



11281

21

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Análisis filogenético del phylum Acanthocephala usando secuencias de genes mitocondriales (COI y 16S del RNA ribosomal) y nucleares (5.8S, 18S, ITS1 e ITS2 del RNA ribosomal).

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Presenta:

El Biol. José Martín García Varela.

Tutor: Dr. Juan Pedro Laclette San Román.



BIOMEDICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA

DEDICATORIAS

A mi maravillosa esposa (Angélica González) por todo su cariño, comprensión y por todos los momentos hermosos que hemos compartido juntos.

A mi mamá por todo su amor y cariño que es incondicional.

A toda mi familia por los momentos felices que hemos compartido junto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Juan Pedro Laclette por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación durante más de cinco años. A los Drs. Gerardo Pérez Ponce de León, Daniel Piñero Dalmau y Juan Pedro Laclette por ser parte de mi comité tutorial así como de sus consejos que sin lugar a duda mejoraron mi aprovechamiento académico durante mi estancia en el Doctorado. A los Drs. Marcos Rafael Lamothe, Juan Pedro Laclette, Luis Eguiarte, Ken Oyama, Antonio Lazcano, María Elena Álvarez-Buylla y Ma. Esperanza Martínez Romero quienes amablemente aportaron comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar la presentación de este trabajo.

A CONACYT y DGEP por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Doctorado.

A PAEP por el apoyo económico otorgado al presente proyecto de tesis No. 102327.

Al Dr. Michael. P. Cummings, por permitirme realizar una estancia de investigación durante el verano del 2000, así como de invitarme a participar en la Workshop on Molecular Evolution en Marine Biological Laboratory, Woodshole Ma.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron en la elaboración de este trabajo. A la M. en C. Patricia de la Torre por su asistencia técnica en el laboratorio y por su ayuda en la secuenciación manual y automatizada del DNA. Al M. en C. Carlos Castellanos por su apoyo técnico durante el uso del material radioactivo. Al M. en C. Luis García del Instituto de Biología por su ayuda en la colecta e identificación del material helmintológico. A la Dra. Angélica González Oliver de la Facultad de Ciencias por su valiosa ayuda durante la purificación y amplificación del DNA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis compañeros de laboratorio del Instituto de biomédicas: Pedro Ostoa, Julio César Carrero, Patricia de la Torre, Dayana Rodríguez, José Vázquez, Pavel Petrossian, Laura Vargas, Carlos Solís, Mariana Mondragón, Celia Caballero, Ana Paulina y Margarita Vargas así como a Ulises Razo y Agustín Jiménez del Instituto de Biología por su apoyo durante todos estos años.

A todos mis familiares con quienes he disfrutado muchos momentos agradables en especial a mi mamá Carmen Varela por todo su amor y cariño. A mi ángel que esta siempre junto a mí. A todos mis hermanos (Alfonso, Manolo, Paz, Fernando, Jorge y Ricardo). A todos mis sobrinos quienes ya son muchos en especial a Mirna Grisel y Janet. A mis suegros Otilio González y Clarita Oliver. A mis cuñados David, Reina, Hugo, Ivette y Clarita por ser tan amables y chistosos. Al tío Jorge González por su amistad y sus buenos consejos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN	5
3.1 <i>Características generales del Phylum Acanthocephala</i>	
3.2 <i>Ciclos de vida</i>	
3.3 <i>Relación del Phylum Acanthocephala con otros Phyla</i>	
IV. OBJETIVOS	10
V. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1 <i>Colecta del material biológico</i>	
5.2 <i>Purificación del DNA genómico</i>	
5.3 <i>Amplificación y secuenciación del gen 18S rRNA</i>	
5.4 <i>Amplificación y secuenciación del gen 18S RNA ribosomal de Polyacanthorhynchus caballeroi y Rhadinorhynchus sp.</i>	
5.5 <i>Amplificación y secuenciación de los genes mitocondriales 16S rRNA, citocromo oxidasa I (COI) y del gen nuclear 5.8S rRNA incluyendo los espaciadores transcritos internos (ITS 1 - ITS2)</i>	
5.6 <i>Alineación de las secuencias y análisis filogenéticos de las secuencias 18S rRNA</i>	
5.7 <i>Análisis filogenético del Phylum Acanthocephala para determinar la existencia de la clase Polyacanthocephala.</i>	
5.8 <i>Análisis filogenético de la clase Archiacanthocephala</i>	
5.9 <i>Análisis filogenético del género Corynosoma</i>	
VI. RESULTADOS	18
6.1 <i>Análisis filogenético de tres clases del phylum Acanthocephala y la relación con el Phylum Rotifera</i>	
6.2 <i>Relación entre Acanthocephala y Rotifera</i>	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 6.3 16S RNA ribosomal Garey et al., (1998)
- 6.4 18S RNA ribosomal de Garey et al., (1996)
- 6.5 Nuestra base de datos expandida del 18S RNA ribosomal usando el alineamiento de Garey et al., (1996)
- 6.6 Análisis de nuestra base de datos expandida del 18S RNA Ribosomal con nuestro alineamiento y adicionando las secuencias de Garey et al.,(1996)
- 6.7 Relaciones filogenéticas del Phylum Acanthocephala
- 6.8 Relaciones filogenéticas de la clase Polyacanthocephala con las tres clases de Acanthocephala
- 6.9 Resultados del análisis filogenético de la clase Archiacanthocephala usando el 16S RNA mitocondrial
- 6.91 COI de Archiacanthocephala
- 6.92 18S rRNA nuclear de Archiacanthocephala
- 6.93 RNA nuclear de ITS1- 5.8S-ITS2 de Archiacanthocephala
- 6.94 Análisis combinado el cual incluye el COI, 16S RNA mitocondrial y 18S RNA nuclear de Archiacanthocephala
- 6.95 Análisis del ITS 1, ITS2 y 5.8S RNA ribosomal del género Corynosoma

VII. DISCUSIÓN26

- 7.1 Relación entre Acanthocephala y Rotifera
- 7.2 Relaciones filogenéticas dentro del Phylum Acanthocephala
- 7.3 Es Polyacanthocephala una clase real?
- 7.4 Relaciones filogenéticas de la clase Archiacanthocephala
- 7.5 Relaciones filogenéticas de 10 especies del género Corynosoma

VIII. METAS FUTURAS.....34

IX. REFERENCIAS.....35

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE I

Análisis Filogenético Molecular.

APÉNDICE II

Phylogenetic relationships of Acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences (2000). Garcia-Varela M, Pérez Ponce de León G, de la Torre P, Cummings MP, Sarma SS, Laclette JP. *J. Mol. Evol.* **50**:532-40.

APÉNDICE III

Phylogenetic análisis based on 18S Ribosomal RNA gene sequences support the existence of class Polyacanthocephala (Acanthocephala). Martín Garcia-Varela, Michael P. Cummings, Gerardo Pérez Ponce de León, Scott L. Gardner and Juan P. Laclette. Aceptado para su publicación en *Mol. Phylogenetics and Evol*

APÉNDICE IV

Phylogenetic relationships of Archiacanthocephala (Acanthocephala) based on gene sequences of 16S, 5.8S and 18S rRNA. Internal transcribed spacer 1 and 2, and COI. Martín García-Varela, Michael P. Cummings and Juan P. Laclatte. Sometido para su publicación.

APÉNDICE V

Molecular phylogeny of some species of *Corynosoma* (Acanthocephala) using sequences from internal spacer regions ITS1, ITS2 and 5.8S ribosomal RNA genes. Martín García-Varela, Gerardo Pérez Ponce de León, Javier Aznar, Daniel Piñero and Juan P. Laclette. Sometido para su publicación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. RESUMEN

Acanthocephala es un phylum de endoparásitos de vertebrados y artrópodos. El phylum esta dividido en cuatro clases: Archiacanthocephala, Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala y Polyacanthocephala. Las clases se distinguen por caracteres morfológicos tales como la localización del sistema lacunar, la persistencia del saco de ligamento en hembras, el número y forma de las glándulas de cemento presentes en machos, el número y tamaño de ganchos en la proboscis y el tipo de huésped definitivo.

Para comprender las relaciones filogenéticas entre los taxa superiores del phylum Acanthocephala y entre los Acanthocephala y el phylum Rotifera, en el presente proyecto de tesis secuenciamos el gen completo del 18S RNA ribosomal, de once especies de parásitos representantes de las cuatro clases de Acanthocephala, y de cuatro especies de Rotifera; tres son miembros de la clase Monogononta y un Bdelloideo. Las relaciones filogenéticas fueron inferidas por el método de máxima verosimilitud (maximum likelihood), utilizando estas nuevas secuencias y otras obtenidas en bases de datos públicas (Genbank). Los resultados del análisis filogenético mostraron que Acanthocephala es un grupo monofilético. La clase Archiacanthocephala es el grupo más basal mientras que las clases Eoacanthocephala y Polyacanthocephala, formaron un clado que aparece como grupo hermano de Palaeacanthocephala. Por otro lado, se comprobó el origen monofilético del phylum Rotifera, representado en los análisis por el clado llamado Eurotatoria, el cual incluyó las clases Bdelloidea y Monogononta. Eurotatoria aparentemente es el grupo hermano del phylum Acanthocephala (Ver Apéndices II y III).

También analizamos las relaciones filogenéticas dentro de la clase Archiacanthocephala, para este trabajo usamos cinco especies de Archiacanthocephala que representan los ordenes (Giganthorhynchida, Moniliformida y Oligacanthorhynchida) y tres rotíferos de la clase Monogononta que fueron usados como grupos externos. Para este proyecto, analizamos secuencias parciales de los genes mitocondriales del COI y del 16S RNA, los genes nucleares para 18S, 5.8S, incluyendo los espaciadores internos (ITS1-ITS2). Las relaciones filogenéticas fueron inferidas por máxima verosimilitud, para cada una de las bases datos y para el análisis combinado el cual incluyó el COI, 16S RNA y el 18S rRNA. Todos los análisis mostraron Archiacanthocephala como monofilético.

Moniliformida aparentemente fue el orden más basal en todos los análisis, excepto con gen 16S RNA mitocondrial. El orden Oligacanthorhynchida ocupó la posición más basal en todos los análisis, estos resultados no apoyan la idea de que Oligacanthorhynchida es el ancestro de todos los acantocéfalos basado en la presencia de los protonefridios (sistema excretor), la presencia de protonefridios es considerado como un rasgo primitivo que ha sido conservado en el orden Oligacanthorhynchida y perdido en todos los acantocéfalos (Apéndice IV).

Finalmente se evaluaron las relaciones filogenéticas de 10 especies del género *Corynosoma*, estos parásitos se asocian a mamíferos y aves marinas distribuidos en todo el mundo. En este proyecto secuenciamos los espaciadores transcritos internos ITS1, ITS2 y el gen 5.8S RNA ribosomal. El análisis de máxima verosimilitud, mostró que el género *Corynosoma* es monofilético. *C. cetaceum* fue la especie más basal del cado. El árbol mostró varios clados, uno incluyó dos especies (*C. australe* y *C. bullosum*), otro incluyó a (*C. validum* y *C. villosum*), mientras que *C. caspicum*, es la especie hermana del clado compuesto por *C. alaskensis*, *C. hamanni*, *C. enhydri* y *C. strumosum*. El análisis de máxima parsimonia mostró una topología similar, excepto por la politomía que incluyó a *C. alaskensis* y *C. hamanni*. La variación nucleotídica entre las especies de *Corynosoma* fue del 1 al 4 %, mientras que *C. cetaceum*, mostró una variación del 10 al 11% con respecto a otras especies del género *Corynosoma*. *C. cetaceum* exhibió una alta tasa de evolución y como evidencia mostró la rama más larga dentro de *Corynosoma* (Apéndice V).

