es conocido como palpo maxilar, el cual es articulado y movable, comúnmente armado con varias setas y dos espinas robustas, que pueden ser lisas o dentadas; los otros tres procesos son lóbulos masticatorios verdaderos que permiten llevar comida a la boca y remover partículas indeseables (Tressler 1959). En la mayoría de las especies de ostrácodos el exópodo está modificado en una larga placa, denominada plato branquial, la cual está equipada con varias setas comúnmente plumosas que están asociadas a la creación de corrientes de agua dentro de la valva y la respiración (Benson *et al.* 1961).

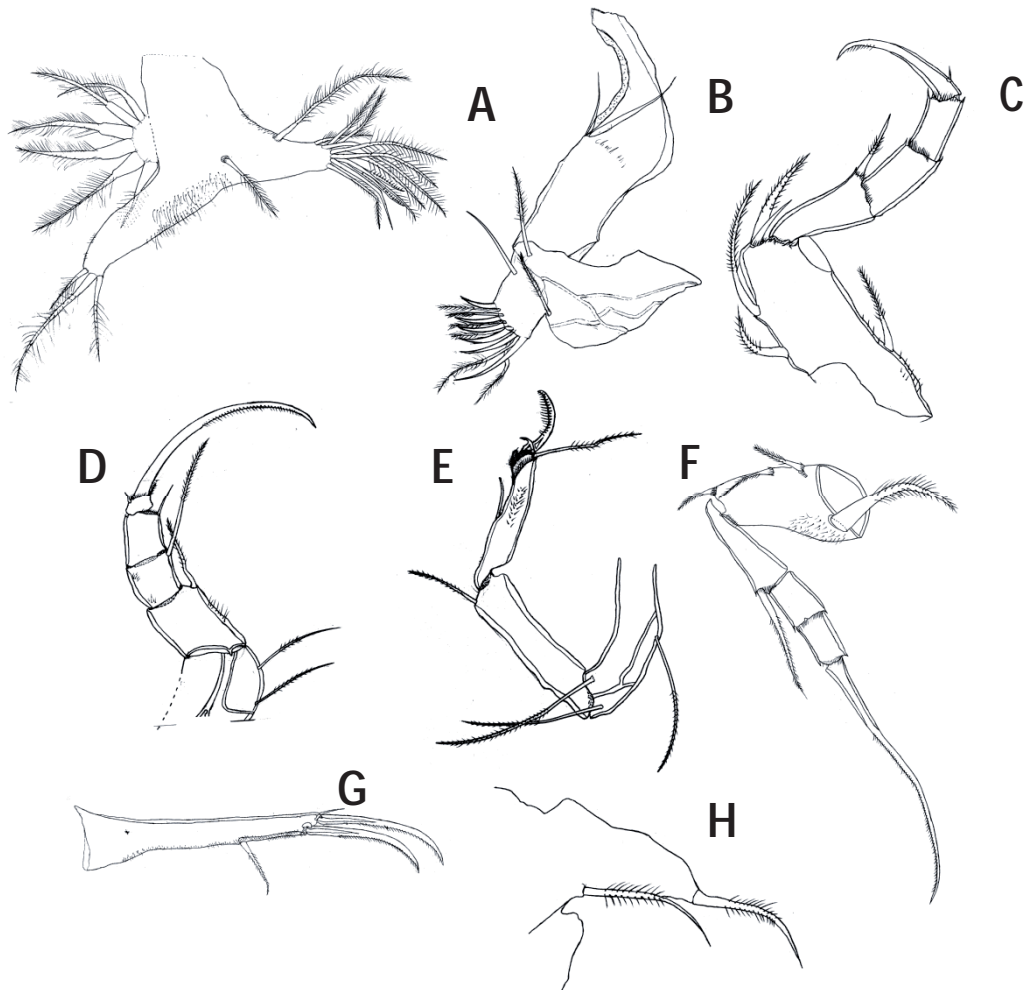


Figura 3. Apéndices de ostrácodos. A, primera pata torácica hembra *Cyprididae*. B, primera pata modificada en el macho *Cyprididae*. C, primera pata torácica *Cytheridae*. D, segunda torácica caminadora. E, tercera pata torácica *Cyprididae*. F, tercera pata torácica *Cytheridae*. G, UR *Cyprididae*. H. UR *Cytheridae*.

Primer apéndice torácico (T1), es una estructura birrámea ubicada en la unión de la cabeza y tórax, en algunas especies (*Cytheridae*), son estructuras similares a los apéndices torácicos (estructuras caminadoras) siguientes pero mas pequeñas (Fig. 3C), aunque existen excepciones (*Limnocythere stationis*); en otras especies (*Cyprididae*) (Fig. 3A), son altamente modificadas por lo que muchos autores se han referido a este apéndice como maxilípedos o segundas maxilas (Benson *et al.* 1961; Meisch 2000).

En algunas especies, el macho presentará modificaciones en el endópodo de los primeros apéndices torácicos (Fig. 3 B), que favorecen a la reproducción (Victor 2002).

El segundo apéndice torácico (T2) es unirrámeo y pediforme (Fig. 3D), armado con una uña terminal robusta y tiene la función de ser una estructura caminadora, rascadora y excavadora. En algunas especies es posible observar en esta estructura dimorfismo sexual en la longitud de las uñas, podómeros y posición de las setas. (Tressler 1959; Benson *et al.* 1961; Karanovic 2012).

El tercer apéndice torácico (T3) es comúnmente una estructura con forma de pata rascadora, dirigida dorsoventralmente (Fig. 3E), la cual termina en una o un par de uñas y una seta de forma, longitud y posición variable. Dependiendo de las especies, ambos caracteres son usados generalmente en taxonomía. La función principal de este apéndice es el de mantener limpias las valvas de materia orgánica. En *Chytheridae* y *Darwinulidae*, esta estructura es apéndices ambulatorios (Fig. 3F) (Tressler 1959).

El ramo uropodal (UR) se ubica en el abdomen de los ostrácodos y a continuación del tercer apéndice torácico. Se trata de una estructura móvil, que puede llegar a extenderse fuera de las valvas cuando se encuentran abiertas. Morfológicamente consiste en una porción basal que termina en un par de uñas móviles y un par de setas ubicadas generalmente en el margen ventral y en la base de la uña subterminal (Fig. 3G). En algunos ostrácodos el ramo uropodal puede ser rudimentario (*Cypridopsinae*), con forma setiforme (*Cytheridae*) (Fig. 3H) o puede estar ausente como en el caso de *Darwinulidae*. La función del ramo uropodal es brindar estabilidad al organismo y para la locomoción (Tressler 1959; Victor 2002).

Fisiología de Ostrácodos

Sistema digestivo

El sistema digestivo de los ostrácodos consiste en una boca, esófago corto, estómago e intestino que se divide en atrio, intestino medio y el ano que termina en la base del ramo uropodal (Tressler 1959; Miranda 2008). En algunas especies se han encontrado organismos vivos (bacterias) a cada lado del estómago, los cuales actúan como fluidos digestivos (Benson *et al.* 1961). La alimentación de estos organismos esta basada en la filtración de material suspendido, detritos, algunas algas; ciertas especies son carnívoras, comensales o parasíticas (Roca *et al.* 1993; Cohen *et al.* 2007; Miranda 2008).

Sistema Glandular

El sistema glandular no es bien conocido en los ostrácodos, sin embargo las glándulas de estos organismos, pueden dividirse en dos tipos: secretoras y excretoras (Benson *et al.* 1961; Karanovic 2012). Algunas de estas glándulas pueden estar ubicadas en el labio superior, funcionando como productoras de saliva, otras en el hepatopáncreas, algunas más en las antenas y en las maxilas (Benson *et al.* 1961; Miranda 2008). Las glándulas maxilares son grandes, se encuentran enrolladas y se localizan entre la pared interna y externa de las valvas (Miranda 2008).

Sistema respiratorio y circulatorio

La respiración es un proceso donde están involucrados los apéndices (patas caminadoras, antenas) y otras estructuras como el plato branquial, que son usadas para crear corrientes dentro de la valva. Los ostrácodos no presentan branquias y su respiración es intrategumentaria, no existe evidencia de corazón verdadero en Podocopida (Karanovic 2012).

Sistema nervioso

El sistema nervioso se compone del cerebro, una cadena ventral de ganglios y el ganglio circumesofágico. El cerebro se encuentra en la cabeza y sus nervios se extienden hacia el ojo, primeras antenas, segundas antenas y la epidermis de las valvas. Los nervios del ganglio circumesofágico se extienden a la cabeza y las segundas antenas. La cadena ventral de ganglios distribuye sus nervios a la mandíbula, maxila, apéndices torácicos y ramo uropodal (Benson *et al.* 1961). Los órganos sensoriales de los ostrácodos son los ojos y las setas sensoriales. Los ojos son estructuras fotosensibles, ubicadas a cada lado del cuerpo, visibles a través de las valvas y las setas sensoriales son considerados como los órganos sensoriales más importantes, se encuentran en las antenas (1ras y 2das), mandíbulas, maxilas y en la superficie de la valva (Miranda 2008; Karanovic 2012).

Sistema reproductor

El sistema reproductor de los ostrácodos está compuesto para los machos de un par de órganos de Zenker (ductos eyaculadores), vesícula seminal, vasos deferentes, un par de hemipenes y palpos modificados para la mayoría de las especies (*Cyprididae*); para otras (*Cytheridae*) los órganos de Zenker estarán integrados en una sola estructura con el hemipene, las estructuras prensiles y el ramo uropodal. En las hembras este sistema está constituido por el ovario, vagina, útero y receptáculos seminales que funcionarán reteniendo esperma por largos periodos. La reproducción en Ostrácodos se lleva a cabo por dos estrategias: partenogénesis, donde las hembras producen huevos fértiles sin la presencia de machos, de los cuales nacerá una generación de hembras y la singamia, donde existe dimorfismo sexual, donde el macho fecunda a las hembras, que producen huevos fértiles de donde nacen machos y hembras. Existen especies que en condiciones particulares pueden llegar a ser partenogénicas facultativas. Para muchas especies, estructuras del macho como palpos prensiles, órgano de Zenker y los hemipenes son determinantes para establecer una diferenciación específica clara (Fig. 4). (Benson *et al.* 1961; López 2007; Kesling 2009).

Características físico-químicas de hábitats de distribución

Las condiciones físico-químicas de los sistemas acuáticos epicontinentales, tienen un rol muy importante en la distribución, supervivencia, desarrollo y morfotipo de los organismos.

Uno de los factores mas importantes a considerar en la distribución de los ostrácodos es la salinidad, mientras menor sea la salinidad de los sistemas, será mayor el grado de colonización y diversidad de ostrácodos dulceacuícolas y viceversa. Se considera que de 0.6 a 0.1 ‰ de salinidad es el rango óptimo de distribución de los ostrácodos dulceacuícolas y que a niveles superiores, se tendrá un efecto significativo en las tasas de desarrollo, supervivencia y conformación de las valvas. (Würding 1983; Mezquita *et al.* 2005; Miranda 2008).

La concentración de iones disueltos será importante también en la distribución de los organismos, siendo los mas importantes: $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$, Cl^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ (Mezquita *et al.* 2005). Delorme (2001) encontró que el 61% de los géneros encontrados en Canadá se distribuyen en aguas carbonatadas y el 9% se distribuyen en aguas con altos contenidos de sulfatos.

El carbonato de calcio (CaCO_3), también será un factor a tomar en cuenta, ya que de esto depende la formación de las valvas, por lo tanto es de esperarse que el pH tenga valores cercanos a neutros para asegurar la disposición de este compuesto, sin embargo se ha observado que algunas especies pueden llegar a tolerar rangos de pH de 0.69 a 9.35 (*Heterocypris rotundata*) (Delorme 2001; Mezquita *et al.* 2005).

La temperatura de los sistemas va a influir en las tasas de desarrollo de los organismos, así como en su distribución y reproducción, por ejemplo, *Heterocypris incongruens* mostró tasas de crecimiento lento a temperaturas bajas (10-15°C) y crecimiento acelerado a temperaturas cercanas a 30°C. Debajo de 5°C, esta especie no logra sobrevivir (Gulshan 1987; Miranda 2008).

Los ostrácodos dependen de una buena aireación y cantidades importantes de oxígeno disuelto. Se considera que los rangos óptimos van desde 7.3 a 9.5 mg/L (Delorme 2001), aunque existen especies tolerantes hasta 11.2 mg/L, como en el caso de *Heterocypris barbara* y algunas como *Cryptocandona vavrai* que toleran niveles de hasta 1.0 mg/L de oxígeno disuelto (Mezquita *et al.* 2005).

Antecedentes

A nivel mundial un área que ha recibido poca atención dentro del estudio de los ostrácodos, es el análisis taxonómico de sus integrantes, entre otras cosas, por el reducido tamaño de los organismos, pocos caracteres taxonómicos tradicionales disponibles y los altos grados de plasticidad fenotípica de algunas especies, que dependen de las condiciones físico-químicas de los sistemas donde habitan (Yin *et al.* 1999; Karanovic 2012).

En México los trabajos taxonómicos sobre este grupo son muy escasos y la mayoría de ellos fueron desarrollados a finales del siglo XIX y principios del siglo XX.

Rio de la loza y Craveri (1858) fueron los primeros en citar dos formas de *Cypris* provenientes de perforación de pozos artesianos del centro del país, pero no les asignaron nombres, ni las describieron; en ese mismo año, pero mas tarde, Sasseur (1858) describe la primera especie mexicana *Chlamydotheca azteca* proveniente de la región costera de Veracruz, actualmente *Chlamydotheca azteca* es la especie tipo del género *Chlamydotheca*.

Sharpe en 1903, describe a la segunda especie del país, perteneciente al mismo género antes mencionado. *Chlamydotheca mexicana*, se encontró en el norte del país, en el estado de Durango.

En 1936, el Carnegie Institution of Washington lleva a cabo algunas expediciones a la península de Yucatán, con el fin de estudiar la composición faunística y algunos aspectos limnológicos de los cenotes de esta región. A partir del material obtenido de estas

expediciones, Furtos en ese mismo año, publica uno de los estudios taxonómicos más amplios sobre ostrácodos del país. Ella describe en su reporte final 23 especies de las cuales, 13 fueron consideradas como nuevas especies para la ciencia en ese momento (actualmente 12 válidas). Posteriormente en 1938, Furtos describe una especie más de la Península de Yucatán *Neocypridopsis mexicana*.

En 1954, Tressler aporta la descripción de una especie proveniente del lago de Pátzcuaro, *Eucandona patzcuaro*, aunque esta especie permanece con incertidumbre taxonómica ya que algunos autores sugieren que se trata de un sinónimo y otros autores la consideran válida, su identidad taxonómica debe ser revisada.

Sandberg en 1964, describe a *Cyprideis mexicana* y con ella describe a la primera especie de la superfamilia Cytheroidea en el país.

En 1985, Forester reporta la presencia de valvas recientes en el centro del país de una especie ampliamente distribuida en el registro fósil del sur de Estados Unidos, *Limnocythere bradburyi*, y describe características de las valvas pero no de las partes blandas.

Luego de estos trabajos, son pocos los estudios taxonómicos que se han realizado en el país, sin embargo destacan tres tesis (actualmente ninguna de ellas publicada): Juárez (2005) (Maestría), López (2007) (Licenciatura) y Cohuo (2010) (Licenciatura). Juárez (2005), desarrollo un estudio paleoambiental con ostrácodos y reportó la presencia de 4 especies para el lago La Preciosa: *Candona patzcuaro*, *Limnocythere itasca*, *Darwinula stevensoni*, y *Potamocypris cf. unicaudata*.

López (2007) realizó un estudio de biodiversidad de ostrácodos de Aguascalientes y el potencial de esos organismos para ser usados como indicadores de contaminación. En este trabajo se presentaron 43 especies, muchas de ellas identificadas a nivel genérico únicamente.

Cohuo (2010), realizó un análisis de la fauna de ostrácodos de la Península de Yucatán. Registró 25 especies, muchas de las cuales fueron consistentes con la fauna descrita por Furtos (1936), aunque se encontraron otros ostrácodos con potencial de ser nuevas especies y se obtuvieron secuencias moleculares por el método de código de barras para algunas especies.

Finalmente, Hernández *et al.* (2010) analizó el ensamble de crustáceos bentónicos, principalmente en su distribución, abundancia y biomasa en el lago Alchichica, y reportó la presencia de dos especies *Limnocythere inopinata* y *Candona sp.*, aunque su determinación taxonómica necesita ser revisada.

Basado en los trabajos antes mencionados, 18 especies han sido descritas en México, (*Chlamydotheca azteca* Saussure 1858; *Chlamydotheca mexicana* Sharpe 1903; *Cypridopsis niagranensis* Furtos 1936; *Cyprinotus inconstans* Furtos 1936; *Cyprideis mexicana* Sandberg 1964; *Cypridopsis rhomboidea* Furtos 1936; *Cyprinotus unispinifera* Furtos 1936; *Cytheridella americana* (Furtos 1936); *Diaphanocypris meridana* (Furtos 1936), *Eucandona patzcuaro* (Tressler 1954); *Eucypris cisternina* Furtos 1936; *Heterocypris putei* (Furtos 1936); *keysercypris xanabanica* (Furtos 1936); *Limnocythere bradburyi* Forester 1985; *Neocypridopsis inaudita* (Furtos 1936); *Neocypridopsis mexicana* (Furtos 1938); *Neocypridopsis yucatecensis* (Furtos 1936); *Strandesia intrepida* Furtos 1936) y actualmente el conocimiento de la diversidad general de los ostrácodos dulceacuícolas no supera por mucho las 18 especies descritas en el país.

Por otro lado, la tendencia actual de la taxonomía es complementar el análisis morfológico tradicional de los individuos con metodologías que permitan una mejor caracterización y discriminación de las especies. La denominada taxonomía integrativa (Will 2005) es un nuevo concepto que actualmente nos permiten realizar lo antes mencionado, ya que propone complementar el análisis morfológico tradicional (morfológico) con técnicas de biología molecular (secuenciación de genes). Esta conjunción de disciplinas nos provee información que permite realizar inferencias a nivel específico y analizar las relaciones evolutivas de los organismos. Uno de los métodos moleculares que mejores resultados a

dado, es el coloquialmente llamado “códigos de barras” (por su traducción al español), este método se basa en la secuenciación de un fragmento del gen mitocondrial COI, que se ha encontrado es único en cada especie del palmeta (Hebert *et al.* 2003). Este método ha demostrado ser el más rápido, económico y confiable en la discriminación de especies y sus resultados han sido notables, tanto en el reconocimiento de especies en estados adultos, como larvarios y en el descubrimiento de especies crípticas dentro del zooplancton dulceacuícola (Elías-Gutiérrez *et al.* 2008; Elías-Gutiérrez & Valdéz-Moreno 2008).

Por esta razón, el presente estudio, pretende que los nuevos conceptos de la taxonomía integrativa (Will 2005), en este caso el análisis taxonómico de los ostrácodos basado en morfología, se complemente con de el análisis molecular de “código de barras” y con esto nos permita tener un acercamiento a la diversidad específica real de los ostrácodos dulceacuícolas del centro-sureste del país y sirva de línea base para futuros trabajos en las diferentes áreas del estudio de estos organismos en México.

Hipótesis

1.- Debido a que la zona central y sur- sureste del país pertenecen a la región de transición y neotropical del continente, se espera que las faunas de ostrácodos de estas dos regiones, sean similares y compartan un número elevado de especies.

2.- Los métodos moleculares por códigos de barras han demostrado ser una herramienta efectiva en la discriminación de especies en diversos grupos, sin embargo para algunos organismos, como peces de agua dulce y algunos grupos del zooplancton, no logra distinguir ciertas especies, ya que los procesos de especiación, no han cumplido el tiempo necesario para que esta separación se refleje en el genoma mitocondrial. Los Ostrácodos de agua dulce del país, al ser un grupo antiguo con presencia desde el paleozoico, será un grupo en el que la discriminación específica será muy efectiva con este método.

Objetivo general

Identificar hasta el nivel más fino posible los Ostrácodos dulceacuícolas del centro y sureste de México utilizando métodos morfológicos. Contrastar estos resultados con la metodología molecular de los códigos de barras.

Objetivos específicos

- Identificar con métodos morfológicos tradicionales a los ostrácodos de la zona de estudio
- Determinar la distribución de especies identificadas en la zona de estudio.
- Analizar las semejanzas y diferencias en la composición de especies de las zonas estudiadas.
- Obtener secuencias de los genes estandarizados conocidos como códigos de barras (citocromo oxidasa c) a partir de los ostrácodos analizados. Para esto será necesario establecer los protocolos apropiados y posiblemente la búsqueda de cebadores (primers) que permitan la amplificación de este gen.
- Comparar las secuencias obtenidas entre ellas mismas y con secuencias preexistentes para la discriminación e identificación de las especies.
- Contrastar los resultados obtenidos con la identificación morfológica y la determinación molecular de los organismos.

Área de estudio

Este estudio se enfocará al trabajo de la región neotropical del país y la zona de transición con la región neártica, es decir, el centro-sureste del país. El estudio comprenderá parte de los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco, Veracruz, norte de Chiapas, parte de Guerrero, Michoacán, Puebla y el Estado de México.

Región sur-sureste

Para este trabajo se considera como área sur-sureste la Península de Yucatán (Fig. 4) y los estados de Tabasco, sur Veracruz y norte de Chiapas (en la cuenca Hidrológica de los ríos Grijalva y Usumacinta).

En la península de Yucatán, se analizaron los principales sistemas acuáticos de la región, entre los que destacan las denominadas localmente como aguadas, cenotes, lagunas y charcos temporales; por su parte en el área de Tabasco, Chiapas y Veracruz se analizaron los sistemas cercanos y asociados a las cuencas de los ríos Grijalva-Usumacinta.

Región centro

Se considera el área centro, a los distritos lacustres conocidos como cuenca de México y cuenca oriental que incluyen el sistema lacustre de la altiplanicie mexicana (Fig. 4) (Alcocer & Bernal-Brooks 2010), principalmente sistemas cercanos a la ciudad de México, los estados de Puebla, Michoacán, Edo. De México y norte de Veracruz. Ambos distritos se sitúan, al menos en parte, en la altiplanicie mexicana por lo que un factor importante a tomar en cuenta es la altitud y cambio de clima, factores que pudieran afectar la distribución de ostrácodos. Esta zona se considera como un área de transición entre las regiones neártica y neotropical del continente.

Se estima que en ambas áreas (sur-sureste y centro), están comprendidos el 39% de los sistemas acuáticos epicontinentales más importantes de México. Las condiciones

ambientales y físico-químicas de un ambiente a otro, pueden llegar a ser muy variables, entre otras cosas debido a altitud, composición de los suelos (volcánico) y la alta contaminación (Hernández et al. 2007; Alcocer & Bernal-Brooks 2010).

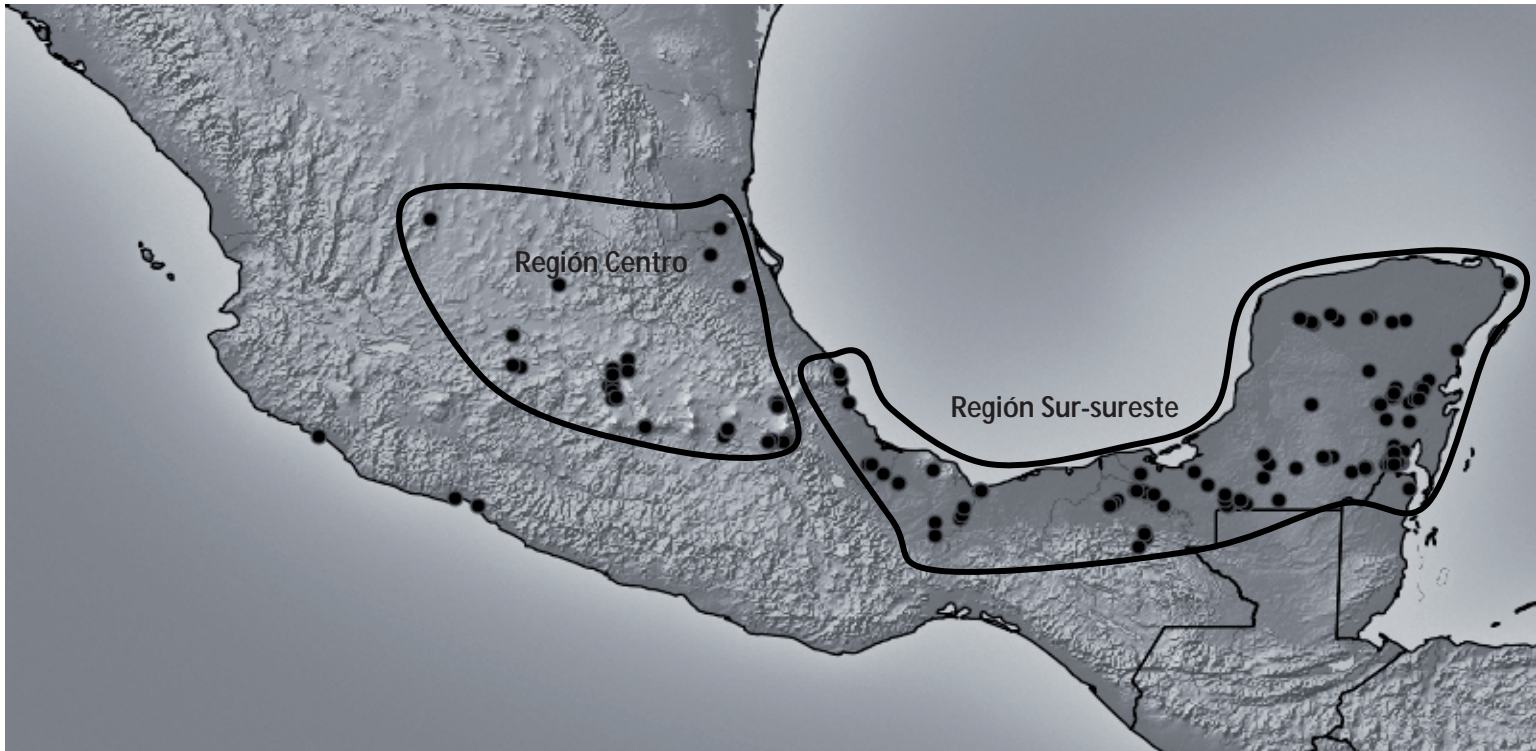


Figura 4. Sitios de colecta y zonas de estudio en el País

Trabajo de campo

Se trabajaron 198 muestras, tomadas de aproximadamente 150 cuerpos de agua epicontinentales, de ambas zonas mencionadas en el apartado anterior (Fig. 4).

Parte de las muestras, se obtuvieron de la colección científica del laboratorio de zooplancton de ECOSUR, correspondientes al intervalo de los años 2002–2010, y otra parte se obtuvo de muestreos complementarios realizados en campo durante el 2011.

Los muestreos en campo involucraron la filtración de 200 litros de agua de cada sistema y el arrastre vertical en la columna de agua, para ambos casos se utilizó una red de arrastre de 50 μ m de abertura de malla.

La filtración se realizó principalmente en la zona litoral de cada sistema, debido a que los ostrácodos generalmente se encuentran asociados al sedimento y vegetación parcialmente sumergida de zonas someras.

Una vez obtenidas las muestras se conservaron y fijaron en una solución al 90% de etanol.

Trabajo de Laboratorio

Identificación de organismos

Con las muestras fijadas, se separaron los organismos con un microscopio estereoscópico y pinzas de punta fina. Los ostrácodos separados se depositaron en tubos de microcentrífuga con una solución de etanol sin desnaturalizar al 96%.

A continuación, de cada tubo (con morfotipos reconocidos) se seleccionaron algunos especímenes, a los cuales se les separaron las valvas y se realizó la microdissección de partes blandas.

El número de organismos montados de cada morfotipo reconocido estuvo en función de los organismos recuperados de la muestra original. El método de montaje se realizó en una mezcla de formol 4%-glicerina (1:1), en preparaciones selladas con el medio Gurr. Todos los montajes realizados y los especímenes se depositaron en la colección de referencia de zooplancton de ECOSUR.

Una vez montados los organismos, la identificación taxonómica se realizó en base a la literatura disponible y la validación de la mayoría de las especies la realizó por la Dra. Ivana Karanovic, especialista reconocida a nivel mundial en este grupo.

Para los morfotipos con incertidumbre para asignarles un nombre, se realizaron esquemas de las principales estructuras de interés taxonómico en una cámara lúcida acoplada a un microscopio de luz, bajo diferentes técnicas como campo claro, contraste de fases y contraste interdiferencial de fases, con el fin de favorecer a su caracterización y facilitar su identificación taxonómica (Anexo 3).

Adicionalmente se tomaron fotografías de los ejemplares a diferentes planos focales y posteriormente se acoplaron con el programa Helicon Focus vers. 4.4, con la finalidad de obtener una sola imagen nítida (Anexo 4). Estas imágenes se subirán al sistema Barcode of Life Database (www.boldsystems.org), junto con la información curatorial y secuencias de los especímenes.

El análisis SEM se realizó con un microscopio Topcon Scanning Electronic Microscope del laboratorio de Barrido Electrónico de ECOSUR unidad Tapachula. El material fotografiado se preparó por el método del punto crítico y se cubrió con un baño de platino-paladio como película conductora. Todas las observaciones se realizaron a 10-15 Kv.

Extracción y secuenciación del ADN

Para la obtención de la secuencia COI de individuos de poblaciones diferentes, se realizó la extracción de ADN de individuos completos utilizando el método de Hotshot (Montero-Pau *et al.* 2008). Los especímenes se digirieron utilizando 10 μ l de una mezcla de buffer de extracción, proteinasa K y agua destilada. Posteriormente cada muestra se incubó a 75°C por cinco minutos en un termociclador. El gen COI se amplificó utilizando los primers COIOstf1F (Forward)- COIOstf1R (Reverse); Ost-COI-1535F (Bucklin *et al.* 2010) Folmer LCO1490, HC02198 (Folmer *et al.* 1994) y Folmer extendidos con las siguientes condiciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Las reacciones de PCR se

realizaron en placas de 96 muestras y de cada muestra se obtuvo un volumen final de 12.5 μ l, conteniendo 2 μ l de ADN, 6.25 μ l de trehalosa al 10%, 2 μ l de agua destilada, 1.25 μ l de 10X PCR buffer, 0.625 μ l de MgCl₂ (50 mM), 0.125 μ l de cada primer (0.01 mM), 0.0625 μ l de cada dNTP (0.05 mM) y 0.3125 U de TaqDNA polimerasa (*Platinum® Taq DNA polymerase-Invitrogen*). Las reacciones se corrieron en un termociclador usando un ciclo de 2 minutos a 94°C, cinco ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 45°C y un minuto a 72°C, seguido por 36 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 51°C y 1 minuto a 72°C, con un paso final de cinco minutos a 72°C. Los productos de la reacción PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (E-Gels[®], Invitrogen) y las muestras que presentaron una banda bien definida se secuenciaron bidireccionalmente usando el secuenciador BigDye[®] Terminator v.3.1., en un analizador ABI 3730x1 DNA (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa CodonCode y se alinearon con el programa CLUSTAL W.

Análisis de datos

Toda la información de los especímenes (e.g. secuencias genéticas, fotografías, información taxonómica) se encuentra en la base de datos Barcode of Life Database (BOLD: Ratnasingham & Hebert 2007, www.boldsystems.org). Las secuencias obtenidas se subieron al GenBank, donde se pondrán a disposición de la misma manera que en BOLD, una vez que los resultados salgan publicados. Para probar la utilidad del COI para identificar especies de Ostrácodos, se calculó la divergencia de las secuencias usando el modelo de distancias genéticas de Kimura de dos parámetros (K2P) (Kimura 1980). Posteriormente se construyó un árbol de Neighbour-Joining (NJ) con los datos de las distancias K2P. Para proporcionar una representación gráfica del patrón de divergencias entre las especies se usó el programa MEGA v.5.01 (Kumar *et al.* 2004), y con ello se examinó la relación entre los taxa.

Con el fin de conocer los patrones de distribución de los ostrácodos del país, se realizó el análisis de la similitud de la composición de las faunas en los sistemas estudiados con el método propuesto por Ward (1963).

La clasificación taxonomía (a nivel de familia e inferiores) de los ostrácodos analizados, sigue lo propuesto por Martens & Savatnalinton (2011); para los géneros *Cypria* y *Typhlocypris*, se considera lo propuesto por Karanovic (2012). La nomenclatura de apéndices para la segunda Antena sigue lo propuesto por Martens (1987), después de su revisión de la descripción original propuesta por Broodbakker & Danielopol (1982). La terminología de la primera antena, sigue lo propuesto por Karanovic (2005). La mandíbula y primera pata torácica, siguen lo propuesto por Broodbakker & Danielopol (1982), para la segunda y tercera pata torácica, se sigue lo propuesto por Meisch (1996). Para el ramo uropodal se sigue el punto de vista de Meisch (2007). Abreviaciones usadas en el texto: A1 - antenula; A2 - antena; Md - Mandíbula; Mdp- Palpo Mandibular; Mxp – Palpo maxilar; UR – ramo uropodal; T1 – Primera pata torácica, T2 – segunda pata torácica; T3 – tercera pata torácica. LV – valva izquierda; RV – valva derecha; Ex – Exopodito; En – Endopodito; CB – Coxabasis.

Resultados

Del total de sistemas analizados (198) (Anexo 1), 14 no presentaron ostrácodos (Emiliano zapata, Cenote la laguna, Chachalacas, Rincón de Parangueo, La Goleta, La Esperanza, cerca Dzúlá, Flor del Bosque, Xbatum, Presa Isla de Aves, Teopizca, Rio mata de Caña, Boca de Ovejas, La Tinaja). Estos sistemas se encuentran distribuidos en todo el país, aunque la mayoría de ellos pertenecen a la región Centro-sur.

De los sistemas con presencia de ostrácodos, se reconocieron un total de 69 especies (Tabla 1), pertenecientes a 5 familias: Cyprididae Baird, 1845; Candonidae Kaufmann, 1900; Ilyocyprididae Kaufmann, 1900; Darwinulidae Brady & Robertson, 1885; Limnocytheridae Klie, 1938.

De las especies antes mencionadas se considera que 12 (*Dolerocypris* sp 1 (Placa 3H), *Dolerocypris* sp 2 (Placa 3J), *Vestalenula* sp 1, *Riocypris* sp (Placa 1D), *Ilyocypris* sp (Placa 3O), *Bradleycypris* sp , *Cyprinotinae* sp 1 (Placa 3B), *Cypria* sp 2, *Cypria* sp 3 (Placa 1L), *Cytheridella* sp 1 (Placa 3C), *Cyprididae* sp 1 (Placa 2C), *Cyprinotinae* sp 6 (Placa 2F),) podrían tratarse de especies nuevas para la ciencia. Dos de éstas podrían corresponder a dos nuevos géneros (*Cyprididae* sp 1 y el grupo *Cyprinotinae*, ver tabla 1).

Tabla 1. Diversidad de Ostrácodos de México, de acuerdo a las regiones geográficas identificadas por el método de Ward (1963).

Resto del País	Península de Yucatán
<i>Heterocypris cf.congenera</i>	<i>Cypretta campechensis n.sp.</i>
<i>Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco n. sp.</i>	<i>Neocypridopsis yucatanensis</i>
<i>Potamocypris sp 1 Timilpan</i>	<i>Chlamydotheca unispinosa</i>
<i>Potamocypris variegata</i>	<i>Cypretta spinosa n. sp.</i>
<i>Potamocypris cf. dadayi</i>	<i>Strandesia intrepida</i>
<i>Potamocypris islagrandensis</i>	<i>Cyprinotus unispinifera</i>
<i>Potamocypris unicaudata</i>	<i>Alicenula serricaudata</i>
<i>Cyprinotinae sp 2 Zempoala*</i>	<i>Typhlocypris cf. elliptica</i>
<i>Potamocypris sp 2 Los baños</i>	<i>Chlamydotheca arcuata</i>
<i>Limnocythere cf. friabilis Km 25 To-At</i>	<i>Diaphanocypris meridana</i>
<i>Chlamydotheca unispinosa</i>	<i>Darwinula stevensoni</i>
<i>Metacypris cf. srisumonae</i>	<i>Cypretta maya n. sp.</i>
<i>Cypria cf. maculata Coatza-Ter.</i>	<i>Vestalenula pagliolii</i>
<i>Cyprinotinae sp 1 Vernet *</i>	<i>Typhlocypris sp 3 Ucum</i>
<i>Cypria cf. kraepelini</i>	<i>Dolerocypris sp 1 Bacalar</i>
<i>Heterocypris cf. dubia Camalote</i>	<i>Heterocypris putei*</i>
<i>Cypria cf. granadae Catemaco</i>	<i>Cypria cf. pseudocrenulata</i>
<i>Cypridopsis vidua 1</i>	<i>Cypria cf. gibbera tenencingo</i>
<i>Cypridopsis vidua 2</i>	<i>Cypridopsis inaudita</i>

Darwinula stevensoni
Diaphanocypris meridana
Typhlocypris sp 1. Catemaco
Vestalenula sp 1 Palenque
Ilyocypris Tlacolula
Typhlocypris sp 2 Tlacolula
Dolerocypris sp 2 Gopalapa
Cyprinotinae sp 4 Zapotal *
Cyprinotus unispinifera
Cypricercus cf. cuneatus Campo Nuevo
Riocypris sp
Bradleycypris sp
Cyprina cf. gibbera
Cyprinotinae sp 6 Coyuquilla
Cypridopsis vidua 3
Valvas libres de:
Darwinulidae Santa Ana
Cyprididae Usumacinta en Jonuta
Candonidae Agua Azul
Candonidae Zapotal
Cypricercinae Charco Usumacinta
Cyprididae La cruz
Darwinulidae Quechulac
Candonidae Alchichica
Limnocytheridae Timilpan
Typhlocypris Timilpan
Potamocypris Timilpan
Potamocypris Presa S. Nicolás

Cyprina sp 2 Chichancanab
Prionocypris loniforma
Cyprina gibbera
Riocypris hinzeaze
Cyprinotinae sp 3 H. Mundaca *
Cyprina pseudocrenulata L. Verde
Cyprina cf. javana
Typhlocypris sp. 4 Noh bec
Vestalenula sp 2 Cenote Azul
Cyprina sp 3 Nuevo Becar
Cyprina sp 1 Bodegas 2
Cyprididae sp 1 Bodegas 2
Cyprinotinae sp 5 Chan Laguna*
Keysercyprina xanabanica
Limnocythere cf. stationis
Strandesia cf. elliptica
Typhlocypris sp 5 L. Kaná
Cytheridella sp 1 L. Kaná
Cytheridella ilosvayi
Cypridopsis vidua 3
Cypridopsis vidua 4
Typhlocypris cf. annae
Valvas libres de:
Darwinulidae Laguna Guerrero
Limnocytheridae Bacalar
Cyclocypridinae Manantial 1
Cyclocypridinae Galeana
Candonidae Km 9 Nvo Becar
Candonidae Las Golondrinas
Cytheridae Galeana
Darwinulidae Cenote Cristal

Darwinulidae Km 3 Carr-Tul.
Cytheridae L. negra
Darwinulidae Xtojil
Darwinulidae Xombacal
Darwinulidae Km 158 Carr. Tul.
Limnocytheridae Vallehermoso
Candonidae L. Tortugas
Timiriasevinae sp L. Guerrero
Candonidae Manantial 2
Cyprididae Laguna Encantada

*Especies no identificadas dentro de un género por carecer de las setas d1 y d2 en la segunda pata torácica (T2).

El análisis de Ward (1963) sobre la similitud de las faunas de ostrácodos en los sistemas analizados, nos permitió determinar que son dos las principales zonas de distribución de ostrácodos en la zona de estudio: la Península de Yucatán (Grupo I) y el resto del país (Grupo II) (Fig. 5). Esto contrasta parcialmente con lo que se postuló en un principio en la hipótesis de este trabajo, ya que si bien se plantean dos zonas de distribución, estas las ubicamos en regiones geográficas diferentes (zona centro y zona sur-sureste).

Dentro de las zonas discriminadas por este método, fue posible observar subgrupos: para la península de Yucatán se observaron nueve subgrupos con una similitud del 77% y para el resto del país se discriminaron diez subgrupos con igual porcentaje de similitud (Figura 5). En ambas zonas los subgrupos corresponden a ciertas regiones geográficas que poseen faunas casi exclusivas y son pocas las especies que se comparten entre ellas.

Grupo I Peninsula de Yucatan

Grupo II Resto del Pais

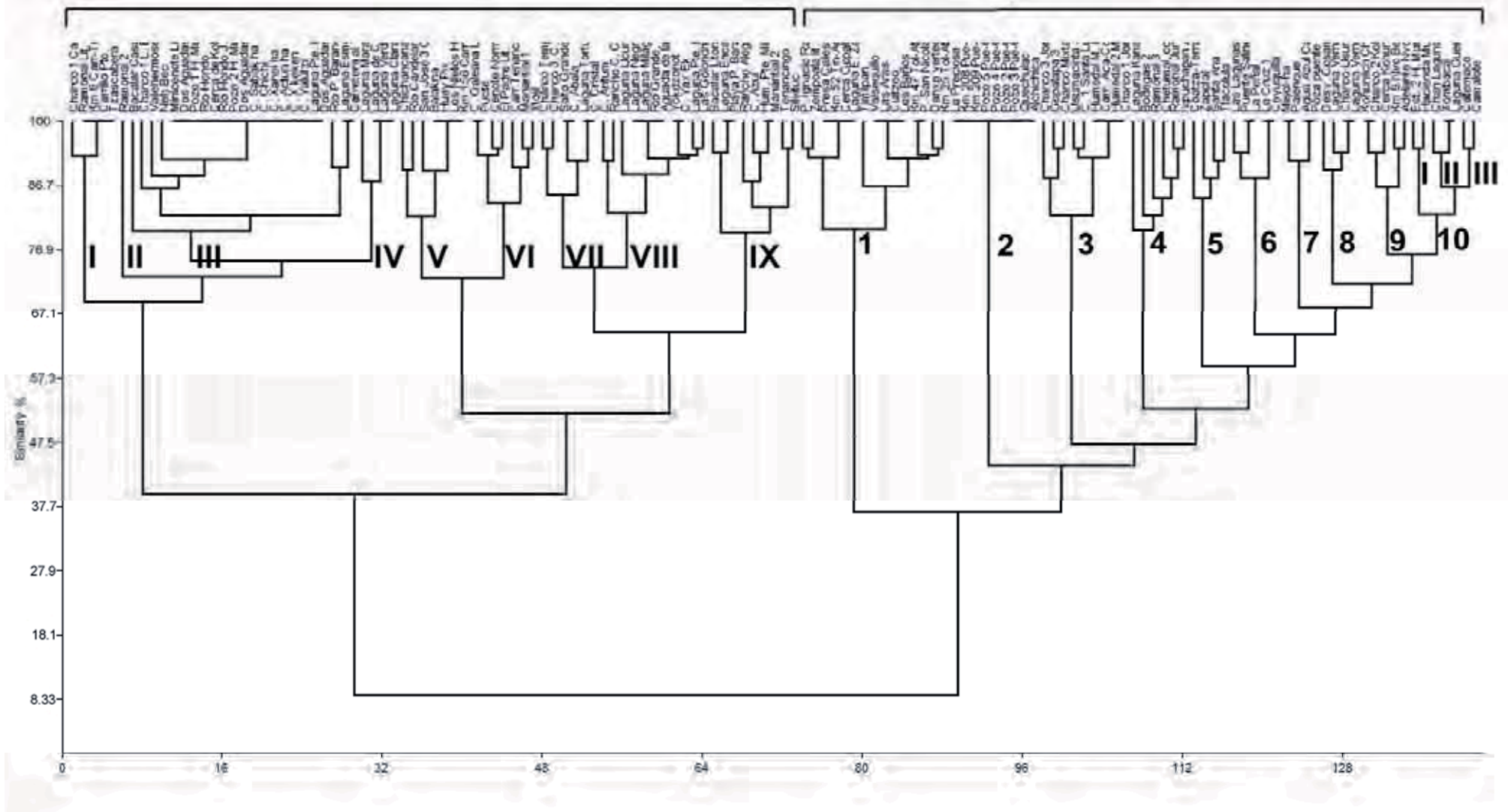


Figura 5. Árbol de similitud de la fauna de ostrácodos de los sistemas analizados por el método de Ward (1963).

A continuación se muestran los resultados del análisis la distribución de las especies pertenecientes a las familias y subfamilias representadas en este trabajo. Para la familia *Darwinulidae* y las subfamilias *Cypridopsinae*, *Cyprinotinae*, *Timiriasevinae*, se realiza además un análisis de identificación molecular comparando las divergencias de las secuencias obtenidas por código de barras para las especies mexicanas con secuencias disponibles en GenBank pertenecientes a especies de ostrácodos de diferentes regiones del mundo. Para las demás familias y subfamilias, el análisis molecular no se pudo realizar debido a que no se obtuvieron secuencias para los organismos (familia *Cyprididae*, *Ilyocyprididae*; subfamilias *Cypricercinae*, *Cypridinae*, *Candoninae*, *Paracypridinae* y *Limnocytherinae*) o no existen actualmente secuencias disponibles en GenBank con las que comparar (*Cyprettinae* y *Cyclocypridinae*). Cabe señalar que el acervo de secuencias genéticas del COI que se presentan en este trabajo representan los primeros resultados a nivel mundial para este gen en ostrácodos de aguas dulces.

Familia Cyprididae Baird, 1845

Meisch (2000) considera que esta familia se caracteriza por presentar valvas de tamaño (0.3 a 7 mm), forma y estructura variable, con la superficie lisa u ornamentada. El epitelio periférico esta presente excediendo los márgenes calcificados o desarrollado internamente; Las setas natatorias en A2, se encuentran usualmente desarrolladas (Fig. 48A) o ausentes. El T1 esta transformada en maxilípedo, en las hembras el endópodo no esta segmentado (Fig. 25E); en los machos se encuentran transformados en palpos prensiles. La pata T2 esta desarrollada como pata caminadora (Fig. 33C) y en la pata T3, el segmento final esta transformada en “Pincer organ”, cuya traducción más cercana sería órgano sujetador (Fig. 43C). UR, bien desarrollado (Fig. 48F) o reducido con forma setiforme (Fig. 44E). Actualmente esta familia esta integrada por 23 subfamilias y 99 géneros a nivel mundial.

En México esta familia está representada por 6 subfamilias: *Cyprettinae* Hartmann, 1971; *Cypricercinae* McKenzie, 1971; *Cypridinae* Baird, 1845 *Eucypridinae* Bronstein 1947; *Cypridopsinae* Kaufmann, 1900; *Cyprinotinae* Bronshtein, 1947.

Dentro de la fauna perteneciente a esta familia, una especie y ciertas valvas libres no pudieron ser asignadas a una subfamilia en particular. Por un lado, la especie encontrada mostró características muy particulares en el UR (Seta posterior ausente, seta anterior desarrollada en uña, uña anterior elongada y fuertemente desarrollada) y valvas. En cuanto a las valvas, son necesarias las partes blandas para definir sobre su identidad taxonómica. Al momento estos organismos se mantendrán solamente a nivel de familia, en espera de obtener mayor cantidad de material de estas localidades. La distribución de las especies agrupadas en esta familia, se encontraron principalmente en los estados de Tabasco y Guanajuato (Fig. 6).

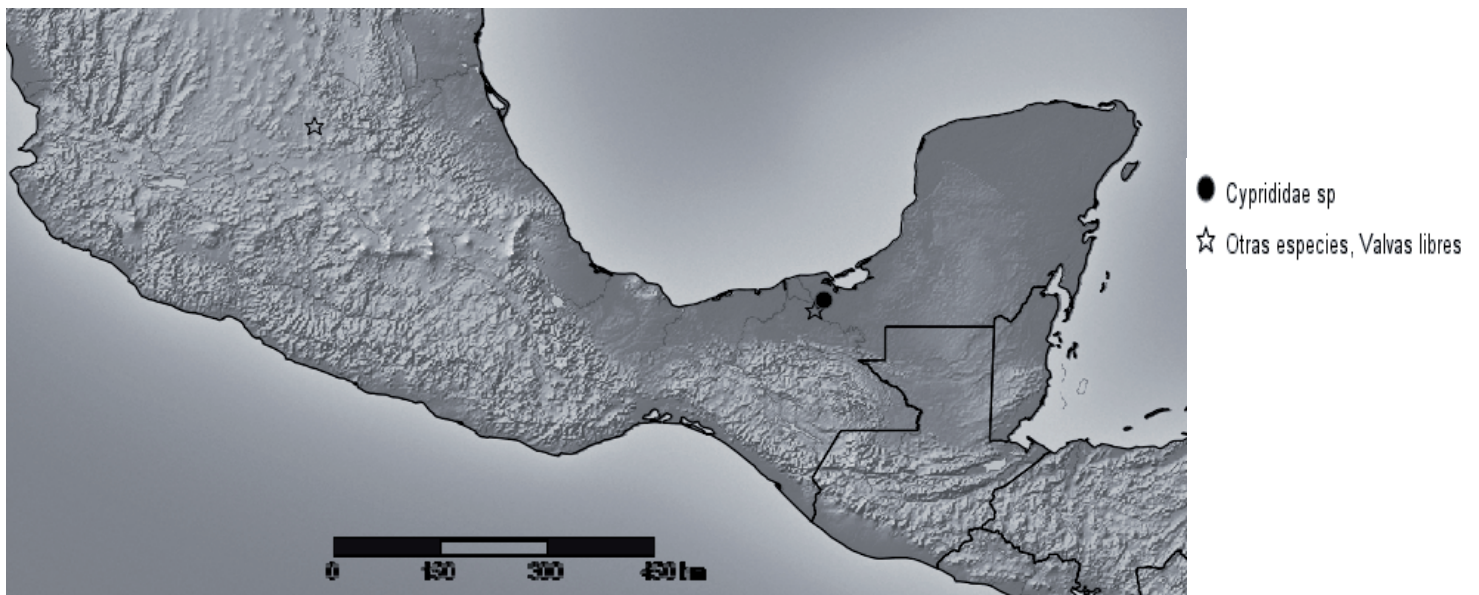


Figura 6. Mapa de distribución de especies identificadas a nivel de familia *Cyprididae*.

La subfamilia Cyprettinae Hartmann, 1971 está caracterizada, de acuerdo a Sohn & Kornicker (1972), por presentar valvas relativamente pequeñas (1 mm) y globosas (Fig. 31, 35,39). La superficie de éstas puede ser lisa u ornamentada, con los márgenes anteriores con septas desarrolladas en los adultos (Fig 38 E, F). A1, con siete segmentos y con el órgano de Rome presente (Fig 32A). Setas natatorias bien desarrolladas o reducidas (solo una especie). T2, con 5 segmentos (Fig. 40C); en T3 el segmento terminal no está diferenciado del penúltimo segmento y con el órgano sujetador desarrollado (Fig. 33D). UR elongado y delgado con dos uñas delgadas (Fig. 37D). Actualmente esta subfamilia está integrada por 2 géneros de los cuales el género *Cypretta* se encontró en el país con las siguientes especies: *Cypretta maya* n. sp. (Fig. 38-40), *Cypretta campechensis* n.sp. (Fig. 31-34), y *Cypretta spinosa* n.sp (Fig. 35-37), distribuidas principalmente en la región centro-sur de la península de Yucatán (Fig. 7).

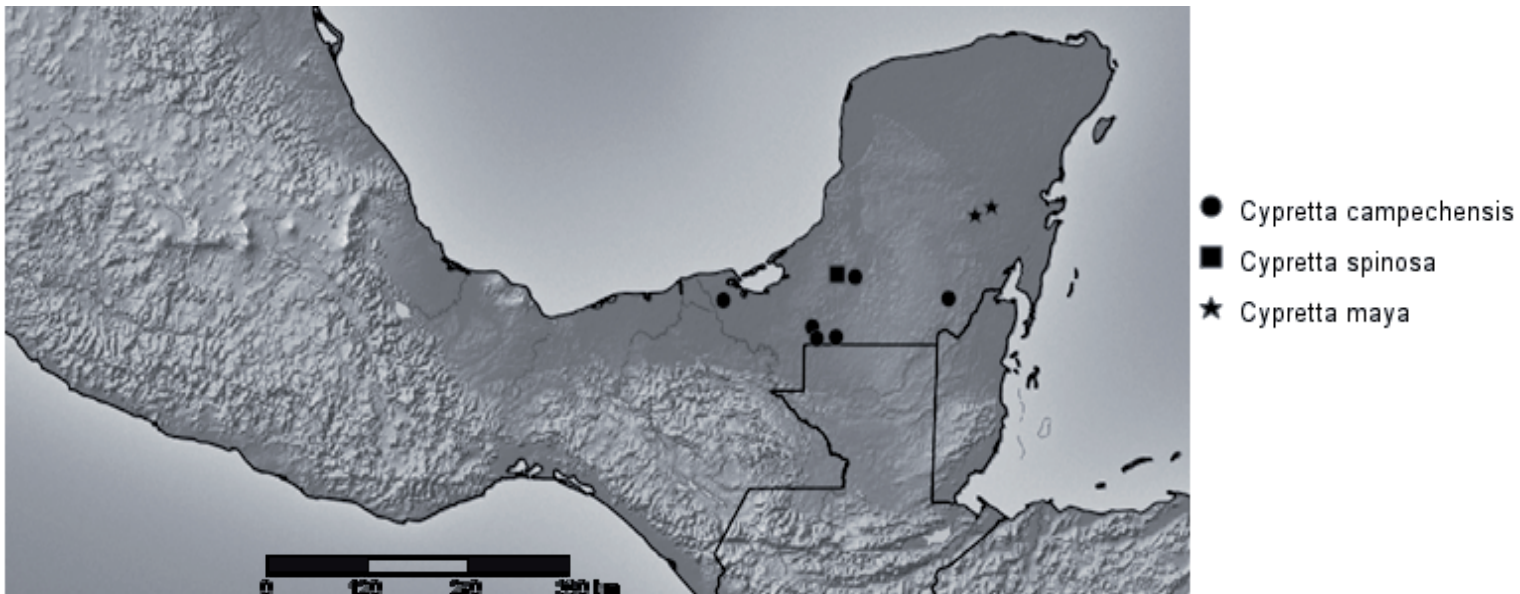


Figura 7. Mapa de distribución de especies pertenecientes a *Cyprettinae*.

La subfamilia Cypricercinae McKenzie, 1971 se caracteriza, según Savatnalinton & Martens (2009), por ser organismos con valvas de forma variable y con la superficie lisa u ornamentada (Placa 2A, 4O). A1 con el órgano de Rome y Wouters presente. Mx1 con el segmento terminal con forma rectangular (Fig. 48B) o espatulada. T1 no presenta la seta “c”. En T2, el penúltimo segmento esta dividido (Fig. 48C). En el segmento basal la seta “d2” mas corta que la seta “d1” (Fig. 48C); T3 con el segmento terminal transformado en órgano sujetador (Fig. 48D); UR, bien desarrollado (Fig. 48F) y con la estructura de soporte con un lazo en la zona distal denominado lazo de Triebel (Triebel’s loop) (Fig. 48E). Esta subfamilia esta representada a nivel mundial por 11 géneros; En México se encontraron los siguientes géneros: *Cypricerus* Sars, 1895 *Diaphanocypris* Würdig & Pinto, 1990 y *Strandesia* Stuhlmann, 1888, con las siguientes especies: *Cypricerus* cf. *cuneatus* (Placa 2 B), *Strandesia intrepida* (Placa 4O), *Strandesia* cf. *elliptica* (Placa 1 R, Fig. 48), *Diaphanocypris meridana* (Placa 1B). Estas especies mostraron una distribución mayor hacia el centro-sur de la península de Yucatán y *Cypricerus* cf. *cuneatus* hacia el sur del estado de Veracruz (Fig. 8).

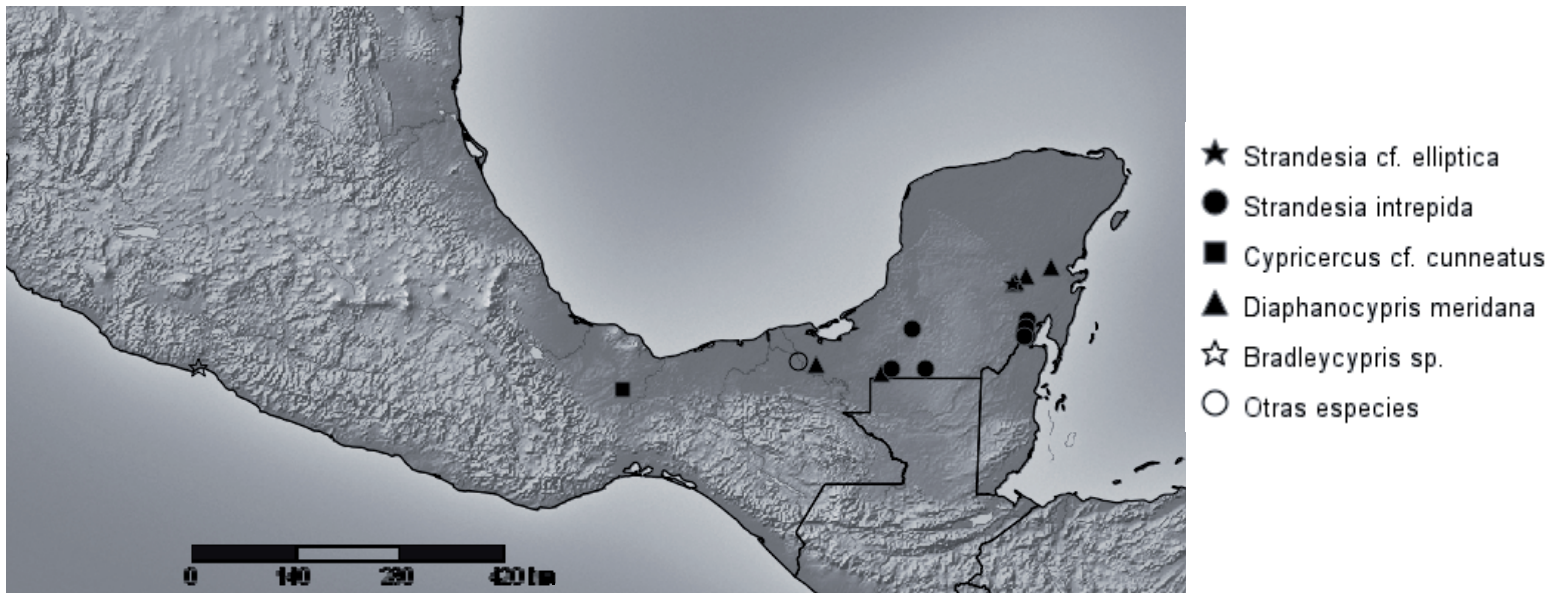


Figura 8. Mapa de distribución de especies pertenecientes a *Cypricercinae*.

La Subfamilia Cypridinae Baird, 1845, está representada a nivel mundial por 9 géneros y según Meisch (2000) se caracteriza por ser organismos con valvas de tamaño variable (1.5–3 mm), ovoides o globulares, con superficie lisa (Placa 1F) o débilmente ornamentada. El epitelio periférico de las valvas está desarrollado internamente. El segundo segmento del palpo maxilar es cilíndrico (Fig. 43A). El T2 presenta de 4 a 5 segmentos (Fig. 43B); En T3 el segmento terminal esta transformado en órgano sujetador (Fig. 43C). Los palpos prensiles en el macho son asimétricos.

En México, encontramos que esta subfamilia esta representada por 2 especies del género *Chlamydotheca* Saussure, 1858: *Chlamydotheca unispinosa* (Placa 1F) y *Chlamydotheca arcuata* (Fig. 43). La distribución de *C. arcuata*, estuvo limitada a la península de Yucatán y *C. unispinosa* se encontró desde la península de Yucatán hasta el sur del estado de Veracruz (Fig. 9), sin embargo, López (2007) reporta la presencia de esta especie hasta el sur del estado de Aguascalientes.

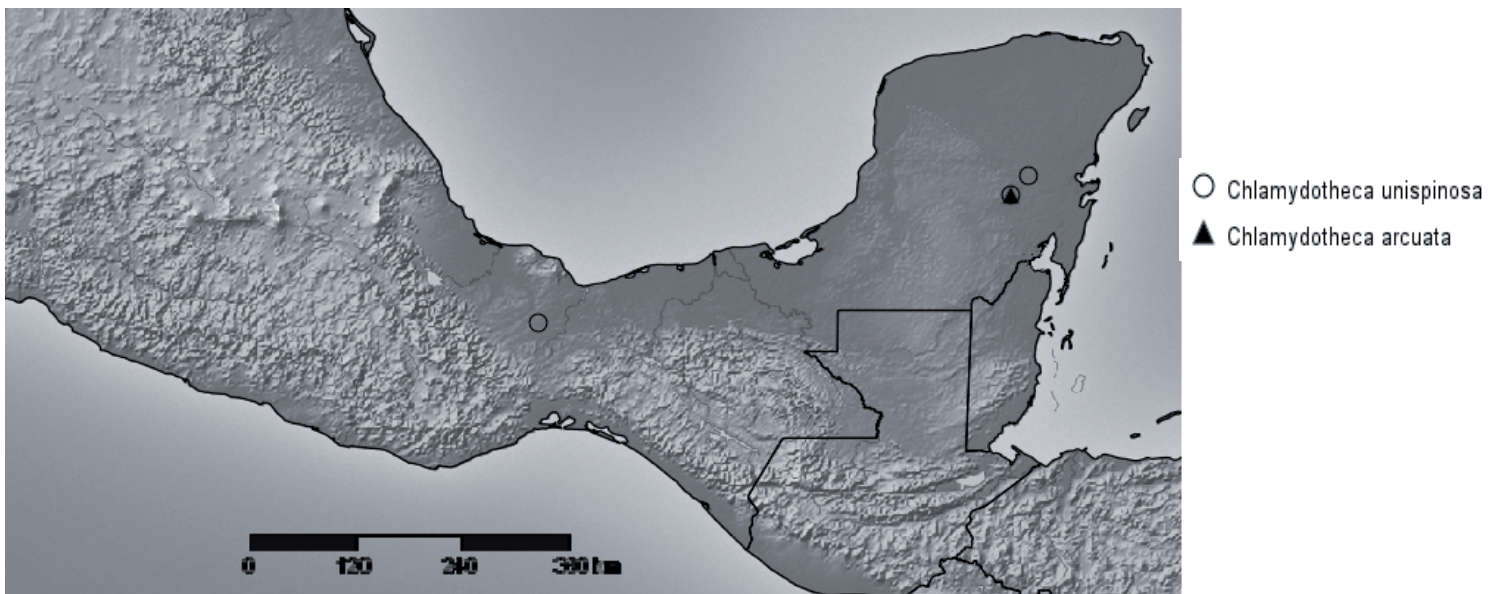


Figura 9. Mapa de Distribución de especies pertenecientes a *Cypridinae*.

La Subfamilia Cypridopsinae Kaufmann, 1900, está actualmente integrada por 16 géneros y caracterizada, según Meisch (2000), por valvas pequeñas de 0.3 a 0.9mm (Placa 2 L,M,N). LV sobrelapando RV anteroventralmente o RV sobrelapando LV. A1, con siete segmentos. A2, con setas natatorias bien desarrolladas y largas (Fig. 44A), en algunas especies también reducidas. Segmento terminal del palpo maxilar cilíndrico (Fig. 44B) o en forma de espátula. En machos los palpos prensiles son asimétricos. El T2 presenta 5 segmentos (Fig. 44C); T3 tiene el segmento terminal transformado en órgano sujetador (Fig. 44D). El UR es reducido con forma de flagelo en hembras (Fig. 44E) y ausente en machos. Hemipenes con dos lóbulos.

En el país esta subfamilia se encuentra integrada por los siguientes géneros: *Cypridopsis* Brady, 1867; *Neocypridopsis* Klie, 1940; *Potamocypris* Brady, 1870, con las siguientes especies: *Neocypridopsis yucatanensis* (Placa 1E), 6 especies de *Potamocypris* (Placa 4C, F, I, J,K) y *Cypridopsis vidua* (Placa 2 L, M; Placa 3A). De ésta última, se observaron importantes variaciones morfológicas entre los individuos por lo que se clasificaron 4 subgrupos (*Cypridopsis* 1- 4). La distribución de esta subfamilia fue la más amplia de todas las analizadas en el país. *Potamocypris* estuvo distribuido exclusivamente en el centro del país (Fig. 10); el complejo de especies *Cypridopsis* estuvo distribuido indistintamente a lo largo de toda el área analizada; *Neocypridopsis yucatanensis* y *Cypridopsis inaudita* estuvieron restringidos a la península de Yucatán (Fig. 10).

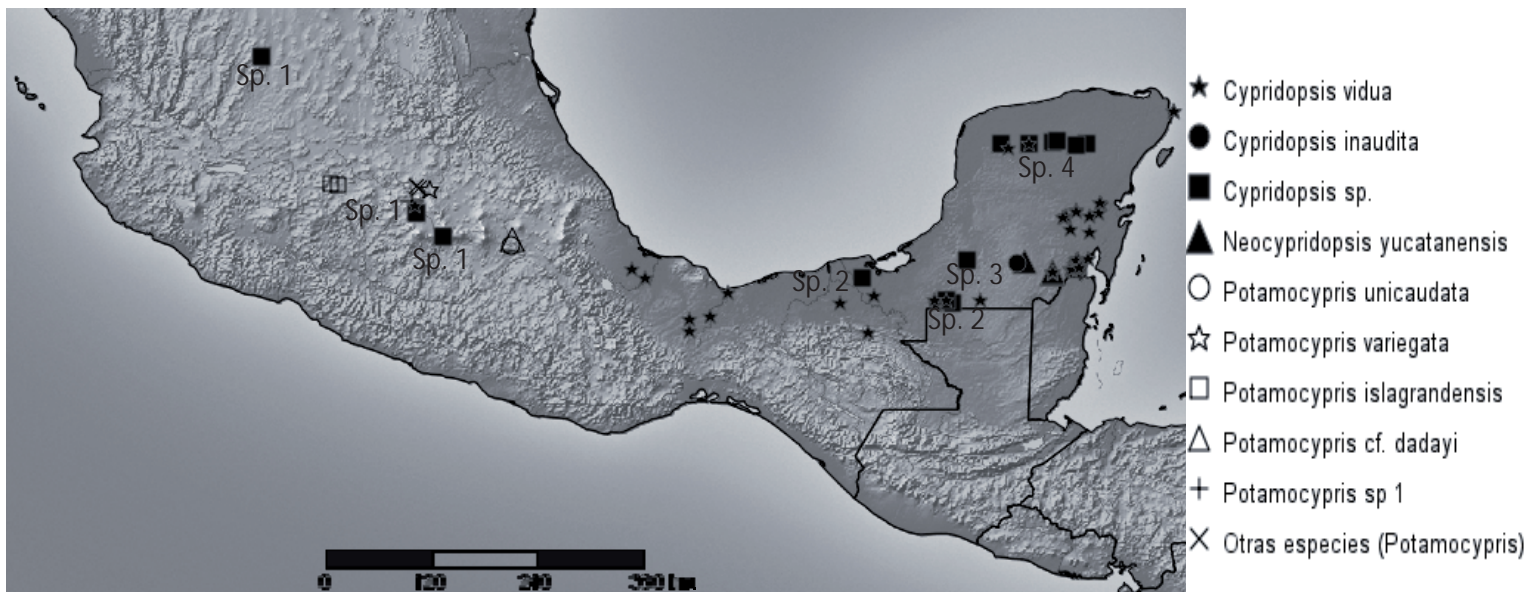


Figura 10. Mapa de Distribución de especies pertenecientes a *Cypridopsinae*.

Análisis del ADN

El análisis molecular de códigos de barras permitió obtener 31 secuencias de diferentes longitudes, pertenecientes a especies identificadas morfológicamente como *Cypridopsis vidua*, muchos de los organismos usados en este análisis mostraron cierta variabilidad fenotípica entre los individuos. Las secuencias mayores a 450 pares de bases se compararon entre ellas y con una secuencia de GenBank, perteneciente a *Cypridopsis vidua* (DQ889094.1) de Canadá. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 11.

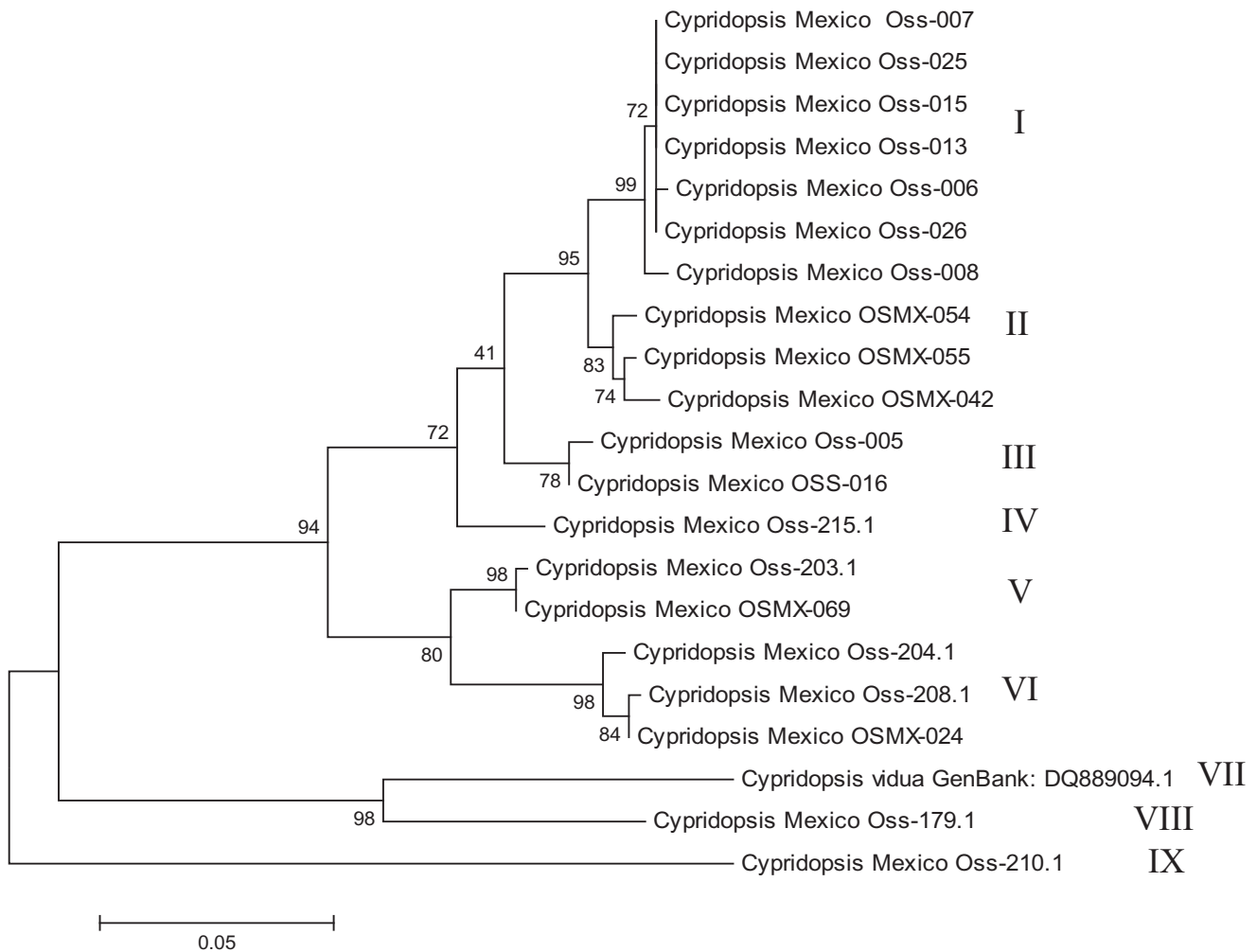


Figura 11. Árbol de identificación de especies pertenecientes a *Cypridopsinae*.

La Subfamilia Cyprinotinae Bronshtein, 1947 esta actualmente integrada por 5 géneros y se caracteriza, de acuerdo con Meisch (2000), por ser organismos con valvas robustas de longitudes entre 1–2 mm (Placa 2 E,F,G). El margen dorsal esta usualmente arqueado (Placa 2 G) y las valvas son asimétricas. RV o LV con o sin tubérculos en el margen (Fig. 25A). A1 con 7 segmentos. A2 con setas natatorias bien desarrolladas. T1 con el plato vibratorio bien desarrollado y usualmente seis setas radiales setuladas (Fig. 25E); en el macho los palpos prensiles son asimétricos. T2, con 5 segmentos (Fig. 25 F). T3 con el segmento terminal transformado en órgano sujetador (Fig. 25G). UR, bien desarrollado (Fig. 25H).

En México esta subfamilia esta representada por especies del género *Heterocypris* Claus, 1892, *Riocypris* Klie 1935, *Cyprinotus* Brady 1886 y un conjunto de especies que en el segmento basal de la pata T2, no tienen las setas d1 y d2 (por lo que preliminarmente no es posible asignarlas a un género). La distribución de las especies pertenecientes a esta subfamilia, se encontró a través de toda el área de estudio (Fig. 12).

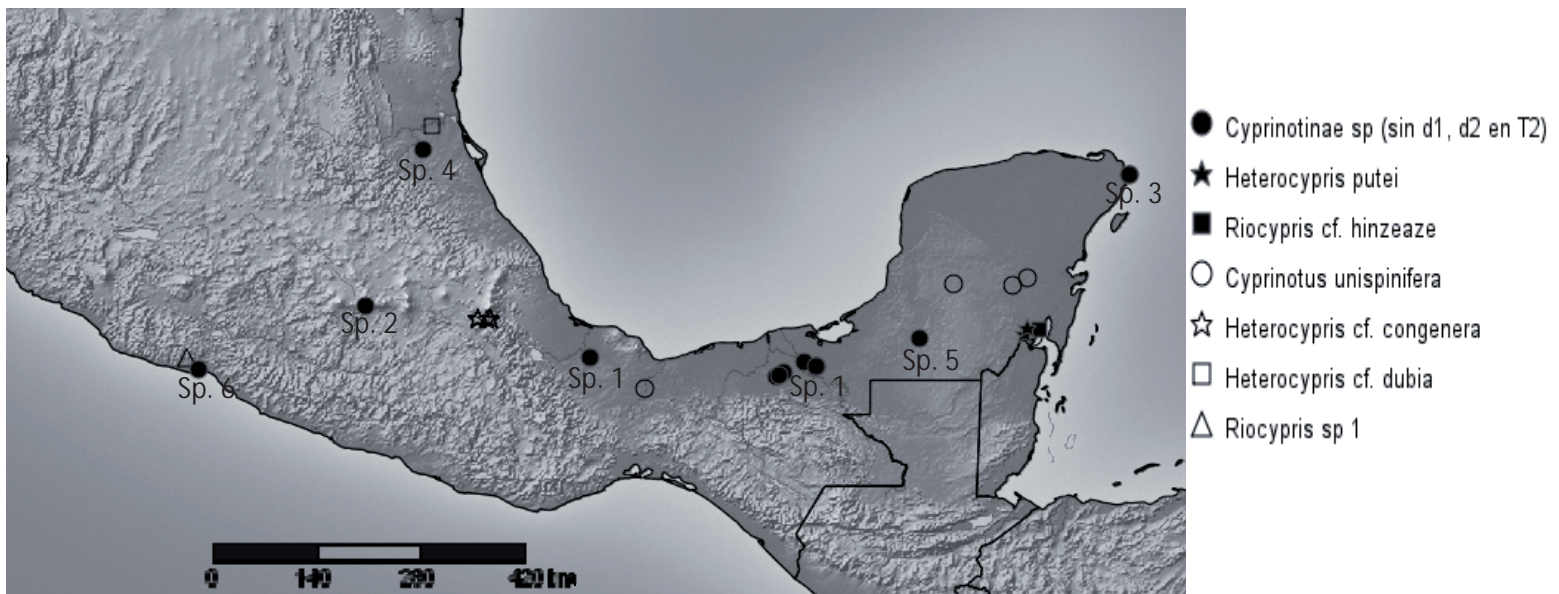


Figura 12. Mapa de distribución de especies pertenecientes a *Cyprinotinae*.

Análisis del ADN

El resultado del análisis de código de barras nos permitió obtener 5 secuencias, pertenecientes a *Cyprinotinae* sp 1 de Tabasco (Fig. 25). La comparación de las secuencias mexicanas, se realizó con secuencias disponibles en GenBank, pertenecientes a especies de la subfamilia Eucypridinae, distribuidas principalmente en Europa y con una secuencia mexicana perteneciente a una especie de la familia Cyprididae (Fig. 13).

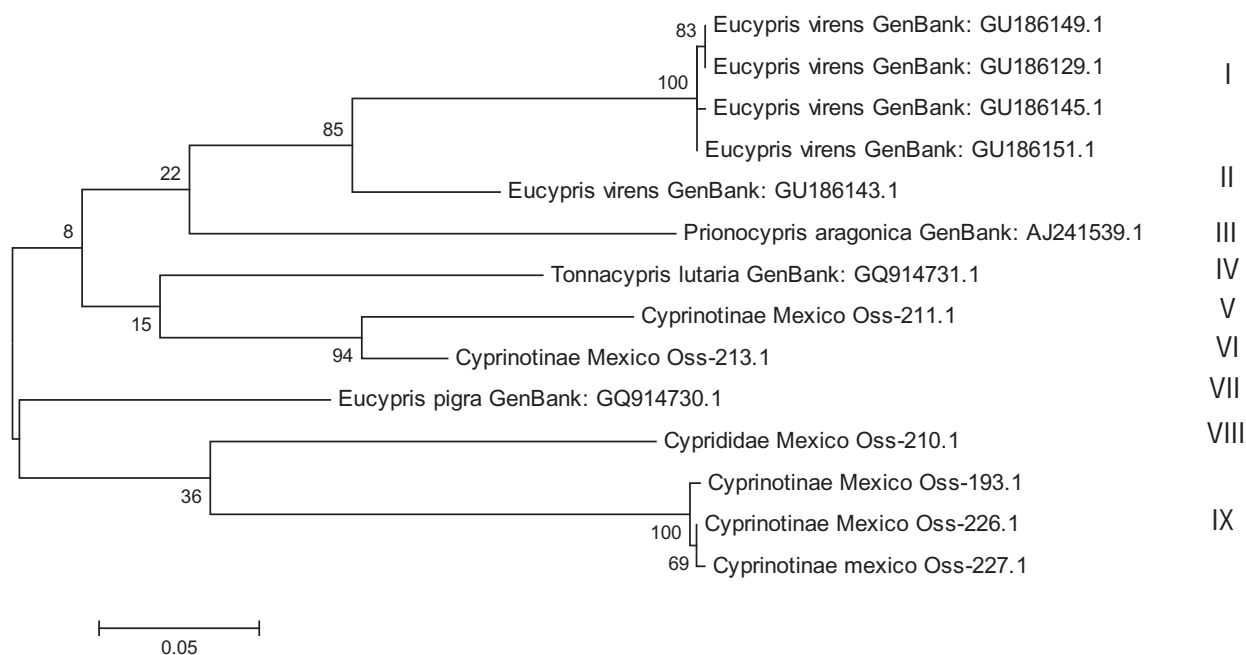


Figura 13. Árbol de identificación de la familia *Cyprinotinae*.

La subfamilia Eucypridinae Bronshtein, 1947, se caracterizan según Meisch (2000), por tener un tamaño entre 1 a 2.5 mm, sus valvas pueden ser elípticas, elongadas y mas raramente ovaladas (Placa 2I). LV generalmente se overlapa con la RV ventralmente. En la pata T1, la seta “c” esta presente (Fig. 47B). La pata T2 es 5 segmentada (Fig. 47 C). La pata T3, presenta el órgano sujetador desarrollado (Fig 47D). El UR esta bien desarrollado (Fig. 47E). La parte posterior del cuerpo se encuentra en forma de espina. A nivel mundial esta subfamilia presenta 9 subfamilias, de las que solo *Prionocypris* Brady & Norman 1896, se encontró en el país con *prionocypris* cf. *longiforma* en la península de Yucatán (Fig. 14).



Figura 14. Mapa de distribución de *Prionocypris cf. longiforma*

Familia Candonidae Kaufmann, 1900

De acuerdo con Meisch (2000), se caracteriza por valvas de tamaño (0.3 - 1.5 mm), forma y estructura variable (Placa 5A-H). Superficie lisa u ornamentada. Cicatrices musculares, compuesta por una cicatriz elongada debajo de la cual están presentes tres cicatrices anteriores y dos cicatrices posteriores. A2 con setas natatorias bien desarrolladas, reducidas o completamente ausentes. T1, transformada en maxilípedos, el endópodo de este apéndice está unisegmentado en hembras y en machos se encuentran transformados en palpos prensiles con 1 o 2 segmentos (Fig. 26E). T2, en forma de pata caminadora (Fig 42D) y T3 con el segmento terminal normalmente desarrollado (Fig 26G). UR bien desarrollados (Fig. 27 F) o algunas veces reducido. Ducto eyaculador (órgano de Zenker) con 8 anillos de espinas quitinizadas.

Esta familia se divide a su vez en tres subfamilias: *Candoninae* Kaufmann 1900, *Cyclocypridinae* Kaufmann, 1900 y *Paracypridinae* Sars, 1923. La subfamilia *Candoninae* esta a su vez integrada por cuatro tribus: *Candonini* Kaufmann, 1900; *Candonopsini* Karanovic, 2004; *Namibcypridini* Martens, 1992 y *Terrestricypridini* Schornikov, 1969.

En México, *Candonidae*, esta representada por las subfamilias *Candoninae* Kaufmann 1900 (tribus *condonini* y tribu *condonopsini*) y *Cyclocypridinae* Kaufmann, 1900.

La subfamilia *Candoninae* Kaufmann 1900 se caracteriza, de acuerdo con Karanovic (2012), por presentar valvas de formas variables (Placa 5 A-H) con LV sobrelapando a RV ventralmente. A1 con el órgano de Rome ausente. En A2, las setas natatorias están ausentes y presentan dimorfismo sexual, en machos la seta “t2” y “t3” están transformadas en setas sensoriales. En T1, el plato vibratorio está reducido presentando solo dos o tres setas setuladas. En machos los palpos prensiles son asimétricos y con un segmento (Fig 26 D, E). T2, con presencia o no de una seta basal. T3, con el segmento terminal bien desarrollado y con tres setas terminales de diferente longitud (Fig. 26G). UR con una de las uñas o setas reducidas (Fig. 27F). Órgano de Zenker con 5 a 8 anillos de proyecciones quitinizadas. Esta subfamilia actualmente presenta 39 géneros distribuidos en 4 tribus. La tribu *condonini* está representada en el país por especies del género *Typhlocypris* (Fig. 26, 27), en cuanto a este género, un carácter determinante para diferenciar especies son las estructuras del macho, en la región solo para dos especies se encontraron machos y hembras en las poblaciones. En el país, las especies de este género, se encontraron distribuidas principalmente en la península de Yucatán, pero también en los estados de Tabasco, Puebla y Veracruz (Fig. 15).

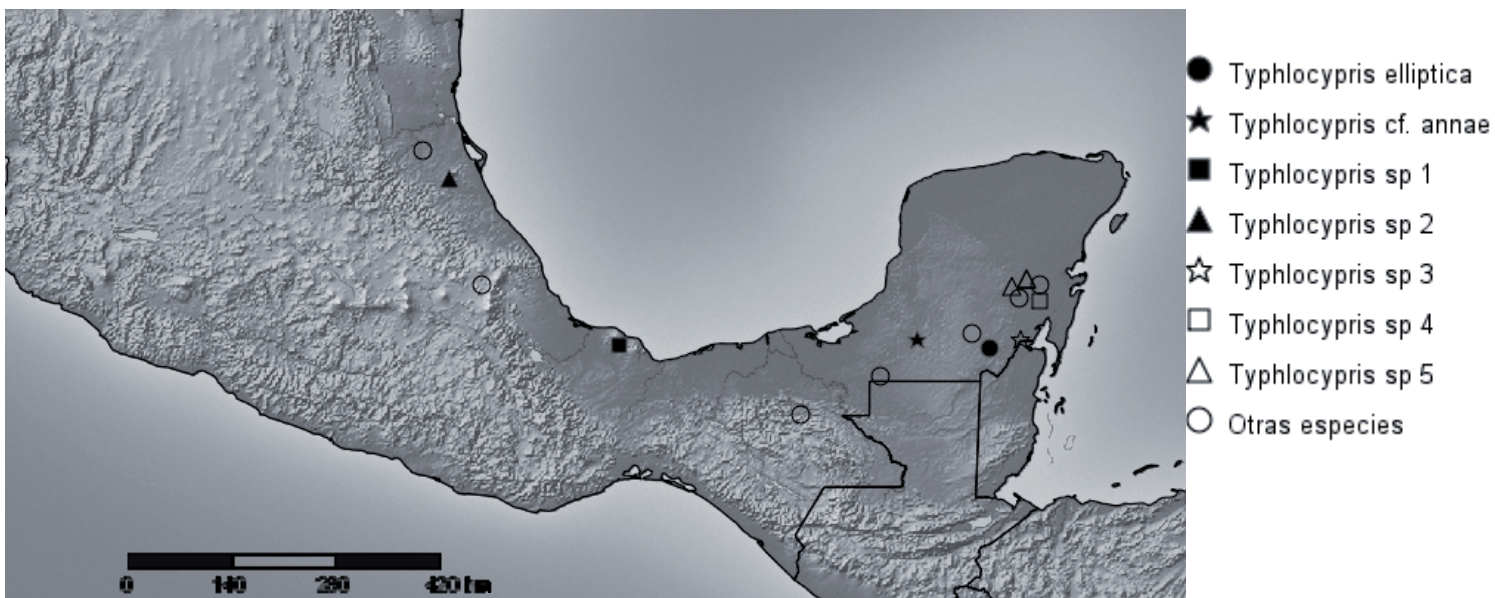


Figura 15. Mapa de distribución de especies pertenecientes a *Candonidae*.

La subfamilia *Cyclocypridinae* Kaufmann, 1900, está caracterizada de acuerdo con Meisch (2000) por presentar valvas pequeñas (menos de 1 mm), usualmente robustas y moderadamente comprimidas u ovals (Placa 1 J-P). A1, por lo regular con siete segmentos y con el órgano de Rome presente (Fig. 42A). En A2, del macho los filamentos sensoriales están presentes. Las setas natatorias en este segmento están bien desarrolladas, aunque en algunos casos pueden estar ausentes. T1, con el plato vibratorio con seis setas (Fig. 42B). En machos los palpos prensiles tienen 2 segmentos (Fig. 42 B,C). T3, con 4 segmentos, el segmento terminal con dos setas cortas y una larga (Fig. 43E). La parte proximal del órgano de Zenker esférica y elongada.

Ésta subfamilia esta compuesta por 6 géneros de los cuales solo *Cypria* y *Keysercypria* se encontraron en el país. Las especies pertenecientes a *Cypria* se encontraron distribuidas en el centro-sur de la península de Yucatán y en los estados de Tabasco y sur de Veracruz (Fig. 16); Por su parte *Keysercypria xanabanica* se encontró exclusivamente al norte de la península de Yucatán (Fig. 16).

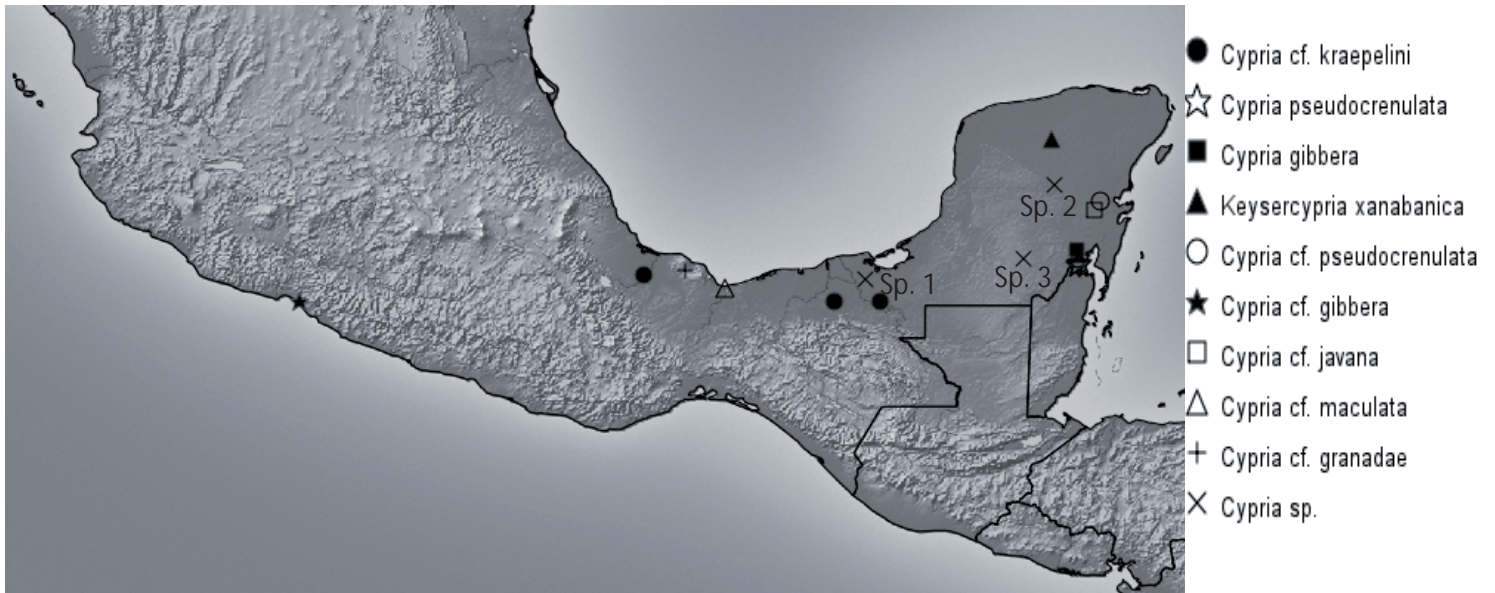


Figura 16. Mapa de distribución de especies pertenecientes a *Cyclocypridinae*.

La subfamilia Paracypridinae Sars, 1923, esta caracterizada según Wouters (1987) por valvas elongadas, débilmente calcificadas (Placa 3H,J). A1 con siete segmentos, el primero con una seta larga en posición ventral. A2 con 5-6 segmentos y el astetasco (Y) alargado, en machos la seta “t2” y “t3” están transformadas en setas sensoriales (Fig. 45A). T1 en forma de maxilípedo. T2 con cinco segmentos (Fig. 45B). T3 con 5–6 segmentos, el penúltimo está débilmente diferenciado, el último segmento termina en un par de uñas reducidas y una seta reflecta muy alargada (Fig. 45C). Esta subfamilia está integrada por dos Tribus Thalassocypridini Hartmann & Puri, 1974 y Renaudocypridini McKenzie, 1980. Thalassocypridini Hartmann & Puri, 1974, está integrada a su vez por 7 géneros de los cuales solo *Dolerocypria* Tressler, 1937, está presente en México con dos especies, distribuidas en sistemas de los estados de Quintana Roo y Tabasco, caracterizados por su cercanía e influencia del mar (Fig. 17).

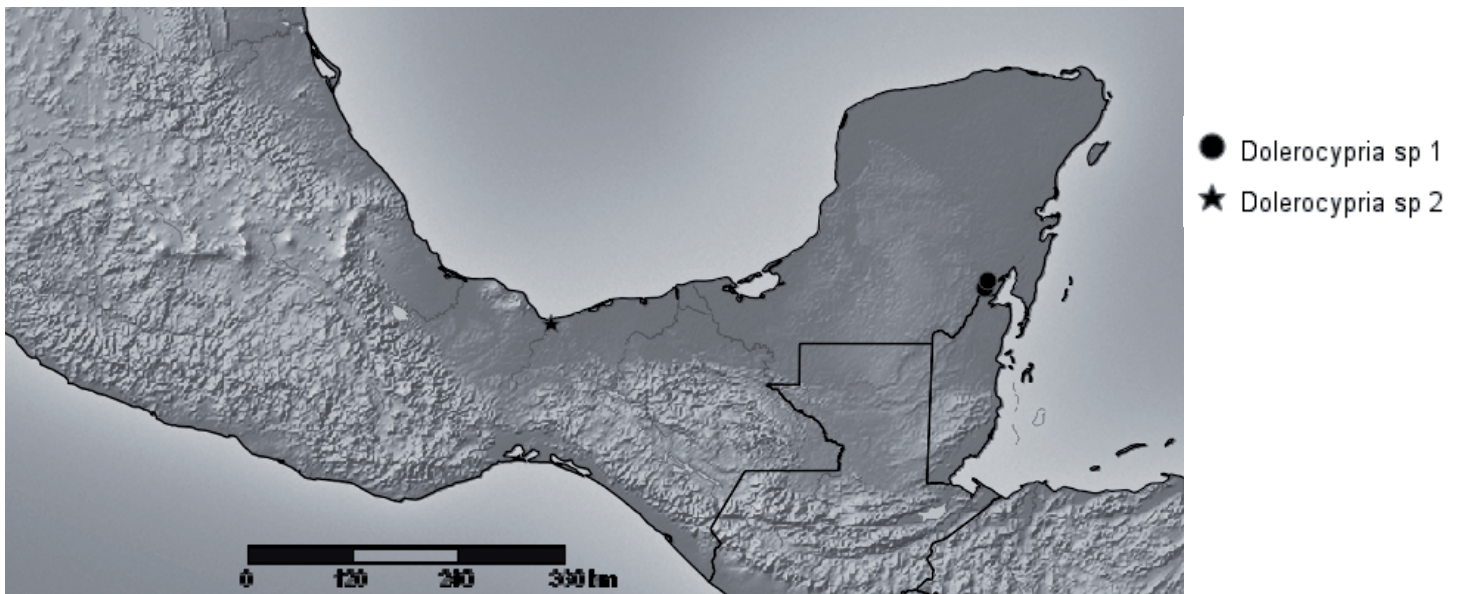


Figura 17. Mapa de distribución de especies pertenecientes a *Dolerocypria*.

Familia Ilyocyprididae Kaufmann, 1900

Caracterizada de acuerdo con Meisch (2000), por valvas rectangulares de más o menos 1 mm, con relieves y en algunas ocasiones proyecciones (Placa 3O). LV se sobrelapa con la RV. A1 con siete segmentos. A2 con las setas natatorias presentes (Fig. 41A), pero en ocasiones reducidas. Mdp con tres segmentos (Fig. 41B). T1, en hembras con el palpo en forma de pata caminadora y dos o tres segmentos. En los machos el palpo esta transformado en órganos prensiles con dos segmentos. T2 con seta basal presente (Fig. 41D). T3 con el segmento terminal cilíndrico con tres setas terminales (Fig. 41E). UR bien desarrollado (Fig. 41F). Órgano de Zenker con 15 a 20 espinas no ordenadas en anillos. Esta subfamilia integra solo un género, *Ilyocypris* Brady & Norman, 1889, del cual una especie se encontró en el país (Fig. 41), distribuidas exclusivamente en un sistema del norte de Veracruz (Fig. 18).

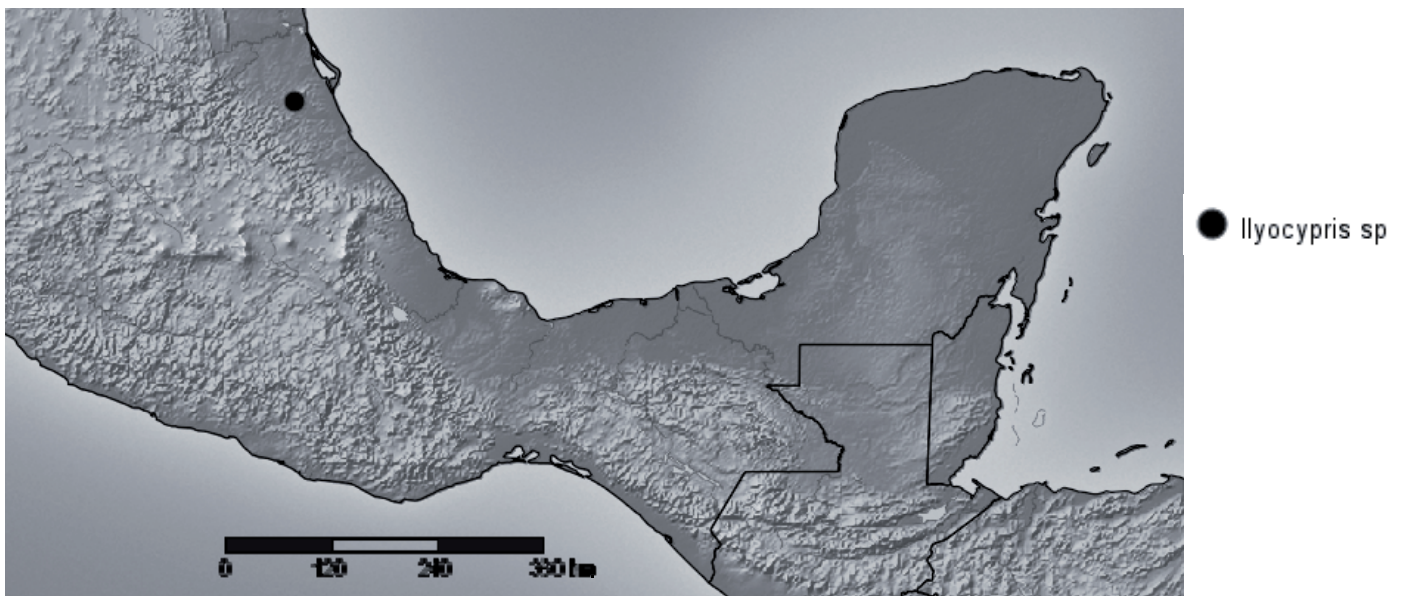


Figura 18. Mapa de distribución de *Ilyocypris* sp.

Familia Darwinulidae Brady & Robertson, 1885

De acuerdo con Rossetti & Martens (1998), presenta organismos de tamaños pequeños a medianos, de forma elongada, subcuadrada o redondeada (Placa 3G, M, N). Zona de fusión delgada con pocos canales del poro marginales. Para algunas especies las valvas presentan en la RV posteroventralmente una pequeña proyección (Placa 4N). A2 con las setas natatorias ausentes (Fig 49 A). Mdp, desarrollado en forma de garra (Fig. 49B). T1 con tres segmentos y con el protópodo transformado en machos (que están presentes solo en pocas poblaciones). T2 y T3 normalmente desarrollados (Fig. 49C,D). UR reducido a una o dos setas. Post-abdomen presente o ausente. Cámara ovígera presente (Placa 1A). Hemipenes lateralmente comprimidos y con tres lóbulos.

Esta familia está integrada por 5 géneros, de los cuales 3 fueron encontrados durante este estudio: *Alicenula* Rossetti & Martens, 1998 *Darwinula* Brady & Robertson, 1885 y *Vestalenula* Rossetti & Martens, 1998, con las siguientes especies: *Darwinula stevensoni* (Placa 3G), *Alicenula serricaudata* (Placa 1A), *Vestalenula pagliolii*, *Vestalenula* sp1 (Fig.49), *Vestalenula* cf. *pagliolii* (Placa 4 M, N). Estas especies se distribuyen principalmente en la península de Yucatán y hacia los estados de Tabasco y norte de Chiapas (Fig. 19), sin embargo se encontraron valvas libres de especies pertenecientes a esta familia hacia el centro del país (Fig. 19), estas podrían pertenecer a *D. stevensoni* ya que es la única especie que se reporta repetidas veces en Norte América.

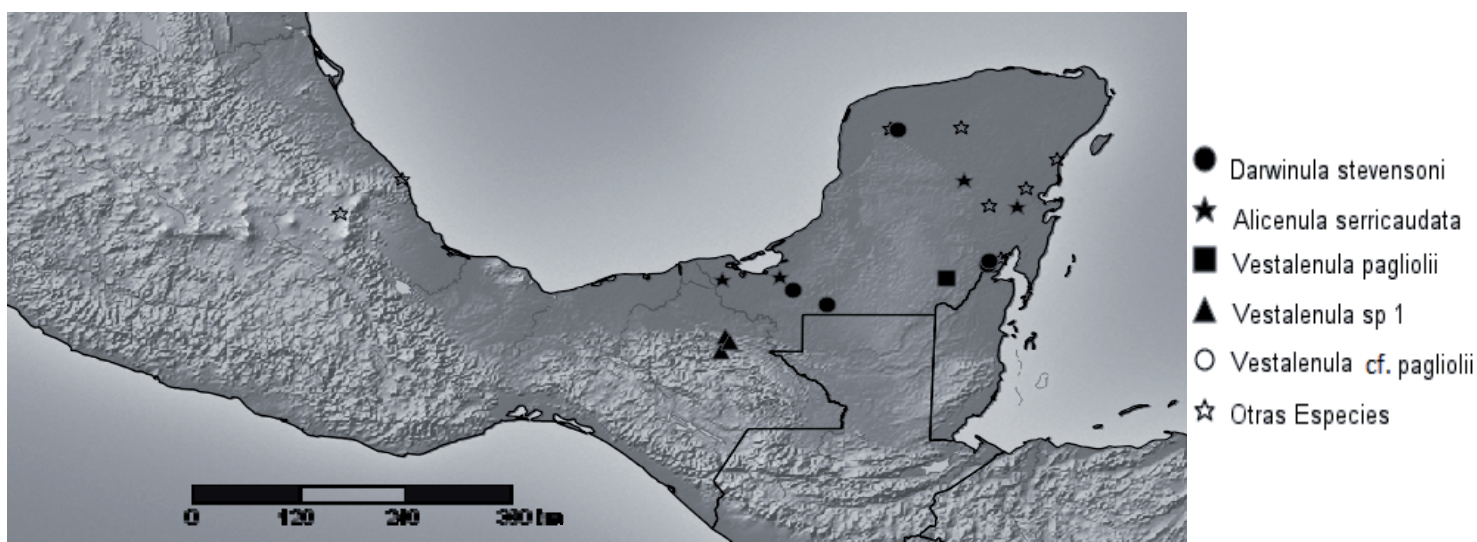


Figura 19. Mapa de distribución de especies pertenecientes a *Darwinulidae*.

Análisis del ADN

El análisis de código de barras para esta familia nos permitió obtener una secuencia perteneciente a *Vestalenula pagliolii*, del sur de Quintana Roo, esta secuencia se comparó con secuencias disponibles en GenBank pertenecientes a *Vestalenula marmonieri*, *Darwinula stevensoni*, *Vestalenula molopoensis*, *Vestalenula matildae*, *Alicenula inversa*, *Vestalenula brasilensis*, *Microdarwinula zimмери*, cuyas distribuciones se reportan en Europa, América del Sur y Asia principalmente (Fig. 20).