II. ABSTRACT

Acanthocephala (thorny-headed worms) is a phylum of endoparasites of vertebrates and arthropods. The phylum traditionally has been divided into 3 classes: Archiacanthocephala, Palaeacanthocephala, and Eoacanthocephala, although a fourth class, Polyacanthocephala, has been recently proposed. These classes are distinguished by morphological characters such as location of lacunar canals, persistence of ligament sacs in females, number and type of cement glands in males, number and size of proboscis hooks, host taxonomy and ecology. To better understand the phylogenetic relationships within Acanthocephala, and between Acanthocephala and Rotifera, we sequenced the complete 18S rRNA genes of 11 species from the four classes of Acanthocephala, and 4 species of Rotifera from classes Bdelloidea and Monogononta. Phylogenetic relationships were inferred by maximum likelihood analyses of these new sequences and others previously determined. The analyses showed that Acanthocephala is monophyletic and includes three clades, Archiacanthocephala as the most basal group within the phylum, whereas classes Polyacanthocephala + Eoacanthocephala formed a clade, with Palaeacanthocephala as its sister group. These results are consistent with the view of that Polyacanthocephala represents an independent class within phylum Acanthocephala.

Archiacanthocephala exhibited a slower rate of evolution at the nucleotide level, as evidenced by shorter branch lengths for the group. We found statistically significant support for the monophyly of Rotifera, represented in our analysis by species from the clade Eurotatoria, that includes classes Bdelloidea and Monogononta. Eurotatoria also appears as the sister group to Acanthocephala.

Another objective of this thesis was to establish phylogenetic relationships among the members of the class Archiacanthocephala, which are endoparasites of terrestrial mammals and birds, distributed worldwide. The class comprises four orders: Apororhynchida, Gigantorhynchida, Moniliformida and Oligacanthorhynchida, each with a single family. The classification of Archiacanthocephala is based on morphological and ecological characters. To better understand the phylogenetic relationships among the Archiacanthocephala we examined five species of Archiacanthocephalans that represent three orders (Gigantorhynchida, Moniliformida and Oligacanthorhynchida) and three

outgroup species of Rotifera class Monogononta. For these taxa we analysed partial mitochondrial gene sequences for COI and 16S rRNA, the nuclear genes for 5.8S and 18S rRNA including the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). The phylogenetic relationships were inferred by maximum-likelihood analyses data for each gene and for the sequences of COI, 16S rRNA and 18S rRNA combined. All analyses yielded Archiacanthocephala as monophyletic. Moniliformida appeared as the most basal order in all analysis except when the 16S data set was used alone. Oligacanthorhynchida is a more derived group within Archiacanthocephala. This is in contrast to proposals placing Oligacanthorhynchida ancestral to Archiacanthocephala and to all Acanthocephala, based on the presence of protonephridia (excretory system). Thus, the presence of protonephridia is a primitive trait that has been conserved in Oligacanthorhynchida and lost in other taxa within Acanthocephala.

Finally we inferred the relationships among some species of genus *Corynosoma* (Acanthocephala), which are parasites that inhabit the digestive tract of marine mammals and sea birds. Their generic classification is based on the size and number of hooks in the proboscis, and the number of spines in the dorsal and ventral regions of the body. We evaluated the phylogenetic relationships among 10 nominal species of *Corynosoma*, using the internal transcribed spacer sequences (ITS 1, ITS 2) and of 5.8S ribosomal RNA. Maximum likelihood analysis indicated that *Corynosoma* is a monophyletic group. *C. cetaceum* was placed as the most basal species. The tree yielded several clades, one included 2 species (*C. australe* and *C. bullosum*), other included (*C. validum* and *C. villosum*). *C. caspicum* was the sister species to the clade formed by *C. alaskensis*, *C. hamanni*, *C. enhydri* and *C. strumosum*. Maximum parsimony analyses showed the same topology, except for the polytomy, which included *C. alaskensis* and *C. hamanni*. The nucleotide variation among the species of *Corynosoma* had a range of 1 to 4 % for ITS (except to *C. cetaceum* which had a variation of 10 to 11% with respect other members of the genus *Corynosoma*). *C. cetaceum* had a high rate of substitution at the nucleotide level, as evidence it shows longest branch.

III. INTRODUCCIÓN

La taxonomía y los esquemas filogenéticos propuestos para los helmintos están basados en estudios morfológicos, fisiológicos, embriológicos y del tipo de huésped. Sin embargo, las clasificaciones propuestas han sufrido modificaciones. En años recientes, los estudios de sistemática molecular han tenido un fuerte impacto en definir las relaciones entre los helmintos y en general entre los invertebrados. Los marcadores moleculares más utilizados son los genes ribosomales: 18S, 5.8 y 28S rRNA. (Woese, 1987; Baverstock, *et al.*, 1991; Morris, 1993; Wainright, *et al.*, 1993; Patterson, *et al.*, 1993; Littlewood *et al.*, 1998; Giribet *et al.*, 2000). Una de las razones que justifican su gran uso es la presencia de regiones conservadas y variables que pueden ser usadas para diferenciar desde taxa superiores hasta especies. Otra razón que justifica su uso es que en la mayoría de los seres vivos los genes ribosomales se encuentran en cadenas de más de cien copias lo que facilita su detección y caracterización. Además, al encontrarse en grandes grupos de copias vecinas, se produce un fenómeno de recombinación continua que homogeniza sus secuencias nucleotídicas (Hillis y Dixon, 1991).

Las regiones codificadoras de genes ribosomales nucleares muestran una baja tasa de evolución por lo que se han usado como marcadores moleculares para investigar relaciones de organismos muy antiguos, así como relaciones entre phyla, clases, familias etc. Particularmente la subunidad menor de los genes ribosomales ha sido la región más secuenciada para soportar o refutar hipótesis filogenéticas por ejemplo: (Littlewood *et al.*, 1998; Giribet *et al.*, 2000).

Otras regiones también usadas son los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2; estos segmentos tienen una alta variabilidad, la rápida tasa de evolución en estas regiones no-codificadoras ha permitido usarlas como marcadores moleculares para estudiar las relaciones entre especies de un mismo género. Además el ITS1 e ITS2 usualmente son regiones pequeñas (800-1200 pb), delimitadas por regiones conservadas en zonas codificadoras, lo que facilita el diseño de oligonucleótidos universales para amplificarlos por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Lee y Taylor, 1991; Baldwin, 1992; Pleyte *et al.*, 1992;). Estudios previos han demostrado que el ITS1 de los Digéneos, exhiben suficiente variación para diferenciar especies (Luton *et al.*, 1992). El ITS2 también ha sido usado para diferenciar especies del género *Fasciola*

(Adlar *et al.*, 1993). Recientemente se ha usado los dos espaciadores internos, así como el gen 5.8S del rRNA, para diferenciar especies de *Echinostoma* (Morgan y Blair, 1995). Estos y otros estudios han demostrado que los espaciadores transcritos internos son marcadores sensibles para diferenciar especies cercanamente relacionadas.

El DNA mitocondrial también ha sido usado en análisis filogenéticos, por su herencia materna independientemente del DNA nuclear. En particular el RNA mitocondrial fue usado para inferir las relaciones filogenéticas de especies que divergieron recientemente. Las secuencias del DNA mitocondrial que han recibido una mayor atención son los genes del RNA ribosomal (12S y 16S), citocromo oxidasa I y II, así como el citocromo b y su región de control (Avisé *et al.*, 1987).

La sistemática molecular de helmintos particularmente los Platyhelminthes y los Nematoda han recibido un gran interés, ya que muchos de estos gusanos afectan al ser humano (Blair *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 1998). Sin embargo, otros grupos de helmintos han pasado desapercibidos; tal es el caso del phylum Acanthocephala, que es un grupo relativamente pequeño con 1150 especies conocidas en todo el mundo (Conway y Crompton, 1982). Este grupo tiene relaciones ecológicas importantes como parásitos ya que habitan el intestino de vertebrados. La actual situación del phylum representa una oportunidad para iniciar estudios de sistemática molecular y aclarar su historia natural. Puesto que los acantocéfalos están siempre asociados con huéspedes definitivos vertebrados, un gran número de estas asociaciones parecen ser de emergencia reciente.

3.1 Características generales del Phylum Acanthocephala

Como muchos otros grupos de parásitos, los acantocéfalos son un excelente modelo para estudiar los principios evolutivos y entender las asociaciones ecológicas con sus huéspedes. Los acantocéfalos son organismos pseudocelomados, de cuerpo blando, cilíndricos, de simetría bilateral y se caracterizan por tener una estructura retráctil cubierta de ganchos llamada proboscis ó trompa (Fig.1). Estos parásitos carecen de aparato respiratorio y circulatorio así como de aparato digestivo, por lo que la pared del cuerpo absorbe los nutrientes que son depositados en el sistema lagunar que funciona como un aparato circulatorio. El cuerpo de estos gusanos se divide en presoma y

A



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B



Fig. 1. Proboscis. **(A)** *Oncicola* sp. (Archiacanthocephala); **(B)** *Echinorhynchus gadi* (Palaeacanthocephala).

metasoma. El presoma comprende la proboscis, el cuello, el receptáculo de la proboscis y los lemniscos que se originan en la base del cuello (Fig. 2). En el metasoma o tronco se encuentran los órganos reproductores. Los machos presentan un par de testículos, una o varias glándulas de cemento nucleadas, mientras que las hembras tienen un ligamento sacular que puede ser persistente (Fig. 3). El phylum está formado por aproximadamente 125 géneros, distribuidos en tres clases: Archiacanthocephala, Eoacanthocephala y Palaeacanthocephala (Nickol y Crompton, 1985). Recientemente, se ha propuesto una clase nueva basada en un número reducido de parásitos asociados a caimanes: Polyacanthocephala. La clase incluye un solo orden con una familia, un género (*Polyacanthorhynchus*), con 4 especies (Amin, 1987). Tres de estas especies, *P. macrorhynchus*, *P. caballeroi* y *P. rhopalorhynchus* parasitan el aparato digestivo de caimanes de América del Sur. La cuarta especie *P. kenyensis* solo se conoce en estadio larval infectando peces dulceacuícolas en Kenia (Tabla 1; Amin y Dezfuli, 1995).

3.2 Ciclos de vida

Los acantocéfalos son endoparásitos de vertebrados de vida silvestre, de animales domésticos y accidentalmente el hombre puede ser un huésped definitivo (Nickol y Crompton 1985). Los acantocéfalos son parásitos en todas las etapas de su ciclo de vida y se transmiten aprovechando relaciones depredador-presa entre sus huéspedes. El ciclo de vida es indirecto y siempre se asocian a un artrópodo como huésped intermediario (crustáceos, insectos y miriápodos). Las formas adultas sexualmente maduras se encuentran en el intestino de varias clases de vertebrados; el adulto se desarrolla cuando el artrópodo es ingerido por el huésped definitivo. En el phylum, la participación de huéspedes paraténicos tales como peces teleósteos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos son importantes en la transmisión de parásitos a otros vertebrados (Figs. 4-5). La diversidad exhibida por los acantocéfalos en cuanto a distribución de huéspedes, morfología y ciclos de vida los convierte en un grupo interesante para estudiar sus relaciones filogenéticas usando marcadores moleculares.

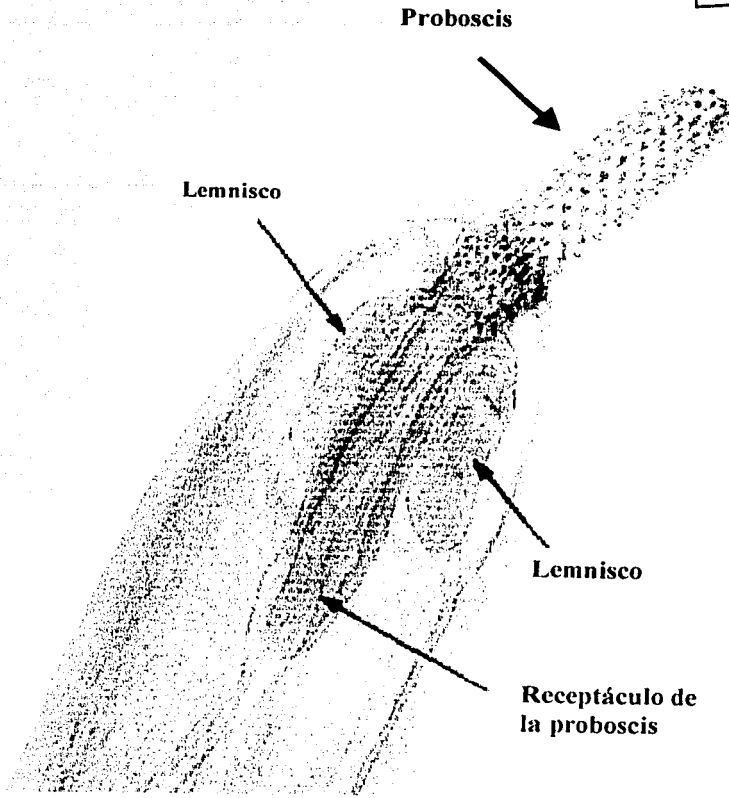


Fig. 2. Presoma de *Echinorhynchus gadi* en donde se localiza la proboscis, receptáculo de la proboscis y un par de lemniscos.

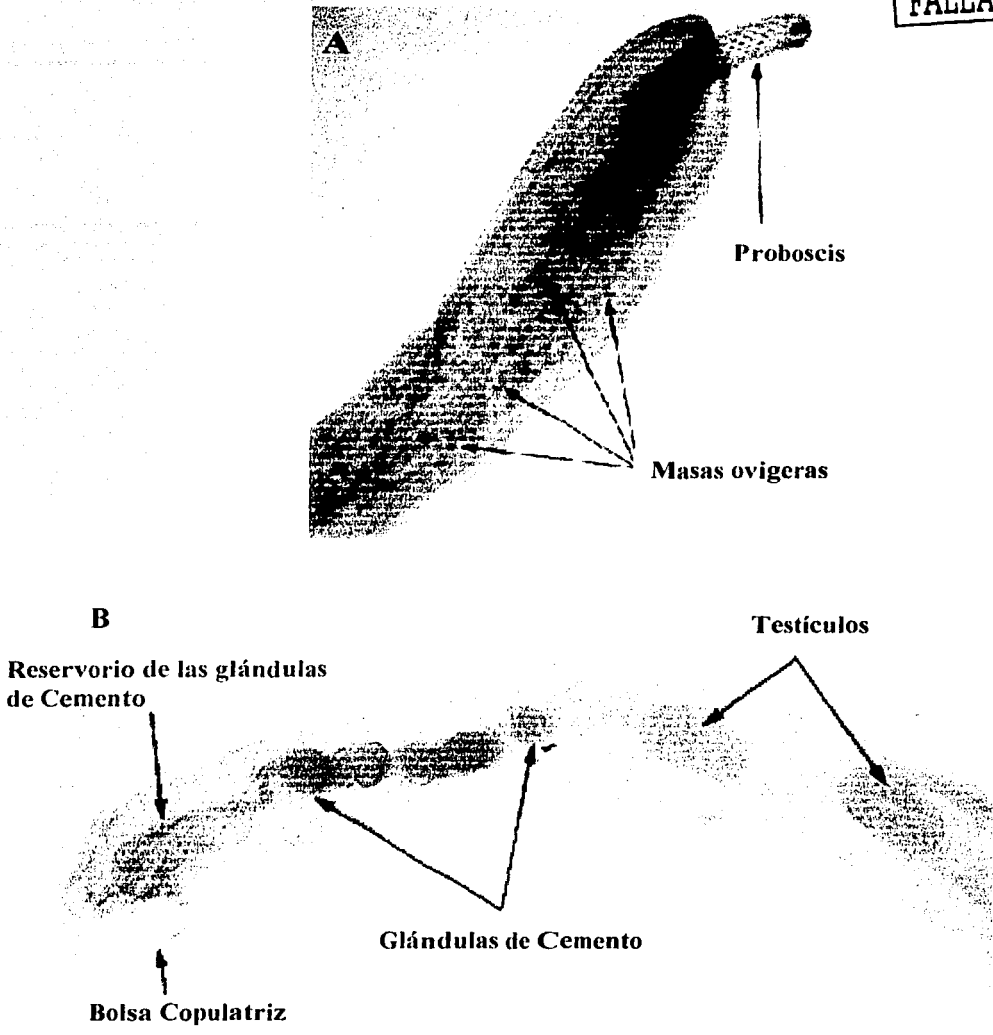


Fig. 3. Metasoma o tronco de *Echinorhynchus gadi* donde se localiza el sistema reproductor (A) Hembra. (B) Macho.

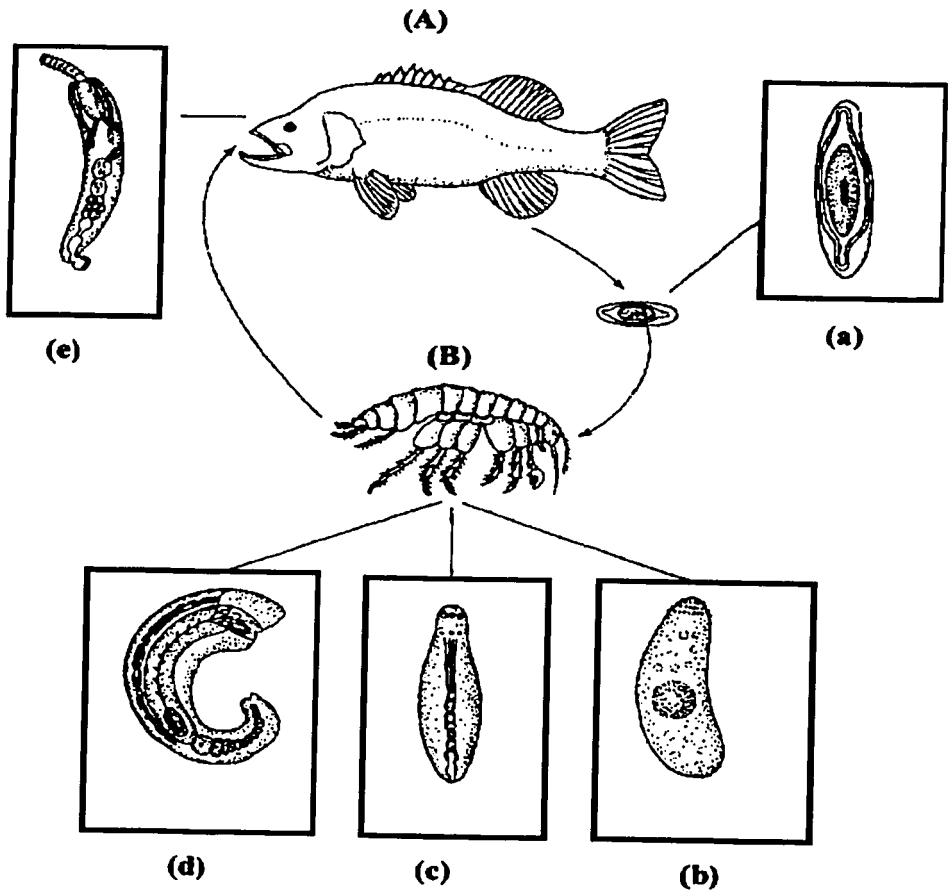


Fig. 4. Ciclo de vida de un acantocéfalo de la clase Eoacanthocephala. Tomado de Schmidt (1988). (A) Huésped definitivo. (B) Huésped intermedio. (a) Huevo. (b) Acanthor. (c) Acanthela. (d) Cistacanto. (e) Adulto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

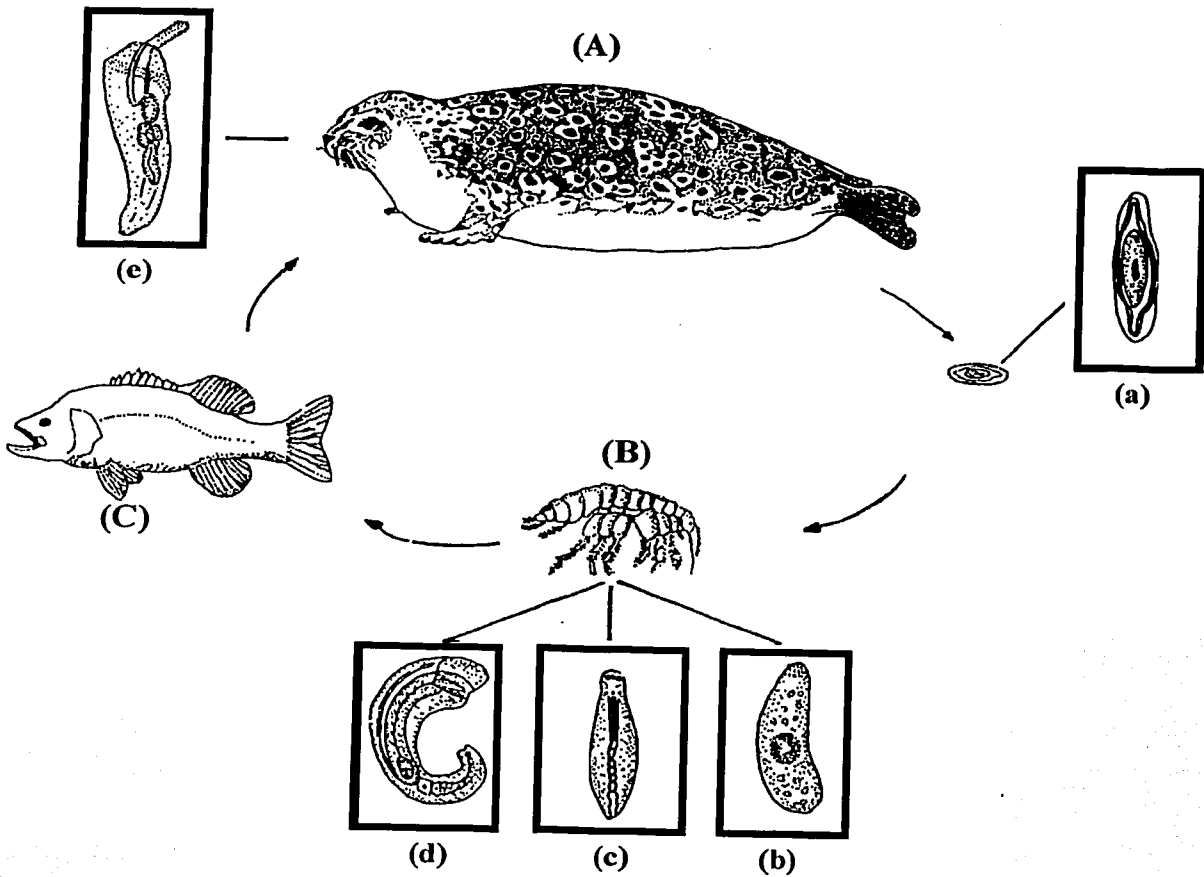


Fig. 5. Ciclo de vida de un acantocéfalo de la clase Palaeacanthocephala. Tomado de Schmidt (1988). (A) Huésped definitivo. (B) Huésped intermediario. (c) Huésped paraténico. (a) Huevo. (b) Acanthor. (c) Acanthela. (d) Cistacanto. (e) Adulto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.3 Relación del Phylum Acanthocephala con otros Phyla