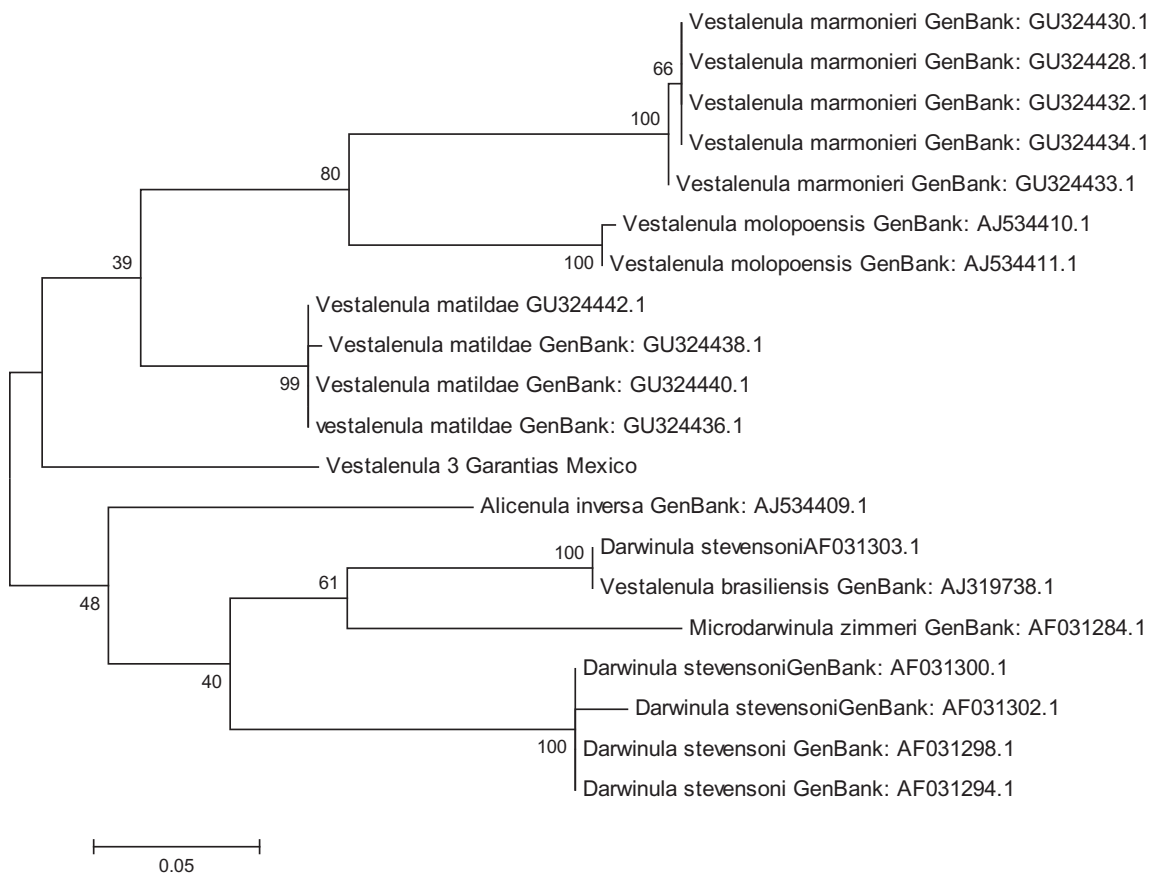


Figura 20. Árbol de identificación de especies pertenecientes a *Darwinulidae*.

Familia Limnocytheridae Klie, 1938

Caracterizada de acuerdo con Hartmann & Puri (1974) y Meisch (2000) por valvas reniformes o elípticas (Placa 4 A, D, G). Las valvas están pobremente ornamentadas con tubérculos, irregularidades, proyecciones y reticulaciones (Placa 4 D, G). Canales del poro marginales largos o ramificados (Fig. 28C,D). Cicatrices musculares dispuestos en forma vertical (Fig. 28 A, B). A1, con 5 o 6 segmentos (Fig. 28E). Astetasco terminal basalmente fusionado con la seta vecina (Fig. 28E). A2 con tres uñas en el segmento terminal (Fig. 28F). Mdp angosto (Fig 28I). T1, T2 y T3 desarrolladas como patas caminadoras con 4 segmentos (Fig. 29C, D, E). Hembras con cámara ovígera presenta o ausente dependiendo de la subfamilia.

Esta familia se integra de dos subfamilias: Limnocytherinae Klie, 1938 (dividida en dos tribus: Limnocytherini Klie, 1938 y Leucocytherini Danielopol *et al.*, 1990) y la subfamilia Timiriaseviinae Mandelstam, 1960.

La subfamilia Limnocytherinae Klie, 1938 de acuerdo con Meisch (2000), se caracteriza por valvas con una o dos crestas o tuberculos poco o bien desarrollados (Placa 4 B, D). En los machos, las valvas son mas elongadas que en las hembras y posteriormente expandidas (Fig. 30 A, B); en las hembras la cámara ovígera es ausente. Segmento terminal de A1 es más largo que el penúltimo segmento (Fig. 28E); la parte fusionada del astetasco con la seta vecina, es largo. Esta subfamilia esta integrada por 12 géneros divididos en dos tribus, de los cuales solo *Limnocythere* Brady, 1868 está presente en México (Placa 4 A, B, D, E, G, H). La distribución de las especies integrantes de esta subfamilia se encontró a lo largo de toda la zona de estudio, pero principalmente al centro-sur de la Península de Yucatán (Fig. 21), desafortunadamente fueron pocos los individuos encontrados de cada especie, ya que sus hábitos ecológicos (bentos y zona intersticial) dificultan su captura.

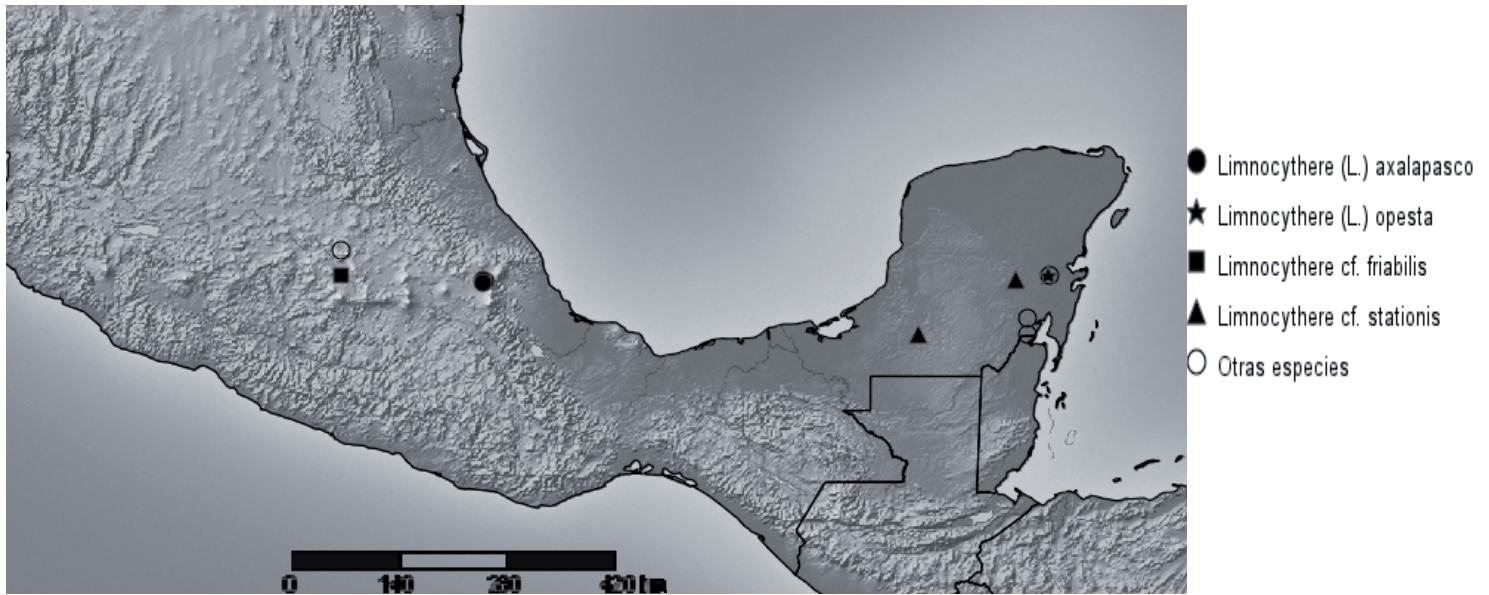


Figura 21. Mapa de distribución de especies pertenecientes a *Limnocythere*.

La Subfamilia Timiriaseviinae Mandelstam, 1960, de acuerdo con Martens (2003) esta caracterizada por presentar valvas con importante dimorfismo sexual, en las hembras las valvas en posición dorsal se aprecian altamente infladas, formando la cámara ovígera (Placa 3Q). A1 con el segmento terminal más corto que el penúltimo segmento. Parte fusionada del astetasco con la seta vecina corta. A2, con el exópodo transformado en una seta larga, gruesa y hueca (Fig. 46A). Mdp angosto o escuadrado (forma de rodilla) (Fig. 46C). T3 es la pata caminadora más grande (Fig. 46D). En el hemipene, el lóbulo distal es movable. Esta subfamilia integra 10 géneros de los cuales *Cytheridella* Daday, 1905 y *Metacypris* Brady & Robertson, 1870 se reconocieron en el país. *Cytheridella ilosvayi* fue una de las especies más comunes en el estudio, pero su distribución estuvo restringida a la península de Yucatán (Fig. 22). En la especie *Cytheridella* sp. 1, se precian importantes variaciones morfológicas con *C. ilosvayi*, por lo que podrían tratarse de una especie diferente, el análisis molecular permitirá dilucidar esta variación morfológica, esta especie se encontró en un único sistema del centro de la península de Yucatán (Fig. 22). Otra especie fue encontrada en el estado de Veracruz (*M. srisumoniae*) (Fig. 22, 46).

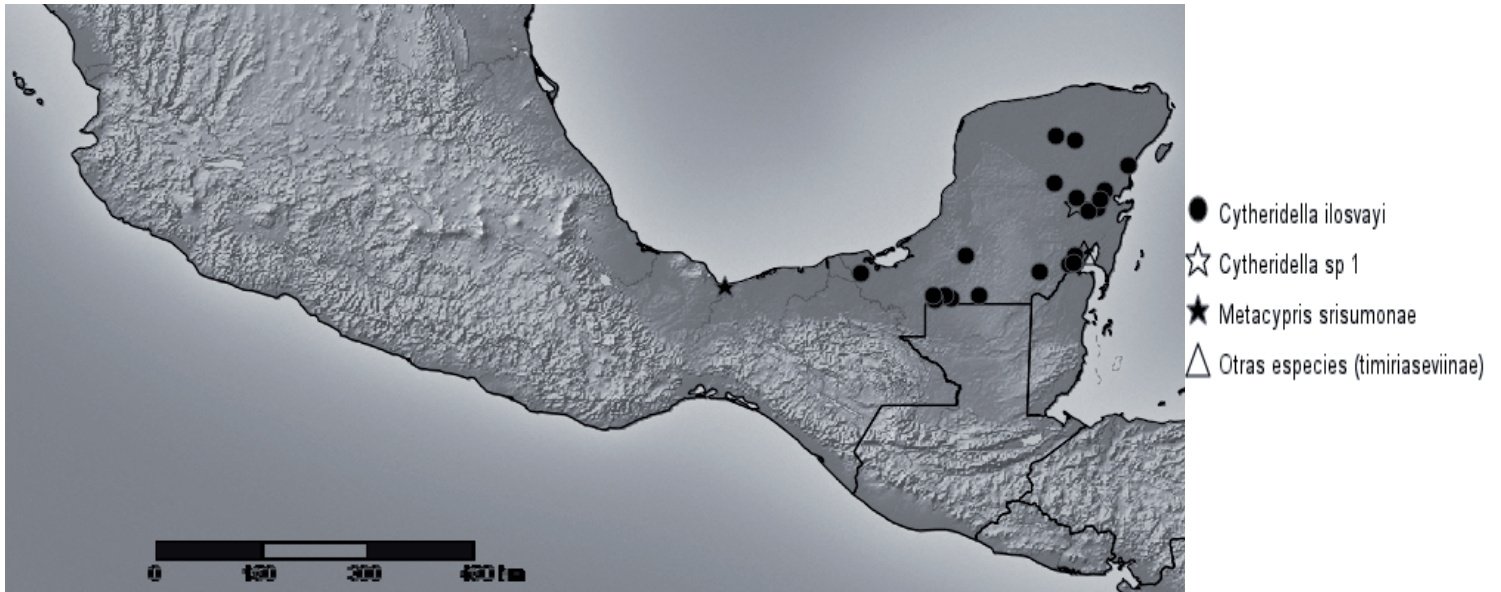


Figura 22. Mapa de distribución de especies integrantes de *Timiriasevinae*.

Análisis del ADN

Con el análisis de código de barras, fue posible obtener seis secuencias de *Cytheridella ilosvayi*, todas ellas colectadas en un mismo sistema del sur de la península de Yucatán, estas secuencias fueron comparadas con secuencias públicas en GenBank de especies de diferentes géneros y subfamilias pertenecientes a la superfamilia Cytheroidea (a la cual pertenece *C. ilosvayi*) y de distribución principal en Africa y Europa (Fig. 23).

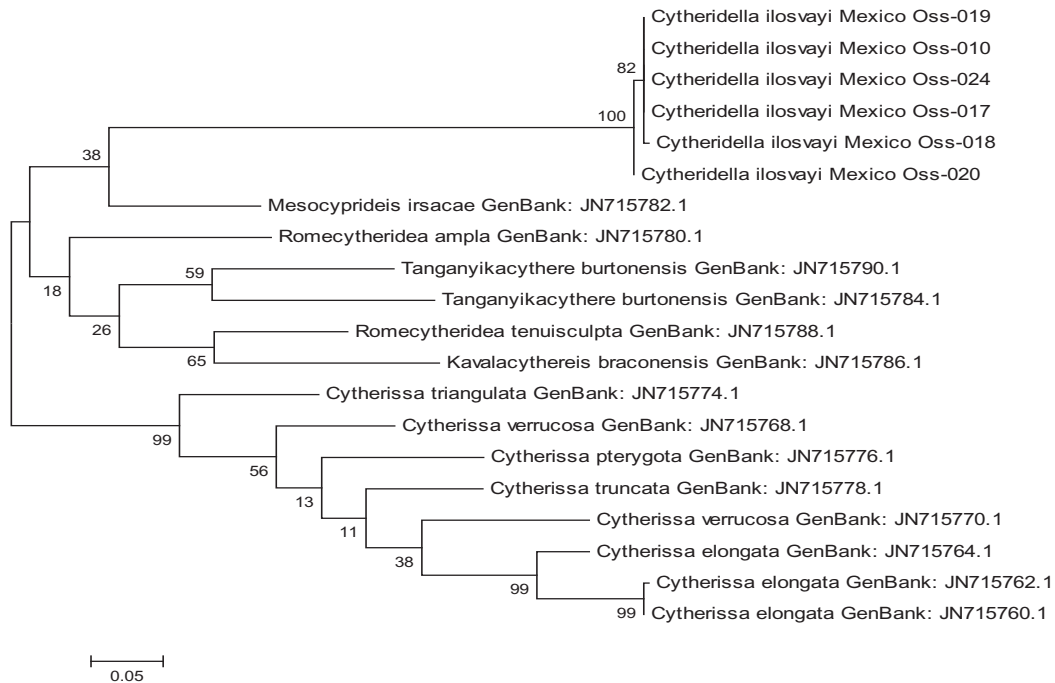


Figura 23. Árbol de identificación de especies integrantes de Cytheroidea.

Durante el presente trabajo, con el método de código de barras se obtuvieron 59 secuencias pertenecientes a 17 especies mexicanas y una sur coreana (Anexo 5). Esta podría considerarse una de las bases de datos más grandes y con mayor diversidad de especies que se ha realizado a nivel mundial para este grupo de organismos de aguas dulces. Para la familia *Darwinulidae* y las subfamilias *Cypridopsinae*, *Cyprinotinae*, y *Timiriasevinae*, fue posible comparar las secuencias obtenidas con secuencias disponibles en GenBank (pertenecientes a especies de diferentes partes del mundo), sin embargo para las subfamilias *Cyprettinae* y *Cyclocypridinae* no fue posible realizar dicha comparación molecular ya que no existen al momento secuencias disponibles en la base de datos con las que comparar. A continuación se presenta un árbol de identificación donde se comparan todas las secuencias obtenidas de especies mexicanas mas secuencias de *Cypria kraepelini* de Corea del Sur (Fig. 24), con este análisis se busca analizar particularmente la divergencia de las subfamilias *Cyprettinae* y *Cyclocypridinae* y determinar la diversidad molecular de los ostrácodos de la zona estudiada del país.

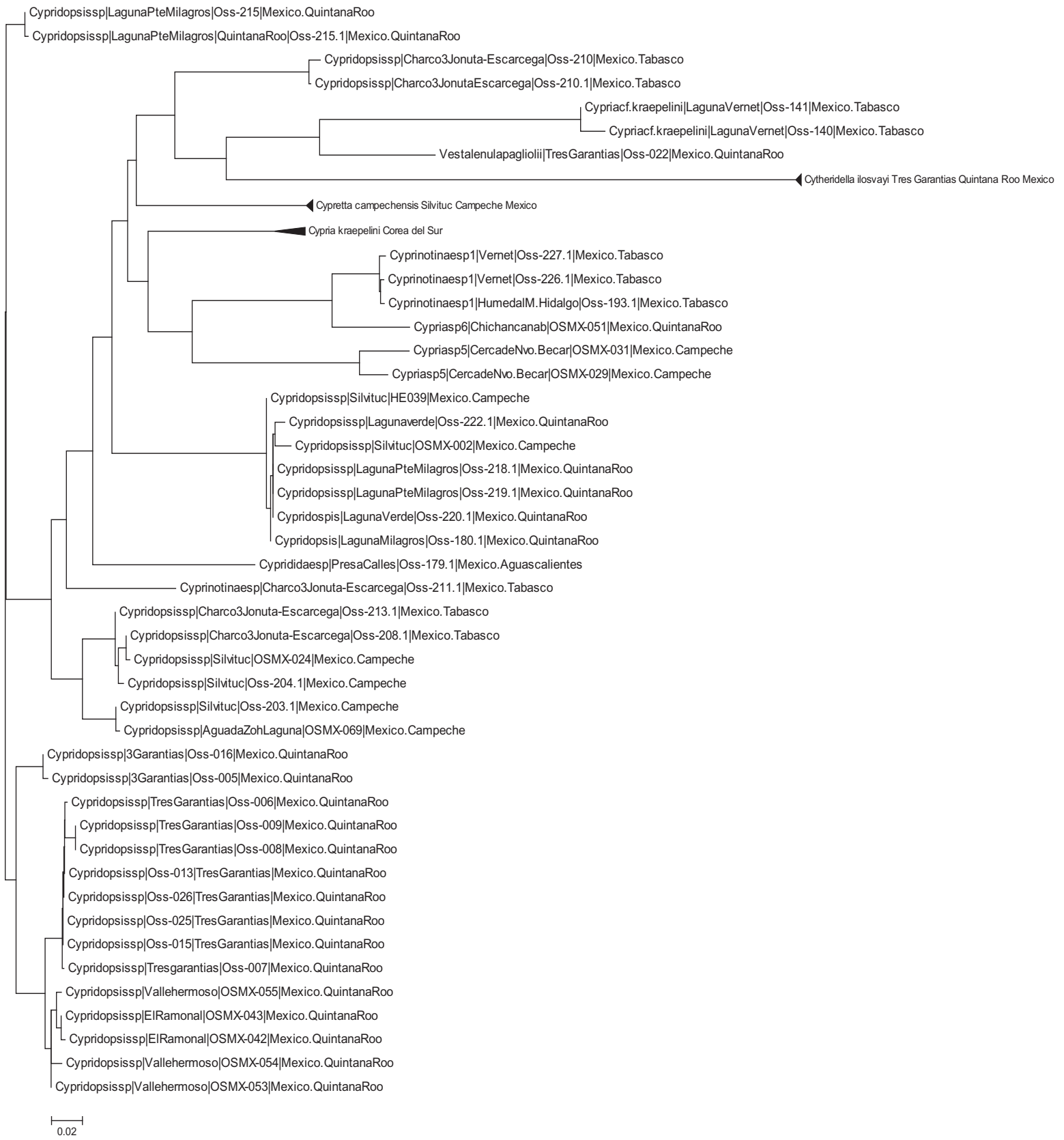


Figura 24. Árbol de identificación de especies mexicanas.

Discusión

Regiones en el País

En un principio se consideró como hipótesis que debido a la diferenciación climática y orográfica del país, se encontrarían dos zonas de distribución de ostrácodos (una en la zona neotropical y una en la zona de transición del continente) y que entre ambas zonas habría altas tasas de intercambio específico, ya que registros previos de ostrácodos sugieren que pueden ser organismos de amplia distribución y algunas especies cosmopolitas (Sohn 1987; Ferguson 1986; Martens & Behen 1994; Little 2005). El análisis de Ward (1963), nos permitió discriminar dos grupos principales que corresponden a dos zonas de distribución en el país (diferentes a las planteadas en la hipótesis) (Fig. 5): la península de Yucatán y el resto del país.

La primera zona, la Península de Yucatán (Fig. 5) mostró la mayor diversidad de ostrácodos, al encontrarse 41 especies (Tabla 1). La fauna que se encontró en esta región denota cierta afinidad con especies y géneros reportados en América del sur (Martens & Behen 1994; Higuti *et al.* 2009) tales como *Cytheridella* Daday 1905, *Alicenula* Rossetti & Martens 1998, *Vestalenula* Rossetti & Martens 1998, *Strandesia* Stuhlmann 1888, *Riocypris* Klie 1935, *Cypretta* Vávra 1895, *Chlamydotheca* Saussure 1858, *Neocypridopsis* Klie 1940, la mayoría sin registros previos para el norte del continente (*Vestalenula*, *Cytheridella*, *Riocypris*, *Neocypridopsis*), o bien con muy pocos representantes en esa región (*Chlamydotheca*, *Cypretta*, *Strandesia*, *Alicenula*). Dentro de esta zona, con el método de Ward (1963) se discriminaron nueve subgrupos con un 77% de similitud en la composición de ostrácodos de los sistemas.

Los subgrupos III, VI, VII, VIII, nos permiten inferir que parte de la fauna se distribuye homogéneamente en la región, ya que estos grupos están constituidos por sistemas del norte, centro y sur de la península. Esta tendencia muy clara, no es totalmente cierta, ya que solamente cuatro especies del total de 41 se distribuyen indistintamente desde el norte hasta el sur de la península y son: *Cytheridella ilosvayi*, *Cypridopsis vidua*, *Darwinula stevensoni*

y *Cypria pseudocrenulata*. Esto coincide con observaciones previas (Cohuo 2010), donde las especies con mayor distribución en la península fueron *Cytheridella ilosvayi* y *Cypridopsis vidua*, encontrándose además que estas especies habitaban juntas en la mayoría de los sistemas que se analizaron en ese trabajo, esto pudo influir en los resultados estadísticos.

Los subgrupos I y II, permiten determinar que existe una composición faunística particular en la región centro de la península, con las siguientes especies representativas: *Cypretta maya*, *Diaphanocypris meridana*, *Strandesia cf. elliptica*, *Chlamydotheca arcuata* y *Cypridopsis vidua*. Por su parte, los subgrupos IV, V y IX nos permiten discriminar faunas particulares hacia el centro-sur-sureste de la península. Por un lado los subgrupos IV (conformado por *Limnocythere cf. stationis*, *Typhlocypris cf. annae*, *Cypridopsis vidua* y *Cypria pseudocrenulata*) y IX (conformado por *Dolerocypris sp 1*, *Strandesia intrepida*, *Cytheridella ilosvayi*, *Cypretta campechensis*, *Cypretta spinosa*, *Vestalenula cf. pagliolii*, *Cypridopsis sp 3* y *Cypria gibbera*) mostraron mayor afinidad hacia el sur-sureste de la península. El grupo V, mostró mayor afinidad hacia el centro-sur, con las siguientes especies: *Cypria sp 2*, *Alicenula serricaudata*, *Cytheridella ilosvayi* y *Typhlocypris elliptica*.

Lo anterior sugiere, que en la zona centro-sur de la península existe una mayor diversidad de especies (en comparación con la zona norte). Esta diversidad y patrón de distribución fue observado previamente también por Cohuo (2010), quien señaló que en la zona norte, solamente se encuentran distribuidas 4 especies y en la región centro-sur, la diversidad fue mucho mayor, encontrándose 24. En aquel trabajo se postuló la posible existencia de un gradiente de diversidad, con menor número de especies al norte, pero incrementándose al centro y sur de la península de Yucatán. Las observaciones realizadas durante este trabajo coinciden con lo anterior y además sugieren que en la región sur pueden existir microregiones donde los ostrácodos se distribuyen de manera particular y única.

Es posible que la distribución de la fauna de ostrácodos con una diversidad mucho mayor hacia el sur-sureste de la península de Yucatán, se deba a la formación geológica de esta

región. Se considera que la península, es una placa de rocas calcáreas y evaporitas con suelos ricos en carbonatos de calcio (caracterizada por presentar sistemas acuáticos de origen cárstico), que emergió en diferentes periodos (Schmitter-Soto *et al.* 2002a). La región norte fue el último fragmento que emergió, en esta zona, existen principalmente cenotes, los cuales son sistemas ricos en CO² disuelto, con un pH con tendencia a la acidez, salinidad que va de 0.4 a 2.9, conductividad mayor a 600 µS/cm y en algunos sistemas existe también elevada concentración de sulfatos (Schmitter-Soto *et al.* 2002b). Por su parte en la región centro-sur, las condiciones físico-químicas son caracterizadas por una conductividad menor a 350 µS/cm y menor concentración de CO² disuelto lo que también modifica el pH (Tabla 2). Estas características junto con una historia geológica más prolongada podrían favorecer a la diversificación y por lo tanto una presencia de un mayor número de especies.

A la segunda zona, se le denominó “Resto del País”, porque dentro de este grupo estuvieron incluidos sistemas de todas las restantes regiones estudiadas. En esta zona se encontraron 34 especies. Con el método de Ward (1963) y con un 77% de similitud, fue posible discriminar 10 subgrupos (Figura 5) que corresponden a ciertas regiones geográficas del país que se discutirán a continuación.

Los subgrupos 1 y 2, se constituyeron por 24 sistemas localizados en el altiplano, más cerca de la zona de transición entre las regiones neártica y neotropical del continente. Incluye a los estados de Michoacan, Morelos, Estado de México y Puebla. Este grupo incluyó principalmente especies del género *Potamocypris* y *Limnocythere* además de especies como *Cyprinotinae* sp 2, *Cypridopsis* sp 1 y *Heterocypris* cf. *congenera*. Para ambos subgrupos, los géneros encontrados muestran mayor representación en el norte del continente, por lo que es posible establecer que esta zona tiene influencia importante de esta región. Otro aspecto importante es que el subgrupo 2, muestra una distribución mas restringida, los sistemas que la integran se encuentran distribuidos en la zona conocida como los llanos de Puebla, en particular los sistemas denominados como Axalapascos, donde se ha reconocido una gran cantidad de fauna endémica que incluye a peces (*Poblana alchichica*), corixidos (*Krizousacorixa tolteca*), isópodos (*Caecidotea Williamsi*) copépodos (*Leptodiptomus*

garciai) y diatomeas (*Cyclotella alchichicana*) (Alcocer & Hammer 1998; Hernández *et al.* 2010; Montiel *et al.* 2012) y recientemente se han demostrado procesos de adaptación local en rotíferos, que eventualmente podrían dar origen a procesos de especiación (Alcántara-Rodríguez *et al.* 2012). Esto sugiere que los axalapascos poseen, además de la fauna endémica de los grupos antes mencionados, tienen una fauna particular de ostrácodos, que debe ser analizada a detalle. Dentro de este trabajo se encontró a *Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco*, nueva especie perteneciente a esta región y se encuentra en proceso de descripción. Es posible que alguno de los factores que permiten la discriminación de estas dos zonas y por lo tanto la presencia de las especies antes mencionadas, sean la variabilidad climática (zona es templada con escasa precipitación pluvial 500-600 mm al año) y altitudinal (Alcocer & Bernal-Brooks 2010). Actualmente y adicional a lo anterior, los sistemas muestra altos grados de contaminación antropogénica (Arredondo 2002).

Los subgrupos 3 y 8 agrupan sistemas ubicados en los estados de Tabasco y sur de Veracruz, sistemas ubicados en las cuencas hidrológicas de los ríos Coatzacoalcos y Grijalva. En el subgrupo 3, la fauna encontrada fue *Diaphanocypris meridana*, *Cyprinotus unispinifera*, *Cyprinotinae* sp 1, *Dolerocypris* sp 2 y *Cypria* cf. *kraepelini*; para el grupo 8, las especies encontradas fueron *Cypridopsis* sp 2, *Cypria* cf. *kraepelini*, *Cypricercus* cf. *cuneatus* y *Cyprinotinae* sp 1. En estos sistemas, muchos de los géneros de la fauna encontrada fueron los mismos que los encontrados en la península de Yucatán y por lo tanto al igual que en esta zona, muestran mayor afinidad con America del sur. La fauna particular de esta región, pudiera ser el resultado de las características de los sistemas acuáticos y la adaptación de las especies a ellos, ya que muchos de estos sistemas son temporales y la mayoría muestran pulsos cíclicos de inundación, lo que provoca que tengan altos grados de oxido-reducción, acumulación de sodio y alta reintegración de nutrientes producto de las inundaciones (Hernández *et al.* 2007).

Los subgrupos 4 y 9, se componen de sistemas de la península de Yucatán. El subgrupo 4 (constituido por *Cyprinotus unispinifera*, *Darwinula stevensoni*, *Cytheridella* sp 1, *Cyprididae* sp 1, *Cypria* sp 1, *Chlamydotheca unispinosa*, *Chlamydotheca arcuata* y

Prionocypris cf. *longiforma*) mostró mayor afinidad hacia el centro-sur de la península y el subgrupo 9 (*Neocypridopsis yucatanensis*, *Cypria* sp 3 y *Candonidae* sp) mostró mayor afinidad con el sur-este de la península. Estos subgrupos complementan las observaciones previas, hacia una alta diversificación de la zona centro-sur de la península y a que dentro de esta zona existen patrones de distribución restringidos a microrregiones con características particulares.

El subgrupo 5, concentra sistemas de la región centro-norte de Veracruz, en la región considerada como planicies costeras del golfo y en las regiones hidrológicas norte de Veracruz y cuenca del Papaloapan (Alcocer & Bernal-Brooks 2010). Las especies pertenecientes a este grupo son *Metacypris* cf. *srisumoniae*, *Cypria* cf. *maculata*, *Cyprinotinae* sp 4, *Ilyocypris* sp y *Typhlocypris* sp 5. En esta región no se aprecia una tendencia clara de afinidad de las faunas hacia al norte o sur del continente, ya que los géneros *Cypria*, *Typhlocypris* y *Cyprinotinae* muestran distribuciones hacia ambos hemisferios (*Cyprinotinae* mayor presencia en el sur) (Martens & Behen 1994). Sin embargo debido a que *Ilyocypris* es un género con mayor representación y presencia en norte América (Karanovic 2012), es posible considerar que esta región es parte de la zona de transición en el continente y por lo tanto influenciada por ambas partes. Es posible que los factores que pudieran contribuir en la distribución de estas especies, sea la composición química de los sistemas, ya que están asociados con volcanes (depresiones, formaciones de lava) y formaciones calcáreas (Hernández *et al.* 2007).

El subgrupo 6, lo integran sistemas ubicados en los estados de Guerrero, Sur de Michoacan, y Colima, por lo que corresponderían a la vertiente del Pacífico. En estos sitios, se encontraron las siguientes especies: *Riocypris* sp, *Cyprinotinae* sp 6 (T2 sin d1, d2) (Placa 2F), *Bradleycypris* sp, *Cytheridae* sp., *Cypria* cf. *gibbera*. En esta región se observa mayor afinidad faunística hacia el sur del continente, ya que comparten la mayoría de los géneros encontrados con esta región, excepto *Bradleycypris*, que es un género reportado exclusivamente en Europa y Asia (Karanovic 2012). En esta región fueron pocos los sitios analizados y gran parte de las especies encontradas pudieran ser nuevas para la ciencia, por lo que su fauna debe ser analizada y caracterizada con más detalle.

El subgrupo 7, integra sistemas lóticos del norte de Chiapas, tributarios del río Usumacinta (río Tulijá y río Tzacone-há). En esta región las especies encontradas fueron *Vestalenula* sp 1, *Cypridopsis vidua* y *Candonidae* sp., especies afines a Centro y Sudamérica. En esta región los ostrácodos solo se encontraron en sitios donde la corriente de los ríos es mínima y donde se forman pozas naturales (ya sea dentro del mismo sistema o en sus inmediaciones), en ambos casos con condiciones oligotróficas. Alcocer & Bernal-Brooks (2010) sugieren que esta zona al igual que Tabasco y el sur de Veracruz, corresponden a la cuenca hidrológica del Grijalva-Usumacinta y por lo tanto con características hidrológicas similares. Sin embargo, es claro que la fauna presente en esta área, se encuentra influenciada en parte por las características de los suelos (Sierra de Chiapas), pero principalmente al comportamiento de los sistemas y muy posiblemente el tipo de depredadores y/o consumidores secundarios. Es posible señalar que la adaptación tan particular de estas especies pudiera ser un factor muy importante para su diversificación, por lo que preliminarmente es posible considerar (basado en el tipo de hábitat y sus características morfológicas) que al menos *Vestalenula* sp 1, es una potencial especie nueva a la ciencia de esta región.

El subgrupo 10, no permitió observar un patrón definido en cuanto a regiones geográficas, ni composición de especies con un 77 % de similitud, por lo que el análisis de este subgrupo se realizó con un 87% de similitud. Resultado de lo anterior, fue posible discriminar 3 subgrupos, el primero (I) está integrado por sistemas y especies distribuidas exclusivamente en Isla Mujeres, Quintana Roo (*Cyprinotinae* sp 3); el segundo subgrupo (II), se integra por una especie del centro de la península de Yucatán (*Cyprinotinae* sp 5) y el tercer grupo (III) presenta sistemas del estado de Veracruz (*Typhlocypris* sp 1, *Cypria* sp 2). Los tres grupos muestran faunas únicas. El grupo I y II presentan solamente una especie cada uno y el grupo III es el único que combina dos especies. Esta distribución observada puede derivarse de adaptaciones locales de los individuos o características únicas en estos sistemas.

Entre las zonas reconocidas del país, (tanto los grupos principales como los subgrupos) se observó que prácticamente no existe intercambio específico, a excepción de especies como *Cypridopsis vidua* (Müller 1776), *Cyprinotus unispinifera* Furtos 1936, *Chlamydotheca unispinosa* (Baird 1862) y *Diaphanocypris meridana* (Furtos 1936). Estas cuatro especies son reconocidas como organismos de amplia distribución, ya que han sido registradas también en el sur del continente (Martens & Behen 1994). *Cypridopsis vidua* (Müller 1776) es considerada además cosmopolita (Yozzo & Steineck 1994), tolerante y adaptable a gran variedad de condiciones físico-químicas de los sistemas (Meisch 2000).

Con todo lo anterior, podemos considerar que las características físico-químicas de los sistemas pudieran ser las responsables de la distribución de las faunas de ostrácodos en el país. Sin embargo es necesario realizar otro tipo de estudios que establezcan una relación entre el ambiente, parámetros físico-químicos y biología de cada sistema para concluir adecuadamente sobre este tema. El presente trabajo provee la base taxonómica fundamental para estudios más detallados que consideren estos aspectos ecológicos.

Distribución de las especies

La familia Cyprididae Baird, 1845 es la más diversificada dentro del grupo de los ostrácodos (Karanovic 2012). En México, la mayoría de las especies encontradas pertenecen a esta familia.

Cyprididae sp 1 de Bodegas 2 (Placa 2C), no pudo ser identificada dentro de un género determinado, debido a que demostró características particulares en el UR. Este presenta la seta anterior fuertemente desarrollada, a manera de uña, la seta posterior está ausente y la uña posterior se encuentra en forma setiforme. El UR es un carácter determinante para separar los géneros y de acuerdo a las características esta especie, tendría relación cercana con la subfamilia Rudjakoviellinae Triebel 1973 (UR delgado con solo una uña terminal y la otra reducida a seta, seta posterior corta), sin embargo las características tanto de UR como de los otros apéndices y estructuras (valvas terminando en grandes espinas en porción anterior y posterior) en esta subfamilia, no se ajustan claramente a esta especie, por lo que se clasifica preliminarmente a nivel de familia, en espera de contar con un mayor número de especímenes (sobre todo machos) para definir su posición taxonómica. No se descarta la

posibilidad de que se trate de una nueva especie y un posible nuevo género. En la figura 6, se muestran también sitios donde se encontraron valvas libres de especies pertenecientes a esta subfamilia, sin embargo es necesario contar con las partes blandas para asignarles una correcta identificación a nivel de especie.

La subfamilia *Cyprettinae* Hartmann 1964 es considerada como tropical, aunque es posible encontrar integrantes en regiones templadas (Sohn & Kornicker 1972). En el continente, la mayoría de las especies han sido descritas en el norte (principalmente Florida), cuatro en Sudamérica y dos en las islas caribeñas. En el país esta subfamilia está representada por tres especies descritas como nuevas para la ciencia durante este trabajo, *Cypretta maya* n. sp.; *Cypretta spinosa* n.sp. y *Cypretta campechensis* n. sp. (Cohuo-Durán *et al.* sometido), las tres se encontraron restringidas a la península de Yucatán (Fig. 7). *Cypretta campechensis* n. sp. se encontró estrechamente relacionada con especies de Florida y Carolina del Norte (especies en las que LV sobrelapa RV) como *C. nigra* Furtos 1936, *C. brevisaepta* Furtos 1934 y *C. bilicis* Furtos 1936, pero la especie mexicana demostró una estructura peculiar, que puede ser considerada como un nuevo carácter taxonómico dentro del género. Se trata de una serie de dentículos en el margen interior presentes, en vez de los canales en forma de embudo característicos de este género. Es necesario revisar si otras especies de Centro América presentan esta característica, con lo que se pudiera establecer un nuevo linaje dentro del grupo. *Cypretta spinosa* n. sp. se encontró relacionada con especies del Norte y sur del continente como *C. intonsa* Furtos 1936 y *C. vivacis* Würdig & Pinto 1993, pero también se encontró relacionada con especies de Australia e Islas del Sureste Asiático como *C. obfusata* Victor & Fernando 1981 and *C. raciborskii* (Grochmalicki 1915), sin embargo esta especie se diferenció claramente por la fuerte ornamentación de sus valvas (espinas y abundantes setas). La última especie *Cypretta maya* n. sp., se relaciona directamente con especies de las islas del sureste asiático, Australia y el Norte de la India, especies que presentan el astetasco de la A2 tri-segmentado. En particular se relaciona estrechamente con *C. hirsuta* Henry 1923, *C. longidactyla* Victor & Fernando 1981 y *C. patialensis* Battish 1982. Esta relación puede deberse a un origen común de las especies cuando los continentes se encontraban unidos y los procesos de especiación ocurrieron luego de la separación de las grandes masas continentales, sin embargo se siguen manteniendo los

caracteres ancestrales de estas especies. Las tres especies reconocidas en el país son las primeras que se describen para Mesoamérica (región que incluye a la península de Yucatán) y representan un eslabón entre las faunas de norte y sur del continente. Las secuencias obtenidas de *Cypretta campechensis* n. sp. son las primeras que se obtienen a nivel mundial para este género.

La subfamilia *Cypricerinae* McKenzie 1971 está representada en el país por 4 especies distribuidas en la región sur y la Península de Yucatán (Fig. 8). Esta subfamilia está caracterizada por poseer especies tropicales y la mayoría de los géneros que la integran están distribuidos en las regiones sureñas del planeta (excepto *Bradleystrandesia* Broodbakker 1983 y *Spirocypris* Sharpe 1903). La especie mejor representada en el país es *Strandesia intrepida* Furtos 1936, potencialmente endémica de la península de Yucatán ya que no ha sido registrada fuera de esta región. El único registro fuera de México se realiza en el lago Petén Itzá al norte de Guatemala (Pérez *et al.* 2010). Sin embargo esta zona pertenece geográficamente a la península de Yucatán. Por otro lado *Diaphanocypris meridana* (Furtos 1936), perteneciente a esta subfamilia, se encontró habitando desde la Península de Yucatán hasta Tabasco, su distribución previamente reconocida es amplia en el continente, ya que ha sido registrada en Sudamérica (Martens & Behen 1994). Los registros de esta especie en la región sur del país podrían sugerir que éste es el límite norte de su distribución. Sin embargo es importante señalar que las especies reconocidas en Sudamérica necesitan ser revisadas con mayor detalle.

Strandesia cf. *elliptica* y *Cypricerus* cf. *cuneatus* mantienen cierta incertidumbre taxonómica ya que se encontraron variaciones en cuanto a las descripciones originales en cada una de estas especies, además de diferencias geográficas importantes como en el caso de *C.* cf. *cuneatus* que es una especie previamente registrada en África. Es necesario comparar con materiales tipo para comprobar sin dudas las identidades de estas especies. La especie nombrada como *Bradleycypris* sp. es potencialmente nueva para la ciencia, aunque es necesario contar con un mayor número de organismos para definir claramente su estatus.

La subfamilia *Cypridinae* Baird, 1845, estuvo representada por 2 especies pertenecientes al género *Chlamydotheca*. *Chlamydotheca* es un género endémico del continente Americano, *Chlamydotheca unispinosa* y *Chlamydotheca arcuata* son especies con amplia distribución en el continente siendo reportadas en diferentes sitios de América del Sur (Martens & Behen 1994; Torres & Martínez 2010; Karanovic 2012). La distribución de este género en México es conocida desde el norte con *C. mexicana* (Durango), hasta el sur con *C. azteca* (Veracruz) y *C. unispinosa* (Yucatán). *Chlamydotheca arcuata* es un nuevo registro para el país (Fig. 9).

La subfamilia *Cypridopsinae* Kaufmann, 1900, es una de los grupos más diversificados dentro de la familia a la que pertenece, sin embargo en el país solo son tres los géneros identificados, *Neocypridopsis* restringido a la Península de Yucatán (Fig. 10), con *N. yucatanensis* que al parecer es una especie endémica de la región (nunca ha sido registrada fuera de ella). El género *Potamocypris* se encontró exclusivamente de la región centro del país (Fig. 10) con 5 especies, de las cuales *Potamocypris* cf. *dadayi* y *Potamocypris* sp 1, mantienen cierta incertidumbre taxonómica. En el caso de la primera especie, podría resolverse con el análisis de los machos o la comparación con material tipo. La segunda especie (*Potamocypris* sp 1) estuvo representada solo por ejemplares muy dañados y los apéndices parcialmente desintegrados, sin embargo características de las valvas nos permiten separarla como especie diferente a las reconocidas en el país. Es necesario un nuevo muestreo para capturar organismos vivos. El género *Cypridopsis*, estuvo integrado por *Cypridopsis inaudita* y *Cypridopsis vidua*. La primera especie se encontró restringida a la península de Yucatán y la segunda especie se encontró ampliamente distribuida, siendo la única presente en las casi todas las zonas de distribución reconocidas del país (Fig. 10). Esta especie se considera cosmopolita y adaptable a gran variedad de condiciones físico-químicas de los sistemas, esta adaptabilidad implica una variabilidad morfológica de los individuos, que requiere un cuidado especial al analizarla (Meisch 2000). En México, en algunos de los sistemas analizados fue posible apreciar esta variación en valvas y partes blandas, por lo que se decidió reconocer cuatro grupos comprendidos en *C. vidua* s.l. (*Cypridopsis* sp 1, *Cypridopsis* sp 2, *Cypridopsis* sp 3, *Cypridopsis* sp 4). De acuerdo a las características morfológicas observadas. *Cypridopsis* sp 1, son organismos pequeños con

valvas comprimidas y poca ornamentación, esta especie la encontramos en las lagunas de Zempoala, al centro del país. *Cypridopsis* 2, son organismos con tamaño mayor en comparación con los de la península de Yucatán y Zempoala, éstos se encuentran distribuidos en el estado de Tabasco y Campeche. *Cypridopsis* sp 3, son organismos pequeños con fuerte ornamentación (setas en las valvas) y tubérculos en región posterior y anterior en valvas. Se encontraron solamente en el sur del estado de Campeche. *Cypridopsis* sp 4, son organismos pequeños, con pocos tubérculos en la región posterior y una ornamentación escasa. Se encontró solamente en los cenotes del norte de la península de Yucatán. Las demás especies que no mostraban variaciones importantes en valvas y partes blandas fueron nombradas *C. vidua*, siguiendo el punto de vista de Meisch (2000). Furtos (1936) realizó observaciones similares sobre la variabilidad de *C. vidua* en la península de Yucatán y Estados Unidos, a partir de lo cual describió a *Cypridopsis viduella* y *Cypridopsis okeechobei* ambas actualmente consideradas como sinónimos (a nivel morfológico) de *C. vidua* (Martens & Savatentalinton 2011), es preciso ser muy cuidadoso con el análisis de estos organismos y estudiarlos ampliamente a nivel morfológico y molecular para concluir adecuadamente sobre su situación taxonómica ya que hasta el momento este grupo indica un reto taxonómico.

La subfamilia *Cyprinotinae* Bronshtein, 1947 estuvo representada en gran parte de los sistemas analizados. Los géneros encontrados fueron *Riocypris*, *Cyprinotus* y *Heterocypris* (Fig. 12). En cuanto a *Riocypris*, las dos especies encontradas, presentaron ciertos caracteres diferentes a las especies descritas. Por un lado *R. cf hinzeaze*, mostró ciertas diferencias en las valvas y el UR con respecto a la descripción original de esta especie, cuya localidad tipo se encuentra en Australia. Es necesaria la comparación con el material tipo, aunque es muy probable que en realidad se trate de una especie diferente y posiblemente nueva como lo proponemos para la segunda especie identificada dentro de este género. En el género *Cyprinotus*, solo *C. unispinifera* fue encontrada, con distribución desde la península de Yucatán hasta el sur del estado de Veracruz.

Además de estas especies, seis más fueron identificadas como parte de esta subfamilia (*Cyprinotinae* Sp 1-6), al compartir características comunes, principalmente con *Heterocypris*. Sin embargo no se les pudo asignar un nombre definitivo dentro de éste u

otro género similar, porque como se mencionó anteriormente, una de las características de los géneros de este grupo es la presencia de al menos una seta (d1 o d2) en la segunda pata caminadora (T2). El material mexicano, no presentó ninguna seta en el protópodo de este apéndice. Por su parte, *Heterocypris putei* (Furtos 1936), fue originalmente descrita para el norte de la Península de Yucatán. La descripción y esquemas originales no mencionan nada sobre el protópodo (sitio de presencia de las setas d1 o d2) en este segundo apéndice caminador (T2). Sin embargo, los demás caracteres taxonómicos permitieron asignar nuestro material como *H. putei* y pudimos establecer que esta especie también carece de ambas setas (d1 y d2) en la pata T2. Con esto podemos establecer que esta especie pertenece al grupo antes mencionado, sin embargo es necesaria una comparación con el material tipo para comprobar las observaciones realizadas en este trabajo. Preliminarmente podemos establecer que estas 7 especies pertenecen a un linaje diferente dentro de la subfamilia. Sin embargo esta conclusión es preliminar y requiere de una revisión taxonómica detallada de estas especies, así como determinar otros caracteres morfológicos y moleculares comunes entre ellas para erigir un posible género nuevo que integre a estas especies.

La subfamilia *Eucypridinae* Bronstein 1947, estuvo representada en el país por un género que actualmente integra tres especies distribuidas en Norteamérica, Europa y Nueva Zelanda. La especie identificada en el sur de Quintana Roo, muestra una relación estrecha con *Prionocypris longiforma*, sin embargo debido a lo pobre de la descripción original, no ha sido posible determinar con claridad si el material de México corresponde a la misma especie registrada en Norte América.

Dentro de la familia *Candonidae* Kaufmann 1900, la subfamilia *Candoninae* estuvo representada por un solo género, *Typhlocypris*. Este género está dividido en 4 subgrupos de especies de acuerdo a sus características morfológicas (Karanovic 2003): *T. eremita*, *T. caribbeana*, *T. rostrata* y *T. prespica*. Cada uno está relacionado con ciertas regiones geográficas a nivel mundial. En el país todas las especies reconocidas pertenecen al subgrupo *T. caribbeana* s.l., debido las siguientes características: valvas trapezoidales o reniformes sin asimetría importante en vista lateral; el palpo mandibular, con el grupo de

setas compuesto por 3 + 2 setas. En la pata T3 están presentes 4 segmentos y la uña Th1 es 2.5 veces tan larga como el segmento terminal. Inicialmente podemos establecer que la fauna de México perteneciente a este grupo y tiene relación con la especies encontradas en la región centro del Continente e islas caribeñas.

En el país se reconocieron siete diferentes morfotipos, sin embargo para los integrantes de este género, las estructuras del macho son el caracter taxonómico más importante para diferenciar especies. Solo se obtuvieron machos para dos especies, una de ellas *T. cf. annae* (Fig. 27) mostró diferencias en el hemipene y apéndices en relación a la descripción original, por lo que se requiere de comparación directa con el organismo tipo. Para cinco especies no fue posible encontrar machos, sin embargo las características de valvas y apéndices permitieron determinar que estas cinco especies eran diferentes, sin embargo se requiere de los machos para tomar una decisión definitiva con estos organismos.

La subfamilia *Cyclocypridinae* Kaufmann 1900, estuvo muy bien representada en el país con 12 especies. *Keysercypria xanabanica* (Placa 3P), *Cypria gibbera* y *Cypria pseudocrenulata* fueron las únicas especies claramente identificadas, las últimas dos estuvieron presentes en más de un sistema, sin embargo los individuos de diferentes poblaciones demostraron diferencias morfológicas por lo que se les denominó *C. cf. gibbera* y *C. cf. pseudocrenulata*. Otras seis especies no pudieron ser identificadas debido a falta de machos, a tres de ellas se les asignó nombres provisionales, siguiendo las claves propuestas por Karanovic (2011, 2012). Otras dos especies, *Cypria* sp 2 y *Cypria* sp 3 son especies con potencial de ser nuevas para la ciencia. Ambas pertenecen a la península de Yucatán. *Cypria* sp 1 no pudo ser identificada plenamente debido a que los organismos analizados se encontraban sin partes blandas o en proceso de descomposición muy avanzado, por lo que se requieren nuevos muestreos que contengan material fresco al momento de la recolecta.

La subfamilia *Paracypridinae* Sars 1923, es un grupo donde la mayor parte de los integrantes pertenecen al ambiente marino. En agua dulce la información existente sobre este grupo es confusa y dificulta la separación de géneros con claridad (Karanovic 2012).

Derivado de lo anterior son pocas las especies que han sido descritas en estos ambientes. En el país son dos las especies encontradas, una del sur de Quintana Roo (Bacalar) y otra del norte de Tabasco (Cerca de la desembocadura del río Coatzacoalcos).

La familia *Ilyocyprididae* Kaufmann 1900 es una familia que comparte características con *Cyprididae* y *Cytheridae*. Por esta razón se considera un grupo intermedio entre estas dos familias. En el continente americano ninguna especie ha sido descrita, aunque se han registrado *I. gibba* (Ramdohr 1808) e *I. brady* Sars 1890 para el norte y sur respectivamente (Delorme 1970; Martens & Behen 1994). La mayoría de las especies conocidas corresponden a Europa y Asia (Karanovic 2012). En el país, la especie encontrada no corresponde a *I. gibba*, ni a *I. brady*, y sus características no permiten que sea identificada como una especie previamente descrita. Preliminarmente es posible considerar que se trate de una nueva especie, aunque debido al escaso número de organismos recuperados de la muestra original no es posible realizar una descripción formal. De confirmarse podría ser la primera especie descrita en el país y posiblemente un microendémico, al encontrarse solo en un sistema al norte de Veracruz (Fig. 18).

La familia *Darwinulidae* Brady & Robertson 1885, es un grupo de organismos que muestra características primitivas y es reconocido que sus integrantes son exclusivamente asexuales (Martens *et al.* 2005), aunque en algunas poblaciones, principalmente de Asia, se han registrado machos, causando cierta controversia respecto a este punto (Smith *et al.* 2006). En el país, tres de los cinco géneros reconocidos a nivel mundial están presentes: *Vestalenula* Rossetti & Martens 1998, *Alicenula* Rossetti & Martens 1998 y *Darwinula* Brady & Robertson 1885 (Fig. 19). La especie *Darwinula stevensoni* es conocida por su capacidad de colonizar diferentes ambientes y ser cosmopolita (Sohn 1987; Meisch 2000). Esta fue la especie que mostró mayor distribución en la zona de estudio, con presencia principalmente en la península de Yucatán, aunque también en el centro del país. Otros reportes de esta especie en el país, se han realizado en el lago cráter La Preciosa, Puebla (Juárez 2005) y en Aguascalientes (López 2007).

En cuanto a *Vestalenula* y *Alicenula* son géneros que se han registrado exclusivamente en el sur del continente (Pinto *et al.* 2003; Higuti *et al.* 2009). Con estos registros se extiende

su ámbito de distribución y podrían significar el límite de distribución máximo de estas especies hacia el norte del continente. *Vestalenula* cf. *pagliolii* y *Vestalenula* sp 1 no fueron identificados a nivel específico debido a que la primera especie presentó cierta variabilidad con respecto a la descripción original. Meisch (2000) señala que para esta familia no existe una variabilidad importante más allá de la reducción del tamaño de los organismos, por lo que es necesario un análisis morfológico y molecular detallado para determinar si es la misma especie o si se trata de especies diferentes. Por otro lado *Vestalenula* sp1, perteneciente a la región norte de Chiapas (Misol ha, Palenque, Agua Azul) y es considerada aquí una especie potencialmente nueva ya que sus características no son compartidas con las previamente descritas.

La familia *Limnocytheridae* Klie 1938 es una familia que integra especies marinas y dulceacuícolas, algunas de ellas tolerantes a altos rangos de salinidad pues pueden colonizar ambientes salinos y sistemas dulceacuícolas (Yin *et al.* 1999; Meisch 2000). En el país se reconocieron dos subfamilias *Limnocytherinae* Klie 1938 y *Timiriasevinae* Mandelstam 1960.

La subfamilia *Limnocytherinae* estuvo integrada por 4 especies, dos de ellas no pudieron ser identificadas con certeza. La primera fue *L.* cf. *stationis*, originalmente descrita en la Republica Checa. El material de México mostró solamente una reducción en tamaño en comparación con la descripción original. No fue posible apreciar en detalle otras diferencias, sin embargo los óstracodos al parecer no se distribuyen tan ampliamente. De confirmarse el estatus taxonómico de esta especie es posible que se trate de una introducción por actividades humanas al centro de Quintana Roo. Estas posibles invasiones desde Europa ya ha sido posible documentarlas con técnicas moleculares en el grupo de los rotíferos (García-Morales & Elías-Gutiérrez, en prensa). La segunda especie con incertidumbre taxonómica es *L.* cf. *fribilis*. Para esta especie es necesario contar con machos, los cuales no estuvieron presentes en las muestras recolectadas.

Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco n. sp. (Fig. 28-30), es una especie de Puebla y fue descrita durante esta trabajo. En breve se someterá la publicación formal del nombre. Las características principales que permitieron separarla del resto de las especies descritas,

fue que en las valvas, el alae se encontró bien desarrollado y transformado en espina. En las hembras la región posterior estaba dirigida hacia abajo y en la superficie de valvas se apreciaban una serie de proyecciones como ornamentación. En partes blandas, la A1 presentó la mayor parte de las setas bifurcadas distalmente. La pata T3 de la hembra se encontró con 5 segmentos y con la seta “dp” reducida. En machos este apéndice se encontró con 4 segmentos, el último fusionado con la uña que es elongada y muy larga, la seta “dp” se encontró elongada y fuertemente desarrollada, expandida en la región basal. El hemipene muestra el lóbulo distal triangular y corto, el ramo superior y el proceso prensil bien desarrollado. En machos el UR se encontró bien desarrollado con la seta fl transformada en una uña fuertemente desarrollada. En las hembras, el área genital presenta forma de cono. Dentro de la fauna descrita, son tres las especies que muestran estrecha relación con esta especie, las tres pertenecientes al Norte del continente: *Limnocythere verrucosa* Hoff 1942; *Limnocythere posterolimba* Delorme 1967 y *Limnocythere itasca* Cole 1949, comparten el hemipene con el ramo superior y el proceso prensil bien desarrollado. Sin embargo *L. axalapasco* se diferencía claramente de *L. verrucosa* por las estructuras del hemipene. En la primera especie el lóbulo distal es triangular y corto. En *L. verrucosa* este lóbulo es triangular pero prominente y el ramo superior aunque elongado, esta distalmente dirigido interiormente. *L. axalapasco* carece de estos caracteres. Por otro lado, las valvas de *L. verrucosa* presentan grandes protuberancias que se extienden lateralmente mas allá de los márgenes. Estas protuberancias están ausentes en la especie de México.

L. posterolimba difiere de *L. axalapasco* n. sp. principalmente en el hemipene. En la primera, el ramo superior esta elongado pero solo sobrepasando el margen dorsal, en la segunda este ramo está mucho más extendido de este margen; En cuanto al proceso prensil está proyectado hacia adentro en *L. posterolimba* y en *L. axalapasco* n. sp. está proyectado distalmente hacia afuera. Por último, las valvas de *L. posterolimba* muestran una depresión en la región posterior y un flange bien desarrollado posteroventralmente, ambas características se encuentran ausentes en *L. axalapasco* n. sp.

Limnocythere itasca y *L. axalapasco* difieren en los caracteres del hemipene. En *L. itasca* el ramo superior es elongado y distalmente redondeado, pero está dirigido hacia el lóbulo

distal que es subcuadrado y con los extremos ampliamente redondeados. Contrariamente *L. axalapasco*, tiene el ramo superior dirigido hacia la unión del margen dorsal y el lóbulo distal, que es triangular y corto. Entre estas dos especies, el proceso prensil también difiere. En *L. itasca* está proyectado hacia arriba distalmente y en *L. axalapasco* está dirigido hacia afuera. En el mismo órgano el UR está fuertemente desarrollado en *L. axalapasco* y la seta fl transformada en uña contrariamente en *L. itasca* el UR no está fuertemente desarrollado y la seta fl no se encuentra transformada en uña.

En cuánto a las especies Europeas dentro de este género (descrito en Europa), existen diferencias importantes con respecto a las especies americanas, la descripción de *L. axalapasco* incluye nuevos caracteres taxonómicos que permitirán diferenciar entre faunas y establecer con claridad la separación entre géneros americanos (*Limnocytherina*) y europeos (*Limnocythere*).

La subfamilia *Timiriasevinae* Mandelstam 1960 estuvo integrada por 3 especies (Fig. 22), dos de ellas fueron reconocidas dentro del género *Cytheridella*; *Cytheridella ilosvayi* fue descrita de América del sur y el registro de esta especie no va más allá de América central (Pérez *et al.* 2010). Con el mapa de distribución actual fue posible determinar que probablemente su máximo rango de distribución al norte del continente es la península de Yucatán, donde se encontró ampliamente distribuida.

Un grupo de especímenes pertenecientes a este género no fue posible asignarlos a *C. ilosvayi*, por presentar diferentes patrones de longitud y setulación de las setas, además de la variación en forma-tamaño de las valvas. Furtos (1936) describió a *Metacypris americana* de la Península de Yucatán pero no fue posible asignarla a esta especie tampoco, por lo que se puede considerar que estos organismos representan potencialmente una nueva especie. Para confirmar esta hipótesis es necesario recolectar más organismos, complementar los análisis morfológicos con un análisis molecular y contar con especímenes machos, ya que puede tratarse también de cierta variabilidad de *C. ilosvayi*.

Por su parte *Metacypris cf. srisumona* mantiene cierta incertidumbre taxonómica, ya que no comparte todas las características con la especie original, que fue descrita en Tailandia,

es necesaria la comparación, como en la mayoría de los casos, con el material tipo y no se descarta la posibilidad de que se trate de una nueva especie.

Finalmente Martens *et al* (2008) señala que en la zona Neotropical del Continente americano existen 275 especies conocidas de las cuales hasta el 84% de ellas podrían ser endémicas. Tomando en consideración esta aseveración, en la región estudiada de México, estaría distribuido el 25% de la fauna Neotropical de Ostrácodos de América, sin embargo tal como lo indicaron Martens (2008) y luego Karanovic (2012). Este número de especies es en realidad el reflejo del poco trabajo con Ostrácodos en el continente y de ninguna manera representa la posible diversidad real de la zona. De hecho, este trabajo tampoco podría considerarse como definitivo para caracterizar la fauna del Centro-sureste país, ya que tal como se ha venido puntualizando se requiere de una serie de muestreos continuos en tiempo y espacio en las distintas zonas del país, así como un análisis integral de las especies a nivel morfológico y molecular.

Por esta razón, se considera que este estudio ofrece un primer acercamiento a la diversidad de los ostrácodos en México y revela que esta región es una de las zonas más diversificadas del planeta, con una serie de especies que además de ser nuevas para la ciencia podrían tratarse de endemismos, lo que daría un carácter único a los cuerpos de agua donde se han encontrado

Código de Barras

El análisis de código de barras dio como resultado 59 secuencias pertenecientes a 17 especies mexicanas y una Sudcoreana (Fig. 24). No fue posible la amplificación del gen COI para todas las especies, debido a que primeramente existe un problema con la fijación (Elías-Gutiérrez, com. pers.). Esto ocurre porque los organismos al sentir el etanol, cierran herméticamente sus valvas, no permitiendo la entrada del fijador. Es posible que se requiera relajarlos primeramente y después proceder a la fijación. En segunda instancia, al parecer los oligonucleótidos requieren de un diseño aún más particular (Prosser, com. pers.). Este

problema ha impedido que muchos laboratorios obtengan siquiera una secuencia válida (Karanovic, com. pers.).

Esta problemática se ha ido resolviendo, por ejemplo, en el caso de la fijación de las muestras, se realizó inicialmente en campo agregando directamente el alcohol sin un reemplazo de toda el agua y manteniéndolo a temperatura ambiente. Como se observó que los resultados para obtener secuencias del material no fueron los mejores, se procedió a la fijación de las muestras eliminando toda el agua y siendo sustituida por etanol al 96% y pasándolas inmediatamente a hielo durante su transporte al laboratorio, donde fueron conservadas a -20°C. Esto dio resultados parcialmente positivos con un 20.4% de éxito, mejorando los resultados anteriores del 8-10% de éxito, obtenidos con el método anterior.

Adicionalmente se trabajó con diferentes oligonucleótidos (Folmer, Folmer extendidos, primers publicados para especies marinas y primers degenerados diseñados durante este trabajo) para tratar de amplificar el gen y los resultados tampoco fueron concluyentes. Se trabajó también en la modificación de los parámetros de PCR usando parámetros establecidos y parámetros optimizados para rotíferos y los resultados tampoco nos permitieron resolver el problema en su totalidad.

Algunos autores han sugerido que un método para resolver el problema es el diseño de oligonucleótidos especie-específicos (Schon *et al.* 1998; Bode *et al.* 2010) aunque esto incrementa de manera muy significativa los costos de trabajar con el grupo. Una posible solución sería el diseño de nuevos oligos con cierto grado de degeneración (usándolos anidados) y la optimización de parámetros de PCR hasta lograr la amplificación del gen, aunado a la nueva forma de fijación descrita. Pero la optimización de todos estos protocolos queda fuera de los objetivos de este trabajo, debido principalmente a limitaciones presupuestales y de tiempo, por lo que deberá ser abordado en un futuro próximo.

Pese a lo anterior, 55 secuencias se obtuvieron de especies mexicanas, pertenecientes a la familia *Darwinulidae* y las subfamilias *Cypridopsinae*, *Cyprinotinae*, *Timiriasevinae*, *Cyprettinae* y *Cyclocypridinae*. Para la familia *Darwinulidae* y las subfamilias

Cypridopsinae, *Cyprinotinae* y *Timiriasevinae*, se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank. A continuación se discuten los resultados de dicho análisis, para los cuatro grupos antes mencionados.

Para la familia *Darwinulidae*, la comparación de las secuencias obtenidas, nos permitió obtener resultados muy consistentes, ya que se observó una separación muy clara de las especies con más del 5% de divergencia (Fig. 20). La especie *Vestalenula pagliolii* de México, se ubicó dentro del grupo que representa al género *Vestalenula* y se separó claramente de las tres especies pertenecientes a este mismo género (*V. matildae*, *V. molopoensis*, *V. marmonieri*). Sin embargo debido a que hasta el momento no existen secuencias disponibles de organismos brasileños, lugar de donde originalmente fue descrita esta especie, no es posible proveer una conclusión definitiva y validar sin lugar a dudas su presencia en México. Por otro lado, este análisis nos permite considerar también, la posible identificación errónea del organismo con número de referencia en GenBank: AF 031303.1 (*Darwinula stevensoni*) y plantear la revisión de este material con más detalle y los resultados del trabajo publicado.

Las mayor parte de las secuencias de la subfamilia *Cypridopsinae*, se obtuvieron de especies mexicanas identificadas como *C. vidua* (alguna de ellas con cierta variabilidad morfológica) y a estas se incluyó una secuencia de *C. vidua* de Canadá, el análisis de la divergencia de estas secuencias, demostró la presencia de 9 grupos (con más del 3% de divergencia) pertenecientes a 9 especies potenciales que forman un complejo (Fig. 11). El primer grupo (I) correspondió a especies de un sistema del sur de Quintana Roo (3 Garantías). El segundo grupo (II) correspondió a especies del centro de la Península de Yucatán (Vallehermoso y Ramonal). El tercer grupo (III) pertenece al mismo sitio de colecta del primer grupo (3 Garantías), y es posible pensar que dentro de este mismo sistema pudieran estar habitando dos especies diferentes pertenecientes a *Cypridopsis*. Sin embargo es necesario realizar más secuencias y una comparación morfológica más detallada de las especies que permita diferenciarlas claramente. El cuarto grupo (IV) se encontró habitando un sistema al Sur de Quintana Roo (Puente Laguna Milagros). Las especies pertenecientes al grupo V, son las especies discriminadas morfológicamente como

Cypridopsis sp 3 (cuyas características se mencionaron anteriormente), distribuidas en Campeche (Silvituc y Zoh laguna), en este grupo se confirman la separación de las especies, corroborando las observaciones morfológicamente. El grupo VI estuvo conformado por especies con una distribución similar a la anterior, al estar presentes en los dos sitios antes mencionados, además de uno adicional en Tabasco (Jonuta- Escárcega). La especie procedente de Canadá se separó de todas las demás (en la rama VII). El octavo grupo (VIII) lo compone una especie de Aguascalientes y el Noveno grupo (IX), estuvo integrado por una especie perteneciente a Tabasco, que posiblemente no pertenezca al género *Cypridopsis*. De acuerdo al árbol de identificación, existen ocho diferentes linajes del género *Cypridopsis* con más del 3% de divergencia en el país. Esto nos permite pensar que la variabilidad morfológica observada en los individuos de diferentes poblaciones, puede ser evidencia suficiente de una separación específica entre individuos, ya que podría tratarse del inicio o conclusión de procesos de especiación en los diferentes sistemas, tal como se reporta para rotíferos en los sistemas del centro del país (Alcántara-Rodríguez *et al.* 2012). Es necesario realizar más secuencias y análisis más detallados que involucren un estudio integral con más especímenes para comprobar estas hipótesis.

Dentro de la subfamilia *Cyprinotinae*, las secuencias obtenidas pertenecen a la especie *Cyprinotinae* sp 1 (Fig. 25) proveniente de diferentes sistemas. Con estas secuencias mexicanas, secuencias de GenBank pertenecientes a especies de la subfamilia *Eucypridinae* (*Eucypris virens*, *Eucypris pigra*, *Prionocypris aragónica*, *Tonnancypris lutaria*) mas una secuencia perteneciente a un organismo de la familia *Cyprididae* (Oss 210.1) (discriminado durante el análisis de *Cypridopsinae*), se realizó el análisis de la divergencia en este grupo. Cabe mencionar que las subfamilias *Cyprinotinae* y *Eucypridinae* son considerados grupos hermanos, pertenecientes a la misma familia. Los resultados obtenidos de este análisis nos permitieron determinar que las especies de los grupos I-IV y VII (Fig. 13), se discriminan claramente de las especies mexicanas (con mas del 3% de divergencia); Por su parte, las secuencias de la especie mexicana antes mencionada (*Cyprinotinae* sp 1) se separó en tres diferentes ramas (V, VI y IX), es posible que debido a que los especímenes secuenciados habitan en diferentes sistemas, (Laguna Vernet, Charco 3 Jonuta Escárcega, Laguna Miguel Hidalgo) pudiéramos estar observando procesos similares a los

sucedidos con *Cypridopsis*, sin embargo en el caso de estos individuos las adaptaciones se han reflejado únicamente en el genoma y aún no son visibles en las características fenotípicas de los organismos. Por el momento la observación morfológica de estos organismos no nos permite separarlas como diferentes. Para resolver esta incertidumbre, se requiere de un mayor número de secuencias del gen COI y un análisis morfológico más detallado de los organismos. Finalmente la especie que integra el grupo VIII al parecer no tiene relación estrecha con *Cyprinotinae* y será necesario retomar sus características morfológicas para determinar con claridad el grupo al que pertenece, sin embargo debido a que no contamos con más organismos en nuestras muestras, se necesitan muestreos posteriores en el sistema donde habita.

Las secuencias mexicanas obtenidas para la subfamilia *Timiriaseviinae*, pertenecieron a *Cytheridella ilosvayi*, éstas se compararon con secuencias de GenBank pertenecientes a organismos de la familia *Cytherideidae*. El resultado obtenido fue una separación clara y efectiva de la especie mexicana. Por su parte las demás especies se discriminaron entre sí de manera muy adecuada (Fig. 23). Cabe señalar que las secuencias pertenecientes a *Cytheridella ilosvayi*, son las primeras que se obtienen para esta especie a nivel mundial y será muy importante poder compararlas con secuencias que en un futuro se puedan obtener de especímenes de Sudamérica, ya que en esta región fue descrita por primera vez esta especie.

Para las subfamilias *Cyclocypridinae* y *Cyprettinae*, a pesar de que se obtuvieron secuencias (9 y 6 secuencias respectivamente), no se pudieron realizar los análisis de divergencia a nivel de subfamilia, porque hasta el momento no existen secuencias disponibles en la base de datos para ambos grupos. Por lo que para obtener un panorama de su situación taxonómica a nivel molecular y además obtener un panorama de la diversidad genética de los ostrácodos de la zona estudiada del país, se realizó el análisis de la divergencia con todas las secuencias obtenidas durante este trabajo. El resultado de dicho análisis se muestra en la figura 24. Cabe señalar que las secuencias de las subfamilias *Cyclocypridinae* y *Cyprettinae* que se obtuvieron en este trabajo, son las primeras que se obtienen a nivel mundial.

Con base en el análisis morfológico y geográfico de los organismos pertenecientes a la subfamilia *Cyclocypridinae*, se determinó que pertenecían a cuatro especies, tres mexicanas (*Cypria* sp 2, *Cypria* sp 3, *Cypria* cf. *kraepelini*) y una surcoreana (*Cypria kraepelini*). El análisis de código de barras, aporta mayor información que permite clarificar la incertidumbre entre la especie mexicana y coreana y al mismo tiempo nos ayuda a confirmar que las diferencias morfológicas observadas entre estas dos especies son suficientes para diferenciarlas aunque es claro que existe cierta relación entre ellas. Por su parte *Cypria* sp 2 y *Cypria* sp 3, deben ser analizadas mas a detalle y descritas con los conceptos de la taxonomía integrativa (Will 2005), ya que se considera que ambas son potencialmente nuevas a la ciencia.

Las secuencias obtenidas para la subfamilia *Cyprettinae*, pertenecen a *Cypretta campechensis* n. sp. (descrita durante este trabajo). La divergencia de estas secuencias permitió que se separaran adecuadamente de otros grupos de ostarcodeos del país. Estas secuencias permitirán realizar inferencias biogeográficas sobre el grupo ya que como se mencionó antes, las especies mexicanas representan el eslabón entre las faunas del continente y se espera que a corto plazo se puedan obtener secuencias de las otras dos especies mexicanas descritas.

Finalmente el análisis de Códigos de barras, demostró que en los ostrácodos dulceacuícolas, el COI es efectivo en su discriminación a nivel específico, de la misma forma como se ha demostrado con rotíferos, cladóceros y copépodos (García-Morales y Elías-Gutiérrez, en prensa y Elías-Gutiérrez *et al.* 2008). El análisis de las familias *Darwinulidae* y *Limnocytheridae* (*Timiriaseviinae*) (Fig. 20,23), nos permitió observar una discriminación muy clara, entre la fauna registrada en México y la de otras regiones del mundo. En el caso de *Cypridopsis* y *Cyprinotinae* (Fig. 11,13) el código de barras indicó la existencia de posibles especies crípticas dentro de ambos géneros, que deberán ser analizadas a detalle más adelante. Cabe señalar que el análisis preliminar de los morfotipos de las mismas es coincidente con el análisis molecular. Por otro lado las subfamilias *Cyprettinae* y *Cyclocypridinae*, también se discriminaron correctamente de los demás grupos de especies

mexicanas. En conclusión, el método de código de barras es muy efectivo para separar a las especies e incluso es coincidente con el origen geográfico del material estudiado. Esto se ve claramente con el género *Cypridopsis*, que fue la especie que contó con mayor número de secuencias. La principal limitante que se tiene en este momento es el bajo éxito para la amplificación del gen, por lo que es necesaria una optimización de los protocolos que actualmente se están utilizando.

Conclusión

La fauna de ostrácodos de agua dulce sugiere que la zona tropical y la zona de transición de México al parecer son de las zonas con mayor diversidad de ostrácodos del planeta, al igual que ocurre con otros grupos de animales y plantas. Como parte de esta diversidad desconocida, se encontraron especies y géneros potencialmente nuevos para la ciencia.

Como resultado de lo anterior, la distribución de las especies se encontró limitada a microrregiones en el país, revelando que los ostrácodos poseen distribuciones restringidas, constituyendo posibles microendemismos. Esta conclusión se contrapone a lo que se creía en un principio, donde se pensaba que la mayoría de las especies se encontraban distribuidas en todo el continente e incluso la existencia de distribuciones intercontinentales.

Solamente 5 especies se encontraron ampliamente distribuidas, lo que equivale a 6.8% del total de la fauna encontrada en este estudio.

Las secuencias obtenidas por medio de código de barras, permitieron discriminar efectivamente a las especies de ostrácodos y sugieren la existencia de especies crípticas. Es necesario ampliar el horizonte de resultados con estas técnicas, pues las secuencias obtenidas a partir de este trabajo son de las primeras a nivel mundial.

Finalmente con este trabajo se da a conocer por primera vez la diversidad de ostrácodos actuales en la región centro-sur-sureste del país. Es necesario señalar que apenas es un primer acercamiento este tipo de fauna y para avanzar con más detalle en el conocimiento de las especies presentes en esta región es necesario un muestreo más amplio en tiempo y

espacio que se enfoquen en el reconocimiento de los individuos utilizando la morfología y datos moleculares, así como aspectos ecológicos, y distribucionales, ya que solo la taxonomía integrativa permitirá soportar de una manera más consistente las nuevas hipótesis que vayan surgiendo.

Literatura Citada

Alcántara-Rodríguez J., Ciro-Pérez J., Ortega-Mayagoitia E., Serranía-Soto C., Piedra-Ibarra E. 2012. Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshwater Biology* 57 (4): 728-740.

Alcocer J. & Bernal-Brooks F., 2010. Limnology in Mexico, *Hydrobiologia* 644: 15-68.

Alcocer, J. & U. Hammer. 1998. Saline lake ecosystems of Mexico. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 1: 291-315.

Arredondo-Figueroa J., 2002. Los axalapazcos de la Cuenca Oriental, Puebla. In De la Lanza Espino, G. & J. L. García-Calderón (eds), *Lagos y Presas de México*. AGT Editor, México, DF: 81–107.

Ballent S. & Díaz A., 2011. Contribution to the taxonomy, distribution and paleoecology of the early representatives of *Penthesilenula* Rossetti & Martens, 1998 (Crustacea, Ostracoda, Darwinulidae) from Argentina, with the description of a new species, *Hydrobiologia* 1-14.

Benson R., Berdan J., Tetsuro H., Howe H, Keslin R & Moore R., 1961. Ostracoda. In Moore Raymond (ed), *Treatise on Invertebrate Paleontology*, Geological Society of America and University of Kansas Press, Q197-Q387.

Bode S., Adolfsson S., Lamatsch D., Martins M., Schmit O., Vandekerkhove J., Mezquita F., Namiotko T., Rossetti G., Schon I., Butlin R. & Martens K., 2010. Exceptional cryptic diversity and multiple origins of parthenogenesis in a freshwater ostracod, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 542-552.

Bridgwater N., Heaton T. & O'Hara S., 1999. A late Holocene palaeolimnological record from central Mexico, based on faunal and stable-isotope analysis of ostracod shells, *Journal of Paleolimnology* 22: 383-397.

Broodbakker N., Danielopol D., 1982. The chaetotaxy of Cyprididacea (Crustacea, Ostracoda) limbs: proposal for a descriptive model, *Bijdr Dierkd* 52:103–120.

Bronshtein Z., 1947. Fresh-water Ostracoda, Academy of Sciences of the USSR Publishers, Moscow (in Russian). Translated from Russian into English for the United States Department of the Interior and the National Science Foundation, Washington DC, by Amerind Publishing Co., New Delhi, 1988., 470 pp.

Bucklin A., Ortman B., Jennings R., Nigro L., Sweetman C., Copley N., Sutton T. & Wiebe P., 2010. A "Rosetta Stone" for metazoan zooplankton: DNA barcode analysis of species diversity of the Sargasso Sea (Northwest Atlantic Ocean), *Deep-Sea Research II* 57: 2234-2247.

Cohen A., Dawn E. & Maddocks R., 2007. Ostracoda. Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon California: 417-446.

Cohuo S., 2010. Caracterización y Distribución de Ostracodos dulceacuícolas de la Península de Yucatán. Tesis. Instituto Tecnológico de Chetumal.

Colin, J. & D. Danielopol, 1978. New data on the systematics of the Limnocytheridae (Ostracoda, Cytheracea), *Geobios* 11: 563-567.

Danielopol, D., Marmonier P., Boulton A. & Bonaduce G., 1994. World subterranean ostracod biogeography: dispersal or vicariance, *Hydrobiologia* 287: 119-129.

Delorme L., 1970. Freshwater ostracodes of Canada. Part IV: Families Ilyocyprididae, Notodromadidae, Darwinulidae, Cytherideidae, and Entocytheridae, Canadian Journal of Zoology 48: 1251-1259.

Delorme L., 1989. Methods in Quaternary ecology n.7: Freshwater Ostracoda., Geoscience Canada 16: 85-90.

Delorme L., 2001. Ostracoda. Pp. 811-849 in Thorp, J.H., and A.P. Covich (eds.). Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. Academic Press, San Diego. 2nd edition.

Elías-Gutiérrez, M., Martínez J., Ivanova N., Valdéz-Moreno M. & Hebert P., 2008. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries, Zootaxa 1839: 1-42.

Elías-Gutiérrez, M. & Valdéz-Moreno M., 2008. A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding, Hidrobiológica 18: 63-74.

Ferguson E., 1986. Recently Described Species and Distributional Records for North American Freshwater Ostracoda, American Midland Naturalist 79: 499-506.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. & Vrijenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, Molecular Marine Biology and Biotechnology 3: 294-299.

Forester R., 1985. *Limnocythere bradburyi* n. sp.: A Modern Ostracode from Central Mexico and a Possible Quaternary Paleoclimatic Indicator, Journal of Paleontology 59: 8-20.

Furtos N., 1936. Fresh-Water Ostracoda from Florida and North Carolina, *American Midland Naturalist* 17: 491-522.

Gulshan A., 1987. Effect of Temperature on the Development of Embryonic and Postembryonic Stages of *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) (Ostracoda), *Crustaceana* 52: 95-100.

Hart D. & Hart C., 1974. The Ostracod Family Entocytheridae, *Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Monographs* 18. 239 pp.

Hartmann G. & Puri H., 1974. Summary of neontological and paleontological classification of Ostracoda. *Mitt. Hambg. Zool. Mus. Inst.* 70:7-73

Hebert P., Cywinska A., Ball S. & deWaard J., 2003. Biological Identification through DNA Barcodes, *Proceedings of the Royal Society London* 270: 313-321.

Hernández J., García J. & Espino G., 2007. A proposed limnological classification of small water bodies based on the climate, in a tropical region: Mexico, *Boletín del Instituto de Geografía* 64: 63-74.

Hernández M., Escobar E. & Alcocer J., 2010. Ensamble de crustáceos bentónicos en un lago salino tropical, *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: S133-S140.

Higuti J., Velho L., Lansac-Toha F. & Martens K., 2007. Pleuston communities are buffered from regional flood pulses: the example of ostracods in the Parana River floodplain, Brazil, *Freshwater Biology* 52: 1930-1943.

Higuti J., Lansac-Toha F., Velho L., Pinto R., Vieira L. & Martens K., 2009. Composition and distribution of Darwinulidae (Crustacea, Ostracoda) in the alluvial valley of the upper Paraná River, Brazil, *Brazilian Journal of Biology* 69: 253-262.

Holmes J., 2002. Ostracoda. In J. P. Smol, H. J. Birks & W. M. Last (eds), *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments* Springer Netherlands, 125-151.

Hunt G., Park L. & Labarbera M., 2007. A Novel Crustacean Swimming Stroke: Coordinated Four-Paddled Locomotion in the Cypridoidean Ostracode *Cypridopsis vidua* (Müller), *Biological Bulletin* 212: 67-73.

Juárez D. 2005. Registro de cambios paleoambientales en sedimentos del lago "La Preciosa", Puebla, con base en el estudio de ostrácodos. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, Mexico.

Karanovic I., 2003. Towards a Revision of Candoninae (Crustacea: Ostracoda): Description of Two New Genera from Australian Groundwaters, *Species Diversity* 8: 353-383.

Karanovic I., 2005. Comparative morphology of the Candoninae antennula, with remarks on the ancestral state in ostracods and a proposed new terminology, *Spixiana* 28: 141-160.

Karanovic I., 2011. On the recent Cyclocypridinae (Podocopida, Candonidae) with description of two new genera and one new species, *Zootaxa* 2820: 1-61.

Karanovic I., 2012. *Recent freshwater Ostracods of the World*. Crustacea, Ostracoda, Podocopida. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg, 608 pp.

Kesling R., 2009. Notes on Zenker's Organs in the Ostracod *Candona*, *The American Midland Naturalist* 57: 175-182.

Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Liebau A., 2005. A revised classification of the higher taxa of the Ostracoda (Crustacea), *Hydrobiologia* 538: 115-137.

Little T., 2005. Genetic diversity and polyploidy in the cosmopolitan asexual ostracod *Cypris pubera*, *Journal of Plankton Research* 27: 1287-1293.

López L., 2007. Biodiversidad de Ostrácodos (Crustacea), dulceacuicolas y su aprovechamiento como bioindicadores en el estado de Aguascalientes, México. Tesis. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Martens K., 1987. Homology and functional morphology of the sexual dimorphism in the antenna of *Sclerocypris* Sars, 1924 (Crustacea, Ostracoda, Megalocypridinae), *Bijdr Dierkd* 57:183–190.

Martens K., 2003. On the evolution of Gomphocythere (Crustacea, Ostracoda) in Lake Nyassa/Malawi (East Africa), with the description of 5 new species, *Hydrobiologia* 497:121–144

Martens K. & Behen F., 1994. A Checklist of the recent non-marine Ostracods (Crustacea, Ostracoda) from the inland waters of South America and adjacent islands., *Travaux Scientifiques du Muséed' Histoire Naturelle de Luxembourg*. 22: 1-64.

Martens K. & Savatnalinton S., 2011. A subjective checklist of the Recent, free-living, non-marine Ostracoda (Crustacea), *Zootaxa* 2855: 1-79.

Martens K., Schon I., Meisch C. & Horne D.J., 2008. Global diversity of ostracods (Ostracoda, Crustacea) in freshwater, *Hydrobiologia* 595: 185-193.

Martens K., Rossetti G., Butlin R. & Schön I., 2005. Molecular and morphological phylogeny of the ancient asexual Darwinulidae (Crustacea, Ostracoda), *Hydrobiologia* 538: 153-165.

Martins, M., Vandekerkhove J., Mezquita F., Schmit O., Rueda J., Rossetti G. & Namiotko D., 2009. Dynamics of sexual and parthenogenetic populations of *Eucypris virens* (Crustacea: Ostracoda) in three temporary ponds, *Hydrobiologia* 636: 219-232.

Meisch C., 1996. Contribution to the taxonomy of Pseudocandona and four related genera, with the description of *Schellencandona* nov. gen., a list of the Candoninae genera, and key to the European genera of the subfamily (Crustacea, Ostracoda), *Bull. Soc. Nat. Luxemb.* 97:211–237.

Meisch C., 2000. *Freshwater Ostracoda of Western and Central Europe.*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 522 pp.

Meisch C., 2007. On the origin of the putative furca of the Ostracoda (Crustacea), *Hydrobiologia* 585: 181-200.

Mezquita F., Roca J., Reed J. & Wansard G., 2005. Quantifying species–environment relationships in non-marine Ostracoda for ecological and palaeoecological studies: Examples using Iberian data, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 225: 93-117.

Miranda F., 2008. Ocorrência de Ostracoda no médio rio doce/MG e revisão do estado da arte do estudo desse grupo no Brasil. Tesis. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Montero-Pau J., Gómez A. & Muñoz J., 2008. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs, *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 218-222.

Neale, J. & Victor R., 1978. On *Indiacypris luxata* (Brady), a freshwater ostracod (Crustacea: Entomostraca) from Sri Lanka. *Zoological Journal of the Linnean Society* 64[1], 71-77.

Palacios-Fest M., Carreño A., Ortega-Ramirez J. & Alvarado-Valdez G., 2002. A paleoenvironmental reconstruction of Laguna Babicora, Chihuahua, Mexico based on ostracode paleoecology and trace element shell chemistry, *Journal of Paleolimnology* 27: 185-206.

Pérez L., Lorenschat J., Brenner M., Scharf B. & Schwalb A., 2010. Extant freshwater ostracodes (Crustacea: Ostracoda) from Lago Petén Itzá, Guatemala, *Revista de Biología Tropical* 58: 871-895.

Pinto R., Rocha C. & Martens K., 2003. On two new species of the genus *Vestalenula* Rossetti & Martens, 1998 (Crustacea, Ostracoda, Darwinulidae) from semiterrestrial habitats in São Paulo State (Brazil), *Zoological Journal of the Linnean Society* 139: 305-313.

Rio de la Loza L. & Craveri C., 1858. Opúsculo sobre los pozos artesianos y las aguas naturales de más uso en la ciudad de México, con algunas noticias sobre el corte del Valle y una lista de plantas que vegetan en las inmediaciones del Desierto Viejo. *BoZ. Soc. Mexicana Geogr. Estad.*, 1ra Epoca, VI (suplem.) : 9-28, lám. 1.

Roca J., Baltanas A. & Uiblein F., 1993. Adaptive responses in *Cypridopsis vidua* (Crustacea: Ostracoda) to food and shelter offered by a macrophyte (*Chara fragilis*), *Hydrobiologia* 262: 127-131.

Rossetti G. & Martens K., 1998. Taxonomic revision of the recent and holocene representatives of the family Darwinulidae (Crustacea, Ostracoda), with a description of three new genera. *Bull. Inst. R Sci. Nat. Belg. Biol.* 68:55–110.

Sandberg P., 1964. The ostracod genus *Cyprideis* in the Americas. *Contr. Geol. stockholm* 12: 1)178.

Saussure H. de., 1858. Memoire sur divers Crustacés nouveaux des Antilles et du Mexique, *Memoires de la Societe de Physique et D'His-toire Naturelle de Geneve.* 14(2):486-490.

Savatenalinton, S. & Martens K., 2009. Generic revision of Cypricerinae McKenzie, 1971 (Crustacea, Ostracoda), with the description of three new genera and one new species and a phylogenetic analysis of the subfamily, *Hydrobiologia* 632: 1-48.

Schmitter-Soto J., Comín F., Escobar-Briones E., Herrera J., Alcocer J., Suarez-Morales E., Elías-Gutiérrez M., Díaz V., Marin L. & Steinich B., 2002a. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico), *Hydrobiologia* 467: 215-228.

Schmitter-Soto, J., Escobar-Briones E., Alcocer J., Suarez-Morales E., Elías-Gutiérrez M. & Marin L., 2002b. Los cenotes de la Peninsula de Yucatán. *Lagos y Presas de México* 338-376.

Schon I., Butlin R., Griffiths H. & Martens K., 1998. Slow Molecular Evolution in an Ancient Asexual Ostracod, *Proceedings: Biological Sciences* 265: 235-242.

Sharpe R., 1903. Report on the freshwater Ostracoda of the United States National Museum, including a revision of the subfamilies and genera of the family Cyprididae. *Proc US Natl Mus* 26:969–1001

Smith, R., Kamiya T. & Horne D., 2006. Living males of the 'ancient asexual' Darwinulidae (Ostracoda: Crustacea), *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273: 1569-1578.

Sohn I., 1987. The Ubiquitous Ostracode *Darwinula stevensoni* (Brady and Robertson, 1870), Redescription of the Species and Lectotype Designation, *Micropaleontology* 33: 150-163.

Sohn I. & Kornicker L., 1972. Morphology of *Cypretta kawatai* Sohn and Kornicker, 1972 (Crustacea, Ostracoda), with a Discussion of the Genus, *Smithsonian Contribution to Zoology* 141: 1-28.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., & Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Torres A. & Martínez J., 2010. Ecology of Non-marine Ostracoda from La Fe Reservoir (El Retiro, Antioquia) and their potential application in Paleoenvironmental studies., *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 34: 397-409.

Tressler W., 1947. A Check List of the Known Species of North American Freshwater Ostracoda, *American Midland Naturalist* 38: 698-707.

Tressler W., 1954. Fresh-water Ostracoda from Texas and Mexico, *Journal of Wash. Acad. Sci.*, 44:138–149

Tressler W., 1959. Ostracoda. In Edmonson W.T, Baldwin W.H & Chadler W.G (eds), *Freshwater Biology* Jhon Wiley & Sons. Inc, USA: 657-733.

Van Doninck K., Schon I., Martens K. & Goddeeris B., 2003. The life-cycle of the asexual ostracod *Darwinula stevensoni* (Brady & Robertson, 1870) (Crustacea, Ostracoda) in a temperate pond, *Hydrobiologia* 500: 331-340.

Victor R., 2002. Ostracoda. In Fernando C.H. (ed), *A Guide of Tropical Freshwater Zooplankton* Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands: 1889-233.

Ward J., 1963. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function, *Journal of the American Statistical Association*, 48, 236–244.

Will K., Mishler B. & Wheeler Q., 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy, *Systematic Biology* 54: 844-851.

Wouters K., 1987. Range extension and supplementary description of *Dolerocyprina taalensis* (Tressler) (Crustacea: Ostracoda), *Indo-Malayan Zoology* 4: 127-133.

Würding N., 1983. Fresh and brackish-water ostracodes from the East Coast of the State of Rio Grande do Sul, Brazil, in R. F. Maddocks (ed.) *Applications of Ostracoda: Proceedings of 8th International Symposium on Ostracoda*, Houston, TX (Houston: University of Houston), pp. 591–604.

Yin Y., Geiger W. & Martens K., 1999. Effects of genotype and environment on phenotypic variability in *Limnocythere inopinata* (Crustacea: Ostracoda), *Hydrobiologia* 400: 85-114.

Yozzo D. & Steineck L., 1994. Ostracoda from Tidal Freshwater Wetlands at Stockport, Hudson River Estuary: Abundance, Distribution, and Composition, *Estuaries* 17: 680-684.

Anexo 1. Sitios de colecta.

Tabla 2. Lugares de colecta y parámetros físico-químicos tomados de ellos.

No	Sistema	N	W	Fecha	Oxig. Dis. (mg l ⁻¹)	Temp. (°C)	Conductividad (Scm ⁻¹)
1	Charco Temp. Ram.	19.39329	-88.62016	14/06/2007	-	28.5	0.506
2	Minicenote Vert.	19.60687	-87.98875	14/06/2007	6.29	28.8	0.712
3	Bacalar Arrastre	18.679472	-88.388278	19/12/2009	-	27	-
4	Bacalar Litoral	18.78454	-88.388123	19/12/2009	-	27	-
5	C. Galeana Vert.	19.47061	-88.02916	14/06/2007	5.99	31.2	1.03
6	El Padre Lit.	19.60642	-87.98809	14/06/2007	6.09	30.9	1.48
7	Minicenote Lit.	19.60687	-87.98875	14/06/2007	6.29	28.8	0.712
8	Ramonal Lit.	19.39386	-88.62003	14/06/2007	0.97	27.2	0.314
9	Minicenote Lit.	19.60695	-87.98863	14/06/2007	5.83	27.8	0.719
10	C. Galeana Lit.	19.47061	-88.02916	14/06/2007	5.4	30.4	1.03
11	Noh Bec	18.142722	-88.176583	28/02/2008	-	24.6	10.0
12	Kohunlich Charco	18.42827	-88.80814	24/05/2007	-	30	-
13	Vallehermoso Lit.	19.178389	-88.52175	04/05/2008	-	-	-
14	Km 9 Nvo Becar	18.613722	-89.293472	26/03/2008	-	-	-
15	Balakna	19.47175	-88.069583	28/02/2008	0.10	-	2.51
16	Pucté	19.467583	-88.0795	28/02/2008	-	23.3	15.0
17	Pucté Vert.	19.468278	-88.071139	28/02/2008	-	23.7	08.0
18	El Padre Vert.	19.606778	-87.987806	28/02/2008	0.71	21.3	3.52
19	C. Galeana	19.475306	-88.029056	28/02/2008	1.4	22.3	2.73
20	Adelante Nvo. Becar	18.613722	-89.293472	26/03/2008	-	-	-
21	Chichancanab	19.883222	-88.770833	06/05/2008	-	-	-
22	Dos Aguadas 1	18.588028	-89.418167	25/03/2008	-	-	-
23	Cenote Normal Vert.	18.667361	-88.394444	02/05/2008	-	-	-
24	Laguna Negra	18.50061	-88.38964	20/09/2008	-	30	-
25	Presa Calles	22.15	-102.45	23/10/2008	-	-	-
26	Rancho Alegre	18.58044	-88.44191	06/11/2008	-	-	-
27	Huay Pix	18.51084	-88.42234	19/06/2004	4.84	30.8	3.17
28	Quechulac	19.374944	-97.353944	17/05/2007	1.42	-	0.687
29	Alchichica	19.413139	-97.402444	17/05/2007	14	-	11.6
30	La Preciosa	19.369972	-97.370667	17/05/2007	8.32	18.57	1.92
31	Valsequillo	18.908972	-98.159917	23/05/2007	8.26	17.66	0.774
32	Las Aras	18.995	-98.1165	23/05/2007	3.59	23.47	0.252
33	Chetumal, cobach	18.524061	-88.294631	15/10/2001	-	-	-
34	Los Nietos Huay pix	18.513831	-88.431078	19/06/2004	8.61	30.6	2.97
35	Rancho Alegre	18.58044	-88.44191	26/02/2008	-	-	-
36	Cerca Kohunlich	18.42626	-88.80387	04/11/2008	-	-	-
37	Pozo 1 H. Mundaca	21.219028	-86.726056	24/05/2009	5.24	34.3	28.7
38	Est. 2 H. Mundaca	21.219278	-86.726556	24/05/2009	1.3	27.9	17.9
39	Hacienda Mundaca	21.219417	-86.718111	24/04/2009	10.95	35.7	27.5
40	Laguna Milagros Lit	18.514694	-88.425694	19/12/2009	-	26	-
41	Bacalar Casa Madera	18.674028	-88.389083	19/12/2009	-	27	-

42	Catemaco 1	18.417	-95.113944	24/07/2005	-	26	0.125
43	Cuitzeo	19.950056	-101.126306	16/07/2005	8.45	26.6	1.76
44	Los Baños	19.669722	-99.848639	19/07/2005	4.63	32.2	0.412
45	Cuitzeo 2A	19.968	-101.245028	18/07/2005	5.21	28.4	4.36
46	Km 25 Tol-Atla.	19.486361	-99.734278	20/07/2005	4.25	22.6	0.270
47	Km 47 Tol-Atla.	19.66375	-99.797583	19/07/2005	7.25	33.2	0.90
48	Catemaco	18.417	-95.113944	24/07/2005	6.59	28.9	0.137
49	Rio Hondo	18.497	-88.507222	01/08/2005	0.43	29	1.65
50	Cerca de Kohunlich	18.447139	-88.824917	31/07/2005	-	-	-
51	Rio Hondo J. Sarabia	18.493328	-88.478956	01/08/2005	-	-	-
52	Santa Ana	19.895306	-96.507389	09/09/2005	-	30	-
53	Tlacolula	21.156361	-97.934389	10/09/2005	-	31	-
54	Zapotlal	21.617083	-98.36375	10/09/2005	-	31	-
55	Camalote	22.011806	-98.227389	10/09/2005	-	30	-
56	Desv. Cosamaloapan	18.344639	-95.837222	08/10/2004	1.30	30.2	0.272
57	Km 208 Pue-Orizaba	18.833639	-97.463083	08/10/2004	13.81	21	0.323
58	Km 209 Pue-Orizaba	18.837167	-97.458111	08/10/2004	-	21	0.300
59	Desv. Cosamaloapan	18.344639	-95.837222	08/10/2004	1.30	30.2	0.272
60	Km 52 Tin-Aca.	18.505917	-96.057667	08/10/2004	1.81	36.8	0.189
61	Laguna Kana	19.499861	-88.395139	04/07/2002	8.24	33	0.604
62	Ramonal 3	19.393556	-88.619056	04/07/2002	5.10	33.2	0.197
63	Ramonal Junto Carr.	19.400306	-89.614944	04/07/2002	1.13	32.3	0.234
64	Charco 3, C. Kana	19.502083	-88.403639	04/07/2002	7.76	26.1	0.217
65	Km 8 Carr-Tulum	19.497306	-88.416389	04/07/2002	1.54	28.7	0.320
66	Ramonal 2	19.386611	-88.633833	24/10/2002	12.59	32.3	0.361
67	Carrillo Pto.	19.6425	-87.998	24/08/2002	4.02	28.1	0.32
68	Charco 1 L. Echev.	18.661239	-88.210944	05/09/2004	-	-	-
69	Ixpuchapan Alto C.	17.670917	-94.719972	16/07/2009	0.40	26.5	0.244
70	Gopalapa 3	18.097861	-94.414639	15/07/2009	2	30.2	28.3
71	Coatza-Terranova	18.109944	-94.440417	15/07/2009	-	27.7	18.6
72	Charco Mixtan	17.742083	-94.684361	16/07/2009	1.60	29.1	0.266
73	Cerca Gopalapa	18.089389	-94.418694	15/07/2009	-	29.6	17.3
74	Charco Usumacinta	17.884667	-91.769028	17/07/2009	0.90	38.1	0.200
75	Laguna Encantada	18.499306	-88.389722	12/06/2009	8.08	26.7	44.7
76	Pozo 2 H. Mundaca	21.219278	-86.726556	24/05/2009	1.30	27.9	17.9
77	Charco 2 Kohunlich	18.447222	-88.824917	05/10/2009	-	27.1	-
78	Kohunlich Limn.	18.42851	-88.82497	05/10/2009	-	28.1	-
79	La Cruz 1	21.193111	-100.574444	06/10/2004	5.90	21.3	0.345
80	Tenancingo	17.913694	-90.5458	25/03/2010	0.41	31.4	1.48
81	Carr.Tenancingo	17.969	-90.642139	25/03/2010	0.09	32.4	2.43
82	Las Golondrinas	17.88975	-90.8186	25/03/2010	0.10	32.6	2.08
83	Manantial 1	17.968167	-90.642139	25/03/2010	0.39	30.3	2.31
84	Rio Grande, Gol.	17.88023	-90.82031	25/03/2010	-	30	-
85	Aguada de la Lag.	18.348444	-92.090972	24/03/2010	0.59	25.3	1.52
86	Bodegas 2	18.266528	-92.009722	24/03/2010	1.02	28.6	1.65
87	Laguna Esmeralda	18.351694	-92.0908	24/03/2010	0.52	30.8	0.476
88	Playa P. Baranda	17.96327	-90.07072	06/02/2011	-	27	-
89	Salto Grande	18.197028	-91.119333	23/03/2010	2.59	28.4	2.21
90	Laguna Maravillas	18.500694	-90.210194	22/03/2010	0.71	26.6	0.205

91	Rio P. Baranda	17.96799	-90.86179	06/02/2011	-	30	-
92	Rio Candelaria	18.388472	-91.308389	23/03/2010	1.06	30	1.89
93	Puente Salinero	18.925611	-104.063167	30/09/2004	1.2	26.1	13.2
94	Las Lagunas	17.877528	-101.749944	29/09/2004	1.84	26.4	0.148
95	Coyuquilla	18.0035	-102.071389	29/09/2004	5.89	30.3	0.373
96	Laguna Encantada	18.499306	-88.389722	27/04/2008	-	-	-
97	Tzascabera Ramonal	19.4007	-88.59510	14/06/2007	5.22	30.5	0.949
98	Dos Aguadas II	18.600306	-89.432611	25/03/2008	-	-	-
99	Rancho C. Camp. N.	17.636361	-95.081306	26/09/2004	0.38	26.7	0.079
100	Laguna Tortugas	19.420694	-88.170083	19/02/2004	6.27	23.5	1.68
101	La Peñal	17.416194	-95.073083	26/09/2004	4.58	29.9	0.55
102	Silvituc	18.64054	-90.2955	07/02/2011	9.57	28	0.24
103	C. Sabak ha	20.580389	-89.588556	03/08/2008	1.03	30.7	1.75
104	Laguna Ucum	18.497306	-88.506978	26/07/2008	-	30.4	1.5
105	C. Abala	20.644611	-89.685528	04/08/2008	1.31	26.4	2.1
106	Km 156 Carr-Tulum	19.76075	-87.904139	10/08/2008	0.66	31.2	1.14
107	C. Azul	18.6465	-88.412139	25/07/2008	14.2	30.7	3.13
108	C. Chichi	20.657778	-89.216861	31/07/2008	0.68	25.2	1.1
109	C. Xanel ha	20.651056	-89.697472	02/08/2008	1.3	21.4	2.1
110	C. Actun ha	20.7215	-89.318333	31/07/2008	0.5	27.3	0.8
111	C. Cristal	20.200611	-87.483611	07/08/2008	2.4	25.8	3.75
112	Silvituc	18.64054	-90.29552	07/02/2011	-	28	-
113	C. X keken	20.660611	-88.243056	29/07/2008	0.76	25.7	1.19
114	C. Antum	19.646778	-88.38	26/07/2008	2.33	30.1	3.9
115	Xombacal	20.669722	-89.778667	04/08/2008	1.57	27.4	2.52
116	El Padre	19.606778	-87.987806	27/07/2008	0.976	32	1.7
117	Minicenote	19.606889	-87.988806	27/07/2008	0.67	29.6	1.1
118	Yokdzonot	20.707056	-88.730667	27/07/2008	.64	26.6	1.01
119	Xtojil	20.685056	-88.804556	30/08/2008	-	-	-
120	C. Galeana	19.470528	-88.029056	30/08/2008	-	-	-
121	C. Yalutzil	20.623861	-89.606556	02/08/2008	1.24	27.6	2
122	C. Yax Ek	20.620833	-88.416417	28/08/2008	-	29.9	0.69
123	Misol-ha	17.390944	-91.999167	17/10/2009	-	33	-
124	Agua Azul Canal	17.257139	-92.114556	17/10/2009	-	28	-
125	Palenque	17.485	-92.043917	17/10/2009	-	24	-
126	Poza puente Murci.	17.463	-92.043926	17/10/2009	-	22	-
127	Laguna Guerrero	18.688583	-88.264694	20/12/2009	-	24	-
128	Laguna Verde canal	18.53301	-88.32521	04/05/2011	-	34	-
129	Laguna Clara Chet.	18.53307	-88.32515	04/05/2011	-	34	-
130	Laguna de Curva	18.51706	-88.34869	04/05/2011	-	34	-
131	Quechulac	19.373333	-97.35	10/03/2009	5.0	20.3	750
132	Alchichica	19.410278	-97.387222	15/12/2008	6.5	19.8	12950
133	La Preciosa	19.369444	-97.387222	10/03/2009	6.5	19.1	2250
134	San José 3 Garantías	18.36886	-89.01259	22/05/2011	3.83	30.2	-
135	Humedal M. Hidalgo	17.95594	-92.43019	25/06/2011	-	37	-
136	Carretera al Tigre	18.03957	-90.8706	26/02/2011	-	30	-
137	Cempoala lit.	19.05103	-99.31521	23/06/2011	-	20	-
138	Cempoala veg.	19.05080	-99.31563	23/06/2011	-	20	-
139	Danxo Vert.	19.87941	-99.55914	22/06/2011	-	15	-

140	Laguna Vernet 2 Sec	17.87491	-92.55414	25/06/2011	-	31	-
141	Carr. Aca-Cosama.	18.20140	-95.60642	24/06/2011	-	38	-
142	Humedal 2 M. Hid.	17.90026	-92.48266	25/06/2011	-	33	-
143	Charco 1 Jon-Esc.	18.10930	-92.07820	25/06/2011	-	-	-
144	C. 1 Santa Lucía	18.06330	-92.01704	25/06/2011	-	-	-
145	Silvituc equisetos	18.64251	-90.29421	26/06/2011	-	33	-
146	Charco 3 Jon-Esc	18.04792	-91.88751	26/06/2011	-	-	-
147	Timilpan	19.88717	-99.73924	22/06/2011	-	17	-
148	Laguna E. Zapata	19.58453	-99.79727	22/06/2011	-	18	-
149	Carr. Aca-Cosama.	18.20160	-95.60731	24/06/2011	-	38	-
150	Pozo 5 Pue-Orizaba	18.82082	-97.23083	24/06/2011	-	23	-
151	P. Ignacio Ramirez	19.46154	-99.77985	22/06/2011	-	18	-
152	Pozo 4 Pue-Orizaba	18.85172	-97.26698	24/06/2011	-	21	-
153	Pozo 2 Pue-Orizaba	18.83715	-97.45815	24/06/2011	-	18	-
154	Pozo 3 Pue-Orizaba	18.82664	-97.30476	24/06/2011	-	18	-
155	Laguna Vernet Lit	17.87722	-92.55024	25/06/2011	-	35	-
156	P. San Nicolás	19.92376	-99.78820	22/06/2011	-	18	-
157	Hum. Pte. Milagros	18.51830	-88.43945	14/09/2011	-	29	-
158	Laguna Pte. Mil.	18.50896	-88.44706	14/09/2011	-	27.5	-
159	Laguna Pte. Mil. 2	18.50324	-88.45089	14/09/2011	-	28	-
160	Usumacinta Jonuta	18.10042	-92.16952	25/06/2011	-	28	-
161	Chan Laguna	18.499236	-90.18475	17/03/2008	-	-	-
162	La Preciosa	19.369444	-97.387222	17/05/2007	-	-	-
163	Valsequillo	18.908972	-98.159917	23/05/2007	3.64	21.75	0.913
164	Noh Bec vert.	19.142722	-88.176583	28/02/2008	-	24.6	100
165	Emiliano Zapata	18.088731	-94.381186	08/04/2008	-	-	-
166	C. Campamento	18.650389	-88.409472	02/05/2008	-	-	-
167	Aguada II Zoh Lag	18.588028	-89.418167	25/03/2008	-	-	-
168	C. La Laguna	18.667361	-88.394444	02/05/2008	-	-	-
169	Lag. Encantada Vert.	18.499306	-88.389722	14/10/2006	-	-	-
170	Cerca Koh. vertical	18.447222	-89.824917	05/10/2009	-	27.1	-
171	Rio mata caña	19.762222	-96.464167	09/09/2005	-	26	-
172	Boca de Ovejas	19.874556	-96.482306	09/09/2005	-	28	-
173	La Tinaja	18.307667	-90.294611	07/09/2005	-	28	-
174	Chachalacas	19.406528	-96.359111	09/09/2005	-	26	-
175	Rincón de Parangueo	20.429417	-101.246278	16/07/2005	9.23	31.1	100
176	La Goleta	20.07275	-99.556056	15/07/2005	6.56	21.5	0.139
177	Km 51 Tin-Aca.	18.483167	-96.020694	08/10/2004	-	30.2	0.272
178	La Esperanza	18.850417	-97.453556	08/10/2004	8.26	17.0	0.346
179	Cerca Dzulá	19.562333	-88.407889	25/11/2002	6.01	31	0.139
180	Charco Dzulá	19.562333	-88.407889	05/11/2002	-	-	-
181	Charco Alto-Coatza.	17.856056	-94.656	16/07/2009	2.90	27	11.6
182	Kohunlich Charco 1	18.428833	-88.807917	05/10/2009	-	28.1	-
183	La Goleta vertical	20.070111	-99.556028	15/07/2005	14.9	20.9	0.141
184	Flor del Bosque	19.035778	-98.112806	23/05/2007	14	20.95	0.206
185	Xbatum	20.673278	-89.772889	04/08/2008	20	27.5	2.3
186	Cempoala vert.	19.05246	-99.31392	23/06/2011	-	18	-
187	Pozo de Agua 1	18.84073	-97.52293	24/06/2011	-	18	-
188	Usumacinta Hor.	18.09935	-92.15645	25/06/2011	-	27	-

189	Silvituc vertical	18.63971	-90.28928	25/06/2011	-	30	-
190	P. Isla de las Aves	19.826609	-99.789927	25/06/2011	-	17	-
191	Teopizca	19.05385	-99.31409	25/06/2011	-	19	-
192	Lag. Tol-Atl.	19.48681	-99.73480	22/06/2011	-	20	-
193	Canal Bach. Chet.	18.524061	-88.294631	03/10/2011	-	-	-
194	P. Ignacio Ramirez	19.46154	-99.77985	22/06/2011	-	18	-
195	Danxo vertedero	19.88105	-99.55762	22/06/2011	-	15	-
196	Charco 1 Car-Tulum	19.642528	-87.997972	24/10/2002	3.4	26.7	0.470
197	Manantial 2	17.966139	-90.862	25/11/2010	0.9	32.4	2.43
198	Dos Aguadas III	18.597167	-89.422194	25/03/2008	-	-	-

Anexo 2. Especies presentes en los sistemas analizados y número de colección.