Desde que se describieron por primera vez a los acantocéfalos, su relación con otros taxa ha sido controvertida. Conway Morris y Crompton (1982) propusieron que Acanthocephala y Priapulida formaban un grupo hermano y que el ancestro de este clado era un Kinorhynchida extinto, además los Acanthocephala se relacionaron con otros phyla como: Rotifera, Nematoda, Gastrotricha, Nematomorpha y Priapulida. Todos estos organismos son conocidos como Aschelminthes (Hyman, 1951; Marcus, 1958; Clark, 1979; Brusca y Brusca, 1990; Rupert y Barnes, 1994; Fig. 6). Un análisis filogenético basado en caracteres morfológicos apoyó la hipótesis de que Aschelminthes es una agrupación polifilética (Lorenzen, 1985). Al respecto, se ha propuesto que los rotíferos y los acantocéfalos forman un clado, mientras que los priapulidos se relacionan con los artrópodos (Wallace *et al.*, 1996). Sin embargo, también se ha mencionado que los priapulidos son el grupo hermano de los acantocéfalos, ya que ambos grupos presentan similitudes en el ectodermo (Nielsen *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha propuesto que los acantocéfalos forma el grupo hermano de rotíferos Bdelloideos, con base en caracteres ultraestructurales (Storch y Welsch 1969; Lorenzen, 1985 y Melone *et al.*, 1998).

Las primeras evidencias moleculares en relación a la posición de los rotíferos y de los acantocéfalos dentro de los Metazoarios, fue un estudio donde se analizó el gen 18S rRNA (Winnepenincky *et al.*, 1995). El análisis incluyó un rotífero, *Brachionus plicatilis*, y un acantocéfalo, *Moniliformis moniliformis*. Los resultados mostraron que los Acanthocephala y los Rotifera forman un clado (Fig. 7). Esta hipótesis fue apoyada en estudios recientes, por ejemplo: Giribet y Ribera 1998; Littlewood *et al.*, 1998; Winnepenincky *et al.*, 1998; Wirz *et al.*, 1999; Giribet *et al.*, 2000. Un análisis filogenético con tres secuencias del gen 18S rRNA, de tres especies del phylum Acanthocephala: *Centrorhynchus conspectus*, *Neoechinorhynchus pseudemydis* y *Moniliformis moniliformis*, más una secuencia de rotífero Bdelloidea: *Philodina acuticornis* y un rotífero de la clase Monogononta: *Brachionus plicatilis*, demostraron que los Acanthocephala y los Bdelloidea formaban un clado, el cual fue llamado Lemniscea (Garey *et al.*, 1996; Fig. 8). Está hipótesis fue apoyada en un nuevo trabajo donde se usaron secuencias parciales del gen 16S RNA mitocondrial, que es el gen

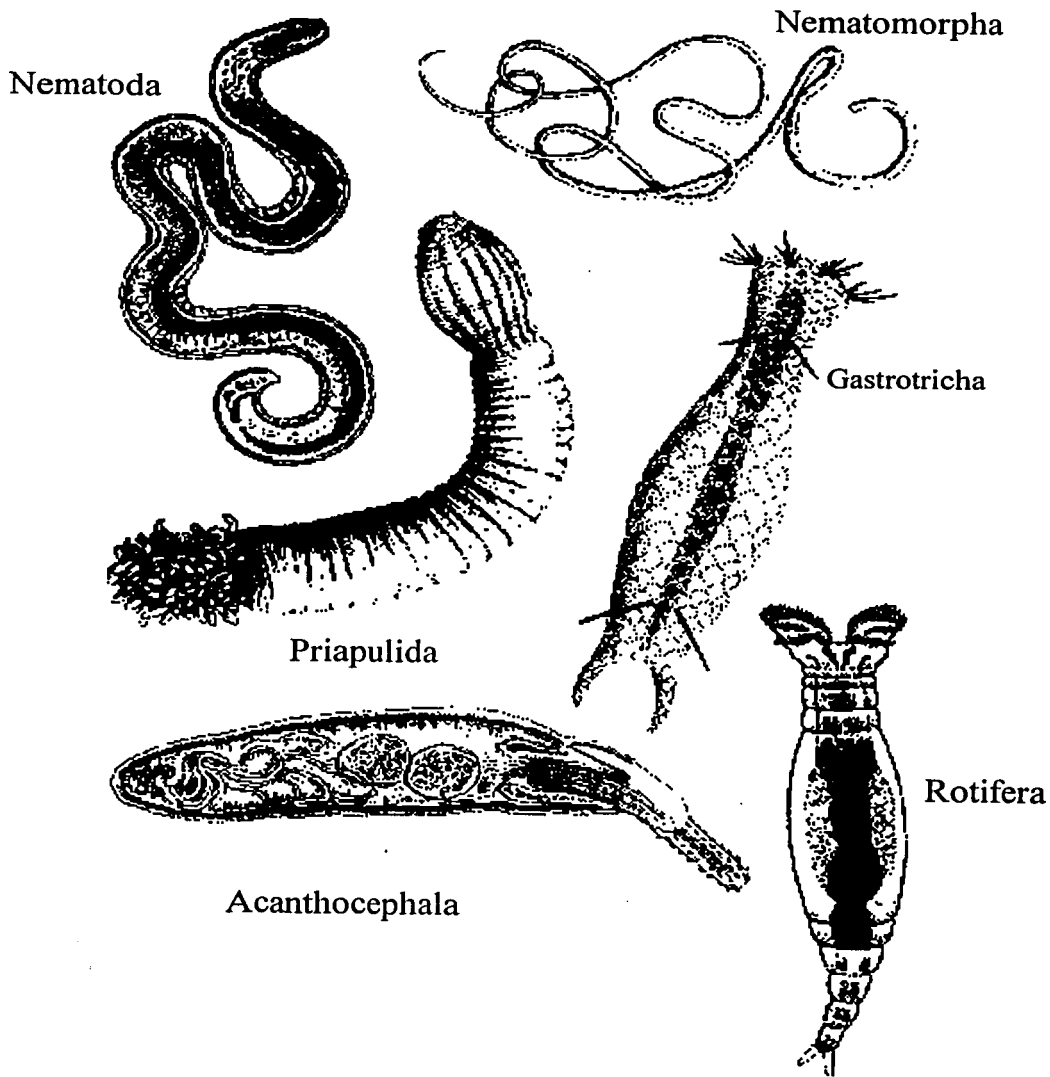


Fig. 6. Phyla clasificados como Aschelminthes (Winnepenninckx *et al.*, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

homólogo al 18S rRNA (Garey *et al.*, 1998; Fig. 9). Nuevos estudios basados en secuencias codificadoras de una proteína de *heat shock* (hsp82), mostraron que las clases Monogononta y Bedelloidea forman un clado, el cual es conocido como Eurotatoria (De Ridder, 1956; Wallace y Colburn, 1989; Melone *et al.*, 1998; Mark Welch, 2000).

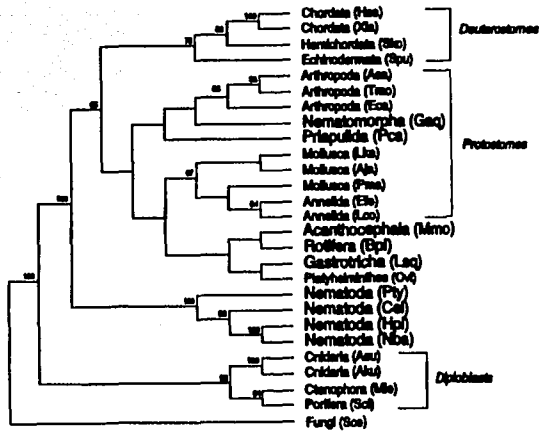


Fig. 7. Análisis basado en la subunidad menor de los genes ribosomales 18S. Donde Rotifera es grupo hermano del phylum Acanthocephala (Winnepenninckx *et al.*, 1995).

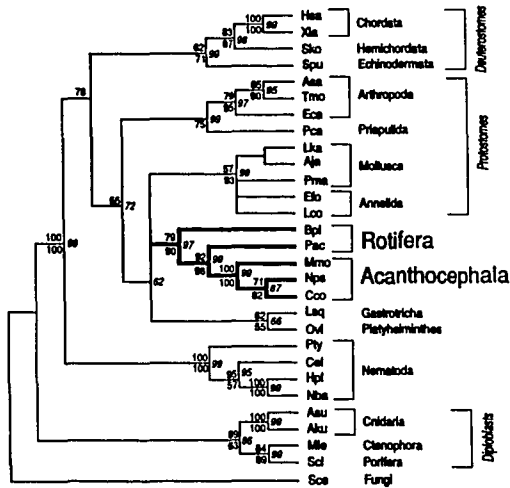


Fig. 8. Análisis filogenético basado en secuencias del gen 18S rRNA, en donde Acanthocephala es parte de Rotifera (Garey *et al.*, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

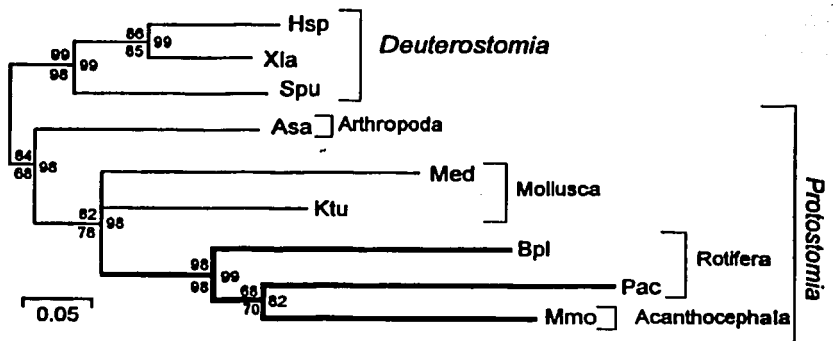


Fig. 9. Análisis filogenético usando secuencias parciales del gen 16S RNA mitocondrial, en donde Acanthocephala es parte de Rotifera (Garey *et al.*, 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla. 1. Clasificación del Phylum Acanthocephala.