Tabla 3. Especies presentes en los sistemas analizados y número de colección.

Sistema	Especies presents	Numero en Colección
Charco Temp. Ram.	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-07769
	<i>Typhlocypris</i> sp 5	ECO-CH-Z-06198
Minicenote Vert.	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06229
Bacalar Arrastre	-----	-----
Bacalar Litoral	<i>Strandesia intrépida</i>	-----
	<i>Darwinula stevensoni</i>	ECO-CH-Z-06157
	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06206
C. Galeana Vert.	Juveniles de <i>Cyclocypridinae</i>	ECO-CH-Z-06202
El Padre Lit.	<i>Cypria</i> cf. <i>pseudocrenulata</i>	ECO-CH-Z-07710
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-06190
Minicenote Lit.	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06229
Ramonal Lit.	<i>Diaphanocypris meridana</i>	ECO-CH-Z-07689
	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-07678
Minicenote Lit.	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06250
C. Galeana Lit.	Juveniles de <i>Cyclocypridinae</i>	ECO-CH-Z-07687
	Valvas de <i>Cytheridae</i>	-----
Noh Bec	<i>Typhlocypris</i> sp. 4	ECO-CH-Z-06195
	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06196
Kohunlich Charco	<i>Neocypridopsis yucatanensis</i>	ECO-CH-Z-07698
Vallehermoso Lit.	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06177
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
Km 9 Nvo Becar	<i>Cypria</i> sp 3	ECO-CH-Z-07706
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
Balakna	<i>Limnocythere</i> cf. <i>opesta</i>	ECO-CH-Z-07684
Pucté	<i>Cypria</i> cf. <i>javana</i>	ECO-CH-Z-07692
Pucté Vert.	-----	-----

El Padre Vert.	-----	-----
C. Galeana	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-06218
	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06220
Adelante Nvo. Becar	<i>Cypria</i> sp 3	ECO-CH-Z-07690
	Juvenil de <i>N. yucatanensis</i>	-----
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
Chichancanab	<i>Cypria</i> sp 2	ECO-CH-Z-07707
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Alicenula serricaudata</i>	ECO-CH-Z-07781
Dos Aguadas 1	<i>Cypridopsis inaudita</i>	ECO-CH-Z-06169
Cenote Normal Vert.	Juvenil de <i>Cyclocypridinae</i>	ECO-CH-Z-06146
Laguna Negra	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
	Valvas de <i>Cytheridae</i>	-----
Presa Calles	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Rancho Alegre	<i>Darwinullua stevensoni</i>	ECO-CH-Z-06157
	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06206
	<i>Strandesia intrepida</i>	-----
	<i>Heterocypris putei</i>	ECO-CH-Z-07726
Huay Pix	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
Quechulac	<i>Limnocythere</i> (<i>Limnocytherina</i>)	ECO-CH-Z-07550
	<i>axalapasco</i> n. sp.	
Alchichica	<i>Limnocythere</i> (<i>Limnocytherina</i>)	ECO-CH-Z-07547
	<i>axalapasco</i> n. sp.	
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
La Preciosa	<i>Limnocythere</i> (<i>Limnocytherina</i>)	ECO-CH-Z-07553
	<i>axalapasco</i> n. sp.	
Valsequillo	<i>Potamocypris</i> cf. <i>unicaudata</i>	ECO-CH-Z-07757
Las Aras	<i>Potamocypris</i> cf. <i>dadayi</i>	ECO-CH-Z-07750
Chetumal, cobach	<i>Cyprinotus unispinifera</i>	-----
	<i>Prionocypris</i> cf. <i>longiforma</i>	ECO-CH-Z-07732
	Juvenil de <i>Neocypridopsis</i>	-----
Los Nietos Huay pix	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
Rancho Alegre	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06206
	<i>Darwinula stevensoni</i>	ECO-CH-Z-06157
Cerca Kohunlich	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06222
	<i>Neocypridopsis yucatanensis</i>	ECO-CH-Z-06223
Pozo 1 H. Mundaca	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Est. 2 H. Mundaca	<i>Cyprinotinae</i> sp 3	ECO-CH-Z-07768
Hacienda Mundaca	<i>Cyprinotinae</i> sp 3	ECO-CH-Z-07725
Laguna Milagros Lit	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Bacalar Casa Madera	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06206
	<i>Dolerocypris</i> sp. 1	ECO-CH-Z-07702
	<i>Cypria gibbera</i>	-----
Catemaco 1	<i>Cypria</i> cf. <i>granadae</i>	ECO-CH-Z-07703
	<i>Typhlocypris</i> sp 1	ECO-CH-Z-07700
Cuitzeo	<i>Potamocypris islagrandensis</i>	ECO-CH-Z-07729

Los Baños	<i>Potamocypris</i> sp 1	ECO-CH-Z-07748
Cuitzeo 2A	<i>Potamocypris islagrandensis</i>	ECO-CH-Z-07737
Km 25 Tol-Atla.	<i>Limnocythere</i> cf. <i>friabilis</i>	ECO-CH-Z-07747
Km 47 Tol-Atla.	<i>Valvas de Potamocypris</i>	-----
Catemaco	<i>Cypria</i> cf. <i>granadae</i>	ECO-CH-Z-07704
	<i>Typhlocypris</i> sp 1	ECO-CH-Z-07700
Rio Hondo	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Cerca de Kohunlich	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06221
Rio Hondo J. Sarabia	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Santa Ana	Valvas de <i>Darwinulidae</i>	-----
Tlacolula	<i>Ilyocypris Tlacolula</i>	ECO-CH-Z-07758
	<i>Typhlocypris</i> sp 2	ECO-CH-Z-07746
Zapotal	<i>Hemicypris</i> cf. <i>salaria</i>	ECO-CH-Z-07761
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
Camalote	<i>Heterocypris</i> cf. <i>dubia</i>	ECO-CH-Z-07693
Desv. Cosamaloapan	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Cypria</i> cf. <i>kraepelini</i>	ECO-CH-Z-07709
Km 208 Pue-Orizaba	<i>Heterocypris</i> cf. <i>congenera</i>	ECO-CH-Z-07728
Km 209 Pue-Orizaba	<i>Heterocypris</i> cf. <i>congenera</i>	-----
Desv. Cosamaloapan	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Cypria</i> cf. <i>kraepelini</i>	ECO-CH-Z-07709
Km 52 Tin-Aca.	<i>Cypridopsis</i> sp 1	ECO-CH-Z-07772
Laguna Kana	<i>Cyprinotus unispinifera</i>	-----
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
	<i>Darwinula stevensoni</i>	ECO-CH-Z-07782
	<i>Cytheridella</i> sp.1	ECO-CH-Z-07730
Ramonal 3	<i>Chlamydotheca unispinosa</i>	-----
	<i>Chlamydotheca arcuata</i>	ECO-CH-Z-07733
	<i>Cyprinotus unispinifera</i>	ECO-CH-Z-07736
Ramonal Junto Carr.	<i>Cyprinotus unispinifera</i>	ECO-CH-Z-07736
Charco 3 cerca Kana	<i>Typhlocypris</i> sp 5	ECO-CH-Z-07786
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Darwinula stevensoni</i>	ECO-CH-Z-07782
Km 8 Carr-Tulum	<i>Diaphanocypris meridana</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	Valvas de <i>Darwinulidae</i>	-----
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
Ramonal 2	<i>Strandesia</i> cf. <i>elliptica</i>	ECO-CH-Z-07722
	<i>Chlamydotheca arcuata</i>	ECO-CH-Z-07733
	<i>Cypretta maya</i> n.sp.	ECO-CH-Z-07529
	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-07678
Carrillo Pto.	<i>Diaphanocypris meridana</i>	ECO-CH-Z-06207
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Charco 1 L. Echev.	<i>Riocypris hinzeaze</i>	ECO-CH-Z-07727
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Ixpuchapan Alto C.	<i>Cyprinotus unispinifera</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Gopalapa 3	<i>Dolerocypris</i> sp 2	ECO-CH-Z-07723
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----

Coatza-Terranova	Metacypris cf. <i>srisumonae</i>	ECO-CH-Z-07724
	<i>Cypria</i> cf. <i>maculata</i>	ECO-CH-Z-07711
Charco Mixtan	Juvenil de <i>Cypridopsinae</i>	-----
Cerca Gopalapa	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Charco Usumacinta	<i>Cypria</i> cf. <i>kraepelini</i>	ECO-CH-Z-07714
Laguna Encantada	<i>Cypridopsis</i> sp 3	ECO-CH-Z-06160
	<i>Strandesia intrepida</i>	ECO-CH-Z-07718
Pozo 2 H. Mundaca	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Charco 2 Kohunlich	<i>Neocypridopsis yucatanensis</i>	ECO-CH-Z-06225
Kohunlich Limn.	<i>Neocypridopsis yucatanensis</i>	ECO-CH-Z-07698
La Cruz 1	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-07763
	Valvas de <i>Cyprididae</i>	ECO-CH-Z-07764
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
Tenancingo	<i>Cypretta campechanensis</i> n. sp.	ECO-CH-Z-07528
	<i>Strandesia intrepida</i>	ECO-CH-Z-07742
	<i>Cypridopsis</i> sp 2	ECO-CH-Z-07671
	Valvas de <i>C. ilosvayi</i>	-----
Carr.Tenancingo	<i>Cypridopsis</i> sp 2	ECO-CH-Z-07671
	<i>Darwinula stevensoni</i>	ECO-CH-Z-07672
Las Golondrinas	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	Valvas de <i>C. ilosvayi</i>	-----
	<i>Strandesia intrepida</i>	ECO-CH-Z-07741
	<i>Diaphanocypris meridana</i>	-----
Manantial 1	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	Valvas de <i>Cyclocypridinae</i>	-----
	Valvas de <i>S. intrepida</i>	-----
Rio Grande, Gol.	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	Limnocythere sp	ECO-CH-Z-07766
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
Aguada de la Lag.	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-07680
	<i>Cypridopsis</i> sp 2	ECO-CH-Z-07681
Bodegas 2	<i>Cyprinotus unispinifera</i>	-----
	<i>Cypria</i> sp. 1	ECO-CH-Z-07757
	<i>Cyprididae</i> sp 1	ECO-CH-Z-07740
Laguna Esmeralda	<i>Cypretta campechensis</i> n. sp.	ECO-CH-Z-07526
Playa P. Baranda	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Strandesia intrepida</i>	ECO-CH-Z-07760
Salto Grande	<i>Darwinula stevensoni</i>	ECO-CH-Z-07777
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-07749
Laguna Maravillas	<i>Limnocythere</i> cf. <i>stationis</i>	ECO-CH-Z-07731
	<i>Typhlocypris</i> cf. <i>annae</i>	ECO-CH-Z-07699
Rio P. Baranda	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Rio Candelaria	Valvas de <i>Limnocythere</i>	-----
	<i>Alicenula serricaudata</i>	ECO-CH-Z-07759
Puente Salinero	Valvas de <i>Cytheridae</i>	-----
Las Lagunas	<i>Cypria</i> cf. <i>gibbera</i>	ECO-CH-Z-07713

Coyuquilla	<i>Riocypris</i> sp.	ECO-CH-Z-07762
	<i>Cyprinotinae</i> sp 6	ECO-CH-Z-07776
	<i>Bradleycypris</i> sp.	ECO-CH-Z-07770
Laguna Encantada	<i>Cypridopsis</i> sp 3	ECO-CH-Z-06160
	<i>Strandesia intrepida</i>	ECO-CH-Z-07718
Tzascabera Ramonal	<i>Diaphanocypris meridana</i>	ECO-CH-Z-07689
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Limnocythere cf. stationis</i>	ECO-CH-Z-06182
Dos Aguadas II Rancho C. Camp. N.	<i>Cypridopsis</i> sp 3	ECO-CH-Z-06215
	<i>Chlamydotheca unispinosa</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Cypricercus cf. cuneatus</i>	ECO-CH-Z-07720
Laguna Tortugas	Valvas de <i>Limnocythere</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
La Peñal Silvituc	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Strandesia intrepida</i>	ECO-CH-Z-07721
	<i>Cypretta campechensis</i> n. sp.	ECO-CH-Z-07516
	<i>Cypretta spinosa</i> n. sp.	ECO-CH-Z-07520
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-06242
C. Sabak ha Laguna Ucum	<i>Cypridopsis</i> sp 3	ECO-CH-Z-06248
	<i>Cypridopsis</i> sp 4	ECO-CH-Z-06153
	<i>Typhlocypris</i> sp 3	ECO-CH-Z-06256
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-06253
	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06225
C. Abala	<i>Darwinula stevensoni</i>	ECO-CH-Z-07784
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Km 156 Carr-Tulum	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Alicenula serricaudata</i>	ECO-CH-Z-06152
C. Azul	<i>Strandesia intrepida</i>	-----
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Vestalenula cf. pagliolii</i>	ECO-CH-Z-07788
C. Chichi	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06150
	<i>Cypridopsis</i> sp 4	ECO-CH-Z-06148
C. Xanel ha	<i>Cypridopsis</i> sp 4	ECO-CH-Z-06155
C. Actun ha	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
C. Cristal	<i>Darwinula stevensoni</i>	ECO-CH-Z-06156
	Juvenil de <i>C. ilosvayi</i>	-----
Silvituc	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-06242
	<i>Strandesia intrepida</i>	ECO-CH-Z-07721
C. X keken	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
C. Antum	<i>Chlamydotheca unispinosa</i>	ECO-CH-Z-06251
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
Xombacal	Valvas de <i>Darwinulidae</i>	-----
El Padre	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-06147
Minicenote	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06229
	Valvas de <i>C. ilosvayi</i>	-----

Yokdzonot	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
Xtojil	<i>Cypridopsis 4</i>	ECO-CH-Z-07697
	<i>Alicenula serricaudata</i>	ECO-CH-Z-07695
	Valvas de <i>Cytheridella</i>	-----
	<i>Keysercypria xanabanica</i>	ECO-CH-Z-07696
C. Galeana	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	ECO-CH-Z-06218
	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06220
	<i>Alicenula serricaudata</i>	ECO-CH-Z-07783
C. Yalutzil	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
C. Yax Ek	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Cypridopsis sp 4</i>	-----
Misol-ha	<i>Vestalenula sp 1</i>	ECO-CH-Z-07789
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Agua Azul Canal	<i>Vestalenula sp 1</i>	ECO-CH-Z-07779
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
Palenque	<i>Vestalenula sp 1</i>	ECO-CH-Z-07790
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Poza puente Murci.	<i>Vestalenula sp 1</i>	-----
Laguna Guerrero	Valvas de <i>Timiriasevinae</i>	-----
	Valvas de <i>Darwinulidae</i>	-----
	Valvas de <i>Cytheridae</i>	-----
Laguna Verde canal	<i>Cypria pseudocrenulata</i>	ECO-CH-Z-07705
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Laguna Clara Chet.	<i>Cypria pseudocrenulata</i>	ECO-CH-Z-07673
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Laguna de Curva	<i>Cypria pseudocrenulata</i>	ECO-CH-Z-07676
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Quechulac	<i>Limnocythere(Limnocytherina)</i>	ECO-CH-Z-07551
	<i>axalapasco n. sp.</i>	
	Valvas de <i>Darwinulidae</i>	-----
Alchichica	<i>Limnocythere(Limnocytherina)</i>	ECO-CH-Z-07556
	<i>axalapasco n. sp.</i>	
	Valvas de <i>Cyprididae</i>	-----
La Preciosa	<i>Limnocythere(Limnocytherina)</i>	ECO-CH-Z-07555
	<i>axalapasco n. sp.</i>	
	Valvas de <i>Candonidae</i>	-----
San José 3 Garantías	<i>Typhlocypris elliptica</i>	ECO-CH-Z-07701
	<i>Cypretta campechensis n. sp.</i>	ECO-CH-Z-07527
	<i>Vestalenula pagliolii</i>	ECO-CH-Z-07787
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
Humedal M. Hidalgo	<i>Cyprinotinae sp 1</i>	-----
Carretera al Tigre	<i>Cypretta campechensis n. sp.</i>	ECO-CH-Z-07524
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Zempoala lit.	<i>Cypridopsis sp 1</i>	ECO-CH-Z-07771
Zempoala veg.	<i>Cypridopsis sp.1</i>	ECO-CH-Z-07771

	<i>Cyprinotinae</i> sp. 2	ECO-CH-Z-07738
Danxo Vert.	-----	-----
Laguna Vernet 2 Sec	<i>Cypria</i> cf. <i>kraepelini</i>	ECO-CH-Z-07712
Carr. Aca-Cosama.	<i>Cyprinotinae</i> sp 1	ECO-CH-Z-07709
Humedal 2 M. Hid.	<i>Cyprinotinae</i> sp 1	-----
Charco 1 Jon-Esc.	<i>Cyprinotinae</i> sp 1	-----
C. 1 Santa Lucía	Juveniles de <i>Cyclocypridinae</i>	-----
Silvituc equiseto	<i>Cypretta campechenensis</i> n. sp.	ECO-CH-Z-07518
	<i>Cypretta spinosa</i> n. sp.	ECO-CH-Z-07520
	<i>Cypridopsis</i> sp 3	ECO-CH-Z-06248
Charco 3 Jon-Esc	<i>Diaphanocypris meridana</i>	-----
	<i>Cyprinotus unispinifera</i>	-----
	<i>Cyprinotinae</i> sp 1	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Timilpan	valvas de <i>Limnocythere</i>	-----
	<i>Potamocypris</i> sp juvenil	-----
Laguna E. Zapata	-----	-----
Carr. Aca-Cosama.	<i>Cyprinotinae</i> sp 1	ECO-CH-Z-07709
Pozo 5 Pue-Orizaba	<i>Heterocypris</i> cf. <i>congenera</i>	ECO-CH-Z-07735
P. Ignacio Ramirez	<i>Cypridopsis</i> sp 1	-----
Pozo 4 Pue-Orizaba	<i>Heterocypris</i> cf. <i>congenera</i>	ECO-CH-Z-07728
Pozo 2 Pue-Orizaba	<i>Heterocypris</i> cf. <i>congenera</i>	-----
Pozo 3 Pue-Orizaba	<i>Heterocypris</i> cf. <i>congenera</i>	-----
Laguna Vernet Lit	<i>Cyprinotinae</i> sp 1	ECO-CH-Z-07708
	<i>Cypria</i> cf. <i>kraepelini</i>	ECO-CH-Z-07712
P. San Nicolás	Juvenil de <i>Potamocypris</i>	-----
Hum. Pte. Milagros	<i>Strandesia intrepida</i>	ECO-CH-Z-07778
	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Laguna Pte. Mil.	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Laguna Pte. Mil. 2	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
Usumacinta Jonuta	Juveniles de <i>Cyprididae</i>	-----
Chan Laguna	<i>Cyprinotinae</i> sp 5	ECO-CH-Z-07774
La Preciosa	<i>Limnocythere</i> (<i>Limnocytherina</i>) <i>axalapasco</i> n. sp.	ECO-CH-Z-07554
Valsequillo	<i>Potamocypris unicaudata</i>	ECO-CH-Z-07757
Noh Bec vert.	-----	-----
Emiliano Zapata	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
C. Campamento	-----	-----
Aguada II Zoh Lag	<i>Cypridopsis</i> sp 3	ECO-CH-Z-06215
C. La Laguna	-----	-----
Lag. Encantada Vert.	<i>Cypridopsis vidua</i>	ECO-CH-Z-06160
Cerca Koh. vertical	-----	-----
Rio mata caña	-----	-----
Boca de Ovejas	-----	-----

La Tinaja	----	-----
Chachalacas	----	-----
Rincón de Parangueo	----	-----
La Goleta	----	-----
Km 51 Tin-Aca.	----	-----
La Esperanza	----	-----
Cerca Dzulá	----	-----
Charco Dzulá	----	-----
Charco Alto-Coatza.	----	-----
Kohunlich Charco 1	----	-----
La Goleta vertical	----	-----
Flor del Bosque	----	-----
Xbatum	----	-----
Cempoala vert.	----	-----
Pozo de Agua 1	----	-----
Usumacinta Hor.	----	-----
Silvituc vertical	----	-----
P. Isla de las Aves	----	-----
Teopizca	----	-----
Lag. Tol-Atl.	----	-----
Canal Bach. Chet.	----	-----
P. Ignacio Ramirez	<i>Cypridopsis</i> sp 1	-----
Danxo vertedero	<i>Potamocypris variegata</i>	ECO-CH-Z-07754
Charco 1 Car-Tulum	<i>Cypretta maya</i> n. sp.	ECO-CH-Z-07521
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	<i>Diaphanocypris meridana</i>	-----
Manantial 2	<i>Cytheridella ilosvayi</i>	-----
	<i>Strandesia intrepida</i>	-----
	<i>Cypridopsis vidua</i>	-----
	Valvas de <i>Candonidae</i>	ECO-CH-Z-07773
Dos Aguadas III	<i>Cypridopsis inaudita</i>	ECO-CH-Z-06170

*Especies con incertidumbre taxonómica

Anexo 3. Caracterización de especies seleccionadas con incertidumbre taxonómica.

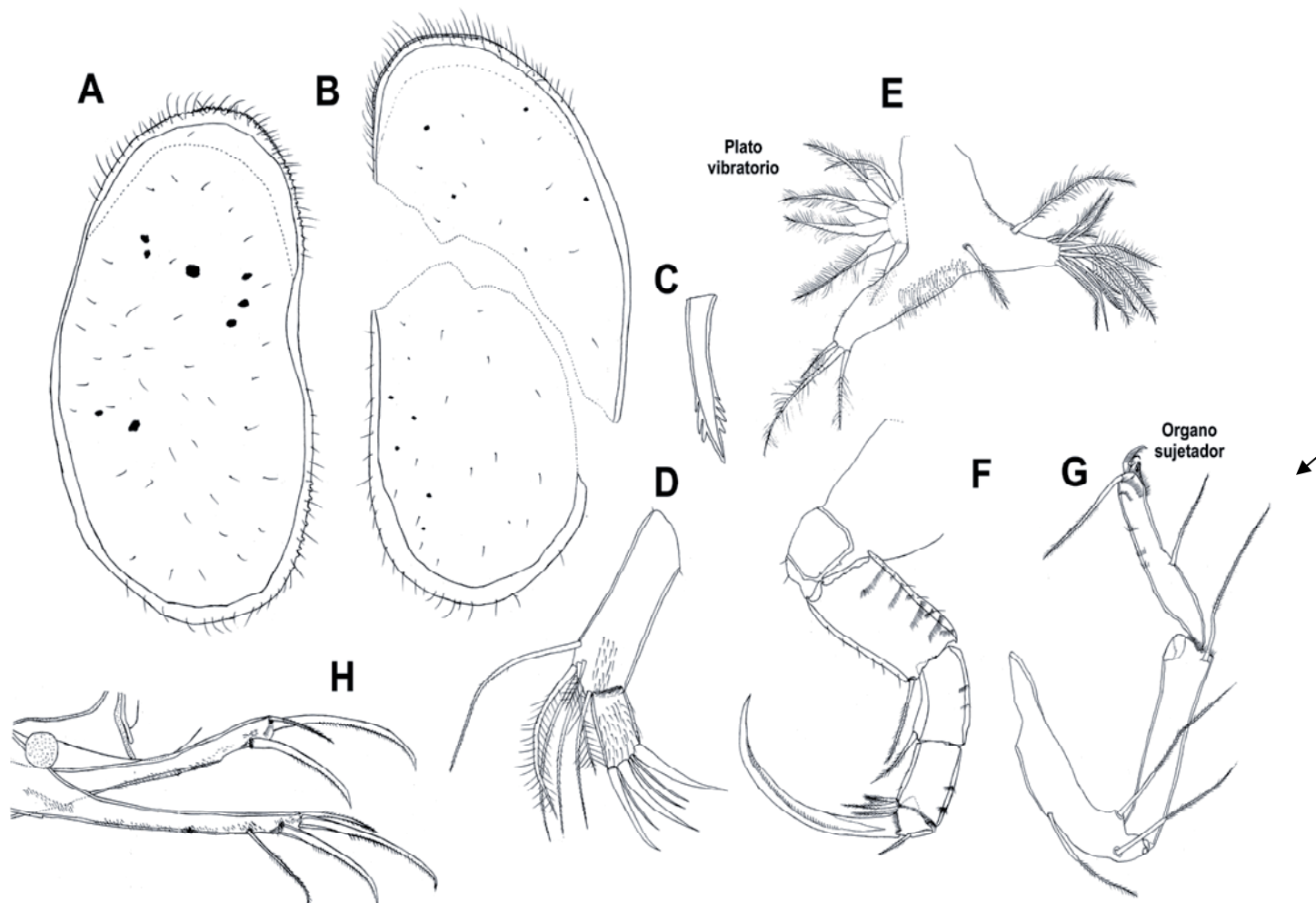


Figura 25. *Cyprinotinae* sp 1, Tabasco. Hembra. A) Valva derecha; B) Valva izquierda; C) Endito del segundo proceso maxilar; D) Palpo maxilar; E) T1; F) T2; G) T3. Imágenes no a escala.



Figura 26. *Typhlocypris* cf. *annae*. Laguna Maravillas, Campeche. Macho. A) Valva Derecha; B) Valva Izquierda; C) Maxila; D) Palpo prensil izquierdo; E) T1 derecho con exopodito transformado en Palpo prensil; F) Hemipene; G) T3; H) UR. Imágenes no a escala.

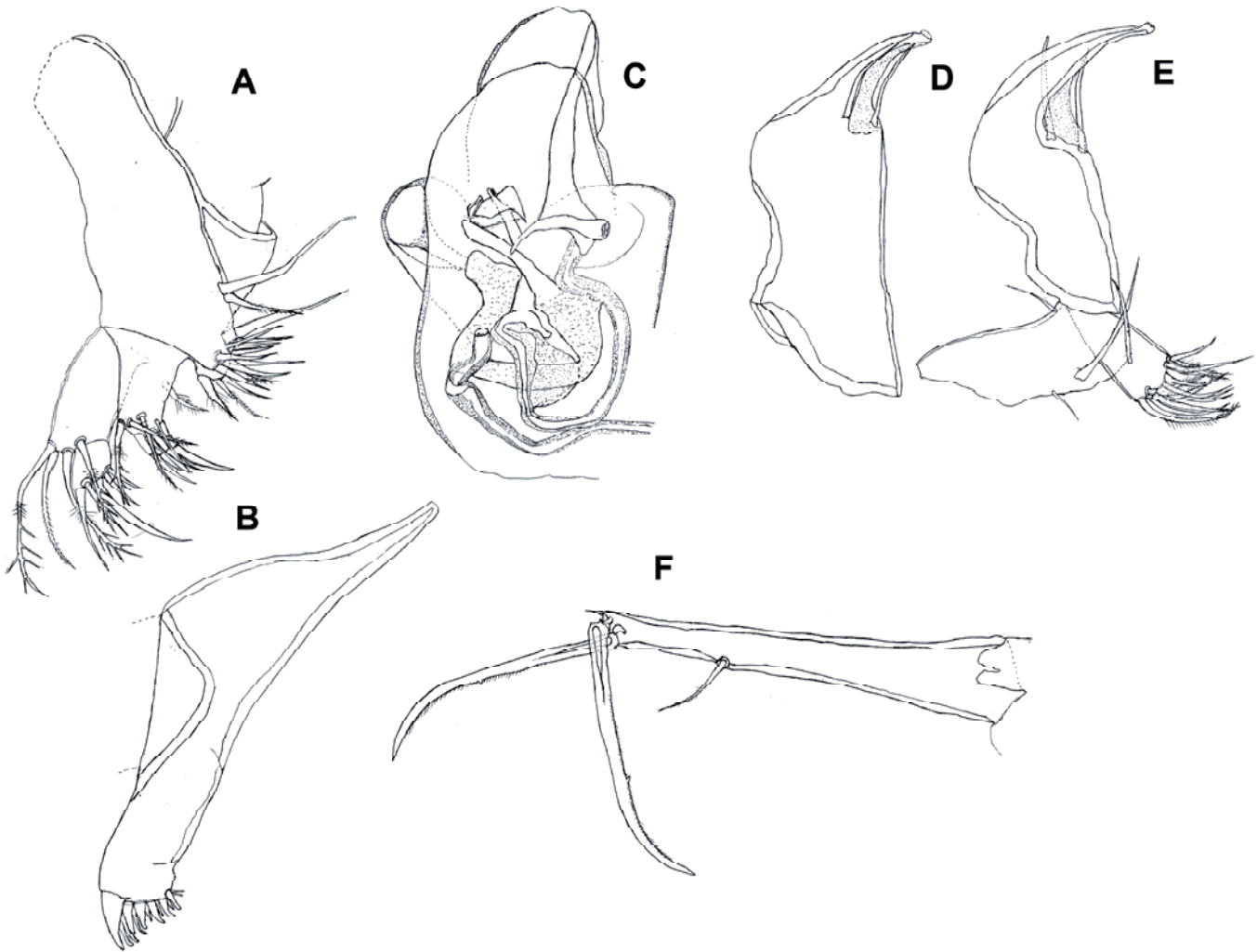


Figura 27. *Typhlocypris elliptica*. Tres Garantías, Quintana Roo. Macho. A) Maxila; B) Mandibula; C) Hemipene; D) Palpo prensil izaquierdo; E) T1 derecha con el exopodito transformado en palpo prensil; F) UR. Imágenes no a escala.

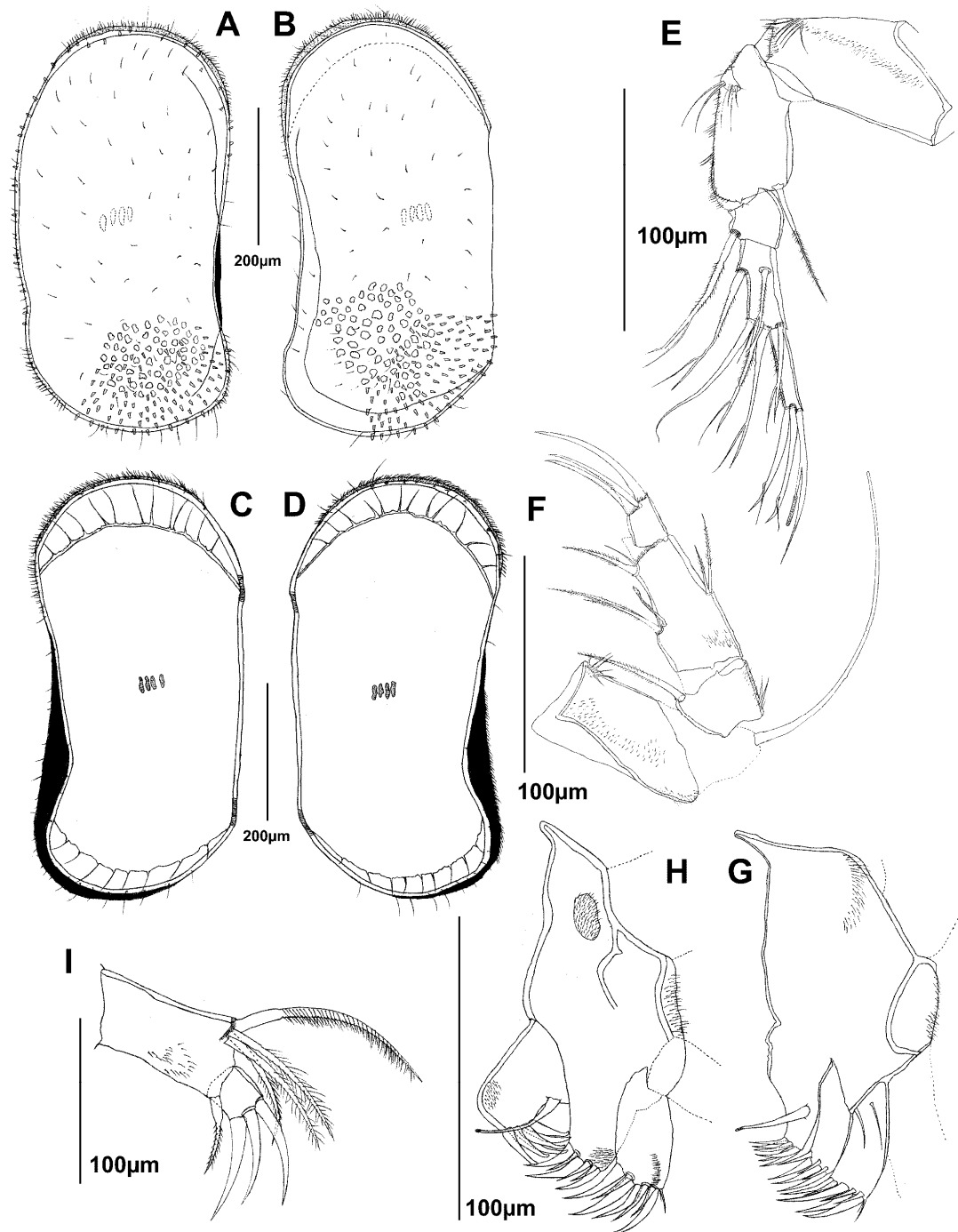


Figura 28. *Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco* n. sp. Alchichica, Puebla. Hembra. A) RV vista externa; B) LV vista externa; C) RV vista interna; D) LV vista externa; E) A1; A) A2; G) Mxl; H) Mxl con variación en el 4to endito; I) Palpo Maxilar.

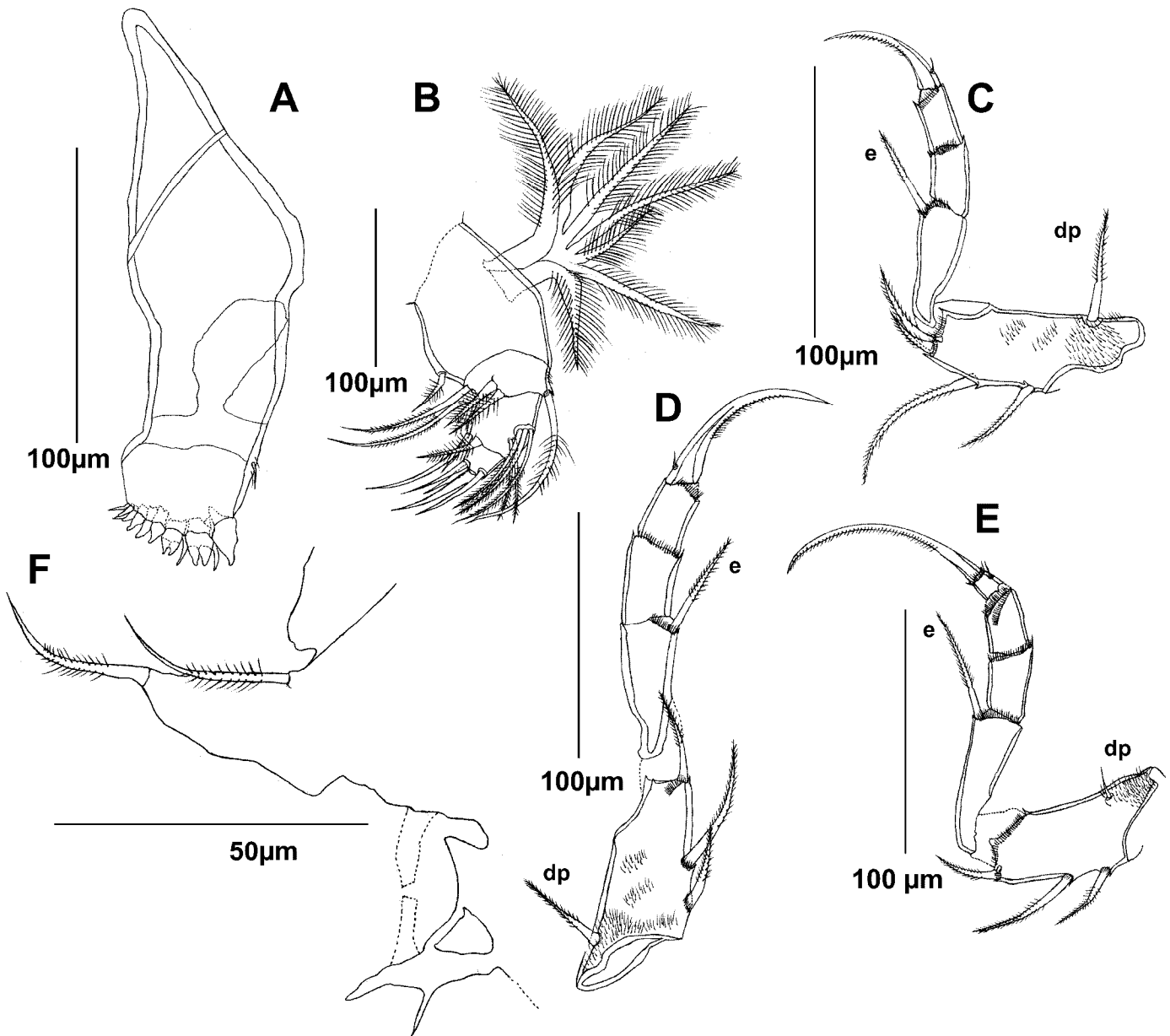


Figura 29. *Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco* n. sp. Alchichica, Puebla. Hembra. A) Md; B) Palpo Mandibular; C) T1; D) T2; E) T3; F) UR y cavidad sexual.

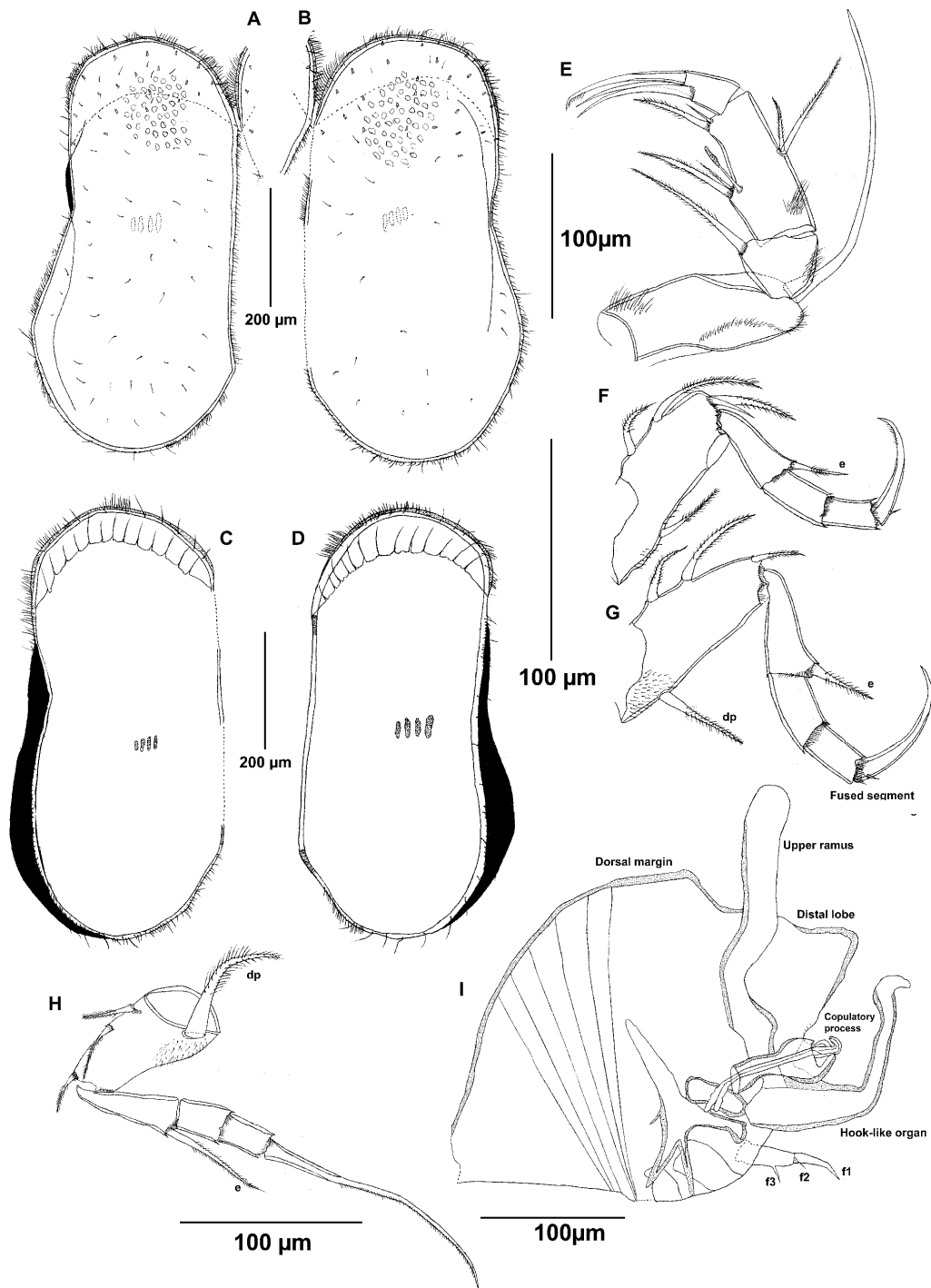


Figura 30. *Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco* n. sp. Alchichica, Puebla. Macho. A) LV vista externa; B) RV vista externa; C) RV vista interna; D) LV vista interna; E) A1; F) T1; G) T2; H) T3; I) Hemipene.

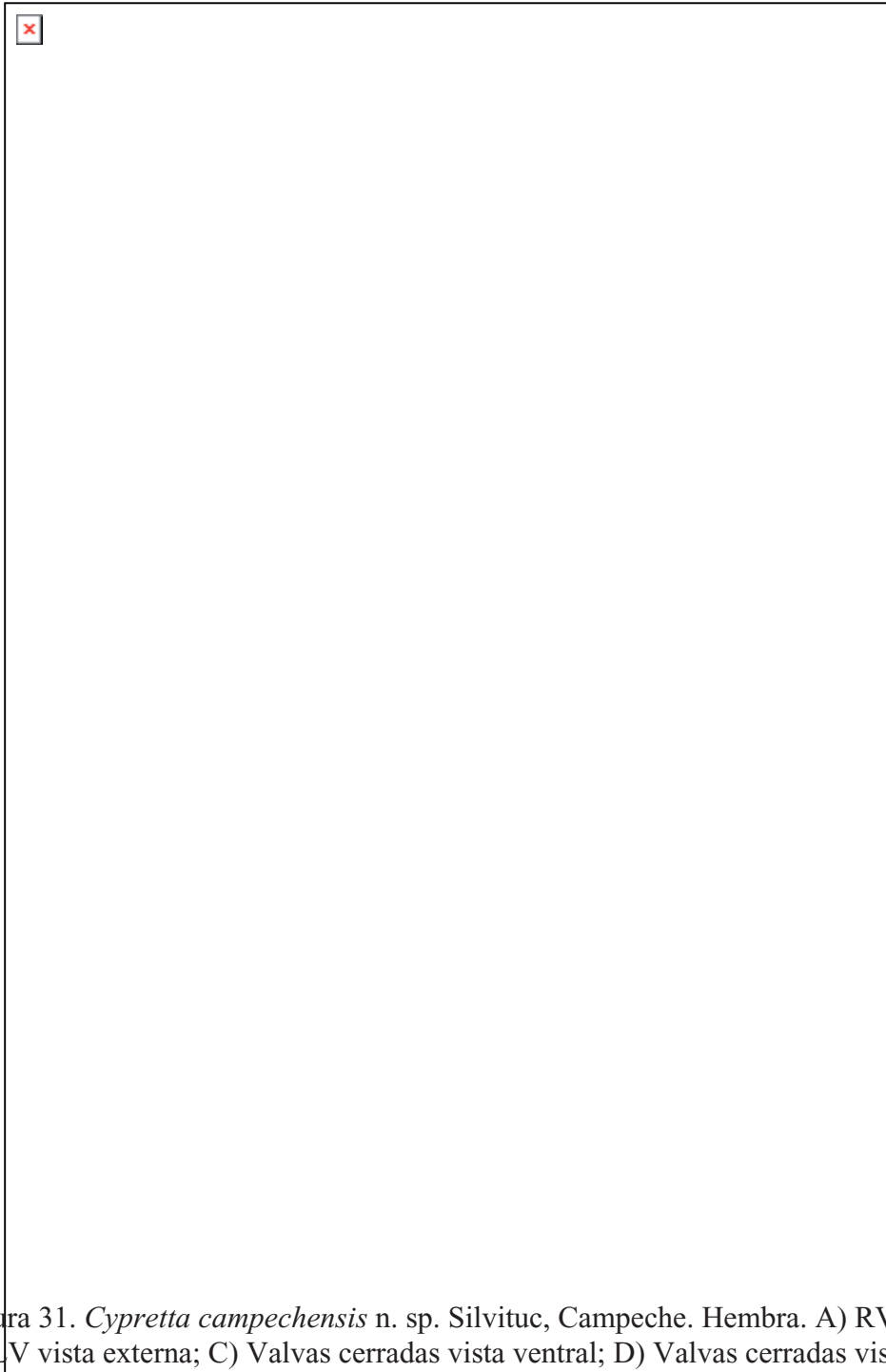


Figura 31. *Cypretta campechensis* n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) RV vista externa; B) LV vista externa; C) Valvas cerradas vista ventral; D) Valvas cerradas vista dorsal; E) RV vista interna; F) LV vista interna.

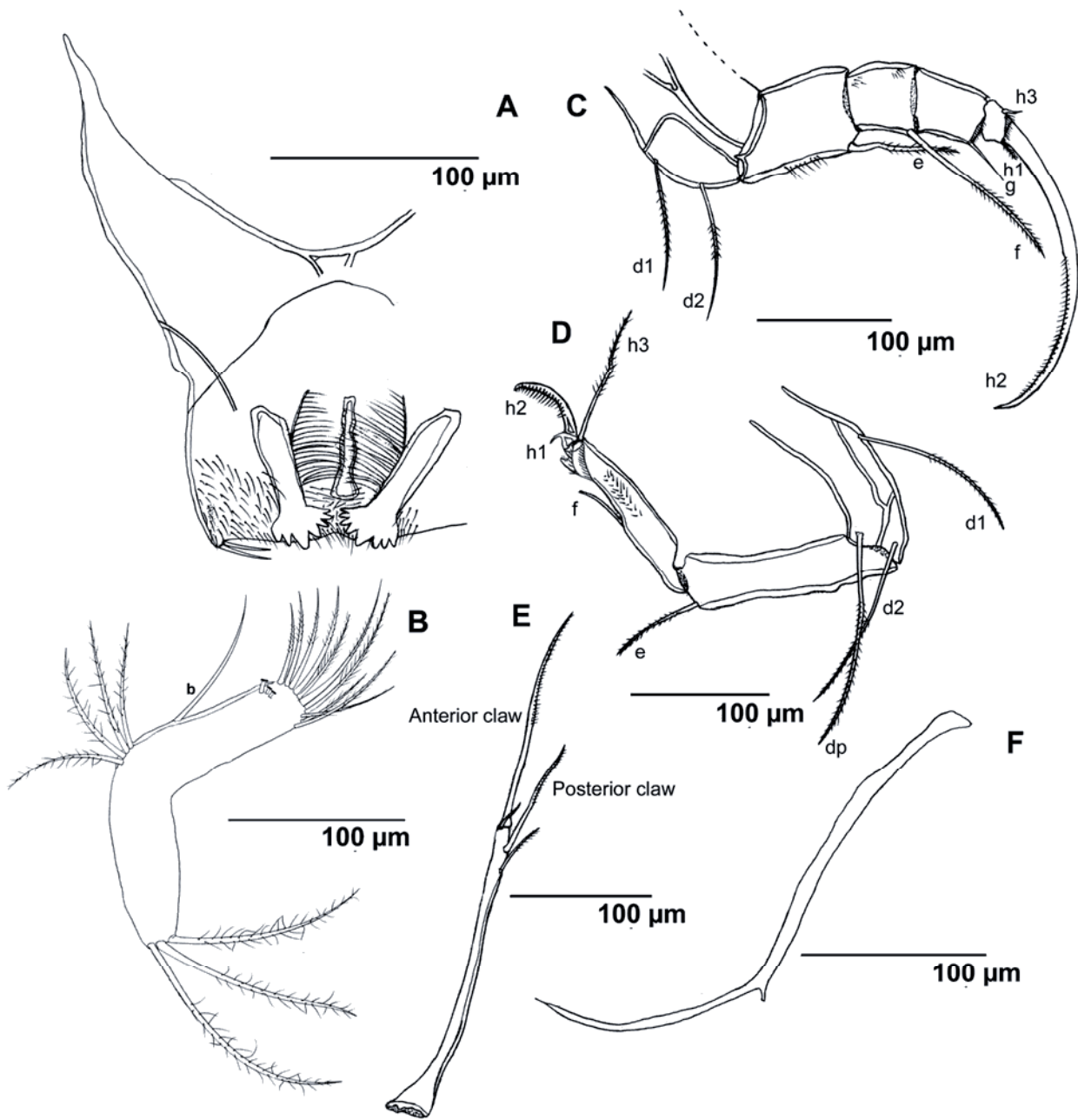


Figura 33. *Cypretta campechensis* n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) Labio Superior y órgano de rastrillo; B) T1; C) T2; D) T3; E) UR; F) Soporte del UR.

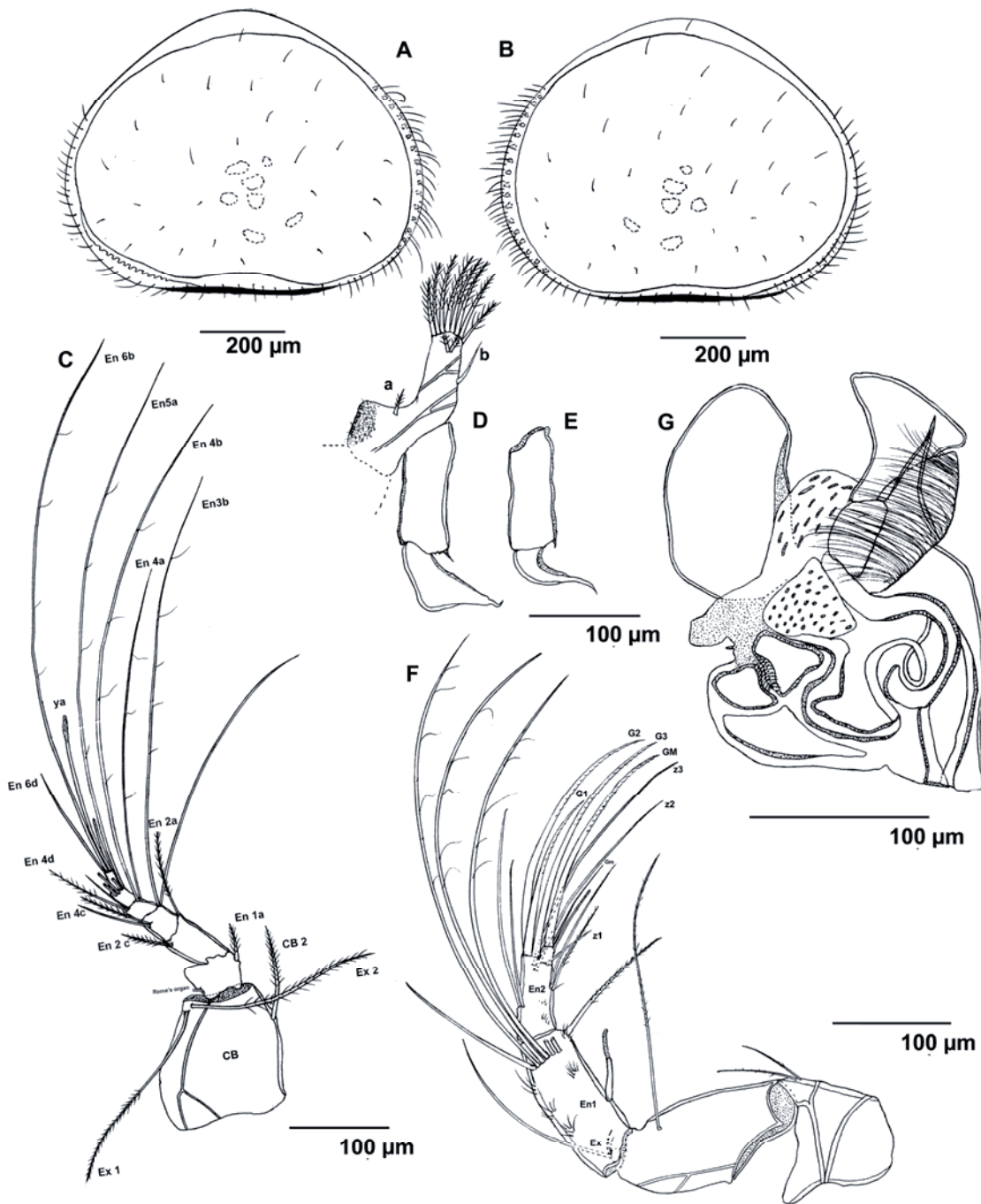


Figura 34. *Cypretta campechensis* n. sp. Silvituc, Campeche. Macho. A) Valva derecha; B) Valva izquierda; C) A1; D) T1 izquierda con el endopodito transformado en palpo prensil; E) Palpo prensil derecho; G) Hemipene.

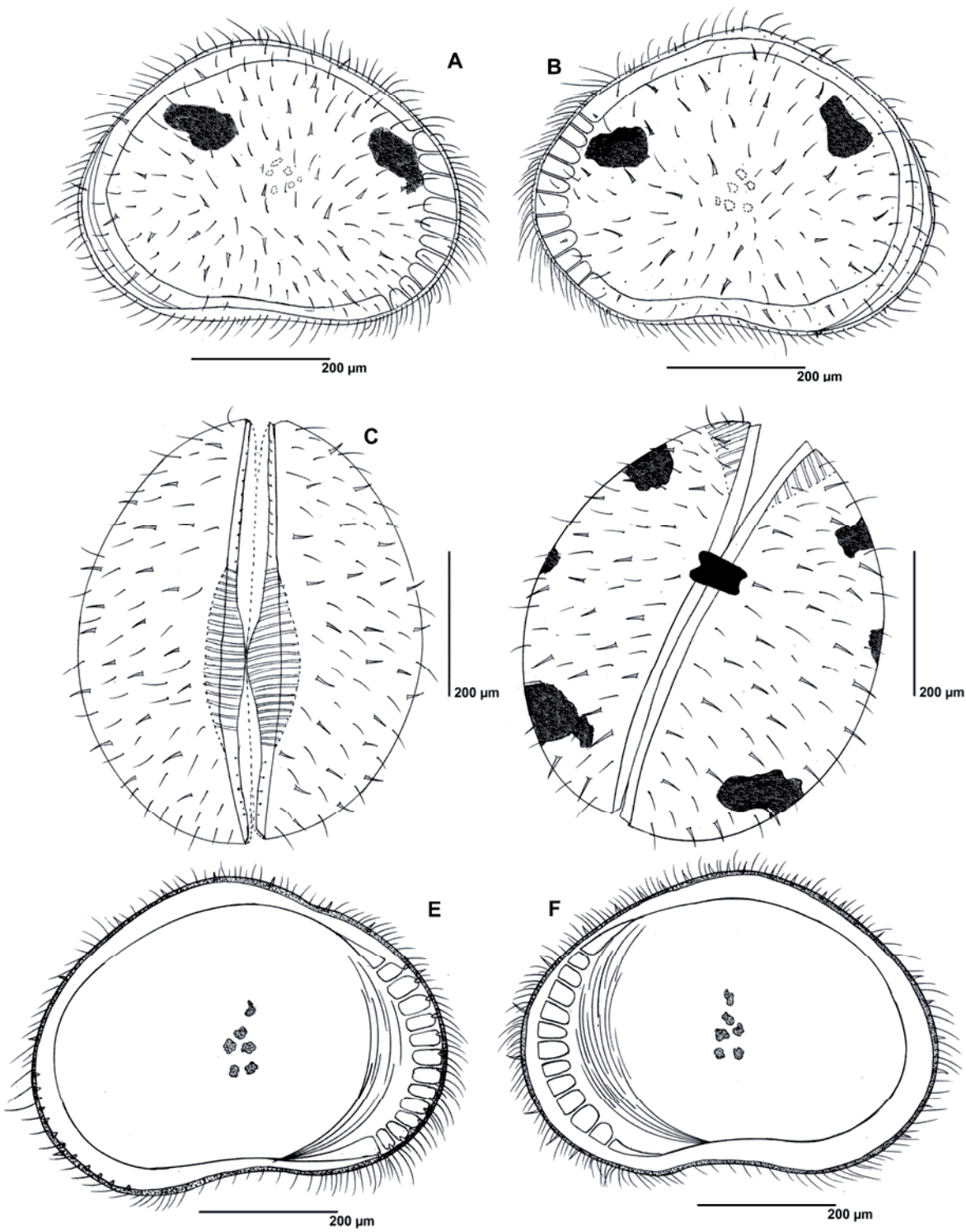


Figura 35. *Cypretta spinosa* n. sp. Silvituc. Campeche. Hembra. A) RV vista externa; B) LV vista externa; C) Valvas cerradas vista ventral; D) Valvas cerradas vista dorsal; E) LV vista interna; F) RV vista interna.

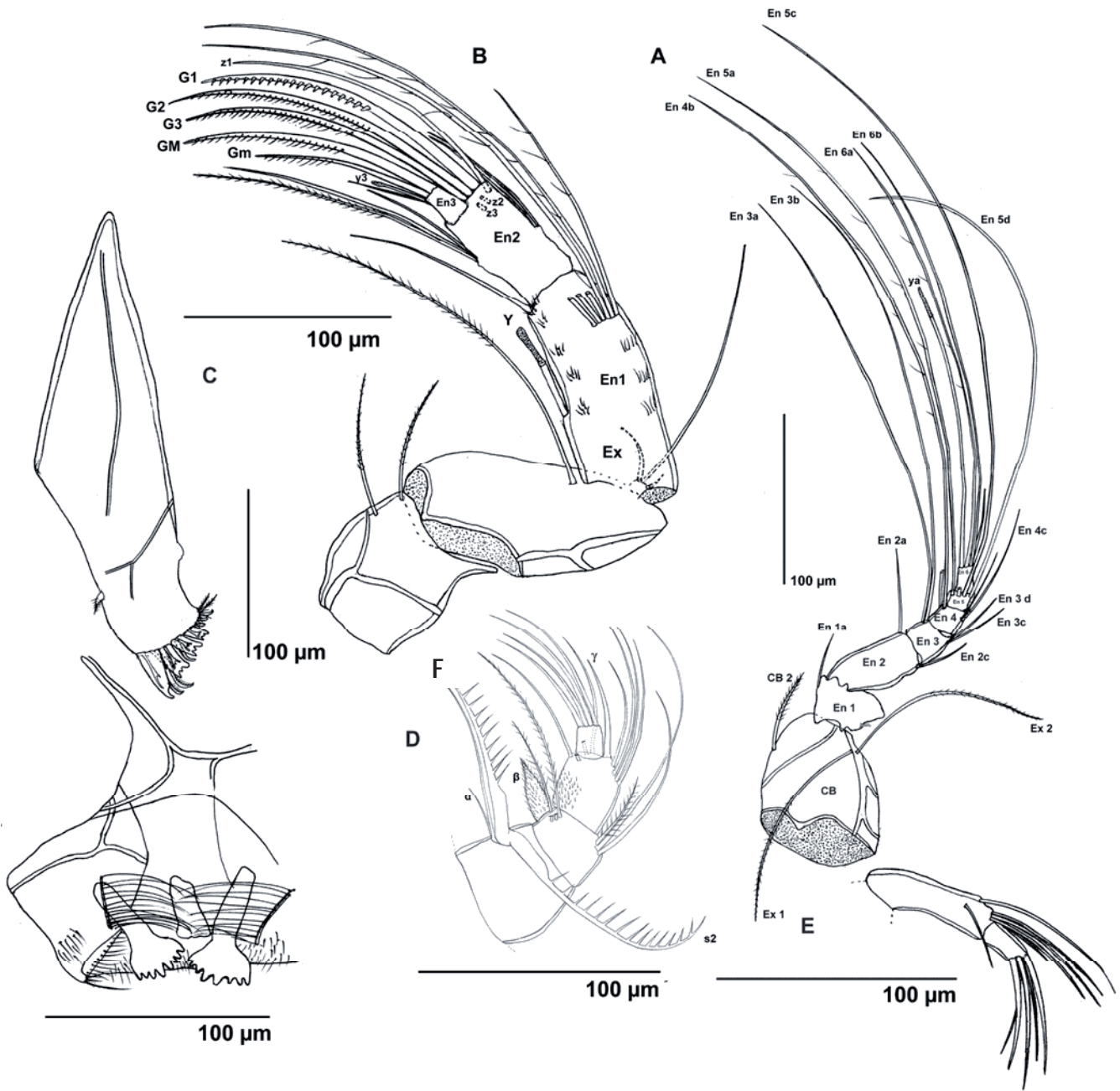


Figura 36. *Cypretta spinosa* n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) A1; B) A2; C) Mandibula; D) Palpo mandibular; E) Palpo maxilar; F) Labio superior mostrando órganos rastrillo.

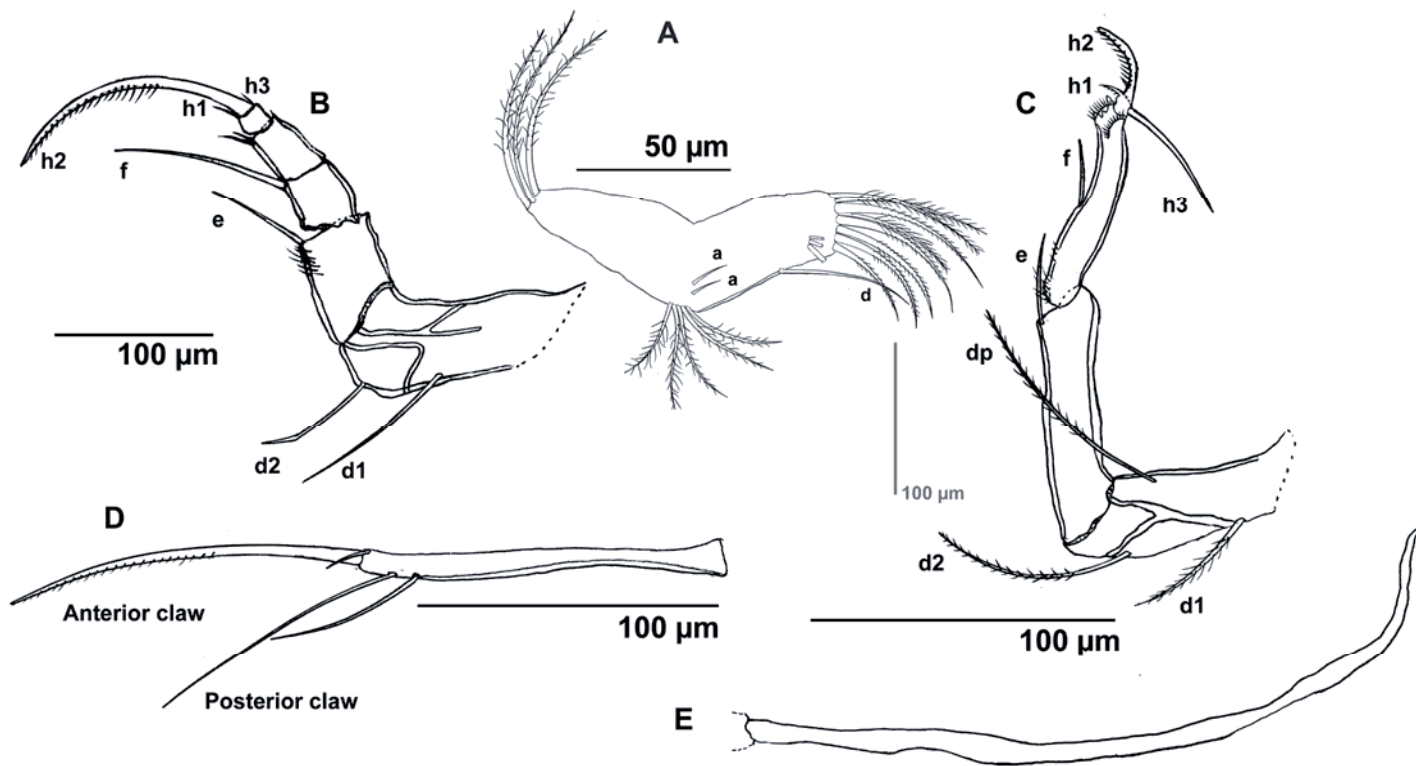


Figura 37. *Cypretta spinosa* n. sp. Silvituc, Campeche. Hembra. A) T1; B) T2; C) T3; D) UR; E) Estructura de soporte del UR.

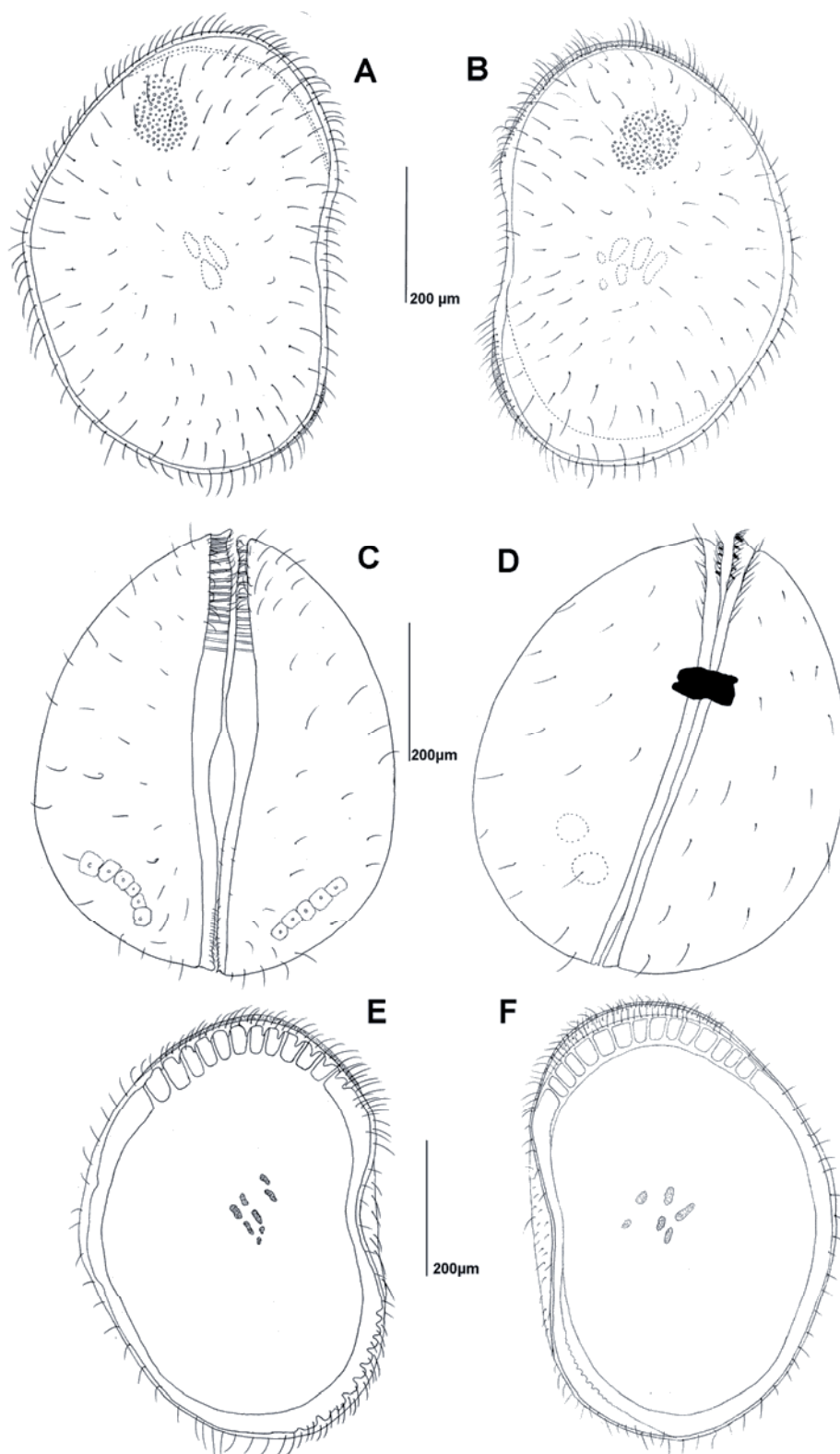


Figura 38. *Cypretta maya* n. sp. Ramonal, Quintana Roo. Hembra. A) RV vista externa; B) LV vista externa; C) Valvas cerradas vista ventral; D) Valvas cerradas vista dorsal; E) LV vista interna; F) RV vista interna.

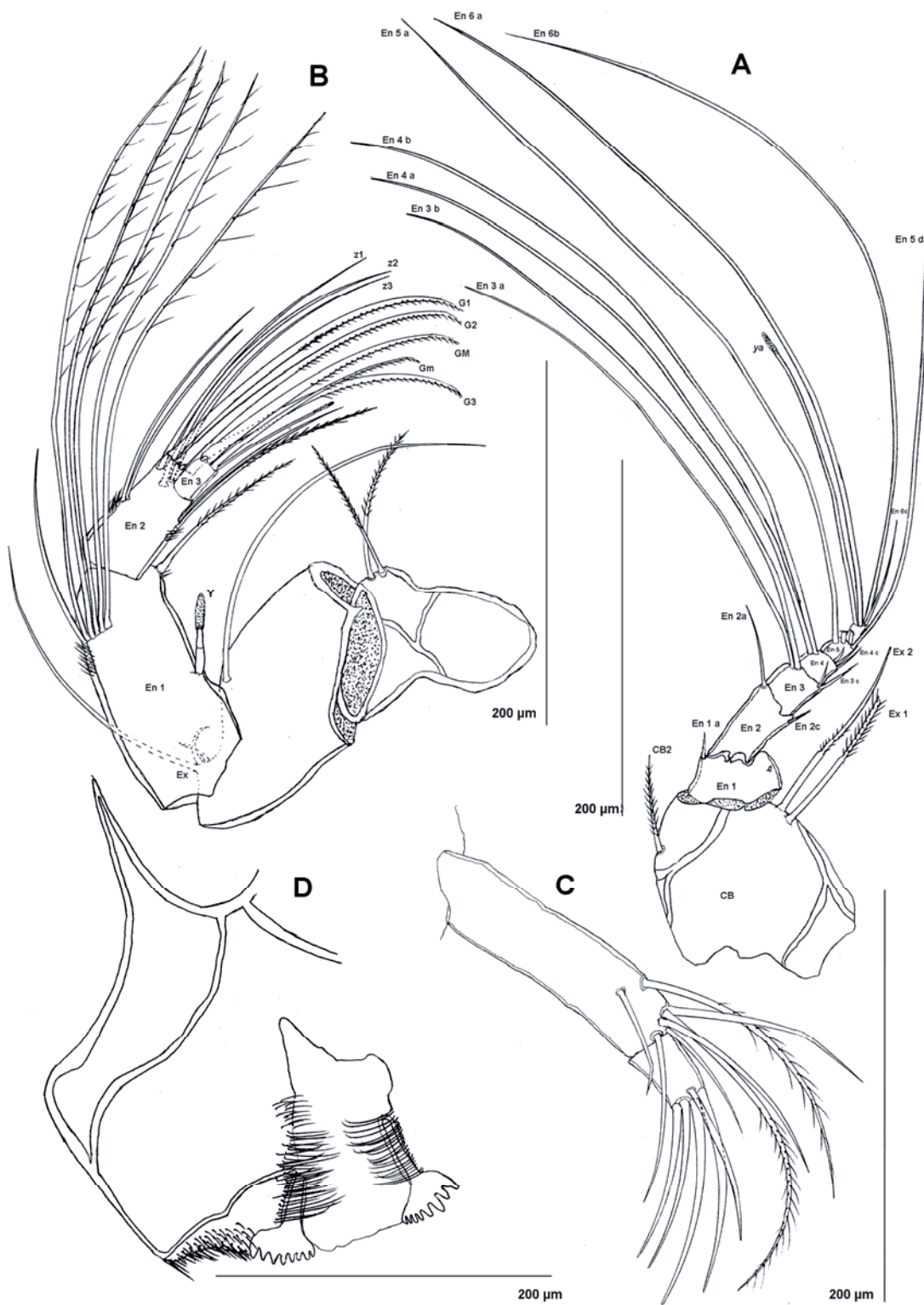


Figura 39. *Cypretta maya* n. sp. Ramonal, Quintana Roo. Hembra. A) A1; B) A2; C) Palpo maxilares; D) Labio superior mostrando los órganos de rastrillo.

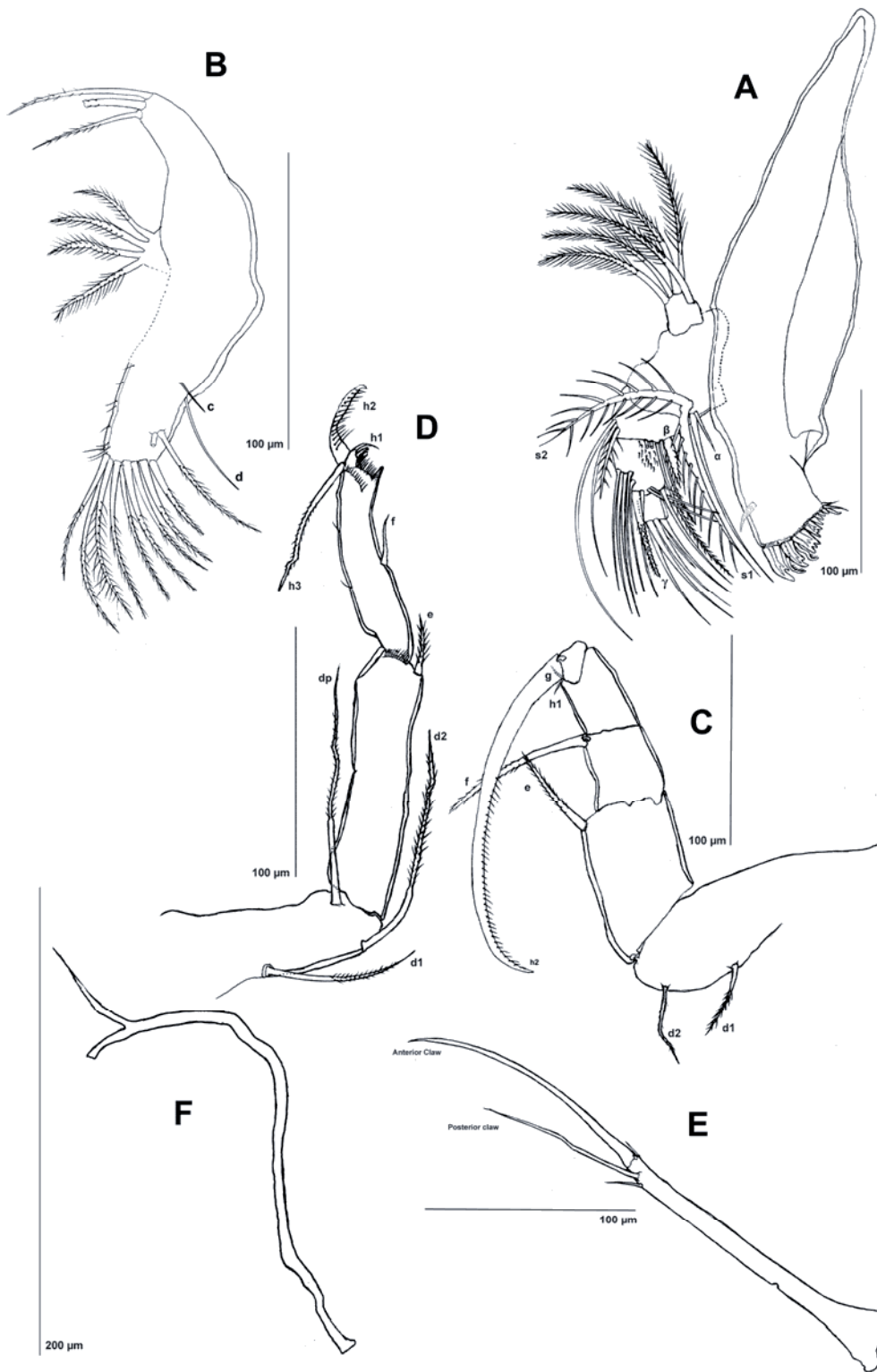


Figura 40. *Cypretta maya* n. sp. Ramonal, Quintana Roo. Hembra. A) Mandíbula con palpo mandibular; B) T1; C) T2; D) T3; E) UR; F) Estructura de soporte de UR.

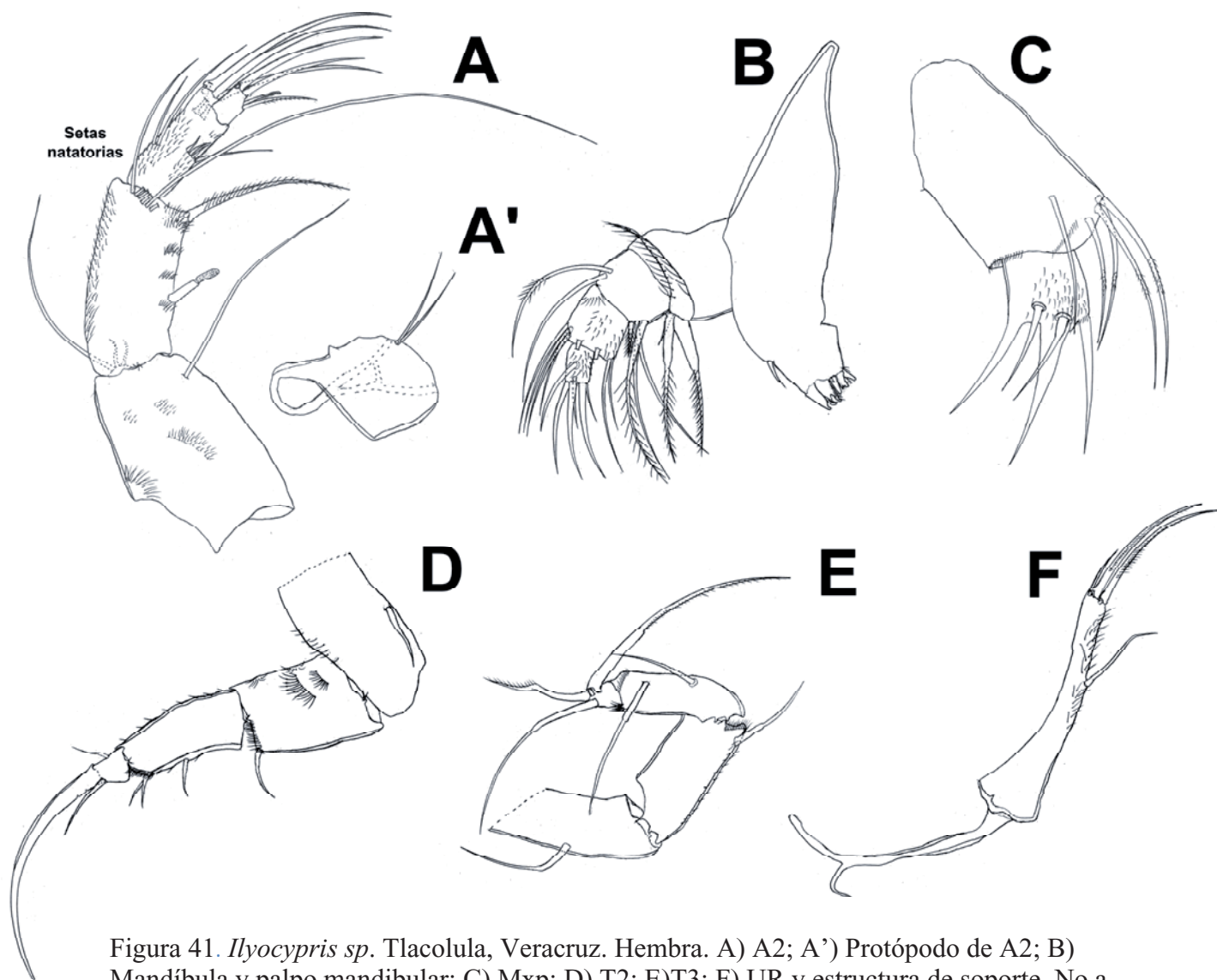


Figura 41. *Ilyocypris* sp. Tlacolula, Veracruz. Hembra. A) A2; A') Protópodo de A2; B) Mandíbula y palpo mandibular; C) Mxp; D) T2; E) T3; F) UR y estructura de soporte. No a escala.

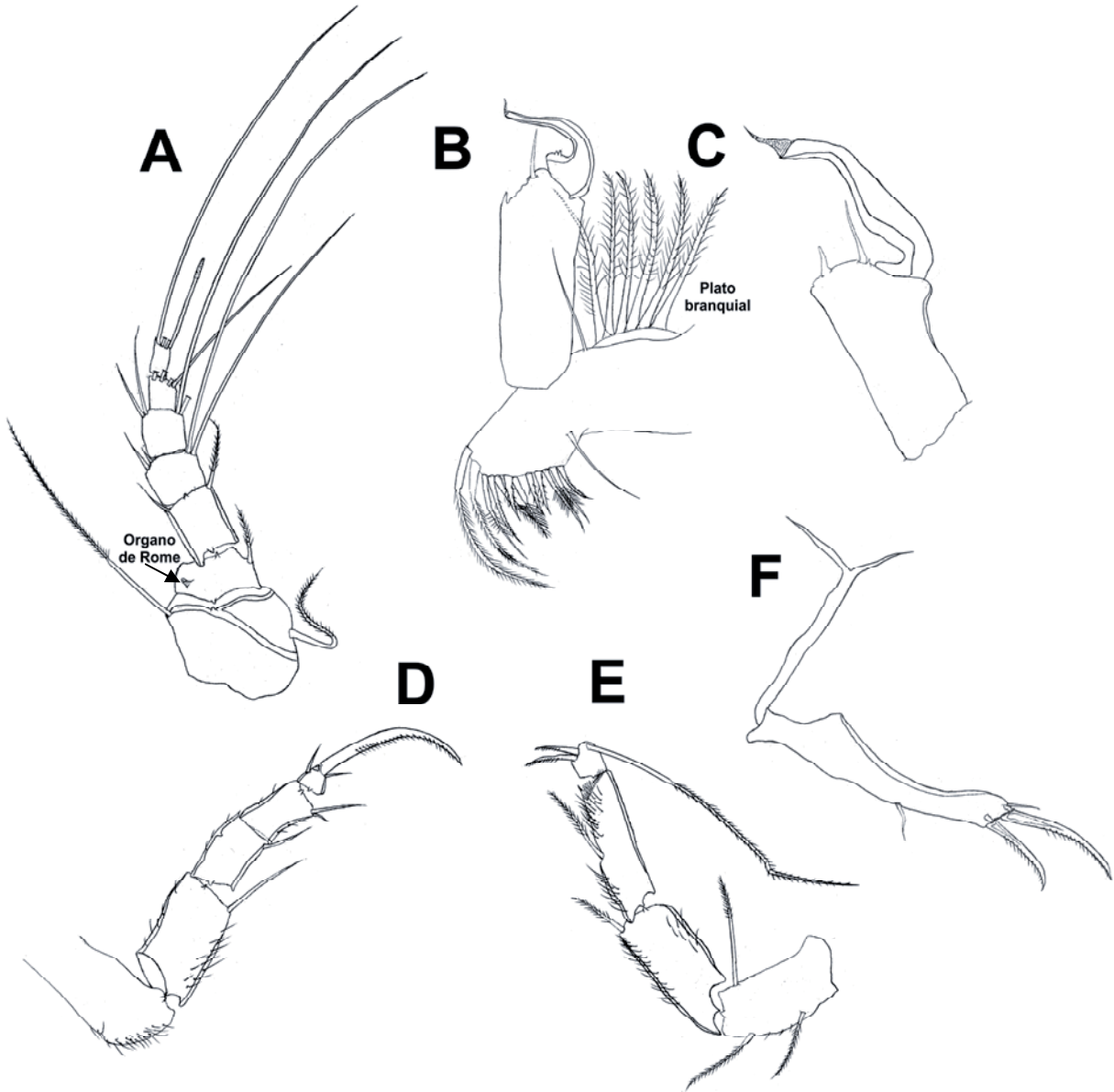


Figura 42. *Cypria sp 2*. Chichancanab. Q uintana Roo. Macho. A) A1; B) T1 con el palpo modificado; C) Palpo prensil izquierdo; D) T2; E) T3; F) UR con estructura de soporte. No a escala.

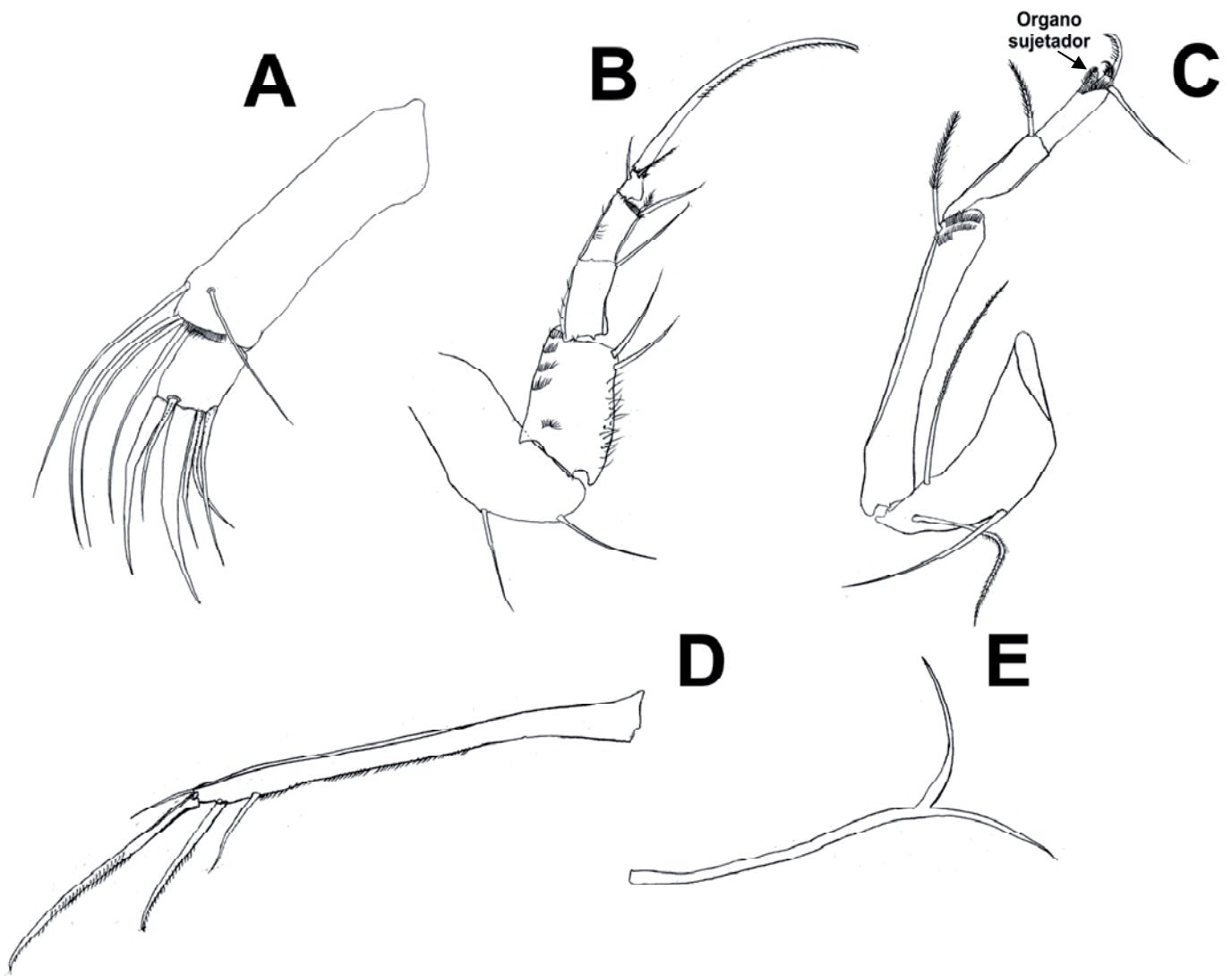


Figura 43. *Chlamydotheca arcuata*. Ramonal, Quintana Roo. Hembra. A) Mxp; B) T2; C) T3; D) UR; E) Estructura de soporte del UR. No a escala.

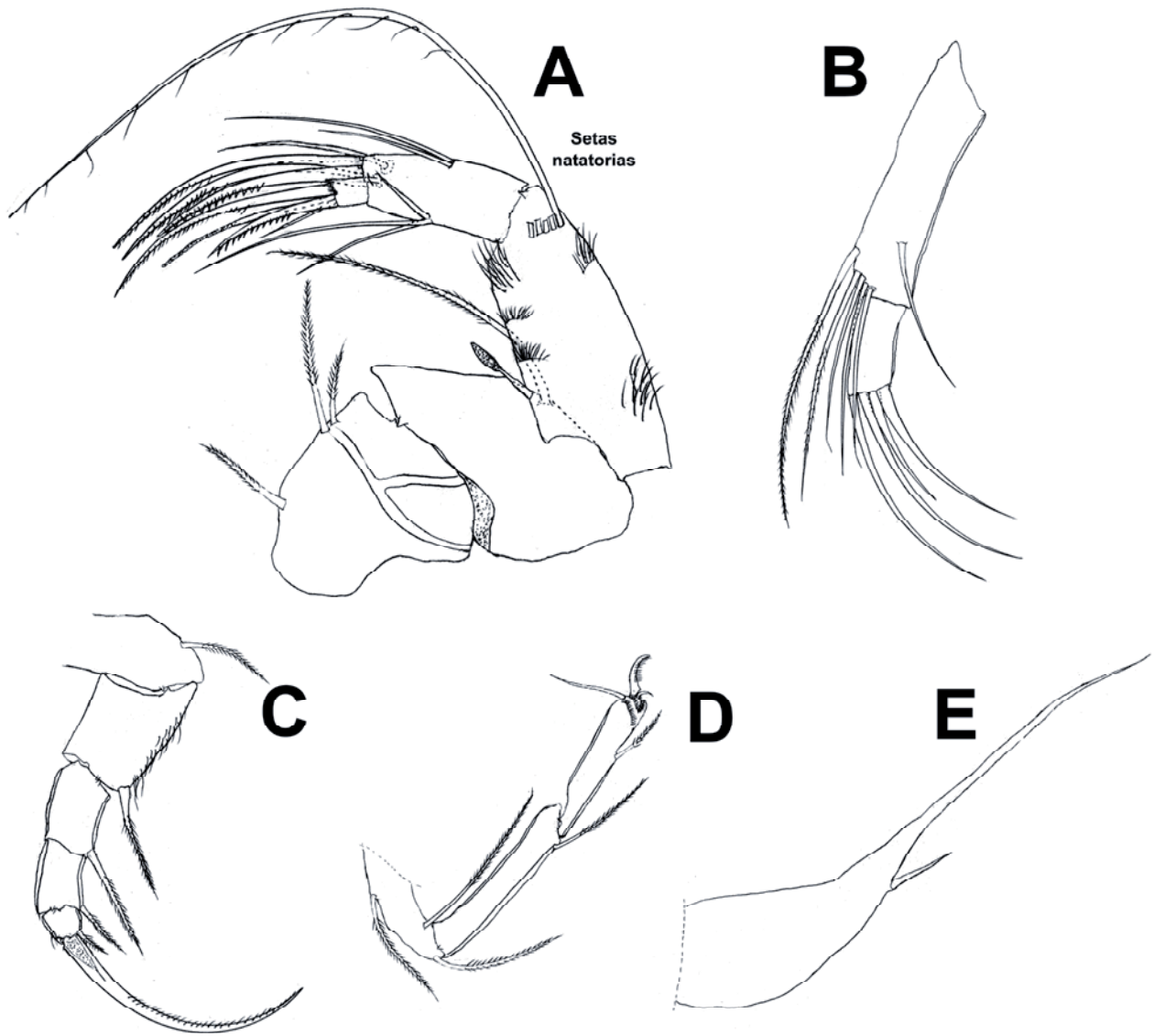


Figura 44. *Cypridopsis sp 1*. Zempoala. Morelos. Hembra. A) A1; B) Mxp; C) T2; D) T3; E) UR setiforme.

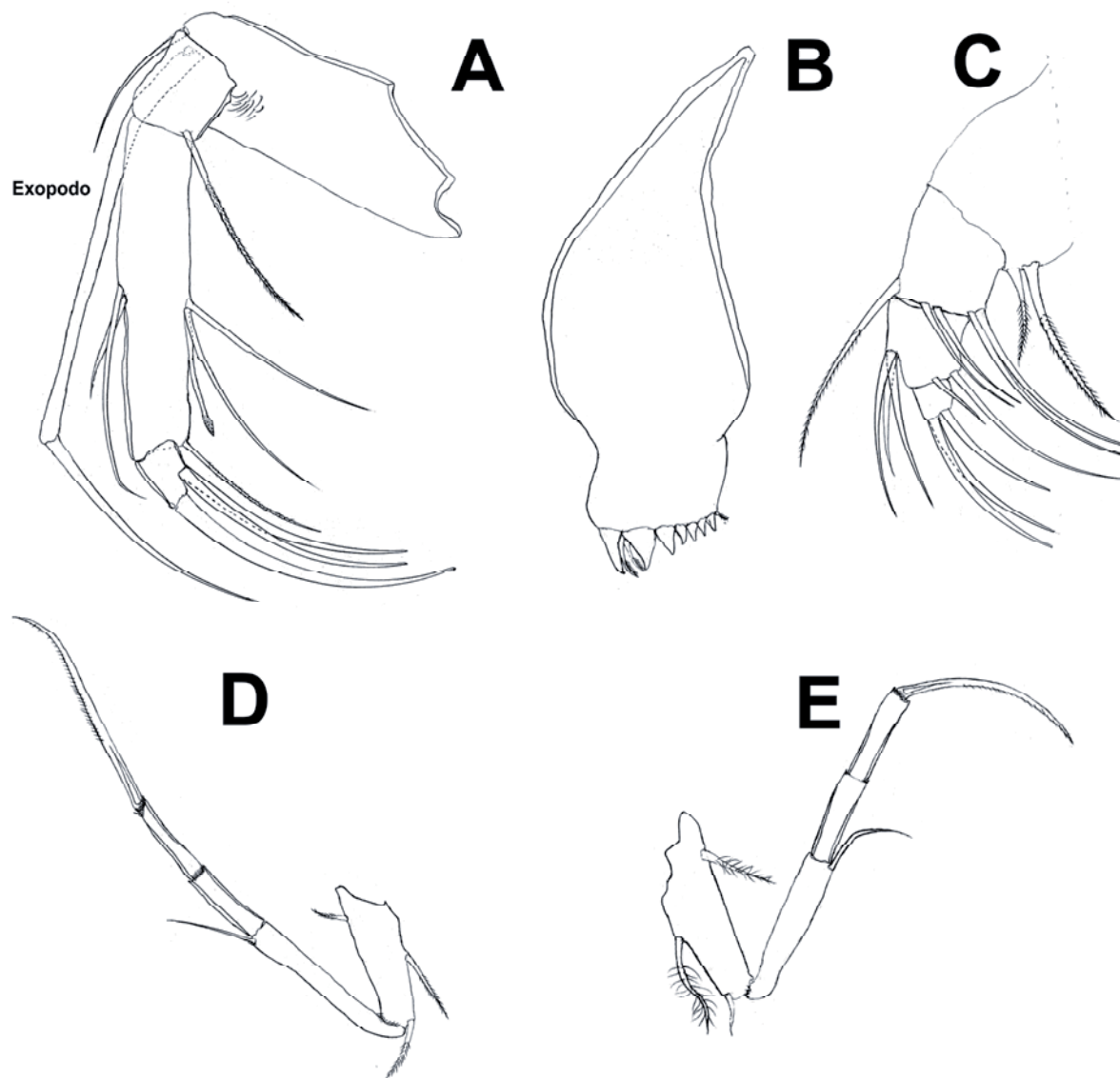


Figura 46. *Metacypris (Thaicythere) cf. srisumonae*. Charco Coatzacolacos-Terranova, Veracruz. Hembra. A) A2; B) Md; C) Mdp; D) T2, E) T3. No a escala.