Clase	Orden	Familia	Género	Huésped definitivo
Archiacanthocephala	Apororhynchida	Apororhynchidae	<i>Apororhynchus</i>	Aves y Mamíferos terrestres.
	Gigantorhynchida	Gigantorhynchidae	<i>Gigantorhynchus</i> <i>Mediorhynchus</i>	
	Moniliformida	Moniliformidae	<i>Moniliformis</i> <i>Promoniliformis</i>	
	Oligacanthorhynchida	Oligacanthorhynchidae	<i>Macracanthorhynchus</i> <i>Neonicola</i> <i>Nephridiorhynchus</i> <i>Oligacanthorhynchus</i> <i>Oncicola</i> <i>Pachysentis</i> <i>Prosthenorchis</i> <i>Tchadorhynchus</i>	
Eoacanthocephala	Gyracanthocephala	Quadrigyridae	<i>Acanthogyrus</i>	Peces, Anfibios y Reptiles
			<i>Devendrosentis</i> <i>Palliolisentis</i> <i>Pallisentis</i> <i>Raotentis</i> <i>Saccosentis</i> <i>Daltacanthus</i> <i>Quadrigyrus</i>	
	Neoechinorhynchida	Dendronucleatidae	<i>Dendronucleata</i>	
		Neoechinorhynchidae	<i>Atactorhynchus</i> <i>Floridosentis</i> <i>Tanaorhamphus</i> <i>Eocollis</i> <i>Gracilisentis</i> <i>Wolffhugelia</i> <i>Pandosentis</i> <i>Dispiron</i> <i>Gorytocephalus</i> <i>Hebesoma</i> <i>Hexaspiron</i> <i>Microsentis</i> <i>Neoechinorhynchus</i> <i>Octospinifer</i> <i>Octospiniferoides</i>	

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

			<i>Paulisentis</i> <i>Zeylonechinorhynchus</i>	
		Tenuisentidae	<i>Paratenuisentis</i> <i>Tenuisentis</i>	
Palaeacanthocephala	Echinorhynchida	Arhythmacanthidae	<i>Heterosentis</i>	Peces, Anfibios, Reptiles, Aves y Mamiferos terrestres.
			<i>Acanthocephaloides</i> <i>Neoacanthocephaloides</i> <i>Breizacanthus</i> <i>Euzetacanthus</i> <i>Paracanthocephaloides</i>	
		Cavisomidae	<i>Cavisoma</i> <i>Echinorhynchoides</i> <i>Caballerorhynchus</i> <i>Femogibbosus</i> <i>Filisoma</i> <i>Megapriapus</i> <i>Neorhadinorhynchus</i> <i>Pseudocavisoma</i> <i>Rhadinorhynchoides</i>	
		Diplosentidae	<i>Allorhadinorhynchus</i> <i>Golvanorhynchus</i> <i>Diplosentis</i> <i>Pararhadinorhynchus</i>	
		Echinorhynchidae	<i>Acanthocephalus</i> <i>Echinorhynchus</i> <i>Pseudoacanthocephalus</i> <i>Yamagutisentis</i>	
		Fessisentidae	<i>Fessisentis</i>	
		Heteracanthocephalidae	<i>Aspersentis</i> <i>Heteracanthocephalus</i> <i>Sachalinorhynchus</i>	
		Hypoechinorhynchidae	<i>Balborhynchoides</i> <i>Hypoechinorhynchus</i>	
		Illiosentidae	<i>Brentisentis</i> <i>Dentitruncus</i> <i>Dollfusentis</i> <i>Goacanthus</i>	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

		<i>Indorhynchus</i>
		<i>Metarhadinorhynchus</i>
		<i>Pseudorhadinorhynchus</i>
		<i>Tegorhynchus</i>
		<i>Telosentis</i>
	Pomphorhynchidae	<i>Longicollum</i>
		<i>Pomphorhynchus</i>
		<i>Tenuiproboscis</i>
	Rhadinorhynchidae	<i>Golvanacanthus</i>
		<i>Australorhynchus</i>
		<i>Cleaveius</i>
		<i>Gorgorhynchoides</i>
		<i>Gorgorhynchus</i>
		<i>Hanumantharaorhynchus</i>
		<i>Leptorhynchoides</i>
		<i>Metacanthocephaloides</i>
		<i>Metacanthocephalus</i>
		<i>Micracanthorhynchida</i>
		<i>Paracanthorhynchus</i>
		<i>Pseudauchen</i>
		<i>Pseudoleptorhynchoides</i>
		<i>Sclerocollum</i>
		<i>Cathayacanthus</i>
		<i>Megistacantha</i>
		<i>Paragorgorhynchus</i>
		<i>Raorhynchus</i>
		<i>Rhadinorhynchus</i>
		<i>Serrasentis</i>
Polymorphida	Centrorhynchidae	<i>Centrorhynchus</i>
		<i>Sphaerirostris</i>
	Plagiorhynchidae	<i>Plagiorhynchus</i>
		<i>Luheia</i>
		<i>Oligoterorhynchus</i>
		<i>Owilfordia</i>
		<i>Porrorchis</i>
		<i>Pseudogordiorhynchus</i>
		<i>Pseudoluheia</i>
		<i>Sphaerechinorhynchus</i>
	Polymorphidae	<i>Andracantha</i>
		<i>Arhythmorhynchus</i>
		<i>Balbosoma</i>
		<i>Corynosoma</i>
		<i>Diplospiner</i>
		<i>Filicollis</i>
		<i>Hexaglandula</i>
		<i>Polymorphus</i>

Polyacanthocephala **Polyacanthorhychida** **Polyacanthorhynchidae** *Polyacanthorhynchus* **Caimanes**

IV. OBJETIVOS

El objetivo central del presente proyecto de tesis doctoral, fue iniciar el estudio filogenético y de evolución molecular dentro del phylum Acanthocephala, con este objetivo, se clonaron y secuenciaron genes ribosomales 18S de 11 especies de acantocéfalos representantes de las clases Archiacanthocephala, Eoacanthocephala, Palaeacanthocephala y Polyacanthocephala. Un segundo objetivo del proyecto fue esclarecer la inclusión o exclusión del phylum Acanthocephala en el phylum Rotifera, basado en secuencias de genes ribosomales 18S de cuatro especies de rotíferos, tres especies pertenecientes a la clase Monogononta y una especie de la clase Bdelloidea. Estas dos clases son generalmente incluidas en un clado designado como Eurotatoria (ver arriba) adicionalmente también se pretendió ubicar a los acantocéfalos dentro de los metazoarios. El tercer objetivo fue esclarecer las relaciones filogenéticas de los ordenes Giganthorhynchida, Moniliformida y Oligacanthorhynchida pertenecientes a la clase Archiacanthocephala, usando diferentes genes nucleares como el 18S, 5.8S y los dos espaciadores internos, así como genes mitocondriales como el citocromo oxidasa I (COI) y el 16S. Finalmente, el cuarto objetivo del proyecto fue establecer las relaciones filogenéticas para las 10 especies de *Corynosoma*, que es uno de los géneros más diversos del phylum, usando secuencias de los dos espaciadores transcritos internos ITS 1, ITS2 así como la región codificante del 5.8S RNA ribosomal.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 *Colecta del material biológico*

El material helmintológico se colectó de distintos huéspedes incluyendo peces, reptiles, aves y mamíferos. A todos los huéspedes se les practicó un examen diagnóstico helmintológico que consiste en realizar una disección sobre la superficie ventral desde el ano hasta la región de los opérculos en peces; en reptiles y aves desde la cloaca hasta la boca, y por último, en mamíferos, desde el ano hasta el esternón. Posteriormente se extrajo el intestino y se revisó bajo el microscopio estereoscópico en busca de acantocéfalos. Los acantocéfalos se fijaron de dos formas: un grupo de ejemplares se colocaron en frascos homeopáticos con agua destilada a 4°C durante 24h, para posteriormente ser fijados en etanol al 70%. Otro grupo se colocó directamente en frascos con etanol absoluto, método que permite la adecuada conservación del organismo y del material genético. Los acantocéfalos colectados: *Floridosentis mugilis*, *Oligacanthorhynchus tortuosa*, *Oncicola* sp., *Mediorhynchus* sp., *Centrorhynchus microcephalus*, *Filisoma bucerium*, *Polymorphus brevis*, *Koronacantha pectinaria*, *Polymorphus* sp., *Corynosoma alaskensis*, *Rhadinorhynchus* sp. y *Polyacanthorhynchus caballeroi*, también fueron teñidos con paracarmin de Mayer, y montados en bálsamo de Canadá en preparaciones permanentes, para su identificación. Las nueve especies del género *Corynosoma* (*C. australe*, *C. bullosum*, *C. caspicum*, *C. cetaceum*, *C. enhydri*, *C. hamanni*, *C. strumosum*, *C. validum* y *C. villosum*) fueron amablemente donados por Javier Aznar, del Departamento de Biología Animal del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, España. Las especies *Filisoma bucerium*, *Polymorphus* sp., y *Rhadinorhynchus* sp., fueron amablemente donados por Scott Monks de la Universidad de Toronto Canadá. El DNA genómico de *Moniliformis moniliformis* fue donado por David M. Welch del Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Harvard, Cambridge. Los cultivos monoxénicos de rotíferos de la clase Monogononta (*Asplanchna sieboldi*, *Lecane bulla*, *Brachionus patulus*) y de la clase Belloidea (*Philodina roseola*), fueron crecidos en un medio de cultivo. Posteriormente se lavaron y se concentraron en 500 µl de agua destilada por el Dr. S.S.S. Sarma, de la FES-Iztacala.

5.2 Purificación del DNA genómico

Los parásitos y rotíferos fueron colocados en una solución que contenía 200 mM NaOH y 1% SDS, e incubados por 2 h a 50°C con 10 mg/ml de proteinasa K, seguido por una extracción de fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol absoluto (Sambrook *et al.*, 1989).

5.3 Amplificación y secuenciación del gen 18S rRNA

La amplificación de la subunidad menor de los genes ribosomales, se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en una mezcla de reacción total de 100 µl que contenía aproximadamente 10-50 ng del DNA genómico de cada especie, 5 unidades de taq polimerasa (GIBCO-BRL), 200 mM de cada dNTP, 10mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 3 mM MgCl₂ y 100 pmol of cada oligonucleotido:

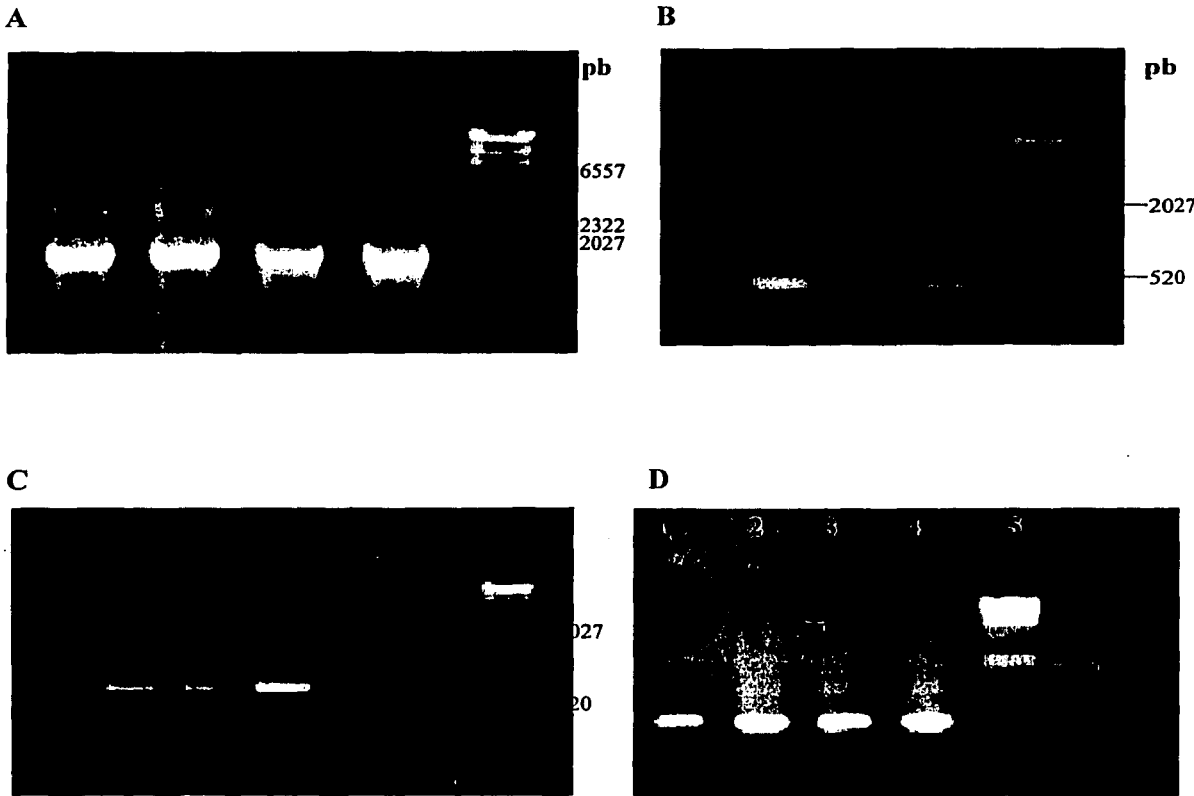
ACA1 5'-AGATTAAGCCATGCATGCGT-3' y

JLR25 5'-GCAGGTTACCTACGGAAAATGCATGCGT-3',

que se unen a las regiones consenso que flanquean el gen 18S RNA ribosomal. El programa de PCR consistía de un paso inicial de desnaturalización de 94°C por 3 min, una temperatura de alineamiento de 50°C por 3 min y un periodo de extensión a 72°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C. El programa fue completado con un periodo de extensión a 72°C por 10 min. Los productos amplificados por PCR fueron separados y observados en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio al 1% en un buffer de Tris-Boratos (TBE) (Fig. 10).

Las bandas que contenía el DNA amplificado fueron evaluadas y cortadas del gel de agarosa de Tris-Acetatos (TAE), para posteriormente ser purificadas por absorción al polvo de vidrio (Vogelstein y Gillespie, 1979). Los productos de PCR purificados fueron ligados en el fago M13mp18, con una enzima ligasa e incubados a 16°C toda la noche. Los fagos se transformaron usando bacterias *Escherichia coli* cepa TG1. Los fagos positivos fueron purificados y secuenciados usando un par de oligonucleótidos universales del fago M13 y 11 oligonucleótidos internos:

JLR9, 5'-GAAACTTAAAGGAATTCACGG-3'



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 10. Geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Los carriles 1-4 muestran el producto de PCR. Carril 5:marcador λ /Hind III. (A) Subunidad menor de los genes ribosomales del DNA nuclear 18S. (B) Subunidad mayor de genes ribosomales del DNA mitocondrial 16S. (C) Citocromo Oxidasa subunidad I del DNA mitocondrial. (D) Espaciadores transcritos internos (ITS1-ITS2), incluyendo el gen 5.8S del RNA ribosomal del DNA nuclear.

JLR4 5'-CCCTTTGTACACACCGCCCG-3'
JLR1 5'-CCAGCAGCCGCGGTAA-3'
JLR23 5'-CTAAAACGGCCATGCTCCCC-3'
JLR28 5'-AGCGACGGGCGGTGTGT-3'
JLR17 5'-CAACGAACGAGACTCCAGCC-3'
JLR18 5'-CTTCTTAGAGGGACAAGCG-3'
JLR30 5'-GAAACGGCTGTCACATCC-3'
JLR33 5'-TCACAGACGGGATAGTTGA-3'
JLR32 5'-CCCTCCAATTGATCCTCG-3'
JLR31 5'-AGTGCATACTTTATATGGTTA-3'
JLR29 5'-AACTTTCGTTCTTGATTAATG-3'.

La reacción de secuencia se llevo al cabo por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), usando el Kit de secuenciación secuenasa 2.0 (United States Biochemical Corporation), y usando [³⁵S] dATP como radionucleotido. Los productos de secuenciación fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6%, compuesto por 30 g. de urea ultrapura, 14 ml H₂O, 9.5 ml acrilamida al 38% que contenía bis acrilamida al 2% , 14 ml del buffer TBE al 5X, 550 µl de persulfato de amonio 50 mg/ml y 20 µl Temed en un buffer de TBE. Antes de colocar las muestras se efectuó una pre-corrída de 45 minutos a 1,400-2,000 voltios y 35-40 miliamperios, para calentar el gel a 55 °C, después de la electroforesis el gel se expuso con una placa de auto-radiografía y se reveló 24h después. Las secuencias completas del gen 18S RNA ribosomal de cada especie fueron ensambladas con el programa computacional PC-Gene (Intelligenetics Inc).

5.4 Amplificación y secuenciación del gen 18S RNA ribosomal de *Polyacanthorhynchus caballeroi* y *Rhadinorhynchus* sp.

El gene 18S RNA ribosomal de *Polyacanthorhynchus caballeroi* y *Rhadinorhynchus* sp., se amplificaron por PCR usando los oligonucleótidos (ACA 1 y JLR 25), siguiendo la metodología descrita arriba. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis. Las bandas del producto amplificado fueron recortadas del gel y purificados con el sistema de purificación Wizar (Promega). Los productos

amplificados fueron ligados en el plásmido pMOSbleu (Amersham). Los plásmidos recombinantes fueron purificados y secuenciados con el secuenciador automático ABI 310 usando un par de oligonucleótidos universales y 11 oligonucleótidos internos como se describió anteriormente. La reacción de secuenciación se realizó con el kit Big-dye terminator de Applied biosystems. Las secuencias fueron ensambladas con el programa DNAMAN (Lynnon Biosoff 1994-97). Las secuencias del gen completo del 18S RNA ribosomal de *Polyacanthorhynchus caballeroi* y *Rhadinorhynchus* sp., se depositaron en la base de datos GenBank (Tabla 2).

5.5 Amplificación y secuenciación de los genes mitocondriales 16S rRNA, citocromo oxidasa I (COI) y del gen nuclear 5.8S rRNA incluyendo los espaciadores transcritos internos (ITS1 - ITS2).

La amplificación de genes mitocondriales 16S, COI y del gen nuclear 5.8S RNA incluyendo los dos espaciadores transcritos internos (ITS 1 - ITS2), se llevo al cabo en una reacción de PCR, en un volumen final de 100 µl que contenía aproximadamente 10-50 ng del DNA genómico de cada especie, 5 u de la taq polimerasa (GIBCO-BRL), 200 mM de cada dNTP, 10mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 3 mM MgCl₂ y 100 pmol of cada oligonucleótido para ITS (BD1 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3'; BD2 5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3'), 16S rRNA mitocondrial (LRN 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT- 3'; LRJ 5'-CTCCGGTTTGAAGTCTCAGATCA- 3'), para el COI (CIN 5'- CCCGGTAAAATTAATATAAACTTC- 3'; CIJ 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC -3'). El programa de PCR consistía de un paso inicial de desnaturalización de 94°C por 3 min, un periodo de pegado a 50°C para el COI y el 16S RNA mitocondrial, y de 54°C para ITS1, ITS2 y 5.8S RNA por 3 min, un periodo de extensión a 72°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C para el COI y el 16S RNA mitocondrial o 54°C para ITS1, ITS2 y 5.8S RNA. El programa fue completado con un periodo de extensión de 72°C por 10 min. Los productos amplificados por PCR fueron separados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 1% en un buffer de Tris-Boratos (TBE). La banda que contenía el producto amplificado fue recortada del gel. El PCR fue limpiado y lavado con el sistema de purificación Wizard (Fig. 10). Algunos productos de PCR fueron

Tabla. 2. Taxa usados.

Nombre del Taxón	No. de Acceso	Largo (bp), G+C (%)	Huésped.	Referencia
Acanthocephala				
<i>Arhythmorhynchus brevis</i>	AF064812	1784, 49	<i>Nycticorax nycticorax</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Centrorhynchus conspectus</i>	U41399	1750, 49	<i>Strix varia</i>	Garey <i>et al.</i> 1996
<i>Centrorhynchus microcephalus</i>	AF064813	1735, 49	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Corynosoma enhydri</i>	AF001837	1747, 49	<i>Enhydra lutris</i>	Near <i>et al.</i> 1998
<i>Echinorhynchus gadi</i>	U88335	1793, 47	<i>Gadus morrhua</i>	Aleshin <i>et al.</i> 1998
<i>Filisoma bucerium</i>	AF064814	1744, 46	<i>Kyphosus elegans</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Floridosentis mugilis</i>	AF064811	1760, 46	<i>Mugil cephalus</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Leptorhynchoides thecatus</i>	AF001840	1758, 47	<i>Lepomis cyanellus</i>	Near <i>et al.</i> 1998
<i>Koronacantha pectinaria</i>	AF092433	1761,46	<i>Microlepidotus brevipinnis</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Macracanthorhynchus ingens</i>	AF001844	1765, 45	<i>Procyon lotor</i>	Near <i>et al.</i> 1998
<i>Mediorhynchus sp.</i>	AF064816	1758, 45	<i>Cassidix mexicanus</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Mediorhynchus grandis</i>	AF001843	1769, 45	<i>Sturnella magna</i>	Near <i>et al.</i> 1998
<i>Moniliformis moniliformis</i>	Z19562	1769, 45	<i>Rattus rattus</i>	Telford y Holland 1993
<i>Neoechinorhynchus pseudemydis</i>	U41400	1771, 46	<i>Trachemys scripta elegans</i>	Garey <i>et al.</i> 1996
<i>Neoechinorhynchus crassus</i>	AF001842	1773, 47	<i>Catostomus commersoni</i>	Near <i>et al.</i> 1998
<i>Oligacanthorhynchus tortuosa</i>	AF064817	1767, 45	<i>Didelphis virginiana</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Oncicola sp</i>	AF064818	1755, 45	<i>Nasua narica</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Plagiorhynchus cylindraceus</i>	AF001839	1745, 48	<i>Armadillidium vulgare</i>	Near <i>et al.</i> 1998
<i>Polymorphus sp.</i>	AF064815	1739, 48	<i>Anas platyrhynchos</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Polymorphus altmani</i>	AF001838	1745, 48	<i>Enhydra lutris</i>	Near <i>et al.</i> 1998
<i>Polyacanthorhynchus caballeroi.</i>	AF388660	2176, 49	<i>Caiman yacare</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2002
<i>Pomphorhynchus bulbocolli</i>	AF001841	1761, 45	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Near <i>et al.</i> 1998
<i>Rhadinorhynchus sp.</i>	AY062433	1754, 45	<i>Pez familia Scianidae</i>	García-Varela <i>et al.</i> 2002
Rotifera				
<i>Asplanchna sieboldi</i>	AF092434	1728, 46	Vida libre	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Brachionus plicatilis</i>	U29235	1736, 47	Vida libre	Winnepenninckx <i>et al.</i> 1995
<i>Brachionus platus</i>	AF154568	1745, 45	Vida libre	García-Varela <i>et al.</i> 2000
<i>Lecane bulba</i>	AF154566	1733, 47	Vida libre	García-Varela <i>et al.</i> 2000