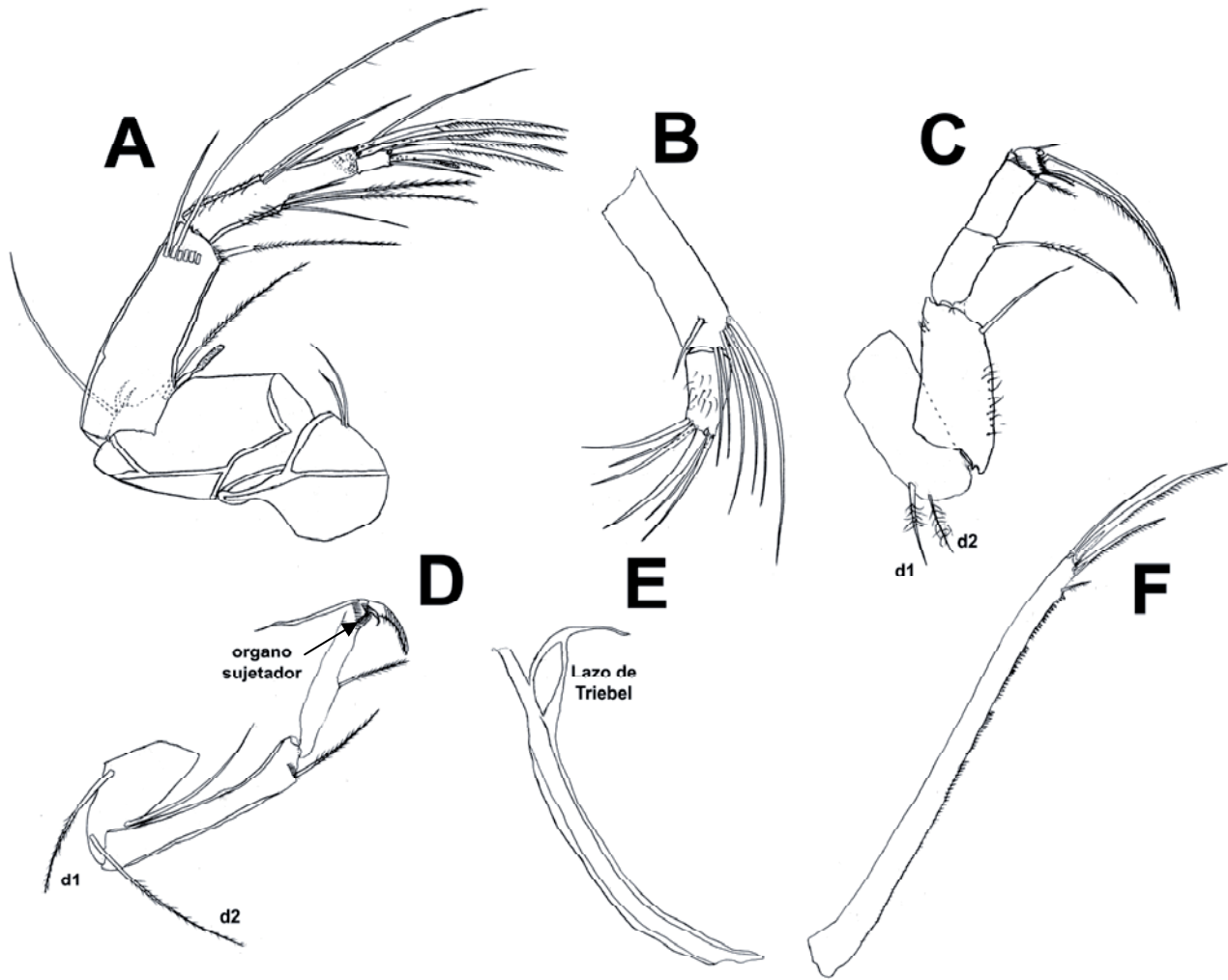


Figura 48. *Strandesia cf. elliptica*. Ramonal 2. Quintana Roo. Hembra. A)A2; B) Mxp; C) T2; D) T3; E) Estructura de soporte mostrando el lazo de Triebel; F) UR. No a escala.

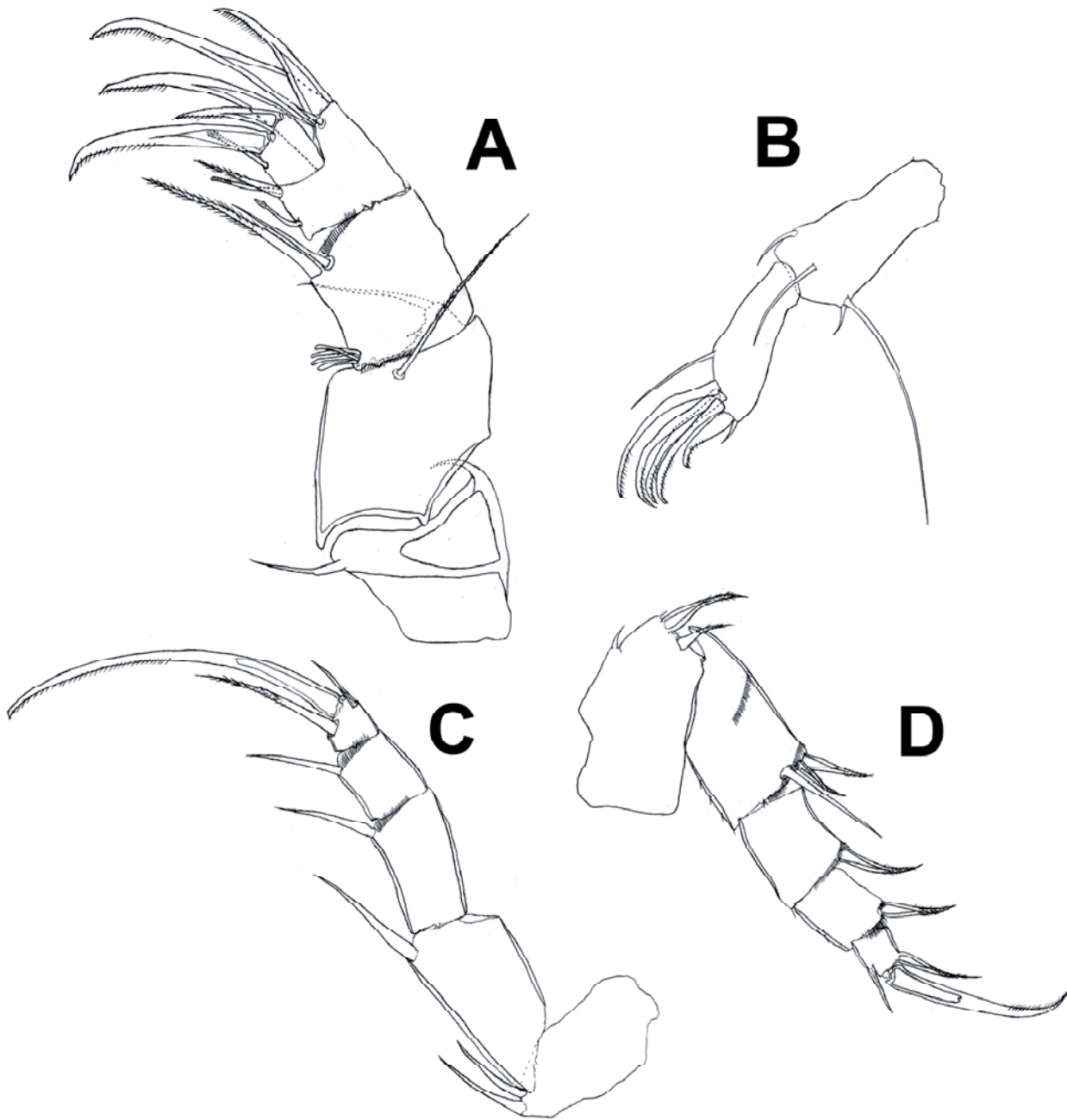
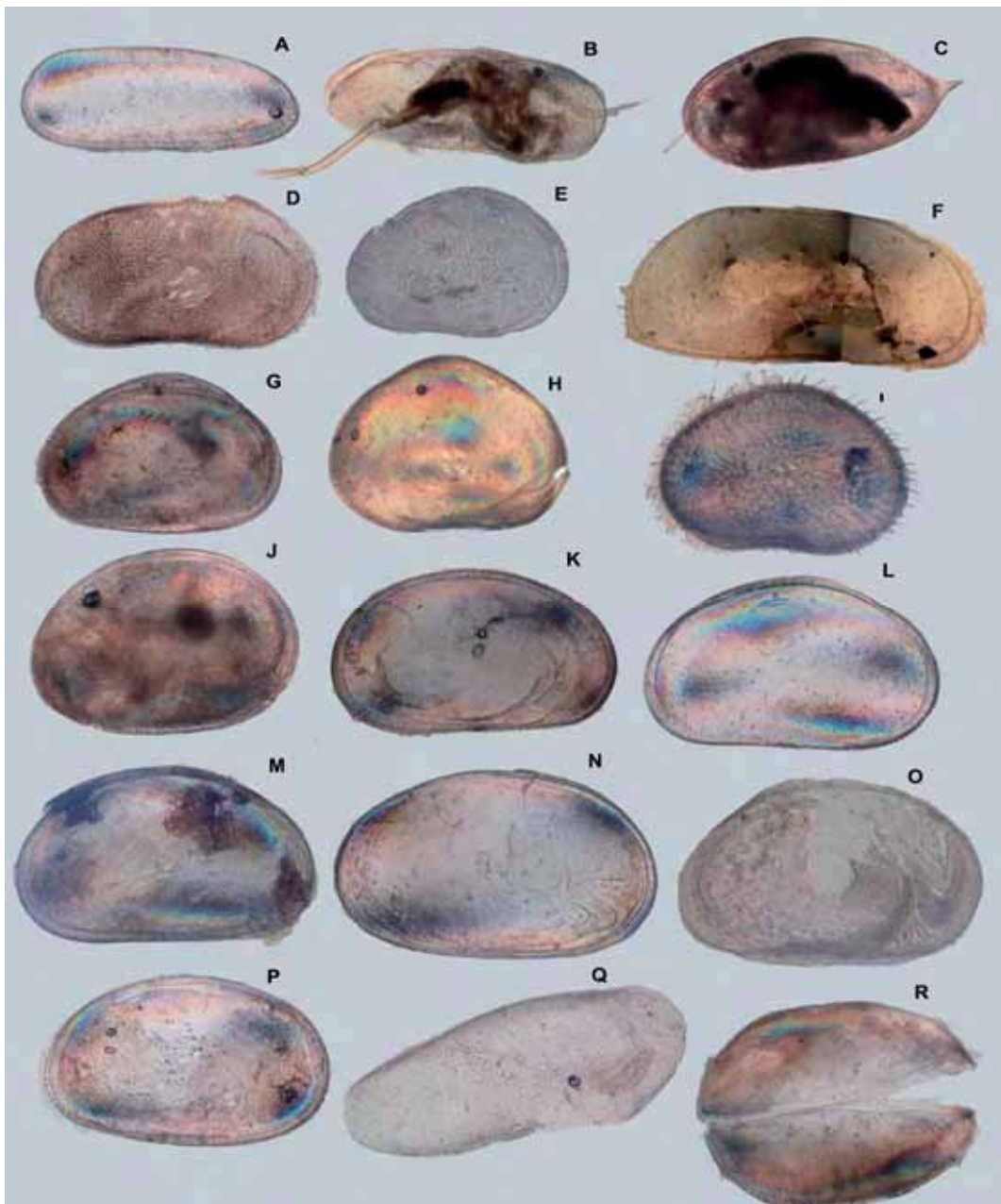
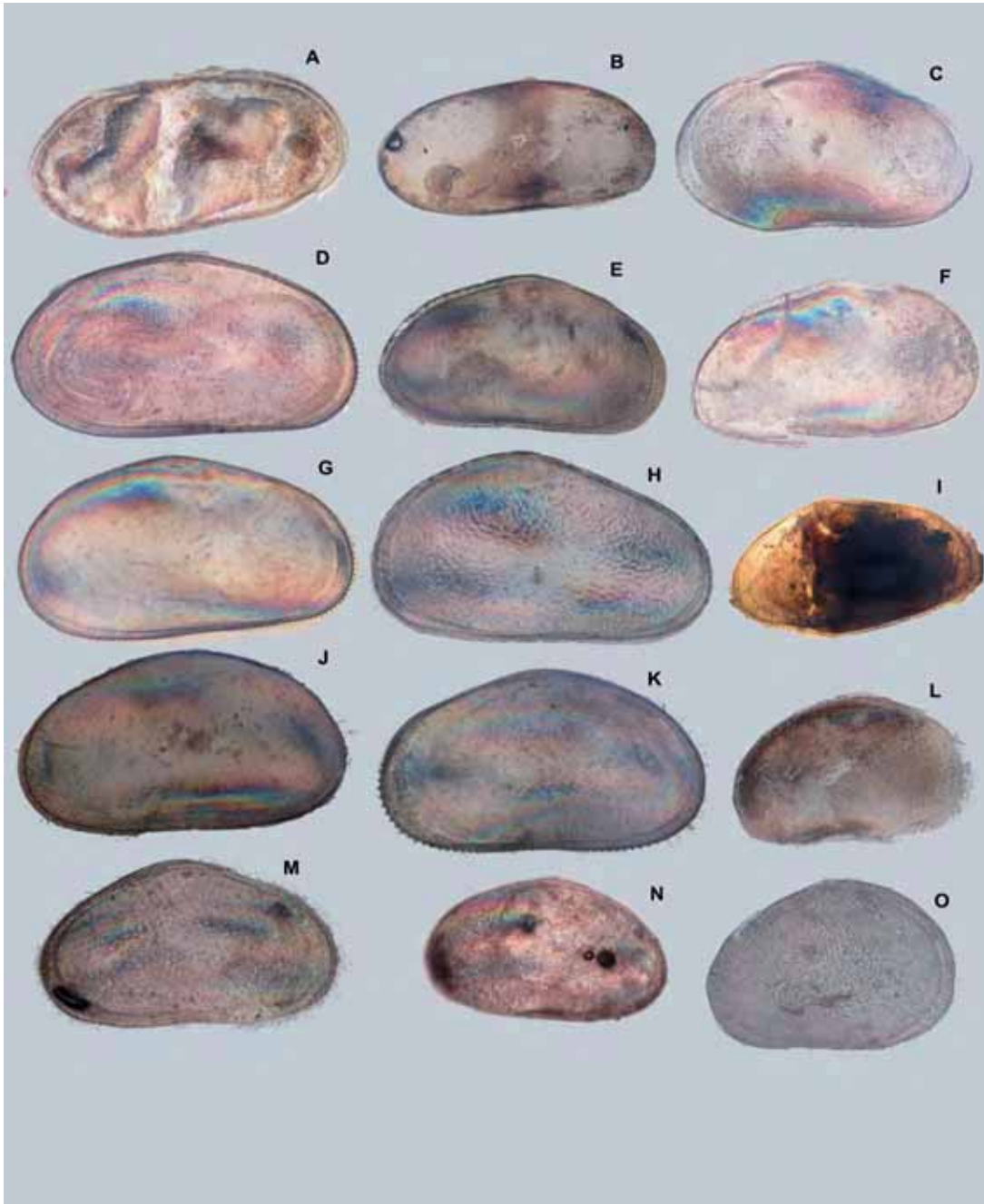


Figura 49. *Vestalenula sp 1*. Agua Azul, Chiapas. Hembra. A) A2; B) Mxp transformado en garra; C)T3; D) T2. No a escala.

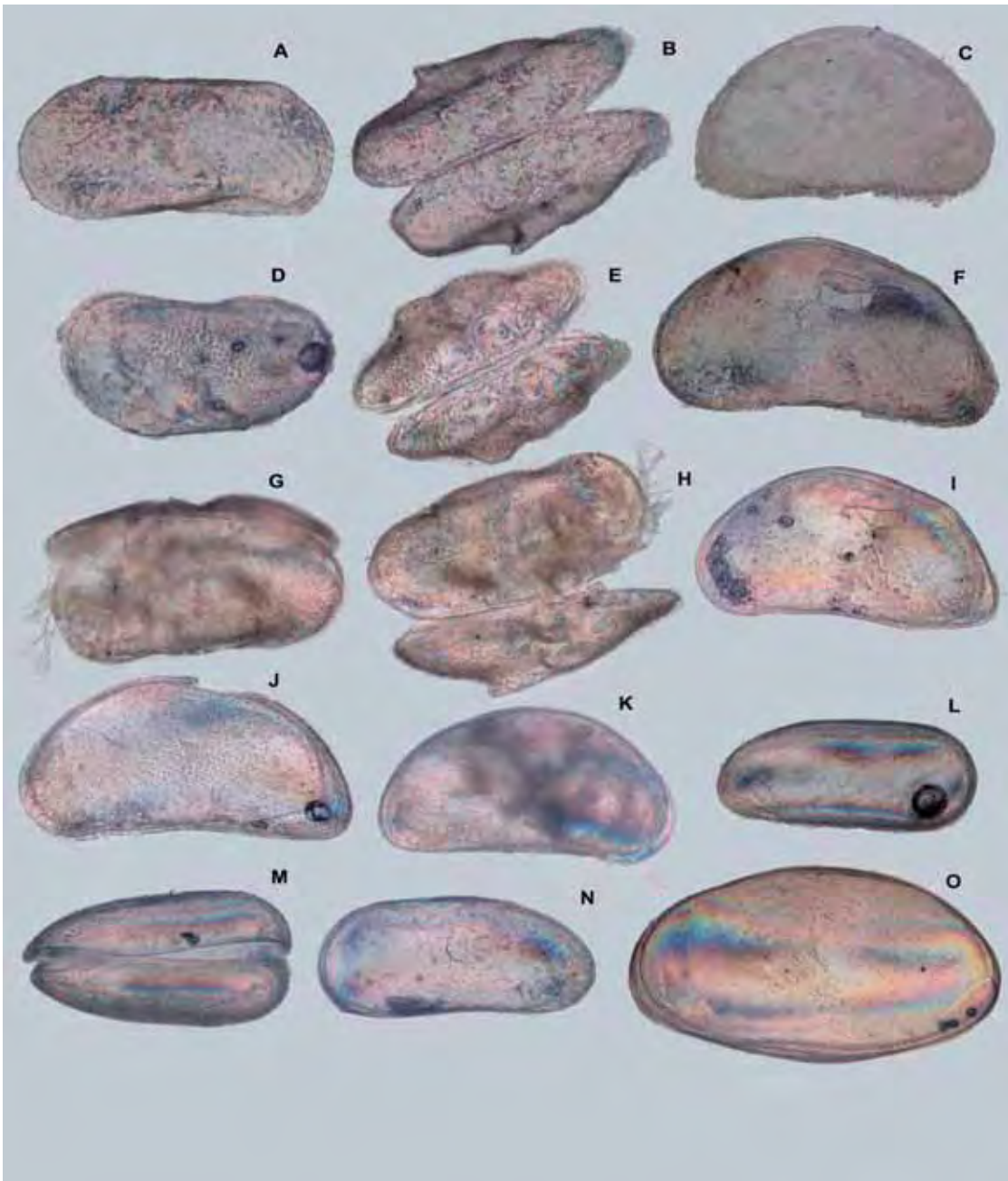
Anexo 4. Imágenes de valvas de Ostrácodos de México



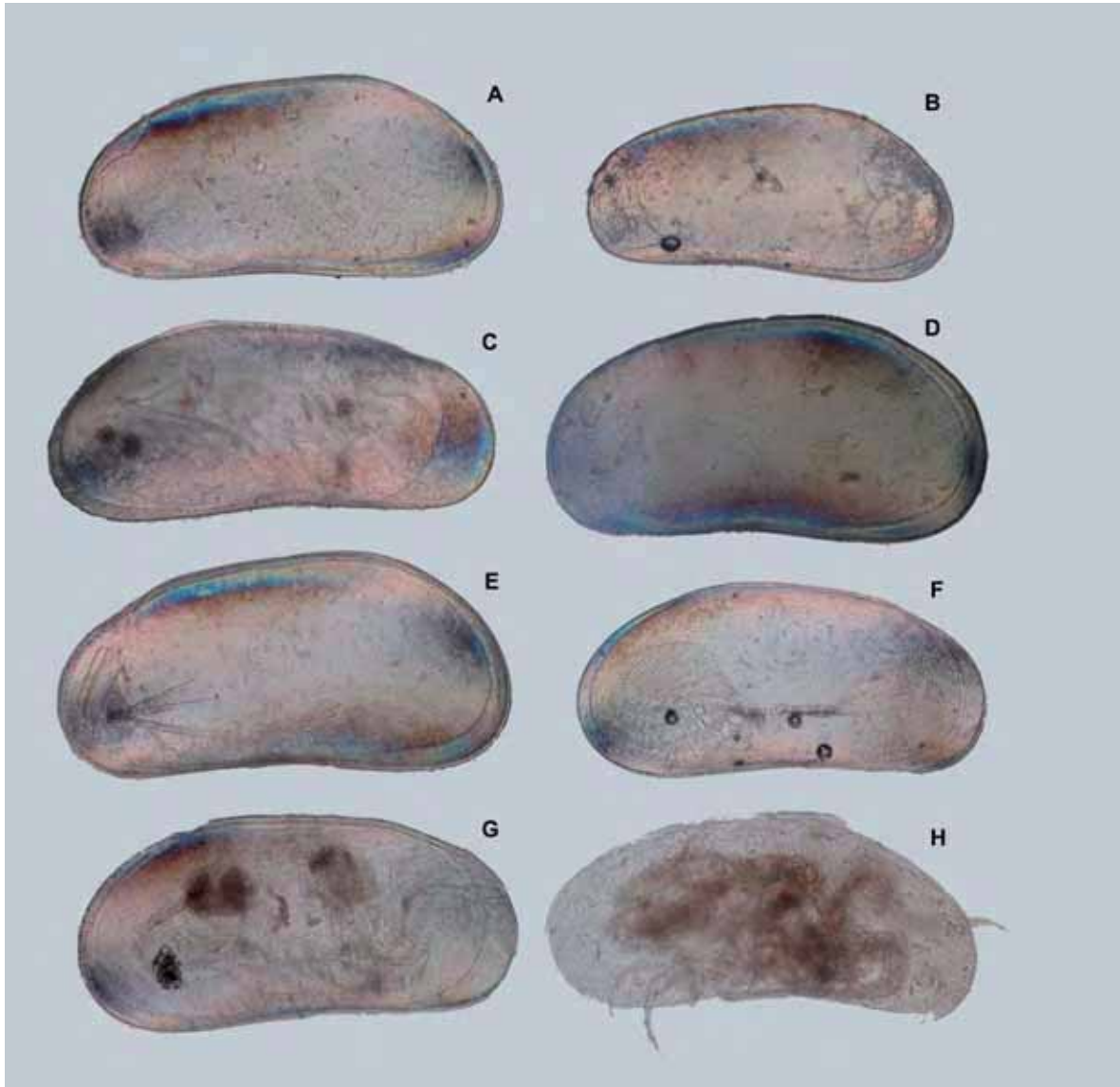
Placa 1. A) *A. serricaudata*; B) *D. meridana*; C) *C. unispinifera*; D) *Riocypris* cf. *hinzeae*; E) *N. yucatanensis*; F) *C. unispinosa*; G) *Cypria gibbera*; H) *Cypretta campechenensis*, I) *Cypretta spinosa*; J) *Cypria* sp 3; K) *Cypria* cf. *granadae* ; L) *Cypria* sp 2; M) *Cypria* cf. *maculata*; N) *Cypria* cf. *pseudocreulata*; O) *Cypria* cf. *gibbera*; P) *Cypria* cf. *kraepelini*; Q) *Cypricercinae* sp Charco Usumacinta; R) *Bradleycypris* sp Coyuquilla.



Placa 2. A) *Strandesia* cf. *elliptica* Ramonal; B) *Cypricercus* cf. *cuneatus*; C) *Cyprididae* sp 1; D) *Heterocypris* cf. *dubia*; E) *Cyprinotinae* sp 5; F) *Cyprinotinae* sp 6; G) *Cyprinotinae* sp 3; H) *Cyprididae* sp Laguna encantada; I) *Prionocypris* cf. *longiforma*; J) *Heterocypris* cf. *congenera*; K) *Cyprinotinae* sp 4 ; L) *Cypridopsis* sp La Cruz; M) *Cypridopsis* sp 1 Km 52 Acayucan-Tinajas; N) *Cypridopsis vidua* Galeana; O) *N. yucatanensis*



Placa 4. A) *Limnocythere (Limnocytherina) axalapasco* n. sp. vista lateral; B) *L. axalapasco* vista dorsal; C) *Potamocypris* cf. *dadayi*; D) *Limnocythere* cf. *stationis* vista lateral; E) *Limnocythere* cf. *stationis* Vista dorsal; F) *Potamocypris variegata*; G) *Limnocythere* sp vista lateral Vallehermoso; H) *Limnocythere* sp vista dorsal Vallehermoso; I) *Potamocypris* cf. *unicaudata*; J) *Potamocypris* sp 1; K) *Potamocypris islagrandensis*; L) *Vestalenula pagliolii*; M) *Vestalenula* cf. *pagliolii* vista ventral; N) *Vestalenula* cf. *pagliolii* vista lateral; O) *Strandesia intrepida*



Placa 5. A) *Typhlocypris* sp 1 Catemaco; B) *Typhlocypris* sp Manantial 2; C) *Typhlocypris* sp Timilpan; D) *Typhlocypris* sp 2 Tlacolula; E) *Typhlocypris* sp 4 Noh Bec, F) *Typhlocypris* sp 3 Ucum; G) *Typhlocypris* cf. *annae*; H) *Typhlocypris* sp 5 Kaná.

Anexo 5. Secuencias obtenidas de Ostrácodos mexicanos.

Cypridopsis sp Silvituc Campeche OSMX-002

ACGAATAAATAATATAAGATTCTGACTTCTCCCCCTTCTCTTACCCTTTTAACA
ATCGGTATATTAGCTGAAAGAGGGGCAGGAACAGGTTGAACGGTATATCCACC
TCTCTCCAGAAACATCTCACACTCTGGAGCAAGAGTTGATTTATCAATTTTTTCT
TTACATTTAGCAGGTGCTTCTCAATCTTAGGAGCAATTAATTTTATTACAAC
ATCATTAAACATACGAACTGCCAGAATATCTCTCGACCGAATTCCTTTGTTTGT
GATCTGTTGGAATTACAGCTTTACTTCTACTTTTATCCTTACCAGTTCTTGCAGG
AGCAATTACCATACTTCTTACTGATCGAAATCTGAATACAACTTTTTTTGACCCT
GCAGGAGGGGGAGACCCAATTCTTTATCAGCATTTATTT

Cypridopsis sp. Silvituc Campeche OSMX-024

TCGAATAAATAATATAAGATTTTGACTTCTTCCCTCCTTTATCATTACTAACA
ATTGGAATATTGACTGAAAGTGGGGCAGGAACAGGCTGAACTGTNTATCCTCC
TCTATCAAGAAATATTTACATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTCTC
TTTACATTTGGCAGGGGCTTCATCAATTTTAGGGGCCATTAATTTTATTACTACC
ATTATTAATATACGGACAGCAAAAATATCTCTTGATCGAATTCCTTTATTTGTTT
GATCAGTCGGGATTACAGCTTTACTACTATTACTATCCTTACCAGTACTTGCTG
GGGCTATTACNATACTATTAACAGACCGAAATTTAAACACAACGTTTTTTTGACC
CNGCCGGAGGGGGTGACCCCATTTCTTTATCAACACTTATTT

Cypria sp 3 (5) Cerca de Nuevo Becar Campeche OSMX-029

ACGAATAAATAATATAAGATTTTGGTTACTCCCTCCATCTTTAACCTTATTAAG
ATTAGGGATATTAACCTGAAAGAGGGGGCTGGAACAGGATGAACAGTTTATCCTC
CACTTTCAAGAAATCTTTCTCATTACAGGAGCAAGGGTAGATCTTTCAATTTTCT
CCCTTCATCTAGCAGGGGCTAGGTCTATTCTAGGGGCCATTAACCTTCACTACTA
CGATTGCTAATATACGAGCAGCAAGAATATCTTTAGACCGGATCCCTCTGTTTG
TATGATCTGTAGGGATTACTGCGCTTTTACTTCTTCTTTCTCTCCCTGTTTTAGC
AGGGGCTATTACTATGCTTCTTACTGATCGTAACTTAAACACTACATTCTTCGA
CCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATCCTTTACCAGCACTTATTT

Cypria sp 3 (5) Cerca de Nuevo Becar Campeche OSMX-031

ACGAATGAATAATATAAGATTTTGGTTACTCCCCCGTCTTTAACCTTATTAAG
ATTAGGAATATTAACCTGAAAGAGGGGGCTGGAACAGGATGAACAGTTTATCCTC
CCCTTTCAAGAAATCTTTCTCATTACAGGAGCAAGGGTAGATCTTTCAATTTTCTC
CCTTCATCTGGCAGGGGCTAGATCTATTCTGGGGGCTATTAACCTTCACTACTAC
GATTGCTAAATACGAGCAGCAAGAATATCTTTAGACCGAATCCCTCTGTTTGTG
TGGTCTGTAGGAATTACTGCGCTTTTACTTCTTCTTTCTCTCCCTGTTTTAGCAG
GGGCCATTACTATGCTTCTTACTGATCGTAACTTGAATACTACATTCTTCGACCC
TGCNNGGGGGAGGGGATCCAATTCTTTACCAACACTTATTT

Cypridopsis sp El Ramonal Quintana Roo OSMX-042

TCGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTTCCCTCCTTCACTATCTCTCTTAACA
ATTGGGATNTTAACCTGAAAGTGGCGCAGGAACCTGGATGAACTGTATATCCCC

ACTATCAAGAAACATTTTCACATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTC
TTTACATCTAGCAGGGGCTTCTTCNATTCTGGGGGCCATTAATTTTATTACTACC
ATCATTAAATATGCGAACAGCAAAAATATCTCTTGATCGNATTCCCTTATTTGTT
TGATCAGTCGGGATTACAGCTCTACTCTTATTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTG
GAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGACC
CAGCTGGAGGGGGTGATCCTATNCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis sp El Ramonal Quintana Roo OSMX-043

TCGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTTCCTCCTTCACTATCTCTCTTAACA
ATTGGGATATTAAGTAAAGTGGCGCAGGAACNGGATGAACTGTATATCCCC
ACTATCAAGAAACATTTTCACATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTC
TTTACATTTAGCAGGGGCTTCTTCNATTCTGGGGGCCATTAATTTTATTACTACC
ATCATTAAATATGCGAACAGCAAAAATATCTCTTGATCGAATTCCCTTATTTGTT
TGATCAGTCGGGATTACAGCTCTACTCTTATTATTATCCTTACCTGTNCTTGCTG
GAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGNAATTTAAATACAACGTTTTTTGACC
CAGCTGGAGGNGGTGATCCNATTCTCTACCAACATTTATTT

Cypria sp 2 (6) Chichancanab Quintana Roo OSMX-051

GCGAATAAATAACATAAGATTTTGATTGCTCCCCCTTCGTAAACCCTTCTTAC
AATCGGCCTCTTAACCGAAAGGGGGGCCGGTACCGGATGAACAGTGTACCCTC
CCCTATCAGGCAACATCTCACACTCAGGCGCCAGAGTTGATTTAACAATCTTCT
CTCTTCATCTCGCTGGGGCCTCTTCTATTCTGGGGGCAATTAATTTTATTACTAC
CATCATTAAACATGCGAGCAGCTAGCATATCATTAGATCGAATTCCGCTATTCTG
TTGGTCTGTAGGGATTACTGCTTTATTATTACTTTTATCGCTCCCTGTCTTAGCG
GGGGCTATCACTATACTTTTGACCGACCGAAACTTAAACACTACCTTTTTTGAC
CCGGCGGGAGGAGGAGATCCAATCTTGTATCAACATCTTTTC

Cypridopsis sp Vallehermoso Quintana Roo OSMX-053

TCGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTTCCTCCTTCACTATCTCTCTTAACA
ATTGGGATATTAAGTAAAGTGGNGCAGGAACAGGATGAACTGTATATCCNCC
ACTATCAAGAAACATTTTCACATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTC
TTTACATTTAGCAGGGGCTTCTTCGATTCTNGGNGCCATTAATTTTATTACTACC
ATCATTAAATATGCGAACAGCAAAAATATCTCTTGATCGGATTCCNTTATTTGTT
TGATCAGTCGGGATTACAGCTCTACTCTTATTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTG
GAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGATC
CAGCTGGAGGAGGTGATCCTATNCNCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis Vallehermoso Quintana Roo OSMX-054

ATAAGATTCTGGCTTCTTCCTCCTTCACTATCTCTCTTAACAATTGGGATATTA
CTGAAAGTGGCGCAGGAACAGGATGAACTGTATATCCTCCGCTATCAAGAAAC
ATTTTCACATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTCTTTACATTTAGCA
GGGGCTTCTTCGATTCTGGGGGCCATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGC
GAACAGCAAAAATATCTCTTGATCGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGGA
TTACAGCTCTACTCTTATTGTTATCCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTAT
ATTATTAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGG
TGATCCTATCCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis Vallehermoso Quintana Roo OSMX-055

TCGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTTCCTCCTTCACTATCTCTCTTAACA
ATTGGAATATTAAGTAAAGTGGCGCAGGAACAGGATGAACTGTATATCCNCC
ACTATCAAGAAACATTTACATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTC
TTTACATTTAGCAGGGGCTTCTTCGATTNTGGGGGCCATTAATTTTATTACTACC
ATCATTAAATATGCGAACAGCAAAAATATCTCTTGATCGAATTCCTTATTTGTT
TGATCAGTCGGGATTACAGCTCTACTCTTATTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTG
GAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGACC
CAGCTGGAGGAGGTGATCCTATCCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis sp Aguada Zoh Laguna Campeche OSMX-069

TCGAATAAATAATATAAGATTCTGACTTCTTCCTCCCTCTTTATCATTACTAACA
ATTGGAATATTGACTGAAAGTGGAGCAGGAACAGGCTGAACTGTATATCCTCC
TCTATCAAGAAACATTTACATGCAGGTNCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTC
TTTACATCTAGCAGGGGNTTCATCAATTTTAGGGGCCATTAATTTTATTACTAC
CATTATTAATATGCGAACAGCAAAAATATCTCTTGATCGAATTCCTTTATTTGTT
TGATCAGTCGGAATTACAGCTCTGCTACTATTATTATCTTTACCTGTACTTGCCG
GTGCTATTACTATACTACTAACAGATCGAAATTTAAACACAACGTTTTTTGACC
CAGCCGGAGGAGGTGACCCCATCTTTATCAACACTTATTT

Cyprididae sp Presa Calles Aguascalientes Oss-179.1

CACTCTATACTTAATTTTTGGTGCTTGATCCGCCATATTAGGAACTGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAGCTTGGACAGCCAGGAACATTAATTGGGAATGACCA
AATTTATAATACAATTGTTACTGCACATGCATTTATTATGATTTTTTTTTATGGTG
ATACCAATTATAATTGGGGGTTTTCGGGAATTGGTTAGTCCCTTTAATATTAGGG
GCCCCAGATATAGCCTTCCCTCGAATAAATAATATAAGATTTTGACTACTCCCC
CCATCTTTATCCCTACTAACAATTGGAATACTCACAGAAAGAGGGGCAGGAAC
AGGATGAACAGTTTATCCTCCTCTATCAAGAAATATCTCTCATGCTGGGGCCAG
AGTAGATTTAACAATTTTCTCATTACACCTAGCCGGTGCCTCATCTATTTTAGG
GGCTATTAATTTCACTACTACTATTATCAACATGCGAAGAGCTAAAATATCCCT
TGATCGAATTCATTATTTGTGTGGTCTGTCGGAATTACTGCTCTTCTTTATTA
TTATCATTGCCTGTTTTAGCGGGAGCAATTACTATACTATTAACAGACCGAAAT
TTAAATACAACATTTTTTGACCCAGCTGGGGGTGGAGACCCTATTCTTTATCAG
CACCTATTC

Cypridopsis sp Laguna Milagros Quintana Roo Oss-180.1

AACATTGTATTTAATCTTCGGGGCTTGGTCTGCTATAATCGGAACAGCTTTAAG
AGTCATTATTCGAGCTGAACTAGGACAACCAGGATCTCTTATTGGAAATGATCA
AATTTATAACACTATCGTGACTGCTCATGCCTTCATTATAATTTTTTTTTATGGTC
ATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTCCCCTAATACTAGGA
GCTCCAGATATGGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTCCCC
CCTTCTCTTACCCTTTTAACAATCGGTATATTAGCTGAAAGAGGGGCAGGAACA
GGTTGAACGGTATATCCACCTCTCTCCAGAAACATCTCACACTCTGGAGCAAGA
GTTGATTTATCAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCCTCAATCTTAGGAG
CAATTAATTTTATTACAATATCATTAAACATAACGAATGCCAGAATATCTCTCG
ACCGAATTCCTTTGTTTGTGTTGATCTGTTGGAATTACAGCTTTACTTCTACTTTT
ATCCTTACCAGTTCTTGCAGGAGCAATTACCATACTTCTTACTGATCGAAATCT

AAATACAACCTTTTTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACA
TTTATTT

Cyprinotinae sp 1 Humedal M. Hidalgo Tabasco Oss-193.1

CACTTTATACCTGATTTTCGGCGCATGGTCTGCTATAGTAGGCACTGCTTTAAG
AGTAATTATTCGGGCTGAGCTAGGGCAACCAGGATCCTTAATCGGAAACGACC
AAATCTACAATACTATTGTGACAGCGCACGCTTTTATCATAATTTTTTTCATGGT
GATACCAATCCTAATTGGGGGTTTTGGAACTGATTGGTCCCTTAATACTTGG
GGCCCTGACATAGCCTTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTGCTCCC
CCCTTCTTTGACCCTTCTTACAATCGGTCTTTTAACCGAAAGGGGGGCGGGCAC
CGGATGGACAGTATACCCTCCCTTATCAGGCAACATCTCACATTCAGGCACCAG
AGTTGATTTAACAATTTTCTCTCTCCATCTCGCCGGGGCCTTCTATTCTAGGG
GCAATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAGCAGCTAGGATATCGTTA
GACCGAATCCCCTGTTTGTGGTCTGTAGGAATTACTGCTTTATTACTTT
TATCACTCCCTGTATTAGCAGGGGCTATCACTATGCTTCTGACCGATCGAACT
TAAACACTACTTTTTTTGACCCGGCGGGAGGAGATCCAATCTTATACCAAC
ATCTTTTC

Cypridopsis sp Silvituc Campeche Oss-203.1

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCAACCAGGAACCTTAATCGGTAATGACCA
AATTTATAATACCATTGTTACTGCACATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAGTG
ATACCATTATAATCGGTGGATTTGGTAATTGATTGGTTCCTTAATACTAGGT
GCCCCAGACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGATTCTGACTTCTTCT
CCCTCTTTATCATTACTAACAATTGGAATATTGACTGAAAGTGGAGCAGGAACA
GGCTGAACTGTATATCCTCCTCTATCAAGAAACATTTACATGCAGGTACAAGA
GTAGATCTTACAATTTTTCTTTACATCTGGCAGGGGTTTCATCAATTTTAGGGG
CCATTAATTTTATTACTACCATTATTAATATGCGAACAGCAAAAATATCTCTTG
ATCGAATTCCTTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACAGCTCTGCTACTATTATT
ATCTTTACCTGTACTTGCCGGTGCTATTACTATACTACTAACAGATCGAAATTT
AAACACAACGTTTTTTGACCCAGCCGGAGGAGGTGACCCCATCTTTATCAACA
CTTATTT

Cypridopsis sp C. vidua Silvituc Campeche Oss-204.1

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCAACCAGGAACCTTAATTGGTAATGACCAA
ATTTATAACACCATTGTTACTGCGCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAGTAA
TACCATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGGTTAGTTCCCTTAATACTAGGTG
CCCCAGACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATGAGATTTTGACTTCTTCTC
CCTCTTTATCATTACTAACAATTGGAATATTGACTGAAAGTGGGGCAGGAACA
GGCTGAACTGTATATCCTCCTCTATCAAGAAATATTTACATGCAGGGGCAAGA
GTAGATCTTACAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGGGCTTCATCAATTTTAGGGG
CCATTAATTTTATTACTACCATTATTAATATACGGACAGCAAAAATATCTCTTG
ATCGAATTCCTTTATTTGTTTGATCAGTCGGCATTACAGCTTTACTACTATTACT
ATCCTTACCAGTACTTGCCGGGGCTATTACGATACTATTAACAGACCGAAATTT
AAACACAACGTTTTTTGACCCCGCCGGAGGGGGTGACCCCATCTTTATCAACA
CTTATTT

Cypretta campechensis Silvituc Campeche Oss-205.1

AACTCTTTATCTTATTTTCGGGGCTTGATCAGCAATACTAGGAACGGCTCTTAG
AGTAATTATTCGTGCTGAATTAGGCCAACAGGTTCTTTAATTGGTAATGATCA
GATTTATAATAACAATCGTTACTGCCCATGCATTCATTATGATTTTCTTTATAGTA
ATGCCTATTATAATTGGAGGGTTTGAAATTGATTAGTTCCGCTTATACTAGGG
GCACCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAAGGTTTTGACTATTACCC
CCTTCTCTTTCTCTTTAACAATTGGTCTATTAACAGAAAGTGGAGCAGGAACA
GGATGAACAGTATACCCTCCACTTTCCGGGAACATCGCTCATTGAGGATCTAGA
GTAGATTTAACAATTTTTTCTCTTCATTTAGCTGGGGCATCTTCAATTTTAGGCG
CAATTAACCTTTATTACAACAATTATTAATATACGAGCCGCAAGAATATCCCTAG
ATCGAATTCCCCTTTTCGTTTGATCAGTAGGAATTACTGCTTTACTACTTCTCTT
ATCCCTTCAGTCCTTGCAGGAGCGATCACAATACTACTTACTGATCGAACTT
AAACACAACCTTCTTTGACCCTGCCGGTGGTGGAGATCCAATTTTATACCAACA
TTTATTT

Cypretta campechensis silvituc Campeche Oss-206.1

AACTCTTTATCTTATTTTCGGGGCTTGATCAGCAATACTAGGAACGGCTCTTAG
AGTAATTATTCGTGCTGAATTAGGCCAACAGGTTCTTTAATTGGTAATGATCA
GATTTATAATAACAATCGTTACTGCCCATGCATTCATTATGATTTTCTTTATAGTA
ATGCCTATTATAATTGGAGGGTTTGAAATTGATTAGTTCCGCTTATACTAGGG
GCACCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAAGGTTTTGACTATTACCC
CCTTCTCTTTCTCTTTAACAATTGGTCTATTAACAGAAAGTGGAGCAGGAACA
GGATGAACAGTATACCCTCCACTTTCCGGGAACATCGCTCATTGAGGATCTAGA
GTAGATTTAACAATTTTTTCTCTTCATTTAGCTGGGGCATCTTCAATTTTAGGCG
CAATTAACCTTTATTACAACGATTATTAATATACGAGCCGCAAGAATATCCCTAG
ATCGAATTCCCCTTTTCGTTTGATCAGTAGGAATTACTGCTTTACTACTTCTCTT
ATCCCTTCAGTCCTTGCAGGAGCGATCACAATACTACTTACTGATCGAACTT
AAACACAACCTTCTTTGACCCTGCCGGTGGTGGAGATCCAATTTTATACCAACA
TTTATTT

Cypretta campechensis Silvituc Campeche Oss 207.1

AACTCTTTATCTTATTTTCGGGGCTTGATCAGCAATACTAGGAACGGCTCTTAG
AGTAATTATTCGTGCTGAATTAGGCCAACAGGTTCTTTAATTGGTAATGATCA
GATTTATAATAACAATCGTTACTGCCCATGCATTCATTATGATTTTCTTTATAGTA
ATGCCTATTATAATTGGAGGGTTTGAAATTGATTAGTTCCGCTTATACTAGGG
GCACCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAAGGTTTTGACTATTACCC
CCTTCTCTTTCTCTTTAACAATTGGTCTATTAACAGAAAGTGGAGCAGGAACA
GGATGAACAGTATACCCTCCACTTTCCGGAAACATCGCTCATTGAGGATCTAGA
GTAGATTTAACAATTTTTTCTCTTCATTTAGCTGGGGCATCTTCAATTTTAGGCG
CAATTAACCTTTATTACAACGATTATTAATATACGAGCCGCAAGAATATCCCTAG
ATCGAATTCCCCTTTTCGTTTGATCAGTAGGAATTACTGCTTTACTACTTCTCTT
ATCCCTTCAGTCCTTGCAGGAGCGATCACAATACTACTTACTGATCGAACTT
AAACACAACCTTCTTTGACCCTGCCGGTGGTGGAGATCCAATTTTATACCAACA
TTTATTT

Cypridopsis sp Charco 3 Jonuta-Escarcega Oss-208.1

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCAACCAGGAACCTTTAATTGGTAATGACCAA
ATTTATAACACCATTGTTACTGCGCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAGTAA
ACCCATTATAATTGGTGGATTTGGTAATTGGTTAGTTCCTTAATACTAGGTGC
CCAGACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGATTTTGGCTTCTTCCTCCCT
CTTTATCATTACTAACAATTGGAATATTGACTGAAAGTGGGGCAGGAACAGGC
TGAACGTATATCCTCCTCTATCAAGAAATATTTACATGCAGGGGCAAGAGTA
GATCTTACAATTTTCTCTTTACATTTGGCAGGGGCTTCATCAATTTTAGGGGCCA
TTAATTTTATTACTACCATTATTAATATACGGACAGCAAAAATATCTCTTGATC
GAATTCCTTTATTTGTTTGATCAGTCGGGATTACAGCTTTACTACTATTACTATC
CTTACCAGTACTTGCTGGGGCTATTACGATACTATTAACAGACCGAAATTTAAA
CACAAACGTTTTTTGACCCCGCCGGAGGGGGTGACCCCATTTCTTTATCAACACTT
ATTT

Cypridopsis sp Charco 3 Jonuta-Escarcega Oss-210.1

AACATTATATCTAATTTTTGGGACTTGAGCTGCTATACTAGGTACAGCCCTAAG
AGTAATTATTCGAAGTGAGCTAGGACAACCTGGATCTTTAATCGGTAATGATCA
AATTTACAATACTATTGTTACTGCTCATGCTTTCATTATAATTTCTTTATAGTA
ATACCCATCATAATTGGGGGATTTGGAAATTGATTGGTTCCATTAATACTTGGT
GCACCTGACATGGCTTTTCCTCGAATGAATAATATGAGATTTTGGCTTCTCCCT
CCATCATTATCATTGTTAACTGTTGGTATATTAACAGAAAGCGGGGCAGGAAC
AGGTTGAACAGTTTACCCTCCACTATCCAGAAATATCTCCCATTCTGGAGC
AAGAGTTGATTTAACAATCTTTTCCCTTCATCTCGCAGGTGTATCCTCAATTCTT
GGGGCAATCAATTTTCATCACTACTATTATTAACATGCGAACCGCAAAAATATCA
TTAGATCAAATTCCTACTCTTTGTATGATCAATTGGTATTACCGCACTCTTATTAC
TATTATCTTTACCAGTGTTAGCTGGAGCAATTACTATATTATTGACAGACCGAA
ATATAAATACAACCTTTTTTTGATCCCGCAGGAGGAGGTGATCCAATTTTATACC
AACATTTATTT

Cyprinotinae Charco 3 Jonuta-Escarcega Oss-211.1

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATGCTTGGTACNGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGACAACCTGGAACCTTTAATTGGTAATGATCAA
ATTTATAATACCATTGTCCTGACACGCATTTATCATAATTTTCTTTATAGTGA
TACCAATTATAATCGGTGGATTCGGTAAGTATTAGTTCCATTAATATTAAGGG
CTCCAGACATAGCTTTCCCCCGAATAAATAATATAAGATTTTACTTCTTCCTC
CCTCCCTATCTCTCTTAACAATTGGAATATTGACTGAGAGTGGGGCAGGAACAG
GTTGAACTGTATATCCTCCTTTATCAAGAAATATTTCTCATGCAGGTGCAAGGG
TAGATCTTACAATTTTTCTTTACATCTAGCAGGAGCTTCATCAATTTTAGGGGC
NATTAATTTTATTACCACTATCATTAAATATACGAACAGCAAAAATATCTCTTGA
CCGAATTCCTTTATTTGTTTGGTCTGTAGGAATCACAGCCTTACTGCTACTACTA
TCTTTACCTGTACTTGCNGGAGCCATTACTATATTATTAACAGACCGTAATCTA
AACACTACGTTTTTCGACCCTGCTGGNGGGGGAGACCCCATTTCTTTATCANCAT
CTGTTT

Cypridopsis sp Charco 3 Jonuta-Escarcega Oss-213.1

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCAACCAGGAACCTTTAATTGGTAATGACCAA

ATTTATAACACCATTGTTACTGCGCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAGTAA
TACCCATTATAAATTGGTGGATTGGTAATTGGTTAGTTCCCTTAATACTAGGTG
CCCCAGACATGGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGATTNTGACTTCTTCCTC
CCTCTTTATCATTACTAACAATTGGAATATTGACTGAAAGTGGGGCAGGAACA
GGCTGAACTGTATATCCTCCTCTATCAAGAAATATTTACATGCAGGGGCAAGA
GTAGATCTTACAATTTTCTCTTTACATTTAGCAGGGGCTTCATCAATTTTAGGGG
CCATTAATTTTATTACTACCATTATTAATATACGGACAGCAAAAATATCTCTTG
ATCGAATTCCTTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACAGCTTTACTACTATTACT
ATCCTTACCAGTACTTGCCGGGGCTATTACTATACTATTAACAGACCGAAATTT
AAACACAACGTTTTTTGACCCCGCCGGAGGGGGTGACCCCATTTCTTTATCAACA
CTTATTT

Cypridopsis sp Laguna pte Milagros Oss-215.1

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCGGCTATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGCCAACCAGGAACCTTAATCGGTAATGACCA
AATTTATAACACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTA
ATACCTATTATAAATTGGTGGCTTTGGTAATTGACTAGTTCCCTTAATATTAGGTG
CCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTTCCTC
CCTCATTATCTCTNTTAACAATTGGGATACTAACTGAAAGTGGTGCAGGAACCTG
GCTGAACTGTATATCCTCCACTATCAAGAAACATTTACATGCAGGGGCAAGA
GTAGATCTTACAATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGGGCTTCTTCGATTCTAGGGG
CCATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAACAGCAAAAATATCTCTTG
ATCGAATTCCTTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACAGCTTTACTCTTATTGTT
ATCTCTACCTGTACTTGCCGGAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTT
AAATAACAACGTTTTTTGACCCAGCTGGAGGAGGTGACCCCATTTCTTACCAACA
TTTATTT

Cypridopsis sp Laguna Pte Milagros Oss-218.1

AACATTGTATTTAATCTTCGGGGCTTGGTCTGCTATAATCGGAACAGCTTTAAG
AGTCATTATTCGAGCTGAACTAGGACAACCAGGATCTCTTATTGGAAATGATCA
AATTTATAACACTATCGTGACTGCTCATGCCTTCATTATAATTTTTTTTATGGTC
ATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTCCCATAACTAGGA
GCTCCAGATATGGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTCCCC
CCTTCTCTTACCCTTTTAACAATCGGTATATTAGCTGAAAGAGGGGCAGGAACA
GGTTGAACGGTATATCCACCTCTCTCCAGAAACATCTCACACTCTGGAGCAAGA
GTTGATTTATCAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCCTCAATCTTAGGAG
CAATTAATTTTATTACAACATCATTAAACATACGAACTGCCAGAATATCTCTCG
ACCGAATTCCTTTGTTTGTTTGATCTGTTGGAATTACAGCTTTACTTCTACTTTT
ATCCTTACCAGTTCTTGCAAGGAGCAATTACCATACTTCTTACTGATCGAAATCT
GAATAACAACTTTTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACA
TTTATTT

Cypridopsis sp Laguna Pte Milagros Oss-219.1

AACATTGTATTTAATCTTCGGGGCTTGGTCTGCTATAATCGGAACAGCTTTAAG
AGTCATTATTCGAGCTGAACTAGGACAACCAGGATCTCTTATTGGAAATGATCA

AATTTATAACACTATCGTGACTGCTCATGCCTTCATTATAATTTTTTTTTATGGTC
ATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTCCCCTAATACTAGGA
GCTCCAGATATGGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTCCCC
CCTTCTCTTACCCTTTTAACAATCGGTATATTAGCTGAAAGAGGGGCAGGAACA
GGTTGAACGGTATATCCACCTCTCTCCAGAAACATCTCACACTCTGGAGCAAGA
GTTGATTTATCAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCCTCAATCTTAGGAG
CAATTAATTTTATTACAACCTATCATTAAACATACGAACTGCCAGAATATCTCTCG
ACCGAATTCCTTTGTTTGTGGATCTGTTGGAATTACAGCTTTACTTCTACTTTT
ATCCTTACCAGTTCTTGCAGGAGCAATTACCATACTTCTTACTGATCGAAATCT
GAATACAACCTTTTTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACA
TTTATTT

Cypridopsis sp Canal de la Laguna verde Oss-220.1

AACATTGTATTTAATCTTCGGGGCTTGGTCTGCTATAATCGGAACAGCTTTAAG
AGTCATTATTCGAGCTGAACTAGGACAACCAGGATCTCTTATTGGAAATGATCA
AATTTATAACACTATCGTGACTGCTCATGCCTTCATTATAATTTTTTTTTATGGTC
ATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTCCCCTAATACTAGGA
GCTCCAGATATGGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTTCTCCCC
CCTTCTCTTACCCTTTTAACAATCGGTATATTAGCTGAAAGAGGGGCAGGAACA
GGTTGAACGGTATATCCACCTCTCTCCAGAAACATCTCACACTCTGGAGCAAGA
GTTGATTTATCAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCCTCAATCTTAGGAG
CAATTAATTTTATTACAACCTATCATTAAACATACGAACTGCCAGAATATCTCTCG
ACCGAATTCCTTTGTTTGTGGATCTGTTGGAATTACAGCTTTACTTCTACTTTT
ATCCTTACCAGTTCTTGCAGGAGCAATTACCATACTTCTTACTGATCGAAATCT
GAATACAACCTTTTTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACCCAATTCTTTATCAACA
TTTATTT

Cypridopsis sp Canal de la Laguna Verde Oss-222.1

TTCCCACGAATAAATAATATAAGATTGTGGCTTCTCCCCCTTCTCTTGCCCTTT
TAACAATCGGTATATTAGCAGAAAGAGGGGCAGGAACAGGTTGAACGGTATAT
CCACCTCTCTCCAGAAACATCTCACACTCTGGAGCAAGAGTTGATTTATCAATT
TTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCNTCAATCTTAGGAGCAATTAATTTTATTA
CAACTATCATTAAACATACGAACTGCCAGAATATCTCTCG

Cyprinotinae sp 1 vernet Oss-226.1

CACTTTATACCTGATTTTCGGCGCATGGTCTGCTATAGTAGGCACTGCTTTAAG
AGTAATTATTCGGGCTGAGCTAGGGCAACCAGGATCCTTAATCGGAAACGACC
AAATCTACAATACTATTGTGACAGCGCACGCTTTTATCATAATTTTTTTCATGGT
GATACCAATCCTAATTGGGGGTTTTGGAACTGATTGGTCCCTTAATACTTGG
GGCCCCTGACATAGCCTTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTGCTCCC
CCCTTCTTTGACCCTTCTTACAATCGGTCTTTTAACCGAAAGGGGGGCGGGCAC
CGGATGGACAGTATACCCTCCCTTATCAGGCAACATCTCACATTCAGGCGCCAG
AGTTGATTTAACAATTTTTCTCTCTCCATCTCGCCGGGGCCTTCTTATTCTAGGG
GCAATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAGCAGCTAGGATATCGTTA
GACCGAATCCCGCTGTTTGTGGTCTGTAGGAATTACTGCTTTATTACTTTT
TATCACTCCCTGTATTAGCAGGGGCTATCACTATGCTTCTGACCGATCGAAACT

TAAACACTACTTTTTTTGACCCGGCGGGGGGAGGAGATCCAATCTTATACCAAC
ATCTTTTC

Cyprinotinae sp 1 Vernet Oss-227.1

CACTCTATACCTGATTTTCGGCGCATGGTCTGCTATAGTAGGCACTGCTTTAAG
AGTAATTATTCGGGCTGAGCTAGGGCAACCAGGATCCTTAATCGGAAACGACC
AAATCTACAATACTATTGTGACAGCGCACGCTTTTATCATAATTTTTTTCATGGT
GATACCAATCCTAATTGGGGGTTTTGGAACTGATTGGTCCCTTAATACTTGG
GGCCCTGACATAGCCTTTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTGCTCCC
CCCTTCTTTGACCCTTCTTACAATCGGTCTTTTAACCGAAAGGGGGGCGGGCAC
CGGATGGACAGTATACCCCCCTTATCAGGCAACATCTCACATTCAGGCGCCA
GAGTTGATTTAACAATTTTCTCTCTCCATCTCGCCGGGGCCTCTTCTATTCTAGG
GGCAATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAGCAGCTAGGATATCGTT
AGACCGAATCCCGCTGTTTGTGGTCTGTAGGAATTACTGCTTTATTATTACTT
TTATCACTCCCTGTATTAGCAGGGGCTATCACTATGCTTCTGACCGATCGAAAC
TAAACACTACTTTTTTTGACCCGGCGGGAGGAGATCCAATCTTATACCAG
CATCTTTTC

Cypria kraepelini Corea del Sur Oss-51.1

CACACTCTACTTAATTTTTGGGGCATGATCCGCTATACTAGGAACCGCTTTAAG
AGTAATTATTCGAGCTGAACTAGGTCAGCCAGGCTCTTTAATTGGCAACGACCA
AATCTATAAACTATTGTTACAGCCCACGCCTTCATTATAATTTTCTTCATAGTT
ATACCNATCTTAATTGGAGGATTTGGGAATTGATTAGTTCCTTTAATACTAGGG
GCCCCTGATATGGCCTTCCCCGAATAAATAACATAAGATTTTGACTTCTTCN
CCATCACTGACTTTGCTTAGACTTGGGATACTAACAGAAAGGGGGGCAGGAAC
AGGCTGAACTGTCTACCCTCCTCTATCAAGAAACCTTTCCCACTCAGGGGCAAG
AGTAGATCTATCAATCTTTTCTTTCATCTTGCTGGTGCTAGATCTATTCTAGGG
GCCATTAATTTTATTACTACAATTGCTAATATACGAGCAGCAAGAATATCTTTA
GACCGAATTCCTTTATTTGTNTGATCCGTAGGTATCACAGCCCTTCTCCTACTTT
TATCTCTTCCTGTTCTAGCTGGAGCAATCACAATACTTTTAACAGATCGAAATC
TAAATACAACCTTTCTTTGATCCCGCTGGAGGAGGGGATCCCATTTTATATCAGC
ACTTATTT

Cypria kraepelini Corea del Sur Oss-52.1

CACACTCTACTTAATTTTTGGGTCATGGTCCGCTATACTAGGAACCGCTCTAAG
AGTAATTATTCGAGCTGAGCTAGGTCAGCCTGGCTCTTTAATTGGGAACGACCA
AATCTATAAACTATTGTTACAGCCCACGCATTATTATAATTTTCTTCATAGTT
ATACCTATCTTAATCGGAGGGTTCGGAAATTGATTAGTTCCTTTAATACTAGGG
GCCCCTGATATGGCCTTCCCCGAATAAATAATATAAGATTTTGACTTCTTCCG
CCATCACTGACTTTGCTTAGACTTGGGATACTAACAGAAAGGGGGGCAGGAAC
AGGCTGAACTGTCTACCCTCCTCTATCAAGAAACCTTTCCCACTCAGGGGCAAG
AGTAGATCTATCAATCTTTTCTTTCATCTTGCTGGTGCTAGATCTATTCTAGGG
GCCATTAATTTTATTACTACAATTGCTAATATATGAGCAGCAAGAATATCTTTA
GACCGAATTCCTTTATTTGCTTGATCCNTAGGTATCACAGCCCTTCTCCTACTTT
TGTCTCTTCCTGTTCTAGCTGGAGCAATCACAATACTTTTAACAGATCGAAATC
TAAGTACAACCTTTCTTTGATCCCGCTAGAGGAGGGGATCCATCTTATATCAGC
ACTTATTT

Cypria kraepelini Corea del Sur Oss-54.1

CACACTCTACTTAATTTTTGGGGCATGGTCCGCTATACTAGGAACCGCTTTAAG
AGTAATTATTCGAACTGAACTAGGTCAGCCTGGCTCTTTAATCGGGAACGACCA
AATCTATAACACTATTGTTACAGCCCACGCCTTTATTATAATTTTTCTTTATAGTT
ATACCCATCTTAATTGGAGGGTTTGGAAATTGGCTAGTTCCTTTAATACTAGGA
GCCCCTGATATGGCCTTCCCCGAATAAATAATATAAGATTTTGACTTCTTCCG
CCATCACTGACTTTGCTTAGACTTGGAACTAACAGAAAGGGGGGCAGGAAC
AGGCTGAACTGTCTACCCTCCCCTATCAAGAAACCTTTCCCACTCGGGGGCAAG
AGTAGATCTATCAATCTTTTCTCTTCATCTTGCTGGTGCAAGATCTATTCTAGGC
GCCATTAATTTTATTACTACAATTGCTAATATACGAGCAGCAAGAATATCTTTA
GACCGAATTCCTTTATTTGTATGATGCGTAGGTATCACAGCCCTTCTTCTACTTT
TGGCTCTTCCCTGTTCTAGCTGGAGCAATCACAACTTTTAACTGATCGAAATC
TAAATACAACCTTTTTTTGATCCCGCTGGAGGGGGTGATCCTATCTTATATCAGC
ACTTATTT

Cypridopsis sp Silvituc HE039

TCTGCTATAATCGGAACAGCTTTAAGAGTCATTATTCGAGCTGAANTAGGACA
ANCNGGATCTC-----TTATT
GGAAATGATCAAATTTATAACACTATCGTGACTGCTCATGCCTTCATTATAATT
TTTTTTATGGTCATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTCCCAC
TAATACTAGGAGCTCCAGATATGGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTCT
GACTTCTCCCCCTTCTCTTACCCTTTTAAACAATCGGTATATTAGCTGAAAGAG
GGGCAGGAACAGGTTGAACGGTATATCCACCTCTCTCCAGAAACATCTCACAC
TCTGGAGCAAGAGTTGATTTATCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCT
CAATCTTAGGAGCAATTAATTTTATTACAACCTATCATTAAACATACGAACTGCCA
GAATATCTCTCGACCGAATTCCTTTGTTTGTGATCTGTTGGAATTACAGCTTT
ACTTCTACTTTTATCCTTACCAGTTCTTGCAGGAGC

Cypridopsis sp 3 Garantias Quintana Roo Oss-005

ATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGAGTAAT
TATTCGAGCTGAATTAGGTCAACCGGGAACCT-----
TAATTGGTAATGATCAAATTTATAATACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTAT
AATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATCGGTGGATTTGGTAATTGATTAGTT
CCCTTAATATTAGGTGCCCCAGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTCTGACTTCTTCCCTCATTATCTCTCTTAAACAATTGGGATATTAAGTAAA
GTGGCGCAGGAACAGGTTGAACTGTGTATCCCCACTATCAAGAAACATTTCA
CATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTCTCTTTACATTTAGCAGGGGCT
TCCTCGATTCTAGGTGCCATTAATTTTATTACTACCATCATCAACATGCGAACA
GCAAAAATATCTCTTGATCGAATTCCTTTATTTGTTTGTGATCAGTCGGAATTACA
GCTCTACTCTTATTATTATCTTTACCTGTACTTGGTGGAGCTATTACTATATTAT
TAACAGACCGAAATTTAAATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGAC
CCTATTCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis sp 3 Garantias Quintana Roo Oss-006

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGCCAGCCAGGAACCT-----

TAATTGGTAATGACCAAATTTATAACACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTAT
AATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATCGGGGGCTTTGGTAATTGGTTAGTT
CCCTTAATACTAGGTGCCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTCTGGCTTCTCCTCCTTCGCTATCTCTCTTAACAATTGGGATATTAAGTAAA
GTGGTGCAGGAACAGGATGAACTGTATACCCCCACTATCAAGAAACATTTCA
CATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTCTTTGCATTTAGCAGGGGCT
TCTTCGATTCTAGGAGCCATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAACA
GCAAAAATATCTCTTGATCGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACA
GCCCTACTCTTACTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTATATTAT
TAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATC
CTATCCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis sp 3 Garantias Quintana Roo Oss-007

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCAGCCAGGAACTT-----
TAATTGGTAATGACCAAATTTATAACACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTAT
AATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATCGGGGGCTTTGGTAATTGGTTAGTT
CCATTAATACTAGGTGCCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTCTGGCTTCTCCTCCTTCGCTATCTCTCTTAACAATTGGGATATTAAGTAAA
GTGGTGCAGGAACAGGATGAACTGTATACCCCCACTATCAAGAAACATTTCA
CATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGGGCT
TCTTCGATTCTAGGAGCCATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAACA
GCAAAAATATCTCTTGATCGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACA
GCCCTACTCTTACTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTATATTAT
TAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATC
CTATCCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis sp 3 Garantias Quintana Roo Oss-008

TATAACACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATAC
CTATCATAATCGGGGGCTTTGGTAATTGGTTAGTTCCCTTAATACTAGGTGCCC
CAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGATTCTGGCTCCTCCTCCTT
CGCTATCTCTCTTAACAATTGGGATATTAAGTAAAAGTGGTGCAGGAACAGGA
TGAAGTGTATACCCCCACTATCAAGAAACATTTACATGCAGGGGCAAGAGT
AGATCTTACAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGGGCTTCTTCGATTCTAGGGGCC
ATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAACAGCAAAAATATCCCTTGAT
CGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACAGCCCTACTCTTACTATTAT
CCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGGAATTTAA
ATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATCCTATCCTCTACCAACATT
TATTT

Cypridopsis sp 3 Garantias Quintana Roo Oss-009

CGAGCTGAATTAGGCCAGCCAGGAACTT-----
TAATTGGTAATGACCAAATTTATAACACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTAT
AATTTTCTTTATAGTAATACCTATCATAATCGGGGGCTTTGGTAATTGGTTAGTT
CCCTTAATACTAGGTGCCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTCTGGCTCCTCCTCCTTCGCTATCTCTCTTAACAATTGGGATATTAAGTAAA
GTGGTGCAGGAACAGGATGAACTGTATACCCCCACTATCAAGAAACATTTCA

CATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGGGCT
TCTTCGATTCTAGGGGCCATTAATTTTATTACTACCATCATTAATATGCGAACA
GCAAAAATATCCCTTGATCGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACA
GCCCTACTCTTACTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTATATTAT
TAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATC
CTATCCTCTACCAACATTTATTT

Cytheridella ilosvayi 3 garantias Quintana Roo Oss-010

ATAATTTTCTTCGCCGTGATGCCGATTATGATTGGGGGGTTCGGGAATTGGTTG
GTGCCGTTGATGGTGGGGAGTGCTGACATGGCGTTTCCTCGCATGAACAACCTG
AGGTTTTGATTACTGCCACCATCGTTAGGGTTGCTGAGGAGATCCTTGCTTTGT
GGTGGTGGTGTGGGGACAGGGTGGACGGTGTACCCTCCCCTTCGAGGTGGGG
GTTTCATTCCAATCCTGGGGTGGACCTTGCAATTTTCTCCCTTCATCTTGCTGGT
GCCAGATCGATTTTGGGGGCGATTAATTTTCATCACGACGGTGTGAACATACGT
GGGGGGTACATGCCACTGTTTCGGGTACCCTGTTTGTGTGATCGGTTTTGATT
ACCGCCGTCCTGCTTTTACTTTCCCTCCGGTGTGGCTGGTGGGATTACGATGT
TGTTGCTGGACCGGAATTACAACGCGAGGTTTTTCGATCCGGTTGGGGGTGGG
GATCCCATTTTGTTCAGCATTGT

Cypridopsis sp 3 Garantias Quintana Roo Oss-013

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGCCAGCCAGGAACTT-----
TAATTGGTAATGACCAAATTTATAACACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTAT
AATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATCGGGGGCTTTGGTAATTGGTTAGTT
CCCTTAATACTAGGTGCCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTCTGGCTTCTCCTCCTTCGCTATCTCTCTTAACAATTGGGATATTAAGTAAA
GTGGTGCAGGAACAGGATGAACTGTATACCCCCACTATCAAGAAACATTTCA
CATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGGGCT
TCTTCGATTCTAGGAGCCATTAATTTTATTACTACCATCATTAATATGCGAACA
GCAAAAATATCTCTTGATCGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACA
GCCCTACTCTTACTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTATATTAT
TAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATC
CTATCCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis sp 3 Garantias Quintana Roo Oss-015

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCAGCCAGGAACTT-----
TAATTGGTAATGACCAAATTTATAACACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTAT
AATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATCGGGGGCTTTGGTAATTGGTTAGTT
CCCTTAATACTAGGTGCCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTCTGGCTTCTCCTCCTTCGCTATCTCTCTTAACAATTGGGATATTAAGTAAA
GTGGTGCAGGAACAGGATGAACTGTATACCCCCACTATCAAGAAACATTTCA
CATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGGGCT
TCTTCGATTCTAGGAGCCATTAATTTTATTACTACCATCATTAATATGCGAACA
GCAAAAATATCTCTTGATCGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACA
GCCCTACTCTTACTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTATATTAT

TAACAGATCGGAATTTAAATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATC
CTATCCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis sp 3 Garantias Quintana Roo Oss-016

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCAACCGGGAACCT-----
TAATTGGTAATGATCAAATTTATAATACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTAT
AATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATCGGTGGATTTGGTAATTGATTAGTT
CCCTTAATATTAGGTGCCCCAGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTCTGACTTCTTCCCTCATTATCTCTCTTAACAATTGGGATATTAAGTAAA
GTGGCGCAGGAACAGGTTGAACTGTNTATCCCCACTATCAAGAAACATTTCA
CATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTCTCTTTACATTTAGCAGGGGCT
TCTTCGATTCTAGGTGCCATTAATTTTATTACTACCATCATNAACATGCGAACA
GCAAAAATATCTCTTGATCGAATTCCTTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACA
GCTCTACTCTTATTATTATCTTTACCTGTACTTGCTGGAGCTATTACTATATTAT
TAACAGACCGAAATTTAAATACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGAT
CCTATTCTCTACCAACATTTATTT

Cytheridella ilosvayi 3 garantias Quintana Roo Oss-017

CTCCCTTACCTCGTGTGTTGGTGGTTGGGCGGGGAGTGTTGGTGCCGGGTAAAG
GGCGATCATTCGCGTGGAACCTGTCCAACCGGGGAGAT-----
TGCTCGAAAGGGATCATTTTTACAATGCAGTTGTAACCGGACATGCTTTTATTA
TAATTTTCTTCGCCGTGATGCCGATTATGATTGGGGGGTTCGGGAATTGGTTGG
TGCCGTTGATGGTGGGGAGTGCTGACATGGCGTTTCTCGCATGAACAACCTGA
GGTTTTGATTACTGCCACCATCGTTAGGGTTGCTGAGGAGATCCTTGCTTTGTG
GTGGTGGTGTGGGACAGGGTGGACGGTGTACCCTCCCCTTTCGAGGTGGGGG
TTTCATTCCAATCCTGGGGTGGACCTTGCAATTTTCTCCCTTCATCTTGCTGGTG
CCAGATCGATTTTGGGGGCGATTAATTTATCACGACGGTGTGAAACATACGTG
GGGGGTACATGCCACTGTTTCGGGTACCACTGTTTGTGTGATCGGTTTTGATTA
CCGCCGTCTGCTTTTACTTTCCCTTCCGGTGTGGCTGGTGGGATTACGATGTT
GTTGCTGGACCGGAATTACAACGCGAGGTTTTTCGATCCGGTTGGGGGTGGGG
ATCCCATTTTGTTCAGCATTTGTTT

Cytheridella ilosvayi 3 garantias Quintana Roo Oss-018

GGTGGTTGGGCGGGGAGTGTTGGTGCCGGGTAAAGGGCGATCATTCGCGTGGA
ACTGTCCAACCGGGGAGAT-----
TGCTCGAAAGGGATCATTTTTACAATGCAGTTGTAACCGGACATGCTTTTATTA
TAATTTTCTTCGCCGTGATGCCGATTATGATTGGGGGGTTCGGGAATTGGTTGG
TGCCGTTGATGGTGGGGAGGGCTGACATGGCGTTTCTCGCATGAACAACCTG
AGGTTTTGATTACTGCCACCATCGTTAGGGTTGCTGAGGAGATCCTTGCTTTGT
GGTGGTGGTGTGGGACAGGGTGGACGGTGTACCCTCCCCTTTCGAGGTGGGG
GTTTCATTCCAATCCTGGGGTGGACCTTGCAATTTTCTCCCTTCATCTTGCTGGT
GCCAGATCGATTTTGGGGGCGATTAATTTATCACGACGGTGTGAAACATACGTG
GGGGGTACATGCCACTGTTTCGGGTACCACTGTTTGTGTGATCGGTTTTGATT
ACCGCCGTCTGCTTTTACTTTCCCTTCCGGTGTGGCTGGAGGGATTACGATGT
TGTTGCTGGACCGGAATTACAACGCGAGGTTTTTCGATCCGGTTGGGGGTGGG
GATCCCATTTTGTTCAGCATTTGTTT

Cytheridella ilosvayi 3 garantias Quintana Roo Oss-019

AAGGGATCATTTTTACAATGCAGTTGTAACCGGACATGCTTTTATTATAATTTT
CTTCGCCGTGATGCCGATTAT
GATTGGGGGGTTCGGGAATTGGTTGGTGCCGTTGATGGTGGGGAGTGCTGACA
TGGCGTTTTCCTCGCATGAACAACCTGAGGTTTTGATTACTGCCACCATCGTTAG
GGTTGCTGAGGAGATCCTTGCTTTGTGGTGGTGGTGGTGGGACAGGGTGGACG
GTGTACCCTCCCCTTTTCGAGGTGGGGGTTTCATTCCAATCCTGGGGTGGACCTT
GCAATTTTCTCCCTTCATCTTGCTGGNGCCAGATCNATTTTGGGG

Cytheridella ilosvayi 3 garantias Quintana Roo Oss-020

CTCCCTTACCTCGTGTTTGGTGGTTGGGCGGGGAGTGTTGGTGCCGGGTAAAG
GGCGATCATTTCGCGTGGAAGTGTCCCAACCGGGGAGAT-----
TGCTCGAAAGGGATCATTTTTACAATGCAGTTGTAACCGGACATGCTTTTATTA
TAATTTTCTTCGCCGTGATGCCGATTATGATTGGGGGGTTCGGGAATTGGTTGG
TGCCGTTGATGGTGGGGAGTGCTGACATGGCGTTTCTTCGCATGAACAACCTGA
GGTTTTGATTACTGCCACCATCGTTAGGGTTGCTGAGGAGATCCTTGCTTTGTG
GGGGTGGAGTTGGGACAGGGTGGACGGTGTACCCTCCCCTTTTCGAGGTGGGGG
TTTCATTCCAATCCTGGGGTGGACCTTGCAATTTTCTCCCTTCATCTTGCTGGTG
CCAGATCGATTTTGGGGGCGATTAATTTTCATCACGACGGTGTGAACATACGTG
GGGGGTACATGCCACTGTTTCGGGTACCTCTGTTTGTGTGATCGGTTTTGATTA
CCGCCGTCCTGCTTTTACTTTCCCTTCCGGTGTGGCTGGAGGGATTACGATGTT
GTTGCTGGACCGGAATTACAACGCGAGGTTTTTTCGATCCGGTTGGGGGTGGGG
ATCCCATTTTGTTCAGCATTGTTT

Vestalenula pagliolii 3 garantias Quintana Roo Oss-022

TTTCTTCATGGTTATGCCAATTATAATTGGAGGATTCGGAAATTGATTAGTACC
CTTAATACTAGGAGCCCCAGACATAGCTTTCCACGAATAAATAACATAAGAT
TCTGACTCCTCCCCCGTCACTATTACTTCTAACTGTAGGAATATTAAGTAAA
GTGGAGCCGGTACCGGCTGAACCGTTTATCCTCCACTATCAGCAAACATTGCAC
ACGCAGGACCANGAGTAGACCTGACAATTTTTTCACTTCACCTAGCCGGTGCTT
CCTCAATTCTAGGAGCAATCAATTTCAATACAACATGTATCAACATACGCCCTG
CAGGAATATCAATAGATCGTATACCTTTATTCGTATGAAGGGTATTAATTAC
AGCAATTTTACTTCTATTATCTTTACCAGTATTAGCTGGTGCCATCACCATATTA
TTAACTGACCGTAACCTTAATACCTCATTTTTTCGATCCAGCAGGAGGGGGGAC
CCAATTTTATATCAACACTTATTT

Cytheridella ilosvayi 3 garantias Quintana Roo Oss-024

CTCCCTTACCTCGTGTTTGGTGGTTGGGCGGGGAGTGTTGGTGCCGGGTAAAG
GGCGATCATTTCGCGTGGAAGTGTCCCAACCGGGGAGAT-----
TGCTCGAAAGGGATCATTTTTACAATGCAGTTGTAACCGGACATGCTTTTATTA
TAATTTTCTTCGCCGTGATGCCGATTATGATTGGGGGGTTCGGGAATTGGTTGG
TGCCGTTGATGGTGGGGAGTGCTGACATGGCGTTTCTTCGCATGAACAACCTGA
GGTTTTGATTACTGCCACCATCGTTAGGGTTGCTGAGGAGATCCTTGCTTTGTG
TGGTGGTGGTGGGACAGGGTGGACGGTGTACCCTCCCCTTTTCGAGGTGGGGGT
TCATTCCAATCCTGGGGTGGACCTTGCAATTTTCTCCCTTCATCTTGCTGGTGCC
AGATCGATTTTGGGGGCGATTAATTTTCATCACGACGGTGTGAACATACGTGGG

GGGTACATGCCACTGTTTCGGGTACCACTGTTTGTGTGATCGGTTTTGATTACC
GCCGTCCTGCTTTTACTTTCCCTTCCGGTGTGGCTGGTGGGATTACGATGTTGT
TGCTGGACCGGAATTACAACGCGAGGTTTTTCGATCCGGTTGGGGGTGGGGAT
CCATTTTGTTCAGCATTGTTT

Cypridopsis sp Tres garantias Quintana Roo Oss-025

CACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCAGCCATATTAGGAACCGCTTTAAGA
GTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCAGCCAGGAACTT-----
TAATTGGTAATGACCAAATTTATAACACCATTGTTACTGCTCATGCATTTATTAT
AATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATCGGGGGCTTTGGTAATTGGTTAGTT
CCCTTAATACTAGGTGCCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTCTGGCTTCTTCCCTCCTTCGCTATCTCTTAAACAATTGGGATATTAAGTAAA
GTGGTGCAGGAACAGGATGAACTGTATACCCCCACTATCAAGAAACATTTCA
CATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGGGCT
TCTTCGATTCTAGGAGCCATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAACA
GCAAAAATATCTCTTGATCGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACA
GCCCTACTCTTACTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTATATTAT
TAACAGATCGGAATTTAAATAACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATC
CTATCCTCTACCAACATTTATTT

Cypridopsis sp Tres garantias Quintana Roo Oss-026

TTATAGTAATACCTATTATAATCGGGGGCTTTGGTAATTGGTTAGTTCCCTTAAT
ACTAGGTGCCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGATTCTGGCT
TCTTCCCTCCTTCGCTATCTCTTAAACAATTGGGATATTAAGTAAAAGTGGTGCA
GGAACAGGATGAACTGTATACCCCCACTATCAAGAAACATTTACATGCAGG
GGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTCTTTACATTTAGCAGGGGCTTCTTCGATT
CTAGGAGCCATTAATTTTATTACTACCATCATTAAATATGCGAACAGCAAAAATA
TCTCTTGATCGGATTCCCTTATTTGTTTGATCAGTCGGAATTACAGCCCTACTCT
TACTATTATCCTTACCTGTGCTTGCTGGAGCTATTACTATATTATTAACAGATCG
GAATTTAAATAACAACGTTTTTTGATCCAGCTGGAGGAGGTGATCCTATCCTCTA
CCAACATTTATTT

Cypria kraepelini Corea del Sur Oss-53

TAGGAACCGCTTTAAGAGTAATTATTCGAACTGAACTAGGTCAGCCTGGTTCTT
TAATTGGAAACGACCAAATCTATAACACTATTGTTACAGCCCACGCCTTCATTA
TAATTTTCTTNATAGTTATACCTATCTTAATTGGAGGGTTTGGAATTGATTAGT
TCCTTTAATACTAGGCGCCCCTGATATGGCCTTCCCCGAATAAATAATATAAG
ATTTTGACTTCTTCCGCCATCACTGACTTTGCTCAGACTTGGAATACTGACAGA
AAGGGGGGCAGGAACAGGCTGAACTGTCTACCCTCCTCTATCAAGAAACCTTT
CCCACTCAGGGGCAAGAGTAGATCTATCAATCTTTTCTTTCATCTTGCTGGTG
CTAGATCTATTCTAGGGGCCATTAATTTTATTACTACAATTGCTAATATACGAG
CAGCAAGAATATCTTTAGATCGAATTCCTTTATTTGTATGATCCGTAGGTATCA
CAGCCCTTCTCCTACTTTTGTCTCTTCCCTGTTCTAGCTGGAGCAATCACAATACT
TTTGACAGATCGAAATCTAAATACAACCTTTTTTT

Cypria cf. *kraepelini* Laguna Vernet Oss-140

CACACTCTACTTAATTTTCGGTGCCTGATCAGCAATAGTAGGAACCGCATTAAAG
AGTCGTCATTCGNGCTGAACTTGGTCAACCCGGAGCTCTTATTGGTAACGATCA
AATCTATAAATACCATTGTAACAGCCCACGCATTATTATAATCTTCTTCATGGT
AATACCCATCTTAATCGGAGGATTTGGAAATTGACTCGTTCCTCTAATGCTAGG
CGCNCCAGATATAGCCTTCCCTCGAATAAACAAACATAAGATTTT

Cypria cf. *kraepelini* Laguna Vernet Oss-141

CACACTCTACTTAATTTTCGGTGCCTGATCAGCAATAGTAGGAACCGCATTAAAG
AGTCGTCATTCGGGCTGAACTTGGTCAACCCGGAGCTCTTATTGGTAACGATCA
AATCTATAAATACCATTGTTACAGCCCACGCATTATTATAATCTTCTTCATGGTA
ATACCCATCTTAATCAGAGGATTTGGAAATTGACTCGTTCCTTTAATGCTAGGC
GCTCCAGACATAGCCTTCCCTCGAATAAACAAACATAAGATTTTGACTTCTTCCC
CCCTCCCTATCACTTCTGACCCTTGGACTTTTAAACAGAAAGGGGAGCTGGGACC
GGTTGAACCGTTTACCCTCCTTGATCCAGTAACATTTCTCATTTCGGGGGCCAGA
GTAGATTTAACAATCTTTTCACTCCACTTAGCAGGAGCTAGGTCCATCCTNNGG
GCAATCAATTTTATTACTACTATTGCCAACATACGAGCAGCAAGNATATCTTTA
GACCGAATCCCATTATTCATATGATCCGTAGGAATCACAGCCCTTCTTCTTCTTC
TATCCTTACTGGTTCTTGCAGGAGCTATTACCATACTTTTAAACGGACCGAAATC
TTAACACAACCTTCTTCGACCCAGCCGGAGGGGGAGACCTGATTTTATATCAAC
ATCTCTTT

Cypretta campechensis Silvituc Oss-205

GAAGAGCAATGCTAGGAACGGCTCTTAGAGTAATTATTCGTGCTGAATTAGGC
CAACCAGGTTCTTTAATTGGTAATGATCAGATTTATAATAACAATCGTTACTGCC
CATGCATTCATTATGATTTTCTTTATAGTAATGCCTATNATAATTGGAGGGTTG
GAAATTGATTAGTTCCGCTTATACTAGGGGCACCAGATATAGCATTCCCTCGAA
TGAATAATATAAGGTTTTGATTATTACCCCTTCTCTTTCTCTTTTAAACAATTGG
TCTATTAACAGAAAGTGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTATACCCTCCACTTT
CCGGGAACATCGCTCATTAGGATCTAGAGTAGATTTAACAATTTTTTCTCTTC
ATTTAGCTGGGGCATCTTCAATTTTAGGCGCAATTAACCTTTATTACAACNATTA
TTAATATAACAAGCCGCAAGAATATCCCTAGATCGAATTCCCCTTTTCGTTTGAT
CAGTAGGAATTACTGCTTTACTACTTCTCTTATCCCTTCCAGTCCTTGCAGGAGC
GATCACAACTACTACTGATCGAAA

Cypretta campechensis Silvituc Oss-206

TGAAAGAGCAATGCTAGGAACGGCTCTTAGAGTAATTATTCGTGCTGAATTAG
GCCAACCAGGTTCTTTAATTGGTAATGATCAGATTTATAATAACAATCGTTACTG
CCCATGCATTCATTATGATTTTCTTTATAGTAATGCCTATTATAATTGGAGGGTT
TGGAAATTGATTAGTTCCGCTTATACTAGGGGCACCAGATATAGCATTCCCTCG
AATGAATAATATAAGGTTTTGACTATTACCCCTTCTCTTTCTCTTTTAAACAATT
GGTCTATTAACAGAAAGTGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTATACCCTCCACT
TTCCGGGAACATCGCTCATTAGGATCTAGAGTAGATTTAACAATTTTTTCTCTT
CATTTAGCTGGGGCATCTTCAATTTTAGGNGCAATTAACCTTTATTACAACGATT
ATTAATATAACGAGCCGCAAGAATATCCCTAGATCGAATTCCCCTTTTCGTTTGA
TCAGTAGGAATTACTGCTTTACTACTTCTCTTATCCCTTCCAGTCCTTGCAGGAG
CGATCACAACTACTACTGATCGAAA

Cypretta campechensis Silvituc Oss-207

AGAGCAATGCTAGGAACGGCTCTTAGAGTAATTATTCGTGCTGAATTAGGCCA
ACCAGGTTCTTTAATTGGTAATGATCAGATTTATAATAACAATCGTTACTGCCCA
TGCATTCATTATGATTTTCTTTATAGTAATGCCTATTATAAATTGGAGGGTTTGG
AATTGATTAGTTCCGCTTATACTAGGGGCACCAGATATAGCATTCCCTCGAATG
AATAATATAAGGTTTTGACTATTACCCCTTCTCTTTCTCTTTAACAATTGGTC
TATTAACAGAAAGTGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTATACCCTCCACTTTCC
GGAAACATCGCTCATTTCGGGATCTAGAGTAGATTTAACAATTTTTTCTCTTCAT
TTAGCTGGGGCATCTTCAATTTTAGGGCGCAATTAACCTTATTACAACGATTATT
AATATACGAGCCGCAAGAATATCCCTAGATCGAATTCCCCTTTTCGTTTGATCA
GTAGGAATTACTGCTTTACTACTTCTTATCCCTCCAGTCCTTGCAGGAGCGA
TCACAATACTACTTACTGATCGAACTTAAACACAACCTTCTTTGACCCTGC

Cypridopsis sp Charco 3 Jonuta-Escarcega Oss-210

GAAGAGCAATGCTAGGTACAGCCCTAAGAGTAATTATTCGAAGTGAGCTAGGA
CAACCTGGATCTTTAATCGGTAATGATCAAATTTACAATACTATTGTTACTGCT
CATGCTTTCATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCCATCATAATTGGGGGATTG
GAAATTGATTGGTTCCATTAATACTTGGTGCACCTGACATGGCTTTTCCTCGAA
TGAATAATATGAGATTTTGGCTTCTCCCTCCATCATTATCATTGTTAACTGTTGG
TATATTAACAGAAAGCGGGGCAGGAACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCACTAT
CCAGAAATATCTCCATTCTGGAGCAAGAGTTGATTTAACAATCTTTTCCCTTC
ATCTCGCAGGTGTATCCTCAATTCTTGGGGCAATCAATTTCACTACTATTAT
TAACATGCGAACC GCAAAAATATCATTAGATCAAATTCCTACTCTTTGTATGATC
AATTGGTATTACCGCACTCTTATTACTATTATCTTTACCAGTGTTAGCTGGAGCA
ATTACTATATTATTGACAGACCGAAATATAAATACAACCTTTT

Cypridopsis sp Laguna Pte Milagros Oss-215

TAGGAACCGCTTTAAGAGTAATTATTCGAGCTGAATTAGGCCAACCGGAACT
TTAATCGGTAATGACCAAATTTATAACACCATTGTTACTGCTCATGCAATTTATT
ATAATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTNGTGGCTTTGGTAATTGACTAG
TTCCCTTAATATTAGGTGCCCCAGACATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAA
GATTCTGGCTTCTTCTNCTCATTATCTCTTAAACAATTGGGATACTAACTGA
AAGTGGTGCAGGAACTGGCTGAACTGTATATCCTCCACTATCAAGAAACATTT
ACATGCAGGGGCAAGAGTAGATCTTACAATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGGGC
TTCTTCGATTCTAGGGGCCATTAATTTTATTACTACCATTAATATGCGAACA
GCAAAAATATCTCTTGATCGAATTCCTTTATTTGTTTGGTCAGT

Anexo 6. Artículo taxonómico sometido.

On three new *Cypretta* Vávra, 1895 species (Crustacea: Ostracoda) from the Yucatan Peninsula, Mexico

SERGIO COHUO-DURAN¹, MANUEL ELIAS-GUTIERREZ^{2*} & IVANA KARANOVIC³

¹*Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Av. Universidad 3000, México, D.F. 04510, Mexico. E-mail: Sergiocd@comunidad.unam.mx*

²*El Colegio de la Frontera Sur, Av. Centenario Km 5.5, Chetumal 77014, Quintana Roo, Mexico. E-mail: melias@ecosur.mx*

³*Present address: Hanyang University, Department of Life Science, college of Natural Sciences, 17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea. E-mail: Ivana.Karanovic@utas.edu.au*

*Corresponding author

Abstract

Three new species from the genus *Cypretta* Vávra, 1985 are described from the Southern Mexico. These descriptions contribute to the systematic of the group and represent the first record of the genus in Mexico and Central America. *Cypretta campechensis* n. sp. is close related to Florida and North Carolina species as *C. nigra* Furtos, 1936, *C. brevisaepta* Furtos, 1934 and *C. bilicis* Furtos, 1936, but it shows a peculiar, new taxonomic character, denticles on the anterior margin on both valves instead funnel-shaped canals. *Cypretta spinosa* n. sp. is related to the North and South American species as *C. intonsa* Furtos, 1936 and *C. vivacis* Würdig & Pinto, 1993, but also with some Australian and South-east Asian Islands ones, such as *C. obfuscata* Victor & Fernando, 1981 and *C. raciborskii* Grochmalicki, 1915). The last species described herein, *Cypretta maya* n. sp., is related to the South-east Asia islands, Australian and North Indian Species, in particular to *C. hirsuta* Henry, 1923, *C. longidactyla* Victor & Fernando, 1981, and *C. patialensis* Battish, 1982. Here we propose a brief explanation about the relation between species known from the Central America and Asia-Oceania based on the geological processes. We also point out a necessarily revision of the genus due to the limited taxonomic descriptions of several species.

Key Words: Diversity, Zoogeography, Systematic, Freshwater Ostracods.

Introduction

The genus *Cypretta* Vávra, 1895, is a group of ostracods living predominantly in freshwater with some species occasionally found in waters with a higher salinity. The genus is considered tropical and subtropical, although some species have been recorded from temperate regions of North America and Europe (Sharpe 1910, Furtos 1936, Sohn & Kornicker 1972). The type species, *Cypretta tenicauda* (Vávra, 1895), was described from Zanzibar (Vávra 1895), as a subgenus of *Cypridopsis* Brady, 1867. Müller (1898) erected it to the genus level, based on the presence of the radial septae along the anterior margin of the valves, and a fully developed uropodal ramus, which has a trunk and two narrow, elongated claws.

Furtos (1934) and later, Sohn & Kornicker (1972) revised the diagnosis of the group and provided details of some appendages such as the second antenna, mandible, uropodal ramus and shell structure. Although Sohn & Kornicker (1972) provided the most accurate description of the genus, up to now the morphology of some appendages and structures remain uncertain in this group. Currently, *Cypretta* encompasses 49 species (Karanovic 2012), descriptions of many being limited and based on the carapace outline and the appearance of the uropodal ramus. The incomplete taxonomic descriptions are the major problem in the systematics of this group and could be a possible cause of some synonyms on one side, and hidden diversity on the other.

The following species are described or subsequently transferred to *Cypretta* (in alphabetical order): *C. alagarkoilensis* Victor & Michael, 1975; *C. baylyi* McKenzie, 1966; *C. brevisaepta* Furtos, 1934; *C. brevispina* Farkas, 1959; *C. bilicis* Furtos, 1936; *C. comitisroseni* (Brehm, 1924); *C. cordata* Klie, 1938; *C. costata* Müller, 1898; *C. devexa* (Daday, 1910); *C. dubiosa* (Daday, 1901); *C. fontinalis* Hartmann, 1964; *C. fossulata* (Daday, 1910); *C. foveata* Hartmann, 1964; *C. gargi* Deb, 1983; *C. globosa* (Brady, 1886); *C. globula* (Sars, 1889); *C. globulosa* (Sharpe, 1910); *C. hirsuta* Henry, 1923; *C. infesta* Klie, 1941; *C. intonsa* Furtos, 1936; *C. judayi* Tressler, 1937; *C. kawatai* Sohn & Kornicker, 1972; *C. kenyensis* Klie, 1939; *C. lemurensis* (Vávra, 1895); *C. lindbergi* Hartmann, 1964; *C. longidactyla* Victor & Fernando, 1981; *C. lutea* McKenzie, 1966; *C. margalefi* Brehm, 1949; *C. minna* (King, 1855); *C. murati* Gauthier, 1939; *C. nigra* Furtos, 1936; *C. nukuhivana* Furtos, 1934; *C. obfuscata* Victor & Fernando, 1981; *C. oxyuris*

Daday, 1910; *C. papuana* Vávra, 1901; *C. patialensis* Battish, 1982; *C. raciborskii* (Grochmalicki, 1915); *C. ramai* Deb, 1984; *C. remota* (Vávra, 1906); *C. reticulata* Lowndes, 1932; *C. rotunda* Ghetti, 1972; *C. sarsi* Brady, 1902; *C. schubarti* Farkas, 1959; *C. seurati* Gauthier, 1929; *C. tenicauda* (Vávra, 1895); *C. turgida* (Sars, 1896); *C. viridis* (Thomson, 1879); *C. vivacis* Würdig & Pinto, 1993 and *C. yapinga* De Deckker, 1982. Majority of the currently recognized species have a relatively restricted distribution and only *C. seurati* and *C. minna*, seem to have a wider range, being recorded from Europe, Africa and Australia (Sohn & Kornicker 1972, Victor & Fernando 1981, Dumont & Martens 1996, Smith & Janz 2008). The greatest number of the *Cypretta* species were described from Asia, 10 are known from the Pacific islands and six are found in India, only *C. lindbergi* was found away from the Indian subcontinent, namely in the Persian Gulf area (Sohn & Kornicker 1972, Deckker 1981). Africa accounts for 11 species, described mainly from the eastern and southern part of the continent. Eight species are known from Oceania, seven of them found in Australia and *C. viridis* in New Zealand (Eagar 1971). Only *C. rotunda* was described from Europe, but *C. seurati* and *C. minna* have also been recorded here (Sohn & Kornicker 1972, Rossi *et al.* 2003, Poquet *et al.* 2008). America has 13 known species, eight from the North, one from the Caribbean Islands and four from the South. The majority of these species are restricted to a relatively small area, and only *C. brevispina* is widely distributed, originally reported from the USA (Danforth 1948) and later found in Brazil (Farkas, 1959). Due to the lack of studies on Ostracoda, there are no previous reports of *Cypretta* species from Mexico or Central America. Only some valves of a dubious *Cypretta brevisaepta* were found in sediments from the lake Peten-Itza (Guatemala) (Pérez *et al.* 2010), but the study of a complete organism is required to confirm their presence.

A recent survey of the Yucatán peninsula, Mexico, revealed the presence of three new species of the genus *Cypretta*, all of them will be described in the following sections.

Material and Methods

From 50 localities surveyed in the Yucatan Peninsula, Mexico, only eight contained *Cypretta* Vávra, 1895 species.

Samples were collected with a hand net (50 µm mesh size) from the littoral zone, by filtering at least 200 l of water. We passed the net through submerged vegetation, rocks and any other refuge for the organisms. If a limnetic zone was developed, then we took several vertical tows with a plankton net (50 µm mesh size, 30 cm mouth), from near the bottom to the surface. All original samples were deposited at El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal Unit (ECOSUR). Sampling period includes the years 2002 to 2011 at different dates (Table 1). Samples were fixed with 96% ethanol. Specimens were sorted in the laboratory under a stereomicroscope.

Only organisms with complete soft parts and valves were studied. The complete organisms were dissected by using tungsten needles and mounted in a mixture of glycerol and formaldehyde (1:1) on a slide and covered with a coverslip. The resulting slides were sealed on their borders with Depex mounting medium (WWR International). The appendages and valves were measured with a stage micrometre adapted to a Nikon light microscope. Same microscope was used to make drawings with the aid of a camera lucida. Non-dissected material was preserved in plastic tubes in 70% ethanol. All studied material was deposited at El Colegio de la Frontera Sur Reference Zooplankton Collection (ECO-CH-Z). Accession numbers are provided.

Terminology and abbreviations used in text and figures:

Martens (1987) revised the terminology for A2 given originally by Broodbakker & Danielopol (1982) which is followed here. The terminology for the antennula follows Karanovic (2005), while the one for the, Md, T1 and T2 follows Broodbakker & Danielopol (1982), and for the T2 and T3 Meisch (1996). Here, the view of Meisch (2007) regarding the terminology and homology of the most posterior appendage on the ostracod body (“furca”) is accepted. A1 -antennula; A2 - antenna; Md - Mandibula; Mdp- Mandibular palp; Mxp – maxilular palp; UR – uropodal ramus; T 1 - first leg , T2 - second leg, T3 – third leg. LV - left valve; RV - right valve. Ex- Exopodite. En- Endopodite. CB- Coxabasis.

Results

Classification

Order	Podocopida Sars, 1866
Suborder	Podocopina Sars, 1866
Family	Cyprididae Baird, 1845
Subfamily	Cyprettinae Hartman, 1964
Genus	<i>Cypretta</i> Vávra, 1895

Amended diagnosis

Small animals, about 1 mm in length, carapace tumid and globose. Anterior margin of both valves with a row of radiating septa, denticles or funnel-shaped radial pore canals, with a seta passing through it. Surface ornamentation punctuate, reticulate or smooth. Right valve usually overlapping left one, although in some species the left valve overlaps the right one. A1, 7-segmented with the Rome's organ present. A2, 5-segmented with swimming setae at least reaching the tip of terminal claws. Third masticatory process of Mx usually armed with two fairly strong spines, toothed or smooth. Terminal segment of Mxp cylindrical and armed with two or three claws and two or three setae. T2 with basal segment bearing d1 and d2 setae, second segment with a single seta, terminal segment with a long claw. T3 with a pincer organ developed, terminal segment not clearly separated from the penultimate one, basal segment of the same appendage with three setae. Uropodal ramus not reduced, carrying two narrow elongated claws, one, two or absent posterior setae and anterior seta can be present or absent. Posterior portion of ovary coiled, forming a spiral in the posterior brood chamber. Prehensile palps of male asymmetrical, Zenker organ rectangular with square shape dorsal projection and bearing closely approximated spines, irregularly distributed, arranged in 16-18 not clearly separated whorls of spines. Hemipenis with two conspicuous terminal lobes and a small medial lobe.

Type species: *Cypridopsis (Cypretta) tenicauda* Vávra, 1895. Zanzibar.

Cypretta campechensis n. sp.

Figures 1- 4, Plate 1, A-C.

Material examined

Holotype: female dissected on one slide (1:1 Glycerol – Formaldehyde sealed with Depex mounting medium WWR International) (ECO-CH-Z-07516) from Yucatán peninsula, Silvituc Lake (18.64054, -90.29552). Collected by Manuel Elias-Gutierrez, February 28, 2005. Allotype: Male dissected on one slide (ECO-CH-Z-07518) from same locality. Paratypes: 17 specimens from same locality, two females dissected on separate slides (ECO-CH-Z-07517, ECO-CH-Z-06235); thirteen females and two males preserved in ethanol (ECO-CH-Z-07531).

Other material

One female from San Jose lake (18.36886, -89.01259), dissected in one slide (ECO-CH-Z-07527); three females from Tenancingo lake (17.913694, -90.545833), one dissected in a slide (ECO-CH-Z-07528) and two preserved in ethanol (ECO-CH-Z-07533); two females from Esmeralda lake (18.351694, - 92.090861), one of them dissected in one slide (ECO-CH-Z-07526) and one preserved in ethanol (ECO-CH-Z-07534), six females from Charco hacia El Tigre (18.03957, - 90.87065) one of them dissected in one slide (ECO-CH-Z-07524) and five preserved in ethanol (ECO-CH-Z-07532); Laguna Las Golondrinas (17.88975, -90.818639), one female dissected in one slide (ECO-CH-Z-07525).

Etymology

This species is named after its known distribution, mainly in the Campeche State, Mexico.

Differential diagnosis

Relatively big animals, without setae on the dorsal margin of the carapace and surface smooth covered by short and sparsely hairs. Both anterior and posterior calcified inner lamellae narrow. Denticles present below anterior margin on both valves. Row of thin setae along with basally fused teeth present in females on postero-ventral side of calcified inner lamella on both valves. In males thin setae present on RV, and teeth on LV. Flange well developed only ventrally. T2 with seta “e” short and “f” long and strong. Hemipenis

with anvil-like outer lobe and medial lobe without spine-like process. On UR, Anterior claw distally curved and shorter than ramus, Posterior claw short, reaching just half length of anterior claw, anterior seta reaching 1/6 length of anterior claw; posterior seta less than a half of posterior claw.

Description of the female

Carapace compressed, broadly arched in lateral view, greatest height around middle, or slightly to posterior half of valves (Figure 1 A, B). Surface of valves smooth, with short and sparsely distributed setae. Valves slightly asymmetrical, LV overlapping RV on anterior and posterior ends (Figure 1 C, D). Length of LV (Figure 1 B) equalling 0.751 – 0.860 mm, height 0.618-0.678 mm. Dorsal margin convex, with no marginal setae present.

Ventral margin slightly concave around middle, with flange overlapping it. Anterior and posterior margins rounded, posterior one slightly wider than anterior one. Anterior margin internally with 15-17 uniformly distributed teeth. Calcified inner lamella covering 3.67-4.76% on anterior side and 7.83 - 8.73%, on posterior end (Figure 1 E). Row of 15 basally fused teeth present medially on postero-ventral calcified inner lamella. Length of RV 0.727 – 0.830mm with dorsal and ventral posterior margins similar to LV (Figure 1A). Anterior margin with 17-19 internal teeth and abundant marginal setae. Calcified inner lamella covering 6.28 - 7.14% of the valve on posterior end, and 2.87 - 3.17% on anterior end (Figure 1F). Medially, on postero-ventral inner lamella, a row of thin and short setulae present. Muscular scar imprints on shell consist of five large adductor scars and two elongated mandibular scars.

A1 (Figure 2A), 7-segmented. First segment (CB) with three setae; CB2 exceeding distal end of following segment and setae Ex1 and Ex2 long and pappose, Ex2 just exceeding distal end of fifth segment and Ex1 with 9/10 the length of Ex2. Seta CB1 missing. Second segment (En1) with seta En 1a, reaching 1/3 of following segment and Rome's organ present. Third segment (En 2) with En 2a exceeding distal end of fifth segment and En2c, reaching distal end of fourth segment. Fourth segment (En 3) posteriorly with En 3c and En 3d equally long, reaching distal end of penultimate segment. Anteriorly, seta En 3a smooth, while En3b sparsely covered with short setulae. Fifth segment (En 4) with four setae, the posterior En 4d pappose, extended beyond terminal segment. En 4c, smooth just exceeding

distal end of terminal segment. Anterior setae En4a and En4b long and pappose. Sixth segment (En5) with En 5a, En 5b and En 5c, long and pappose. En5d smooth, 17.1 times as long as terminal segment. Terminal segment (En6) with four setae, En6a and En6b long and pappose, En6c short and smooth, 3.7 times longer than segment, Seta *ya* 5.3 times length of terminal segment. Length ratios between last five segments 2.8: 1.6: 1.1: 0.9: 1.

A2 (Figure 2B), 5-segmented. Basal segment with two equally long, pappose setae. Second segment with one long and pappose seta, exceeding distal end of terminal segment.

Exopodite (Ex) with two short and one long setae. First endopodal segment (En 1) with six swimming setae, five of them feathered and extended slightly beyond tips of terminal claws, while sixth one smooth and shorter, reaching distal end of penultimate segment.

Anterior end of this segment carrying one pappose seta, extended beyond terminal segment and one asthetasc antero-medially. Second endopodal segment (En2) with two unequal and smooth posterior setae and four anterior setae: longer ones similar in length (approximately 8.4 times length of terminal segment), and shorter ones slightly more than half-length of two longer setae. Distal end of same segment with two z-seta (z2 and z3) and three terminal claws, G1, G2, G3 subequally long, (10.4 times length of terminal segment) with spine-like tips. Terminal segment (En 3) bearing one short smooth seta, and one asthetasc (y3) along with two claws GM and Gm, the later approximately 4/5 length of GM. Length ratio of endopodal segments 7.4: 4.6: 1.

Md (Figure 2C, D) mandibular coxa armed with seven teeth, and three teeth-like setae between them. Outer tooth more strongly developed than other ones. Basis of inner teeth with three setulae and two pappose setae. One strong and pappose seta situated more proximally on coxa and approximately 1.5 length of outer tooth.

Mdp (Figure 2D) 4-segmented. First segment with pappose α seta, not reaching end of following segment. Second segment with setal group consisting on three long and pappose setae. β seta strong and pappose, reaching distal end of segment. Posteriorly three unequally long setae. Penultimate segment with nine setae distributed on anterior and posterior ends, posterior ones subequally long: one of these setae swollen and modified into claw, and representing γ -seta. Terminal segment with two claw-like setae and two setae. Former ones subequally long (both with spine-like tip), with 4.4 times length of terminal segment.

Mxp (Figure 2E). Two-segmented. First segment with 7 setae, two distinctively stronger and longer than rest. Second segment cylindrical, approximately 1/3 length of first segment. On distal end second segment bearing five claw-like setae, four of them subequally long, 2.2 times length of last segment while fifth one, 2/3 length of longer ones. Teeth on third masticatory process smooth.

Rake-like organ (Figure 3A) T-shaped with seven and eight teeth on left and right sides respectively.

T1 (Figure 3B) with protopodite armed with ten pappose terminal setae, and three subterminal pappose setae. “b” seta present, exceeding distal end of protopodite.

T2 (Figure 3C), 5-segmented. Protopodite bearing long and pappose d1 and d2 setae. First endopodal segment with seta “e” pappose, not reaching distal end of third endopodal segment. Second endopodal segment with seta “f” pappose, extended beyond of terminal segment. Seta “g” on third endopodal segment, slightly exceeding distal end of terminal segment. Fourth endopodal segment short, with terminal claw, long and strong, distally serrated, with two times the length of last three segments combined. Setae h1 pappose and h3 smooth.

T3 (Figure 3D) 4-segmented. Protopodite with d1, d2 and dp long and pappose setae. First endopodal segment with seta “e”, subapical, short and pappose. Second endopodal segment with seta “f” short on medio-lateral side. Terminal segment reduced to a pincer-like organ, with short and strong h2 seta which distally serrated, h1 claw-like and short, and h3 long and plumose on dorsal side.

UR (Figure 3E) long and thin, anterior margin smooth, 1.3 times longer than anterior claw. Anterior claw thin and distally serrated. Anterior seta short, 1/6 length of anterior claw. Posterior claw thin and distally serrated, not reaching half length of anterior claw. Posterior seta less than half of posterior claw. Attachment of UR (Figure 3F) long and narrow, distally bifurcated.

Male

RV (Figure 4A). Length 0.660 – 0.705mm, height mm. Similar to female. Anterior end with 16 teeth along internal margin. Postero-ventral end of inner lamella with 12 teeth fused basally. LV (Figure 4B). Length 0.680 - 0.718. On anterior margin 15-17 teeth

distributed along internal margin. Anterior inner lamella covering 3.6 - 3.9% and posterior one 2.8 - 3.1%, carrying postero-ventrally a row of radiating, thin and short setulae.

A1 (Figure 4C) without sexual dimorphism, length ratios of five distal segments 3: 1.9: 1.1: 1.07: 1.

A2 (Figure 4F) sexually dimorphic, second endopodal segment (En 2) anteriorly with only two setae (t-setae), one smooth and long, other pappose and 2/3 the length of previous seta. Three z-setae present. On the same segment, G1 is reduced reaching just two thirds the length of adjacent claws (G2 and G3). On terminal segment GM present and Gm modified into a seta. Length ratios of the endopodal segments 7.8: 4.3: 1.

T1 (Figure 4D), protopodite bearing 8 pappose terminal setae and two subterminal setae. One seta "a" and "b" present. Prehensile palps two-segmented and asymmetrical. Left palp (Figure 4D) stout, with first segment cylindrical. Inserted on distal end a couple of little outgrowths along with sensory organ present. Finger curved and wide. Right palp (Figure 4E) with first segment narrower than left palp and with sensory organ at distal end. Finger also narrow with sensory organ at distal end.

Hemipenis (Figure 4G) with two conspicuous terminal lobes, external one anvil-like. A small lobule between them, without spine-like process. Internal canals double coiled.

Distribution

Recorded in Laguna Silvituc, Laguna Esmeralda, Charco hacia el Tigre, Laguna San José, Laguna Tenancingo, Laguna las Golondrinas, and Laguna Pedro Baranda (Figure 11)

Remarks and affinities

Cypretta campechensis n.sp., belongs to the group of species in which the LV overlaps the RV. Currently there are five species with the same character: *C. reticulata* Lowndes, 1932; *C. schubarti* Farkas, 1959; *C. nigra* Furtos, 1936; *C. brevisaepta* Furtos, 1934 and *C. bilicis* Furtos, 1936. Among them the last three species were described from Florida and North Carolina (Furtos 1934, 1936). *Cypretta campechensis* and the three North American species are closely related, sharing some characteristics such as a short posterior seta on the UR, and the posterior claw half (or less) the length of the anterior claw. These features clearly distinguish them from *C. schubarti* and *C. reticulata*, because the former has the posterior

seta on the UR as long as the posterior claw and the latter one has the posterior claw on the UR longer than $\frac{1}{2}$ length of the anterior one. The main distinguishing feature of *C. campechensis* is the presence of denticles instead of funnel-shaped radial pore canals on the anterior margin on both valves, but this species also differs from *C. brevisaepta* by the shape of the outer lobe on the hemipenis. In the Mexican species the hemipenis is anvil-like, and it does not have a spine-like process on the medial lobe, while it is oval with a spine-like process in *C. brevisaepta*. The new species also has a well-developed flange, overlapping ventral margin of both valves. The Mexican species differs from *C. nigra* by the length of the “f” seta on the T2: in *C. nigra* this seta slightly exceeds distal margin of the terminal segment; in *C. campechensis* the “f” seta is much longer, by far exceeding distal end of the segment. The two species also differ in the length of terminal segment of the Mxp: in *C. campechensis* it is two times longer than wide, in *C. nigra* it is three times longer than wide. *Cypretta campechensis* and *C. bilicis* differ mainly in the shape of the outer lobe of the hemipenis, as in *C. bilicis* it is narrow and rounded.

Cypretta spinosa n. sp

Figures 5-7, Plate 1, D-F, J.

Material examined

Holotype: Female dissected in one slide (1:1 Glycerol – Formaldehyde sealed with Depex mounting medium WWR International) (ECO-CH-Z-07519) from Yucatán peninsula, Silvituc Lake (18.64054, -90.29552). 28 Feb 2005. Collected by Manuel Elias-Gutierrez, February 28, 2005. Allotype: A female dissected on one slide (ECO-CH-Z-07520) from same locality. Paratypes: 4 females preserved in ethanol (ECO-CH-Z-07535) from the same locality.

Etymology

The name is a Latin adjective, *spinosa*, which means spiny, highlighting the specific ornamentation on the valves in this species.

Differential diagnosis

Small organisms with its valves, with several spine-like setae on surface and along margins. Seta En 6a and En 6b on A1 reduced. A2 with G2 strong and toothed. Mdp with γ -seta, strong and smooth reaching the half length of terminal setae. On T2, Seta “f” reaching proximal third of terminal claw and on penultimate segment presence of two anterior setae. Posterior claw on UR reaching $\frac{3}{4}$ of anterior claw and posterior seta exceeding the half length of Posterior claw. Attachment of UR not bifurcated terminally.

Description of the female

Carapace tumid, in lateral view subovate. Greatest height around middle, slightly toward posterior half. Surface of valves pitted and covered with short spine-like setae and thin setae. On postero-dorsal and postero-ventral side dark-patches (Figure 5 A, B). Valves slightly asymmetrical, RV overlapping LV on anterior and posterior side (Figure 5 C, D). Length of LV (Figure 5B) ranging from 0.521-0.581mm, height 0.393 – 0.387mm. Dorsal margin convex, sloping more softly towards anterior than towards posterior end. Ventral margin slightly concave around middle. Posterior end rounded with 12 marginal teeth on postero-ventral region, while 15 teeth present on anterior end. Four adductor muscular and two mandibular imprints are present. Calcified inner lamella of LV 10.3 - 11.96% of length anteriorly, and 4.35 - 5.98% posteriorly. From 13 to 15 anterior radial pore canals (Figure 5E). Length of RV (Figure 5A) ranging from 0.539 – 0.600mm, height 0.418 – 0.424mm. Dorsal and ventral margins similar to left valve. Posterior end broadly rounded. Anterior end with 12-14 radial pore canals (Figure 5 F). Calcified inner lamella 13.87 - 15.17% of length anteriorly and 7.54 - 8.3% posteriorly.

A1 (Figure 6A) 7-segmented. First segment (CB) with three setae. Ex1 and Ex2 long and pappose, CB2 reaching distal end of following segment, CB1 missing. Second segment (En 1), anteriorly with short and smooth En1a; Rome organ present. Third segment (En2) with En 2a exceeding slightly penultimate segment and En 2c exceeding distal end of following segment. Fourth segment (En3) with En 3a and En 3b smooth, subequally long, reaching distal end of terminal segment. Fifth segment (En 4) with four unequal setae. Anteriorly, En4a and En 4b long and pappose, 24.7 times as long as terminal segment. Posteriorly, En

4c and En 4d short setae. Sixth segment (En 5) with four setae, En 5a and En 5b pappose, 27.3 times length of terminal segment. Seventh segment (En 6) with four setae, En 6a and En 6b pappose 19.3 times length of sixth segment. En 6c short, 3.6 times length of this segment and seta ya about 14 times length of last segment. Length ratios of last five segments 3.5: 1.3: 1.1: 0.6: 1.

A2 (Figure 6B) 5-segmented. Protopodite two segmented, first segment with two setae equally long and pappose. Second segment with one long and pappose seta exceeding distal end of terminal segment. Exopodite with two short and one long setae. First endopodal segment (En1) with six swimming setae, five of them feathered and just reaching tips of terminal claws, while sixth one also feathered but less than half length of long setae. Asthetasc Y on antero-medial side of first endopodal segment, and one smooth apical seta on anterior end, just exceeding distal end of terminal segment. Second endopodal segment (En 2), with three unequally long anterior setae and two posterior smooth setae, 2.9 times length of terminal segment. Three z-seta present. Five strong terminal claws, G1, G2, G3 and GM approximately subequal, 6.4 times length of terminal segment. Gm reduced, 3/4 length of other claws. G1 strongly serrated on distal end. Third endopodal segment (En 3) carrying one short seta and one asthetasc (γ_3) along with GM and Gm claws. Length ratio of endopodal segments 4.4: 2.25: 1.

Md (Figure 6C). Mandibular coxa armed with seven teeth and three teeth-like setae. Basis of inner tooth with three setae, longer one pappose. One strong and pappose seta present on proximal side of coxa, with less than 1/3 the length of outer tooth.

Mdp (Figure 6D). Four-segmented. First segment with two long S-setae, one long seta, and α seta smooth just reaching distal end of segment. Second segment with setal group composed of three pappose setae extended beyond last segment, and β seta swollen and pappose. On posterior side three setae present, one of them short and pappose, other two long and smooth. Third segment with nine setae, one of them smooth, modified into a claw (γ -seta). Terminal segment with four claw-like setae, longer one approximately 5 times length of terminal segment.

Mxp (Figure 6E) 2-segmented. First segment with six setae, longer one three times length of terminal segment. Second segment cylindrical, two times longer than wide. Distally five claw-like subequally long setae, three times length of segment. Teeth on third masticatory process of maxilla smooth.

Rake-like organ (Figure 6F) T-shaped with eight teeth on each organ.

T1 (Figure 7A) with protopodite armed distally with eight similar pappose setae and three subterminal pappose seta. Two “a” and one “d” setae present, far exceeding distal end of protopodite.

T2 (Figure 7B). 5-segmented. Protopodite with relatively long d1 and d2 setae. First endopodal segment with seta “e” exceeding distal end of following segment. Second endopodal segment with seta “f”, 6.8 times length of terminal segment. Third segment with two short, unequal, anterior setae. Terminal segment with strong h2 seta, distally serrated, 12.4 times length of segment. Seta h1 twice as long as h3.

T3 (Figure 7C). 4-segmented. Protopodite with d1, d2 and dp setae long and pappose. First endopodal segment with seta “e” smooth. Second endopodal segment with seta “f” short. Third endopodal segment transformed into pincer organ with long h2 seta, distally serrated. Seta h3, smooth, slightly more than half length of segment.

UR (Figure 7D) long and thin, ventral margin smooth, 1.2 times longer than anterior claw. Anterior claw distally serrated. Anterior seta short and smooth, approximately 1/7 length of anterior claw. Posterior claw smooth, $\frac{3}{4}$ length of anterior claw. Posterior seta smooth, slightly more than half length of posterior claw. Attachment of UR, long and narrow not distally bifurcated (Figure 7E).

Male

Not known

Distribution

Recorded only from its type locality (Figure 11).

Remarks and affinities

Cypretta spinosa n.sp., belongs to the group of *Cypretta* where the RV overlaps the LV. Within this group, *C. spinosa* is closely related to *C. obfuscata* Victor & Fernando, 1981; *C. raciborskii* (Grochmalicki, 1915); *C. intonsa* Furtos, 1936 and *C. vivacis* Würdig & Pinto, 1993. They share the following characters: posterior seta on the UR equals more than a half of the posterior claw, and the seta on the antepenultimate segment of the T2 by far exceeds distal end of the terminal segment. *Cypretta obfuscata* and *C. raciborskii* are known from Malaysia and Indonesia (Victor & Fernando 1981). *Cypretta intonsa* and *C. vivacis* are American species, the former known from the North (Furtos 1936) and the latter from the South of the continent (Würdig & Pinto 1993).

Cypretta spinosa differs clearly from the south eastern Asian species by the appearance of the shell surface: in the Mexican species the surface is pitted and covered with several hair-like and spine-like setae; in *C. obfuscata* it is covered with the reticulated patterns and sparsely hirsute; in *C. raciborskii* the surface is punctuate with few and sparsely distributed hair-like setae. The three species also differ in the appearance of the aesthetasc “Y” on the A2: in *C. spinosa* it is long and 2-segmented, in *C. obfuscata* and *C. raciborskii* it is short and 3-segmented. The Mexican species differ from *C. raciborskii* in the length of the posterior claw on UR, which in *C. spinosa* exceeds half-length of the anterior claw, while in *C. raciborskii* it is less than half as long as the anterior one.

In comparison to the American species, *C. spinosa* differs from *C. intonsa* by the length : width ration of the terminal segment on the Mxp (it is two times longer than wide in the Mexican species, three times in *C. intonsa*). Both American species differ from *C. spinosa* in the length of the posterior seta on the UR, which is slightly more than a half length of the posterior claw in *C. spinosa*, while in *C. intonsa* and *C. vivacis* it is as long as the posterior claw. *Cypretta spinosa* and *C. vivacis* additionally differ in the appearance of the valve surface: in *C. vivacis* the surface is hirsute and sculptured (not pitted).

Cypretta maya n. sp

Figures 8-10, Plate 1, G-I, K, L.

Material examined

Holotype

Female dissected on one slide (1:1 Glycerol – Formaldehyde sealed with Depex mounting medium WWR International) (ECO-CH-Z-07529) from Ramonal Pond (19.392111, -88.623861). 24 Oct 2002. Collected by Manuel Elias, February 28, 2005. Allotype: A female dissected on one slide (ECO-CH-Z-07530) from same locality. Paratypes: 2 females preserved in ethanol (ECO-CH-Z-07536) from same locality. Other material: 6 females from Charco near Carrillo Puerto Town (19.6425, -87.998), three of them dissected on separated slides (ECO-CH-Z-07521, ECO-CH-Z-07522, ECO-CH-Z-07523), remain three were preserved in ethanol (ECO-CH-Z-07537).

Etymology

The name is in the honour to the Mayan culture, present in the area of the species distribution.

Differential diagnosis

Small organisms with its surface valves pitted and covered by abundantly hairs mainly along margins. Septae on RV not reaching the margins. LV with teeth on anterior and posterior internal margins. On A2, asthetasc Y, three segmented. Smooth teeth of third masticatory process of maxilla. Last segment of Mxp 1.4 times longer than wide. On Mdp α seta smooth, reaching the distal end of following segment. Short setae d1, d2 on T2. On UR, posterior claw more than half length of anterior claw and posterior seta very short just reaching 1/5 length of posterior claw; anterior setae tiny with 1/11 length of anterior claw. Curved main branch on UR attachment.

Description of the female

Carapace tumid, in lateral view subovate. Greatest height approximately on middle of valves. Surface of valves pitted, covered with thin and short setae. Valves asymmetrical with RV overlapping LV (Figure 8C, D). LV (Figure 8B) Length ranging from 0.630 to 0.670mm, height from 0.430 to 0.448mm. Dorsal margin convex, sloping more softly to the

posterior side. Ventral margin slightly concave on medial region. Posterior side rounded, internally with 10-12 teeth on postero-ventral position. Anterior side slightly ovate with 10-13 teeth along inner margin and 12 long radial pore canals (Figure 8E). Four adductor muscular and two mandibular scars present. Calcified inner lamella of LV covering 7.46 - 8.94% in anterior side and 6.45 - 7.31% on posterior side. RV (Figure 8A). Length 0.660 to 0.703mm, height 0.436 to 0.449mm, dorsal and ventral side similar to left valve. Posterior side rounded and on inner lamella 9 basal fused teeth. Anterior side with 15 radial pore canals and with Calcified inner lamella covering 8.80-9.75% on anterior side and 5.8- 6.5% on posterior side (Figure 8F).

A1 (Figure 9A) 7-segmented. CB with three setae. Ex1 and Ex2 long and pappose. CB2 short, not reaching distal end of following segment; CB 1 missing. Second segment (En 1), with En1a short and with Rome's organ. Third segment (En2) with En 2a not reaching distal end of penultimate segment and En 2c short, reaching about half length of following segment. Fourth segment (En3) with En 3a and En 3b long and smooth, En 3c and En 3d short and unequal. Fifth segment (En 4) with four unequal setae. Anteriorly En 4a and En 4b long and smooth, slightly unequal, the longer one (En 4b) 30.6 times length of last segment. Posteriorly, En 4c and En 4d short and unequal. Sixth segment (En 5) with four setae, En 5a, En 5b and En 5c, smooth and sub equally 32.4 times length of last segment. En 5d, short, 18 times length of last segment. Seventh segment (En 6) with four setae, En 6a and En 6b long and smooth, 33.2 times length of last segment. En 6c short, 4.9 times length of last segment and seta *ya*, 14.1 times length of last segment. Length ratios of last five segments 2.9: 1.8: 1.3: 1.1: 1.

A2 (Figure 9B), 5-segmented. First segment of the protopodite with two setae long and pappose. Second segment of the protopodite with a long anterior seta extended beyond distal end of last segment and remains of exopodite (Ex), composed by two short and a long seta. First Endopodal segment (En1) with six swimming setae, five of them reaching the tips of terminal claw while the sixth one, short with about one third length of adjacent setae. On anterior side of this segment, an apical seta is exceeding distal end of last segment and on medially region one asthetasc (Y), three segmented. Second endopodal segment (En 2) with two posterior seta slightly unequal and two anterior setae. Three z-seta present. On distal end. Claws G1, G2 and G3, approximately subequal, 8.4 times length of last segment.

Third endopodal segment (En 3) carrying GM approximately subequal in length with G3, Gm reduced, 5/6 length of GM and one aesthetasc (y3), with more than a half length of GM. Length ratios of endopodal segments 5.8: 3.1: 1.

Md (figure 10A). Mandibular coxa armed with nine teeth and two teeth-like setae. The basis of inner tooth with two unequal setae. The basis of outer tooth with a strong and smooth seta.

Mdp (Figure 10B) 4-segmented. First segment with S-setae long and α seta smooth, reaching the distal end of following segment. Second segment anteriorly with setal group pappose and smooth, 5.6 times length of last segment. Seta β swollen and pappose reaching the distal end of third segment. On posterior side three unequal seta, longer one with 9.2 times length of last segment. Third segment with five setae on postero-medial region. On distal end six setae, Gamma seta modified into a strong claw and cover with short hairs. Terminal segment with five unequal claw-like setae, all of them smooth.

Mxp (Figure 9C). 2-segmented. First segment with two subterminal setae one of them long and pappose, with 4.6 times length of last segment. Five unequal setae on distal end of segment, the long one pappose, 5.2 times length of last segment. Second segment cylindrical, 1.4 times longer than wide. Distally five claw-like setae slightly unequal, the longer one 3.1 times length of the segment. Teeth of third masticatory process of maxilla smooth.

Rake-like organ (Figure 9D) T-shaped with eight teeth on each organ.

T1 (Figure 10B) with protopodite, armed on distal end by nine pappose setae, seven of them approximately similar. Two subterminal pappose setae and one “c” seta next to “d” seta exceeding distal end of protopodite.

T2 (Figure 10C). 5-segmented. Protopodite bearing d1 and d2 short and paposse setae. First endopodal segment with Seta “e”, short and strong, reaching distal end of following segment. Second endopodal segment with Seta “f”, long and strong, 8.1 times length of terminal segment. Third segment with Seta “g” just reaching distal end of following segment. Terminal segment with a strong claw distally serrated (h2), with length of four previous segments combined. Seta h1 short. Seta h3 missing

T3 (Figure 10 D). 4-segmented. Protopodite with d1 short just reaching the distal end of protopodite; d2 and dp long and pappose. First endopodal segment with a short and strong

apical seta, reaching $\frac{1}{4}$ length of following segment. Second endopodal segment with Seta “F”, short and smooth. Third endopodal segment, transformed into pincer organ, with a long h2, distally serrated. Seta h3 pappose, reaching more than a half length of second endopodal segment.

UR (Figure 10E). Ramus long and thin, ventral margin smooth, 1.2 times longer than anterior claw. Anterior claw long and smooth. Anterior seta short with $\frac{1}{11}$ the length of anterior claw. Posterior claw smooth, exceeding half length of anterior claw. Posterior seta short and smooth approximately $\frac{1}{5}$ length of posterior claw. Attachment of UR, long and narrow, distally bifurcated (Figure 10F).

Male

Not known

Distribution

Recorded from Ramonal pond and Charco near Carrillo Puerto town, in the Mayan zone of the state of Quintana Roo (Figure 11).

Remarks and affinities

Cyprretta maya n. sp., belongs to the group of species where RV overlaps LV, and it is most closely related to *C. hirsuta* Henry, 1923; *C. longidactyla* Victor & Fernando, 1981, and *C. patialensis* Battish, 1982. They all have the posterior claw on the UR shorter than the anterior one, and the posterior seta reaching only distal end of the ramus. Their valves are globular with both margins approximately equally wide, and the greatest H laying around the middle. These three species are distributed in the South and South-East Asia and Oceania: *C. hirsuta* was described from Australia (Henry 1923); *C. patialensis* from India (Battish 1982) and *C. longidactyla* from the Philippines (Victor & Fernando 1981).

Cyprretta maya can be easily distinguished from *C. patialensis* based on the morphology of the third masticatory process of maxilla (teeth are present on the claws of this appendage in *C. maya* and absent in *C. patialensis*); length of the UR (in *C. maya* it is 1.2 times longer than the anterior claw, in the Indian species the claw is longer than the ramus); and the

length of the anterior claw (in *C. maya* it is more than half as long as the anterior claw, in *C. patialensis* the claw is less than half as long as the anterior one).

C. maya and *C. longidactyla* differ clearly in the morphology of the ventral margin of the valves. Namely, *C. longidactyla* has a prominent bulge on the LV looking from the inside, while in *C. maya* the internal margins are normally developed, i.e. they do not possess a bulge. In *C. longidactyla* the anterior claw on the UR is extremely long, overpassing the length of the ramus.

Cypretta maya and *C. hirsuta* differ mainly in the valve appearance, The Mexican species are more elongated, being about two times longer than wide, while *C. hirsuta* is more globular with the equal length and width. *Cypretta hirsuta* is also slightly longer than *C. maya*.

Discussion

With the description of three new species from Yucatan, the genus *Cypretta* currently comprises 52 recent species. According to Gauthier (1939) the genus could be subdivided in two groups depending on the valve overlap. The first group includes species in which the LV overlaps the RV. Gauthier (1939) followed by Sohn & Kornicker (1972) even proposed separate them from the *Cypretta* genus, but they never implemented in the literature. These species also do not possess a typical radiating septa on the valves margins, observed in other *Cypretta*. Sohn & Kornicker (1972) described these septae as funnel-shaped canals, each one terminating with a seta. Actually six species can be classified into this group, five of them present in American continent, one from Brazil (*C. schubarti*), three from North America (southeaster United States) (*C. nigra*, *C. brevisaepta*, *C. bilicis*) and *C. campechensis* from Central America (Southern Mexico). The latter four species are the most closely related, but *C. campechensis* shown an important variation in the morphology of the septae on valves, because it seems that they are not funnel-shaped canals and there is no seta passing through them, the structures present on Central American species are calcified denticles. This character definitely has an important phylogenetical significance and if present in other *Cypretta* species from Central America would mean that they represent a separate lineage within the genus.

Cypretta spinosa and *Cypretta maya* belongs to the group of the species were RV overlaps LV which is the more diverse one, having 45 species worldwide distributed. The Mexican species are clearly differentiated from them, showing a particular close relation with the Indian, South eastern Asian islands and Australian species. Other crustacean group such as Rotifera (Garcia-Morales & Elias-Gutierrez 2004; Garcia-Morales & Elias-Gutierrez 2007) and Cladocera (Elias-Gutierrez *et al.* 1999; Elias-Gutierrez *et al.* 2006) have similar zoogeographical connections. In the *Cypretta* species, this close relationship is evident by the presence of a combination of the conservative characters: for example, the length of the posterior seta and the posterior claw on the UR, and the three segmented asthetasc Y on A2. This may suggest a common ancestor for these species. This could be supported by the theory proposed by Blakey (2008), who consider that in the geological history, Mexico and Central America were part of the ancient peri-gonwanan terrain, Hunic, extending through the south Eurasia, North Africa and Indian subcontinent. A part called Cimmeria was situated below Hunic, extending all the way to Australia. From Cimmeria the Pacific islands and South-east Asia became. In the period between the late Ordovician to the early Devonian, Hunic and Cimmeria were connected, which probably enabled faunal exchange. Subsequent separation was followed by diversification on each continent, but they still preserve some common characters as seen in the case of the Mexican species. This is one possible approach to understand the phylogenetic relationship of the Central American fauna, and certainly further study will enrich our present knowledge.

The distribution map of the new *Cypretta* species found in Yucatan peninsula (Figure 11) reveals particular patterns: *C. campechensis* is mostly found in the southwest part of the peninsula; *C. maya* is present in two systems restricted to the central region and *C. spinosa* n. sp. was found only in the Silvituc lake, in the southwest of the peninsula and it seems to be endemic to a very small region. More studies on Northern Guatemala are needed to clarify the distribution of these taxa. Yucatan peninsula is already known for the endemic fauna: Iliffe (1993) pointed out that at least 20 crustacean troglobiont species have been described from this region and Suárez-Morales & Reid (2003) reported the presence of 16 freshwater endemic copepods.

Acknowledgements

This work is part of the M.Sc. thesis at Instituto de Ciencias del Mar y Limnología in the Universidad Nacional Autónoma de México of the first author, granted with a CONACYT fellowship for these studies. Patricia Quiroz-Vazquez assisted with field collections. El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal Unit, gave access to his Reference Collection of Freshwater Zooplankton and provided all laboratory facilities to work.

References

- Battish, S. K. (1982) Freshwater Ostracods of the family Cypridopsidae from Punjab, India, with the description of two new species. *Journal of Natural History*, 16, 83–94.
- Blakey, R. (2008) Gondwanan paleogeography from assembly to breakup- A 500 m.y. odyssey. In Fielding C.R. Frank T. D. and Isbell J. L., (eds.), *Resolving the late Paleozoic Ice Age in Time and Space*. Geological society of America. Special paper 44, p 1–28.
- Broodbakker, N.W. & Danielopol, D.L. (1982) The chaetotaxy of Cypridacea (Crustacea, Ostracoda) limbs: proposal for a descriptive model. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 52, 103–120.
- Danforth, W. (1948) A List of Iowa Ostracoda with Descriptions of Three New Species. *Proceedings of the Iowa Academy of Science*, 55, 351–359.
- Deckker, P., (1981) 10. Ostracods of athalassic saline lakes. *Hydrobiologia*, 81–82, 131–144.
- Dumont, H. & Martens, K. (1996) The freshwater microcrustacea of Easter Island. *Hydrobiologia*, 325, 83–99.
- Eagar, S. (1971) A Check List of the Ostracoda of New Zealand. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 1, 53–64.

Elias-Gutiérrez, M., Ciro-Pérez, J., Suárez-Morales, E. & Silva-Briano, M., (1999) The Freshwater Cladocera (Orders Ctenopoda and Anomopoda) of Mexico, with Comments on Selected Taxa. *Crustaceana*, 72 (2), 171–186.

Elias-Gutiérrez, M., Kotov, A. & Garfias-Espejo, T., (2006) Cladocera (Crustacea: Ctenopoda, Anomopoda) from southern Mexico, Belize and northern Guatemala, with some biogeographical notes. *Zootaxa*, 1119, 1–27.

Farkas, H. (1959) Die Beschreibung von *Cypretta schubarti* n.sp. (Ostracoda) aus Sudamerika. *Annales historico-naturales Musei Nationalis Hungarici.*, Ser. novo 9, 51, 277–280.

Furtos, N. (1934) Two New Species of *Cypretta* (Ostracoda) from the Marquesas Islands and Florida with notes on the distribution of the genus. *Pacific Entomological Survey*, 7, 21.

Furtos, N. (1936) Fresh-Water Ostracoda from Florida and North Carolina. *American Midland Naturalist*, 17, 491–522.

García-Morales, A. & Elias-Gutiérrez, M. (2004) Rotifera from southeastern Mexico, new records and comments on zoogeography. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología*, 75(1), 99–120.

García-Morales, A. & Elias-Gutiérrez, M., (2007) The Rotifer fauna of Guatemala and Belize: survey and biogeographical affinities. *Revista de Biología Tropical*, Vol. 55 (2), 569–584.

Gauthier, H. (1939) Contribution a l'etude de la faune dulcaquicole de la region du Tchad et particulierement des Branchiopodes et des Ostracodes. *Bulletin de l'Institut Francais d'Afrique Noire*, 1 (1), 110–244.

Henry, M. (1923) A Monograph of the fresh-water Entomostraca of New South Wales, part III, Ostracoda. Linnean Society of South Wales, Proceedings, volume 48, 267-286.

Illiffe, T.M. (1993) Fauna Troglobia Acuática de la Península de Yucatán. In Salazar-Vallejo S.I. y González N.E. (eds.), *Biodiversidad Marina y Costera de México*. Comisión Nacional de Biodiversidad y CIQRO, México, pp. 673–686.

Karanovic, I. (2005) Comparative morphology of the Candoninae antennula, with remarks on the ancestral state in ostracods and a proposed new terminology. *Spixiana*, 28, 141–60.

Karanovic I. (2012) Recent freshwater Ostracods of the World. Crustacea, Ostracoda, Podocopida. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg, 608 pp.

Martens, K. (1987) Homology and functional morphology of the sexual dimorphism in the antenna of *Sclerocypris* Sars, 1924 (Crustacea, Ostracoda, Megalocypridinae). *Bijdragen tot de Dierkunde*, 57, 183–190.

Meisch, C. (1996) Contribution to the taxonomy of *Pseudocandona* and four related genera, with the description of *Schellencandona* nov. gen., a list of the Candoninae genera, and a key to the European genera of the subfamily (Crustacea, Ostracoda). *Bulletin de la Société des Naturalistes Luxembourgeois*, 97, 211–237.

Meisch, C. (2007) On the origin of the putative furca of the Ostracoda (Crustacea). *Hydrobiologia*, 585, 181–200.

Müller, G. W. (1898) Die Ostracoden. *Abhandlungen herausgegeben von der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft*, 21 (2), 257–296.

Pérez, L., Lorenschat, J., Brenner, M., Scharf, B. & Schwalb, A. (2010) Extant freshwater ostracodes (Crustacea: Ostracoda) from Lago Petén Itzá, Guatemala. *Revista de Biología Tropical*, 58, 871–95.

- Poquet, J.M., Mezquita, F., Rueda, J. & Miracle, M.R. (2008) Loss of Ostracoda biodiversity in Western Mediterranean wetlands. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18, 280–96.
- Rossi, V., Benassi, G., Veneri, M., Bellavere, C., Menozzi, P., Moroni, A. & McKenzie, K. (2003) Ostracoda of the Italian ricefields thirty years on: new synthesis and hypothesis. *Journal of Limnology*, 61, 1–8.
- Sharpe, R. (1910) On Some Ostracoda, Mostly New, in the Collection of the United States National Museum. *Proceedings of the United States Natural Museum*, 38, 335–41.
- Smith, R. J., Janz, H. (2008) Recent species of the Family Candonidae (Ostracoda, Crustacea) from the ancient Lake Biwa, Central Japan. *Journal of Natural History*, 42 (2), 865–922.
- Sohn, I.G., & Kornicker, L. (1972) Morphology of *Cypretta kawatai* Sohn and Kornicker, 1972 (Crustacea, Ostracoda), with a Discussion of the Genus. *Smithsonian Contribution to Zoology*, 141, 1–28.
- Suárez-Morales, E. & Reid, J. (2003) An Updated Checklist of the Continental Copepod Fauna of the Yucatan Peninsula, Mexico, with Notes on Its Regional Associations, *Crustaceana*, 76 (8), 997–991.
- Vávra, W. (1895) Süßwasser-Ostracoden Sansibars ges. Dr. Stuhlmann: Beih z. Jahrb. D. Hamburg. Wiss. Anat., 12.
- Victor, R. & Fernando, C. H. (1981) Freshwater Ostracods (Crustacea: Ostracoda) of the Genus *Cypretta* VÁVRA, 1895 from Malaysia, Indonesia and the Philippines. *International Review of Hydrobiology*, 66, 415–433.

Würdig, N.L. & Pinto, I.D. (1993) A new freshwater Ostracoda from southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 65 (1), 89–99.

Table 1. Location and limnological data of studied lakes where *Cypretta* species occur.

Lake	N	W	Date	D. oxygen (mg l ⁻¹)	Temp. (°C)	Conductivity (µScm ⁻¹)
Silvituc	18.64054	-90.2955	07/02/2011	9.57	28	0.24
Tenancingo	17.913694	-90.5458	25/03/2010	0.41	31.4	1.48
Esmeralda	18.351694	- 92.0908	24/03/2010	0.52	30.8	0.476
El Tigre	18.03957	- 90.8706	26/02/2011	-	30	-
Golondrinas	17.88975	-90.8186	25/03/2010	0.10	32.6	2.08
San Jose	18.36886	-8901259	22/05/2011	3.83	30.2	-
Ramonal	19.392111	-88.6238	04/07/2002	0.28	27.6	0.383
Carrillo Pto.	19.6425	-87.998	24/08/2002	4.02	28.1	0.32



El Colegio de la Frontera Sur

Código de barras y análisis filogeográfico de rotíferos
(Monogononta, Ploima) del sureste mexicano

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Doctorado en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable

por

Alma Estrella García Morales

2013

DEDICATORIA

A mi mamá Alberta Morales Ramírez y mi hermano Oscar Omar con mucho amor y cariño. Gracias por estar siempre conmigo, alentándome para no rendirme en los momentos difíciles. Gracias por su apoyo y amor.

A mis queridos sobrinos Jonathán Yael y Ana Paola, por su cariño y sus travesuras.

A la vida y su maravillosa diversidad.

AGRADECIMIENTOS

A El Colegio de la Frontera Sur unidad Chetumal por el apoyo institucional y de infraestructura para la realización de mi tesis doctoral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A mi director de tesis el Dr. Manuel Elías Gutiérrez, por confiar en mí, por sus consejos y comentarios para llevar a buen término mi trabajo de tesis.

A mi consejo tutelar integrado por el Dr. David González Solís, el Dr. Marcelo Silva-Briano y el Dr. Luis Fernando Carrera Parra por sus comentarios y aportaciones para mejorar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Eduardo Suárez Morales jefe del laboratorio de zooplancton por las facilidades e infraestructura otorgadas para la buena realización del trabajo de laboratorio.

Al laboratorio de Códigos de Barras de la Vida, nodo Chetumal por el apoyo con el equipo y material para la obtención del material genético y su amplificación.

A la Dra. Sarah Adamowicz y el Dr. Ryan Gregory de la Universidad de Guelph, Canadá, así como al Dr. Elías Piedra y la M. en C. Carmen Serranía de la FES-Iztacala por permitirme trabajar en sus laboratorios y asesorarme con los protocolos y técnicas moleculares.

Al Dr. Jorge Ciro y al Dr. Gerardo Ortiz de la FES-Iztacala por permitirme trabajar en sus laboratorios y hacer uso de su equipo.

A mis profesores de los cursos de doctorado, la Dra. Dolores González y el Dr. Efraín de Luna (INECOL), así como los doctores Mario González, Neptalí Ramírez y Luis Bernardo Vázquez (ECOSUR-San Cristóbal) por sus enseñanzas y consejos.

Al Dr. Eduardo Naranjo (ECOSUR-San Cristóbal) por su apoyo para la colecta de algunas muestras en las inmediaciones de la selva Lacandona.

A Nataly Ivanova, Alex Borisenko y Rick Turner de la Universidad de Guelph, así como a Monica Enriquez y Lorena Ramírez de INECOL por el apoyo técnico y/o de alojamiento que me brindaron y por compartir momentos agradables y divertidos.

A Giezi Yam, Sergio Cohuo y a mi prima Karen Maya por su ayuda en el trabajo de campo.

A José Santos Gómez por su ayuda con la búsqueda de bibliografía.

Contenido

RESUMEN GENERAL	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
EL ADN MITOCONDRIAL Y EL GEN CITOCROMO C OXIDASA 1	5
DIVERSIDAD GENÉTICA	6
FILOGEOGRAFÍA	7
EL FILO ROTIFERA.....	9
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
ÁREA DE ESTUDIO	21
FISIOGRAFÍA	21
GEOLOGÍA	23
CLIMA Y VEGETACIÓN.....	24
HIDROLOGÍA	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	30
CAPÍTULO 1 DNA BARCODING OF FRESHWATER ROTIFERA IN MEXICO: EVIDENCE OF CRYPTIC SPECIATION IN COMMON ROTIFERS	32
ABSTRACT	33
INTRODUCTION	33
MATERIALS AND METHODS.....	34
RESULTS.....	36
DISCUSSION.....	37
CONCLUSIONS	41
REFERENCES	41
SUPPORTING INFORMATION	44
CAPÍTULO 2 VARIABILIDAD GENÉTICA DE ROTÍFEROS MONOGONONTOS DE MÉXICO.....	67
RESUMEN.....	68
INTRODUCCIÓN	69
MATERIALES Y MÉTODOS	70
RESULTADOS	71
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES	78
LITERATURA CITADA.....	79
APÉNDICES.....	84

CAPÍTULO 3 GENETIC DIVERSITY AND COMPARATIVE PHYLOGEOGRAPHY OF BRACHIONUS GENUS (ROTIFERA: MONOGONONTA) FROM MEXICO AND OTHER PARTS OF THE WORLD	94
ABSTRACT	96
INTRODUCTION	97
MATERIALS AND METHODS	99
RESULTS	103
DISCUSSION	110
CONCLUSIONS	118
REFERENCES	120
TABLES	130
FIGURES	135
APPENDIXES	139
CONCLUSIONES GENERALES.....	144
LITERATURA CITADA GENERAL.....	147

RESUMEN GENERAL

En este trabajo, se presentan los resultados del primer estudio a nivel mundial del código de barras y variabilidad genética de diversos táxones de rotíferos monogonontos de México. También se presenta el primer análisis de filogeografía comparada de 12 táxones del género *Brachionus*. Para el estudio del código de barras, se secuenciaron 417 especímenes que representan 63 morfoespecies, colectadas de 62 cuerpos de agua. La divergencia genética intraespecífica promedió 0.7%, mientras que entre los géneros fue de 20%. No existió traslape entre las divergencias intraespecíficas e interespecíficas; por lo tanto, el código de barras fue exitoso en discriminar la mayoría de las especies identificadas morfológicamente. Sin embargo, esta metodología reveló posibles eventos de especiación críptica en *Ascomorpha ovalis*, *Lecane bulla*, *L. cornuta*, *L. curvicornis*, *L. crepida*, *L. lunaris*, *L. hastata*, *Platyias quadricornis*, *Keratella cochlearis*, *Brachionus calyciflorus*, *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*, *Testudinella patina* y *Mytilina ventralis* var. *macracantha*. Por otro lado, el análisis de variabilidad genética reveló una baja variación genética (H_d : 0.000-0.356 y π : 0.000-0.0039) en 34 táxones de rotíferos, sugiriendo un evento de colonización reciente o un efecto fundador persistente. Otros 13 táxones exhibieron una diversidad haplotípica y nucleotídica alta (H_d : 0.689-1.00 y π : 0.0100-0.2269). Los altos niveles de diferenciación genética pueden ser explicados por diferentes procesos tales como el azar, la adaptación local, el aislamiento geográfico o colonizaciones secundarias. Para el análisis filogeográfico se utilizaron 100 individuos de 12 táxones de *Brachionus* colectados en el centro y sureste mexicano. Los resultados revelaron una estructura

filogeográfica en *B. calyciflorus* y *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, cada uno con un linaje distribuido en la zona montañosa del centro de México y otro en las tierras bajas y tropicales del sureste mexicano. Eventos geológicos como la actividad volcánica ocurrida durante el período Mioceno-Plioceno fueron considerados como posibles factores promotores de la diferenciación genética de los rotíferos en esta región.

Palabras clave: COI, filogeografía comparada, diversidad, especies crípticas, diversificación.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La biodiversidad o diversidad biológica es definida como la variedad y variabilidad de organismos vivos y los complejos ecológicos de los cuales forma parte (Toledo, 1988), y se clasifica en diferentes niveles de organización biológica relacionados entre sí (genética, especies y ecosistemas), a fin de poder estudiarla (Chediack, 2009; Léveque y Mounolou, 2004). Dentro de estos niveles, la diversidad de especies es el que ha sido más estudiado (Conabio, 1998), y como resultado de este esfuerzo, en la actualidad se conocen alrededor de 2 millones de especies (Chapman, 2009). Sin embargo, algunos científicos han estimado que el número de especies desconocidas puede abarcar de 5 a 50 millones (Chapman, 2009; Wilson, 2003). De acuerdo con estas cifras, la inmensa mayoría de las especies no han sido aún descubiertas ni descritas y muchas de ellas corren el riesgo de extinguirse sin conocerse debido a las actividades humanas (Conabio, 1998).

Por otro lado, la identificación de las especies no siempre es una tarea fácil, de hecho los métodos taxonómicos tradicionales de identificación (basados en la morfología) consumen mucho tiempo y no siempre son suficientes para identificar especímenes a nivel de especie, sobre todo en aquellos casos donde diferentes especies exhiben una variación morfológica limitada o bien donde existe plasticidad fenotípica (Cywinska et al., 2006; Gómez, 2005). A lo anterior se suma la dramática falta de taxónomos en todo el mundo que afronten la tarea de investigar la biodiversidad, principalmente en los grupos taxonómicos con mayor riqueza de especies (invertebrados) donde el número

de táxones descritos es una pequeña proporción de la diversidad estimada (Blaxter, 2004; Rougerie et al., 2009; Witt et al., 2006).

Las tecnologías basadas en el uso del ADN (Acido Desoxirribonucleico) están siendo usadas como una opción para acelerar el reconocimiento de las especies y avanzar en el conocimiento que se tiene de la biodiversidad (Hogg y Hebert, 2004). Por ejemplo, Hebert et al. (2003a) propusieron usar una secuencia de aproximadamente 650 pares de bases (pb) de la subunidad 1 del gen mitocondrial citocromo c oxidasa (COI) como un sistema de identificación universal para animales. Esta secuencia genética corta y estandarizada es conocida de manera coloquial como código de barras o *barcode* (Hebert et al., 2003b). Múltiples estudios moleculares han demostrado que el COI o código de barras puede ser una herramienta confiable, ya que este gen pudo discriminar exitosamente las especies estudiadas en diferentes grupos de vertebrados (Borisenko et al., 2008; Hebert et al., 2004; Vargas et al., 2009; Ward et al., 2005) e invertebrados (Ball et al., 2005; Costa et al., 2007; Witt et al., 2006).

En la actualidad, el COI está siendo usado como una herramienta complementaria al trabajo taxonómico tradicional, ayudando no solo en la identificación de las especies, sino también en el reconocimiento de las especies crípticas y destacando táxones que requieren de una investigación taxonómica exhaustiva (Chen et al., 2011; Fisher y Smith, 2008; Lara et al., 2010). Adicionalmente, el COI es utilizado ampliamente como un marcador molecular para realizar estudios comparativos de diversidad (genética, de

especies), así como para estudios filogenéticos y filogeográficos (Elpidio y Hebert, 2003; Hajibabaei et al., 2007; Kaya et al., 2009).

El ADN mitocondrial y el gen citocromo c oxidasa 1

Entre las características moleculares que hacen especial al genoma mitocondrial (ADNmt) de los animales están que es una molécula circular covalentemente cerrada, de tamaño pequeño, conformada por un total de 37 genes (13 genes codificantes para proteínas, dos genes codificantes para ARN ribosomal y 22 genes codificantes para ARN de transferencia), además de una región mayor no codificante (llamada región control en vertebrados) que contiene sitios de iniciación para la replicación y transcripción del ADN mitocondrial (Vargas, 2009; Vázquez-Domínguez, 2007).

Desde un punto de vista filogenético, las ventajas del COI y en general del ADNmt residen en: 1) su haploidía, que permite secuenciar los productos de amplificación sin tener primero que clonarlos para distinguir entre los dos alelos de un gen (Birky, 2007); 2) son exclusivamente transmitidos por vía materna, por lo que las historias matrilineales de organismos con-específicos pueden ser recuperadas (Avise, 2000); 3) presentan baja variación intraespecífica; 4) son clonalmente heredados en copias sencillas, 5) hay ausencia de procesos recombinantes, por lo que las mutaciones en el ADNmt originadas en diferentes individuos no son recombinadas durante la reproducción sexual (Avise et al., 1987) y 6) presentan altas tasas de evolución a nivel

de secuencias de nucleótidos, es decir, que evolucionan más rápido que los genes nucleares, dando como resultado una acumulación de diferencias entre especies relacionadas y poblaciones (Avice, 2000; Hebert et al., 2003b).

Además de sus ventajas, el gen COI presenta algunas propiedades que lo han hecho útil como código de barras, entre ellas están que se encuentra en casi todos los organismos eucariontes como un componente crucial de la cadena de transporte de electrones durante la respiración aerobia (Lane, 2009), es relativamente fácil de amplificar en animales porque posee cebadores (*primers*) universales, por lo que las secuencias pueden ser obtenidas de cualquier especie (Folmer et al., 1994), el gen COI está presente en cientos de copias dentro de cada célula, lo que favorece su conservación y recuperación de muestras preservadas y de pequeñas cantidades de tejido (Hebert et al., 2003a), y generalmente carece de inserciones y deleciones (indels) (Suga et al., 2007).

Diversidad genética

La diversidad genética es el componente más básico de la biodiversidad (Piñero et al., 2008b) y se define como todas las variaciones heredables que se presentan entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Chediack, 2009). Esta diversidad es el resultado de diversos procesos como las mutaciones, recombinación, flujo genético, adaptación local, efecto de fundador y el aislamiento

geográfico (De Meester et al., 2002; González, 1998). Es por ello que su estudio y comprensión son de gran importancia para diversas áreas del conocimiento biológico; por ejemplo, el estudio de la diversidad genética se puede aplicar para conocer la riqueza genética de una especie y su distribución geográfica, así como para el estudio de la evolución, entre otros tipos de estudios (Piñero et al., 2008b).

Filogeografía

La filogeografía se define como la disciplina que estudia los patrones y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genéticos (Avice, 2000). Parte de la idea de que las especies en la naturaleza exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la geografía (Moreno, 2007). Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez (2009) mencionan que esta estructura genética puede ser compleja, por ejemplo, en especies que habitan áreas de fuerte actividad tecto-volcánica o paleoclimática o bien ser de menor complejidad, como en el caso de especies con altas tasas de migración o cuyo aislamiento, hablando en tiempos geológicos, es relativamente reciente (p. ej., última glaciación). De esta manera, es posible detectar la estructura filogeográfica entre poblaciones cuando el elemento genealógico es analizado a la par de los eventos geográficos e históricos (geológicos o climáticos) (Hernández-Baños et al., 2007). Esto es, al comparar las relaciones evolutivas de los linajes con su distribución geográfica, es posible tener un mejor entendimiento de cuáles factores históricos han influido más en la distribución de la variación genética. Para hacer esto, la filogeografía hace uso de la información proveniente de otros

disciplinas tales como la biología molecular, la sistemática filogenética, la paleontología, la geología y la geografía histórica (Piñero et al., 2008a).

La filogeografía se ha utilizado principalmente para estudiar patrones históricos y evolutivos entre subpoblaciones de una misma especie; sin embargo, también puede ser útil para inferir los mismos procesos comparando los patrones filogeográficos de varias especies o poblaciones co-distribuidas; esta última aproximación es conocida como filogeografía comparada (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). La filogeografía comparada estudia la influencia de los eventos históricos sobre la distribución y evolución de dos o más especies o táxones. Su objetivo es probar si diferentes táxones con distribuciones geográficas traslapadas o similares comparten una historia evolutiva en común (Vázquez-Domínguez, 2007; Zink, 1996). Por lo tanto, se define como el estudio de los efectos de la historia evolutiva y biogeográfica sobre la distribución de la variación genética en táxones co-distribuidos (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez, 2011).

Por otro lado, las aproximaciones filogeográficas también pueden ser útiles para inferir procesos, como flujo genético, colonización, cuellos de botella, fragmentación de hábitats, expansión del rango de distribución de las especies y poblaciones, vicarianza entre otros procesos (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). En el caso de la filogeografía comparada, al evaluar dos o más especies que comparten una distribución geográfica similar se pueden detectar no solo patrones de dispersión y

eventos vicariantes, sino también hibridación, contacto secundario, dinámicas de la población, entre otros (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez, 2011; Zink, 2002).

El Filo Rotifera

Uno de los principales grupos de invertebrados de agua dulce son los rotíferos, los cuales conforman el Filo Rotifera. Estos organismos son metazoos pseudocelomados, bilateralmente segmentados, que miden entre 50 y 2,000 μm de longitud (Brusca y Brusca, 2003). Se caracterizan por presentar una corona ciliar en la cabeza, una faringe especializada llamada mástax, la cual contiene unas estructuras denominadas trofi, cuya función es semejante a las mandíbulas; y una pared corporal sincicial llamada lorica, la cual puede presentar diversos tipos de apéndices y proyecciones (Wallace, 2002). De acuerdo con Segers (2002), el Filo está dividido en dos clases: Pararotatoria (Orden Seisonacea) y Eurotatoria, esta última comprende dos Subclases: Bdelloidea y Monogononta.

El Orden Seisonacea comprende una sola Familia (Seisonidae) y dos géneros (*Paraseison* y *Seison*) con tres especies de organismos marinos (Segers, 2007). Dos de estas especies (*P. annulatus* y *S. nebaliae*) son ectoparásitos del crustáceo del género *Nebalia*. La tercera especie (*S. africanus*) no se ha observado en asociación con el crustáceo (Wallace et al., 2006). La corona en estos rotíferos es altamente especializada y su trofi es de tipo fulcrado. Son organismos dioicos que contienen dos

gónadas y se reproducen sexualmente (Nogrady et al., 1993). La Subclase Bdelloidea comprende organismos que habitan en agua dulce, así como en musgos, líquenes y en el suelo. Se conocen alrededor de 461 especies (Segers, 2007). Poseen un cuerpo vermiforme con seudosegmentos y su corona ciliar está formada por dos trocos (campos ciliares en forma de disco). Tienen un pie desarrollado con un número variable de dedos (0-4), su trofi es de tipo ramado y presentan dos gónadas. Se reproducen por medio de partenogénesis obligada (Wallace et al., 2006).

La Subclase Monogononta agrupa organismos principalmente dulceacuícolas, aunque también pueden habitar en aguas salobres y salinas (Wallace et al., 2006). Los monogonontos son el grupo de rotíferos más grande del Filo, comprendiendo cerca de 1,566 especies válidas (Segers, 2007). En estos organismos, el cuerpo, la corona ciliar y el trofi son muy variables en forma. Todos los monogonontos poseen una sola gónada y son considerados dioicos, aunque en muchas especies no se han observado a los machos (Nogrady et al., 1993). Se reproducen por partenogénesis cíclica, la cual se caracteriza por alternar la fase asexual (partenogenética o amíctica) con una fase sexual (fase míctica). Bajo condiciones ambientales adversas, las hembras amícticas comienzan a producir hijas, denominadas hembras mícticas, las cuales producen huevos haploides que darán origen a machos (Wallace, 2002). Los machos aparecen por un breve periodo de tiempo (2-5 días) para inseminar a otras hembras mícticas que producirán cistes llamados huevos de resistencia, los cuales se fijan en el fondo del cuerpo de agua hasta que las condiciones ambientales vuelven a ser propicias para que

las hembras amícticas nazcan. Estas hembras amícticas entran en la fase asexual del ciclo de vida para producir más hembras amícticas. Los huevos de resistencia son muy resistentes a condiciones ambientales extremas y pueden dispersarse a grandes distancias geográficas por el viento o las aves migratorias (Wallace et al., 2006).

La mayoría de los rotíferos monogonontos viven en la zona litoral, con cerca de 100 especies limnéticas y alrededor de 150 forman parte del bentos (Ricci y Balsamo, 2000). En general, son organismos libre nadadores o se arrastran sobre el sedimento y unas pocas especies viven permanentemente fijas a un sustrato (p. ej., plantas acuáticas) (Wallace et al., 2006). Dentro de los sistemas acuáticos juegan un papel fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas, ya que son la base alimenticia de organismos de niveles tróficos superiores. Convierten la producción primaria (algas, cianobacterias) en una forma utilizable para los consumidores secundarios (p. ej., cladóceros, copépodos, larvas de insectos y peces) (Arndt, 1993). Son organismos oportunistas y adaptables cuya tasa de reproducción es una de las más rápidas entre los metazoarios (Brusca y Brusca, 2003).

El género *Brachionus*

Dentro de los rotíferos monogonontos, *Brachionus* es uno de los géneros más estudiados. Este grupo de rotíferos exhibe variación morfológica intraespecífica y se

piensa que las formas polimórficas en algunas especies, aparentemente son inducidas por factores bióticos y abióticos (Koste y Shiel, 1986). La mayoría de las especies son semi-limnéticas y sólo unas pocas son limnéticas (p. ej., *B. angularis*, *B. plicatilis*). Se encuentran en una variedad de ambientes que van desde aguas alcalinas hasta sistemas fuertemente eutróficos (Segers, 2008). En general las especies son termófilas y se distribuyen principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Koste y Shiel, 1986).

A nivel mundial se reconocen aproximadamente 57 especies y 13 infraespecies de braquiiónidos (Segers, 2007) y en México se tienen registradas 20 especies (Sarma, 1999). De todos los táxones de *Brachionus* reconocidos, 24 especies y 5 subespecies son endémicas, de estas, nueve especies son endémicas de Sudamérica. Por otro lado, algunas otras especies de origen neotropical (sudamericanas) como *B. havanaensis*, *B. satanicus* y *B. zahniseri* se han extendido a Norteamérica (Segers, 2008). También existe evidencia de que ciertas especies exhiben patrones de distribución restringida y especiación críptica, como el complejo *B. plicatilis* (Gómez et al., 2002; Mills et al., 2007). Sin embargo, se requiere de más investigación genética, morfológica, ecológica y de distribución para determinar si otras especies de *Brachionus* exhiben patrones similares.

De acuerdo con Dumont (1983) la aparente radiación de *Brachionus* pudo haber ocurrido en el continente Gondwana durante el Triásico superior-Jurásico inferior. Sin

embargo, Segers (2008) menciona que los patrones de endemidad en este grupo, centrados en Sudamérica y Australia, sugieren que el origen de *Brachionus* pudo haberse dado en el Cretácico superior.

ANTECEDENTES

Aunque en esta tesis se reporta el primer análisis sobre código de barras con un amplio número de especies de rotíferos, el gen COI ha sido previamente utilizado como marcador molecular en diversos trabajos, todos ellos con un ámbito muy limitado de especies, que permita analizar la diversidad críptica y patrones de distribución. Estos trabajos son mencionados a continuación: Por ejemplo, Gómez et al. (2002b), estudiando especímenes del complejo *Brachionus plicatilis*, colectados en 27 lagos de la península Ibérica y de otros lugares del mundo encontraron nueve linajes genéticamente divergentes; concluyendo que el alto porcentaje de divergencia (15-22%) y la ausencia de hibridización observada entre los nueve linajes genéticos, indican que estos representan especies diferentes. Posteriormente, Suatoni et al. (2006) analizaron poblaciones del complejo *B. plicatilis* provenientes de un mayor número de localidades de todo el mundo. Ellos encontraron 14 linajes profundamente divergentes, ocho de los cuales ya habían sido previamente identificados por Gómez et al. (2002b). Por su parte, Mills et al. (2007) encontraron cuatro linajes divergentes en *B. plicatilis sensu stricto*.

También se han encontrado divergencias genéticas en otros táxones de rotíferos. Derry et al. (2003) examinaron tres morfos de *Keratella cochlearis* (*tecta*, *robusta* y *faluta*) y dos de *K. hiemalis* (uniespinado y biespinado). Ellos encontraron una amplia divergencia genética entre las formas con espinas y sin espinas de *K. cochlearis*, sugiriendo la presencia de especies crípticas dentro de este complejo. En contraste la variación morfológica en *K. hiemalis* parece ser debido sólo a plasticidad fenotípica ya que los morfos uni y biespinados fueron muy similares genéticamente. Otras especies crípticas altamente divergentes se han encontrado en *Brachionus calyciflorus* por Gilbert y Walsh (2005) y Xiang et al. (2010, 2011). Experimentos de apareamiento realizados en estos estudios revelaron la existencia de aislamiento reproductivo entre algunos de los linajes genéticos analizados, apoyando así su estatus a nivel de especie.

A través de evidencia morfológica, reproductiva y genética Schröder y Walsh (2007) descubrieron tres especies crípticas en el complejo *Epiphanes senta*. Estas tres nuevas especies fueron descritas como *E. ukera* de Alemania, *E. chihuahuaensis* de Texas, Estados Unidos y *E. hawaiiensis* de Hawaii. Por su parte, Walsh et al. (2009) reportaron tres especies crípticas (que no fueron nombradas) dentro del complejo *Lecane bulla*, las cuales fueron encontradas en su patria en sistemas acuáticos del desierto de Chihuahua.

Por su parte, en rotíferos bdelloideos se ha encontrado una posible diversidad críptica mucho mayor a la de los monogonontos utilizando el gen COI. Por ejemplo, Fontaneto

et al. (2007) estudiaron ocho morfoespecies del género *Rotaria* y demostraron que estas especies han diversificado no solo en grupos o linajes genéticos distintos (especies crípticas), los cuales son prueba de evolución independiente; sino que también han experimentado divergencia ecológica por selección natural en la morfología del trofi, indicando divergencia del nicho. En estudios posteriores, Fontaneto et al. (2008) reportaron nueve especies crípticas en la especie *Philodina flaviceps*, mientras que Fontaneto et al. (2009) registraron 34 posibles especies crípticas en la especie *Rotaria rotatoria* y Fontaneto et al. (2011) 36 especies crípticas en el complejo reconocido como *Adineta vaga*. Estos investigadores atribuyen esta extraordinaria diversidad en bdelloideos a tres procesos principales: 1) al modo particular de reproducción (partenogénesis estricta), 2) a la heterogeneidad espacial y temporal del hábitat y 3) a su alto potencial de dispersión. Cabe señalar que un gran problema es que todas estas posibles especies crípticas no han sido nombradas hasta el momento.

Por otro lado, los patrones filogeográficos en rotíferos sólo han sido analizados en las especies: *B. plicatilis* s.s, *B. manjavacas* y *B. calyciflorus*. Gómez et al. (2000) investigaron la filogeografía de *B. plicatilis* s.s en la península Ibérica. Sus resultados revelaron dos linajes genéticos que mostraron una clara y restringida distribución geográfica; considerando que estos linajes posiblemente divergieron a principios del Pleistoceno debido a una fragmentación de la población con una posterior recolonización desde dos refugios glaciales en el sur de la península Ibérica. Gómez et al. (2007) estudiaron a la especie *B. manjavacas* encontrando dos clados profundamente divergentes. Sus resultados mostraron que uno de los clados tuvo un

patrón filogeográfico similar al de *B. plicatilis* s.s representado por: a) una fragmentación alopatrica entre las poblaciones y b) su posterior expansión geográfica por la península Ibérica durante el Pleistoceno. En su estudio a escala global, Mills *et al.* (2007) encontraron cuatro linajes divergentes en *B. plicatilis* s.s, los cuales parecen estar estructurados geográficamente en un modo casi continental con un linaje de Norteamérica, uno de Australia, uno del este del Mediterráneo y otro del oeste del Mediterráneo.

Xiang *et al.* (2010), estudiaron poblaciones de *B. calyciflorus* de diversas localidades del este de China. El análisis filogeográfico en este estudio reveló la presencia de tres especies crípticas. Una de estas especies (especie críptica 3) fue la más extendida, ya que agrupó haplotipos que se encontraron en todas las localidades estudiadas. Los resultados de Xiang *et al.* (2010) sugieren que algunos haplotipos de las tres especies crípticas pudieron haber sobrevivido en múltiples refugios glaciales en el sur de China durante la fase de enfriamiento *Younger Dryas* ocurrida a finales del periodo Pleistoceno. Desde estos refugios glaciales haplotipos de las tres especies crípticas se extendieron y recolonizaron el norte de China. Sin embargo, las evidencias obtenidas por Xiang *et al.* (2010) sugieren que la especie críptica 3, probablemente con una mayor capacidad de dispersión y adaptación pudo haber arribado y colonizado amplias áreas de China antes que las especies crípticas 1 y 2. Posteriormente, estas últimas se extendieron solo a unas pocas áreas de China debido a su débil capacidad de dispersión, a los persistentes efectos de fundador de la especie críptica 3, la reducción del flujo genético entre ellas y a la presencia de barreras geográficas (ríos o arroyos).

En otro trabajo filogeográfico, Xiang et al. (2011) analizaron poblaciones de *B. calyciflorus* provenientes de muestras colectadas en verano e invierno en el este de China. Su análisis filogenético reveló la presencia de ocho especies crípticas, de las cuales cuatro ya habían sido identificadas en un estudio previo (Xiang et al., 2010). Estas ocho especies crípticas exhibieron diversos patrones de distribución, cuatro de ellas (BcSI, BcSII, BcWI y BcWII) presentaron una distribución restringida, indicando un probable evento pasado de fragmentación de la población o una colonización histórica. Por otro lado, ellos no encontraron asociación entre distancia genética y geográfica en otras dos especies crípticas (BcWIII y BcSW), que fueron las más abundantes y con la distribución geográfica más amplia. Entre los posibles procesos que pueden explicar el patrón geográfico observado en las especies crípticas, se encuentran: 1) una expansión geográfica reciente, 2) colonización a larga distancia, y 3) contacto secundario entre distintos linajes que sobrevivieron en diferentes refugios glaciales; combinados con una alta capacidad de dispersión, flujo genético reducido y efectos de prioridad. Finalmente, ellos observaron una diferenciación genética mucho más grande entre poblaciones geográficas dentro de una sola temporada climática (verano o invierno) que entre diferentes temporadas.

Estos análisis filogeográficos demuestran que los rotíferos pueden exhibir altos niveles de diferenciación genética y endemismo local, a pesar de su alta capacidad para dispersarse pasivamente a largas distancias. Los estudios anteriormente mencionados

coinciden en que la expansión geográfica a través de la dispersión, la colonización a largas distancias, la adaptación local y el flujo génico restringido son algunos de los procesos responsables de la estructuración geográfica observada en los táxones estudiados.

JUSTIFICACIÓN

Nuestro entendimiento de la diversidad de los animales microscópicos es aún muy pobre, debido a que su taxonomía es poco confiable y a la falta de datos exhaustivos sobre la distribución de las especies (Dumont, 1980, Segers, 1996). En particular, el trabajo taxonómico para los rotíferos monogonontos se ha visto limitado por la notable falta de taxónomos que tengan la experiencia y el entrenamiento adecuados para identificarlos (Wallace et al., 2006). Por otro lado, su pequeño tamaño, así como su alta variación morfológica y gran plasticidad fenotípica, dificultan la determinación de morfoespecies claramente diferenciadas. Esto ha resultado en el uso de una enorme cantidad de categorías infrasubespecíficas (variedades y formas), arbitrarias hasta cierto punto, debido a que no se encuentran reguladas por ninguna autoridad, como el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Igualmente, se presentan un gran número de sinonimias e identificaciones erróneas o dudosas (Segers y De Smet, 2008; Wallace et al., 2006). Esta falta de caracteres taxonómicamente útiles, ha dificultado el reconocimiento de las especies crípticas (Segers, 2008), que han sido tradicionalmente identificadas a través de aproximaciones experimentales costosas y que consumen

mucho tiempo. Por ejemplo, solo tras décadas de trabajo experimental con *Brachionus plicatilis*, se pudo corroborar la existencia del fenómeno de especiación críptica dentro de este taxon (Ciros-Pérez et al., 2001; Gómez, 2005).

En este contexto, las técnicas moleculares ofrecen posibilidades para superar este fenómeno, denominado “impedimento taxonómico” (Rougerie et al., 2009) de una forma más sencilla, con un menor costo y en tiempo breve (Gómez et al., 2002b; Hebert et al., 2003a). Estos métodos están llegando a ser una herramienta común en el trabajo taxonómico para identificar a las especies de organismos terrestres y acuáticos. Diversos análisis moleculares con rotíferos han demostrado que los táxones estudiados están compuestos de complejos de especies crípticas, lo cual destaca que la diversidad en rotíferos posiblemente esté subestimada (Gilbert y Walsh, 2005; Fontaneto et al., 2009; Schröder y Walsh, 2007). Es por ello, que en el presente trabajo se plantea utilizar el gen COI o código de barras como una herramienta molecular para establecer si es funcional en la diferenciación de las morfoespecies conocidas de rotíferos monogonontos, principalmente del centro y sureste de México.

Por otro lado, los análisis de los patrones de diversidad son la base teórica y empírica de la biogeografía y filogeografía; sin embargo, a diferencia de los organismos macroscópicos, los organismos microscópicos (como los rotíferos) no son usados con frecuencia para realizar ese tipo de estudios, a pesar de que pueden proporcionar escenarios alternativos sobre la historia evolutiva de una región, debido a que presentan etapas de resistencia (p. ej., los huevos durmientes de los monogonontos) y

como resultado una gran capacidad de dispersión a través de diversos mecanismos, asociado con mecanismos de adaptación local (Gómez et al., 2002a; Kaya et al., 2009; Suatoni et al., 2006).

OBJETIVO GENERAL

Conocer el potencial de la subunidad 1 del gen mitocondrial citocromo c oxidasa como una herramienta para discriminar las especies de rotíferos monogonontos y observar su variabilidad en poblaciones del sureste de México. Así mismo, demostrar su utilidad en la determinación de la estructura filogeográfica de las especies del género *Brachionus* secuenciadas con este gen.

Objetivos particulares

- 1) Determinar la habilidad del gen citocromo c oxidasa para identificar las morfoespecies de rotíferos monogonontos colectados en diversas localidades del centro y sureste de México.
- 2) Conocer la variabilidad genética de los diferentes táxones de rotíferos monogonontos identificados, a través de la estimación de la diversidad haplotípica y nucleotídica.

- 3) Determinar la estructura filogeográfica de las especies del género *Brachionus*, con secuencias del gen COI, distribuidas principalmente en cuerpos de agua de México.

ÁREA DE ESTUDIO

Las localidades de muestreo se localizan en los estados de Michoacán, Morelos y Estado de México, en el centro de México, y los estados de Veracruz, Campeche, Tabasco, Chiapas y Quintana Roo, en el sureste; así como el estado de Baja California Sur en el noroeste. La Figura 1 muestra la ubicación geográfica de los cuerpos de agua y la Tabla 1 incluye datos de las localidades de muestreo.

Fisiografía

Las localidades del centro de México están ubicadas dentro de la provincia fisiográfica Faja Volcánica Transmexicana (FVT). Esta provincia se caracteriza por ser un sistema de montañas, planicies, valles y cuencas endorreicas que fueron conformados primordialmente por vulcanismo (Ferrusquía-Villafranca, 1993). La mayoría de los sitios de muestreo dentro de esta provincia están localizados principalmente en zonas de planicies a una altura entre 2,500 y 2,700 m.s.n.m. Dos sitios están localizados en las lagunas de Zempoala en una zona montañosa a 2,800 m.s.n.m., mientras que un sitio de muestreo se ubicó en una cuenca endorreica (lago Cuitzeo a 1,800 m.s.n.m.).

Por otra parte, la región conocida como sureste mexicano (Morán-Zenteno, 1994), abarca tres provincias fisiográficas: la Planicie Costera del Golfo (PCG), Sierra Madre de Chiapas (SMC) y Península de Yucatán (PY). La PCG comprende las tierras bajas que bordean el Golfo de México y sus principales características fisiográficas son la llanura costera, planicies inundables, llanuras fluvio-marinas y sierras aisladas. Se divide en dos sectores (norte y sur) por el macizo de Teziutlán (Ferrusquía-Villafranca, 1993). Los sitios de muestreo dentro de esta provincia se localizan en su sector sur que abarca el sur de Veracruz y Tabasco. En Veracruz, los sitios de colecta se ubican dentro de la región de Los Tuxtlas, la cual se caracteriza por la presencia de volcanes, cerros y planicies (CONANP, 2006). La mayoría de los sitios de muestreo en los Tuxtlas están a altitudes entre 125 y 710 m.s.n.m., mientras que dos sitios están localizados a nivel del mar (Capulteol y la laguna costera de Sontecomapan). En Tabasco, los sitios de colecta están ubicados en las inmediaciones de los pantanos de Centla en una zona que está aproximadamente a 1 m.s.n.m. Esta zona es principalmente una planicie inundable formada por depósitos aluviales (INE, 2000b).

La provincia PY incluye los estados de Quintana Roo, Yucatán y la mayor parte de Campeche. Se caracteriza por ser básicamente una región calcárea plana, sólo interrumpida en su parte norte por la sierrita de Ticul, y en su parte sur por la meseta de Zoh-Laguna (Schmitter-Soto et al., 2002). La mayoría de los sitios de muestreo están ubicados en la parte sur de Campeche y Quintana Roo, a altitudes entre 3 y 15

m.s.n.m., y algunas como las lagunas Silvituc y Tres Garantías, están ubicadas a mayor altitud (50 y 128 m.s.n.m., respectivamente). Por su parte, la provincia SMC comprende la mayor parte del estado de Chiapas, y se caracteriza por su complejidad topográfica, la cual incluye sierras altas plegadas asociadas con cañadas, lomeríos asociados con llanuras, mesetas y zonas de cañones (Ferrusquía-Villafranca, 1993). Los sitios de muestreo en esta provincia están ubicados en el límite sur de la selva Lacandona a una altitud de entre 160 y 170 m.sn.m., en una zona de lomas de poca altura.

Geología

La provincia FVT está constituida por material volcánico emplazado durante el lapso Mioceno-Reciente, así como de depósitos sedimentarios continentales (Ferrusquía-Villafranca, 1993). De acuerdo a estas características, los sitios de muestreo localizados en la FVT presentan suelos de tipo Feozem, Andosol, Planosol y Luvisol (Arriaga et al., 2000). La PCG está compuesta por una secuencia marina siliciclástica/carbonatada no deformada del Terciario y por depósitos fluvioaluviales y lacustres depositados por los ríos que atraviesan la PCG durante el Cuaternario (Ferrusquía-Villafranca, 2007). Por lo tanto, en las estribaciones de la sierra de Los Tuxtlas en Veracruz, los sitios de colecta presentan suelos de tipo Luvisol y Acrisol ricos en arcilla, mientras que los sitios ubicados en la costa de Los Tuxtlas presentan suelos Vertisol y Feozem (Arriaga et al., 2000). Los sitios de muestreo localizados en Tabasco por su parte, presentan suelos inundables tipo Gleysol (INE, 2000b).

Por otro lado, la PY está conformada por una placa marina sedimentaria de roca caliza, dolomita y evaporita formada durante el Cenozoico y que disminuye en edad hacia el norte (Morán-Zenteno, 1994). De acuerdo con estas características geológicas, los sitios de colecta en Campeche y Quintana Roo presentan suelos principalmente de tipo Rendzina y Regosol (Arriaga et al., 2000), mientras que los sitios de muestreo de la provincia SMC están sobre suelos de tipo Litosol y Rendzina (INE, 2000a).

Clima y vegetación

En general, las zonas donde están localizados los sitios de colecta de la FVT presentan un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (Ferrusquía-Villafranca, 2007). La temperatura media anual varía entre 10 y 16°C, la precipitación total anual oscila entre 700 y 1,200 mm (Arriaga et al., 2000). Los tipos de vegetación presentes en estas zonas son el bosque de pino-encino, pino y pastizal inducido (Rzedowski, 2006). Por otro lado, en la zona donde se encuentra el lago Cuitzeo, se presenta un clima seco templado con lluvias en verano. La temperatura media anual varía entre 14 y 21°C, la precipitación anual oscila entre 5.7 y 147 mm (Arriaga et al., 2000). Entre los tipos de vegetación presentes en las inmediaciones de Cuitzeo están los bosques mixtos, de pino y vegetación halófila (Rzedowski, 2006).

El clima de las zonas donde están ubicados los sitios de muestreo en la PCG es principalmente cálido subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura promedio anual

varía de 22 a 26°C y la precipitación media anual oscila entre 1,200 y 2,000 mm. Los tipos de vegetación en la zona de muestreo en Tabasco son vegetación acuática, pastizales naturales e inducidos y selva baja perennifolia, mientras que en la zona de muestreo en Veracruz los tipos de vegetación son pastizal inducido, selva baja y mediana perennifolia (CONANP, 2006; INE, 2000b). Por otra parte, el clima en los sitios de muestreo de las provincias PY y SMC es cálido subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura promedio anual oscila entre 22 y 28°C, la precipitación media anual varía de 1,200 a 1,500 mm (Arriaga et al., 2000). Los tipos de vegetación en la zona de muestreo de la PY son selva mediana subperennifolia, selva mediana subcaducifolia y la sabana, mientras que el tipo de vegetación en la zona de la SMC es selva alta perennifolia (Rzedowski, 2006).

Hidrología

Los sitios de muestreo de la FVT se encuentran dentro de la cuenca del río Lerma-Santiago donde destacan sistemas acuáticos formados por diferentes tipos de actividad volcánica, como los lagos formados por el cierre de amplias cuencas (endorreicos) por flujos de lava (p. ej., Cuitzeo) (Alcocer y Bernal-Brooks, 2010). Algunos otros sistemas importantes de esta cuenca son las lagunas de Zempoala, así como algunos reservorios y presas (p. ej., Danxho, Ignacio Ramírez) y bordos (Alcocer y Escobar, 1996). En la PY, la mayoría de los sitios de muestreo (sur de Quintana Roo) están dentro de la cuenca del río Hondo, que separa a México de Guatemala y Belice. Mientras que los sitios de muestreo de las provincias PCG y SMC se encuentran bajo

la influencia de las cuencas de los ríos Papaloapan, Grijalva y Usumacinta (Alcocer y Bernal-Brooks, 2010).

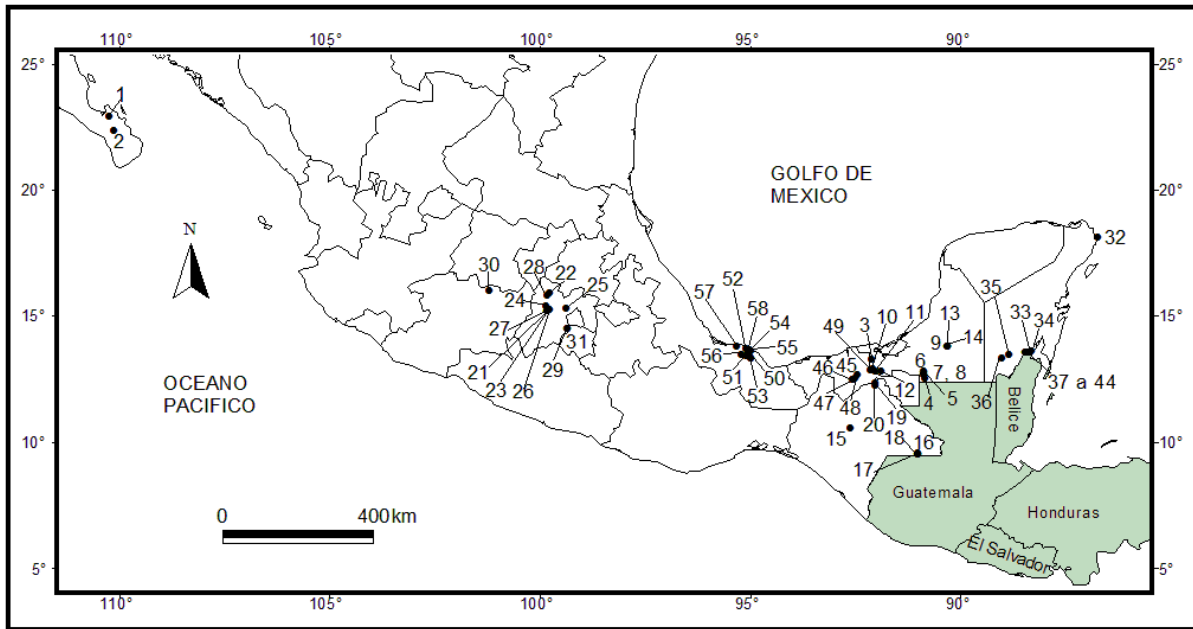


Figura 1. Ubicación geográfica de las localidades de muestreo en la península de Baja California, centro y sureste mexicano. Los números corresponden a las localidades mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas geográficas, fechas de colecta y tipo de hábitat de los sitios de muestreo.

Localidad/Estado	Fecha de colecta	Tipo de sistema	Hidroperiodo	Hábitat	Lat N	Lon O
1. Presa La Buena Mujer, BCS	20-01-11	léntico	permanente	limnético	24.086	-110.19

2. El Rosario I, BCS	21-01-11	léntico (charco)	temporal	litoral	23.753	-110.09
3. Aguada de la lagartera, Camp.	24-03-10	léntico	temporal	litoral	18.348	-92.091
4. Las Golondrinas, Camp.	25-03-10	léntico	permanente	hidrófitas sumergidas	17.89	-90.819
5. Manantial 2, Camp.	25-11-10	léntico	temporal	litoral	17.966	-90.862
6. Carretera rumbo al Tigre I, Camp.	06-02-11	léntico	temporal	litoral	18.074	-90.871
7. Carretera rumbo al Tigre II, Camp.	06-02-11	léntico	temporal	litoral	18.04	-90.871
8. Río Pedro Baranda, Camp.	06-02-11	lótico	permanente	litoral	17.968	-90.862
9. Laguna Silvituc, Camp.	07-02-11	léntico	permanente	litoral	18.64	-90.296
10. Charco 1 carr. Jonuta- Escarcega, Camp.	26-06-11	léntico	temporal	litoral	18.109	-92.078
11. Charco 2 carr. Jonuta- Escarcega, Camp.	26-06-11	léntico	temporal	litoral	18.063	-92.017
12. Charco 3 carr. Jonuta- Escarcega, Camp.	26-06-11	léntico	temporal	litoral	18.048	-91.888
13. Lag. Silvituc, equiseto, Camp.	26-06-11	léntico	permanente	<i>Equisetum</i>	18.64	-90.289
14. Lag. Silvituc, litoral, Camp.	26-06-11	léntico	permanente	litoral	18.642	-90.294
15. Parque Los Humedales charco 5, Chis.	03-12-09	léntico	temporal	humedal	16.709	-92.617
16. Canal Loma Bonita, Chis.	13-04-11	léntico	temporal	algas filamentosas	16.099	-91
17. Poza del río sendero Ruinas, Chis.	14-04-11	léntico	permanente	limnético	16.108	-91.015
18. Río Lacanjú, Chis.	14-04-11	lótico	permanente	limnético	16.102	-91.015
19. Lag. Catazajá, limnetica, Chis.	15-04-11	léntico	permanente	limnético	17.786	-92.025
20. Lag. Catazajá, litoral, Chis.	15-04-11	léntico	permanente	litoral	17.728	-92.015
21. Charco Presa Ignacio Ramirez, Méx.	22-06-11	léntico	temporal	litoral	19.464	-99.774

22. Charco Timilpan, Méx.	22-06-11	léntico	temporal	limnético	19.887	-99.739
23. Lag. km 25 carr. Toluca- Atlacomulco, Méx.	22-06-11	léntico	temporal	limnético	19.487	-99.735
24. Lag. Emiliano Zapata, Méx.	22-06-11	léntico	permanente	hidrófitas emergentes	19.584	-99.797
25. Presa Danxho, Méx.	22-06-11	léntico	permanente	limnético	19.529	-99.337
26. Presa Ignacio Ramirez, limnetica, Méx.	22-06-11	léntico	permanente	limnético	19.46	-99.777
27. Presa Ignacio Ramirez, litoral, Méx.	22-06-11	léntico	permanente	litoral	19.462	-99.78
28. Presa Trinidad Fabela, Méx.	22-06-11	léntico	permanente	limnético	19.827	-99.79
29. Lag. Zempoala Principal, Méx.	23-06-11	léntico	permanente	hidrófitas sumergidas	19.051	-99.316
30. Cuitzeo arrastre 2, Mich.	29-12-08	léntico	permanente	limnético	19.955	-101.16
31. Lag. Zempoala 2, Mor.	23-06-11	léntico	permanente	litoral	19.055	-99.316
32. Hacienda Mundaca estación 2, QRoo.	24-05-09	léntico	temporal	limnético	21.219	-86.726
33. Canal frente a Bachilleres 2, QRoo.	19-09-10	léntico (humedal)	temporal	algas filamentosas	18.525	-88.294
34. Lag. Parque Ecológico, QRoo.	29-10-10	léntico	permanente	litoral	18.507	-88.319
35. Aguada cerca de Kohunlich, QRoo.	03-02-11	léntico	temporal	béntico	18.447	-88.825
36. Lag. en Tres Garantias, QRoo.	22-05-11	léntico	permanente	litoral	18.369	-89.013
37. Lag. Encantada litoral, Subtte. López, QRoo.	07-09-11	léntico	permanente	hojas de <i>Nymphaea</i>	18.498	-88.39
38. Lag. Encantada vertical, Subtte. López, QRoo.	07-09-11	léntico	permanente	limnético	18.499	-88.39
39. Lag. Huay-Pix , QRoo.	07-09-11	léntico	permanente	litoral	18.511	-88.422
40. Lag. Negra litoral, Subtte. López, QRoo.	07-09-11	léntico	permanente	hojas de <i>Nymphaea</i>	18.498	-88.393

41. Lag. Negra vertical, Subtte. López, QRoo.	07-09-11	léntico	permanente	limnético	18.5	-88.394
42. Humedal Puente Milagros, QRoo.	14-09-11	léntico (humedal)	temporal	entre vegetación	18.518	-88.434
43. Lag. Puente Milagros 1, arrastre, QRoo.	14-09-11	léntico	permanente	limnético	18.503	-88.451
44. Lag. Puente Milagros 1, vegetación, QRoo.	14-09-11	léntico	permanente	litoral	18.509	-88.447
45. Humedal Miguel Hidalgo, Tab.	25-06-11	léntico (humedal)	temporal	litoral	17.976	-92.43
46. Lag. Vernet 2a seccion, horizontal, Tab.	25-06-11	léntico	permanente	limnético	17.877	-92.55
47. Lag. Vernet 2a seccion, litoral, Tab.	25-06-11	léntico	permanente	lirio acuático	17.877	-92.55
48. Río de Ciudad Pemex, Tab.	25-06-11	lótico	permanente	limnético	17.9	-92.483
49. Río Usumacinta en Jonuta, Tab.	25-06-11	lótico	permanente	limnético	18.086	-92.14
50. Laguna Apompal, Ver.	27-08-10	léntico	permanente	hidrófitas emergentes	18.376	-94.963
51. Lago de Catemaco, Ver.	27-08-10	léntico	permanente	limnético	18.417	-95.092
52. Laguna Escondida, Ver.	27-08-10	léntico	permanente	litoral	18.592	-95.088
53. Poza Reyna, Ver.	27-08-10	léntico	permanente	litoral	18.364	-94.969
54. Lag. Capulteol, Ver.	28-08-10	léntico	permanente	hidrófitas sumergidas	18.549	-94.968
55. Lag. de Sontecomapan, Ver.	28-08-10	léntico	permanente	limnético	18.553	-94.992
56. Laguna Encantada, Ver.	29-08-10	léntico	permanente	hidrófitas emergentes	18.458	-95.192
57. Laguna Majahual, Ver.	29-08-10	léntico	permanente	litoral	18.659	-95.306
58. Poza de los Enanos, Ver.	29-08-10	léntico	permanente	limnético	18.509	-95.033

BCS= Baja California Sur, Camp.= Campeche, Chis.= Chiapas, Méx.= Estado de México, Mich.= Michoacán, Mor. Morelos, QRoo.= Quintana Roo, Tab.= Tabasco, Ver.= Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El equipo y los métodos de colecta, así como los materiales y procedimientos para la extracción del ADN, amplificación, secuenciación y análisis del gen citocromo c oxidasa 1, son detallados en el capítulo 1 de esta tesis. Los métodos para el análisis de variabilidad genética y análisis filogeográfico son descritos en los capítulos 2 y 3 respectivamente.

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se presentan en tres capítulos:

El primer capítulo aborda el primer objetivo específico planteado. Se presenta el análisis del código de barras de diversos táxones de rotíferos monogonontos, se evalúa la capacidad del gen COI para discriminar especies y se discuten algunos aspectos taxonómicos. El artículo fue aceptado y se encuentra en prensa en la revista *Molecular Ecology Resources*.

El segundo capítulo responde al segundo objetivo específico. En éste se presentan los resultados del análisis de variabilidad genética de los diferentes táxones de rotíferos monogonontos registrados, utilizando algunos parámetros de diversidad genética.

El tercer capítulo responde al tercer objetivo específico, donde se presenta la filogeografía comparada de diferentes táxones del género *Brachionus* encontradas en el centro y sureste de México. Se examina la estructura filogeográfica de los táxones encontrados y se discute la influencia de algunos procesos históricos sobre la diferenciación y estructuración geográfica en esos táxones. El artículo se envió a la revista *Journal of Biogeography*.

Es importante mencionar que otra parte esencial del trabajo de tesis es la conformación de una base de datos que incluye todas las secuencias COI obtenidas de 417 especímenes, así como algunos datos relacionados a las secuencias. La base de datos incluye también la información curatorial (datos de la colección, números de catálogo, etc.), taxonómica (categorías y nombres taxonómicos, determinadores), geográfica (coordenadas geográficas, localidades), así como las fotografías digitales de las morfoespecies identificadas. Esta base de datos se encuentra disponible en línea con el nombre de “*Freshwater Rotifera of North America*” código AGROT en: <http://v2.boldsystems.org/views/projectlist.php?&> y puede ser consultada por todos aquellos interesados en la información, sean o no especialistas en el grupo. Finalmente, mencionar que hay especímenes montados en laminillas que están depositados como *vouchers* en la colección de Zooplancton de El Colegio de la Frontera Sur unidad Chetumal como referencia de los especímenes que fueron secuenciados.

CAPÍTULO 1

DNA barcoding of freshwater Rotifera in Mexico: Evidence of cryptic speciation in common rotifers

DNA barcoding of freshwater Rotifera in Mexico: Evidence of cryptic speciation in common rotifers

A. E. GARCÍA-MORALES and M. ELÍAS-GUTIÉRREZ

El Colegio de la Frontera Sur, Av. Centenario km 5.5, Chetumal, Quintana Roo 77014, Mexico

Abstract

DNA barcodes are useful tools to identify and discover new species in a wide range of taxa. Here, we report the first barcode study of monogonont rotifers from fresh and brackish waters in Mexico, and discuss the taxonomic implications of this work. We used DNA barcodes based on the sequence of cytochrome oxidase I to examine patterns of divergence among 417 specimens that represented 63 morphological taxa of rotifers. The mean sequence divergence among conspecific rotifer individuals was 0.75%, whereas the mean sequence divergence among congeneric taxa was 20.8%. The barcodes could discriminate between all the morphospecies identified. Moreover, the barcoding data revealed the presence of possible cryptic species in *Ascomorpha ovalis*, *Lecane bulla*, *L. cornuta*, *L. curvicornis*, *L. crepida*, *L. lunaris*, *L. hastata*, *Platyias quadricornis*, *Keratella cochlearis*, *Brachionus calyciflorus* and *Testudinella patina*, as well as in some forms and varieties such as *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* and *Mytilina ventralis* var. *macracantha*. Barcode analysis also enabled some forms and varieties of common species to be identified as separate species. The results obtained support recent taxonomic revisions, such as the recognition of the genus *Plationus*, and the presence of cryptic speciation in *L. bulla*. This work shows that DNA barcoding identifies species effectively, can aid taxonomists by identifying cryptic species, and is an important tool for resolving taxonomic controversies.

Keywords: cryptic species, DNA barcoding, Mexico, rotifers

Received 15 December 2011; revision received 27 June 2012; accepted 4 July 2012

Introduction

Rotifera are a group of bilaterally symmetrical, eutelic, pseudocoelomates (Wallace 2002) that encompass approximately 2 000 taxa (Segers 2007). They are abundant, microscopic animals (50–2 000 μm) that are found in freshwater and brackish habitats, from large, permanent lakes to small temporary pools; they are also found in the soil and in association with lichens and mosses (Wallace *et al.* 2006). All rotifers possess three main features: an anterior ciliated corona, a specialized pharynx (the mastax) with hard jaws called trophi and a stiff body wall called the lorica. In general, rotifers reproduce by parthenogenesis and produce small propagules. These propagules are resistant to harsh environmental conditions and are adapted to ensure their passive dispersal (Ricci & Balsamo 2000). Rotifers play a pivotal role in aquatic food webs by transferring energy from bacteria and algae to higher trophic levels, and in turn serve as prey for invertebrate predators and fish fry (Arndt 1993;

Ricci & Balsamo 2000; Wallace 2002). Owing to their passive dispersal, rapid reproduction and adaptability, rotifers have long been considered to be cosmopolitan organisms. However, this assumption might reflect the limited number of studies that have been conducted from a geographical perspective (Gómez 2005; Segers 2008). Data on the distribution, diversity and ecology of rotifers remain limited and are plagued by numerous cases of misidentification; in addition, most studies have focused on small, specific regions and few habitat types (Segers & De Smet 2008).

Compared with other freshwater micrometazoans, such as cladocerans and copepods, the true taxonomy of rotifers remains unclear (Wallace 2002; Segers & De Smet 2008). The causes of this are well known: very few taxonomists have sufficient training to compensate for the lack of knowledge about the systematics of rotifers (Segers 2008), and academic institutions often overlook the field of taxonomy when allocating resources. Although some proposals have been made to address the paucity of knowledge about rotifer taxonomy (Pearson *et al.* 2011), there are only a few specialists in the world who can identify a rotifer reliably. In addition, it is especially

Correspondence: Manuel Elías Gutiérrez, Fax: (983) 835 0454; E-mail: aegarcia@ecosur.mx; melias@ecosur.mx

CAPÍTULO 2

Variabilidad genética de rotíferos monogonontos de México

RESUMEN

La variabilidad genética se refiere a la variación en el material genético de una población. Esta variabilidad es la materia prima de la evolución sobre la cual pueden actuar procesos como la selección natural y la deriva génica. En este trabajo, la variabilidad genética de diversos táxones de rotíferos monogonontos del centro y sureste de México fue investigada a través de parámetros como la diversidad haplotípica, el número de haplotipos, la diversidad nucleotídica, así como el número de sitios polimórficos. El número de haplotipos por taxon abarcó de 1 a 9 y el número de sitios polimórficos de 0 a 29. En general, la diversidad genética en la mayoría de los táxones estudiados fue de moderada a baja. Solo 13 táxones exhibieron una diversidad haplotípica y nucleotídica alta. Niveles altos de diferenciación genética en rotíferos pueden ser explicados por diferentes procesos como el azar, la adaptación local, el aislamiento geográfico o las colonizaciones secundarias. Es posible que la falta de variación genética observada en 34 táxones sea el resultado de procesos tales como efectos de fundador persistentes o bien a un evento de colonización reciente. Las familias con táxones con más variación genética fueron Brachionidae, Lecanidae, Mytilinidae y Testudinellidae. Estos resultados por primera vez dibujan un esquema de la variabilidad genética en rotíferos y demuestran la necesidad de continuar con este tipo de estudios, pues permitirán no solo el reconocimiento de la biodiversidad, sino el acervo genético que representan los rotíferos en nuestras aguas continentales.

Palabras clave: Diversidad haplotípica, sitios polimórficos, Rotifera, haplotipos.

INTRODUCCIÓN

La variabilidad genética es el componente básico de la biodiversidad y se define como las diferencias que se presentan entre individuos o entre poblaciones (Chediack, 2009). Esta variabilidad o diversidad es la materia prima sobre la cual puede actuar la selección natural y la deriva genética; por tal razón es usada con frecuencia como un indicador indirecto de la historia evolutiva de los organismos y de su habilidad para adaptarse a un ambiente distinto, de ahí que su conocimiento y comprensión sean de vital importancia (Piñero et al., 2008). La manera en como se distribuye la variación genética dentro y entre poblaciones constituye su estructura genética, y el análisis de esta estructura es el primer paso para comprender que fuerzas evolutivas han prevalecido en la evolución de las poblaciones y eventualmente de las especies (Loveless y Hamrick, 1984; Hedrick, 2000).

Las técnicas moleculares a través de los marcadores genéticos (p. ej., secuencias de ADN, microsatélites, etc.) han permitido un gran avance en el estudio de la diversidad genética en las poblaciones de muchos grupos taxonómicos (Piñero et al., 2008). Existen diversos parámetros para analizar la diversidad genética; de estos, los que generalmente se usan para evaluar la variación genética en el ADN mitocondrial (mADN) son la diversidad haplotípica (H_d) y la diversidad nucleotídica (π). La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes; mientras que la diversidad nucleotídica es el número promedio de

diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias escogidas al azar. Cuantos más altos sean estos valores más alta es la variabilidad genética de una población o especie (Hedrick, 2000).

El Filo Rotifera es un grupo diverso de invertebrados microscópicos. Estos organismos se encuentran comúnmente en sistemas acuáticos epicontinentales y pueden llegar a ser abundantes en el plancton, el bentos y el perifiton (Wallace et al., 2006). Los rotíferos exhiben una extensa variación morfológica intraespecífica, que es el resultado de la interacción de factores ambientales, genéticos e históricos (Derry et al., 2003). Estudios moleculares previos han reportado un alto grado de divergencia genética en algunas especies comunes de rotíferos, principalmente táxones que habitan en el plancton (Gómez et al., 2002; Gilbert y Walsh, 2005; Schröder y Walsh, 2007). Sin embargo, no se han realizado estudios de variabilidad genética con rotíferos de México; por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es conocer la variación genética de diversos táxones de rotíferos monogonontos colectados en cuerpos de agua del centro y sureste mexicano. Para este análisis se utilizaron secuencias del gen mitocondrial citocromo c oxidasa 1 para estimar algunos parámetros de la variación genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de plancton de 58 cuerpos de agua distribuidos principalmente en el sureste y centro de México (Figura 1). La Tabla 1 muestra las coordenadas geográficas de las localidades de muestreo así como datos sobre la colecta y el tipo de

hábitat. Las muestras fueron colectadas con redes de plancton de 50 μm de apertura de malla y fueron fijadas con etanol al 96%. Los organismos se extrajeron de las muestras y se almacenaron en tubos de PCR con etanol al 96% hasta el momento de la extracción del ADN. La identificación morfológica de los especímenes se llevó a cabo bajo un microscopio óptico utilizando las claves de Koste (1978) y Koste y Shiel (1987, 1989), Nogrady y Segers (2002) y Segers (1995). Para conocer los detalles de la extracción, amplificación y secuenciación ver el capítulo 1 de este trabajo.

Las secuencias fueron alineadas con CLUSTAL W implementado en el programa MEGA 5.0, utilizando los parámetros por defecto (Tamura et al., 2011). En total se alinearon 402 secuencias de rotíferos monogonontos. La variación genética de los diferentes táxones fue evaluada a través de diversos parámetros como la diversidad haplotípica (H_d), el número de haplotipos (h), la diversidad nucleotídica (π), el número de sitios polimórficos o segregantes (S), así como el contenido de G+C (guaninas y citocinas) que fueron calculados con el programa DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas, 2009). Adicionalmente se calcularon las divergencias genéticas intraespecíficas de los táxones analizados utilizando el programa MEGA 5.0.

RESULTADOS

En general el número de haplotipos abarcó de 1 a 9 (Apéndice 1). De los táxones examinados, *Lecane luna* fue la especie que presentó el mayor número de haplotipos

con nueve, seguida por *Keratella americana* y *Macrochaetus collinsi* que presentaron siete haplotipos respectivamente. Los sitios polimórficos abarcaron de 0 a 29 sitios, siendo los táxones *Lecane luna* y *Brachionus havanaensis* los que tuvieron el mayor número de sitios polimórficos (26 y 29 sitios respectivamente). En cuanto a la diversidad nucleotídica, esta abarcó de 0 a 0.2269 (Apéndice 1), siendo *Mytilina ventralis* var. *macracantha*AEG2 la que presentó el valor más alto. 54 táxones tuvieron valores nulos o bajos (0-0.00392) de diversidad nucleotídica, 17 táxones tuvieron valores moderados (0.00403-0.00929) y 13 táxones tuvieron valores altos (0.0100-0.2269) de diversidad nucleotídica (Apéndice 1). La clasificación de los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica (bajo, moderado y alto) seguida en este trabajo es de acuerdo con Xiang et al. (2010). El contenido de Guaninas y Citocinas (G+C) abarcó de 29% a 45% y fueron los táxones *Lecane closterocerca*, *L. grandis*, *L. cornuta*¹ y *Ascomorpha ovalis* las que presentaron el menor contenido G+C y los táxones *Testudinella patina*AEG5 y *Testudinella patina* f. *intermedia* las que tuvieron el mayor contenido G+C (Apéndice 1). Por otra parte, las divergencias genéticas intraespecíficas promedio abarcaron de 0% a 2.67% (Apéndice 1).

En general, se observaron 34 táxones con diversidad haplotípica y nucleotídica nula o baja (Hd: 0.000-0.356 y π : 0.000-0.00392) y solo 13 táxones mostraron una diversidad haplotípica y nucleotídica alta (Hd: 0.689-1.00 y π : 0.0100-0.2269, p. ej., *Platyias quadricornis*, *Lecane cornuta*¹, *Brachionus havanaensis*). Otros 14 presentaron valores de diversidad haplotípica alta y valores de diversidad nucleotídica moderada (p. ej., *Macrochaetus collinsi*, *Keratella tropica*, *Lecane quadridentata*), mientras 13 táxones

mostraron una diversidad haplotípica moderada y una diversidad nucleotídica baja (p. ej., *Brachionus bidentatus*, *Lecane closterocerca*). Siete táxones presentaron valores de diversidad haplotípica altos y valores de diversidad nucleotídica bajos (*Asplanchna* cf. *sieboldi*, *Brachionus falcatus*, *Lecane rhenana*, *L. hastata*AEG1, *Keratella cochlearis*, *Trichocerca* cf. *capucina* y *Mytilina ventralis* var. *macracantha*AEG3). Por otra parte, *Trichocerca stylata*, *Lecane bulla*4 y *Ascomorpha ovalis* presentaron una diversidad haplotípica y nucleotídica moderada.

Cabe destacar que los 13 táxones que presentaron una diversidad genética alta pertenecen a las familias Brachionidae, Lecanidae, Mytilinidae y Testudinellidae. Dentro de estos táxones *Brachionus havanaensis*, *Brachionus* sp. Almenara, *B. quadridentatus* f. *brevispinus*AEG1, *Keratella americana*, *Platyias quadricornis*, *Lecane papuana*, *L. luna*, *L. cornuta* y *L. cornuta*1 fueron de los más extendidos geográficamente y cada localidad (población) estuvo formada por uno o dos haplotipos exclusivos, lo cual explica en gran medida que la diversidad genética de cada uno de estos táxones fuera alta. Además, los táxones *Testudinella patina*AEG5, *Mytilina ventralis* var. *macracantha*AEG2 y *Mytilina ventralis* var. *macracantha*AEG4 también presentaron una diversidad genética alta; en este caso, los especímenes analizados provienen de dos localidades respectivamente, las cuales están relativamente distantes. En estos táxones cada población presentó diferencias nucleotídicas más grandes en comparación con los táxones de Brachionidae y Lecanidae primeramente mencionados.

Por el contrario, táxones extendidos geográficamente como *Lecane leontina*, *Plationus patulus* y *Beauchampiella eudactylota* mostraron una variabilidad genética moderada en el primer caso y baja en los otros dos casos. Mientras, algunos táxones de rotíferos limnéticos como *Filinia* sp., *Kellicottia bostoniensis*, *Keratella cochlearis*AEG1 y *K. morenoi*, cuyas poblaciones contenían cientos o posiblemente miles de individuos no presentaron variabilidad genética, probablemente debido a efectos de prioridad o una colonización reciente; sin embargo en otros táxones limnéticos como *Asplachna* cf. *sieboldi* y *A. silvestrii* la variabilidad genética fue moderada y el número de haplotipos encontrado fue de tres y dos respectivamente. Dicranophoridae, Lepadellidae y Notommatidae, que son familias con especies principalmente bénticas, no mostraron diversidad genética.