<i>Philodina acuticornis</i>	U41281	1789, 43	Vida libre	Garey <i>et al.</i> 1996
<i>Philodina roseola</i>	AF154567	1747, 46	Vida libre	García-Varela <i>et al.</i> 2000
Gastrotricha				
<i>Lepidodermella squamata</i>	U29198	1742, 50	Vida libre	Winnepenninckx <i>et al.</i> 1995
<i>Chaetonotus</i> sp	AJ001735	1814, 49	Vida libre	Littlewood <i>et al.</i> 1998
Platyhelminthes				
<i>Opisthorchis viverrini</i>	X55357	1992, 51	<i>Homo sapiens</i>	Korbsrisate <i>et al.</i> 1991
Annelida				
<i>Lanice conchilega</i>	X79873	1809, 51	Vida libre	Winnepenninckx <i>et al.</i> 1995
Nematoda				
<i>Haemonchus placei</i>	L04154	1758, 47	<i>Bos taurus</i>	Zarlenga <i>et al.</i> 1994
<i>Nematodirus battus</i>	U01230	1758, 47	<i>Bos taurus</i>	Zarlenga <i>et al.</i> 1994
Nematomorpha				
<i>Gordius aquaticus</i>	X87985	1797, 47	Vida libre	Winnepenninckx <i>et al.</i> 1995
Priapulida				
<i>Priapulus caudatus</i>	X87984	1811, 49	Vida libre	Winnepenninckx <i>et al.</i> 1995
Kinorhyncha				
<i>Pycnophyes kielenensis</i>	U67997	1806, 49	Vida libre	Aleshin <i>et al.</i> 1998
Arthropoda				
<i>Artemia salina</i>	X01723	2020, 50	Vida libre	Winnepenninckx <i>et al.</i> 1995

secuenciados directamente con el secuenciador automático ABI 310. Otros productos amplificados fueron ligados en el plásmido pMOSbleu (Amersham). Los plásmidos recombinantes fueron purificados y secuenciados con el secuenciador automático ABI 310.

5.6 Alineación de las secuencias y análisis filogenéticos de las secuencias 18S rRNA

Todas las secuencias en las distintas bases de datos fueron inicialmente alineadas con Clustal W, incluido en el programa DNAMAN (Higgins y Sharp, 1988) y ajustadas manualmente. Las secuencias del gen de 18S RNA ribososomal para nueve especies de acantocéfalos y 4 especies de rotíferos fueron alineadas con otras 22 secuencias; 10 de acantocéfalos, 2 de rotíferos y 12 de otros taxa que fueron usados como grupos externos (Tabla 2). Las relaciones filogenéticas fueron inferidas por máxima verosimilitud (ML; Felsenstein, 1981), usando el programa PAUP *4.0d6 (Swofford, 2000). Para la búsqueda del mejor árbol se realizaron varios pasos para aumentar la eficiencia de la búsqueda. Inicialmente un árbol fue generado por Neighbor-joining (Saito y Nei, 1987). Un modelo de probabilidad fue usado en el árbol inicial para obtener los parámetros para la siguiente búsqueda. El modelo de prueba estimó la tasa de substitución para las frecuencias de nucleótidos, proporción de sitios invariables y la distribución gamma. Con los parámetros estimados, se realizó una búsqueda heurística, adicionando las secuencias al azar, usando el algoritmo Tree-Bisection-Reconnection, usando la opción de Branch-Swapping para encontrar el árbol inicial. Estos parámetros fueron re-estimados y los nuevos parámetros fueron usados en otra búsqueda de máxima verosimilitud, agregando 5 búsquedas heurísticas para encontrar el árbol final. Para comparar las topologías específicas con las topologías alternativas se realizaron pruebas de "constraint" (forzado de ramas) para algunas ramas del árbol y se realizaron las mismas búsquedas heurísticas. Las diferencias entre los valores de máxima verosimilitud para los árboles que representan las hipótesis alternativas fueron evaluadas con la prueba de Kishino y Hasegawa (1989), implementada en el programa PAUP. Los árboles fueron dibujados usando el programa RETREE y DRAGRAM incluidos en el programa computacional PHYLIP (Felsenstein, 1999).

5.7 Análisis filogenético del Phylum Acanthocephala para determinar la existencia de la clase Polyacanthocephala.

Se utilizó una base de datos expandida que contaba con 37 secuencias más dos nuevas secuencias de acantocéfalos *Polyacanthorhynchus caballeroi* y *Rhadinorhynchus* sp; se alinearon con Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Los análisis filogenéticos para esta nueva base de datos expandida se realizaron con el programa PAUP* versión 4.0b7a (Swofford, 2000). Para determinar cual es el mejor modelo de evolución para la nueva base de datos se realizó una prueba de verosimilitud con el programa computacional Modeltest versión 3.0 (Posada y Crandall, 1988). Las relaciones filogenéticas fueron inferidas usando el método de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981). Para el análisis se realizaron 5 búsquedas heurísticas, adicionando los taxa al azar, usando la opción de Tree-Bisection-Reconnection (TBR) y el algoritmo de Branch-Swapping. La topología resultante, fue comparada con topologías alternativas en las que se forzaron algunas ramas. Las diferencias en los valores de verosimilitud fueron comparadas con la prueba de Kishino y Hasegawa (1989). La topología más probable fue dibujada con los programas computacionales antes mencionados. Adicionalmente una análisis de máxima parsimonia fue realizado. La topología resultante fue evaluada en un análisis de 1000 replicas de bootstrap.

5.8 Análisis filogenético de la clase Archiacanthocephala

Las secuencias de los genes mitocondriales del 16S RNA ribosomal y del COI, así como los genes 5.8 y del 18S RNA nuclear incluyendo los dos espaciadores transcritos internos de cinco especies de acantocéfalos, que representan los ordenes Oligacanthorhynchida, Gigantorhynchida y Moniliformida, más 2-3 especies de rotíferos monogonontos fueron alineados con el algoritmo PILEUP, el cual esta implementado en el programa computacional GCG versión 7 (Devereux *et al.*, 1984). Los análisis filogenéticos se llevaron al cabo con el programa PAUP 4.0b7a. (Swofford, 2000). Para determinar cual es el mejor modelo de evolución para cada una de las regiones secuenciadas, realizamos una prueba de búsqueda de verosimilitud para los modelos que conforman la familia del General- Time- Reversible (Rodríguez *et al.*, 1990), usando el programa Modeltest versión 3.0 (Posada y Crandall, 1998).

Las relaciones filogenéticas fueron inferidas usando el método de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981), con el modelo previamente determinado para cada base de datos y el combinado, usamos búsquedas de Branch-and-Bound. La confiabilidad de los árboles inferidos se evaluaron con 1000 replicas de bootstrap. Las figuras fueron editadas con los programas RETREE y DRAGRAM incluidos en el paquete computacional PHYLIP (Felsenstein, 1999).

5.9 Análisis filogenético del género *Corynosoma*

Las secuencias de 10 especies de *Corynosoma*, más dos especies del género *Polymorphus*, que fueron usados como grupos externos, se alinearon con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente el alineamiento fue corregido manualmente. Las relaciones filogenéticas se determinaron por máxima verosimilitud (Swofford, 2000). Para determinar cual es el mejor modelo de evolución para la región secuenciada, realizamos una prueba de búsqueda de verosimilitud para los modelos que conforman la familia del General-Time-Reversible (Rodríguez *et al.*, 1990), con el programa Modeltest versión 3.0 (Posada y Crandall, 1998). Para el análisis de máxima verosimilitud se usaron búsquedas heurísticas con Branch-Swapping y adicionando los taxa al azar. El árbol obtenido fue evaluado con 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1981). También se realizaron análisis con máxima parsimonia usando búsquedas de Branch and Bound para encontrar el árbol más corto, para apoyar el árbol obtenido se realizaron 1000 búsquedas de bootstrap.

VI. RESULTADOS

6.1 *Análisis filogenético de tres clases del Phylum Acanthocephala y su relación con el Phylum Rotifera*

Las secuencias del gen 18S RNA ribosomal, obtenidas en el presente proyecto de tesis para nueve especies de acantocéfalos y cuatro especies de rotíferos fueron alineadas con otras secuencias existentes en ese entonces en la base de datos del GenBank (Tabla 2). El promedio del número de nucleótidos para las secuencias analizadas fue de 1756, con una media del contenido G+C de 0.465. La composición de bases para las secuencias no fue significativamente heterogénea ya que obtuvimos una X^2 de 116.588, con una desviación estándar de 108 y un valor de $p = 0.269$

6.2 *Relación entre Acanthocephala y Rotifera*

Nueve secuencias de acantocéfalos y cuatro de rotíferos, más otras secuencias del gen 18S RNA ribosomal fueron alineadas y analizadas para inferir las relaciones filogenéticas. Inicialmente nuestros análisis mostraron que el phylum Acanthocephala es monofilético, como grupo hermano del phylum Rotifera, estos resultados no concuerdan con registros anteriores, donde Acanthocephala aparentemente es parte Rotifera (Garey *et al.*, 1996). Para comprobar si las diferencias en los resultados eran debidas a diferencias en el alineamiento de las secuencias, o al método de inferencia, en el presente proyecto de tesis comparamos 4 diferentes alineaciones o bases de datos: la alineación de Garey *et al.*, (1998) para genes mitocondriales 16S RNA; la alineación de Garey *et al.*, (1996) para genes nucleares 18S RNA; las secuencias generadas en este trabajo fueron alineadas con las secuencias de Garey *et al.*, (1996), de acuerdo a sus criterios de alineación; las secuencias de Garey *et al.*, (1996), fueron alineadas con nuestras secuencias, usando nuestro criterio de alineación. Los alineamiento del 16S y 18S RNA ribosomal de Garey *et al.*, (1996,1998) fueron tomados de la página web, <http://chuma.cas.usf.edu/~garey/index.htm>. Para la descripción de los resultados usamos el término Rotifera en el texto y en las conclusiones nos referimos a la relación de Acanthocephala y Eurotatoria; este último representa un clado compuesto por las clases Monogononta y Bedelloidea del phylum Rotifera.

6.3 Alineación de Garey et al., (1998) para genes mitocondriales del 16S RNA ribosomal.

Esta base de datos fue compuesta por 9 taxa y 762 posiciones de nucleótidos alineados. Las búsquedas de máxima verosimilitud mostraron a los Rotifera como un grupo parafilético y los Acanthocephala fueron considerado como un grupo dentro de Rotifera. Interesantemente, este árbol también mostró al phylum Mollusca (uno de los grupos externos) como parafilético. Un árbol correspondiente a una hipótesis alternativa, donde Rotifera es monofilético y separado de Acanthocephala, fue forzado como hipótesis alternativa y comparado con el anterior (Fig. 11). Las diferencias en $-\ln$ verosimilitud entre las dos hipótesis no fueron estadísticamente significativas, según la prueba de Kishino y Hasegawa (Tabla 3). Por tanto, las dos hipótesis son igualmente válidas. Cabe hacer notar que en este último caso Mollusca aparecía como monofilético.