DISCUSIÓN

La variación genética es el resultado de la combinación de factores ecológicos, genéticos e históricos. Esta variación dentro de una población puede generar cambios funcionales en la bioquímica o la morfología de los individuos y tener impacto en su tasa de reproducción o supervivencia; por estas razones la variación genética constituye la materia prima para la evolución (Piñero et al., 2008). En este estudio, se encontró un promedio de G+C de 34%, este porcentaje indica que la región genética examinada (COI) es relativamente baja en Guaninas y Citocinas o bien rica en Adeninas y Timinas (promedio 66%). Un patrón similar de contenido A+T ha sido observado en *Daphnia pulex* y *Artemia franciscana*. En estas especies, el contenido

A+T en los genes codificantes de proteínas del ADN mitocondrial son del 62% y 64% respectivamente (Crease, 1999). En organismos parásitos del género *Triatoma* (chinches) por su parte se han reportado porcentajes del 70%-75% de contenido A+T (Sainz et al., 2004; Grisales et al., 2010). Un contenido A+T del 40% al 60% es considerado como el más frecuente. Sin embargo, entre las especies el contenido de A+T puede variar debido a diferentes presiones ambientales. Comúnmente, este sesgo en la composición de las bases es designada como sesgo mutacional (Glöckner, 2000). Por otra parte, en *Plasmodium falciparum* una especie con un fuerte sesgo A+T (80%) en su genoma, se ha encontrado evidencia de que la selección natural puede ser el fenómeno responsable del alto contenido A+T en algunos de los genes de este parásito (Escalante et al., 1998).

Por otro lado, la diversidad haplotípica y nucleotídica en la mayoría de los táxones fue de baja a moderada. Teóricamente, una baja diversidad haplotípica y nucleotídica en una población sugiere que esta pudo haber experimentado un cuello de botella reciente, disminuyendo así su capacidad para adaptarse a cambios ambientales (Avise, 2000). En dos estudios, uno con la especie *Brachionus plicatilis* y otro con la especie *B. manjavacas*, algunas de las poblaciones estudiadas presentaron valores de diversidad nucleotídica y haplotípica baja en el gen COI (Gómez et al., 2000, 2007). Sin embargo, es posible que la baja variación genética encontrada en los estudios con *B. plicatilis* y *B. manjavacas*, así como la baja variación encontrada en este estudio se deba a procesos tales como las colonizaciones recientes y los efectos de fundador persistentes. Es decir al colonizar un nuevo hábitat, el o los propágulos colonizadores comenzarán a

reproducirse rápidamente vía reproducción asexual hasta alcanzar grandes números. La superioridad numérica de los nuevos residentes y la monopolización que ejercen sobre los recursos locales evitarán que nuevos genotipos se establezcan en el hábitat. Por lo tanto, cada vez que otros inmigrantes intenten establecerse en el hábitat se producirá un efecto de fundador.

Valores altos de diversidad haplotípica y nucleotídica indican que la población se encuentra estable. Aunque valores altos en estos parámetros también pueden ser observados en muestras con una mezcla de individuos de poblaciones históricamente separadas (Avice, 2000). En dos estudios recientes con la especie *Brachionus calyciflorus*, se encontraron valores altos de diversidad haplotípica (0.722-1.000) y nucleotídica (0.014-0.103) en algunas de las poblaciones estudiadas. La alta variabilidad genética encontrada en esta especie es atribuida a la presencia de especies crípticas (Xiang et al., 2010, 2011). Sin embargo, la alta variabilidad haplotípica y nucleotídica encontrada en 13 táxones de Brachionidae, Lecanidae, Mytilinidae y Testudinellidae ya mencionados, puede ser resultado de la influencia de algunos de los procesos tales como el azar, la adaptación a las particularidades ambientales de cada cuerpo de agua (adaptación local), así como al aislamiento geográfico o bien colonizaciones secundarias (Campillo et al., 2009, 2011; De Meester et al., 2002).

Las poblaciones en estos 13 táxones fueron encontradas en diversos tipos de hábitats los cuales abarcaron la zona litoral y limnética, vegetación sumergida, vegetación

emergente, así como humedales. En estudios recientes con rotíferos bdelloideos se ha mencionado a la heterogeneidad de hábitats como uno de los principales factores responsables de la diferenciación genética en este grupo de organismos (Fontaneto et al., 2009, 2011). En el caso de los rotíferos monogonontos, particularmente con el complejo de especies *Brachionus plicatilis* se ha observado que la adaptación local a las condiciones ambientales -específicamente a la salinidad y la temperatura- ha jugado un papel clave sobre la diferenciación ecológica y genética entre las especies de este complejo (Campillo et al., 2011). Otro ejemplo de adaptación local es presentado por Alcántara-Rodríguez et al. (2012), quienes demostraron que la adaptación al agua dulce, así como el aislamiento geográfico (alopatría) del sistema acuático han jugado un papel importante en la diferenciación ecológica y genética de un posible nuevo miembro del complejo *Brachionus plicatilis*, denominado *Brachionus* sp. México.

En un estudio con el gen mitocondrial ND4 de organismos parásitos pertenecientes al género *Triatoma*, se reportó que la alta diferenciación genética observada en algunas poblaciones podría relacionarse con características ecológicas (heterogeneidad ambiental) y geográficas particulares de cada región (Grisales et al., 2010). Contrario a lo anterior, en táxones como *Lecane leontina*, *Plationus patulus* y *Beauchampiella eudactylota* cuyas poblaciones fueron encontradas en diferentes tipos de hábitats geográficamente distantes, mostraron una diversidad genética baja a moderada. Es posible que algunas especies no presenten limitantes geográficas ni ecológicas como ha sido observado en algunos táxones del género *Adineta* (Fontaneto et al., 2011).

Por otra parte, teóricamente, se considera que valores altos de diversidad haplotípica y valores bajos de diversidad nucleotídica sugieren un crecimiento rápido de la población desde una población ancestral, y que en ese periodo, el tiempo transcurrido ha sido suficiente para recuperar la variación de haplotipos vía mutación (Avise, 2000). En este estudio siete táxones (p. ej., *Brachionus falcatus* y *Lecane rhenana*) mostraron este patrón de diversidad haplotípica alta y diversidad nucleotídica baja; sin embargo debido a que el número de individuos secuenciados es pequeño es indispensable analizar un mayor número de individuos para conocer mejor la variación de haplotipos de esas poblaciones y descartar o apoyar el patrón observado.

CONCLUSIONES

Este trabajo es el primer estudio sobre variabilidad genética de múltiples especies de rotíferos monogonontos de México. La mayoría de los táxones analizados mostraron niveles moderados a bajos de diversidad haplotípica y nucleotídica. La alta variabilidad genética encontrada en 13 táxones puede ser explicada por cuatro procesos (azar, adaptación local, aislamiento geográfico, colonización secundaria). Es coincidente esta alta variabilidad con una distribución geográfica muy amplia de los táxones implicados. Por otro lado, 34 táxones no mostraron variación genética o fue muy baja, probablemente debido a efectos de prioridad o colonización reciente. Un ligero sesgo hacia un mayor contenido A+T observado en la mayoría de los táxones estudiados

puede deberse a presión de selección. Estos resultados son los primeros datos sobre la variación genética en este grupo de organismos. En un futuro, la comparación de los mismos con otros estudios que abarquen diferentes cuerpos de agua permitirá reconocer no solo las especies, sino también fenómenos de adaptación local y dispersión de estos organismos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte de la formación doctoral de Alma Estrella García Morales, apoyada a través de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Para realizar el trabajo molecular se contó con el apoyo del Laboratorio de Código de Barras de la Vida nodo Chetumal de la red Códigos de Barras de la Vida en México (MEXBOL). El estudio fue parcialmente financiado por CONABIO a través del proyecto HE009. La secuenciación fue apoyada con el financiamiento del Gobierno de Canadá a través del Genome Canada y el Ontario Genomics Institute para el International Barcode of Life Project. Agradecemos a Sergio Cohuo Durán y Giezi Yam Poot por su ayuda en las colectas de las muestras.

LITERATURA CITADA

Alcántara-Rodríguez, J.A., J. Ciros-Pérez, E. Ortega-Mayagoitia, C. Serrania-Soto & E. Piedra-Ibarra. 2012. Local adaptation in populations of a *Brachionus* group

plicatilis cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshwater Biology*, 57, pp.728-740.

Avice, J.C., 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.

Campillo, S., García-Roger, E.M., Carmona, M. J., Gómez, A. and Serra, M., 2009. Selection on life-history traits and genetic population divergence in rotifers. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, pp. 2542-2553.

Campillo, S., García-Roger, E.M., Carmona, M. J. and Serra, M., 2011. Local adaptation in rotifer populations. *Evolutionary Ecology*, 25, pp. 933-947.

Chediack, S.A., 2009. Conceptos generales sobre biodiversidad y manejo de recursos naturales. In: S.E. Chediack, ed. *Monitoreo de biodiversidad y recursos naturales: ¿para qué?*. México D.F: Seprim, pp.13-28.

Crease, T.J., 1999. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*, 233, pp.89-99.

De Meester, L., Gómez, A., Okamura, B. and Schwenk, K., 2002. The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23, pp.121-135.

Derry, A.M., Hebert, P.D.N. and Prepas, E.E., 2003. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. *Limnology and Oceanography*, 48(2), pp.675-685.

- Escalante, A.A., Lal, A.A. and Ayala, F.J., 1998. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics*, 149, pp.189-202.
- Fontaneto, D., Iakovenko, N., Eyres, I., Kaya, M., Wyman, M. and Barraclough, T.G. 2011. Cryptic diversity in the genus *Adineta* Hudson & Gosse, 1886 (Rotifera: Bdelloidea: Adinetidae): a DNA taxonomy approach. *Hydrobiologia*, 662, pp.27-33.
- Fontaneto, D., Kaya, M., Herniou, E.A. and Barraclough, T.G., 2009. Extreme levels of hidden diversity in microscopic animals (Rotifera) revealed by DNA taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, pp.182-189.
- Gilbert, J.J. and Walsh, E.J., 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. *Hydrobiologia*, 546, pp.257-265.
- Gómez, A., Carvalho, G.R. and Lunt, D.H., 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankton: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 267(1458), pp.2189-2197.
- Gómez, A., Montero-Pau, J., Lunt, D.H., Serra, M. and Campillo, S., 2007. Persistent genetic signatures of colonization in *Brachionus manjavacas* rotifers in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 16, pp.3228-3240.

- Gómez, A., Serra, M., Carvalho, G.R. and Lunt, D.H., 2002. Speciation in ancient cryptic species complex: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, 56(7), pp.1431-1444.
- Glöckner, G., 2000. Large scale sequencing and analysis of AT rich eukaryote genomes. *Current Genomics*, 1, pp.289-299.
- Grisales, N., Triana, O., Angulo, V., Jaramillo., Parra-Henao, G., Panzera, F. and Gómez-Palacio, A., 2010. Diferenciación genética de tres poblaciones colombianas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) mediante análisis molecular del gen mitocondrial ND4. *Biomédica*, 30, pp.207-214.
- Hedrick, P.W., 2000. *Genetics of populations*. 2nd ed. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers.
- Koste, W., 1978. Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Ein Bestimmungswerk, begründet von Max. Vol 2 Tafelband. Voigt Überordnung Monogononta. Germany.
- Koste, W. and Shiel, R.J., 1987. Rotifera from Australian inland waters II. Ehiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Invertebrate Taxonomy*, 1, pp.949-1021.
- Koste, W. and Shiel R.J., 1989. Rotifera from Australian inland waters III. Euchlanidae, Mytilinidae and Trichotriidae (Rotifera: Monogononta). *Transactions of the Royal Society of South Australia*, 113, pp.85-114.

- Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, pp.1451-1452.
- Loveless, M.D. and Hamrick, J.L., 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15, pp.65-95.
- Nogrady, T. and Segers, H., eds., 2002. Rotifera volume 6: Asplanchnidae, Gastropodidae, Lindiidae, Microcodidae, Synchaetidae, Trochosphaeridae and Filinia. **In:** *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. The Netherlands: Backhuys Publishers.
- Piñero, D. et al., 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. **In:** *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. México D.F: CONABIO.
- Sainz, A.C., Mauro, L.V., Moriyama, E.N. and García, B.A., 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica*, 121, pp.229-240.
- Segers, H., 1995. Rotifera volume 2: The Lecanidae (Monogononta). **In:** H.J. Dumont, T. Nogrady, eds. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. The Netherlands: SPB Academic Publishing.
- Schröder, T. and Walsh, E.J., 2007. Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species. *Hydrobiologia*, 593, pp.129-140.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011.

MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(19), pp.2731-2739.

Wallace, R.L., Snell, T.W., Ricci, C. and Nogrady, T., 2006. Rotifera volume 1: Biology, ecology and systematics. **In:** H.J. Dumont, H. Segers, eds. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. 2nd ed. The Netherlands: Kenobi Productions and Backhuys Publishers.

Xiang, X.L., Xi, Y.L., Wen, X.L., Zhang, J.Y. and Ma, Q., 2010. Spatial patterns of genetic differentiation in *Brachionus calyciflorus* species complex collected from East China in summer. *Hydrobiologia*, 638, pp.67-83.

Xiang, X.L., Xi, Y.L., Wen, X.L., Zhang, G., Wang, J.X. and Hu, K., 2011. Genetic differentiation and phylogeographical structure of the *Brachionus calyciflorus* complex in eastern China. *Molecular Ecology*, 20, pp.3027-3044.

APÉNDICES

Apéndice 1. Valores de los estimadores de diversidad genética de los táxones de rotíferos monogonontos colectados en el centro y sureste de México.

n= número de individuos, h= número de haplotipos, Hd= diversidad haplotípica, S= sitios polimórficos o segregantes, π = diversidad nucleotídica, Id(%)= divergencia genética intraespecífica en porcentaje, ♠= especie críptica.

ORDEN FLOSCULARIACEAE

FAMILIA FILINIIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
1. <i>Filinia</i> sp.	Charco Timilpan	5	1	0.00 +- 0.00	0	0.000 +- 0.000	0.369	0

FAMILIA TESTUDINELLIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
2. <i>Testudinella patina</i>	Capulteol	4	3	0.833+- 0.222	8	0.00656+- 0.00192	0.390	0.51
<i>T. patina</i> AEG5▲	Capulteol, Charco 3	2	2	1.000+- 0.500	15	0.02586+- 0.01293	0.439	2.67
3. <i>T. patina</i> f. <i>intermedia</i>	L. Zempoala Principal	2	1	0.000 +- 0.000	0	0.000 +- 0.000	0.455	0

ORDEN PLOIMA

FAMILIA ASPLANCHNIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
4. <i>Asplanchna</i> cf. <i>sieboldi</i>	L. Vernet	4	3	0.833 +- 0.222	3	0.00277 +- 0.00080	0.322	0.3
5. <i>A. silvestrii</i>	Cuitzeo	5	2	0.400 +- 0.237	1	0.00061 +- 0.00036	0.320	0.1

FAMILIA BRACHIONIDAE

GENERO *Brachionus*

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
6. <i>B. angularis</i>	L. Apompal	5	2	0.400 +- 0.237	1	0.00061 +- 0.00036	0.345	0.075
7. <i>B. angularis</i> f. <i>pseudodolabratus</i>	Parque Ecológico	3	1	0.000 +- 0.000	0	0.000 +- 0.000	0.356	0
8. <i>B. bidentatus</i>	L. Vernet	5	2	0.400 +- 0.237	1	0.00061 +- 0.00036	0.337	0.075
9. <i>B. calyciflorus</i>	Danxho, Isla de las Aves	6	2	0.333+- 0.215	3	0.00183+- 0.00118	0.340	0.39
<i>B. calyciflorus</i> AEG1♣	L. Vernet	4	2	0.500+- 0.265	1	0.00078+- 0.00042	0.341	0.2
10. <i>B. caudatus</i>	Capulteol	4	1	0.000 +- 0.000	0	0.000 +- 0.000	0.327	0
11. <i>B. cf. urceolaris</i>	Humedal Miguel Hidalgo	4	1	0.000 +- 0.000	0	0.000 +- 0.000	0.337	0
12. <i>B. falcatus</i>	L. Catazajá	4	3	0.833 +- 0.222	2	0.00151 +- 0.00051	0.350	0.15
13. <i>B. havanaensis</i>	Poza Reyna, L. Catemaco L. Apompal, L. Escondida L. Negra, L. Encantada (Q.Roo), L. Catazajá, Las Golondrinas, Parque Ecológico	19	5	0.713 +- 0.077	2 6	0.01519 +- 0.00128	0.307	1.73
14. <i>Brachionus</i> sp. Almenara	Cuitzeo, Sontecomapan Poza Enanos, Hacienda Mundaca	9	4	0.806 +- 0.120	1 9	0.01394 +- 0.00270	0.333	1.51
15. <i>B. quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	L. Escondida	5	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.334	0
<i>B. quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AEG1♣	L. Vernet, Parque Ecológico	9	3	0.722+- 0.097	1 0	0.00871+- 0.00110	0.344	0.9

<i>B. quadridentatus</i> f.	Charco 1	2	1	0.000+-	0	0.00000+-	0.328	0
<i>brevispinus</i> AEG2♣				0.000		0.00000		
16. <i>B. quadridentatus</i> f.	El Rosario	5	1	0.000+-	0	0.00000+-	0.381	0
<i>cluniorbicularis</i>				0.000		0.00000		
<i>B. quadridentatus</i> f.	L. Vernet	5	1	0.000+-	0	0.00000+-	0.376	0
<i>cluniorbicularis</i> AEG1♣	Ciudad Pemex, Charco 1			0.000		0.00000		
17. <i>B. variabilis</i>	Presa Ignacio Ramírez	5	1	0.000 +-	0	0.000 +-	0.327	0
				0.000		0.000		
18. <i>Brachionus</i> sp.	Charco 2	3	2	0.667+-	1	0.00106 +-	0.342	0.1
				0.314		0.00050		

GENERO *Kellicottia*

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
19. <i>Kellicottia</i>	L. Zempoala 2, Danxho	7	1	0.000 +-	0	0.000 +-	0.341	0.13
<i>bostoniensis</i>				0.000		0.000		

GENERO *Keratella*

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
20. <i>Keratella</i>	Tres Garantias, L.	19	7	0.848 +-	12	0.00929 +-	0.337	0.85
<i>americana</i>	Escondida, Presa Buena			0.046		0.00058		
	Mujer, L. Majahual, L.							
	Negra, L. Encantada							
	(Q.Roo), Huay-Pix, L.							
	Catazajá							
21. <i>K. cochlearis</i>	L. km 25, Presa Ignacio	2	2	1.000+-	1	0.00198+-	0.370	0.2
	Ramírez			0.500		0.00099		
<i>K.</i>	Charco Timilpan	2	1	0.000+-	0	0.00000+-	0.368	0
<i>cochlearis</i> AEG1♣				0.000		0.00000		

22. <i>K. morenoi</i>	Charco Timilpan, Presa	4	1	0.000 +-	0	0.000 +-	0.363	0
	Ignacio Ramírez			0.000		0.000		
23. <i>K. tropica</i>	Aguada Kohunlich	3	3	1.000 +-	4	0.00403 +-	0.355	0.46
				0.272		0.00134		

GENERO *Platyonus*

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
24. <i>Platyonus</i>	L. Silvituc, L. Escondida, L.	10	2	0.356 +-	7	0.00392 +-	0.361	0.83
<i>patulus</i>	Encantada (Ver)			0.159		0.00175		
25. <i>P. patulus</i> var.	Charco 3	3	1	0.000 +-	0	0.000 +-	0.327	0.075
<i>macracanthus</i>				0.000		0.000		

GENERO *Platyias*

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
26. <i>Platyias</i>	L. Apompal, L. Escondida,	10	3	0.689+-	24	0.01738+-	0.384	1.8
<i>quadricornis</i>	Capulteol			0.104		0.00238		
<i>P.</i>	Canal de Bachilleres	7	1	0.000+-	0	0.00000+-	0.365	0
<i>quadricornis</i> 1 ♣				0.000		0.00000		

FAMILIA DICRANOPHORIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
27. <i>Dicranophorus</i> sp.	L. Catazajá	3	1	0.000 +-	0	0.000 +-	0.374	0
				0.000		0.000		

FAMILIA EUCHLANIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
-------	-----------	---	---	----	---	---	-----	--------

28. <i>Beauchampiella eudactylota</i>	Charco 3, Canal de Bachilleres	6	2	0.333 +- 0.215	2	0.00101 +- 0.00065	0.343	0.15
29. <i>Dipleuchlanis propatula</i>	Capulteol	5	1	0.000 +- 0.000	0	0.000 +- 0.000	0.354	0
30. <i>Euchlanis dilatata</i>	Capulteol, L. Encantada (Ver)	6	2	0.333 +- 0.215	4	0.00212 +- 0.00137	0.335	0.32
31. <i>Tripleuchlanis plicata</i>	Canal de Bachilleres	4	2	0.667 +- 0.204	1	0.00101 +- 0.00031	0.359	0.075

FAMILIA GASTROPODIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
32. <i>Ascomorpha ovalis</i>	Danxho,	5	2	0.400+- 0.237	4	0.00535+- 0.00317	0.297	0
<i>A. ovalis</i> AEG1♣	L. Zempoala 2	2	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.298	0

FAMILIA LECANIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
33. <i>Lecane bulla</i>	Capulteol	7	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.304	0
<i>L. bulla1</i>♣	L. Silvituc, Canal de Bachilleres	6	2	0.600+- 0.129	1	0.00091+- 0.00020	0.323	0.075
<i>L. bulla2</i>♣	L. Escondida, L. Majahual	3	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.300	0
<i>L. bulla3</i>♣	L. Apompal, L. Escondida	6	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.308	0
<i>L. bulla4</i>♣	Manantial 2, Canal de Bachilleres	3	2	0.667+- 0.314	6	0.00666+- 0.00314	0.301	0.51

L. bulla5♠	El Tigre II, L. Encantada (Q.Roo), Humedal Pte. Milagros, L. Pte. Milagros 1,	5	3	0.700+- 0.218	7	0.00425+- 0.00212	0.322	0.61
L. bullaAEG9♠	Capulteol	4	2	0.500+- 0.265	1	0.00155+- 0.00082	0.307	0
L. bullaAEG10♠	L. Emiliano Zapata, L. Zempoala Principal, L. Catemaco	3	3	1.000+- 0.272	16	0.01614+- 0.00672	0.331	1.66
34. L. closterocerca	L. Silvituc	4	2	0.500 +- 0.265	2	0.00172 +- 0.00091	0.293	0.32
35. L. cornuta	P. Humedales charco 5, Canal Loma Bonita, Capulteol	6	4	0.800+- 0.172	12	0.00920+- 0.00288	0.315	1.07
L. cornuta1♠	El Tigre I, Río Pedro Baranda, L. Silvituc	4	4	1.000+- 0.177	20	0.01765+- 0.00413	0.293	1.71
L. cornutaAEG2♠	Aguada Lagartera, L. Silvituc	2	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.322	0
36. L. crepida	El Tigre II, Humedal Pte. Milagros	5	5	1.000+- 0.126	11	0.00704+- 0.00247	0.346	0.65
L. crepidaAEG1♠	El Tigre I, El Tigre II	2	2	1.000+- 0.500	4	0.00605+- 0.00303	0.350	0.61
37. L. curvicornis	Aguada Lagartera	2	2	1.000+- 0.500	2	0.00501+- 0.00251	0.348	2.3
L. curvicornisAEG2♠	Canal Loma Bonita	2	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.334	0
38. L. grandis	Humedal Pte. Milagros	3	2	0.667 +- 0.314	1	0.00101 +- 0.00048	0.294	0.075
39. L. hamata	El Tigre I, Tres Garantias	2	2	1.000 +- 0.500	11	0.01664 +- 0.00832	0.365	1.7

40. <i>L. hastata</i>	Charco 3, L. Catazajá	3	3	1.000+-	6	0.00638+-	0.348	0.95
				0.272		0.00188		
<i>L. hastata</i>AEG1♠	Charco 3	2	2	1.000+-	1	0.00175+-	0.344	0.18
				0.500		0.00087		
41. <i>L. leontina</i>	El Tigre II, Canal de Bachilleres, L. Encantada (Q.Roo), L. Negra, L. Encantada (Ver), Río Pedro Baranda	10	5	0.844 +- 0.080	9	0.00500 +- 0.00103	0.321	0.74
42. <i>L. ludwigii</i> f. <i>ohioensis</i>	Charco 3, Capulteol	6	3	0.600 +- 0.215	3	0.00151 +- 0.00068	0.351	0.15
43. <i>L. luna</i>	El Tigre I, El Tigre II, Humedal Pte. Milagros, L. Pte. Milagros 1	11	9	0.945 +- 0.066	29	0.01605 +- 0.00283	0.338	1.64
44. <i>L. lunaris</i>	El Tigre I, El Tigre II, L. Silvituc	7	3	0.524+- 0.209	3	0.00177+- 0.00085	0.310	0.53
<i>L. lunaris</i>AEG1♠	L. Encantada (Q.Roo), L. Negra, Humedal Pte. Milagros	4	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.330	0
45. <i>L. monostyla</i>	Capulteol	5	1	0.000 +- 0.000	0	0.000 +- 0.000	0.354	0
46. <i>L. papuana</i>	Charco 1, Río Lacanju, Canal Bachilleres, Río Usumacinta	6	5	0.933 +- 0.122	20	0.01382 +- 0.00277	0.310	1.39
47. <i>L.</i> <i>quadridentata</i>	El Tigre II, Humedal Pte. Milagros	4	4	1.000 +- 0.177	12	0.00908 +- 0.00229	0.362	0.77
48. <i>L. rhenana</i>	El Tigre II	2	2	1.000 +- 0.500	2	0.00353 +- 0.00177	0.357	0.36
49. <i>Lecane</i> sp.AEG1	El Tigre I, El Tigre II, Tres Garantias, Humedal Pte.	4	4	1.000 +- 0.177	10	0.00883 +- 0.00213	0.331	0.77

	Milagros								
50. <i>L. spinulifera</i>	Humedal Pte. Milagros,	5	4	0.900 +- 0.161	13	0.01266 +- 0.00321	0.350	1.47	
	L. Pte. Milagros 1								

FAMILIA LEPADELLIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
51. <i>Lepadella</i> cf.	Río Sendero Ruinas	2	2	1.000 +- 0.500	6	0.01017 +- 0.00508	0.341	0
<i>ovalis</i>								
52. <i>L. patella</i>	L. Zempoala Principal	2	1	0.000 +- 0.000	0	0.000 +- 0.000	0.372	0

FAMILIA MYTILINIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
53. <i>Mytilina</i>	L. Zempoala Principal	1	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.358	0
<i>ventralis</i> var.								
<i>brevispina</i>								
54. <i>M. ventralis</i> var.	Capulteol	5	1	0.000+- 0.000	0	0.00000+- 0.00000	0.360	0
<i>macracantha</i>								
<i>M. ventralis</i> var.	Río Sendero Ruinas,	2	2	1.000+- 0.500	15	0.2269+- 0.01135	0.360	2.34
<i>macracantha</i> AEG2	Humedal Pte. Milagros							
♠								
<i>M. ventralis</i> var.	L. Silvituc	2	2	1.000+- 0.500	2	0.00303+- 0.00151	0.327	0.31
<i>macracantha</i> AEG3								
♠								
<i>M. ventralis</i> var.	Charco Ignacio Ramírez, L.	3	3	1.000+- 0.272	10	0.01009+- 0.00362	0.381	1.03
<i>macracantha</i> AEG4	Zempoala Principal							
♠								

FAMILIA NOTOMMATIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
55. <i>Cephalodella</i> cf.	L. Emiliano Zapata	2	1	0.000 +-	0	0.000 +-	0.418	0
<i>gibba</i>				0.000		0.000		

FAMILIA TRICHOCERCIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
56. <i>Trichocerca</i> cf.	Danxho	2	2	1.000 +-	1	0.00154 +-	0.329	0.16
<i>capucina</i>				0.500		0.00077		
57. <i>T. longiseta</i>	L. Zempoala	4	2	0.500 +-	3	0.00235 +-	0.371	0.31
	Principal			0.265		0.00125		
58. <i>T. stylata</i>	L. Negra, L.	9	3	0.639 +-	8	0.00814 +-	0.352	1.2
	Vernet			0.126		0.00148		

FAMILIA TRICHOTRIIDAE

Taxon	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
59. <i>Macrochaetus</i>	El Tigre II, Charco 3,	7	7	1.000 +-	9	0.00579 +-	0.335	0.63
<i>collinsi</i>	Humedal Pte. Milagros			0.076		0.00102		
60. <i>Trichotria</i>	L. Zempoala Principal, L.	6	2	0.333 +-	1	0.00057 +-	0.357	0.085
<i>tetractis</i>	Zempoala 2			0.215		0.00037		

CAPÍTULO 3

**Genetic diversity and comparative
phylogeography of *Brachionus* genus (Rotifera:
Monogononta) from Mexico and other parts of
the world**

Genetic diversity and comparative phylogeography of *Brachionus* genus (Rotifera: Monogononta) from Mexico and other parts of the world

Alma Estrella García-Morales & Manuel Elías-Gutiérrez*

El Colegio de la Frontera Sur, Av. Centenario km 5.5, Chetumal 77014, Quintana Roo, México.

E-mail: aegarcia@ecosur.mx; melias@ecosur.mx

Keywords: cryptic species, diversification, cytochrome c oxidase 1, Miocene.

*Corresponding author: Manuel Elías Gutiérrez, El Colegio de la Frontera Sur, Av. Centenario km 5.5, Chetumal 77014, Quintana Roo, México. Teléfono/Fax 01 (983)835 0440/ (983) 835 0454 e-mail: melias@ecosur.mx

ABSTRACT

The *Brachionus* genus contains species that are cyclical parthenogens with passive dispersal. In Mexico this genus is found widespread, with about 20 species recorded. In this study, we analyzed phylogeographic patterns from multiple co-distributed species within this genus from three geologically contrasting regions of Mexico by using mitochondrial sequences of the cytochrome c oxidase (COI or *cox1*) gene. In total 100 individuals from 22 different locations were sequenced and analyzed. The genetic divergences found here suggest different evolutionary histories and different origins for the species found. Therefore, there is no congruence between age and phylogenetic relationships of most taxa analyzed. Nevertheless, results revealed a geographic structure in *Brachionus calyciflorus* and *B. quadridentatus* f. *brevispinus* with lineages distributed in Central Mexico and lineages distributed in the tropical lowlands from the Southeast. The application of a molecular clock revealed that divergence of these lineages began between the late Miocene and early Pliocene. This is coincident with geological and climatic events that occurred during this period, associated with the formation and development of the Mexican Volcanic Belt. This hypothesis agrees with previous results in some vertebrates and arthropods from this region, and provides new evidences about the factors responsible for genetic differentiation in some groups of the freshwater zooplankton, a topic never studied before in this interesting region of the world.

INTRODUCTION

The freshwater zooplankton is an important component of aquatic ecosystems, and is dominated by three groups: Cladocera, Copepoda and Rotifera. In the case of Cladocera and Rotifera, they have different mating forms and life cycles, including asexual reproduction, strict parthenogenesis and cyclical parthenogenesis (Gómez *et al.*, 2000). After sexual reproduction, they produce dormant stages (e.g. resting eggs) that allow them to passively disperse long distances by wind and waterfowl and colonize wherever suitable ecological conditions exist (Gómez & Carvalho, 2000; Mills *et al.*, 2007). Because of this reason many species of zooplankton are considered cosmopolitans (Fontaneto *et al.*, 2006; Suatoni *et al.*, 2006). Nevertheless, development of molecular tools have changed this idea, since genetic studies have demonstrated that genetic variation of continental zooplankton can be phylogeographically structured (Gómez *et al.*, 2000, Hebert *et al.*, 2003b; Xu *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2010).

Although studies on zooplankton phylogeography are increasing, most have focused mainly on cladocerans (Hebert *et al.*, 2003b; De Gelas & De Meester, 2005; Ishida & Taylor, 2007; Durbin *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). In rotifers only *B. plicatilis* and *B. calyciflorus* species complexes both distributed in temperate zones, have been studied with these new tools (Gómez *et al.*, 2000, 2007; Suatoni *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2010, 2011). These previous studies on these complexes (*B. calyciflorus*, *B. manjavacas* and *B. plicatilis* s.s.) have found structured lineages, which probably diverged during the Pleistocene (Gómez *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2010). The strong

phylogeographical structure found in those taxa indicates a subdivision of population with a recent range expansion since glacial refugia, founder effects and long-distance colonization. However, no attempts have been made to investigate spatial patterns neither the historical processes responsible for those patterns in rotifer species from subtropical and tropical zones, so we do not know if geological factors and climate changes, two of the main causes recognized as promoting diversification and genetic structure in species (Ferrusquía-Villafranca & González-Guzmán, 2005; Jaeger *et al.*, 2005) have affected this community in Mexico, or if the passive dispersion of resistant stages as resting eggs have minimized its effect.

Recent evidences from phylogeographic studies with some crustacean zooplankton species of temperate zones suggest that diversification in the examined taxa may have occurred before the Pleistocene (Väinölä *et al.*, 2001; Dooh *et al.*, 2006; Makino & Tanabe, 2009). In the case of Mexico, vicariant events (uplift of mountains) caused by volcanic activity occurred during the Miocene and Pliocene have been considered promoters of divergence in some groups of vertebrates (Mateos *et al.*, 2002; Bryson *et al.*, 2011; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2011; Schönhuth *et al.*, 2011; Parra-Olea *et al.*, 2012).

Herein, we present the first phylogeographic assessment of a zooplankton, the diverse *Brachionus* taxa from Mexico using sequences of cytochrome c oxidase subunit 1 (COI). Furthermore, we analyzed whether phylogeographic patterns of species co-distributed

are congruent with historical factors such as climatic or geological changes occurred here in the Miocene and Pleistocene.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

In total 58 water bodies were analyzed, but only 22 were positive for the presence of *Brachionus* species. These 22 localities are found mainly in Central and Southern Mexico (Fig. 1). The locations from Central Mexico are located in the Mexican Volcanic Belt (MVB), which is characterized by altitudes between 1,500 and 5,000 meters above sea level (m.a.s.l). The MVB has a moderately diverse climate regime (semiarid to humid), with temperatures ranging between 10°C and 20°C, and some areas reaching from 15°C to 30°C (Ferrusquía-Villafranca, 2007). In Southeast Mexico sampling locations are located in the Gulf Coastal Plain (GCP) and the Yucatan Peninsula (YP). These physiographic zones are characterized by a tropical humid climate with temperatures ranging between 15°C and 36°C and altitudes from 0 to 200 m.a.s.l (Ferrusquía-Villafranca, 1993; Alcocer & Bernal-Brooks, 2010), except some localities in Los Tuxtlas, Veracruz, which are at an altitude between 400 and 710 m.a.s.l. Los Tuxtlas is a unique volcanic region with elevations ranging from 300 to 1,720 m.a.s.l (CONANP, 2006) located in the region GCP. El Rosario I is the only locality from the Baja California Peninsula (BCP) (Fig. 1). Table 1 contains the geographic coordinates and other data from the sampling sites.

Samples were collected with plankton nets in the limnetic and littoral zone. The samples were fixed replacing all water with 96% ethanol, and kept them in cold storage immediately after fixation. The organisms were sorted from the samples and stored in PCR tubes with 96% ethanol until their DNA extraction. Morphological identification to the species level was carried out under a compound microscope and using specialized literature (Koste, 1978; Koste & Shiel, 1986). Voucher specimens were mounted on slides from the same population representing each morphospecies, and deposited in the Reference Collection of Zooplankton at El Colegio de la Frontera Sur unit Chetumal (Chetumal Ecosur).

DNA extraction, amplification and sequencing

DNA extraction and PCR reactions were carried out at Ecosur Chetumal. DNA was extracted from the whole body in accordance with the HotShot protocol (Montero-Pau *et al.*, 2008) as described below. Rotifers were digested using 30 μ l of alkaline lysis buffer (NaOH 25 mM, disodium EDTA 0.2mM, pH 8.0) into 0.2 ml tubes and crushed against the sides in the bottom of the tube. Each sample was incubated at 95°C for 30 minutes and stored in ice for 3 to 4 minutes. A further 30 μ l of neutralizing buffer was added to each tube and every sample was spinned down. A 660-bp segment of COI was amplified using the primers LCO1490 and HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). PCR amplifications were performed according to the standard Barcode of Life protocol (Hajibabaei *et al.*, 2005). The PCR mix contained a final volume of 12.5 μ l, including

6.25 μl of 10% trehalose, 2 μl of ultrapure water, 1.25 μl of 10X PCR buffer, 0.625 μl of MgCl_2 (50 mM), 0.125 μl of each primer (0.01 mM), 0.0625 μl of each dNTP (0.05 mM), 0.06 μl of TaqDNA polymerase (Platinum[®] Taq, Invitrogen), and 2 μl of DNA template.

The PCR reactions were performed in 96-well plates using an Eppendorf thermal cycler. Thermocycling comprised an initial step of 1 minute at 94°C, five cycles of 40 seconds at 94°C, 40 seconds at 45°C and 1 minute at 72°C followed by 35 cycles of 40 seconds at 94°C, 40 seconds at 51 ° C and 1 minute at 72°C, with a final step of 5 minutes at 72°C. PCR products were visualized in a 2% agarose gels (E-Gels[®], Invitrogen) and the most intense products were selected for sequencing. PCR products were labeled with BigDye[®] Terminator v.3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc.), and sequenced bidirectionally on an ABI 3770 automated sequencer. COI sequences were edited using SeqApp 1.9 sequence editor. All sequences obtained in the present study were deposited in GenBank (accession numbers HM880040, HM880041, HQ944329, HQ944338, HQ944356, JX216501-JX216584, JX216588-JX216592) and Barcode of Life Database (BOLD, www.boldsystems.org) under the project Freshwater Rotifera from North America (AGROT).

Sequence alignment and phylogenetic analysis

Sequences were aligned with CLUSTAL W implemented in MEGA 5.0 software using default parameters (Tamura *et al.*, 2011). A total of 100 sequences were aligned, 94 from individuals collected in this study and 6 s equences of Mexican brachionids

obtained from GenBank (DQ664504, DQ664508, DQ664505, JN008935, JN008936 and JN008937). Haplotype diversity (Hd), number of haplotypes (h), nucleotide diversity (π), number of polymorphic sites (S), and the G+C content (guanines and cytosines) were calculated in DnaSP v.5.10 software (Librado & Rozas, 2009). Intra and interspecific genetic divergences were calculated with the MEGA 5.0 software. Phylogenetic relationships of haplotypes were inferred using Maximum Parsimony (MP) and Bayesian analysis. MP and Bayesian analyses were conducted in PAUP*4.0b10 (Swofford, 2002) and MrBayes V.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) respectively. The MP analysis was performed by 10,000 replicates of heuristic search with an initial random stepwise addition of sequences and TBR branch-swapping. Branch support was estimated from 1,000 replicates of a boot strap search. A 50% majority-rule consensus tree was calculated. Bayesian analysis assumed a substitution model under the Akaike Information Criterion (AIC) implemented in Modeltest v.3.7 (Posada & Crandall, 1998), and the best substitution model for the dataset was the K81 + I + G model. The settings for the Bayesian analysis were four simultaneous Monte Carlo Markov Chains (MCMC) for one million generations, sampling every 100 generations, and a burn-in of 25%. Finally, a majority-rule consensus tree was obtained. In both phylogenetic analyses *Plationus patulus* was used (accession number JX216785) as outgroup, because it is considered a sister species of *Brachionus* (Reyna-Fabián *et al.*, 2010).

Additionally, in order to examine the relationship between *Brachionus* species from Mexico with *Brachionus* species from another sites of the world, we analyzed sequences

of *Brachionus* sp. Almenara, *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* and *B. calyciflorus* obtained in the present study and sequences of *B. quadridentatus*, *B. calyciflorus* and *B. plicatilis* complex downloaded from GenBank. The GenBank accession numbers are given in Appendix 1. Sequences were aligned with CLUSTAL W and haplotypes were calculated with DnaSP v.5.10. The model of nucleotide substitution that best fits the dataset was GTR + I + G and was determined with the AIC in Modeltest v.3.7. Bayesian analysis was performed running four simultaneous MCMC for one million generations, sampling every 100 generations, and with a burn-in value of 25%. MP analysis was performed with 1,000 replicates of heuristic search using TBR branch swapping. Branch support was estimated from 500 replicates of bootstrap.

RESULTS

Genetic diversity

One hundred individuals were sequenced and a total of 30 unique haplotypes were identified. Haplotype diversity ranged from 0 to 0.833 (Table 2), and comprised 12 species. Compared with other studies published, this work includes the highest number of sequences and the major number of species of *Brachionus*. From all species included here, *B. quadridentatus* f. *brevispinus* had the higher number of polymorphic sites (119)

followed by *B. calyciflorus* (73). The G+C content of the sequences ranged from 30% to 37% (Table 2).

For all species, the mean intraspecific genetic divergences ranged from 0% to 1.8%. The maximum intraspecific divergence was found among specimens of *Brachionus* sp. Almenara (Appendix 2). The mean interspecific genetic distances were much higher, ranging from 6.3% to 26%. The lower interspecific genetic divergence was found among *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* and *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*AE1, whereas the higher interspecific genetic divergence was found among *B. calyciflorus*AE1 and *B. variabilis* (Appendix 2). *B. havanaensis* and *B. quadridentatus* f. *brevispinus* had the major number of haplotypes (5), one of them, the BhavaHA was the most widespread and it was found in four locations from Veracruz (Table 3).

Phylogenetic relationships among and within brachionid taxa

Phylogenetic analysis was carried out with 34 haplotypes, including 30 haplotypes obtained in this study and four haplotypes from sequences obtained from GenBank (*B. calyciflorus*CHP, *B. falcatus*ROD, *B. havanaensis*XCH and *Brachionus* sp. Mexico) (Table 3). Parsimony analysis produced a near identical topology to that of Bayesian analysis; therefore only the Bayesian tree will be analyzed here. Posterior probabilities and branch support values are shown in the Bayesian tree nodes (Fig. 2). *B. angularis* formed a single lineage with two haplotypes (BanguHA and BanguHB), as well as *B.*

bidentatus (BbidenHA and BbidenHB), whereas *B. angularis* f. *pseudodolabratus*, *B. caudatus*, *B. cf. urceolaris* and *B. variabilis* had a single haplotype (Table 3 and Fig. 2). Most of these taxa were found in the GCP and the YP, except *B. variabilis* which was found in the MVB.

In the *B. calyciflorus* group there are three clear lineages, the BcI and the BcII lineages with haplotypes distributed in the MVB, and the BcIII lineage distributed in the GCP in Southeastern Mexico. The genetic divergence among BcI and BcII lineages was 12%, and the genetic distance among BcI y BcIII lineages was 15%. Similarly, the *B. havanaensis* group was divided in two lineages, the BhI lineage with haplotypes from the YP and GCP, and the BhII lineage with a haplotype from the MVB. The genetic distance between these two lineages was 7%. The high divergence within the *B. calyciflorus* group and the *B. havanaensis* group indicates they are cryptic species. Due to that BcII and BhII lineages contain a single individual, they will not be considered for a more comprehensive analysis. Within the *B. plicatilis* complex, the *Brachionus* sp. Almenara group (BaI lineage, Fig. 2) is represented by haplotypes from the YP and GCP (except the BAImeHA haplotype from the MVB), whereas *Brachionus* sp. Mexico collected from three lakes from the Eastern Basin of the Central Plateau (Eastern MVB) is represented by a single haplotype (Fig. 2). The *Brachionus* sp. Almenara group from Mexico (BaI lineage) and the *Brachionus* sp. Mexico group showed a mean genetic divergence of 15%. This divergence indicates they are different species.

B. quadridentatus f. *cluniorbicularis* was divided in two lineages, the Bqcl lineage from the BCP and the BqcII lineage from the GCP (Fig. 2). Despite the geographical high distance between these two lineages, the genetic divergence among them was just of 6.3%. In the *B. quadridentatus* f. *brevispinus* group three different lineages were found, the Bqbl lineage from the GCP, the BqblI lineage with haplotypes from the YP and the GCP, and the BqblII lineage from the YP (Fig. 2). These three lineages have a mean genetic divergence of 20%, suggesting cryptic speciation. In contrast, the *B. falcatus* group formed a single lineage (Fig. 2) with haplotypes distributed in the GCP (northern Chiapas) and one from the MVB (BfalcaROD). This latter haplotype was found in a region characterized by a warm climate (Morelos). In the remaining *Brachionus* taxa mean intraspecific divergences ranged from 0% to 0.9% (Appendix 2).

The mean genetic divergence among all *Brachionus* taxa was 21%. In the phylogenetic tree (Fig. 2) *B. angularis* is the most basal species (19% average divergence). *B. angularis* f. *pseudodolabratus* was more closely related to *B. caudatus* with a genetic distance of 12%. *B. bidentatus* formed a single lineage related with *B. calyciflorus*, *Brachionus* sp. Almenara and *Brachionus* sp. Mexico (20%). In the other hand, *B. falcatus* is more closely related with *B. cf. urceolaris* and *B. variabilis* (with 17% average divergence) while *B. havanaensis*, *B. quadridentatus* f. *brevispinus* and *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* formed independent lineages. Finally, the lineage *B. quadridentatus* f. *brevispinus*AE2 is more related to *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*, with 17% mean genetic distance.

Phylogenetic relationships with brachionids of the world

The comparison of 116 COI sequences of *B. calyciflorus*, *B. quadridentatus* and *B. plicatilis* complex from Mexico and other localities around the world comprised a 712 bp fragment of the COI gene for all sequences. Sixty four unique haplotypes were calculated with DnaSP software. MP and Bayesian analyses produced an identical tree, only the Bayesian tree is shown in Figure 3. The bootstrap and credibility values are shown in the nodes. Appendix 3 shows the average values of genetic divergence between *B. calyciflorus*, *B. quadridentatus* and *B. plicatilis* complex from Mexico and other localities around the world. The tree (Fig. 3) revealed a close relationship among *Brachionus* sp. Almenara from Mexico with *Brachionus* sp. Almenara from Spain and the United States of America (USA). The mean genetic divergence between these haplotypes was 2.7% and 1.3% respectively (Appendix 3). These results indicate a possible recent expansion of *Brachionus* sp. Almenara from Europe to America. Figure 3 also shows a clear divergence between *Brachionus* sp. Mexico with other species of the *B. plicatilis* complex. The former related with *Brachionus* sp. Almenara (15% divergence) and *B. ibericus* (19% divergence). The genetic divergence between *Brachionus* sp. Mexico with other taxa of the *B. plicatilis* complex such as *B. rotundiformis* and *B. plicatilis* s.s was 17% and 21% respectively (Appendix 3).

Haplotypes of *B. calyciflorus* from China formed six lineages, named in this study BcS1, BcS2, BcS3, BcW1, BcW2 and BcW3. The letter S indicates specimens collected in summer and the letter W specimens collected in winter (Xiang *et al.*, 2011). In the same group of species (Fig. 3) the Bcl lineage from MVB is related to the BcW1 winter lineage. The divergence among these two lineages was 9% indicating they are different species. The lineage BcIII from Southeastern Mexico formed a separate clade related with the Bcl and BcII from the MVB and with the BcW1, 2 and 3 from China (mean divergence 14%) (Appendix 3).

The lineage BcS1 (Fig. 3) included one haplotype from Spain and one from China. The mean genetic distance among BcS1 clade with BcS2 and BcS3 was 21% and 24% respectively (Appendix 3). These results indicate that these lineages are possible cryptic species. In the other hand, the *B. quadridentatus* group was divided in six lineages (Fig. 3), five of them from Southeastern Mexico (Bqbl, BqbII, BqbIII, Bqcl and BqcII) and one from Spain (Bq). The mean genetic divergence between the Bq clade from Spain with the Bqbl, BqbII, BqbIII, Bqcl and BqcII lineages from Mexico was 22.6%, indicating they are cryptic species.

Phylogeographic structure and divergence time

In general, the analysis supported a phylogeographic structure in the *B. calyciflorus*, *B. quadridentatus* f. *brevispinus* and *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* groups. The *B.*

calyciflorus group displayed one lineage (Bcl) from the MVB and a second lineage (BclIII) from the GCP. Similarly, the *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* group displayed one lineage (Bqcl) from the BCP and other from the GCP (Fig. 2). While the *B. quadridentatus* f. *brevispinus* group was divided in three clades, one from the GCP warm highlands (Bqbl from Los Tuxtlas, Veracruz), a second from the GCP warm lowland (BqbIII from Campeche) and a third from the YP (BqbII from Quintana Roo).

Within the Bhl lineage of *B. havanaensis* the genetic divergence among some haplotypes ranged from 1.7% to 2.2%. These divergences are indicative of a historical division into subpopulations; however this subdivision was not reflected in the Bayesian tree (Fig. 2), instead of that, there is a spatial pattern of haplotypes (one haplotype from Los Tuxtlas and two haplotypes from the GCP and YP). Similarly, within *Brachionus* sp. Almenara, the intraspecific divergences ranged from 2% to 2.6%, suggesting a subdivision in subpopulations (Fig. 2). These genetic variants were grouped according to the water body in which they were collected (Fig. 1, Table 3). In *B. falcatus*, the genetic divergences ranged from 0% to 2.4%, and three haplotypes were found within the same water body in the GCP region, whereas the BfalcaROD haplotype was found only in the MVB (Fig. 1, Table 3). The remaining *Brachionus* species showed no geographic structure because they were collected in a single locality.

High levels of divergence found in the *B. plicatilis* complex, *B. calyciflorus* and *B. quadridentatus* f. *brevispinus* groups suggest an ancient divergence. Due to the

inexistence of a mtDNA molecular clock for rotifers, we used one developed for arthropods for an approximation of the divergence time (1.4%-2.3% sequence divergence per million years). This clock has also been applied in studies with other invertebrates, including a rotifer species (Schubart *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2000, Mejía-Madrid *et al.*, 2007). According to these calibrations, we can estimate the time when the divergence could occur. For *B. calyciflorus* group, an average divergence of 15% between Bcl and BclIII lineages suggests about 6.5-10.7 million years (Ma) of independent evolutionary history. Similar level of divergence (15%) between *Brachionus* sp. Almenara and *Brachionus* sp. Mexico indicates the same span of time for independent history. In the case of *B. quadridentatus* f. *brevispinus* group, an average genetic distance of 20% between the Bqbl, BqbII and BqbIII lineages indicates from 8.6 Ma to 14 Ma of independence. Finally, an average genetic divergence of 6.3% in the *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* group suggests that the Bqcl and BqcII lineages could have been separated between 2.7 Ma and 4.5 Ma ago. Based on these results, these *Brachionus* lineages have a long independent evolutionary history. The differentiation probably began during the Miocene and Pliocene and might be related to the formation and development of the MVB in Central Mexico.

DISCUSSION

Genetic diversity

Genetic diversity is the basic component of biodiversity and is the raw material on which natural selection can act, therefore their knowledge and understanding are critical for any ecological, evolutionary and conservation study (Piñero *et al.*, 2008b). Some parameters generally used to assess genetic variation in mitochondrial DNA (mtDNA) are haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (π). High values of these parameters indicate a rich genetic diversity within a population (Piñero *et al.*, 2008a). In this study 30 unique haplotypes were found in 12 *Brachionus* taxa. The *B. havanaensis* and *B. quadridentatus* f. *brevispinus* taxa had the higher number of haplotypes (5), *Brachionus* sp. Almenara had four haplotypes, whereas *B. falcatus* and *B. calyciflorus* had three haplotypes. *B. quadridentatus* f. *brevispinus* had the higher haplotype and nucleotide diversity from all *Brachionus* taxa (0.825 and 0.11026, respectively), followed by *B. calyciflorus* (0.711 and 0.07046). An Hd= 1 indicates that all haplotypes in the sample are different; therefore, the genetic variation detected in *B. quadridentatus* f. *brevispinus* and *B. calyciflorus* is rich. However, a high genetic diversity may be a result of an intrapopulation structure in subpopulations or the presence of cryptic species (Xiang *et al.*, 2010).

Phylogenetic relationships

In the present study 34 haplotypes of *Brachionus* from Mexico were grouped in 19 lineages (Fig. 2). Some of these lineages in the *B. calyciflorus*, *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* and *B. plicatilis* complex groups represent possible cryptic species that exhibit a clear pattern of distribution. COI

divergences greater than 3%, have typically been accepted to delimit species level (Hebert *et al.*, 2003a), and recent molecular studies have found high values of COI divergence in several rotifer species considered cosmopolitans: Some examples are *B. plicatilis* (12%-22%, Gómez *et al.*, 2002b), *Keratella cochlearis* (4.4%, Derry *et al.*, 2003), *Epiphanes senta* (10.9%-12.5%, Schröder & Walsh, 2007), *Lecane bulla* (12%-15%, Walsh *et al.*, 2009), and *B. calyciflorus* (10%-26%, Xiang *et al.*, 2010, 2011). Similarly, in this study we found divergences between 6.3%-22% in the *B. plicatilis* complex, *B. calyciflorus*, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*, and *B. quadridentatus* f. *brevispinus* groups.

Brachionus is a warm water genus, with many species distributed in tropical and subtropical regions around the world (Koste & Shiel, 1986; Segers, 2008). In the present study most of *Brachionus* taxa we identified were found in the tropical region of Southeastern Mexico (GCP and YP) at altitudes less than 700 m.a.s.l. Just the *B. variabilis* species and two lineages of *B. calyciflorus* group were found more than 2,500 m.a.s.l in Central Mexico (MVB). The monophyly in most of the 19 lineages of *Brachionus* is strongly supported with bootstrap and posterior probabilities values >80%. The phylogenetic tree (Fig. 2) shows that the *B. calyciflorus* group is related to the *B. plicatilis* group, while the *B. havanaensis* group is related to the *B. falcatus* group. These phylogenetic relationships were also observed in other molecular study (Reyna-Fabián *et al.*, 2010).

In the other hand, *Brachionus* sp. Mexico, a possible new species from the *B. plicatilis* complex, is more closely related with *Brachionus* sp. Almenara and *B. ibericus* (Fig. 3) (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), whereas the phylogenetic relationships observed among the remaining species of the *B. plicatilis* complex is in agreement with other studies (Gómez *et al.*, 2002b; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Lineages from MVB (2,500-2,700 m.a.s.l) of *B. calyciflorus* group are related to winter lineages of *B. calyciflorus* from China, probably because these lineages are adapted to live in temperate conditions. In our analysis, summer lineages of *B. calyciflorus* from China formed a different group from the winter lineages according to the results reported by Xiang *et al.* (2011).

Phylogeographic patterns

For long time, it has been thought that freshwater zooplankton species occur all over the world, mainly because of its large capacity to passive dispersion (Suatoni *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009). However, some phylogeographic studies with the *B. plicatilis* complex have found high levels of genetic differentiation and local endemism, despite the high potential for this passive dispersal (Gómez *et al.*, 2000, 2002a; Mills *et al.*, 2007). Studies with the *B. calyciflorus* complex by Xiang *et al.* (2010, 2011) have found different patterns of distribution in this complex, since full cosmopolitanism to local endemism, mainly due to a combination of recent population expansions, restricted gene flow, local adaptation and long-distance dispersal as the factors responsible for the phylogeographic structure of this complex in eastern China. The present study agrees

with these previous molecular results and demonstrates that rotifers may have different patterns of geographical distribution. This statement has been suggested also after some traditional empirical studies, using sole morphology (Segers, 2008; Segers & De Smet, 2008).

Herein, it was revealed a geographic pattern in *B. calyciflorus*, *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, and *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*. These divisions in different lineages occurring in environmentally contrasting geological areas may be the result of past events of population fragmentation with geographical isolation due to geological and climatic factors or reflect historical colonization (Avise, 2000).

A recent geographic expansion may be inferred in the *Brachionus* sp. Almenara species. Haplotypes from Mexico have a very close genetic relationship with the ones from the USA and Spain. A possible cause of this pattern is the large capacity of the species to disperse long distances and colonize new habitats (Gómez *et al.*, 2002b, Suatoni *et al.*, 2006). Similarly, the high mountains lineages of *B. calyciflorus* from Mexico had a relationship with winter lineages of *B. calyciflorus* from China, and although genetic divergence in this case was much higher (9%), the possible explanation for this pattern is also the dispersion and long-distance colonization, as well as the adaptation to local environmental conditions. Probably, the original founders arrived and colonized complete habitats. Then they adapted to new local environments after this historic colonization and subsequently a rapid population growth may have interfered with gene

flow, accelerating genetic differentiation of these populations (De Meester *et al.*, 2002, Xiang *et al.*, 2010).

In Mexican Central Plateau, *Brachionus* sp. Mexico is the first known case of local adaptation to freshwater, and also it is possible that this lineage might have diverged due to the isolation of the lakes which are located at 2,300 m.a.s.l. Therefore, the geographic isolation of the lakes could have restricted the arrival and settlement of other genotypes (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

Divergence times

The ages of differentiation in the *B. plicatilis* complex, *B. calyciflorus* and *B. quadridentatus* f. *brevispinus* groups are consistent with the formation of the Mexican Volcanic Belt, which was essentially formed in the middle Miocene-late Miocene (15 Ma) (Ferrusquía-Villafranca *et al.*, 2005; Gómez-Tuena *et al.*, 2005). As a result of the lifting of the MVB, a geographical barrier was created between the southern and northern Mexico, promoting the differentiation of regional biotas (Ferrusquía-Villafranca, 2007). At the same time within the MVB, different types of volcanic activity led to the formation of several watersheds with lakes (Alcocer & Bernal-Brooks, 2010). In the other hand, during the late Miocene-early Pliocene, the Southeastern and central parts of the Yucatan Peninsula were above sea level (Morán-Zenteno, 1994; Padilla, 2007). There is strong evidence that geological vicariant events that occurred in the MVB and other

mountains of Mexico have promoted diversification and the formation of endemic species in beetles (Morrone & Márquez, 2001), fishes (Mateos, 2005; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2008), amphibians (Parra-Olea *et al.*, 2012), reptiles (Zarza *et al.*, 2008; Bryson *et al.*, 2011; Bryson & Riddle, 2012) and mammals (Demastes *et al.*, 2002).

In *B. plicatilis* complex, *B. calyciflorus* and *B. quadridentatus* f. *brevispinus* differentiation seems to have started in the late Miocene possibly of an ancestor with wide distribution, while, *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* probably began to expand and differentiate during the Pliocene-Pleistocene. We hypothesized that the rise and development of MVB and the consequent formation of basins with isolated lakes have played an important role in the genetic differentiation of these taxa of rotifers. Recent phylogeographic studies have suggested that a climate change resulting in a high and abundant precipitation, as well as the tectonic and the volcanic activity that occurred during the late Miocene-Pliocene along the MVB were two probable causes that promoted the isolation and genetic differentiation in fishes of the subfamily Goodeinae, through the expansion of paleo-lakes and streams and its subsequent fragmentation and isolation by volcanic activity (Mejía-Madrid *et al.* 2007; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2008).

These pre-Pleistocene origins have been found in other regions of the world in some crustacean taxa. For example the European amphipod *Gammaracanthus lacustris* which

average 12% divergence between a lacustrine lineage and a marine lineage yielded an age of 5 Ma to 8.5 Ma, consistent with the period of the late Miocene-Pliocene, so we might consider this period as the time when divergence could happen (Väinölä *et al.*, 2001). Dooh *et al.* (2006) found a similar result in the *Mysis relicta* group. The average genetic divergence (8.2%) between two lineages (lacustrine and Arctic) yielded an age between 3.6 Ma to 5.9 Ma of independent evolutionary history. Two possible explanations to this result were provided by Dooh *et al.* (2006): 1) a recurrent invasion to the freshwater from the Arctic seas and 2) cladogenesis events occurred in the Arctic seas before transition to inland waters during the Pliocene. Similarly, Makino & Tanabe (2009), studying the freshwater copepod *Acanthodiaptomus pacificus* found three genetic lineages which showed an age between 6.5 Ma to 15.8 Ma. This age is coincident with the opening of the Japan Sea (14-16 Ma ago) during the Miocene.

In the other hand, the genetic divergence between haplotypes of *Brachionus* sp. Almenara from Mexico and haplotypes of *Brachionus* sp. Almenara from Spain yielded an age among 1 Ma to 1.9 Ma of independent history, suggesting that this species has recently expanded, possibly from glacial refuge in Spain (Gómez *et al.*, 2000) during the interglacial periods of the Pleistocene. A recent study reported a similar result (0.9-1.6 Ma) in *Limnocalanus macrurus* species, suggesting a recent separation between the Arctic lineages and the continental lineages (Dooh *et al.*, 2006). Similarly, within *B. havanaensis* and *B. falcatus* the average divergences indicated an age between 0.5 Ma and 1 Ma. These ages suggest that these species may also have recently spread probably from South America during the Pleistocene.

The complex topography, geography and climate history of the mountainous regions of Mexico give origin to a biodiversity hotspot (Espinosa *et al.*, 2008; Bryson *et al.*, 2011). Also these extensive mountainous areas harbor a significant number of endemism and rotifers apparently are not an exception, as species as *Brachionus josefinae* and *B. araceliae* have been recorded only from the mountains of Aguascalientes state (Silva-Briano & Segers, 1992; Silva-Briano *et al.*, 2007). The formation of the MVB had an impact on the diversification of highland species with respect to the lowland species. The similarity of the patterns of divergence between these rotifers and other taxonomic groups suggests common mechanisms that could lead to genetic differentiation. However, because rotifers are animals with a high capacity for passive dispersal, future studies will be needed with a greater level of detail, especially during samplings, to establish with more certainty which factors are responsible for genetic differentiation, and what is the role of differentiation in this group of organisms.

CONCLUSIONS

Some species of the *Brachionus* genus examined here are cryptic species complexes, which have different patterns of distribution. We observed a concordance among genetic divergence and geological events of the Miocene in *B. calyciflorus* and *B. quadridentatus* f. *brevispinus* taxa, which have lineages distributed in the mountains of the MVB or in the mountains of the GCP, as well as in the Southeastern. Shallower

divergences in *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*, and *Brachionus* sp. Almenara groups indicate a recent geographical expansion of the species during the Pleistocene. These results suggest diverse evolutionary histories; hence there is no congruence between age and phylogenetic relationships in all taxa examined in this study. We hypothesized that the mountain uplift and the subsequent formation of basins with different water bodies could promote genetic differentiation in *B. calyciflorus*, *B. quadridentatus* f. *brevispinus* and *Brachionus* sp. Mexico, through the adaptation of populations to local conditions and geographic isolation of water bodies. Our results also highlight the importance of passive dispersal over long distances with a rapid geographic expansion as observed with the species *Brachionus* sp. Almenara. This work marks the beginning to understand a very complex series of factors that have led to the current diversity of this group of rotifers, hence more studies are needed to gain better knowledge of the interaction between geological and climatic events, as well as genetic patterns, adaptation and dispersal in the differentiation and speciation of the rotifer fauna, not only the *Brachionus* genus.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is part of the doctoral studies of Alma Estrella Garcia Morales, supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant. The molecular work was supported by the Barcode of Life Laboratory, Chetumal node. The study was partially funded by CONABIO through HE009 project. Sequencing was supported by funding from the Government of Canada through Genome Canada and the Ontario Genomics

Institute in support of the International Barcode of Life Project. We thank Sergio Cohuo Duran and Giezi Yam Poot for their help in the collections of samples.

REFERENCES

- Alcántara-Rodríguez, J.A., J. Ciros-Pérez, E. Ortega-Mayagoitia, C. Serrania-Soto & E. Piedra-Ibarra. 2012. Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshwater Biology* 57: 728-740.
- Alcocer, J. & F.W. Bernal-Brooks. 2010. Limnology in Mexico. *Hydrobiologia* 644: 15-68.
- Avice, J.C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, United Kingdom. 447 p.
- Bryson, R.W, R.W. Murphy, A. Lathrop & D. Lazcano-Villareal. 2011. Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: a case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes. *Journal of Biogeography* 38: 697-710.
- Bryson, R.W. & B.R. Riddle. 2012. Tracing the origins of widespread highland species: a case of Neogene diversification across the Mexican sierras in an endemic lizard. *Biological Journal of the Linnean Society* 105: 382-394.

CONANP. 2006. Programa de conservación y manejo Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Salinas Impresores S.A. de C.V. México, D.F. 293 p.

De Gelas, K. & L. De Meester. 2005. Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe. *Molecular Ecology* 14: 753-764.

Demastes, J.W., T.A. Spradling, M.S. Hafner, D. Hafner & D.L. Reed. 2002. Systematics and phylogeography of pocket gophers in the genera *Cratogeomys* and *Pappogeomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22(1): 144-154.

De Meester, L., A. Gómez, B. Okamura & K. Schwenk. 2002. The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica* 23: 121-135.

Derry, A.M., P.D.N. Hebert & E.E. Prepas. 2003. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. *Limnology and Oceanography* 48(2): 675-685.

Domínguez-Domínguez, O., F. Alda, G. Pérez-Ponce de León, J.L. García-Garitagoitia & I. Doadrio. 2008. Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* (Bean, 1898) (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. *BMC Evolutionary Biology* 8: 161-179.

Domínguez-Domínguez, O., M. Vila, R. Pérez-Rodríguez, N. Remón & I. Doadrio. 2011. Complex evolutionary history of the Mexican stoneroller *Campostoma ornatum*

Girard, 1856 (Actinopterygii: Cyprinidae). *BMC Evolutionary Biology* 11: 153-172.

Dooh, R.T., S.J. Adamowicz & P.D.N. Hebert. 2006. Comparative phylogeography of two North American 'glacial relict' crustaceans. *Molecular Ecology* 15: 4459-4475.

Durbin, A., P.D.N. Hebert & M.E.A Cristescu. 2008. Comparative phylogeography of marine cladocerans. *Marine Biology* 155: 1-10.

Espinosa, D., S. Ocegueda, C. Aguilar, O. Flores-Villela & J. Llorente-Bousquets. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. In: Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 33-65.

Ferrusquía-Villafranca, I. 1993. Geology of Mexico: a synopsis. In: Ramamoorthy, T., R. Bye, A. Lot & J. Fa (Eds.). Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press, USA, pp. 3-87.

Ferrusquía-Villafranca, I. 2007. La Faja Volcánica Transmexicana: un ensayo sobre su caracterización y significación biológica. In: Luna-Vega, I., J.J. Morrone-Lupi & D. Espinosa (Eds.). Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana: un estudio multidisciplinario. UNAM, México D.F., pp. 7-38.

Ferrusquía-Villafranca, I. & L. González-Guzmán. 2005. Northern Mexico's landscape, part II: the biotic setting across time. In: Cartron, J.L., G. Ceballos *et al.* (Eds.).

Biodiversity, ecosystems and conservation in northern Mexico. Oxford University Press, USA, pp. 39-51.

Ferrusquía-Villafranca, I., L. González-Guzmán & J.L. Cartron. 2005. Northern Mexico's landscape, part I: the physical setting and constraints on modelling biotic evolution. In: Cartron, J.L., G. Ceballos *et al.* (Eds.). Biodiversity, ecosystems and conservation in northern Mexico. Oxford University Press, USA, pp. 11-38.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular and Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-297.

Fontaneto, D., G.F. Ficetola, R. Ambrosini & C. Ricci. 2006. Patterns of diversity in microscopic animals: are they comparable to those in protist or in large animals?. *Global Ecology and Biogeography* 15: 153-162.

Gómez, A. & G.R. Carvalho. 2000. Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. *Molecular Ecology* 9: 203-214.

Gómez, A., G.R. Carvalho & D.H. Lunt. 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankton: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 267(1458): 2189-2197.

- Gómez, A., G.J. Adcock, D.H. Lunt & G.R. Carvalho. 2002a. The interplay between colonization history and gene flow in passively dispersing zooplankton: microsatellite analysis of rotifer resting egg banks. *Journal of Evolutionary Biology* 15 (1): 158-171.
- Gómez, A., M. Serra, G.R. Carvalho & D.H. Lunt. 2002b. Speciation in ancient cryptic species complex: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution* 56(7): 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.
- Gómez-Tuena, A., M.T. Orozco-Esquivel & L. Ferrari. 2005. Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* LVII(3): 227-283.
- Hajibabaei, M., J.R. DeWaard, N.V. Ivanova, S. Ratnasingham, R. Dooh, S.L. Kirk, P.M. Mackie & P.D.N. Hebert. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences* 360: 1959–1967.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 313-321.

- Hebert, P.D.N., J.D.S. Witt & S.J. Adamowicz. 2003b. Phylogeographical patterning in *Daphnia ambigua*: regional divergence and intercontinental cohesion. *Limnology and Oceanography* 48(1): 261-268.
- Ishida, S. & D.J. Taylor. 2007. Quaternary diversification in a sexual Holarctic zooplankter, *Daphnia galeata*. *Molecular Ecology* 16: 569-582.
- Jaeger, J.R., B.R. Riddle & D.F. Bradford. 2005. Cryptic Neogene vicariance and Quaternary dispersal of the red-spotted toad (*Bufo punctatus*): insights on the evolution of North American warm desert biotas. *Molecular Ecology* 14, 3033-3048.
- Koste, W. 1978. Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Ein Bestimmungswerk, begründet von Max. Vol 2 Tafelband. Voigt Überordnung Monogononta. Germany. 673 p.
- Koste, W. & R.J. Shiel. 1986. Rotifera from Australian inland waters. II. Ehiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Invertebrate Taxonomy* 1(7): 949-1021.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Makino, W. & A.S. Tanabe. 2009. Extreme population genetic differentiation and secondary contact in the freshwater copepod *Acanthodiaptomus pacificus* in the Japanese Archipelago. *Molecular Ecology* 18: 3699-3713.

- Mateos, M. 2005. Comparative phylogeography of livebearing fishes in the genera *Poeciliopsis* and *Poecilia* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes) in central Mexico. *Journal of Biogeography* 32: 775-780.
- Mateos, M., O.I. S anjur & R.C. Vrijenhoek. 2002. Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Evolution* 56(5): 972-984.
- Mejía-Madrid, H.H., E. Vázquez-Domínguez, G. Pérez-Ponce de León. 2007. Phylogeography and freshwater basins in central Mexico: recent history as revealed by the fish parasite *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda). *Journal of Biogeography* 34: 787-801.
- Mills, S., D.H. Lunt & A. Gómez. 2007. Global isolation by distance despite strong regional phylogeography in a small metazoan. *BMC Evolutionary Biology* 7: 480-487.
- Montero-Pau, J., A. Gómez & J. Muñoz. 2008. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 218-222.
- Morán-Zenteno, D. 1994. The Geology of the Mexican Republic. The American Association of Petroleum Geologist. USA, pp.75-83.

- Morrone, J.J. & J. Márquez. 2001. Halffter's Mexican Transition Zone, beetle generalized tracks, and geographical homology. *Journal of Biogeography* 28: 635-650.
- Padilla, R.J. 2007. Evolución geológica del sureste mexicano desde el Mesozoico al presente en el contexto regional del Golfo de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* LIX(1): 19-42.
- Parra-Olea, G., J.C. Windfield, G. Velo-Antón & K.R. Zamudio. 2012. Isolation in habitat refugia promotes rapid diversification in a montane tropical salamander. *Journal of Biogeography* 39: 353-370.
- Piñero, D., A. Barahona *et al.* 2008a. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. In: Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 415-435.
- Piñero, D., J. Caballero-Mellado *et al.* 2008b. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In: Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 437-494.
- Posada, D. & K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Reyna-Fabián, M.E., J.P. Lacleste, M.P. Cummings & M. García-Varela. 2010. Validating the systematic position of *Platyonus* 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.

Ronquist, F. & J.P. Huelsenbeck. 2003. Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Schönhuth, S., M.J. Blum, L. Lozano-Vilano, D.A. Neely, A. Varela-Romero, H. Espinosa, A. Perdices & R.L. Mayden. 2011. Inter-basin exchange and repeated headwater capture across the Sierra Madre Occidental inferred from the phylogeography of Mexican stonerollers. *Journal of Biogeography* 38:1406-1421.

Schubart, C.D., R. Diesel & S.B. Hedges. 1998. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* 393: 363-365.

Schröder, T. & E.J. Walsh. 2007. Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species. *Hydrobiologia* 593: 129-140.

Segers, H. 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 49-59.

Segers, H. & W.H. De Smet. 2008. Diversity and endemism in Rotifera: a review, and *Keratella* Bory de St Vincent. *Biodiversity Conservation* 17: 303-316.

- Silva-Briano, M. & H. Segers. 1992. Una nueva especie del género *Brachionus* (Rotifera: Monogononta), del estado de Aguascalientes, México. *Revue d'Hydrobiologie Tropical* 25(4): 283-285.
- Silva-Briano, M., R. Galván-De la Rosa, I.A. Pérez-Legaspi & 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.
- Suatoni, E., S. Vicario, S. Rice, T. Snell & A. Caccone. 2006. An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 86-98.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analyses using parsimony (*and other methods), versión 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(19): 2731-2739.
- Väinölä, R., J.K. Vainio & J.U. Palo. 2001. Phylogeography of 'glacial relict' *Gammaracanthus* (Crustacea, Amphipoda) from boreal lakes and the Caspian and White seas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 2247-2257.

- Walsh, E.J., T. Schröder, R.L. Wallace & R. Rico-Martinez. 2009. Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 30: 1046-1050.
- Xiang, X.L., Y.L. Xi, X.L. Wen, J.Y. Zhang & Q. Ma. 2010. Spatial patterns of genetic differentiation in *Brachionus calyciflorus* species complex collected from East China in summer. *Hydrobiologia* 638: 67-83.
- Xiang, X.L., Y.L. Xi, X.L. Wen, G. Zhang, J.X. Wang & K. Hu. 2011. Genetic differentiation and phylogeographical structure of the *Brachionus calyciflorus* complex in eastern China. *Molecular Ecology* 20: 3027-3044.
- Xu, S., P.D.N. Hebert, A.A. Kotov & M.E. Cristescu. 2009. The noncosmopolitanism paradigm of freshwater zooplankton: insights from the global phylogeography of the predatory cladoceran *Polyphemus pediculus* (Linnaeus, 1761) (Crustacea, Onychopoda). *Molecular Ecology* 18: 5161-5179.
- Zarza, E., V.H. Reynoso & B.C. Emerson. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology* 17: 3259-3275.

TABLES

Table 1. Geographic coordinates, sampling dates and temperature of sampling localities.

Locality	Sampling date	State	Environment T°C	Latitude N	Longitude W	Altitude (masl)	Water T°C
1. Pond El Rosario I	21-01-11	Baja California Sur	27	23.753	-110.091	479	18
2. Pond 1 Highway Jonuta-Escarcega	26-06-11	Campeche	-	18.109	-92.078	7	-
3. Las Golondrinas	25-03-10	Campeche	33	17.89	-90.819	36	32
4. Catazaja lagoon, limnetic	15-04-11	Chiapas	27	17.786	-92.025	11	28
5. Danxho dam	22-06-11	State of Mexico	14	19.529	-99.337	2558	15
6. Ignacio Ramirez dam, limnetic	22-06-11	State of Mexico	19	19.46	-99.777	2561	18
7. Trinidad Fabela dam	22-06-11	State of Mexico	16	19.827	-99.79	2702	17
8. Cuitzeo lake	29-12-08	Michoacan	15	19.955	-101.161	1835	-
9. Laguna Encantada littoral	07-09-11	Quintana Roo	30	18.499	-88.39	15	30
10. Laguna Negra, littoral	07-09-11	Quintana Roo	30	18.5	-88.394	15	30
11. Hacienda Mundaca station 2	24-05-09	Quintana Roo	-	21.219	-86.726	8	35
12. Ecological Park lagoon, littoral	29-10-10	Quintana Roo	32	18.507	-88.319	3	30
13. Laguna Vernet 2a seccion	25-06-11	Tabasco	33	17.877	-92.55	1	31
14. River in Ciudad Pemex	25-06-11	Tabasco	33	17.9	-92.483	1	33
15. Wetland near Miguel Hidalgo, littoral	25-06-11	Tabasco	-	17.976	-92.43	1	-
16. Apompal lagoon	27-08-10	Veracruz	23	18.376	-94.963	710	24
17. Catemaco lake, limnetic	27-08-10	Veracruz	28	18.417	-95.092	341	28

18. Escondida lagoon	27-08-10	Veracruz	29	18.592	-95.088	125	26
19. Sontecomapan lagoon, limnetic	28-08-10	Veracruz	31	18.553	-94.992	7	26
20. Poza de los Enanos, limnetic	29-08-10	Veracruz	27	18.509	-95.033	10	25
21. Poza Reyna, littoral	27-08-10	Veracruz	25	18.364	-94.969	428	22
22. Lagoon in Capulteol town	28-08-10	Veracruz	31	18.549	-94.98	20	30

Table 2. Parameters of genetic diversity of the *Brachionus* genus from Mexico.

Taxa	Locality	n	h	Hd	S	π	G+C
<i>B. angularis</i>	Apompal	5	2	0.400	1	0.00061	0.345
<i>B. angularis</i> f. <i>pseudodolabratus</i>	Ecological Park	3	1	0.000	0	0.000	0.356
<i>B. bidentatus</i>	L. Vernet	5	2	0.400	1	0.00061	0.337
<i>B. calyciflorus</i>	Danxho, Trinidad Fabela, L. Vernet	10	3	0.711	73	0.07046	0.341
<i>B. caudatus</i>	Capulteol town	4	1	0.000	0	0.000	0.327
<i>B. cf. urceolaris</i>	Wetland Miguel Hidalgo	4	1	0.000	0	0.000	0.337
<i>B. falcatus</i>	Catazaja	4	3	0.833	2	0.00151	0.350
<i>B. havanaensis</i>	Poza Reyna, Catemaco Apompal, Escondida, L. Negra, L. Encantada Catazaja, Las Golondrinas,	19	5	0.713	26	0.01519	0.307

	Ecological Park						
<i>Brachionus</i> sp.	Cuitzeo, Sontecomapan	9	4	0.806	19	0.01394	0.333
Almenara	Poza Enanos, Hacienda						
	Mundaca						
<i>B. quadridentatus</i> f.	Escondida, Ecological Park,	16	5	0.825	119	0.11026	0.342
<i>brevispinus</i>	L.Vernet, Pond 1						
<i>B. quadridentatus</i> f.	El Rosario I, L. Vernet	10	2	0.556	34	0.03466	0.379
<i>cluniorbicularis</i>	Ciudad Pemex, Pond 1						
<i>B. variabilis</i>	Ignacio Ramirez dam	5	1	0.000	0	0.000	0.327

n= number of individuals, h= haplotypes number, Hd= haplotype diversity, S= polymorphic sites, π = nucleotide diversity.

Table 3.- Haplotypes of different taxa of *Brachionus* and locality where they were collected.

Taxa	Haplotype code	Locality
<i>B. angularis</i>	BanguHA	Apompal
	BanguHB	Apompal
<i>B. angularis</i> f.	Bapseudo	Ecological Park
<i>pseudodolabratus</i>		
<i>B. bidentatus</i>	BbidenHA	L. Vernet
	BbidenHB	
<i>B. calyciflorus</i>	BcalyHA	Danxho
	BcalyHB	Trinidad Fabela
	BcalyAE1	L. Vernet
<i>B. caudatus</i>	Bcauda	Capulteol town

<i>B. cf. urceolaris</i>	Burceo	Wetland Miguel Hidalgo
<i>B. falcatus</i>	BfalcaHA	Catazaja
	BfalcaHB	Catazaja
	BfalcaHC	Catazaja
<i>B. havanaensis</i>	BhavaHA	Poza Reyna, Catemaco, Apompal, Escondida
	BhavaHB	L. Negra, L. Encantada
	BhavaHC	Catazaja
	BhavaHD	Las Golondrinas
	BhavaHE	Ecological Park
<i>Brachionus</i> sp. Almenara	BAlmeHA	Cuitzeo
	BAlmeHB	Sontecomapan, Poza Enanos
	BAlmeHC	Sontecomapan
	BAlmeHD	Hacienda Mundaca
<i>B. quadridentatus</i> f.	Bqbrevi	Escondida
<i>brevispinus</i>	BqbreviAE1HA	Ecological Park
	BqbreviAE1HB	Ecological Park
	BqbreviAE1HC	L.Vernet
	BqbreviAE2	Pond 1
<i>B. quadridentatus</i> f.	Bqcluni	El Rosario I
<i>cluniorbicularis</i>	BqcluniAE1	L. Vernet, Ciudad Pemex, Pond 1
<i>B. variabilis</i>	Bvaria	Ignacio Ramirez dam
<i>B. calyciflorus</i>*	BcalyCHP	Chapultepec lagoon
<i>B. falcatus</i>*	BfalcaROD	El Rodeo lagoon
<i>B. havanaensis</i>*	BhavaXCH	Xochimilco
<i>Brachionus</i> sp. Mexico*	B. sp. Mexico	Atexcac, La Preciosa, Alchichica

*From GenBank

FIGURES

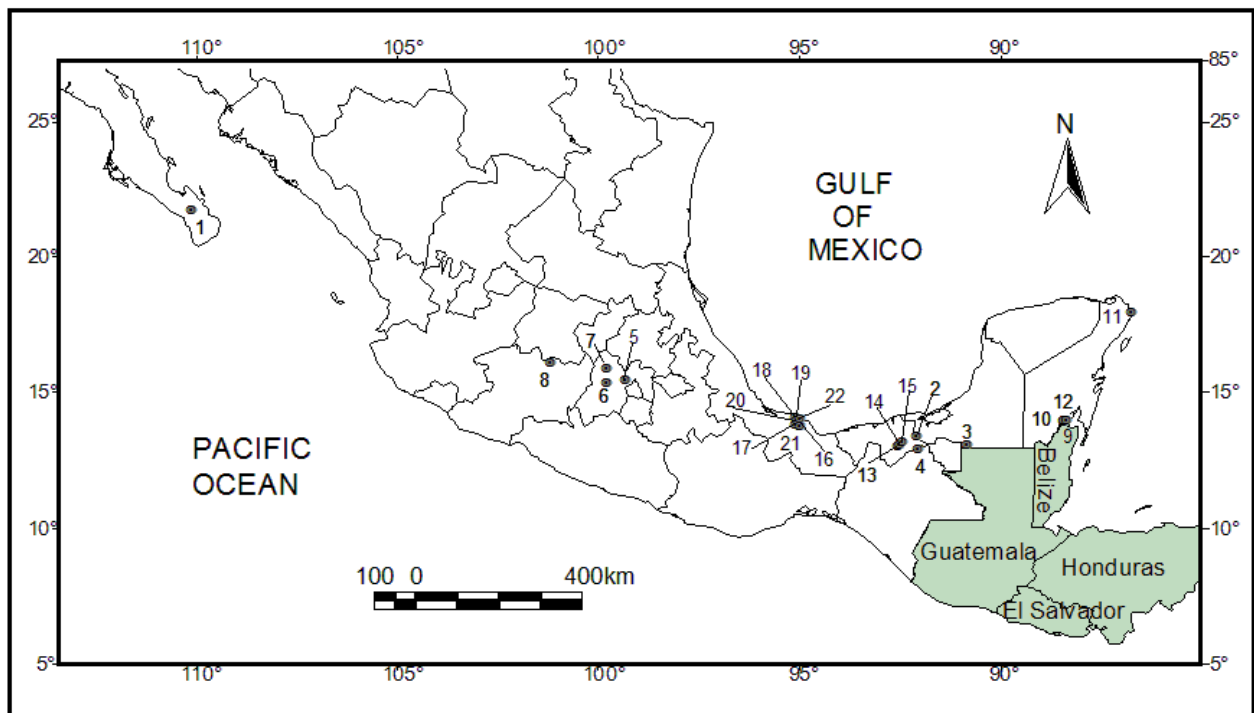


Figure 1. Map of Mexico showing geographic location of sampling localities.

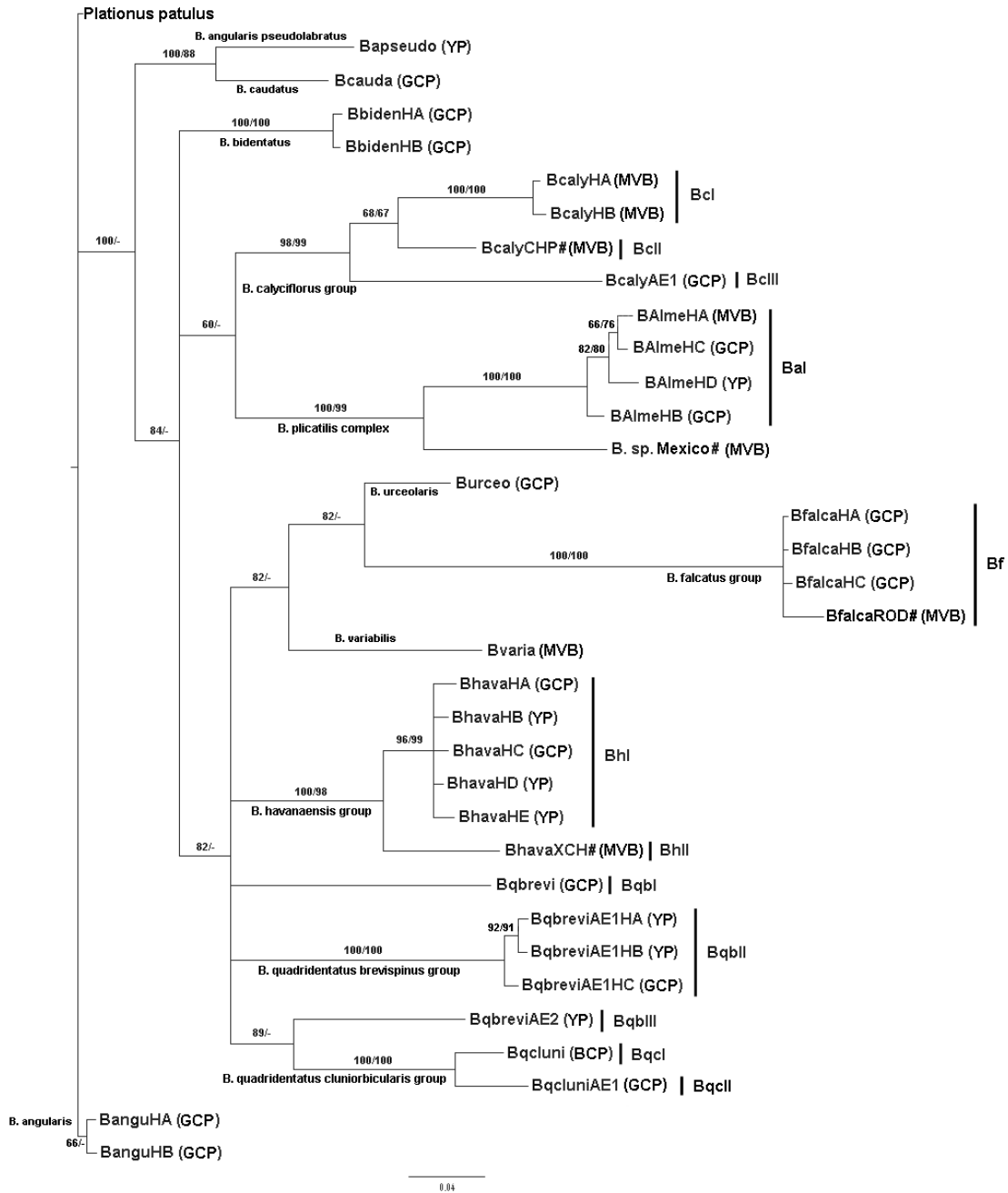


Figure 2. Bayesian tree representing the phylogenetic relationships among *Brachionus* taxa from Mexico. The numbers on the branches indicate posterior probabilities and bootstrap support respectively. The letters in brackets indicate: GCP= Gulf Coastal Plain, YP= Yucatan Peninsula, MVB= Mexican Volcanic Belt, BCP= Baja California

Peninsula. The # symbol indicates that the sequences were obtained from GenBank. BanguHa= *B. angularis*, haplotype A; BanguHB= *B. angularis*, haplotype B; Bcl= clade I of *B. calyciflorus*, BclI= clade II of *B. calyciflorus*, BclII= clade III of *B. calyciflorus*, Bal= clade *Brachionus* sp. Almenara, Bf= clade *B. falcatus*, Bhl= clade I of *B. havanaensis*, BhII= clade II of *B. havanaensis*, Bqbl= clade I of *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, BqbII= clade II of *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, BqbIII= clade III of *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, Bqcl= clade I of *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis* and BqcII= clade II of *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*. B.sp.Mexico= *Brachionus* sp. Mexico.

Figure 3. Bayesian tree representing the phylogenetic relationships among *B. quadridentatus* group, *B. calyciflorus* group, and the *B. plicatilis* complex from Mexico and from other places of the world. The numbers on the branches indicate posterior probabilities and bootstrap support respectively. The letters in brackets indicate: GCP= Gulf Coastal Plain, YP= Yucatan Peninsula, MVB= Mexican Volcanic Belt, BCP= Baja California Peninsula, USA= United States of America, SPN= Spain. Bqbl= clade I of *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, BqbII= clade II of *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, BqbIII= clade III of *B. quadridentatus* f. *brevispinus*, Bqcl= clade I of *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*, BqclI= clade II of *B. quadridentatus* f. *cluniorbicularis*, Bq= clade *B. quadridentatus*, Bcl= clade I of *B. calyciflorus*, BclI= clade II of *B. calyciflorus*, BclII= clade III of *B. calyciflorus*, BcW1= clade 1 of winter of *B. calyciflorus*, BcW2= clade 2 of winter of *B. calyciflorus*, BcW3= clade 3 of winter of *B. calyciflorus*, BcS1= clade 1 of summer of *B. calyciflorus*, BcS2= clade 2 of summer of *B. calyciflorus*, BcS3= clade 3 of summer of *B. calyciflorus*. Specimens of the clades BcW1, BcW2, BcW3, BcS1, BcS2 and BcS3 were collected in China.

APPENDIXES

Appendix 1. Taxa of the *Brachionus* genus, localities and accession numbers to GenBank.

Taxa	Locality	Country	GenBank accession
<i>Brachionus calyciflorus</i>	Chapultepec	Mexico	DQ664504
<i>B. quadridentatus</i> PET21	Laguna de Pétrola	Spain	AF387295
<i>B. quadridentatus</i> SAL7	Laguna de Salobrejo	Spain	AF387294
<i>Brachionus</i> sp. Mexico ATX	Atexcac	Mexico	JN008936
<i>Brachionus</i> sp. Mexico LPR	La Preciosa	Mexico	JN008937
<i>Brachionus</i> sp. Mexico ALC	Alchichica	Mexico	JN008935
<i>Brachionus</i> sp. Almenara	Indian Rocks Beach, Florida	USA	FR729668
Indianrocks1			
<i>Brachionus</i> sp. Almenara Lostlake1	Lost Lake, Connecticut	USA	AY785219
<i>Brachionus</i> sp. Almenara Lostlake1	Lost Lake, Connecticut	USA	FR729690
<i>Brachionus</i> sp. Almenara pettaq1	Pettaquamscutt, Rhode Island	USA	AY785216
<i>Brachionus</i> sp. Almenara pettaq2	Pettaquamscutt, Rhode Island	USA	AY785217
<i>Brachionus</i> sp. Almenara pettaq3	Pettaquamscutt, Rhode Island	USA	AY785218
<i>Brachionus</i> sp. Almenara	Nevada4	USA	AF387265
<i>Brachionus</i> sp. Almenara	Nevada6	USA	AF387266
<i>Brachionus</i> sp. Almenara	Nevada5	USA	AF387267
<i>Brachionus</i> sp. Almenara	Charco Almenara	Spain	AF387268
<i>Brachionus</i> sp. Almenara	Charco Almenara	Spain	AF387269
<i>Brachionus</i> sp. Nevada	Nevada	USA	AF387246
<i>Brachionus</i> sp. Nevada Little2	Little Fish Lake	USA	FR729685
<i>Brachionus</i> sp. Nevada	Nevada	USA	AM180752
<i>B. plicatilis</i> 2GAL982	Laguna de Gallocanta	Spain	AF266880
<i>B. plicatilis</i> 1ERA5	Laguna de las Eras	Spain	AF266889
<i>B. plicatilis</i> 6TOS4	Poza Sur, Pantano Torreblanca	Spain	AF266862
<i>B. plicatilis</i> 6TOSL4	Poza Sur, Pantano Torreblanca	Spain	AF266860
<i>B. plicatilis</i> 6TUR3	Estany de En Turies	Spain	AF266861
<i>Brachionus</i> sp. Austria	NevadaP	USA	AF387247
<i>Brachionus</i> sp. Austria	Obere Halbjockchlacke	Austria	AF387248
<i>Brachionus</i> sp. Austria	Tianjin	China	AF387249
<i>Brachionus</i> sp. Austria Nakuru2	Lago Nakuru	Kenya	FR729670
<i>Brachionus</i> sp. Austria Bogoria1	Lago Bogoria	Kenya	FR729692
<i>Brachionus</i> sp. Manjavacas	Mar de Azov	Russia	AF387250
<i>Brachionus</i> sp. Manjavacas	Laguna de Gallocanta	Spain	AF387251
<i>Brachionus</i> sp. Manjavacas	Laguna de Gallocanta	Spain	AF387252
<i>Brachionus</i> sp. Manjavacas	Korba Sebkhet	Tunisia	AF387253
<i>Brachionus</i> sp. Manjavacas	Manjavacas	Spain	AF387257
<i>B. ibericus</i> 6TONSM6	Poza Norte, Pantano Torreblanca	Spain	AF387270
<i>B. ibericus</i> 6ALMSM5	Charco Almenara	Spain	AF387271

<i>B. ibericus</i> 5TIS3	Laguna de Tiscar	Spain	AF387272
<i>B. ibericus</i> 6TUR10	Estany de En Turies	Spain	AF387274
<i>B. ibericus</i> Wales1	Kidwelly, Gales	United Kingdon	AF387275
<i>Brachionus</i> sp. Cayman	Charco Meagher	Cayman Island	AF387284
<i>Brachionus</i> sp. Cayman	Charco Meagher	Cayman Island	AF387285
<i>Brachionus</i> sp. Cayman		Turkey	AF387286
<i>B. rotundiformis</i>	Poza Sur, Pantano Torreblanca	Spain	AF387287
<i>B. rotundiformis</i>	Albufera de Pollensa	Spain	AF387289
<i>B. rotundiformis</i>	Albufera de Pollensa	Spain	AF387290
<i>B. rotundiformis</i>	Charca Universidad de Cádiz	Spain	AF387292
<i>B. rotundiformis</i>	Hondo Sur	Spain	AF387293
<i>B. calyciflorus</i> 6ALM2	Laguna de Almenara	Spain	AF387296
<i>B. calyciflorus</i> XZ9	Xuzhou (summer)	China	GU232733
<i>B. calyciflorus</i> XZ18	Xuzhou (summer)	China	GU232723
<i>B. calyciflorus</i> WH13	Wuhu (summer)	China	GU232687
<i>B. calyciflorus</i> TJ6	Tianjin (summer)	China	GU232679
<i>B. calyciflorus</i> NJ9	Nanjing (summer)	China	GU232663
<i>B. calyciflorus</i> NJ18	Nanjing (summer)	China	GU232653
<i>B. calyciflorus</i> Gan9	Ganzhou (summer)	China	GU232625
<i>B. calyciflorus</i> Gan13	Ganzhou (summer)	China	GU232609
<i>B. calyciflorus</i> DZ5	Dezhou (summer)	China	GU232581
<i>B. calyciflorus</i> AQ7	Anqing (summer)	China	GU232561
<i>B. calyciflorus</i> AHNUW22	Wuhu (winter)	China	FJ827003
<i>B. calyciflorus</i> AHNUW5	Wuhu (winter)	China	FJ826995
<i>B. calyciflorus</i> AHNUH1	Danzhou (winter)	China	FJ826985
<i>B. calyciflorus</i> AHNUN8	Nanjing (winter)	China	FJ826961
<i>B. calyciflorus</i> AHNUT11	Tianjin (winter)	China	FJ826951
<i>B. calyciflorus</i> AHNUA1	Anqing (winter)	China	FJ826941
<i>B. calyciflorus</i> AHNUH3	Danzhou (winter)	China	FJ826913
<i>B. calyciflorus</i> AHNUN2	Nanjing (winter)	China	FJ827004
<i>B. calyciflorus</i> AHNUG11	Guangzhou (winter)	China	FJ826909
<i>B. calyciflorus</i> AHNUG2	Guangzhou (winter)	China	FJ826907
<i>B. calyciflorus</i> AHNUX5	Xuzhou (winter)	China	FJ827018
<i>B. calyciflorus</i> AHNUX1	Xuzhou (winter)	China	FJ827012

Appendix 2. Intra and interspecific mean genetic divergences of the *Brachionus* taxa from Mexico.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	<i>B. angularis</i>	0.2																			
2	<i>B. angularis</i> f. <i>pseudodolabratus</i>	13.8	0																		
3	<i>B. bidentatus</i>	16.01	21.03	0.08																	
4	<i>B. calyciflorus</i>	21.78	22.39	16.75	0.3																
5	<i>B. calyciflorus</i> AE1	21.63	24.1	21.71	15.77	0															
6	<i>B. caudatus</i>	15.5	12.78	17.69	20.21	22.12	0														
7	<i>B. cf. urceolaris</i>	17.57	17.24	15.21	16.75	19	18.09	0													
8	<i>B. falcatus</i>	19.44	24.63	20.85	21.99	23.8	20.18	18.02	0.2												
9	<i>B. havanaensis</i>	18.67	20.59	16.66	17.64	19.92	18.72	14.36	19.99	1.57											
10	<i>Brachionus</i> sp. Almenara	21.9	21.26	20.66	21.54	21.58	21.75	19.98	24.33	20.27	1.84										
11	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	19.15	21.76	18.73	20.61	22.34	21.42	19.2	24.58	19.66	24.56	0									
12	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AE1	18.97	20.68	20.86	22.26	20.69	16.73	17.52	24.14	19.65	20.85	23.04	0.9								
13	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AE2	16.6	17.28	15.83	20.35	20.3	18.39	15.64	23.13	17.02	17.32	19.5	17.07	0							
14	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	21.78	23.36	18.27	21.01	21.28	18.68	17.91	23.9	20.89	23.7	19.57	20.21	17.11	0						
15	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AE1	22.67	23.69	17.97	18.39	21.3	18.98	17.61	25.48	19.38	22.88	19.57	19.64	16.81	6.3	0					
16	<i>B. variabilis</i>	18.97	21.28	20.23	24.52	26.07	19.27	14.09	22.93	18.92	21.85	21.17	22.19	19.33	20.22	22.03	0				
17	<i>B. calyciflorus</i> *	19.48	21.72	16.59	11.24	14.08	19.15	17.83	20.03	19.59	22.13	21.44	20.65	18.58	18.97	20.42	23	0			
18	<i>B. havanaensis</i> *	18.2	20.61	16.02	18.51	18.62	18.05	13.8	17.68	7.44	21.8	22.31	19.35	16.7	21	20.38	20.1	17.5	0		
19	<i>B. falcatus</i> *	20.45	25.8	21.61	22.76	24.27	21.52	19.29	2.31	20.74	25.35	25.05	25	23.64	23.48	26.05	24.4	20.5	18.7	0	
20	<i>Brachionus</i> sp. México*	22.77	22.39	19.92	20.67	22.14	21.86	20.4	25.89	20.67	15.56	25.97	23.04	20.71	25.03	25.32	22.4	22.4	21.6	27.1	0

*From GenBank

Appendix 3. Intra and interspecific mean genetic divergences of *Brachionus* sequences produced in the present study and sequences downloaded from GenBank.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	<i>Brachionus</i> sp. Almenara (Mex)	1.5																												
2	<i>Brachionus</i> sp. Almenara (USA)	1.3	0.8																											
3	<i>Brachionus</i> sp. Almenara (Spn)	2.7	2.3	3.4																										
4	<i>Brachionus</i> sp. Mexico	15.3	15.2	15.7	0																									
5	<i>B. ibericus</i>	19.1	19.5	19.8	19.5	2.8																								
6	<i>B. rotundiformis</i>	16.6	17.1	17.7	16.9	19.4	0.2																							
7	<i>Brachionus</i> sp. Nevada	20.1	20.3	20.2	20.9	21.3	19.4	0																						
8	<i>Brachionus</i> sp. Nevada1 LF	17.3	17.1	17.1	18.4	23	17.6	14	0																					
9	<i>Brachionus</i> sp. Nevada2	18.4	18.4	18.8	19.2	23.2	19.1	9.6	13.8	0																				
10	<i>Brachionus</i> sp. Austria	18.5	18.6	18.8	18.1	23.1	19.4	17.4	16	16.4	4																			
11	<i>B. plicatilis</i>	21	20.6	21.1	20.4	24.3	19.6	19.4	17	22.5	21.3	0.9																		
12	<i>Brachionus</i> sp. Manjavacas	21	21.3	21	21	24.7	19.8	21.6	18.7	19.8	22.6	21.5	3.1																	
13	<i>Brachionus</i> sp. Cayman	16.1	16.2	16.6	16.6	20.7	14	17.1	15	15.3	16.6	21.1	18.5	0																
14	<i>Brachionus</i> sp. Cayman1 TU	21.6	21.7	22	19.2	22.8	17.3	21.8	20	21.8	20.6	24.6	22.6	12.9	0															
15	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i>	23	22.8	23.2	25	25.8	21.9	24.8	18.9	22.2	23.9	24.8	25.2	19.9	25.1	0														
16	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AE1	20.6	20.8	20.8	22.2	23.6	18	22.3	18.4	23.2	23.4	23.6	25.1	17.3	20.6	22.2	0.9													
17	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>brevispinus</i> AE2	16.8	16.9	17.2	20	23.7	17.7	21.7	18.6	21.1	22.3	23.2	26.4	15.8	19.2	18.6	16.6	0												
18	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	23	22.8	23.1	24.4	24.1	23.1	23.5	21.1	22.9	22.9	23.6	25	21.2	21.5	19	19.8	16.4	0											
19	<i>B. quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AE1	22.4	22.7	22.4	24.3	24.2	22.8	22.7	19.4	23.2	22.5	24.9	25.3	19.2	20.6	19.2	19.5	16.4	6.3	0										
20	<i>B. quadridentatus</i> (Spn)	26	26.1	26.4	26.4	26	25.7	27.3	26.6	28.4	27.2	27.1	26.3	26.7	26.8	26.5	22.8	23.5	19.6	20.8	0									
21	<i>B. calyciflorus</i>	21	21.2	21	20.8	26.7	21	23.7	17.4	22.8	23.2	22.6	20.8	20.3	25.2	20.2	22.3	20.2	20.6	18.4	24.4	0.2								
22	<i>B. calyciflorus</i> AE1	20.6	20.4	20.4	21.9	22.4	21	22.4	17.3	18.4	22.7	24	19.7	18.1	22.2	21.6	20.5	19.9	21.1	21.1	24.8	15.4	0							
23	<i>B. calyciflorus</i> CHP	21.2	20.9	20.9	21.6	24.6	17.9	21.7	18.9	20.8	22.7	22.2	21.6	19.4	21.1	20.4	19.9	17.5	18.1	19.8	25.5	11.6	14	0						
24	<i>B. calyciflorus</i> BcS1	24.5	24.2	24.3	23.3	26.6	23.8	26.8	23.4	24.5	26.2	24.8	20.3	20.1	23.4	22.7	23.5	23.3	25.2	25.5	27.2	18.8	17.4	18.5	0.95					
25	<i>B. calyciflorus</i> BcS2	24.2	24.4	24.6	25.1	24.7	26.3	23.8	24	26.4	27.1	25.2	25.3	24.3	26.1	27.3	23.8	26.7	25.6	27.8	23.9	21.3	23.8	20.6	21.3	0.08				
26	<i>B. calyciflorus</i> BcS3	29.1	28.6	28.4	25.8	24.7	27.4	24.6	25.7	27.7	26.6	25	26.1	27.9	30.8	28.6	28.2	28.6	29.4	29.1	27.3	22.4	25	23.5	24.3	19	0			
27	<i>B. calyciflorus</i> BcW1	21.1	21.1	20.9	18.6	22.3	19.9	19.7	19.3	20.4	21.1	21.8	22.1	19.3	22.7	20.8	20.4	18.8	20.2	19.1	23.4	8.9	14.3	12.1	19.1	20.2	22	0.4		
28	<i>B. calyciflorus</i> BcW2	21.6	21.8	21.1	22	27.8	19.6	23.7	18.5	21.3	20.3	22.1	20.4	18.4	22.1	22.4	23.5	19.5	20.9	19.8	27.9	12.7	14.7	6.8	18.4	24.1	26.2	14.4	0.7	
29	<i>B. calyciflorus</i> BcW3	21.6	21.6	21.2	21.5	27	20.7	22.9	17.8	19.6	22.9	24.1	21.1	17.2	21.8	20.8	21.2	20.6	21.8	23.6	27	12.2	14.2	7.5	16	21.3	23.9	13.7	9.3	0.6

Mex= Mexico, USA= United States of America, Spn= Spain, LF= Little Fish Lake (USA), TU= Turke

CONCLUSIONES GENERALES

En este estudio el gen citocromo c oxidasa 1 o COI probó ser una buena herramienta para la discriminación de especies de rotíferos monogonontos, ya que todos los táxones analizados formaron grupos genéticos bien definidos, por lo tanto, hubo congruencia entre la identificación morfológica y la molecular. Por otro lado, morfológicamente se identificaron 63 especies e infraespecies de rotíferos; sin embargo, el análisis de código de barras discriminó 87 táxones, es decir que con el COI se pudieron detectar 24 posibles especies crípticas, una proporción alta de diversidad oculta. Además, el COI identificó los táxones de nivel infrasub-específico (5 formas y 3 variedades) como entidades a nivel taxonómico de especie; sin embargo, análisis morfológicos más detallados serán necesarios para establecer el estatus específico de esos táxones. Estos resultados sugieren que el conocimiento sobre la diversidad de Rotifera está aún lejos de estar completo.

Con el análisis de variabilidad genética se detectaron 13 táxones con una alta variabilidad (H_d : 0.689-1.00 y π : 0.0100-0.2269) la cual puede ser explicada por la influencia de algunos procesos como el azar, la adaptación a las condiciones ambientales locales, el aislamiento geográfico o colonizaciones secundarias. Por su parte, otros 34 táxones presentaron una variación genética baja (H_d : 0.000-0.356 y π : 0.000-0.0039) la cual puede ser debida a procesos como colonizaciones recientes o efectos de fundador persistentes. El resto de los táxones (37) analizados presentaron valores moderados de diversidad haplotípica (H_d) o bien de diversidad nucleotídica (π).

De acuerdo con estos resultados, es necesario realizar muestreos en otras localidades abarcando un mayor número de hábitats para poder no solo establecer con más certeza como es la variabilidad genética en las especies de rotíferos sino también poder identificar los fenómenos responsables de esa variación.

Por otro lado, el COI también demostró ser un buen marcador molecular para el análisis filogeográfico, ya que las altas divergencias genéticas (6.3% a 26%) encontradas entre los diferentes táxones de *Brachionus* examinados sugieren que algunos de estos táxones son antiguos (Mioceno). Además con el COI se pudo observar que *Brachionus calyciflorus* y *B. quadridentatus* f. *brevispinus* presentaron una estructura filogeográfica con un linaje distribuido en las zonas montañosas de la FVT y otro linaje de las zonas tropicales del sureste respectivamente. Este resultado es congruente con la idea de que los rotíferos si pueden presentar una estructura geográfica a pesar de su alta capacidad de dispersión pasiva a largas distancias. Sin embargo, se encontró un caso donde la baja distancia genética (promedio de 2%) entre *Brachionus* sp. Almenara de México y *Brachionus* sp. Almenara de EUA y España sugiere una reciente expansión de ámbito de esta especie posiblemente desde refugios glaciales en el sur de España durante el Pleistoceno. Por lo tanto, se comprueba la alta capacidad de dispersión de este taxon. Finalmente, los resultados del reloj molecular aplicado a *Brachionus calyciflorus* y *B. quadridentatus* f. *brevispinus* sugieren que la separación de sus linajes genéticos pudo haber ocurrido durante el Mioceno, posterior al levantamiento de la Faja Volcánica Transmexicana. Por lo que, no se descarta la posibilidad de que barreras geográficas y la adaptación local a nuevas condiciones ambientales hayan jugado un papel

importante en la diferenciación genética de rotíferos, como ha ocurrido con algunos grupos de peces dulceacuícolas.

LITERATURA CITADA GENERAL

- Alcocer, J. and Bernal-Brooks, F.W., 2010. Limnology in Mexico. *Hydrobiologia*, 644, pp.15-68.
- Alcocer, J. and Escobar, E., 1996. Limnological regionalization of Mexico. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 2, pp.55-69.
- Arndt, H., 1993. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) -a review. *Hydrobiologia*, 255/256, pp.231-246.
- Arriaga, L., Aguilar, V. y Alcocer, J., 2000. *Aguas continentales y diversidad biológica de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Avise, J.C. et al., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, pp.489-522.
- Ball, S.L., Hebert, P.D.N., Burian, S.K. and Webb, J.M., 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA Barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(3), pp.508-524.

- Blaxter, M., Elsworth, B. and Daub J., 2004. DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 271, pp.S189-S192.
- Birky, C.W., 2007. Workshop on barcoded DNA: application to rotifer phylogeny, evolution, and systematic. *Hydrobiologia*, 593, pp.175-183.
- Borisenko, A.V. et al., 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*, 8, pp.471-479.
- Brusca, R. and Brusca, G., 2003. *Invertebrates*. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer-Sunderland.
- Chapman, A.D., 2009. *Numbers of living species in Australia and the world*. 2nd ed. Canberra: Report for the Australian Biological Resources Study.
- Chediack, S.A., 2009. Conceptos generales sobre biodiversidad y manejo de recursos naturales. **In:** S.E. Chediack, ed. *Monitoreo de biodiversidad y recursos naturales: ¿para qué?*. México D.F: Seprim, pp.13-28.
- Chen, J., Li, Q., Kong, L. and Yu, H., 2011. How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: the case study of a poorly understood marine fauna. *PLoS ONE*, 6(6), e21326. doi: 10.1371/journal.pone.0021326.
- Ciros-Pérez, J., Gómez, A. and Serra, M. 2001. On taxonomy of 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(12), pp.1311-1328.

- CONABIO., 1998. *La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas)., 2006. *Programa de conservación y manejo Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas*. México D.F: Salinas Impresores.
- Costa, F.O. et al., 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64, pp.272-295.
- Cywinska, A., Hunter, F.F. and Hebert, P.D.N., 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, pp.413-424.
- De Meester, L., Gómez, A., Okamura, B. and Schwenk, K., 2002. The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23, pp.121-135.
- Derry, A.M., Hebert, P.D.N. and Prepas, E.E., 2003. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. *Limnology and Oceanography*, 48(2), pp.675-685.

- Domínguez-Domínguez, O. y Vázquez-Domínguez, E., 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32, pp.59-69.
- Dumont, H., 1983. Biogeography of rotifers. *Hydrobiologia*, 104, 19-30.
- Elpidio, R. and Hebert, P.D.N., 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, pp.641-647.
- Ferrusquía-Villafranca, I., 1993. Geology of Mexico: a synopsis. **In:** T. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, J. Fa, eds. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. New York: Oxford University Press, pp.3-87.
- Ferrusquía-Villafranca, I., 2007. La Faja Volcánica Transmexicana: un ensayo sobre su caracterización y significación biológica. **In:** I. Luna-Vega, J.J. Morrone-Lupi, D. Espinosa, eds. *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana: un estudio multidisciplinario*. México D.F: CONABIO-UNAM, pp.7-38.
- Fisher, B.L. and Smith, M.A., 2008. A revision of Malagasy species of *Anochetus* Mayr and *Odontomachus* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). *PLoS ONE*, 3(5): e1787. doi: 10.1371/journal.pone.0001787.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular and Marine Biology and Biotechnology*, 3, pp. 294-297.

- Fontaneto, D., Boschetti, C. and Ricci, C., 2008. Cryptic diversification in ancient asexual: evidence from the rotifer *Philodina flaviceps*. *Journal for Evolutionary Biology*, 21, pp.580-587.
- Fontaneto, D. et al., 2007. Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS Biology*, 5(4), e87. doi: 10.1371/journal.pbio.0050087.
- Fontaneto, D. et al., 2011. Cryptic diversity in the genus *Adineta* Hudson & Gosse, 1886 (Rotifera: Bdelloidea: Adinetidae): a DNA taxonomy approach. *Hydrobiologia*, 662, pp.27-33.
- Fontaneto, D., Murat, K., Herniou, E.A. and Barraclough, T.G., 2009. Extreme levels of hidden diversity in microscopic animals (Rotifera) revealed by DNA taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, pp.182-189.
- Gilbert, J.J. and Walsh, E.J., 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. *Hydrobiologia*, 546, pp.257-265.
- Gómez, A., 2005. Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation. *Hydrobiologia*, 546, pp.83-99.
- Gómez, A., Carvalho, G.R. and Lunt, D.H., 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankter: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 267(1458), pp.2189-2197.

- Gómez, A., Adcock, G.J., Lunt, D.H. and Carvalho, G.R., 2002a. The interplay between colonization history and gene flow in passively dispersing zooplankton: microsatellite analysis of rotifer resting egg banks. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(1), pp.158-171.
- Gómez, A., Serra, M., Carvalho, G.R. and Lunt, D.H., 2002b. Speciation in ancient cryptic species complex: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, 56(7), pp.1431-1444.
- Gómez, A., Montero-Pau, J., Lunt, D.H., Serra, M. and Campillo, S., 2007. Persistent genetic signatures of colonization in *Brachionus manjavacas* rotifers in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 16, pp.3228-3240.
- González, D., 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología*, 14, pp.1-21.
- Gutiérrez-García, T. and Vázquez-Domínguez, E., 2011. Comparative phylogeography: designing studies while surviving the process. *BioScience*, 61(11), pp.857-868.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. and Hickey, D.A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), pp.167-172.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. B*, 270, pp.313-321.

- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. B*, 270, pp.S96-S99.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. and Francis, C.M., 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biology*, 2(10), pp.1657-1663.
- Hernández-Baños, B.E., Honey-Escandón, M., Cortés-Rodríguez, M.N. and García, G., 2007. Filogeografía de aves mexicanas. In: L.E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, comp. *Ecología Molecular*. México D.F: Impresora y Encuadernadora Progreso S.A. de C.V.
- Hogg, I.D. and Hebert, P.D.N., 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 82, pp.749-754.
- INE (Instituto Nacional de Ecología). 2000a. *Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Montes Azules*. México, D.F: Enkidu Editores.
- INE (Instituto Nacional de Ecología). 2000b. *Programa de manejo Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla*. México, D.F: P7 Ediciones.
- Kaya, M., Herniou, E.A., Barraclough, T.G. and Fontaneto, D., 2009. Inconsistent estimates of diversity between traditional and DNA taxonomy in bdelloid rotifers. *Organisms, Diversity and Evolution*, 9, pp.3-12.

- Koste, W. and Shiel, R.J., 1986. Rotifera from Australian inland waters. II. Ehiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Invertebrate Taxonomy*, 1(7), pp.949-1021.
- Lane, N., 2009. On origin of bar codes. *Nature*, 462, pp.272-274.
- Lara, A. et al., 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, 10, pp.421-430.
- Léveque, C. and Mounolou, J.C., 2004. *Biodiversity*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Mills, S., Lunt, D.H. and Gómez, A., 2007. Global isolation by distance despite strong regional phylogeography in a small metazoan. *BMC Evolutionary Biology*, 7, pp.480-487.
- Morán-Zenteno, D., 1994. *The Geology of the Mexican Republic*. Oklahoma: The American Association of Petroleum Geologist.
- Moreno, A., 2007. Tamaño efectivo de la población. **In:** L.E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, comp. *Ecología Molecular*. México D.F: Impresora y Encuadernadora Progreso S.A. de C.V.
- Nogrady, T., Wallace, R.L. and Snell, T.W., 1993. Rotifera. Volume 1: Biology, ecology and systematics. **In:** H.J. Dumont, ed. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. The Hague: SPB Academic Publishing.

- Piñero, D. et al., 2008a. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. **In:** *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. México D.F: CONABIO.
- Piñero, D. et al., 2008b. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. **In:** *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. México D.F: CONABIO.
- Ricci, C. and Balsamo, M., 2000. The biology and ecology of lotic rotifers and gastrotrichs. *Freshwater Biology*, 44, pp.15-28.
- Rougerie, R. et al., 2009. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(8), pp.789-801.
- Rzedowski, J., 2006. *Vegetación de México*. México D.F: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sarma, S.S.S., 1999. Checklist of rotifers (Rotifera) from Mexico. *Environment and Ecology*, 17(4), pp.978-983.
- Schmitter-Soto, J.J. et al., 2002. Los cenotes de la península de Yucatán. **In:** G. de la Lanza, J.L. García, comp. *Lagos y presas de México*. México D.F: AGT Editor.

- Schröder, T. and Walsh, E.J., 2007. Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species. *Hydrobiologia*, 593, pp.129-140.
- Segers, H., 1996. The biogeography of littoral *Lecane* Rotifera. *Hydrobiologia*, 323, pp.169-197.
- Segers, H., 2002. The nomenclature of the Rotifera: annotated checklist of valid family- and genus-group names. *Journal of Natural History*, 36, pp.631-640.
- Segers, H., 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, 1564, pp.1-104.
- Segers, H., 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, pp.49-59.
- Segers, H. and De Smet, W.H., 2008. Diversity and endemism in Rotifera: a review, and *Keratella* Bory de St Vincent. *Biodiversity Conservation*, 17, pp.303-316.
- Suatoni, E., Vicario, S., Rice, S., Snell, T. and Caccone, A., 2006. An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, pp.86-98.
- Suga, K., Tanaka, Y., Sakakura, Y. and Hagiwara, A., 2007. Inheritance of mitochondrial DNA in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 593, pp.167-173.
- Toledo, V.M., 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*, 81, pp.17-30.

- Vargas, B., 2009. Filogeografía de *Artibeus jamaicensis triomylus* y *Artibeus jamaicensis yucatanicus* (Chiroptera: Phyllostomidae) de México. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- Vargas, S.M., Araújo, F.C.F. and Santos, F.R., 2009. DNA barcoding of Brazilian sea turtles (Testudines). *Genetics and Molecular Biology*, 32(3), pp.608-612.
- Vázquez-Domínguez, E., 2007. Filogeografía y vertebrados. **In:** L.E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, comp. *Ecología Molecular*. México D.F: Impresora y Encuadernadora Progreso S.A. de C.V.
- Wallace, R.L., 2002. Rotifers: exquisite Metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, 42, pp.660-667.
- Wallace, R.L., Snell, T.W., Ricci, C. and Nogrady, T., 2006. Rotifera. Volume 1: Biology, ecology and systematics. **In:** H.J. Dumont, H. Segers, eds. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. 2nd ed. The Netherlands: Kenobi Productions and Backhuys Publishers.
- Walsh, E.J., Schröder, T., Wallace, R.L. and Rico-Martinez, R., 2009. Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 30, pp.1046-1050.
- Ward, R.D. et al., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society. B*, 360, pp.1847-1857.

- Wilson, E.O., 2003. The encyclopedia of life. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, pp.77-80.
- Witt, J., Threlloff, D.L. and Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology*, 15, pp.3073-3082.
- Xiang, X.L., Xi, Y.L., Wen, X.L., Zhang, J.Y. and Ma, Q., 2010. Spatial patterns of genetic differentiation in *Brachionus calyciflorus* species complex collected from East China in summer. *Hydrobiologia*, 638, pp.67-83.
- Xiang, X.L., Xi, Y.L., Wen, X.L., Zhang, G., Wang, J.X. and Hu, K., 2011. Genetic differentiation and phylogeographical structure of the *Brachionus calyciflorus* complex in eastern China. *Molecular Ecology*, 20, pp.3027-3044.
- Zink, R.M., 1996. Comparative phylogeography in North American birds. *Evolution*, 50(1), pp.308-317.
- Zink, R.M., 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American Aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, 42, pp.953-959.

Taxa	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
<i>Cephalodella cf. gibba</i>	L. Emiliano Zapata	2	1	0.000 +- 0.000	0	0.000 +- 0.000	0.418	0

FAMILIA TRICHOCERCIDAE

Taxa	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
<i>Trichocerca cf. capucina</i>	Danxho	2	2	1.000 +- 0.500	1	0.00154 +- 0.00077	0.329	0.16
<i>T. longiseta</i>	L. Zempoala Principal	4	2	0.500 +- 0.265	3	0.00235 +- 0.00125	0.371	0.31
<i>T. stylata</i>	L. Negra, L. Vernet	9	3	0.639 +- 0.126	8	0.00814 +- 0.00148	0.352	1.2

FAMILIA TRICHOTRIIDAE

Taxa	Localidad	n	h	Hd	S	π	G+C	Id (%)
<i>Macrochaetus collinsi</i>	El Tigre II, Charco 3, Humedal Pte. Milagros	7	7	1.000 +- 0.076	9	0.00579 +- 0.00102	0.335	0.63
<i>Trichotria tetractis</i>	L. Zempoala Principal, L. Zempoala 2	6	2	0.333 +- 0.215	1	0.00057 +- 0.00037	0.357	0.085

Apéndice 2. Divergencias intraespecíficas de los taxa crípticos detectados por el análisis de código de barras.

Taxa	Localidad	Id (%)
<i>Testudinella patina</i>	Capulteol	0.51
<i>Testudinella patina</i> AEG5	Capulteol, Charco 3	2.67
<i>B. calyciflorus</i>	Danxho, Isla de las Aves	0.39
<i>B. calyciflorus</i> AEG1	L. Vernet	0.2
<i>B. quadridentatus f. brevispinus</i>	L. Escondida	0
<i>B. quadridentatus f. brevispinus</i> AEG1	L. Vernet, Parque Ecológico	0.9
<i>B. quadridentatus f. brevispinus</i> AEG2	Charco 1	0

<i>B. quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i>	El Rosario	0
<i>B. quadridentatus</i> f. <i>cluniorbicularis</i> AEG1	L. Vernet, Ciudad Pemex, Charco 1	0
<i>K. cochlearis</i>	L. km 25, Presa Ignacio Ramírez	0.2
<i>K. cochlearis</i> AEG1	Charco Timilpan	0
<i>Platyias quadricornis</i>	L. Apompal, L. Escondida, Capulteol	1.8
<i>Platyias quadricornis</i> 1	Canal de Bachilleres	0
<i>Ascomorpha ovalis</i>	Danxho,	0
<i>Ascomorpha ovalis</i> AEG1	L. Zempoala 2	0
<i>Lecane bulla</i>	Capulteol	0
<i>Lecane bulla</i> 1	L. Silvituc, Canal de Bachilleres	0.075
<i>Lecane bulla</i> 2	L. Escondida, L. Majahual	0
<i>Lecane bulla</i> 3	L. Apompal, L. Escondida	0
<i>Lecane bulla</i> 4	Manantial 2, Canal de Bachilleres	0.51
<i>Lecane bulla</i> 5	El Tigre II, L. Encantada (Q.Roo), Humedal Pte. Milagros, L. Pte. Milagros 1,	0.61
<i>Lecane bulla</i> AEG9	Capulteol	0
<i>Lecane bulla</i> AEG10	L. Emiliano Zapata, L. Zempoala Principal, L. Catemaco	1.66
<i>L. cornuta</i>	P. Humedales charco 5, Canal Loma Bonita, Capulteol	1.07
<i>L. cornuta</i> 1	El Tigre I, Río Pedro Baranda, L. Silvituc	1.71
<i>L. cornuta</i> AEG2	Aguada Lagartera, L. Silvituc	0
<i>L. crepida</i>	El Tigre II, Humedal Pte. Milagros	0.65
<i>L. crepida</i> AEG1	El Tigre I, El Tigre II	0.61
<i>L. curvicornis</i>	Aguada Lagartera	2.3
<i>L. curvicornis</i> AEG2	Canal Loma Bonita	0
<i>L. hastata</i>	Charco 3, L. Catazajá	0.95
<i>L. hastata</i> AEG1	Charco 3	0.18
<i>L. lunaris</i>	El Tigre I, El Tigre II, L. Silvituc	0.53
<i>L. lunaris</i> AEG1	L. Encantada (Q.Roo), L. Negra, Humedal Pte. Milagros	0
<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i>	Capulteol	0
<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG2	Río Sendero Ruinas, Humedal Pte. Milagros	2.34
<i>Mytilina ventralis</i> var. <i>macracantha</i> AEG3	L. Silvituc	0.31

CONCLUSIONES GENERALES

1. En este estudio el gen citocromo c oxidasa 1 o COI probó ser una buena herramienta para la discriminación de especies de rotíferos monogonontos, por lo tanto se confirma su capacidad como código de barras. Además demostró tener capacidad para detectar especies crípticas, así como taxa que requieren análisis taxonómicos más exhaustivos.
2. El COI también demostró ser un buen marcador molecular para el análisis filogeográfico.
3. Las divergencias genéticas altas encontradas entre los diferentes taxa de *Brachionus* examinados sugieren que el grupo es antiguo.
4. Los taxa *Brachionus calyciflorus* y *B. quadridentatus* f. *brevispinus* presentaron una estructura filogeográfica con un linaje distribuido en las zonas montañosas de la FVT o de la PCG (Los Tuxtlas) y otro linaje de las zonas tropicales del sureste respectivamente. Este resultado es congruente con la idea de que los rotíferos si pueden presentar estructura geográfica a pesar de su alta capacidad de dispersión pasiva.

5. Las diferentes edades calculadas en algunos de los taxa de *Brachionus* estudiados sugieren que estos taxa tienen un origen evolutivo distinto. Lo cual ha sido observado también en otras especies de zooplancton epicontinental.

6. La baja distancia genética encontrada entre *B. sp.* Almenara de México y *B. sp.* Almenara de EUA y España sugiere una reciente expansión de ámbito de esta especie posiblemente desde refugios glaciales en el sur de España durante el Pleistoceno.

7. Los resultados del reloj molecular en *Brachionus calyciflorus* y *B. quadridentatus* f. *brevispinus* sugieren que la separación de sus dos linajes genéticos pudo haber ocurrido durante el Mioceno, posterior al levantamiento de la Faja Volcánica Transmexicana. Por lo tanto, es posible que barreras geográficas si puedan estar jugando un papel importante en la diferenciación de rotíferos y de otros grupos de zooplancton epicontinental.

8. La diversidad genética en la mayoría de los taxa estudiados fue de moderada a alta, en algunos casos esta diversidad es debido a la presencia de especies crípticas.

9. Es posible que la baja variación genética encontrada en algunos taxa de rotíferos sea debido al muestreo de poblaciones clonales, o bien que los taxa fueron encontrados en una sola localidad.

LITERATURA CITADA

- Alcocer, J. and Bernal-Brooks, F.W., 2010. Limnology in Mexico. *Hydrobiologia*, 644, pp.15-68.
- Alcocer, J. and Escobar, E., 1996. Limnological regionalization of Mexico. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 2, pp.55-69.
- Arndt, H., 1993. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) -a review. *Hydrobiologia*, 255/256, pp.231-246.
- Arnot, D.E., Roper, C. and Bayoumi, R.A., 1993. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61, pp.15-24.
- Avice, J.C., 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Bermingham, E. and Moritz, C., 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7, pp.367-369.
- Brusca, R. and Brusca, G., 2003. *Invertebrates*. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer-Sunderland.
- Census of Marine Life. Julio 2012. [home page], disponible en: <http://www.coml.org>
- Chapman, A.D., 2009. *Numbers of living species in Australia and the world*. 2nd ed. Canberra: Report for the Australian Biological Resources Study.

Chediack, S.A., 2009. Conceptos generales sobre biodiversidad y manejo de recursos naturales. In: S.E. Chediack, ed. *Monitoreo de biodiversidad y recursos naturales: ¿para qué?*. México D.F: Seprim, pp.13-28.

CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). 2006. *Programa de conservación y manejo Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas*. México D.F: Salinas Impresores.

Cywinska, A., Hunter, F.F. and Hebert, P.D.N., 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, pp.413-424.

Dawkins, R., 1998. *Unweaving the rainbow: science, delusion and the appetite for wonder*. Boston: Houghton Mifflin.

Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407-415.

De Meester, L. and Declerck, S., 2005. The study of biodiversity in freshwater habitats: societal relevance and suggestions for priorities in science policy. *Hydrobiologia*, 542, pp.1-9.

Derry, A.M., Hebert, P.D.N. and Prepas, E.E., 2003. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. *Limnology and Oceanography*, 48(2), pp.675-685.

Dumont, H., 1983. Biogeography of rotifers. *Hydrobiologia*, 104, 19-30.

Ferrusquía-Villafranca, I., 1993. Geology of Mexico: a synopsis. **In:** T. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, J. Fa, eds. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. New York: Oxford University Press, pp.3-87.

Ferrusquía-Villafranca, I., 2007. La Faja Volcánica Transmexicana: un ensayo sobre su caracterización y significación biológica. **In:** I. Luna-Vega, J.J. Morrone-Lupi, D. Espinosa, eds. *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana: un estudio multidisciplinario*. México D.F: CONABIO-UNAM, pp.7-38.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular and Marine Biology and Biotechnology*, 3, pp. 294-297.

Fontaneto, D., Boschetti, C. and Ricci, C., 2008. Cryptic diversification in ancient asexual: evidence from the rotifer *Philodina flaviceps*. *Journal for Evolutionary Biology*, 21, pp.580-587.

Fontaneto, D. et al., 2011. Cryptic diversity in the genus *Adineta* Hudson & Gosse, 1886 (Rotifera: Bdelloidea: Adinetidae): a DNA taxonomy approach. *Hydrobiologia*, 662, pp.27-33.

Fontaneto, D., Murat, K., Herniou, E.A. and Barraclough, T.G., 2009. Extreme levels of hidden diversity in microscopic animals (Rotifera) revealed by DNA taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, pp.182-189.

- Gilbert, J.J. and Walsh, E.J., 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. *Hydrobiologia*, 546, pp.257-265.
- Global Taxonomy Initiative. Julio 2012. [home page], disponible en: <http://www.cbd.int/gti/about.shtml>.
- Gómez, A., 2005. Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation. *Hydrobiologia*, 546, pp.83-99.
- Gómez, A., Carvalho, G.R. and Lunt, D.H., 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankter: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 267(1458), pp.2189-2197.
- Gómez, A., Montero-Pau, J., Lunt, D.H., Serra, M. and Campillo, S., 2007. Persistent genetic signatures of colonization in *Brachionus manjavacas* rotifers in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 16, pp.3228-3240.
- Gómez, A., Serra, M., Carvalho, G.R. and Lunt, D.H., 2002. Speciation in ancient cryptic species complex: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, 56(7), pp.1431-1444.
- González, D., 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, pp.137-157.

- González, D., 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología*, 14, pp.1-21.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. and Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, pp.968-971.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. and Hickey, D.A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), pp.167-172.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. B*, 270, pp.313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. B*, 270, pp.S96-S99.
- Hernández-Baños, B.E., Honey-Escandón, M., Cortés-Rodríguez, M.N. and García, G., 2007. Filogeografía de aves mexicanas. In: L.E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, comp. *Ecología Molecular*. México D.F: Impresora y Encuadernadora Progreso S.A. de C.V.
- INE (Instituto Nacional de Ecología). 2000. *Programa de manejo Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla*. México, D.F: P7 Ediciones.

- Kaya, M., Herniou, E.A., Barraclough, T.G. and Fontaneto, D., 2009. Inconsistent estimates of diversity between traditional and DNA taxonomy in bdelloid rotifers. *Organisms, Diversity and Evolution*, 9, pp.3-12.
- Koste, W. and Shiel, R.J., 1986. Rotifera from Australian inland waters. II. Ephiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Invertebrate Taxonomy*, 1(7), pp.949-1021.
- Krishnamurthy, K.V., 2003. *Textbook of biodiversity*. Enfield: Science Publishers.
- Lane, N., 2009. On origin of bar codes. *Nature*, 462, pp.272-274.
- Léveque, C. and Mounolou, J.C., 2004. *Biodiversity*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Llorente, J. and Luna, I., 1994. *Taxonomía biológica*. México D.F: Fondo de Cultura Económica.
- Mills, S., Lunt, D.H. and Gómez, A., 2007. Global isolation by distance despite strong regional phylogeography in a small metazoan. *BMC Evolutionary Biology*, 7, pp.480-487.
- Morán-Zenteno, D., 1994. *The Geology of the Mexican Republic*. Oklahoma: The American Association of Petroleum Geologist.
- Moreno, A., 2007. Tamaño efectivo de la población. **In:** L.E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, comp. *Ecología Molecular*. México D.F: Impresora y Encuadernadora Progreso S.A. de C.V.

- Piñero, D. *et al.*, 2008a. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. **In:** *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. México D.F: CONABIO.
- Piñero, D. *et al.*, 2008b. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. **In:** *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. México D.F: CONABIO.
- Ricci, C. and Balsamo, M., 2000. The biology and ecology of lotic rotifers and gastrotrichs. *Freshwater Biology*, 44, pp.15-28.
- Rzedowski, J., 2006. *Vegetación de México*. México D.F: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sarma, S.S.S. and Elías-Gutiérrez, M., 1999. A survey on the rotifer (Rotifera) fauna of the Yucatan Peninsula (Mexico). *Revista de Biología Tropical*. 47(1), pp.191-200.
- Schmitter-Soto, J.J. *et al.*, 2002. Los cenotes de la península de Yucatán. **In:** G. de la Lanza, J.L. García, comp. *Lagos y presas de México*. México D.F: AGT Editor.
- Schröder, T. and Walsh, E.J., 2007. Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species. *Hydrobiologia*, 593, pp.129-140.

- Segers, H., 2002. The nomenclature of the Rotifera: annotated checklist of valid family- and genus-group names. *Journal of Natural History*, 36, pp.631-640.
- Segers, H., 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, 1564, pp.1-104.
- Segers, H., 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, pp.49-59.
- Segers, H. and De Smet, W.H., 2008. Diversity and endemism in Rotifera: a review, and *Keratella* Bory de St Vincent. *Biodiversity Conservation*, 17, pp.303-316.
- Suatoni, E., Vicario, S., Rice, S., Snell, T. and Caccone, A., 2006. An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, pp.86-98.
- Suga, K., Tanaka, Y., Sakakura, Y. and Hagiwara, A., 2007. Inheritance of mitochondrial DNA in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 593, pp.167-173.
- Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *TREE*, 15(5), pp.199-203.
- Toledo, V.M., 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*, 81, pp.17-30.
- Vargas, B., 2009. Filogeografía de *Artibeus jamaicensis triomylus* y *Artibeus jamaicensis yucatanicus* (Chiroptera: Phyllostomidae) de México. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

- Velasco de León, P., Arellano, J., Silva-Pineda, A. y Yussim, S., 2007. Aspectos geológicos y paleontológicos. **In:** I. Luna-Vega, J.J. Morrone-Lupi, D. Espinosa, eds. *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana: un estudio multidisciplinario*. México D.F: CONABIO-UNAM, pp.25-38.
- Velázquez, L y Ordaz, A., 1992. Provincias hidrogeológicas de México. *Ingeniería Hidráulica en México*, 7(11), pp.36-55.
- Vázquez, E., 2007. Filogeografía y vertebrados. **In:** L.E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, comp. *Ecología Molecular*. México D.F: Impresora y Encuadernadora Progreso S.A. de C.V.
- Wallace, R.L., 2002. Rotifers: exquisite Metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, 42, pp.660-667.
- Wallace, R.L., Snell, T.W., Ricci, C. and Nogrady, T., 2006. Rotifera. Volume 1: Biology, ecology and systematics. **In:** H.J. Dumont, H. Segers, eds. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. 2nd ed. The Netherlands: Kenobi Productions and Backhuys Publishers.
- Walsh, E.J., Schröder, T., Wallace, R.L. and Rico-Martinez, R., 2009. Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 30, pp.1046-1050.
- Wild, G.A.M., 2001. Mitochondrial DNA diversity of three common eastern percids (Teleostei: Percidae). Master degree thesis. Trent University, Peterborough, Ontario, Canada.

Wilson, E.O., 2003. The encyclopedia of life. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, pp.77-80.

Xiang, X.L., Xi, Y.L., Wen, X.L., Zhang, J.Y. and Ma, Q., 2010. Spatial patterns of genetic differentiation in *Brachionus calyciflorus* species complex collected from East China in summer. *Hydrobiologia*, 638, pp.67-83.

Xiang, X.L., Xi, Y.L., Wen, X.L., Zhang, G., Wang, J.X. and Hu, K., 2011. Genetic differentiation and phylogeographical structure of the *Brachionus calyciflorus* complex in eastern China. *Molecular Ecology*, 20, pp.3027-3044.

Zink, R.M., 1996. Comparative phylogeography in North American birds. *Evolution*, 50(1), pp.308-317.

Zink, R.M., 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American Aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, 42, pp.953-959.

ANEXO III

Premios



GOBIERNO DEL ESTADO
Quintana
2005



Gobierno del Estado de Quintana Roo
H. Congreso del Estado de Quintana Roo
Consejo Quintanarroense de Ciencia y Tecnología
otorgan el presente:

RECONOCIMIENTO

A la: Dra. Martha Elena Valdez Moreno

Coautora del trabajo ganador en la categoría "Investigación Científica" de los Premios Estatales de Ciencia, Tecnología y de Reconocimiento a la Innovación 2010.

Dip. Luís González Flores
Presidente de la Gran Comisión
del Congreso del Estado.

M. en C. José Antonio Hoy Manzanilla
Director General del COQCYT.

MÉXICO
2010

Bicentenario
Independencia

Centenario
Revolución

En Ciencia y Tecnología
Siempre hacia adelante



GOBIERNO DEL ESTADO

Quintana

2005



Roo

2011



Gobierno del Estado de Quintana Roo
H. Congreso del Estado de Quintana Roo
Consejo Quintanarroense de Ciencia y Tecnología
otorgan el presente:

RECONOCIMIENTO

Al: Dr. Manuel Elías Gutierrez

Coautor del trabajo ganador en la categoría "Investigación Científica" de los Premios Estatales de Ciencia, Tecnología y de Reconocimiento a la Innovación 2010.

Dip. Luis González Flores
Presidente de la Gran Comisión
del Congreso del Estado.

M. EN C. José Antonio Hoy Manzanilla
Director General del COQCYT.

MÉXICO
2010

Bicentenario
Independencia

Centenario
Revolución

En Ciencia y Tecnología
Siempre hacia adelante

ANEXO IV

Protocolos no públicos

Extracción de DNA genómico mediante el método de NaCl y Cloroformo

1. Coloque ~50 mg de tejido en un microtubo limpio
2. Adicione 410 μ l de Buffer de lisis (100 mM NaCl; 50mM Tris pH 8.0; 100mM EDTA) además de 90 μ l de SDS 10%.
500 μ l ← 410 ml Buffer lisis + 90 ml SDS 10%
3. Homogenice el tejido en partículas finas
4. Añada 20 μ l de Proteinasa K (Solución stock de 10 mg/ml; Sigma No Cat P-2308) además de 2 μ l de RNasa.
5. Incube a 65°C durante 30 min
6. Adicione 200 μ l de NaCl saturado (~6M)
7. Agite vigorosamente (aprox. 5 min.)
8. Incube en baño de hielo durante 10 min.
9. Centrifugue a 10,000 rpm durante 10 min.
10. Transfiera 500 μ l del sobrenadante a un microtubo limpio
11. Adicione 350 μ l de Cloroformo:Alcohol Isoamilico (24:1)
12. Agite vigorosamente (aprox. 5 min.)
13. Centrifugue a 14,000 rpm durante 5 min.
14. Transfiera 500 μ l del sobrenadante a un microtubo limpio
15. Adicione 1,000 μ l (2 Volúmenes) de Etanol al 100%
NOTA: El isopropanol se utiliza para precipitar fragmentos de DNA difíciles que son menores a 500 pb ó mayores a 4 Kb. Cuando se encuentran en el rango intermedio NO es necesario utilizar el isopropanol.
16. Mezcle por inversión, llegándose a apreciar una turbidez (DNA).
Sí no se observa turbidez o es muy escasa, **continúe en el Paso 18**
17. Tome el DNA con una punta de pipeta y transfíralo a un microtubo que contenga 100 μ l de agua o solución TE. Cuidando de NO arrastrar demasiado alcohol. **continúe en el Paso 26**

18. Centrifugue a 14,000 rpm durante 10 min
19. Decantar el etanol
20. Adicione 500 μ l Etanol al 80%
21. Agite en vórtex
22. Centrifugue a 14,000 rpm durante 5 min
23. Decantar el etanol
24. Seque en centrífuga de vacío
25. Disuelva el DNA con 100 μ l de agua o TE
26. Agite en vórtex
27. Tomar 10 μ l del DNA y diluirlo en 90 μ l de agua destilada estéril (dil. 1:10)
28. Incubar a 95°C durante 5 min.
29. Pasar inmediatamente a baño de hielo durante 5 min.
30. Almacene a -20°C.

ANEXO V

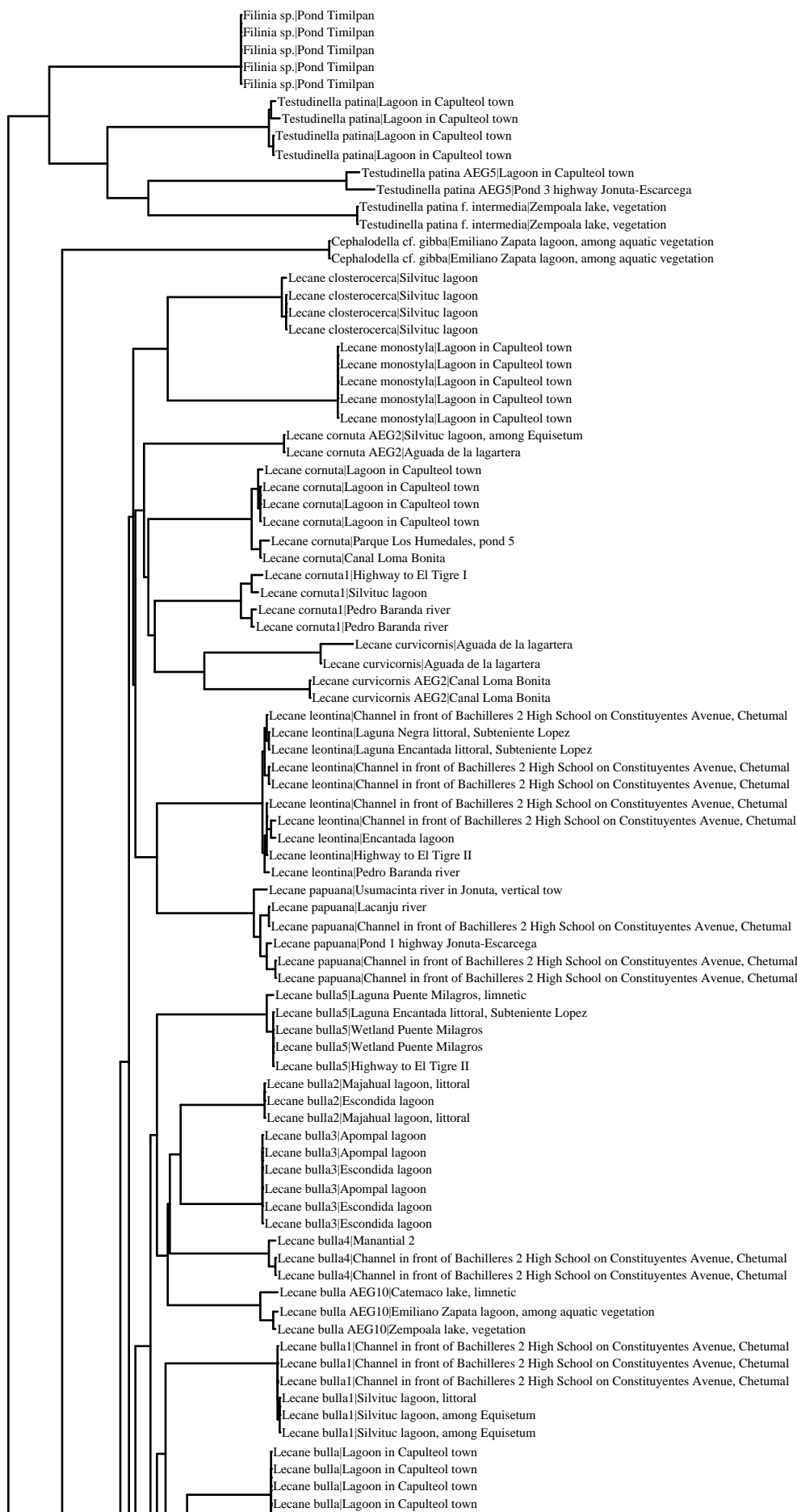
Árbol de identificación de rotíferos

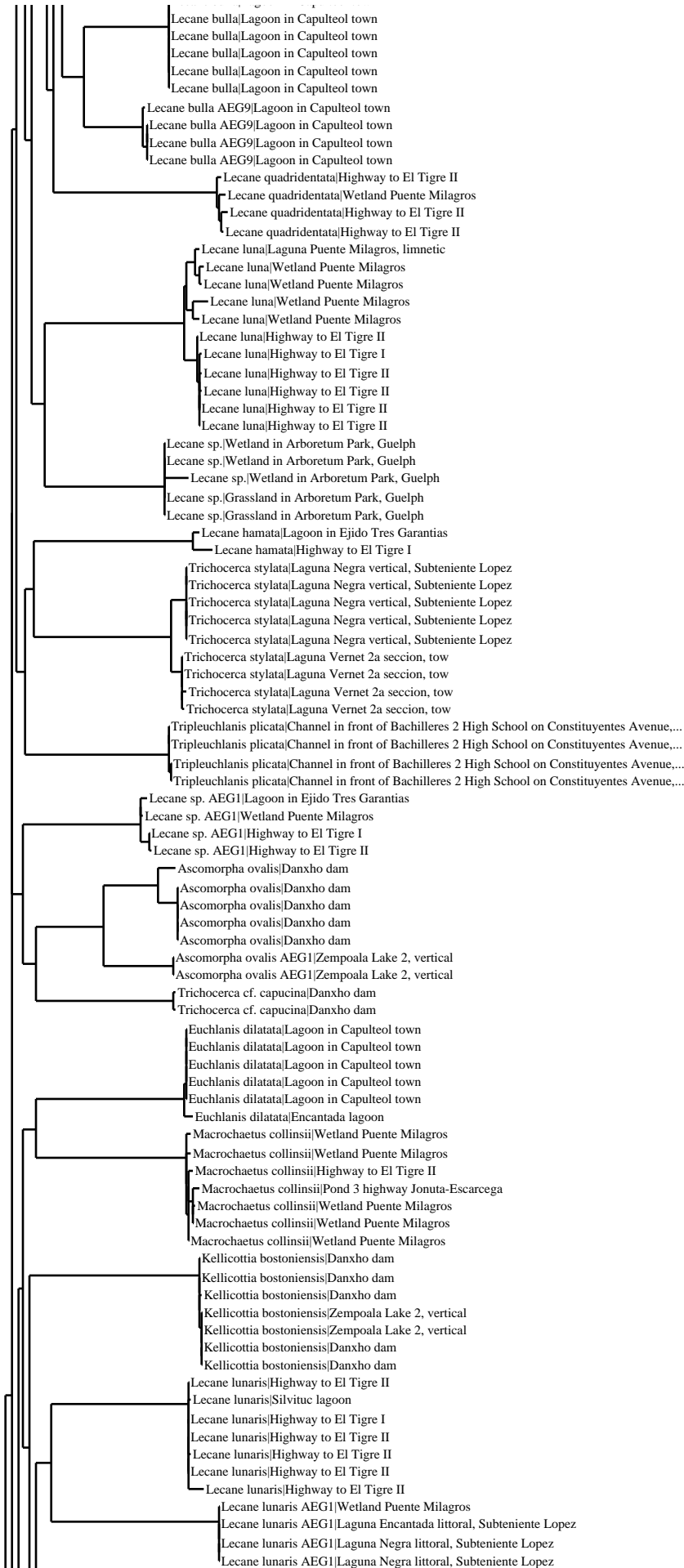
BOLD TaxonID Tree

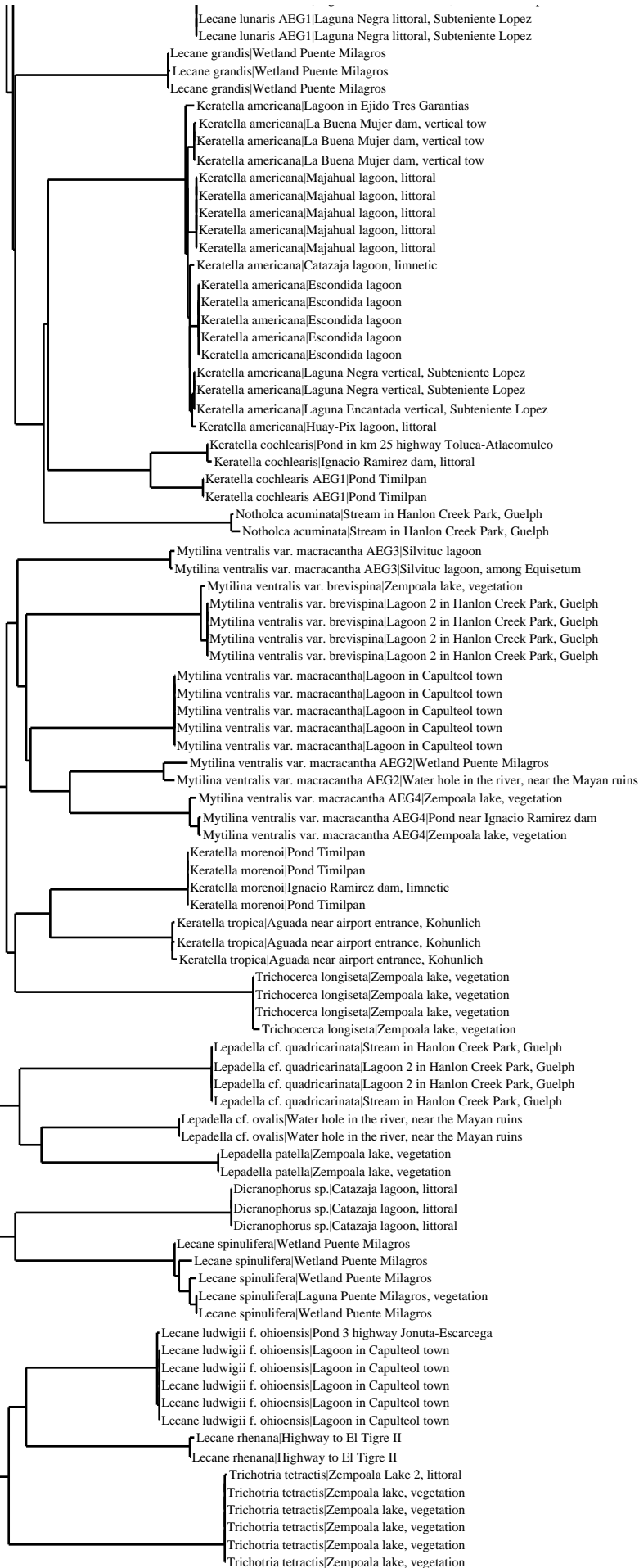
Title : Freshwater Rotifera of North America [AGROT]
Date : 6-August-2013
Data Type : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Marker : COI-5P
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels : Site
Filters : Length > 200

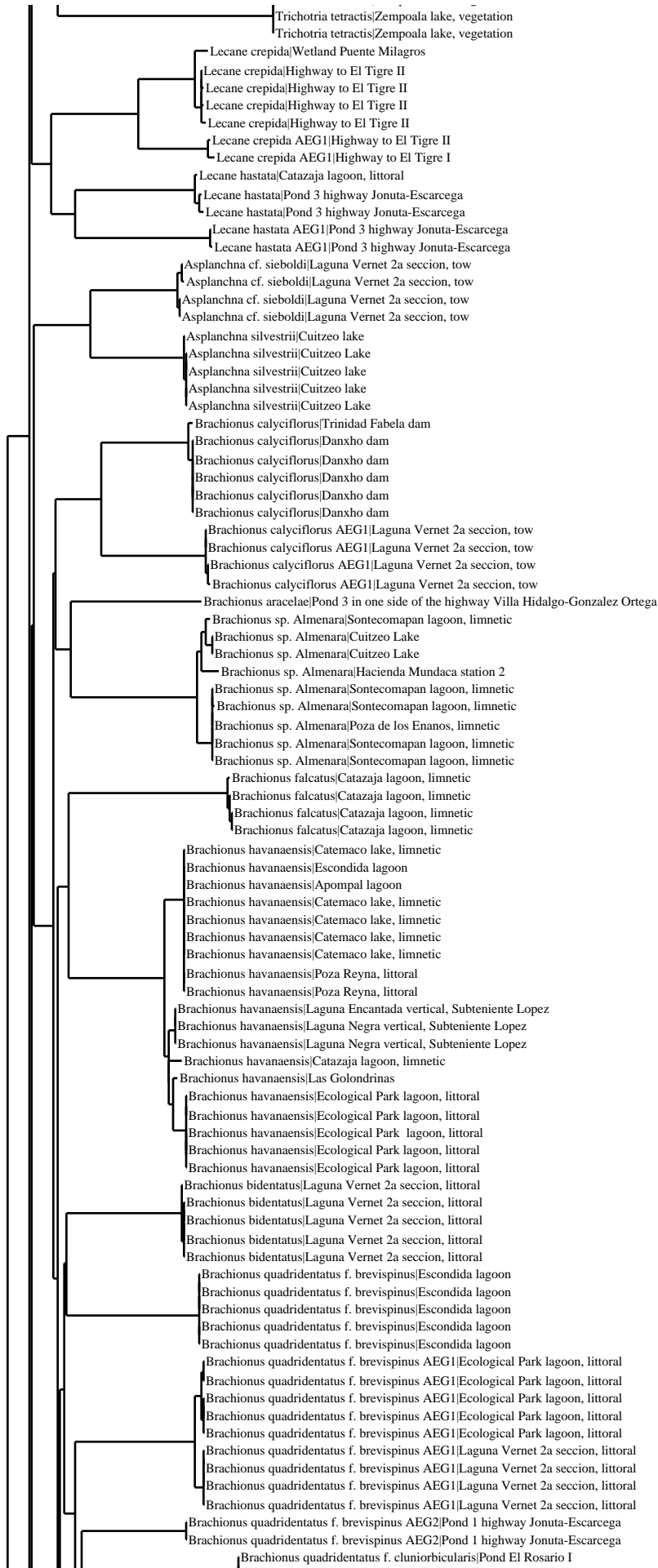
Sequence Count : 429
Species count : 89
Genus count : 22
Family count : 13
Unidentified : 0

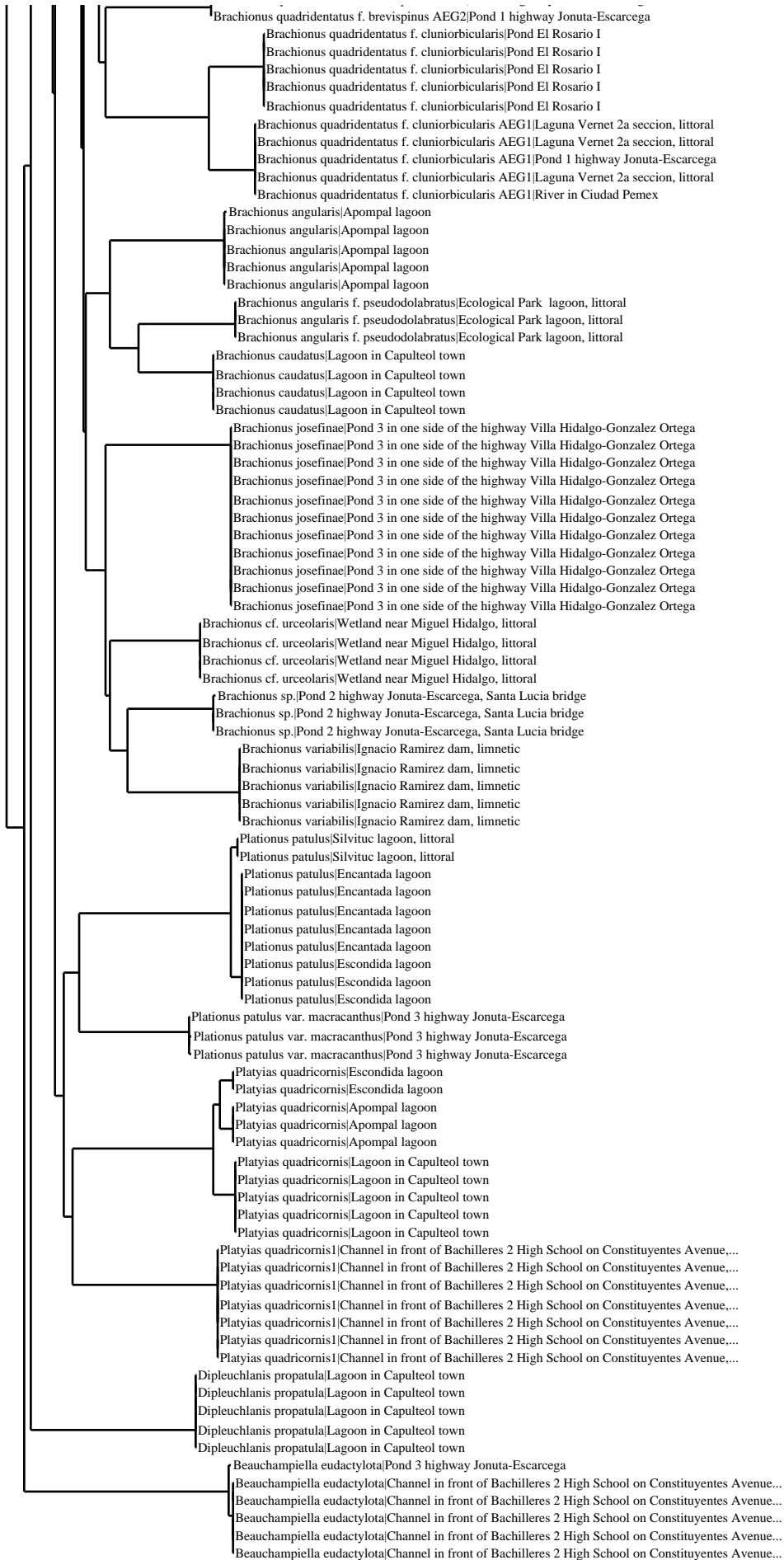
10 %











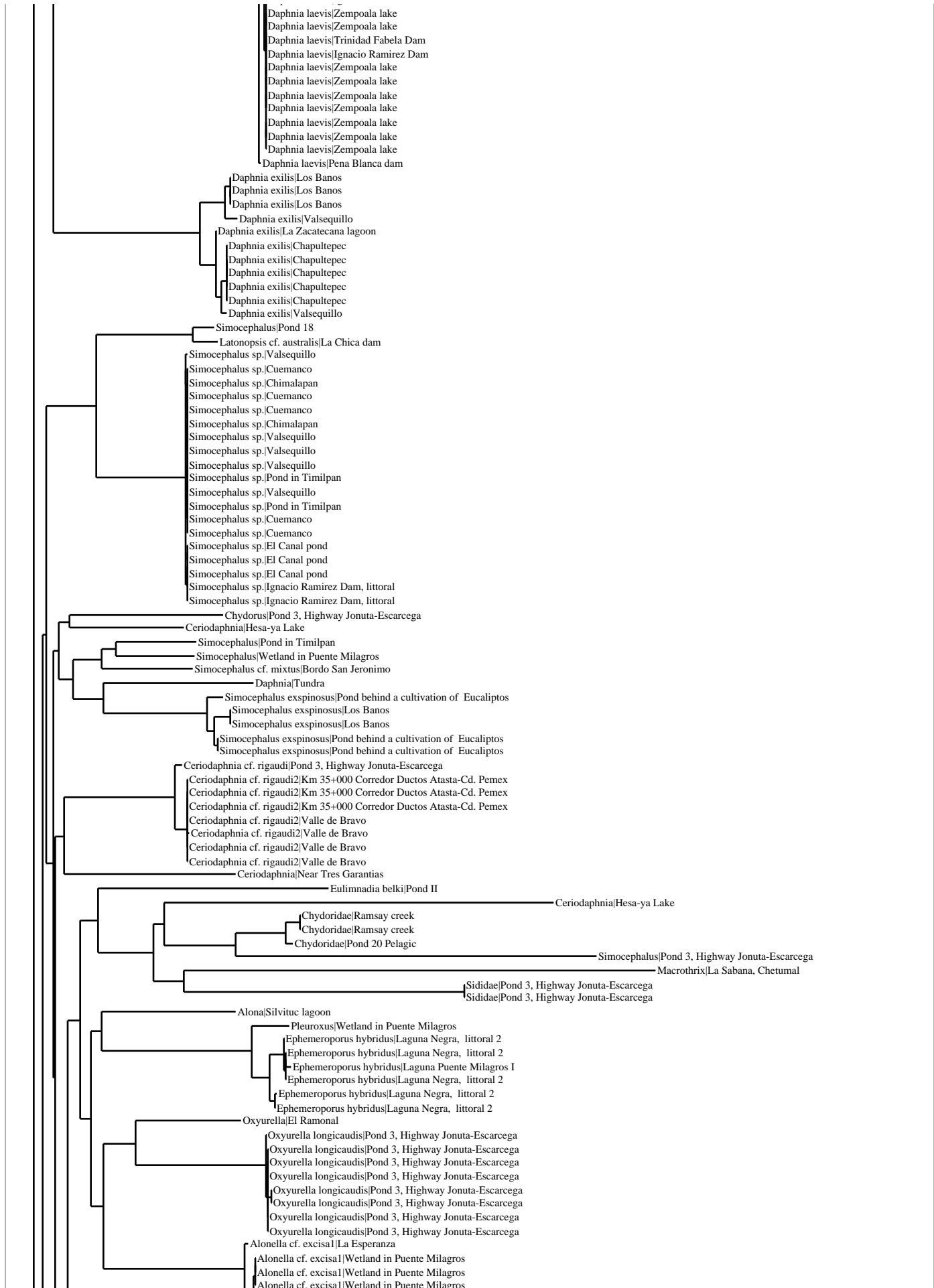
ANEXO VI

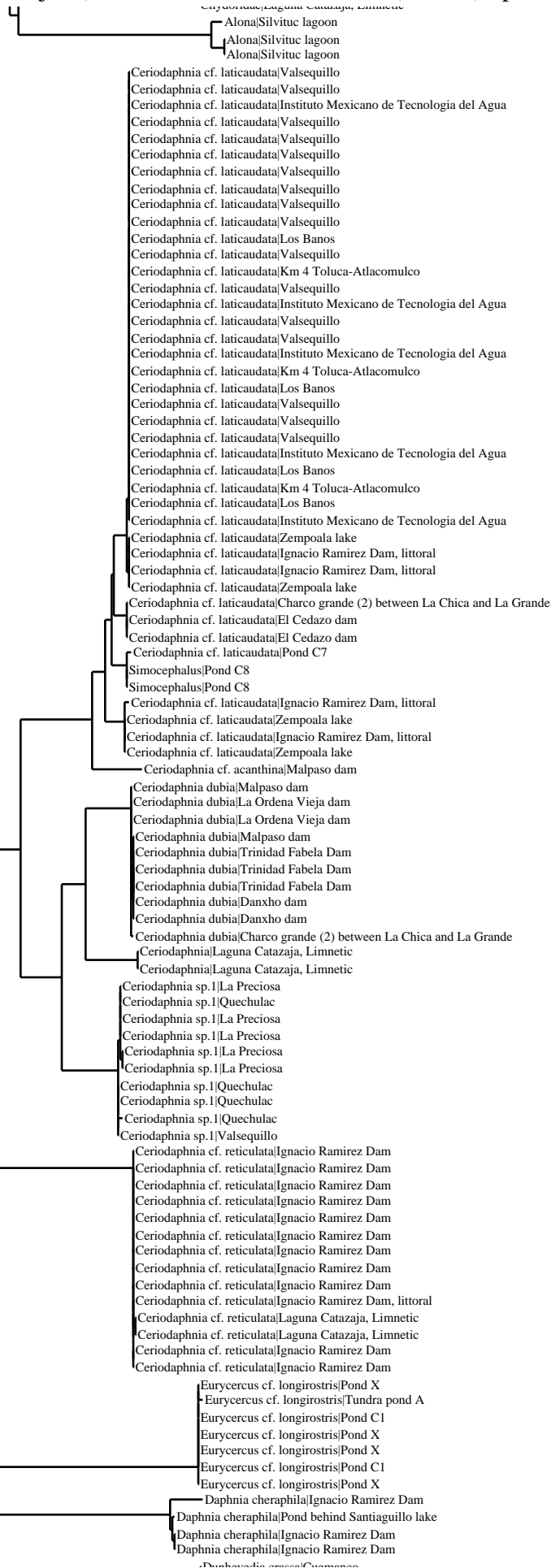
Árbol de identificación de cladóceros

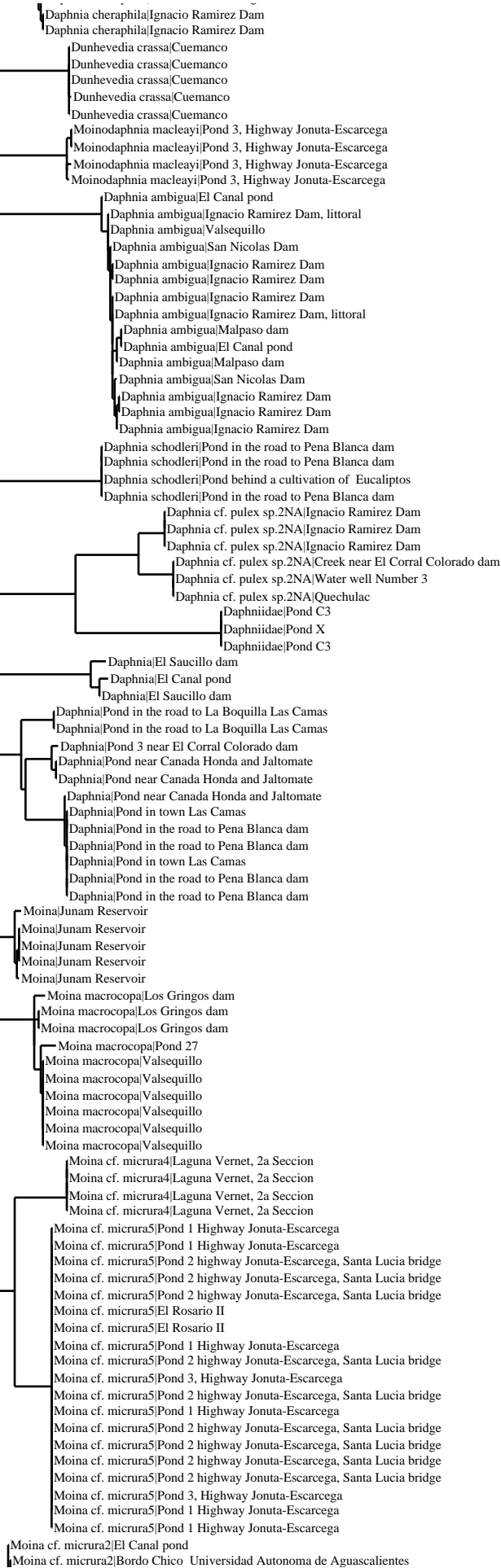
BOLD TaxonID Tree

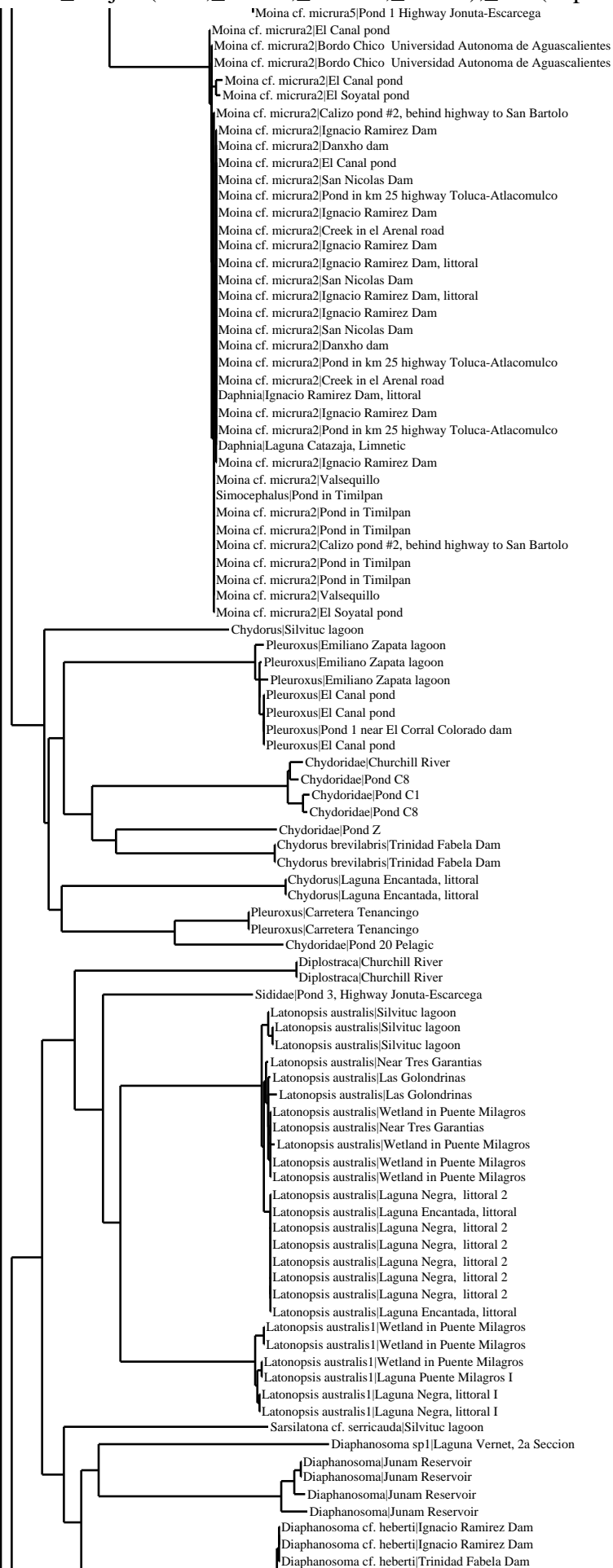
Title : SEARCH: Project(ZPII; ZMIII; ZPLIV; ZPLV), Tax(Diplostraca),...
Date : 6-August-2013
Data Type : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Marker : COI-5P
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels : Site
Filters : Length > 200

Sequence Count : 638
Species count : 55
Genus count : 26
Family count : 9
Unidentified : 128









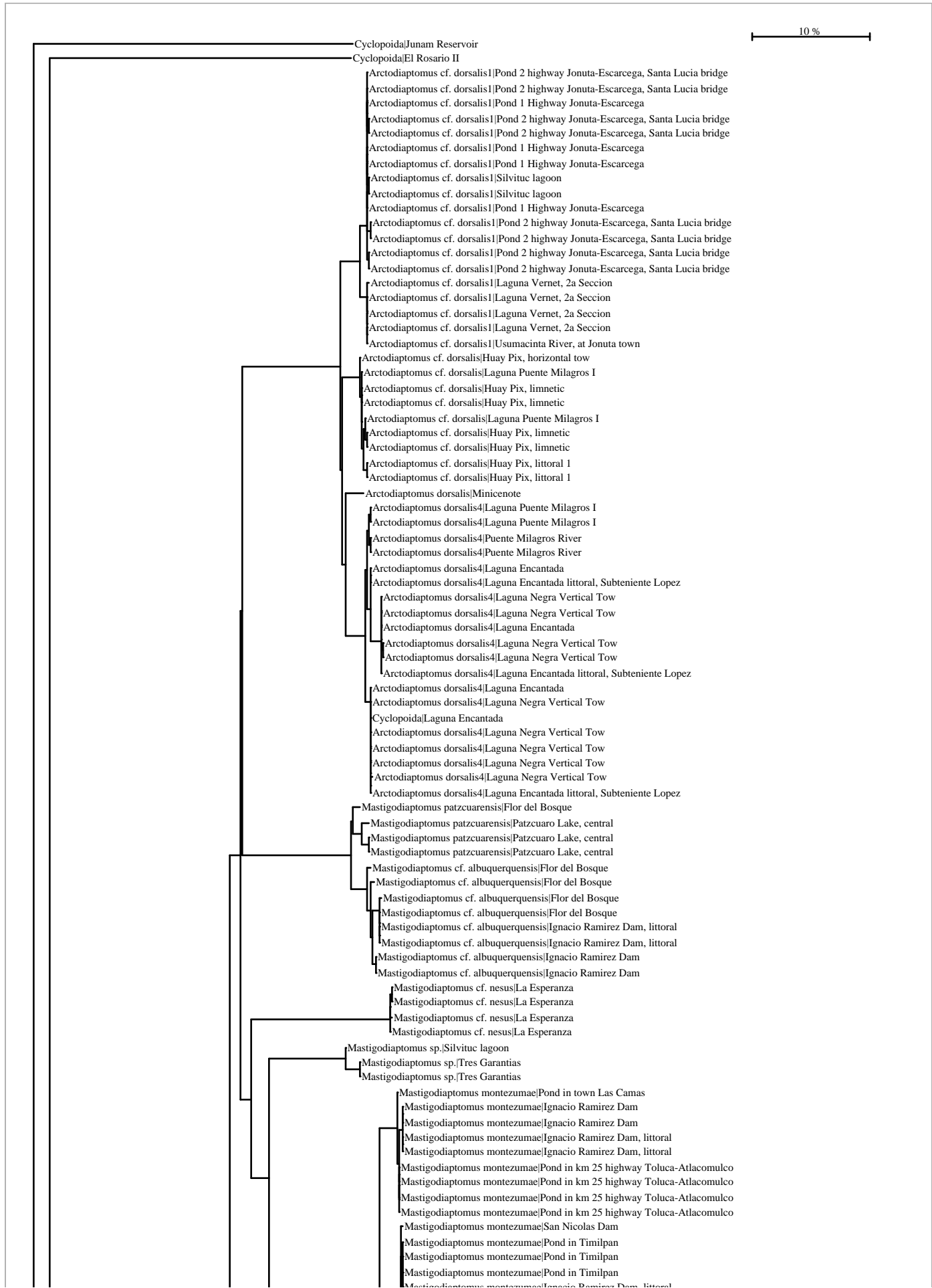
ANEXO VII

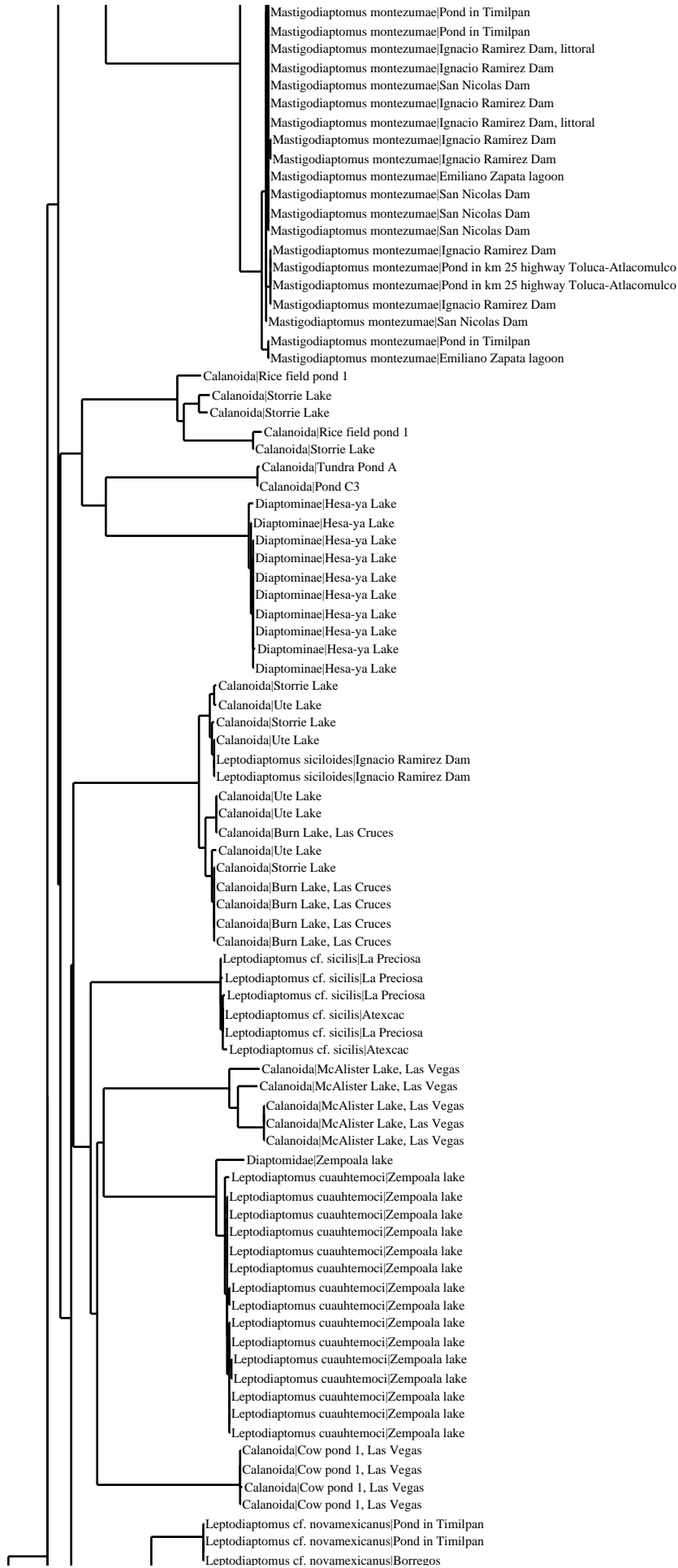
Árbol de identificación de copéodos

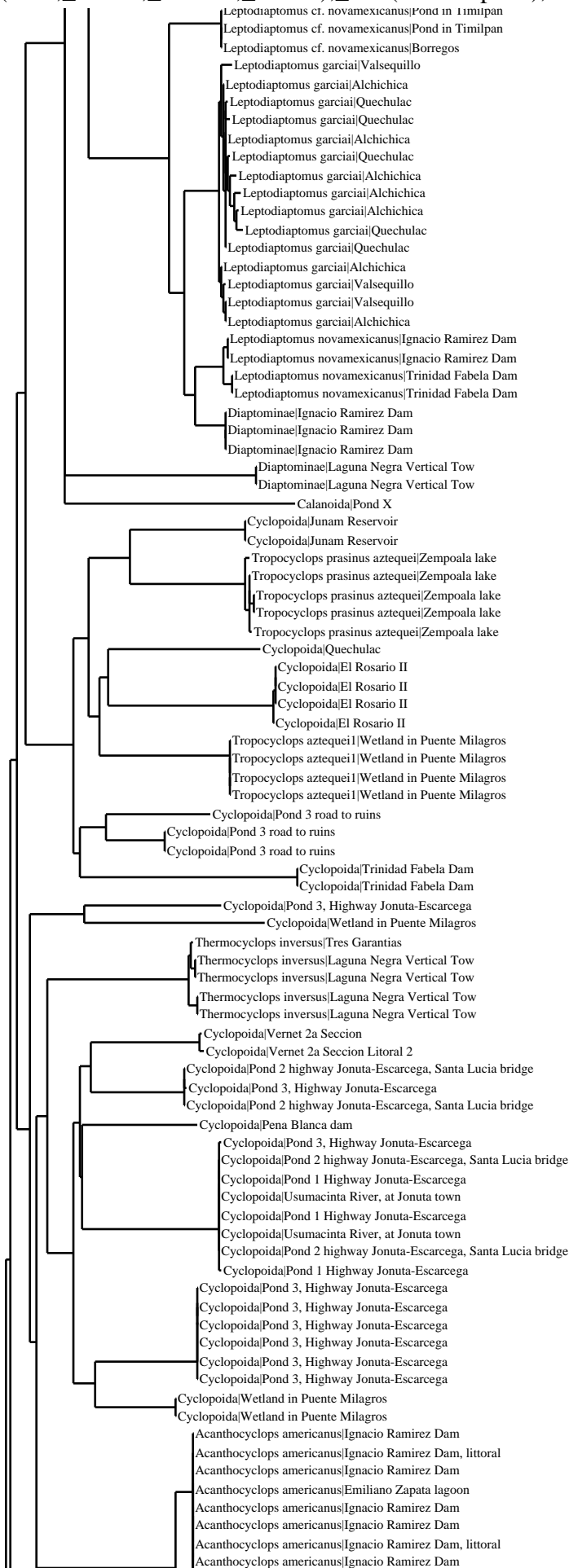
BOLD TaxonID Tree

Title : SEARCH: Project(ZPII; ZMIII; ZPLIV; ZPLV), Tax(Maxillopoda),...
Date : 6-August-2013
Data Type : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Marker : COI-5P
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels : Site
Filters : Length > 200

Sequence Count : 332
Species count : 20
Genus count : 7
Family count : 2
Unidentified : 156







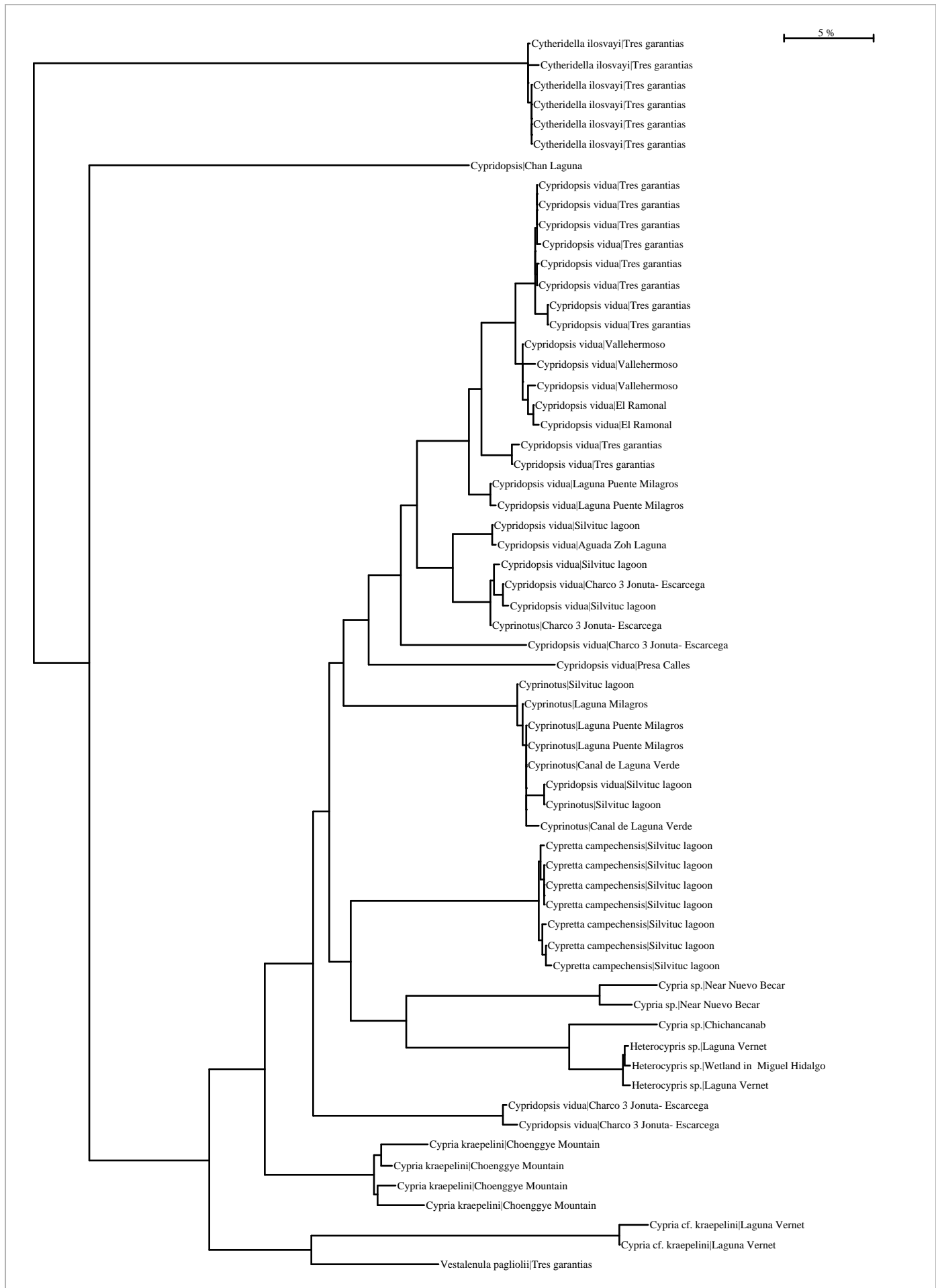
Anexo VIII

Árbol de identificación de ostrácodos

BOLD TaxonID Tree

Title : OSTRACODA I [OSSI]
Date : 6-August-2013
Data Type : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Marker : COI-5P
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels : Site
Filters : Length > 200

Sequence Count : 62
Species count : 8
Genus count : 7
Family count : 4
Unidentified : 9



ANEXO IX

Árbol de identificación de peces

BOLD TaxonID Tree

Title : SEARCH: Project(MXLF; LIOMX; MFL; MFLII; MLIII; MFII; MFIII;...)
Date : 7-August-2013
Data Type : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Marker : COI-5P
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels : Site
Filters : Length > 200

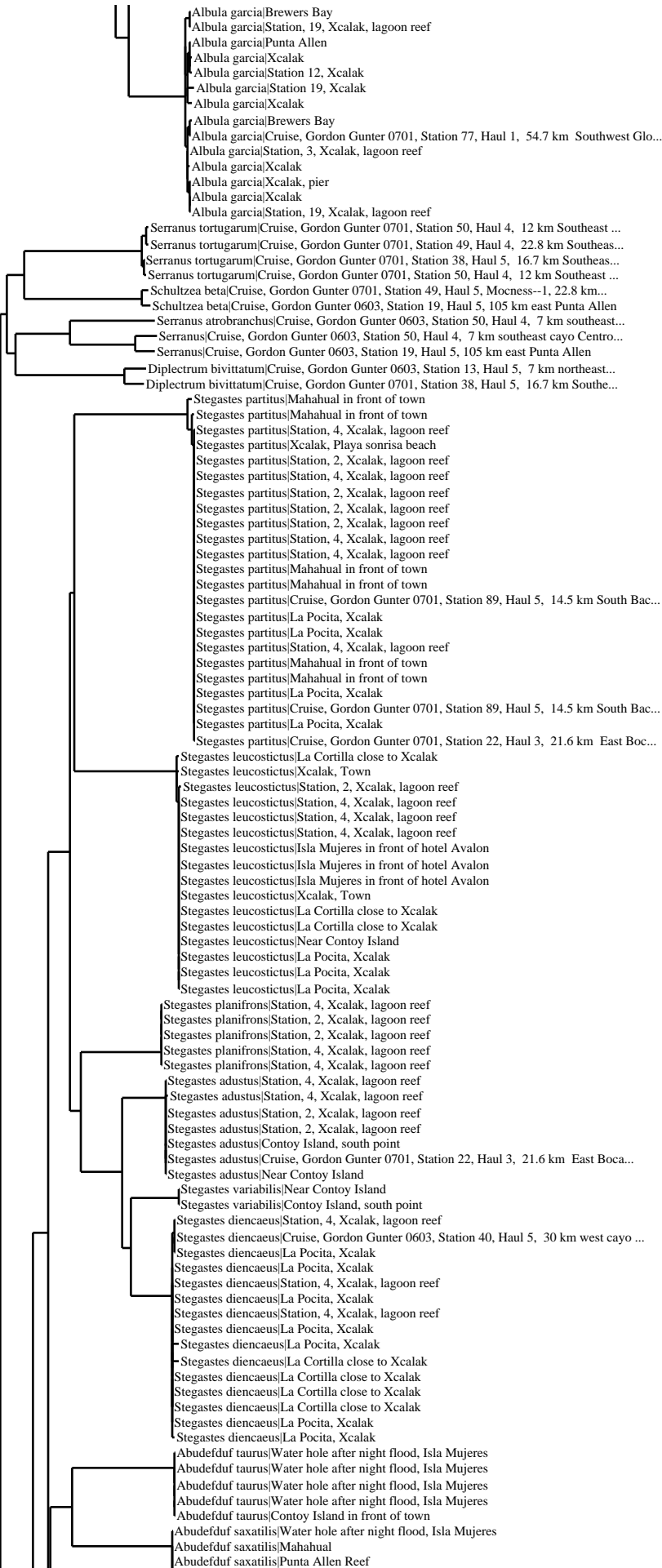
Sequence Count : 3634
Species count : 474
Genus count : 295
Family count : 128
Unidentified : 214

10 %

- Hypoplectrus ecosur|Near Contoy Island
- Hypoplectrus ecosur|Near Contoy Island
- Hypoplectrus ecosur|Near Contoy Island
- Albula vulpes|Punta Gruesa
- Albula vulpes|Punta Herrero
- Albula vulpes|Zaragoza channel
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Lighthouse reef
- Albula vulpes|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest Glo...
- Albula vulpes|Station Mangle, Banco Chinchorro Central Key
- Albula vulpes|Isla Mujeres
- Albula vulpes|Zaragoza channel
- Albula vulpes|Isla Mujeres
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Chinchorro bank
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Chinchorro bank
- Albula vulpes|Station Mangle, Banco Chinchorro Central Key
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Cabana
- Albula vulpes|Chetumal Bay
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
- Albula vulpes|Chetumal Bay
- Albula vulpes|Lagoon behind town
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Punta Gruesa
- Albula vulpes|Lighthouse reef
- Albula vulpes|Zaragoza channel
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
- Albula vulpes|Lagoon behind town
- Albula vulpes|Cabana
- Albula vulpes|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
- Albula vulpes|Chetumal Bay
- Albula vulpes|Station 4, St. Thomas
- Albula vulpes|Bacalar Chico
- Albula vulpes|Lighthouse reef
- Albula vulpes|Isla Mujeres
- Albula vulpes|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest Glo...
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Cabana
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Lighthouse reef
- Albula vulpes|Zaragoza channel
- Albula vulpes|Tamalcab
- Albula vulpes|Brewers Bay
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Chinchorro bank
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Chetumal Bay
- Albula vulpes|Chetumal Bay
- Albula vulpes|Zaragoza channel
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Ophisternon sp.|Laguna Encantada
- Albula vulpes|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
- Albula vulpes|Punta Gruesa
- Albula vulpes|Cabana
- Albula vulpes|Zaragoza channel
- Albula vulpes|Isla Mujeres
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Chinchorro bank
- Albula vulpes|Lagoon behind town
- Albula vulpes|Punta Herrero
- Albula vulpes|Station Mangle, Banco Chinchorro Central Key
- Albula vulpes|Brewers Bay
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Isla Mujeres
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Station 1, St. Thomas
- Albula vulpes|Lagoon behind town
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Lighthouse reef
- Albula vulpes|Zaragoza channel
- Albula vulpes|Lighthouse reef
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Chetumal Bay
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Lagoon behind town
- Albula vulpes|Lighthouse reef
- Albula vulpes|Punta Herrero
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Xcalak
- Albula vulpes|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
- Albula vulpes|Chetumal Bay
- Albula vulpes|Tamalcab

Albulu vulpes|Station 2, Xcalak, lagoon reef
 Albulu vulpes|Chetumal Bay
 Albulu vulpes|Tamalcab
 Albulu vulpes|Station, 11, Xcalak, lagoon reef
 Albulu vulpes|Lagoon behind town
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Chinchorro bank
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Punta Gruesa
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Tamalcab
 Albulu vulpes|Punta Gruesa
 Albulu vulpes|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Close to Roads Town
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Cabana
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Punta Gruesa
 Albulu vulpes|Bacalar Chico
 Albulu vulpes|Xcalak
 Albulu vulpes|Lighthouse reef
 Albulu vulpes|Lagoon behind town
 Albulu vulpes|Tamalcab
 Albulu vulpes|Lagoon behind town
 Albulu sp. 1MFL|Station, 11, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station, 14, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Station 12, Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest G...
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station, 10, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest G...
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest G...
 Albulu sp. 1MFL|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 10, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albulu sp. 1MFL|Station, 14, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station 19, Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 11, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Zaragoza channel
 Albulu sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albulu sp. 1MFL|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station, 14, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albulu sp. 1MFL|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
 Albulu sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albulu sp. 1MFL|Punta Allen
 Albulu sp. 1MFL|Station 19, Xcalak, lagoon reef

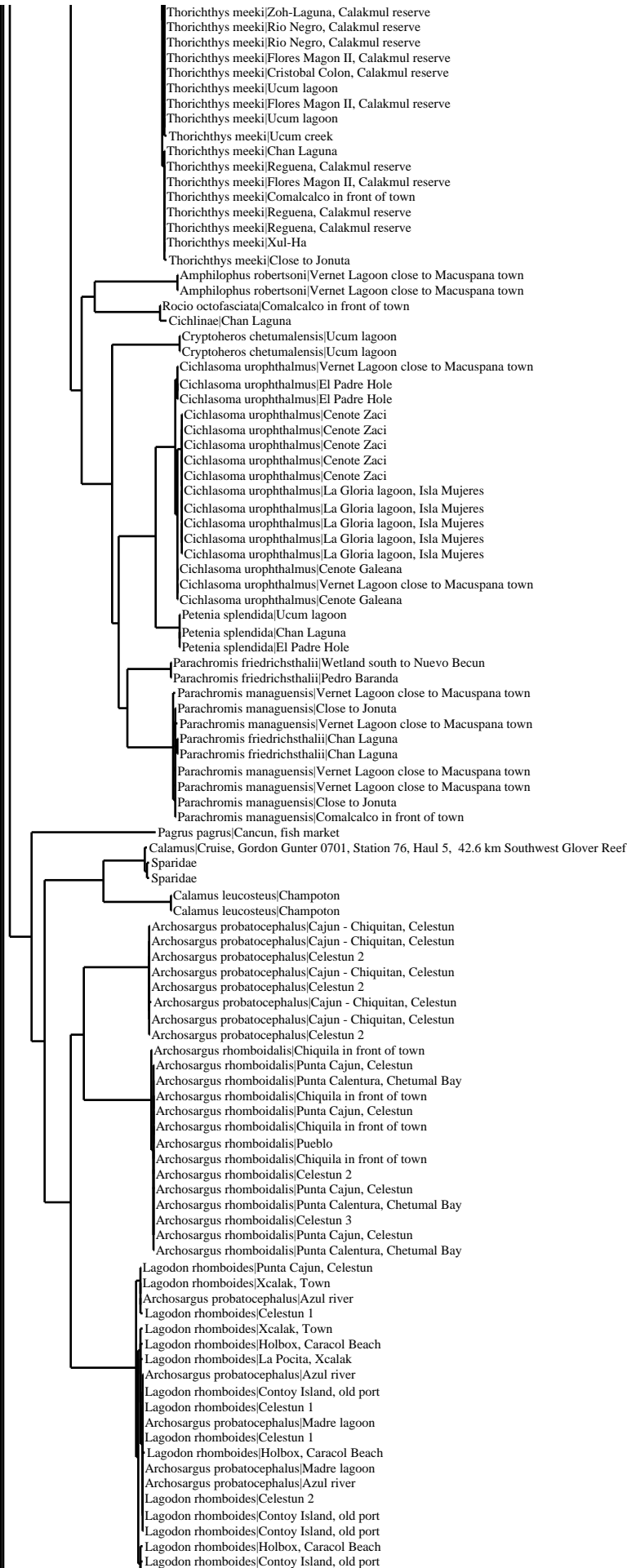
Albula sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Station, 14, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Station, 10, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Station 19, Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Station 12, Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Station, 3, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Station 19, Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Station, 11, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Station, 11, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Station, 14, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Station, 10, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Reef lagoon Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Station 14, Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Station 19, Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Xcalak
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 1, 54.7 km Southwest G...
 Albula sp. 1MFL|Punta Allen
 Albula sp. 1MFL|Station, 10, Xcalak, lagoon reef
 Albula esuncula|Close to Acapulco
 Albula esuncula|Close to Acapulco
 Albula esuncula|San Dionisio del Mar
 Albula esuncula|San Carlos
 Albula garcia|Brewers Bay
 Albula garcia|Station, 19, Xcalak, lagoon reef
 Albula garcia|Punta Allen

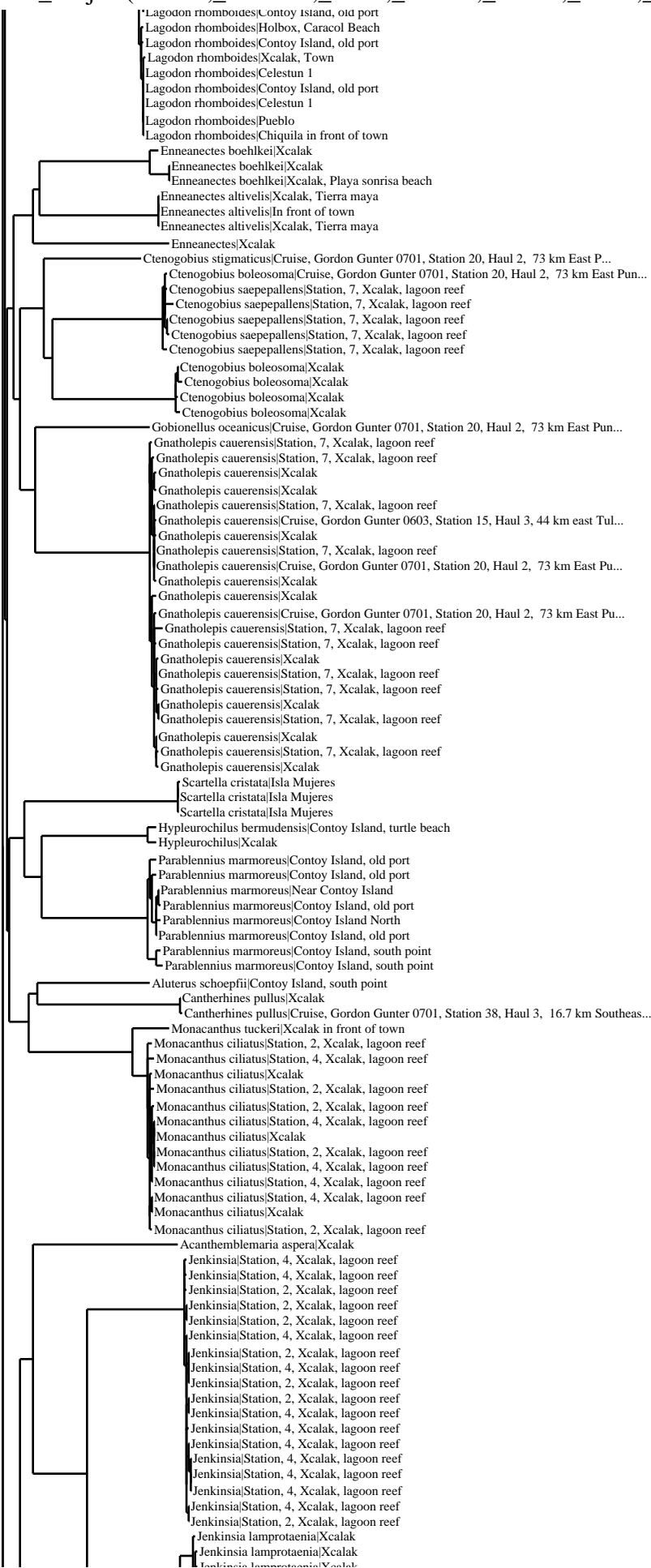


Abudedefduf saxatilis|water note after night flood, Isla Mujeres
 Abudedefduf saxatilis|Mahahual
 Abudedefduf saxatilis|Punta Allen Reef
 Abudedefduf saxatilis|Mahahual
 Abudedefduf saxatilis|Punta Allen Reef
 Abudedefduf saxatilis|Punta Allen Reef
 Abudedefduf saxatilis|Mahahual
 Abudedefduf saxatilis|Punta Palancar
 Abudedefduf saxatilis|Mahahual
 Abudedefduf saxatilis|Mahahual
 Chromis multilineata|Punta Allen
 Microspathodon chrysurus|La Cortilla close to Xcalak
 Microspathodon chrysurus|Xcalak, Town
 Microspathodon chrysurus|Xcalak, Town
 Microspathodon chrysurus|Xcalak, Town
 Chromis cyanea|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 85, Haul 5, South Belize
 Chromis cyanea|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Isla Mujeres in front of Avalon hotel
 Atherinomorus stipes|Rosada lagoon, Telchac
 Atherinomorus stipes|Isla Mujeres in front of Avalon hotel
 Atherinomorus stipes|Rosada lagoon, Telchac
 Atherinomorus stipes|Isla Mujeres in front of Avalon hotel
 Atherinomorus stipes|Rosada lagoon, Telchac
 Atherinomorus stipes|Chinchorro bank
 Atherinomorus stipes|Chinchorro bank
 Atherinomorus stipes|Chinchorro bank
 Atherinomorus stipes|Xcalak, Town
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Xcalak, Town
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Contoy Island, south point
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Xcalak, Town
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Xcalak, Town
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Atherinomorus stipes|Contoy Island, south point
 Atherinomorus stipes|Xcalak
 Hyporhamphus unifasciatus|Holbox, close to the Pasion beach
 Oligoplites saurus|Pueblo
 Centropomus undecimalis|Candelaria river
 Hyporhamphus unifasciatus|Candelaria river
 Centropomus undecimalis|Candelaria river
 Hyporhamphus unifasciatus|Candelaria river
 Cichlinae|Salto Grande
 Hirundichthys|In front of Puerto Morelos
 Hirundichthys|In front of Puerto Morelos
 Perciformes|Cruise Gordon Gunter 0701, Station 39, 18.8 Km East of cayo Centro, Chincho...
 Hemiramphus balao|In front to the beach
 Hemiramphus balao|In front to the beach
 Hemiramphus balao|In front to the beach
 Hemiramphus balao|In front to the beach
 Hemiramphus balao|Contoy Island North
 Hemiramphus balao|Contoy Island North
 Atherinella|Pedro Baranda
 Atherinella|Coatzacoalcos River
 Poblana|Close to Morelia City
 Poblana|Close to Morelia City
 Poblana|Close to Morelia City
 Poblana|Close to Morelia City
 Poblana|Close to Morelia City
 Poblana|Close to Morelia City
 Poblana|Close to Morelia City
 Menidia beryllina|Azul river
 Menidia beryllina|Azul river
 Menidia beryllina|Azul river
 Menidia beryllina|Madre lagoon
 Menidia beryllina|Azul river
 Menidia beryllina|Azul river
 Menidia|Rosada lagoon, Telchac
 Menidia|Rosada lagoon, Telchac
 Menidia|Rosada lagoon, Telchac
 Menidia|Rosada lagoon, Telchac
 Menidia beryllina|Bravo river
 Menidia beryllina|Bravo river
 Menidia beryllina|Sugar Lake, Comales.
 Menidia beryllina|Sugar Lake, Comales.
 Menidia beryllina|Sugar Lake, Comales.
 Menidia beryllina|Bravo river
 Menidia beryllina|Bravo river
 Menidia beryllina|Bravo river
 Menidia beryllina|Bravo river
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Ignacio, Linares
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Ignacio, Linares
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Ignacio, Linares
 Cyprinodon variegatus variegatus|Acequia in Rio Salado de Los Nadadores, near Estacion Hermanas
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Ignacio, Linares
 Cyprinodon variegatus variegatus|Acequia in Rio Salado de Los Nadadores, near Estacion Hermanas
 Cyprinodon variegatus variegatus|Bravo river
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Ignacio, Linares
 Cyprinodon variegatus variegatus|Acequia in Rio Salado de Los Nadadores, near Estacion Hermanas
 Cyprinodon variegatus variegatus|Acequia in Rio Salado de Los Nadadores, near Estacion Hermanas
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Juan river
 Cyprinodon variegatus variegatus|Acequia in Rio Salado de Los Nadadores, near Estacion Hermanas
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Juan river
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Juan river
 Cyprinodon variegatus variegatus|San Juan river

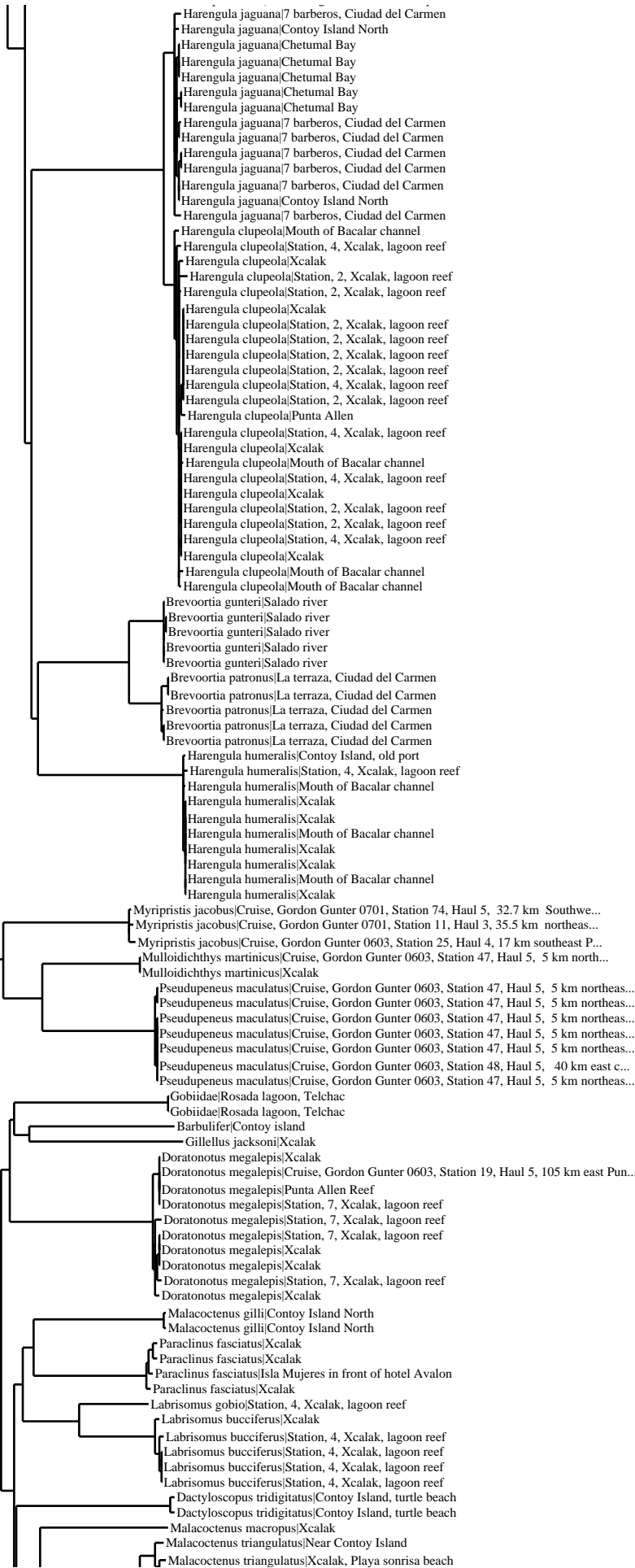


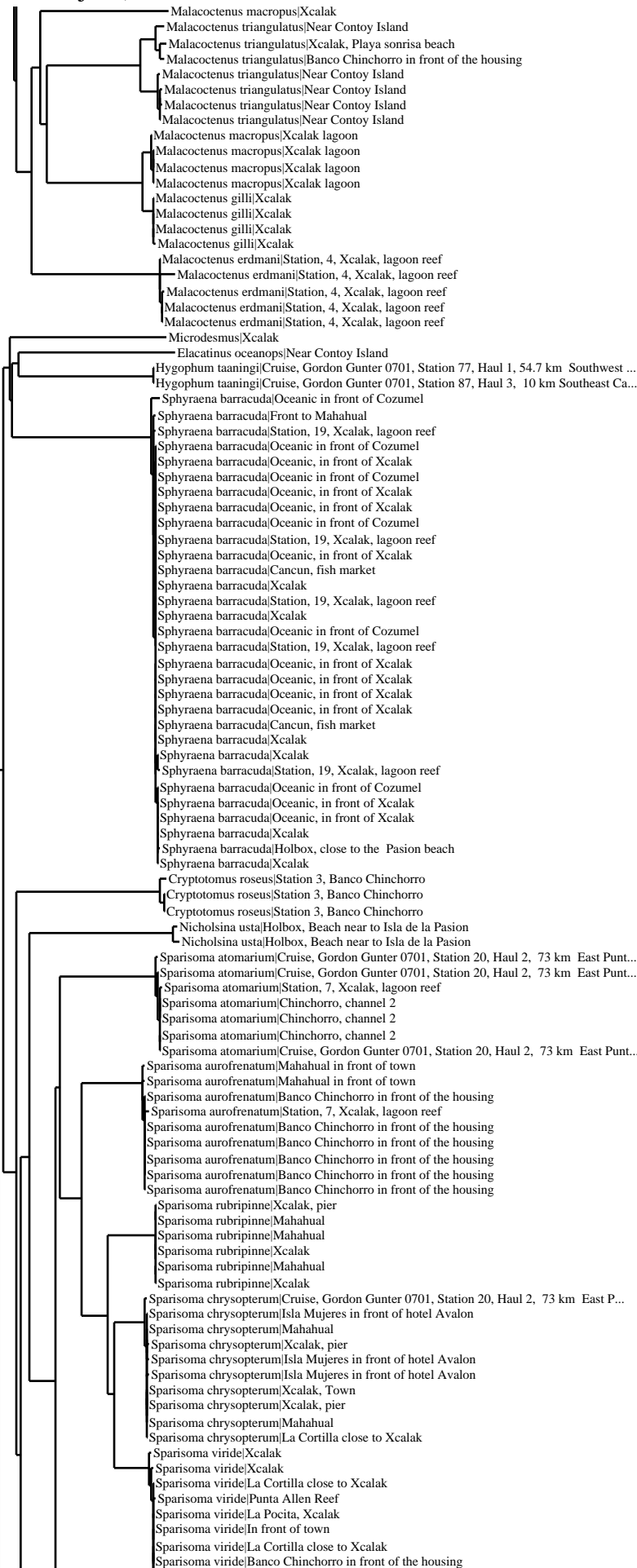
Herichthys minckleyi|El Venado river
 Herichthys cyanoguttatus|El Encadenado river
 Herichthys minckleyi|El Venado river
 Herichthys minckleyi|El Venado river
 Herichthys cyanoguttatus|El Encadenado river
 Herichthys minckleyi|El Venado river
 Herichthys cyanoguttatus|El Encadenado river
 Herichthys cyanoguttatus|El Encadenado river
 Herichthys minckleyi|Los Mezquites river
 Herichthys cyanoguttatus|San Juan river
 Paraneetroplus fenestratus|Coatzacoalcos River
 Paraneetroplus fenestratus|Coatzacoalcos River
 Paraneetroplus fenestratus|Coatzacoalcos River, Minatitlan
 Cichlinae|Salto Grande
 Paraneetroplus fenestratus|Usumacinta river close to a bridge
 Paraneetroplus fenestratus|Usumacinta river close to a bridge
 Paraneetroplus fenestratus|Usumacinta river close to a bridge
 Paraneetroplus fenestratus|Usumacinta river close to a bridge
 Paraneetroplus fenestratus|Usumacinta river close to a bridge
 Paraneetroplus fenestratus|Usumacinta river close to a bridge
 Cichlinae|Candelaria river
 Paraneetroplus fenestratus|Usumacinta river close to a bridge
 Cichlinae|Candelaria
 Cichlinae|Candelaria river
 Cichlinae|Salto Grande
 Cichlinae|Candelaria
 Cichlinae|Salto Grande
 Paraneetroplus synspilus|Candelaria
 Paraneetroplus synspilus|Silvituc lagoon
 Paraneetroplus synspilus|Silvituc lagoon
 Cichlinae|Salto Grande
 Paraneetroplus synspilus|Silvituc lagoon
 Cichlinae|Chan Laguna
 Paraneetroplus synspilus|Maravillas lagoon
 Paraneetroplus synspilus|Bacalar lagoon
 Paraneetroplus synspilus|Bacalar lagoon
 Paraneetroplus synspilus|Bacalar lagoon
 Paraneetroplus synspilus|Bacalar lagoon
 Paraneetroplus synspilus|Azul-Region 225, Cancun
 Paraneetroplus synspilus|Bacalar lagoon
 Cichlasoma salvini|Chan Laguna
 Cichlasoma salvini|Minicenote
 Cichlasoma salvini|Minicenote
 Cichlasoma salvini|Minicenote
 Cichlasoma salvini|Minicenote
 Thorichthys helleri|Vernet Lagoon close to Macuspana town
 Thorichthys helleri|Candelaria river
 Thorichthys helleri|Candelaria river
 Thorichthys helleri|Vernet Lagoon close to Macuspana town
 Thorichthys helleri|Close to Jonuta
 Thorichthys helleri|Close to Jonuta
 Thorichthys helleri|Close to Jonuta
 Thorichthys pasionis|Close to Jonuta
 Thorichthys pasionis|Chan Laguna
 Thorichthys pasionis|Maravillas lagoon
 Thorichthys pasionis|Chan Laguna
 Thorichthys pasionis|Maravillas lagoon
 Thorichthys pasionis|Close to Jonuta
 Thorichthys pasionis|Close to Jonuta
 Thorichthys pasionis|Close to Jonuta
 Thorichthys meeki|Calakmul lagoon
 Thorichthys meeki|Los Cocos
 Thorichthys meeki|Los Cocos
 Thorichthys meeki|El Padre Hole
 Thorichthys meeki|Xul-Ha
 Thorichthys meeki|Minicenote
 Thorichthys meeki|El Padre Hole
 Thorichthys meeki|Xul-Ha
 Thorichthys meeki|Minicenote
 Thorichthys meeki|Xul-Ha
 Thorichthys meeki|El Padre Hole
 Thorichthys meeki|El Padre Hole
 Thorichthys meeki|El Padre Hole
 Thorichthys meeki|Xul-Ha
 Thorichthys meeki|Minicenote
 Thorichthys meeki|El Padre Hole
 Thorichthys meeki|Minicenote
 Thorichthys meeki|Azul-Region 225, Cancun
 Thorichthys meeki|Azul-Region 225, Cancun
 Thorichthys meeki|Calakmul reserve north
 Thorichthys meeki|Minicenote
 Thorichthys meeki|Calakmul lagoon
 Thorichthys meeki|Maravillas lagoon
 Thorichthys meeki|Zoh-Laguna, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Flores Magon II, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Rio Negro, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Los Cocos
 Thorichthys meeki|Rio Negro, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Cristobal Colon, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Cristobal Colon, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Rio Negro, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Cristobal Colon, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Ucum creek
 Thorichthys meeki|Cristobal Colon, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Zoh-Laguna, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Flores Magon II, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Zoh-Laguna, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Zoh-Laguna, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Zoh-Laguna, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Rio Negro, Calakmul reserve
 Thorichthys meeki|Rio Negro, Calakmul reserve



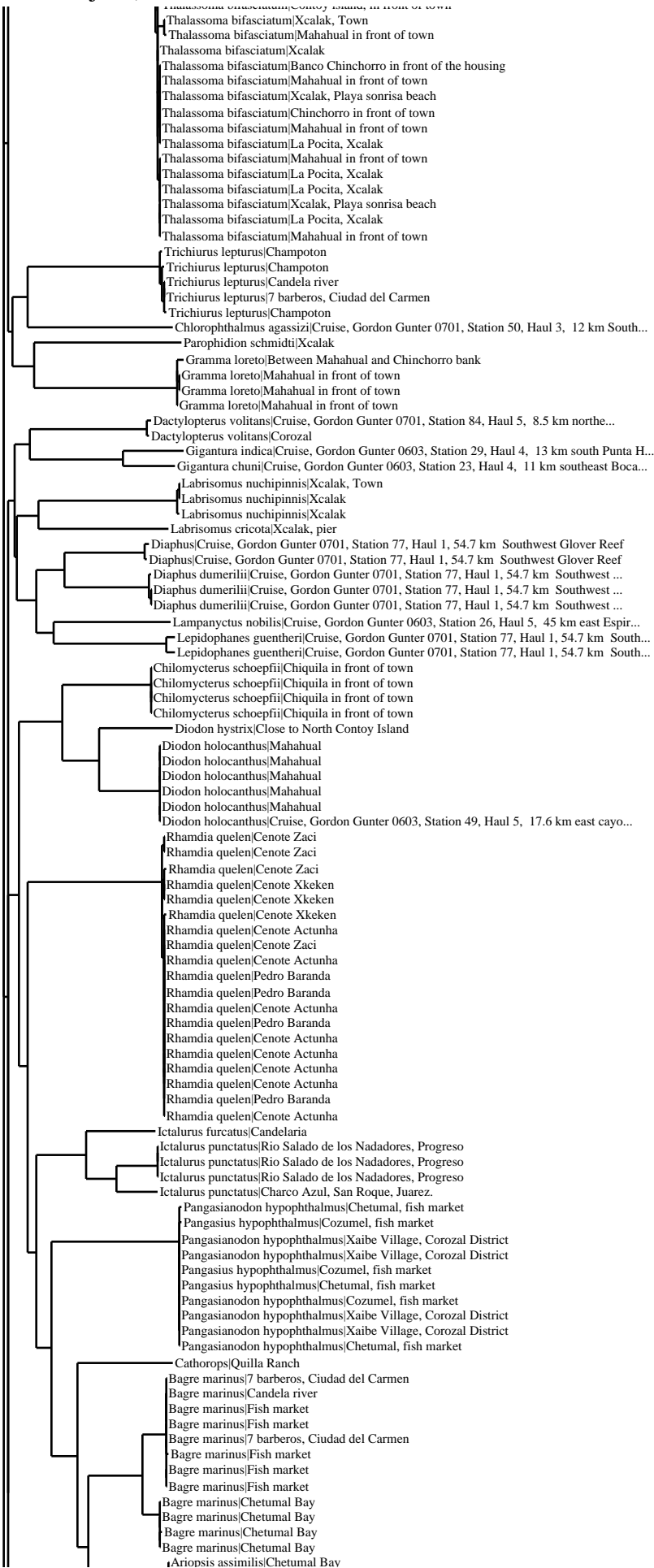


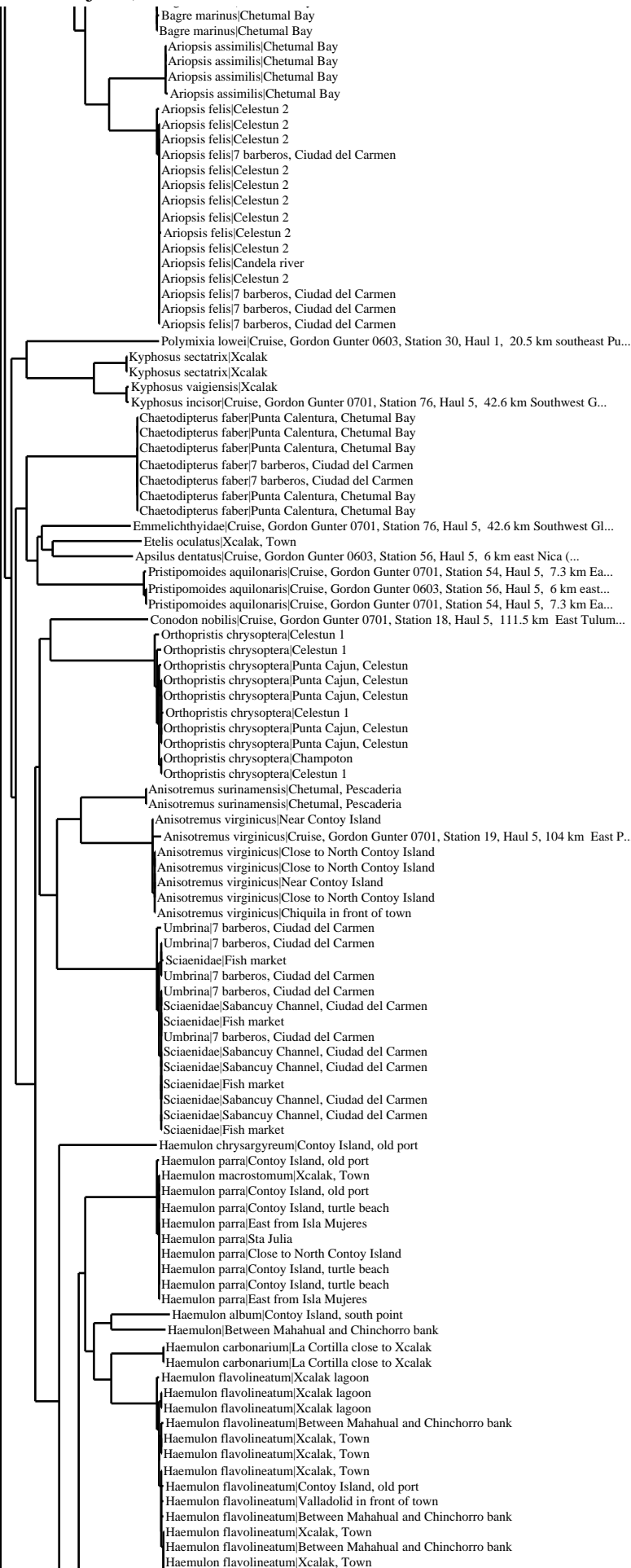




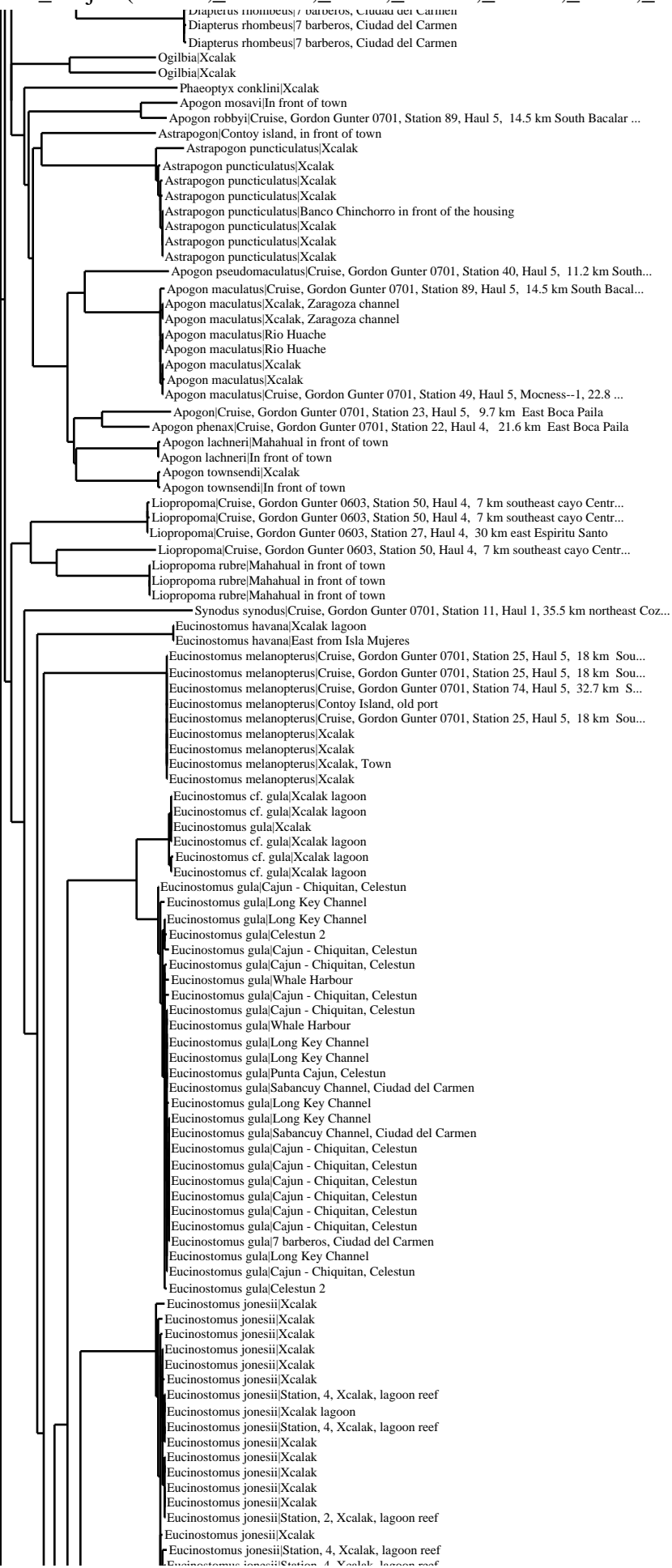


Sparisoma viride|In front of town
Sparisoma viride|La Cortilla close to Xcalak
Sparisoma viride|Banco Chinchorro in front of the housing
Sparisoma viride|Xcalak
Sparisoma viride|Xcalak
Sparisoma viride|La Cortilla close to Xcalak
Sparisoma viride|Banco Chinchorro in front of the housing
Sparisoma viride|Xcalak, Town
Sparisoma radians|Punta Allen
Sparisoma radians|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 20, Haul 2, 73 km East Punta ...
Sparisoma radians|Station, 7, Xcalak, lagoon reef
Sparisoma radians|Station, 7, Xcalak, lagoon reef
Sparisoma radians|Station, 7, Xcalak, lagoon reef
Scarus taeniopterus|Mahahual in front of town
Scarus iseri|Xcalak, Town
Scarus iseri|Banco Chinchorro in front of the housing
Scarus iseri|Xcalak, Town
Scarus iseri|Punta Allen Reef
Scarus iseri|Banco Chinchorro in front of the housing
Scarus iseri|Punta Allen Reef
Scarus iseri|Xcalak
Scarus iseri|Punta Allen Reef
Scarus iseri|Xcalak, Town
Scarus iseri|La Pocita, Xcalak
Scarus iseri|Mahahual in front of town
Scarus iseri|Chinchorro in front of town
Scarus iseri|La Pocita, Xcalak
Scarus iseri|La Pocita, Xcalak
Scarus iseri|Punta Allen Reef
Scarus iseri|Near Contoy Island
Scarus iseri|Xcalak, Town
Scarus iseri|Xcalak, Town
Scarus iseri|Isla Mujeres in front of hotel Avalon
Xyrichtys splendens|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 1, 35.5 km northeast...
Xyrichtys splendens|Chinchorro, channel 2
Xyrichtys splendens|Xcalak
Xyrichtys splendens|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 86, Haul 4, 3.6 km Southeast...
Xyrichtys splendens|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 1, 35.5 km northeast...
Xyrichtys splendens|Contoy Island, south point
Xyrichtys splendens|Contoy Island, south point
Xyrichtys splendens|Contoy Island, south point
Xyrichtys splendens|Chinchorro, channel 2
Xyrichtys splendens|Contoy Island, old port
Xyrichtys splendens|Contoy Island, south point
Xyrichtys splendens|Chinchorro, channel 2
Xyrichtys splendens|Chinchorro, channel 2
Xyrichtys splendens|Contoy Island North
Xyrichtys splendens|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 1, 35.5 km northeast...
Xyrichtys splendens|Chinchorro, channel 2
Xyrichtys novacula|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 1, 35.5 km northeast ...
Xyrichtys novacula|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 86, Haul 4, 3.6 km Southeast ...
Xyrichtys martinicensis|Station 6, Banco Chinchorro
Xyrichtys martinicensis|Station 6, Banco Chinchorro
Xyrichtys martinicensis|Station 6, Banco Chinchorro
Xyrichtys martinicensis|Station 6, Banco Chinchorro
Xyrichtys martinicensis|Station 6, Banco Chinchorro
Halichoeres maculipinna|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 5, 54.7 km Sou...
Halichoeres garnoti|Xcalak, Town
Halichoeres cyanocephalus|Cruise, Gordon Gunter 0603, Station 16, Haul 5, 56 km east...
Halichoeres bivittatus|La Pocita, Xcalak
Halichoeres bivittatus|Xcalak
Halichoeres bivittatus|Contoy Island, south point
Halichoeres bivittatus|La Pocita, Xcalak
Halichoeres bivittatus|Xcalak
Halichoeres bivittatus|La Pocita, Xcalak
Halichoeres bivittatus|Xcalak
Halichoeres bivittatus|La Pocita, Xcalak
Halichoeres bivittatus|La Pocita, Xcalak
Halichoeres bivittatus|Xcalak
Halichoeres bivittatus|Xcalak
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|In front of town
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Xcalak, Playa sonrisa beach
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Mahahual in front of town
Halichoeres garnoti|Xcalak, Playa sonrisa beach
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Xcalak, Tierra maya
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Mahahual in front of town
Halichoeres garnoti|Mahahual in front of town
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Halichoeres garnoti|Chankana'ab
Halichoeres garnoti|Banco Chinchorro in front of the housing
Synagrops|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 80, Haul 2, Mocness-1, 21 km Southea...
Synagrops|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 80, Haul 2, Mocness-1, 21 km Southea...
Aulostomus maculatus|Xcalak
Thalassoma bifasciatum|Banco Chinchorro in front of the housing
Thalassoma bifasciatum|La Pocita, Xcalak
Thalassoma bifasciatum|Contoy island, in front of town
Thalassoma bifasciatum|Xcalak, Town
Thalassoma bifasciatum|Mahahual in front of town
Thalassoma bifasciatum|Xcalak



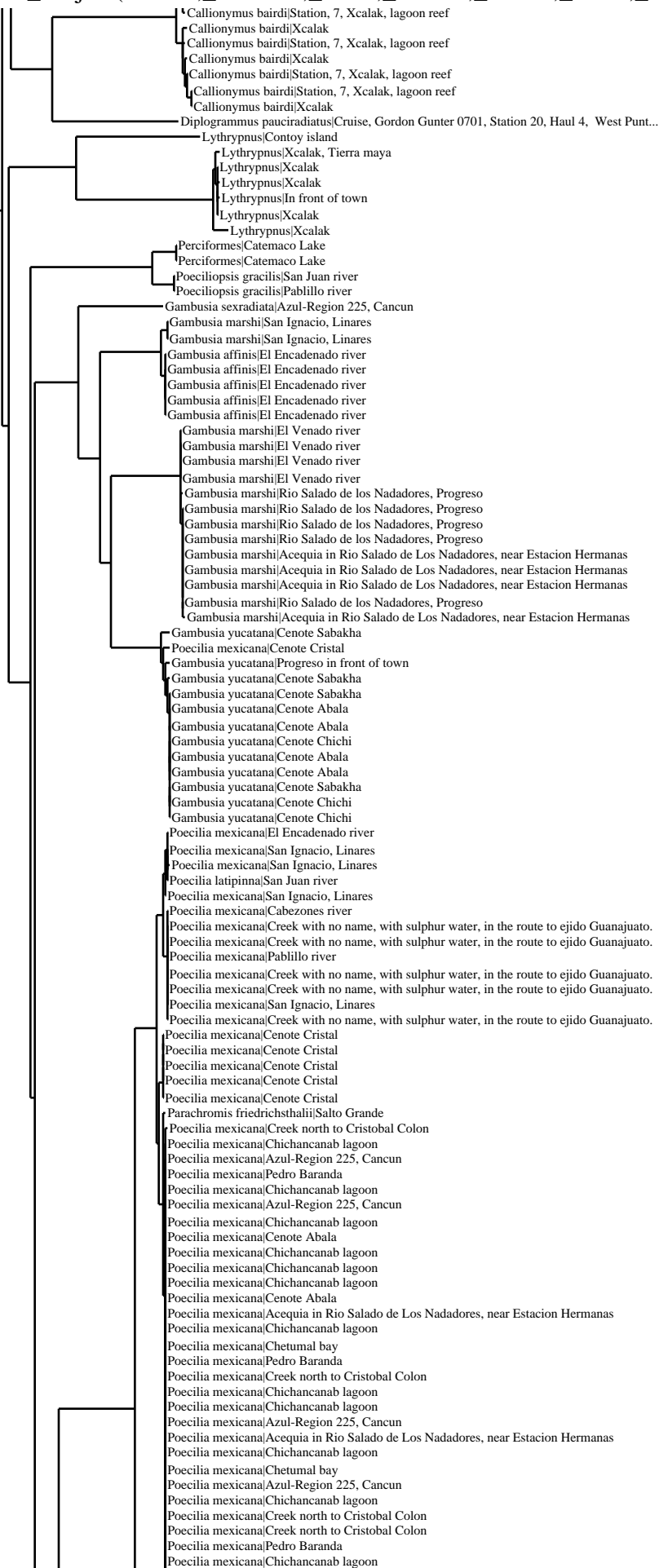


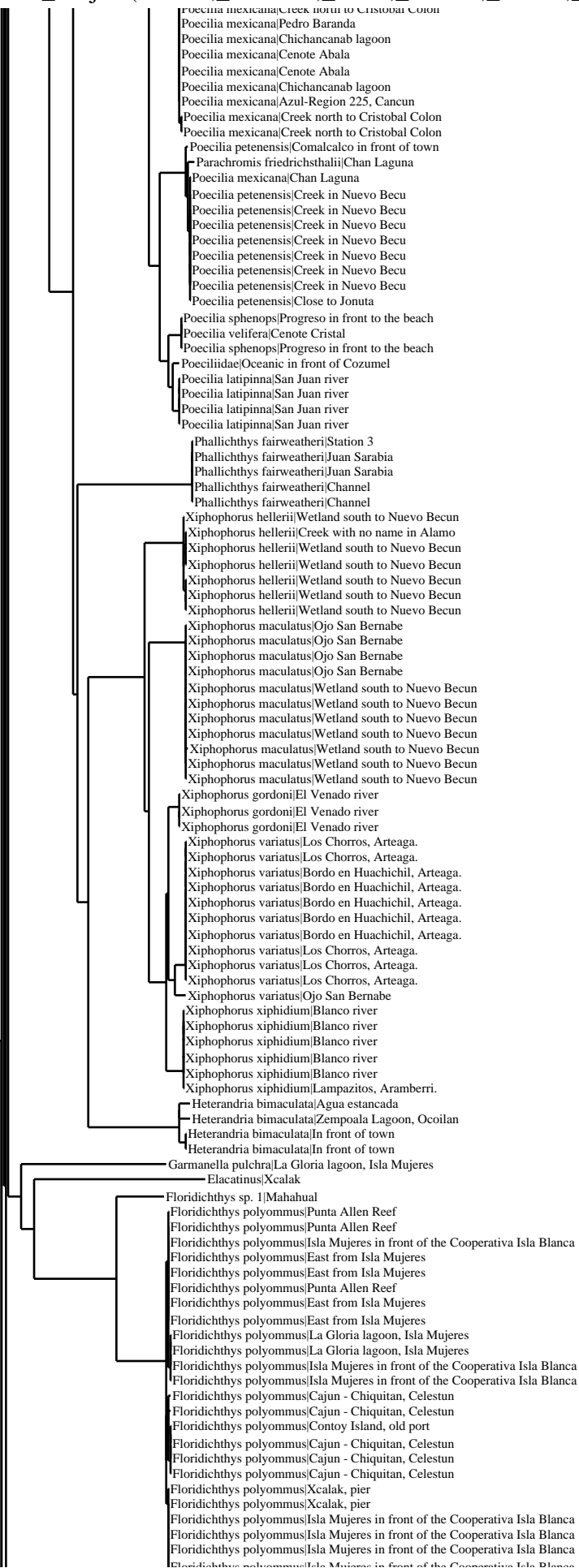
Haemulon flavolineatum|Xcalak, Town
 Haemulon flavolineatum|Between Mahahual and Chinchorro bank
 Haemulon flavolineatum|Xcalak, Town
 Haemulon flavolineatum|Between Mahahual and Chinchorro bank
 Haemulon flavolineatum|Between Mahahual and Chinchorro bank
 Haemulon flavolineatum|Between Mahahual and Chinchorro bank
 Haemulon flavolineatum|Near Contoy Island
 Haemulon flavolineatum|Valladolid in front of town
 Haemulon flavolineatum|Xcalak, Town
 Haemulon flavolineatum|Xcalak lagoon
 Haemulon flavolineatum|Xcalak lagoon
 Haemulon flavolineatum|Between Mahahual and Chinchorro bank
 Haemulon flavolineatum|Xcalak, Mogotes
 Haemulon sciurus|Station 6, Banco Chinchorro
 Haemulon sciurus|East from Isla Mujeres
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|East from Isla Mujeres
 Haemulon sciurus|East from Isla Mujeres
 Haemulon sciurus|Contoy Island, turtle beach
 Haemulon sciurus|Station 6, Banco Chinchorro
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak, Town
 Haemulon sciurus|Station 6, Banco Chinchorro
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Station 6, Banco Chinchorro
 Haemulon sciurus|East from Isla Mujeres
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|East from Isla Mujeres
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Station 6, Banco Chinchorro
 Haemulon sciurus|Xcalak
 Haemulon sciurus|Xcalak, Town
 Haemulon plumierii|La Pocita, Xcalak
 Haemulon plumierii|La Pocita, Xcalak
 Haemulon plumierii|La Pocita, Xcalak
 Haemulon plumierii|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 76, Haul 5, 42.6 km Southwest...
 Haemulon plumierii|La Pocita, Xcalak
 Haemulon plumierii|La Pocita, Xcalak
 Eugerres mexicanus|Candelaria river
 Eugerres mexicanus|Candelaria river
 Cichlinae|Candelaria
 Eugerres mexicanus|Candelaria
 Eugerres mexicanus|Candelaria river
 Eugerres mexicanus|Candelaria river
 Eugerres mexicanus|Usumacinta river close to a bridge
 Eugerres mexicanus|Usumacinta river close to a bridge
 Eugerres mexicanus|Usumacinta river close to a bridge
 Cichlinae|Candelaria
 Eugerres mexicanus|Candelaria river
 Eugerres|Pueblo
 Eugerres|Pueblo
 Eugerres plumieri|Xcalak, Town
 Eugerres plumieri|Punta Calentura, Chetumal Bay
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Punta Calentura, Chetumal Bay
 Eugerres plumieri|Chetumal, Pescaderia
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Chetumal, Pescaderia
 Eugerres plumieri|Punta Calentura, Chetumal Bay
 Eugerres plumieri|Pueblo
 Eugerres plumieri|Chetumal, Pescaderia
 Eugerres plumieri|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Huay-Pix, Puente Milagros
 Eugerres plumieri|Punta Calentura, Chetumal Bay
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Punta Calentura, Chetumal Bay
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Chetumal, Muelle Fiscal
 Eugerres plumieri|Coatzacoalcos River, Minatitlan
 Eugerres plumieri|Coatzacoalcos River, Minatitlan
 Eugerres plumieri|Sabancuy, Ciudad del Carmen
 Eugerres plumieri|Sabancuy, Ciudad del Carmen
 Eugerres plumieri|Sabancuy, Ciudad del Carmen
 Diapterus auratus|Quilla Ranch
 Diapterus auratus|Quilla Ranch
 Diapterus auratus|Quilla Ranch
 Diapterus auratus|Quilla Ranch
 Diapterus rhombeus|7 barberos, Ciudad del Carmen
 Diapterus rhombeus|7 barberos, Ciudad del Carmen
 Diapterus rhombeus|7 barberos, Ciudad del Carmen

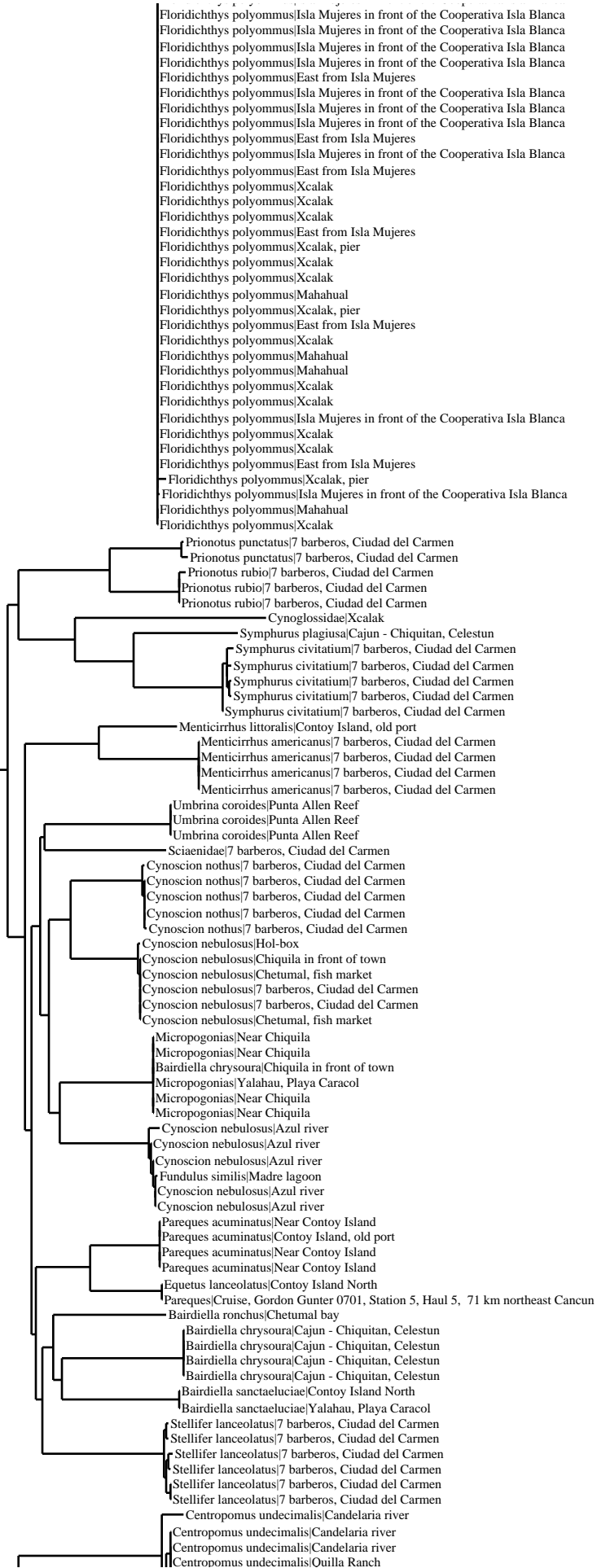


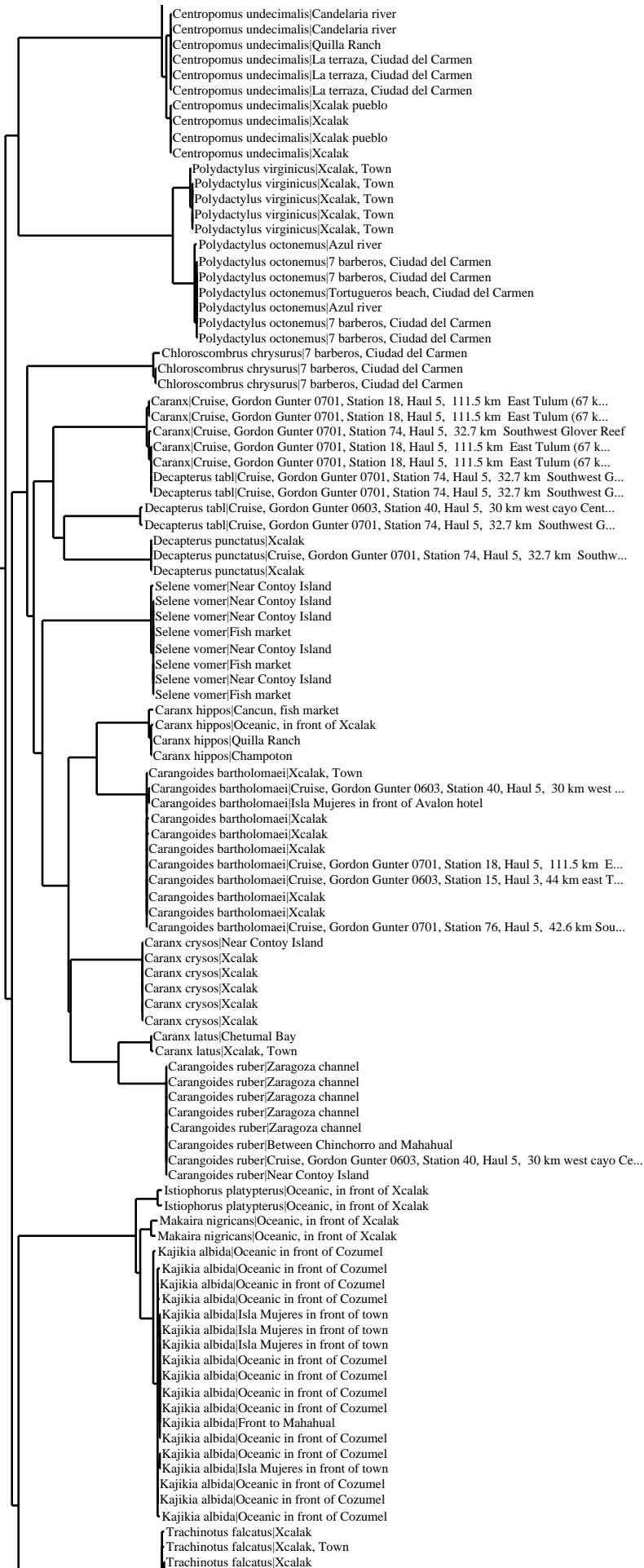
Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Isla Mujeres in front of the Cooperativa Isla Blanca
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Zaragoza channel
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|East from Isla Mujeres
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak lagoon
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Isla Mujeres in front of the Cooperativa Isla Blanca
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Zaragoza channel
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Zaragoza channel
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Punta Allen Reef
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Zaragoza channel
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Punta Allen Reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak lagoon
 Eucinostomus jonesii|Xcalak lagoon
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak lagoon
 Eucinostomus jonesii|Zaragoza channel
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Punta Allen Reef
 Eucinostomus jonesii|Long Key Channel
 Eucinostomus jonesii|Yalahau, Playa Caracol
 Eucinostomus jonesii|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus jonesii|Xcalak
 Eucinostomus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 25, Haul 4, 18 km Southeast Punta ...
 Eucinostomus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 25, Haul 5, 18 km Southeast Punta ...
 Eucinostomus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 21, Haul 1, 41 km East Boca Paila
 Eucinostomus|Xcalak
 Eucinostomus|Xcalak
 Eucinostomus|Xcalak
 Eucinostomus|Xcalak
 Eucinostomus|Xcalak
 Eucinostomus|Long Key Channel
 Eucinostomus|Long Key Channel
 Eucinostomus|Whale Harbour
 Eucinostomus|Long Key Channel
 Eucinostomus|Whale Harbour
 Eucinostomus|Long Key Channel
 Eucinostomus|Long Key Channel
 Eucinostomus|Long Key Channel
 Eucinostomus|Long Key Channel
 Eucinostomus|Whale Harbour
 Eucinostomus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 76, Haul 5, 42.6 km Southwest Glove...
 Eucinostomus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 76, Haul 5, 42.6 km Southwest Glove...
 Eucinostomus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 76, Haul 4, 42.6 km Southwest Glove...
 Eucinostomus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 21, Haul 3, 41 km East Boca Paila
 Eucinostomus argenteus|Holbox, close to the Pasion beach
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Holbox, close to the Pasion beach
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Pueblo
 Eucinostomus argenteus|Punta Cajun, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac

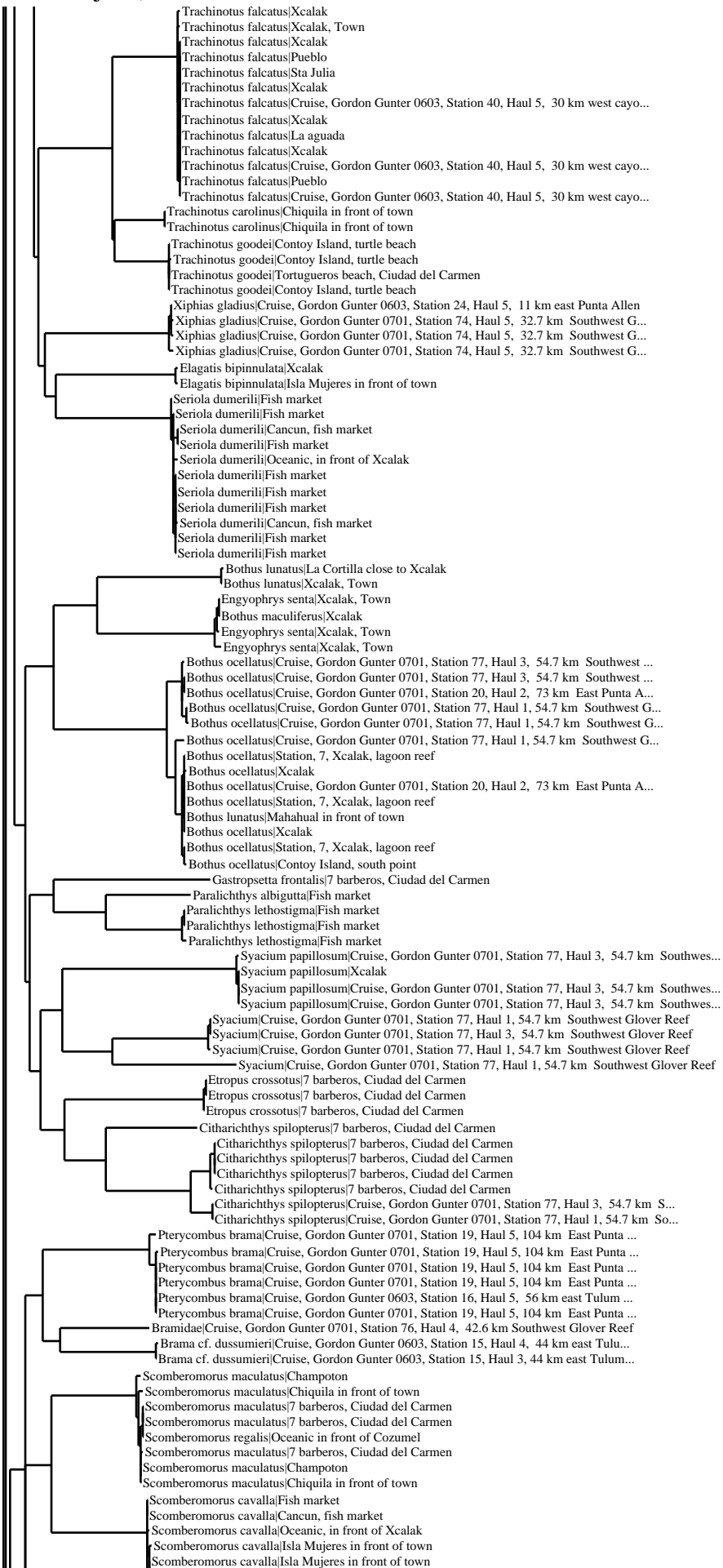
Eucinostomus argenteus|Pueblo
 Eucinostomus argenteus|Punta Cajun, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac
 Eucinostomus argenteus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eucinostomus argenteus|East from Isla Mujeres
 Eucinostomus argenteus|Holbox, close to the Pasion beach
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Pueblo
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Isla Mujeres in front of the Cooperativa Isla Blanca
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Holbox, close to the Pasion beach
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Punta Cajun, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Pueblo
 Eucinostomus argenteus|Pueblo
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Xcalak
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Long Key Channel
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Eucinostomus argenteus|Punta Cajun, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac
 Eucinostomus argenteus|Isla Mujeres in front of the Cooperativa Isla Blanca
 Eucinostomus argenteus|Isla Mujeres in front of the Cooperativa Isla Blanca
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac
 Eucinostomus argenteus|Xcalak
 Eucinostomus argenteus|Rosada lagoon, Telchac
 Eucinostomus argenteus|East from Isla Mujeres
 Eucinostomus argenteus|Pueblo
 Eucinostomus argenteus|Punta Cajun, Celestun
 Eucinostomus argenteus|Whale Harbour
 Caulolatilus cyanops|Fish market
 Carapus bermudensis|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Carapus bermudensis|Xcalak
 Carapus bermudensis|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Carapus bermudensis|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Carapus bermudensis|Port Honduras Marine Reserve
 Carapus bermudensis|Station, 4, Xcalak, lagoon reef
 Carapus bermudensis|Xcalak
 Diretmoides pauciradiatus|Cruise, Gordon Gunter 0603, Station 23, Haul, 2 11 km sout...
 Elacatinus macrodon|Near Contoy Island
 Elacatinus macrodon|Near Contoy Island
 Brotula barbata|7 barberos, Ciudad del Carmen
 Gonostoma elongatum|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 1, 35.5 km northeast...
 Achirus lineatus|7 barberos, Ciudad del Carmen
 Achirus lineatus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Achirus lineatus|Celestun 2
 Achirus lineatus|Near Chiquila
 Achirus lineatus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Achirus lineatus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Achirus lineatus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Achirus lineatus|Celestun 2
 Achirus lineatus|Candela river
 Achirus lineatus|Celestun 2
 Achirus lineatus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Achirus lineatus|Chetumal Bay
 Achirus lineatus|Chetumal Bay
 Achirus lineatus|Chetumal Bay
 Achirus lineatus|Chetumal Bay
 Achirus lineatus|Chetumal Bay
 Trinectes maculatus|7 barberos, Ciudad del Carmen
 Trinectes maculatus|7 barberos, Ciudad del Carmen
 Trinectes maculatus|7 barberos, Ciudad del Carmen
 Trinectes maculatus|7 barberos, Ciudad del Carmen
 Trinectes|Xcalak
 Trinectes inscriptus|Xcalak bridge
 Bregmaceros atlanticus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 20, Haul 2, 73 km East P...
 Bregmaceros|Xcalak
 Bregmaceros|Xcalak
 Bregmaceros|Xcalak
 Bregmaceros|Xcalak
 Callionymus bairdi|Station, 7, Xcalak, lagoon reef
 Callionymus bairdi|Xcalak
 Callionymus bairdi|Station, 7, Xcalak, lagoon reef
 Callionymus bairdi|Xcalak
 Callionymus bairdi|Station, 7, Xcalak, lagoon reef

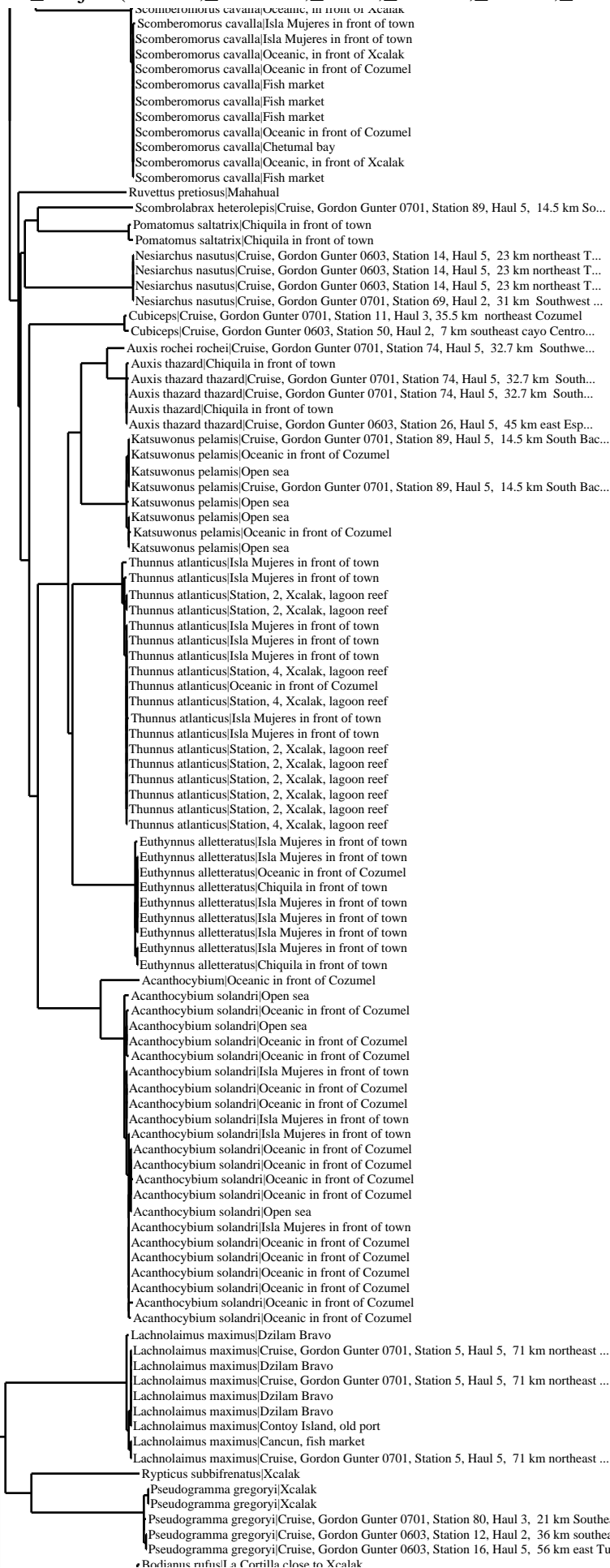


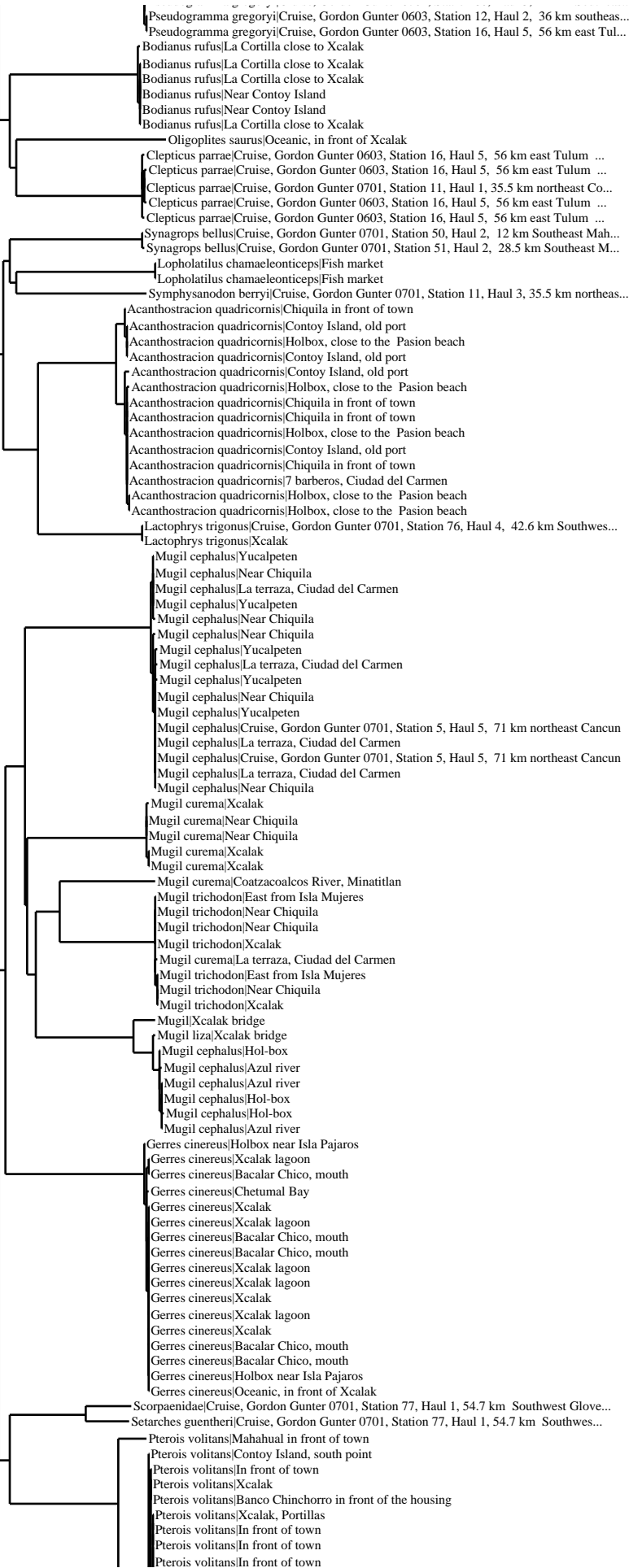








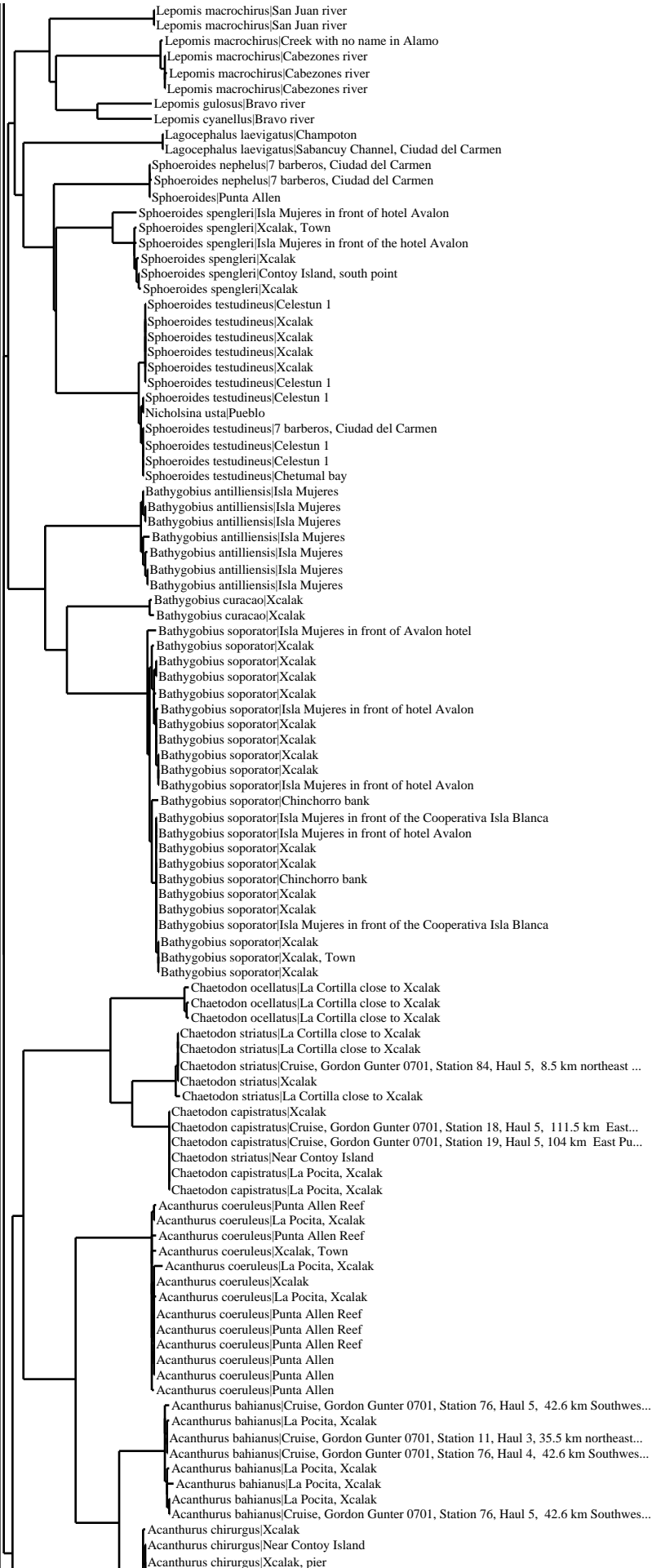


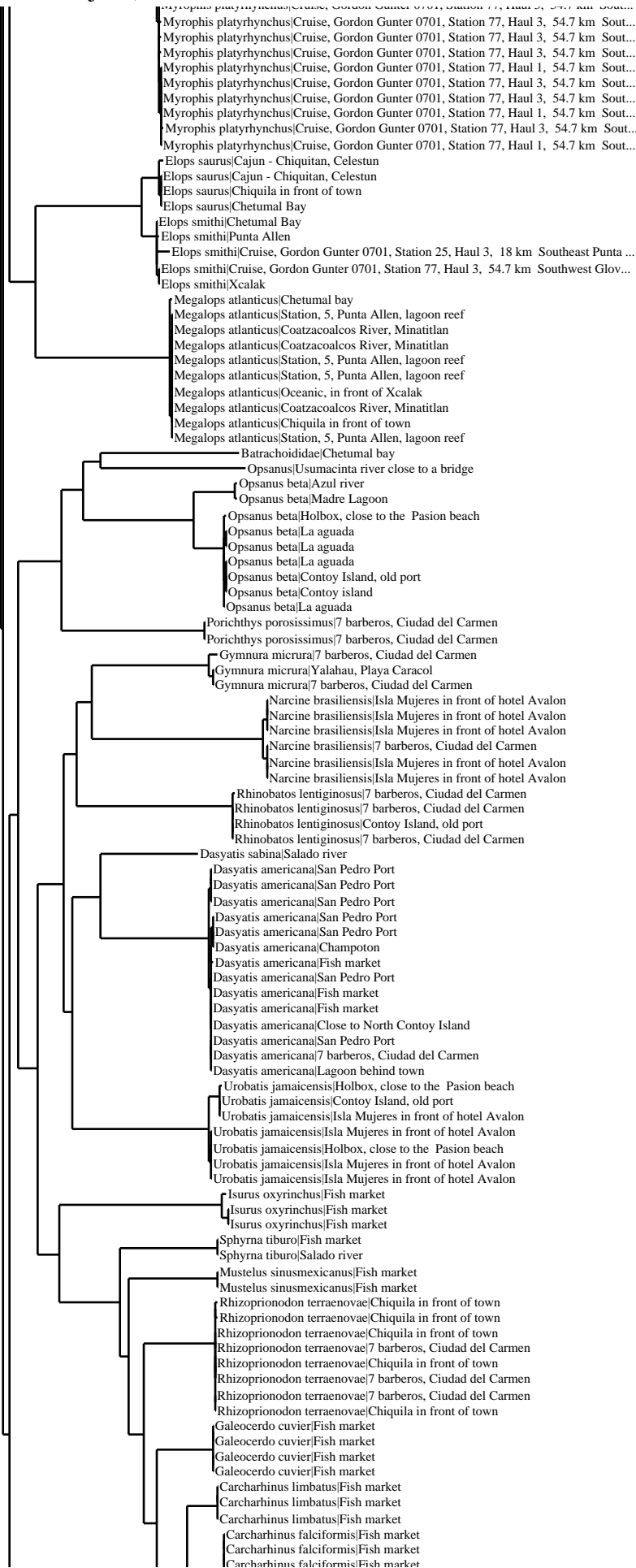


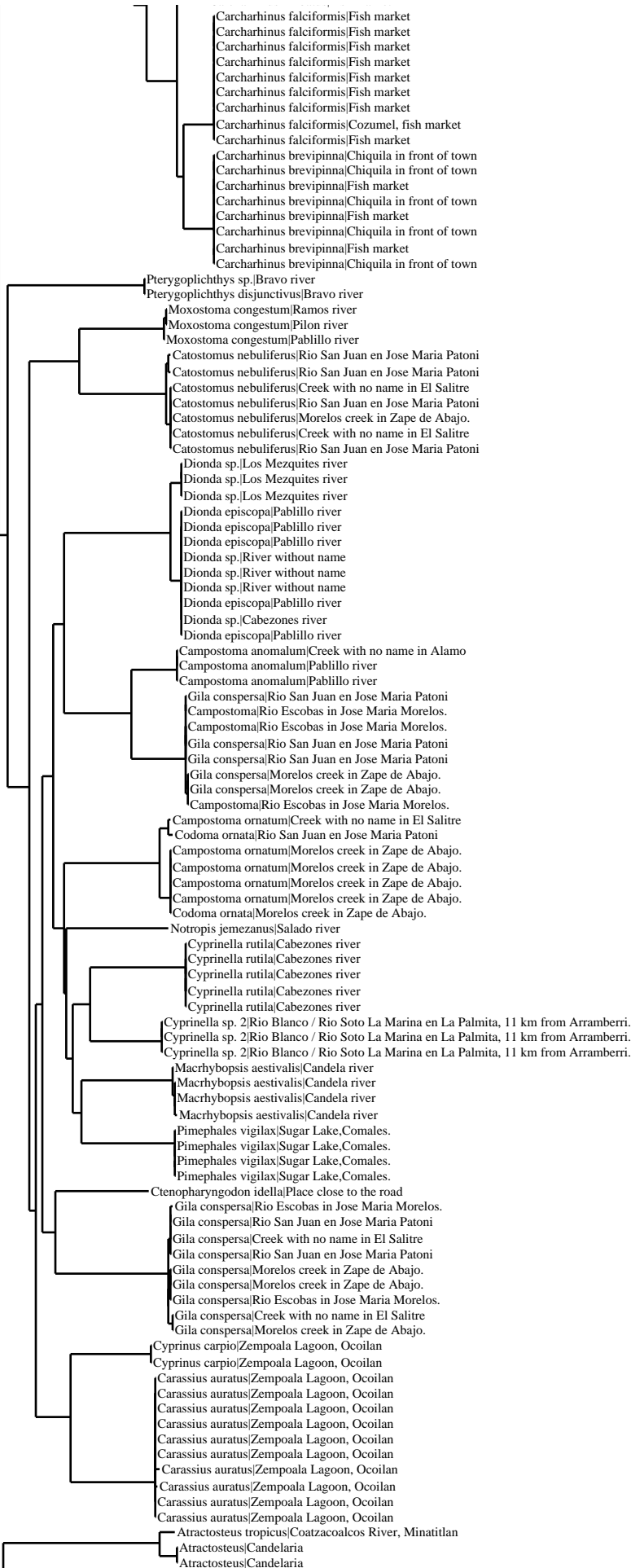
Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|Playa del Carmen in front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|Xcalak, Quebrado
 Pterois volitans|Cozumel
 Pterois volitans|Mahahual in front of town
 Pterois volitans|Near Contoy Island
 Pterois volitans|Xcalak, Mogotes
 Pterois volitans|Chankana'ab
 Pterois volitans|San Francisco
 Pterois volitans|Mahahual in front of town
 Pterois volitans|Xcalak, barco
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|Mahahual in front of town
 Pterois volitans|Mahahual in front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|Xcalak, Playa sonrisa beach
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|Xcalak, Pozarica
 Pterois volitans|Mahahual in front of town
 Pterois volitans|Xcalak, Punta Gavilan
 Pterois volitans|Mahahual in front of town
 Pterois volitans|Puerto Morelos in front of town
 Pterois volitans|Xcalak
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|Xcalak, Town
 Pterois volitans|Xcalak, Playa sonrisa beach
 Pterois volitans|Xcalak
 Pterois volitans|Xcalak, Playa sonrisa beach
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|In front of town
 Pterois volitans|Xcalak
 Pterois volitans|In front of town
 Scorpaenidae|Xcalak
 Scorpaenidae|Xcalak
 Scorpaenidae|Xcalak
 Cephalopholis fulva
 Cephalopholis fulva
 Cephalopholis fulva|Cruise, Gordon Gunter 0603, Station 02, Haul 4, 56 km northeast ...
 Cephalopholis cruentata|Mahahual in front of town
 Cephalopholis cruentata|Punta Palancar
 Cephalopholis cruentata|La Pocita, Xcalak
 Cephalopholis cruentata|La Cortilla close to Xcalak
 Cephalopholis cruentata|Mahahual in front of town
 Cephalopholis cruentata|Rio Huache
 Cephalopholis cruentata|Xcalak
 Cephalopholis cruentata|La Cortilla close to Xcalak
 Cephalopholis cruentata|La Cortilla close to Xcalak
 Cephalopholis cruentata|La Cortilla close to Xcalak
 Epinephelus morio|Fish market
 Epinephelus morio|Cozumel, fish market
 Epinephelus morio|Fish market
 Hyporthodus mystacinus|Xcalak in front of town
 Mycteroperca microlepis|Fish market
 Mycteroperca microlepis|Fish market
 Mycteroperca microlepis|Fish market
 Mycteroperca microlepis|Chetumal bay
 Mycteroperca microlepis|Chetumal, fish market
 Mycteroperca venenosa|Xcalak
 Mycteroperca venenosa|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Chetumal bay
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Chetumal bay
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Chetumal bay
 Mycteroperca bonaci|Cruise, Gordon Gunter 0603, Station 02, Haul 4, 56 km northeast ...
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Hol Chan Reef
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Chetumal bay
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Oceanic, in front of Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Chetumal bay
 Mycteroperca bonaci|Chetumal bay
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Xcalak

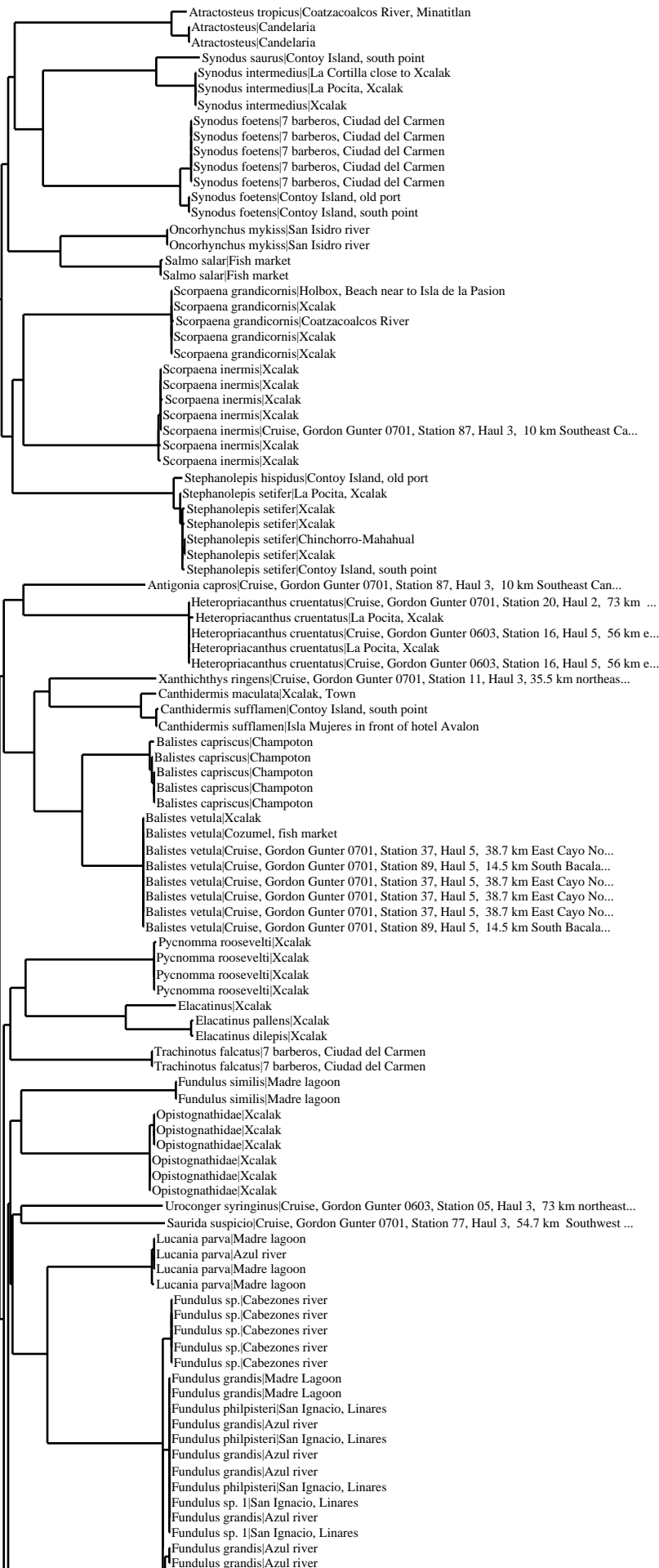
Mycteroperca bonaci|Cetumat bay
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Xcalak
 Mycteroperca bonaci|Chetumal bay
 Neoniphon marianus|Cruise, Gordon Gunter 0603, Station 15, Haul 4, 44 km east Tulum ...
 Sargocentron coruscum|Xcalak in front of town
 Sargocentron coruscum|Rio Huache
 Sargocentron vexillarium|La Cortilla close to Xcalak
 Sargocentron vexillarium|La Cortilla close to Xcalak
 Holocentrus adscensionis|Cruise, Gordon Gunter 0603, Station 25, Haul 4, 17 km south...
 Holocentrus adscensionis|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 74, Haul 5, 32.7 km So...
 Holocentrus rufus|Xcalak, Town
 Holocentrus rufus|Xcalak, Town
 Holocentrus rufus|Xcalak, Town
 Holocentrus rufus|La Pocita, Xcalak
 Holocentrus rufus|Xcalak, Town
 Lutjanus cyanopterus|San Felipe in front of town
 Lutjanus cyanopterus|Contoy Island, old port
 Lutjanus joci|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 56, Haul 5, 54.5 km East San Pedro...
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Contoy Island, turtle beach
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Near Contoy Island
 Lutjanus apodus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus apodus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Celestun 2
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Lutjanus griseus|Pueblo
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Lutjanus griseus|Celestun 2
 Lutjanus griseus|Pueblo
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Contoy Island, turtle beach
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Celestun 2
 Lutjanus griseus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Near Contoy Island
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Biscayne Bay, Seine
 Lutjanus griseus|Cajun - Chiquitan, Celestun
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus griseus|Xcalak
 Lutjanus campechanus|Cruise, Gordon Gunter 0603, Station 56, Haul 5, 6 km east Nica ...
 Lutjanus vivanus|Xcalak, Town
 Lutjanus vivanus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 87, Haul 3, 10 km Southeast Can...
 Lutjanus vivanus|Xcalak, Town
 Ocyurus chrysurus|Xcalak
 Ocyurus chrysurus|Xcalak, pier
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay

Ocyurus chrysurus|Acana
 Ocyurus chrysurus|Xcalak, pier
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Xcalak, pier
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 38, Haul 5, 16.7 km Southeast ...
 Ocyurus chrysurus|Xcalak, pier
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Contoy Island, old port
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Ocyurus chrysurus|Xcalak
 Ocyurus chrysurus|Xcalak, pier
 Ocyurus chrysurus|Xcalak
 Ocyurus chrysurus|Xcalak, pier
 Ocyurus chrysurus|Brewers Bay
 Lutjanus buccanella|Xcalak, Town
 Lutjanus mahogoni|La Cortilla close to Xcalak
 Lutjanus mahogoni|La Cortilla close to Xcalak
 Lutjanus mahogoni|La Cortilla close to Xcalak
 Lutjanus mahogoni|La Cortilla close to Xcalak
 Lutjanus analis|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 70, Haul 3, 36 km Southwest Glo...
 Lutjanus analis|Xcalak
 Lutjanus analis|Xcalak
 Lutjanus analis|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 56, Haul 5, 54.5 km East San Ped...
 Lutjanus analis|Xcalak
 Lutjanus analis|Xcalak
 Lutjanus analis|Xcalak
 Lutjanus analis|La Pocita, Xcalak
 Lutjanus analis|La Pocita, Xcalak
 Lutjanus analis|La Pocita, Xcalak
 Lutjanus analis|La Pocita, Xcalak
 Lutjanus analis|Pueblo
 Lutjanus analis|Xcalak
 Lutjanus analis|Xcalak
 Lutjanus analis|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 74, Haul 5, 32.7 km Southwest G...
 Lutjanus analis|Pueblo
 Lutjanus analis|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 70, Haul 3, 36 km Southwest Glo...
 Lutjanus synagris|Xcalak, Town
 Lutjanus synagris|Xcalak, Town
 Lutjanus synagris|Xcalak, Town
 Lutjanus synagris|Progreso in front of town
 Lutjanus synagris|Progreso in front of town
 Lutjanus synagris|La Pocita, Xcalak
 Lutjanus synagris|Xcalak
 Lutjanus synagris|Xcalak
 Lutjanus synagris|Xcalak, Town
 Lutjanus synagris|Xcalak, Town
 Lutjanus synagris|La Pocita, Xcalak
 Lutjanus synagris|Xcalak
 Lutjanus synagris|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Erotelis smaragdus|Xcalak
 Gobiomorus dormitor|Cenote Azul
 Gobiomorus dormitor|Encantada lagoon
 Gobiomorus dormitor|Encantada lagoon
 Gobiomorus dormitor|Cenote Azul
 Gobiomorus dormitor|Cenote Azul
 Gobiomorus dormitor|Cenote Azul
 Gobiomorus dormitor|Coatzacoalcos River
 Gobiomorus dormitor|Coatzacoalcos River, Minatitlan
 Gobiomorus dormitor|Coatzacoalcos River, Minatitlan
 Gobiomorus dormitor|Coatzacoalcos River, Minatitlan
 Eleotris pisonis|Cenote de Xcaceel
 Nes longus|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Nes longus|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Nes longus|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Nes longus|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Nes longus|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Nes longus|Xcalak
 Nes longus|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Nes longus|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Nes longus|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Nes longus|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Nes longus|Station, 2, Xcalak, lagoon reef
 Nes longus|Station, 5, Punta Allen, lagoon reef
 Gobiidae|Xcalak
 Gobiidae|Xcalak
 Holacanthus ciliaris|Xcalak
 Holacanthus ciliaris|Near Contoy Island
 Centropyge argi|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 3, 35.5 km northeast Coz...
 Centropyge argi|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 3, 35.5 km northeast Coz...
 Centropyge argi|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 3, 35.5 km northeast Coz...
 Centropyge argi|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 11, Haul 3, 35.5 km northeast Coz...
 Centropyge argi|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 14, Haul 2, 25 km East Tulum
 Pomacanthus arcuatus|Cozumel, fish market
 Pomacanthus arcuatus|Contoy Island, turtle beach

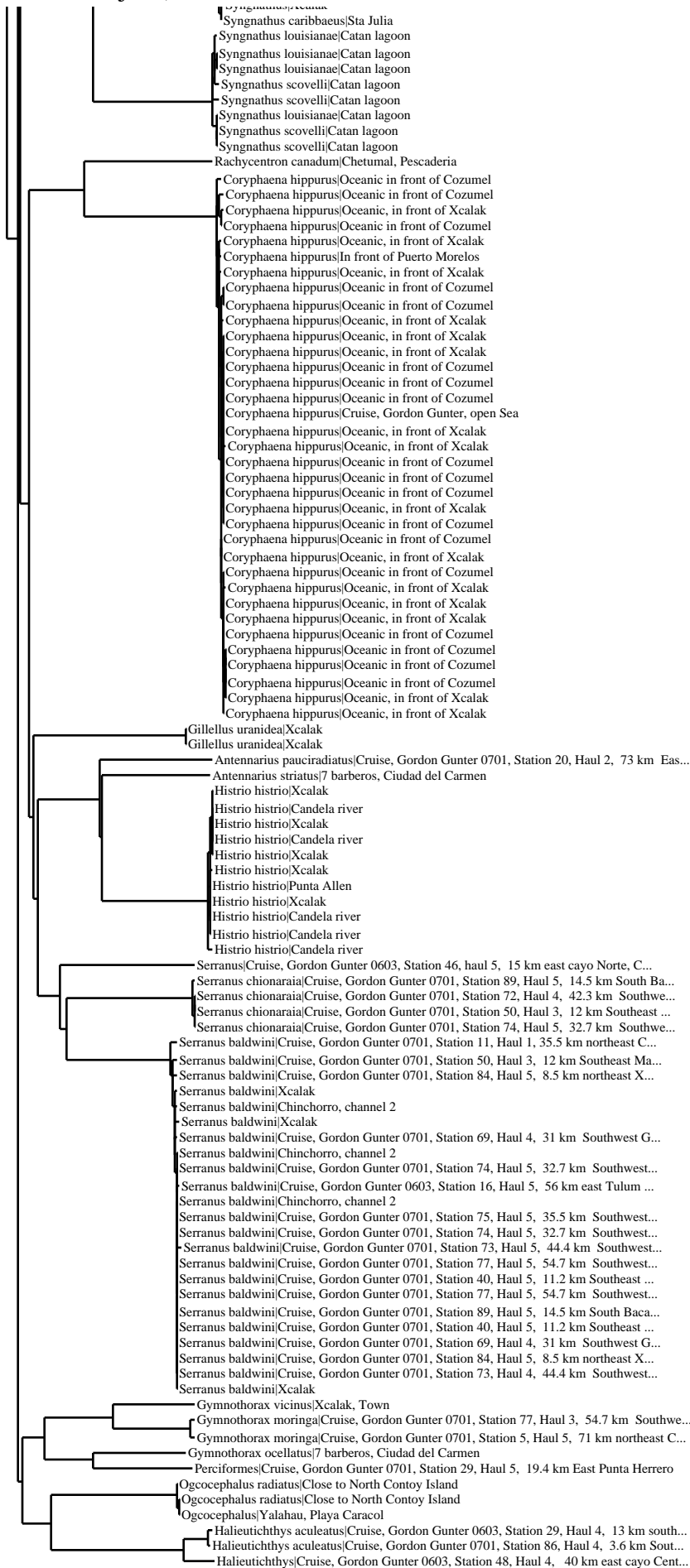








Fundulus sp. 1|San Ignacio, Linares
Fundulus grandis|Azul river
Fundulus grandis|Azul river
Fundulus sp. 2|Lampazitos, Aramberri.
Fundulus sp. 2|Blanco river
Fundulus sp. 2|Blanco river
Fundulus sp. 1|Rio Blanco / Rio Soto La Marina en La Palmita, 11 km from Aramberri.
Fundulus sp. 2|Lampazitos, Aramberri.
Fundulus sp. 1|Rio Blanco / Rio Soto La Marina en La Palmita, 11 km from Aramberri.
Fundulus sp. 1|Rio Blanco / Rio Soto La Marina en La Palmita, 11 km from Aramberri.
Fundulus sp. 2|Blanco river
Fundulus sp. 2|Lampazitos, Aramberri.
Fundulus sp. 2|Blanco river
Fundulus sp. 2|Blanco river
Fundulus sp. 1|Rio Blanco / Rio Soto La Marina en La Palmita, 11 km from Aramberri.
Fundulus sp. 1|Rio Blanco / Rio Soto La Marina en La Palmita, 11 km from Aramberri.
Rivulus tenuis|Pedro Baranda
Gadus chalcogrammus|Cozumel, fish market
Echeneis naucrates|Contoy Island North
Echeneis naucrates|Contoy Island, south point
Girardinichthys multiradiatus|Zempoala Lagoon, Ocoilan
Girardinichthys multiradiatus|Zempoala Lagoon, Ocoilan
Girardinichthys multiradiatus|Zempoala Lagoon, Ocoilan
Girardinichthys multiradiatus|Zempoala Lagoon, Ocoilan
Girardinichthys multiradiatus|Zempoala Lagoon, Ocoilan
Goodea atripinnis|Creek in Juan Aldana, exit to Ojitos.
Goodea atripinnis|Creek in Juan Aldana, exit to Ojitos.
Goodea atripinnis|Creek in Juan Aldana, exit to Ojitos.
Goodea atripinnis|Aguanaval creek in the limits of Zacatecas and Durango, Highway 49
Goodea atripinnis|Aguanaval creek in the limits of Zacatecas and Durango, Highway 49
Goodea atripinnis|Aguanaval creek in the limits of Zacatecas and Durango, Highway 49
Goodea atripinnis|Aguanaval creek in the limits of Zacatecas and Durango, Highway 49
Goodea atripinnis|Creek in Juan Aldana, exit to Ojitos.
Goodea atripinnis|Aguanaval creek in the limits of Zacatecas and Durango, Highway 49
Priolepis hipolitii|In front of town
Ophisternon|Pedro Baranda
Ophisternon|Pedro Baranda
Strongylura marina|Bravo river
Strongylura marina|Candela river
Strongylura marina|Salado river
Strongylura timucu|Sabancuy Channel, Ciudad del Carmen
Strongylura timucu|Celestun 3
Strongylura timucu|Sabancuy Channel, Ciudad del Carmen
Strongylura timucu|Xcalak lagoon
Strongylura timucu|Xcalak lagoon
Strongylura timucu|Xcalak lagoon
Strongylura timucu|Xcalak lagoon
Strongylura notata|Bacalar Chico, mouth
Strongylura notata|Celestun 3
Strongylura notata notata|Xcalak
Strongylura notata|Yalahau, Playa Caracol
Strongylura notata|Bacalar Chico, mouth
Strongylura notata notata|Xcalak
Strongylura notata|Bacalar Chico, mouth
Strongylura notata|Lighthouse reef
Strongylura notata|Chiquila in front of town
Strongylura notata|Bacalar Chico, mouth
Strongylura notata|Bacalar Chico, mouth
Strongylura notata|Sta Julia
Strongylura notata|Chiquila in front of town
Pollichthys maui|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest...
Pollichthys maui|Cruise, Gordon Gunter 0701, Station 77, Haul 3, 54.7 km Southwest...
Lobotes surinamensis|Candela river
Chaenopsidae|Xcalak
Tomicodon rupestris|Xcalak
Hippocampus erectus|7 barberos, Ciudad del Carmen
Bryx|Contoy Island, old port
Bryx dunckeri|Xcalak
Bryx dunckeri|Punta Allen
Bryx dunckeri|Xcalak
Bryx dunckeri|Punta Allen
Bryx dunckeri|Contoy Island, south point
Syngnathinae|Contoy island
Syngnathinae|Contoy island
Syngnathinae|Contoy island
Acyrtops beryllinus|Xcalak
Acyrtops beryllinus|Xcalak
Acyrtops beryllinus|Xcalak
Acyrtops beryllinus|Xcalak
Acyrtops beryllinus|Xcalak
Acyrtops beryllinus|Xcalak
Acyrtops beryllinus|Xcalak
Acyrtops beryllinus|Xcalak
Acyrtops beryllinus|Contoy Island, south point
Acyrtops beryllinus|Contoy island
Cosmocampus elucens|Contoy Island, south point
Cosmocampus elucens|Contoy Island, old port
Syngnathus floridae|Contoy Island, south point
Syngnathus floridae|Holbox, Beach near to Isla de la Pasion
Syngnathus|Xcalak
Syngnathus caribbaeus|La aguada
Syngnathus caribbaeus|Sta Julia
Syngnathus caribbaeus|Xcalak, Town
Syngnathus|Xcalak
Syngnathus caribbaeus|Xcalak, Town
Syngnathus|Xcalak
Syngnathus|Xcalak
Syngnathus|Xcalak
Syngnathus caribbaeus|Sta Julia
Syngnathus louisianae|Catan lagoon



Literatura citada

Adamowicz, S. J. & A. Purvis, 2005. How many branchiopod crustacean species are there? Quantifying the components of underestimation, *Global Ecology and Biogeography* 14: 455-468.

Alcántara-Rodríguez, J. A., J. Ciro-Pérez, E. Ortega-Mayagoitia, C. Serranía-Soto & E. Piedra-Ibarra, 2012. Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico, *Freshwater Biology*.

Becker, S., R. Hanner & D. Steinke, 2010. Five years of FISH-BOL: Brief status report, *Mitochondrial Dna* 21: 1-7.

Berner, D. B.. Taxonomy of *Ceriodaphnia* (Crustacea: Cladocera) in U.S. environmental protection agency cultures. Environmental Protection Agency EPA/600/4-86/032, 1-35. 1986. Environmental Protection Agency. Research and Development.
Ref Type: Report

Campillo, S., E. M. García-Roger, D. Martínez-Torres & M. Serra, 2005. Morphological stasis of two species belonging to the L-morphotype in the *Brachionus plicatilis* species complex, *Hydrobiologia* 546: 181-187.

Carrera-Parra, L. F. & S. I. Salazar-Vallejo, 2011. Redescriptions of *Eunice filamentosa* and *E. denticulata* and description of *E. tovarae* n. sp. (Polychaeta: Eunicidae), highlighted with morphological and molecular data, *Zootaxa* 2880: 51-64.

Cervantes, F. A., J. Arcangeli, Y. Hortelano-Moncada & A. V. Borisenko, 2010. DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico, *Mitochondrial Dna* 21: 44-50.

Cervantes-Martínez, A., M. Elías-Gutiérrez, M. A. Gutiérrez-Aguirre & A. A. Kotov, 2005. Ecological remarks on *Mastigodiatomus nesus* Bowman, 1986 (Copepoda : Calanoida) in a Mexican karstic sinkhole, *Hydrobiologia* 542: 95-102.

Ciro-Pérez, J., M. J. Carmona & M. Serra, 2001a. Resource competition between sympatric sibling rotifer species, *Limnology and Oceanography* 46: 1511-1523.

Ciro-Pérez, J., A. Gómez & M. Serra, 2001b. On the taxonomy of 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.

Dayrat, B., 2005. Towards integrative taxonomy, *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.

Elías-Gutiérrez, M., A. A. Kotov & T. Garfías-Espejo, 2006. Cladocera (Crustacea : Ctenopoda, Anomopoda) from southern Mexico, Belize and northern Guatemala, with some biogeographical notes, *Zootaxa* 1119: 1-27.

- Elías-Gutiérrez, M., F. Martínez-Jerónimo, N. V. Ivanova & M. Valdez-Moreno, 2008a. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries, *Zootaxa* 1849: 1-42.
- Elias-Gutierrez, M. & E. Suarez-Morales, 1999. *Alona pectinata* (Crustacea : Anomopoda ; Chydoridae), a new freshwater cladoceran from Southeast Mexico, *Revista de Biología Tropical* 47: 105-111.
- Elías-Gutiérrez, M., E. Suárez-Morales, M. Gutiérrez-Aguirre, M. Silva-Briano, J. G. Granados-Ramírez & T. Garfias-Espejo, 2008b. Guía ilustrada de los microcrustáceos (Cladocera y Copepoda) de las aguas continentales de México, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 367 pp.
- Elías-Gutiérrez, M. & M. Valdez-Moreno, 2008. A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding, *Hidrobiológica* In press.
- Engstrand, R. C., J. C. Tovar, A. Cibrian-Jaramillo & S. O. Kolokotronis, 2010. Genetic variation in avocado stem weevils *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico, *Mitochondrial Dna* 21: 38-43.
- Escalante, P., A. Ibarra-Vazquez & P. Rosas-Escobar, 2010. Tropical montane nymphalids in Mexico: DNA barcodes reveal greater diversity, *Mitochondrial Dna* 21: 30-37.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, 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.
- Forro, L., N. M. Korovchinsky, A. A. Kotov & A. Petrusek, 2008a. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater, *Hydrobiologia* 595: 177-184.
- Forro, L., N. M. Korovchinsky, A. A. Kotov & A. Petrusek, 2008b. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater, *Hydrobiologia* 595: 177-184.
- García-Varela, M., G. Pérez-Ponce de León, F. J. Aznar & S. A. Nadler, 2011. Erection of *Ibirhynchus* Gen. Nov (Acanthocephala: Polymorphidae), Based on Molecular and Morphological Data, *Journal of Parasitology* 97: 97-105.
- Gelinas, M., B. Pinel-Alloul & M. Slusarczyk, 2007. Formation of morphological defences in response to YOY perch and invertebrate predation in two *Daphnia* species coexisting in a mesotrophic lake, *Hydrobiologia* 594: 175-185.
- Gilbert, J. J. & E. J. Walsh, 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: Mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains, *Hydrobiologia* 546: 257-265.
- Gomez, 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.

Gomez, A., M. Serra, G. R. Carvalho & D. H. Lunt, 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: Evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera), *Evolution* 56: 1431-1444.

Hajibabaei, M., J. R. DeWaard, N. V. Ivanova, S. Ratnasingham, R. Dooh, S. L. Kirk, P. M. Mackie & P. D. N. Hebert, 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 360: 1959-1967.

Hajibabaei, M., D. H. Janzen, J. M. Burns, W. Hallwachs & P. D. N. Hebert, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 968-971.

Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. DeWaard, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270: 313-321.

Hebert, P. D. N. & T. L. Finston, 1996. A taxonomic reevaluation of North American *Daphnia* (Crustacea: Cladocera) II. New species in the *Daphnia pulex* group from the south-central United States and Mexico, *Canadian Journal of Zoology* 74: 632-653.

Hebert, P. D. N., J. D. S. Witt & S. J. Adamowicz, 2003b. Phylogeographical patterning in *Daphnia ambigua*: Regional divergence and intercontinental cohesion, *Limnology and Oceanography* 48: 261-268.

Hudec, I., 1988. *Graptoleberis testudinaria* (Cladocera, Chydoridae) in Slovakia, *Vest. cs spolec. Zool.* 52: 98-105.

Hudec, I., 2000. Subgeneric differentiation within *Kurzia* (Crustacea : Anomopoda : Chydoridae) and a new species from Central America, *Hydrobiologia* 421: 165-178.

Ivanova, N. V., J. R. DeWaard, M. Hajibabaei & P. D. N. Hebert. *Protocols for High-Volume DNA Barcode Analysis*. 2006. Canada.
Ref Type: Pamphlet

Jeffery, N. W., M. Elías-Gutiérrez & S. J. Adamowicz, 2011. Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada, *Plos One* 6: e:18364.

Kiefer, F., 1938. Ruderfubkrebse (Crust. Cop.) aus Mexico, *Zoologischer Anzeiger* 115: 274-279.

Kim, K., A. A. Kotov & D. J. Taylor, 2006. Hormonal induction of undescribed males resolves cryptic species of cladocerans, *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273: 141-147.

Korovchinsky, N. M., 1992. *Sididae and Holopediidae*, SPB Academic Publishing, Amsterdam, 82 pp.

- Korovchinsky, N. M., 1996. How many species of Cladocera are there?, *Hydrobiologia* 321: 191-204.
- Korovchinsky, N. M. & M. Elías-Gutiérrez, 2000. First record of *Sarsilatona serricauda* (Sars, 1901) (Crustacea: Branchiopoda: Sididae) from Mexico, with redescription of its male, *Arthropoda Selecta* 9: 5-11.
- Korovchinsky, N. M. & N. G. Sheveleva, 2011. A cladoceran similar to the American *Diaphanosoma brevireme* Sars, 1901 (Crustacea: Cladocera: Sididae) found in the Russian Far East, *Arthropoda Selecta* 20: 145-148.
- Korovchinsky, N. M. & B. V. Timms, 2011. A new species of the genus *Diaphanosoma* Fischer (Crustacea: Cladocera: Sididae) from Claypans in Western Australia, *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 133: 1-10.
- Kotov, A. A., 2008. Importance of male and ephippial female characters for differentiating three Palaearctic species of *Macrothrix* Baird, 1843 (Cladocera: Anomopoda), with a redescription of *Macrothrix dadayi* Behning, 1941, *Ann.* 44: 45-61.
- Kotov, A. A. & M. Alonso, 2010. Two new species of *Leydigia* Kurz, 1875 (Chydoridae, Cladocera) from Spain, *Zootaxa* 2673: 39-55.
- Kotov, A. A. & M. Elías-Gutiérrez, 2009. A Phylogenetic Analysis of *Ilyocryptus* SARS, 1862 (Cladocera: Ilyocryptidae), *Int.* 94: 208-225.
- Kotov, A. A., S. Ishida & D. J. Taylor, 2009. Revision of the genus *Bosmina* Baird, 1845 (Cladocera: Bosminidae), based on evidence from male morphological characters and molecular phylogenies, *Zoological Journal of the Linnean Society* 156: 1-51.
- Kotov, A. A. & P. Stifter, 2006. Cladocera: Family Ilyocryptidae (Branchiopoda: Cladocera: Anomopoda), Kenobi Productions & Backhuys Publishers, Leiden-Ghent, 172 pp.
- Kotov, A. A. & D. J. Taylor, 2010. A new African lineage of the *Daphnia obtusa* group (Cladocera: Daphniidae) disrupts continental vicariance patterns, *Journal of Plankton Research* 32: 937-949.
- Kraus, K., 1986. *Daphnia laevis tarasca* ssp. nov., a lake-dwelling subspecies of *Daphnia laevis* Birge, 1879 (Cladocera: Daphnidae) from Patzcuaro Lake, *Crustaceana* 3: 225-230.
- Leon-Regagnon, V., 2010. Evidence of new species of *Haematoloechus* (Platyhelminthes: Digenea) using partial cox1 sequences, *Mitochondrial Dna* 21: 12-17.
- Ma, Q., Y. L. Xi, J. Y. Zhang, X. L. Wen & X. L. Xiang, 2010. Differences in life table demography among eight geographic populations of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera) from China, *Limnologia* 40: 16-22.
- Martinez-Salazar, E. A. & V. Leon-Regagnon, 2010. Molecular evidence that *Langeronia macrocirra* and *Langeronia* cf. *parva* (Trematoda: Pleurogenidae) parasites of anurans from Mexico are conspecific, *Mitochondrial Dna* 21: 3-11.

- Matthes, M., 2004. Low genotypic diversity in a *Daphnia pulex* population in a biomanipulated lake: the lack of vertical and seasonal variability, *Hydrobiologia* 526: 33-42.
- Mergeay, J., D. Verschuren & L. De Meester, 2005. Cryptic invasion and dispersal of an American *Daphnia* in East Africa, *Limnology and Oceanography* 50: 1278-1283.
- Meusnier, I., G. A. C. Singer, J. F. Landry, D. A. Hickey, P. D. N. Hebert & M. Hajibabaei, 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis, *BMC Genomics* 9.
- Montero-Pau, J., A. Gomez & J. Munoz, 2008. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs, *Limnology and Oceanography-Methods* 6: 218-222.
- Montiel-Martínez, A., J. Ciro-Pérez, E. Ortega-Mayagoitia & M. Elías-Gutiérrez, 2008. Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiptomus garciai* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species, *Journal of Plankton Research* 30: 1079-1093.
- Nandini, S., M. H. Valdez & S. S. S. Sarma, 2005. Life history characteristics of cladocerans (cladocera) fed on wastewaters, *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 33: 133-141.
- Nicolalde-Morejón, F., F. Vergara-Silva, J. González-Astorga, D. W. Stevenson, A. P. Vovides & V. Sosa, 2011. A character-based approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combinations for DNA barcoding, *Cladistics* 27: 150-164.
- Oceguera-Figueroa, A., V. Leon-Regagnon & M. E. Siddall, 2010. DNA barcoding reveals Mexican diversity within the freshwater leech genus *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae), *Mitochondrial Dna* 21: 24-29.
- Orlova-Bienkowskaja, M. J., 2001. Cladocera: Anomopoda: Daphniidae: genus *Simocephalus*, Backhuys Publishers, Leiden, 130 pp.
- Pena-Aguado, F., J. Morales-Ventura, S. Nandini & S. S. S. Sarma, 2008. Influence of vertebrate and invertebrate infochemicals on the population growth and epizoic tendency of *Brachionus rubens* (Ehrenberg) (Rotifera : Brachionidae), *Allelopathy Journal* 22: 123-130.
- Pereira, L. H. G., G. M. G. Maia, R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira, 2010. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, Sao Paulo, Brazil, *Mitochondrial Dna* 21: 1-9.
- Prado, B. R., C. Pozo, M. Valdez-Moreno & P. D. N. Hebert, 2011. Beyond the Colours: Discovering Hidden Diversity in the Nymphalidae of the Yucatan Peninsula in Mexico through DNA Barcoding, *Plos One* 6: e27776.
- Quiroz-Vazquez, P. & M. Elias-Gutierrez, 2009. A New Species of the Freshwater Cladoceran Genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Cladocera: Anomopoda) from the Semidesert Northern Mexico, Highlighted by DNA Barcoding, *Zootaxa* 2236: 50-64.
- Ratnasingham, S. & P. D. N. Hebert, 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org), *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.

Reyna-Fabián, M., J. P. Laclette, M. P. Cummings & M. García-Valera, 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.

Richard, J., 1894. Entomostracés recueillis dans lac Toba (Sumatra), *Annali del Museo Civico di Storia Naturale "Giacomo Doria"* 14: 565-578.

Sarma, S. S. S., S. Nandini, F. Pena-Aguado & D. J. Chaparro-Herrera, 2009. Effects of asplanchnin allelochemical on the toxicity of triasulphuron herbicide to rotifer *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae), *Allelopathy Journal* 23: 485-492.

Sarma, S. S. S., V. M. Peredo-Alvarez & S. Nandini, 2007. Comparative study of the sensitivities of neonates and adults of selected cladoceran (Cladocera : Crustacea) species to acute toxicity stress, *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 42: 1449-1452.

Schröder, T. & E. J. Walsh, 2007. Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species, *Hydrobiologia* 593: 129-140.

Schroder, T. & E. J. Walsh, 2010. Genetic differentiation, behavioural reproductive isolation and mixis cues in three sibling species of Monogonont rotifers, *Freshwater Biology* 55: 2570-2584.

Segers, H., 1995. Nomenclatural consequences of some recent studies on *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Brachionidae), *Hydrobiologia* 313: 121-122.

Segers, H., 2001. Zoogeography of the Southeast Asian Rotifera, *Hydrobiologia* 446: 233-246.

Segers, H. & W. H. De Smet, 2008. Diversity and endemism in Rotifera: a review, and *Keratella* Bory de St Vincent, *Biodiversity and Conservation* 17: 303-316.

Segers, H. & G. Murugan, 1993. On the taxonomy of the Brachionidae: description of *Plationus* n. gen. (Rotifera, Monogononta), *Hydrobiologia* 268: 1-8.

Sinev, A. Y. & M. M. Atroschenko, 2011. Revision of the genus *Alonopsis* Sars, 1862 and its position within Aloninae (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae), *Zootaxa* 2800: 1-17.

Smirnov, N. N., 1974. Fauna of the U.S.S.R.: Crustacea. Chydoridae, Keter Publishing House, Jerusalem, 644 pp.

Smirnov, N. N., 1996. Cladocera: The Chydorinae and Sayciinae (Chydoridae) of the World, SPB Academic Publishing, Amsterdam, 197 pp.

Steiner, C. F., 2004. *Daphnia* dominance and zooplankton community structure in fishless ponds, *Journal of Plankton Research* 26: 799-810.

Steinke, D., T. S. Zemlak & P. D. Hebert, 2009. Barcoding Nemo: DNA-Based Identifications for the Ornamental Fish Trade, *Plos One* 4.

Stelzer, C. P. & T. W. Snell, 2003. Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue, *Limnology and Oceanography* 48: 939-943.

Suatoni, E., S. Vicario, S. Rice, T. Snell & A. Caccone, 2006. An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer - *Brachionus plicatilis*, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 86-98.

Tovar-Hernández, M. & L. F. Carrera-Parra, 2011. *Megalomma* Johansson, 1925 (Polychaeta: Sabellidae) from America and other world-wide localities, and phylogenetic relationships within the genus, *Zootaxa* 2861: 1-71.

Valdez-Moreno, M., N. V. Ivanova, M. Elias-Gutierrez, S. Contreras-Balderas & P. D. N. Hebert, 2009a. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes, *Journal of Fish Biology* 74: 377-402.

Valdez-Moreno, M., C. Quintal-Lizama, R. Gómez-Lozano & M. C. García-Rivas, 2012. Monitoring an Alien Invasion: DNA Barcoding and the Identification of Lionfish and Their Prey on Coral Reefs of the Mexican Caribbean, *Plos One* 7: e36636.

Valdez-Moreno, M., L. Vázquez-Yeomans, M. Elías-Gutiérrez, N. V. Ivanova & P. D. N. Hebert, 2010a. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management., *Marine and Freshwater Research* 61: 665-671.

Valdez-Moreno, M. E., N. V. Ivanova, M. Elias-Gutierrez, S. Contreras-Balderas & P. D. N. Hebert, 2009b. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes, *Journal of Fish Biology* 74: 377-402.

Valdez-Moreno, M. E., L. Vázquez-Yeomans, M. Elías-Gutiérrez, N. V. Ivanova & P. D. N. Hebert. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research* 61, 665-671. 2010b.

Ref Type: Magazine Article

Valdez-Moreno, M., N. V. Ivanova, M. Elías-Gutiérrez, S. Contreras-Balderas & P. D. N. Hebert, 2007. DNA barcodes in freshwater fishes from Mexico and Guatemala, *Journal of Fish Biology* Submitted.

Van Damme, K., A. A. Kotov & Dumont H.J., 2010. A checklist of names in *Alona* Baird 1843 (Crustacea: Cladocera: Chydoridae) and their current status: an analysis of the taxonomy of a lump genus, *Zootaxa* 2330: 1-63.

Van Damme, K. & A. Y. Sinev, 2011. A new genus of cave-dwelling microcrustaceans from the Dinaric Region (south-east Europe): adaptations of true stygobitic Cladocera (Crustacea: Branchiopoda), *Zoological Journal of the Linnean Society* 161: 31-52.

Vasquez-Yeomans, L., L. Carrillo-Bribiezca, S. Morales, E. Malca, J. A. Morris, T. Schultz & J. T. Lamkin, 2011. First larval record of *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae) collected from the ichthyoplankton in the Atlantic, *Biological Invasions* DOI 10.1007/s10530-011-9968-z.

Victor, B. C., 2007. *Coryphopterus kuna*, a new goby (Perciformes : Gobiidae : Gobiinae) from the western Caribbean, with the identification of the late larval stage and an estimate of the pelagic larval duration, *Zootaxa* 51-61.

Victor, B. C., L. Vasquez-Yeomans, M. Valdez-Moreno, L. Wilk, D. L. Jones, M. R. Lara, C. Caldwell & M. Shivji, 2010. The larval, juvenile, and adult stages of the Caribbean goby, *Coryphopterus kuna* (Teleostei: Gobiidae): a reef fish with a pelagic larval duration longer than the post-settlement lifespan, *Zootaxa* 2346: 53-61.

Walsh, E. J., T. Schröder, R. Wallace & R. Rico-Martinez, 2009a. Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters, *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung der Limnologie* 30: 1046-1050.

Walsh, E. J., T. Schröder, R. L. Wallace, J. V. Ríos-Arana & R. Rico-Martinez, 2009b. Rotifers from selected inland saline waters in the Chihuahuan Desert of Mexico, *Saline Systems* 4: doi:10.1186/1746-1448-4-7.

Ward, R. D., 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes, *Molecular Ecology Resources* 9: 1077-1085.

Will, K. W., B. D. Mishler & Q. D. Wheeler, 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy, *Systematic Biology* 54: 844-851.

Wong, E. H. K., M. S. Shivji & R. H. Hanner, 2009. Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach, *Molecular Ecology Resources* 9: 243-256.

Xiang, X. L., Y. L. Xi, X. L. Wen, J. Y. Zhang & Q. Ma, 2010. Spatial patterns of genetic differentiation in *Brachionus calyciflorus* species complex collected from East China in summer, *Hydrobiologia* 638: 67-83.

Zaldivar-Riveron, A., J. J. Martinez, F. S. Ceccarelli, V. S. Jesus-Bonilla, A. C. Rodriguez-Perez, A. Resendiz-Flores & M. A. Smith, 2010. DNA barcoding a highly diverse group of parasitoid wasps (Braconidae: Doryctinae) from a Mexican nature reserve, *Mitochondrial Dna* 21: 18-23.