6.4 18S RNA ribosomal de Garey et al., (1996)

La base de datos fue compuesta por 29 taxa y 2520 posiciones de nucleótidos alineados. Las búsquedas iniciales mostraron al phylum Rotifera como parafilético y el phylum Acanthocephala es considerado como un grupo dentro de Rotifera. Un árbol correspondiente a una hipótesis alternativa donde Rotifera es monofilético fue forzado (Fig. 12). Las diferencias en $-\ln$ de verosimilitud entre los árboles que representan las dos hipótesis no son estadísticamente significativas (Tabla 3). Por tanto, las dos hipótesis son igualmente válidas.

6.5 Nuestra base de datos expandida del 18S RNA ribosomal usando los criterios de alineamiento de Garey et al., (1996)

Esta base de datos fue compuesta por 37 taxa y 2527 posiciones de nucleótidos alineados. La base de datos incluyo nueve especies de Acanthocephala y cuatro especies de Rotifera, con estos datos se compararon dos hipótesis. La primera considera al phylum Acanthocephala como grupo hermano de la clase Bedelloidea del phylum Rotifera y estos dos como grupo hermano de la clase Monogononta del phylum Rotifera, esta hipótesis representa la propuesta de Garey et al., (1996, 1998). La segunda hipótesis consideró al phylum Acanthocephala como grupo hermano de todos los Rotifera: esta

Tabla. 3. Relación de Acanthocephala y Rotifera.

Bases de Datos	-ln verosimilitud ^a	Proporción de sitios invariables	Distribución Gamma
16S rRNA (Garey <i>et al.</i> , 1999).			
Fig. 11 A	4382.478 ¹	0.141	1.316
Fig. 11 B	4384.405 ¹	0.141	1.263
18S rRNA (Garey <i>et al.</i> , 1996).			
Fig. 12 A	23494.397 ²	0.071	0.472
Fig. 12 B	23499.077 ²	0.074	0.473
Adicionando nuestras secuencias usando el criterio de alineamiento de Garey <i>et al.</i> , (1996).			
Fig. 13	27015.414 ³	0.063	0.637
Fig. 14	27004.101 ³	0.060	0.633
Adicionando las secuencias de Garey <i>et al.</i> , (1996), a nuestra base de datos expandida y usando nuestro criterio de Alineación.			
Fig. 15	24231.698 ⁴	0.083	0.513
Fig. No mostrada.	24248.954 ⁴	0.085	0.515

^a Diferencias en el -ln de verosimilitud entre los árboles que representan las dos hipótesis, basado en la prueba de Kishino y Hasegawa. (¹ = 1.927 las diferencias no son significativas = 4.138, t = 0.465, p = 0.642); (² = 4.681 las diferencias no son significativas = 3.567, t = 1.312, p = 0.190); (³ = 11.314 las diferencias es marginalmente significativa = 5.848, t = 1.941, p = 0.052); (⁴ = 17.256 las diferencias son significativas = 7.599, t = 2.271, p = 0.023).

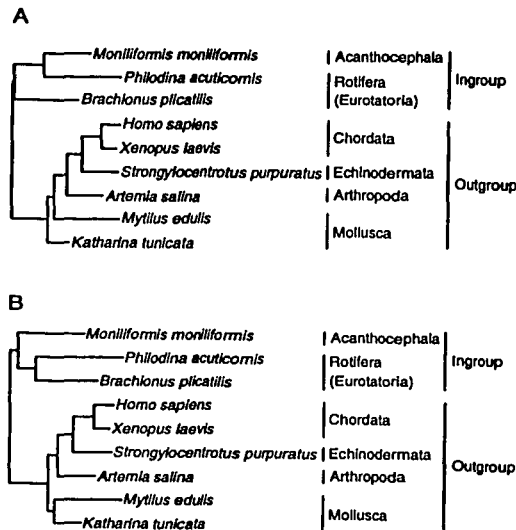


Fig. 11. Árbol filogenético para Acanthocephala y Eurotatoria, basado en análisis del gen 16S RNA mitocondrial (Garey *et al.*, 1998). Árbol correspondiente a la hipótesis (A) donde Eurotatoria es parafiletico y Acanthocephala es grupo hermano de Eurotatoria de la clase Bdelloidea, ((Acanthocephala, Bdelloidea)Monogononta) El $-\ln$ de verosimilitud para esta hipótesis es 4382.478. El árbol (B) es el resultado del análisis del forzado de ramas donde Eurotatoria es monofilético, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)). El $-\ln$ de verosimilitud es 4384.405, las diferencias entre ambas hipótesis no es significativa ($P = 0.642$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

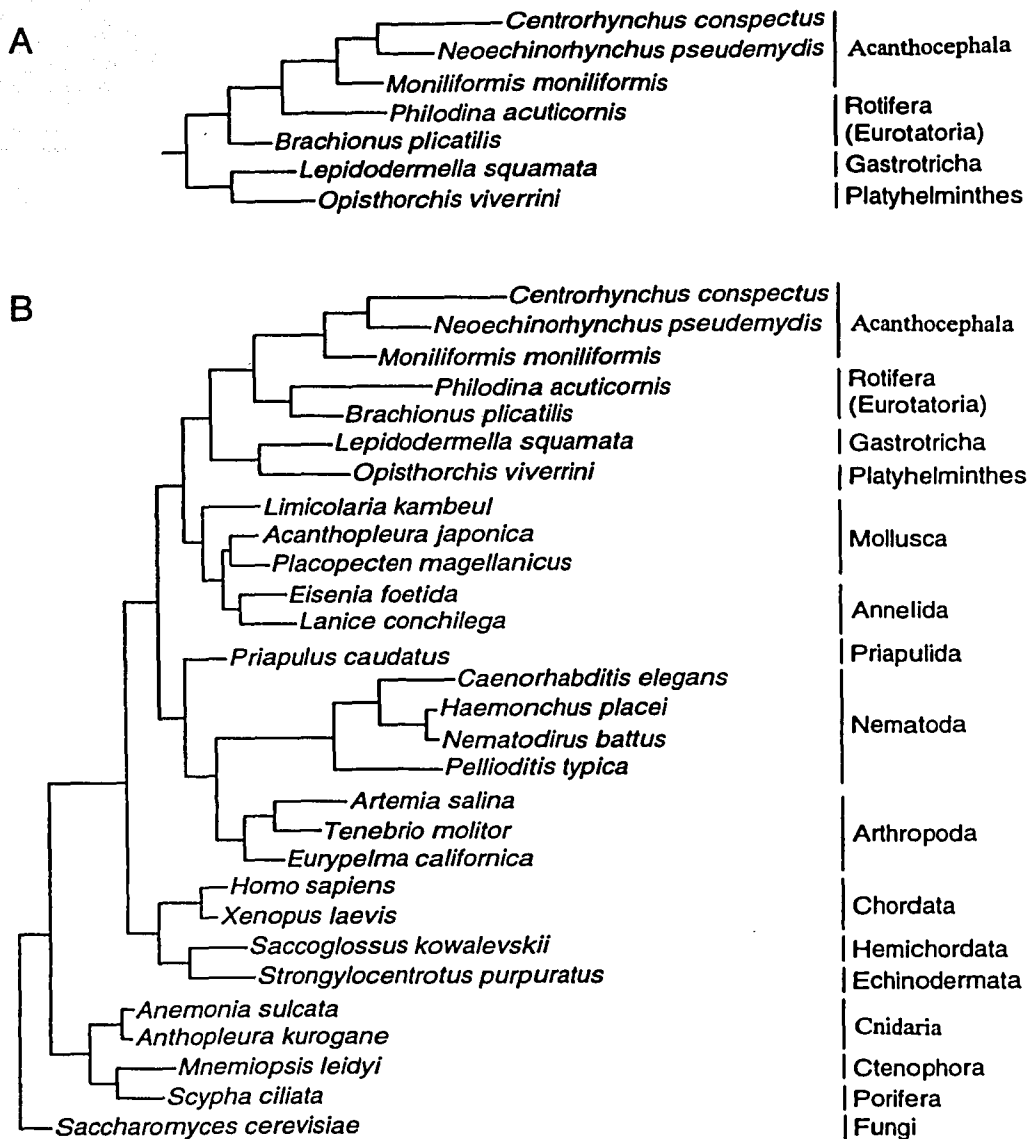


Fig. 12. Árboles correspondientes al gen 18S rRNA ribosomal (A), Hipótesis de Eurotatoria es parafilético y Acanthocephala es grupo hermano de la clase Bdelloidea. ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta). El $-\ln$ de verosimilitud es 23494.397. El árbol (B), corresponde la hipótesis alternativa donde Eurotatoria es monofilético (Acanthocephala, (Bdelloidea, Monogononta)). El $-\ln$ de verosimilitud es 23499.077. Las diferencias entre las dos hipótesis no es significativa ($p = 0.190$).

hipótesis fue propuesta por Winnepeninckx *et al.*, (1995), Wallace *et al.*, (1996), y Melone *et al.*, (1998). El análisis correspondiente a la primera hipótesis ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta), se muestra en la Figura 13. Un árbol correspondiente a la segunda hipótesis alternativa donde el phylum Acanthocephala es grupo hermano de todos los Rotifera, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)), fue generado forzando ramas. Las diferencias en $-ln$ de verosimilitud entre los árboles que representan las dos hipótesis es marginalmente significativo (Tabla 3). Un rasgo distintivo de estos dos árboles es el origen parafilético del género *Mediorhynchus* (Fig. 14).

6.6 Análisis de nuestra base de datos expandida del 18S RNA ribosomal con nuestros criterios de alineamiento y adición de las secuencias de Garey *et al.*, (1996)

La base de datos fue compuesta por 37 taxa y 2031 posiciones de nucleótidos alineados. Todas las búsquedas mostraron el mismo árbol con una topología donde todo el phylum Rotifera es monofilético como grupo hermano de Acanthocephala, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)). Un árbol correspondiente a la hipótesis alternativa, Bdelloidea como grupo hermano de Acanthocephala, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta), fue generado forzando ramas. Las diferencias entre los árboles que representan las dos hipótesis son significativas (Tabla 3). Es decir que la hipótesis de Acanthocephala como phylum independiente de Rotifera parece más probable que la hipótesis alternativa. Cabe hacer notar que en este árbol el género *Mediorhynchus* aparecen con un origen monofilético (Fig. 15).

6.7 Relaciones filogenéticas del Phylum Acanthocephala

Las búsquedas de máxima verosimilitud mostraron las mismas relaciones entre las clases dentro del phylum Acanthocephala. La clase Palaeacanthocephala fue el grupo hermano de la clase Eoacanthocephala, este clado resultó ser el grupo hermano de la clase Archiacanthocephala, ((Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala) Archiacanthocephala). Para examinar la consistencia de esta topología, forzamos algunas ramas proponiendo otras posibles topologías. Uno de los mejores árboles obtenidos para una hipótesis alternativa fue la relación de (Palaeacanthocephala

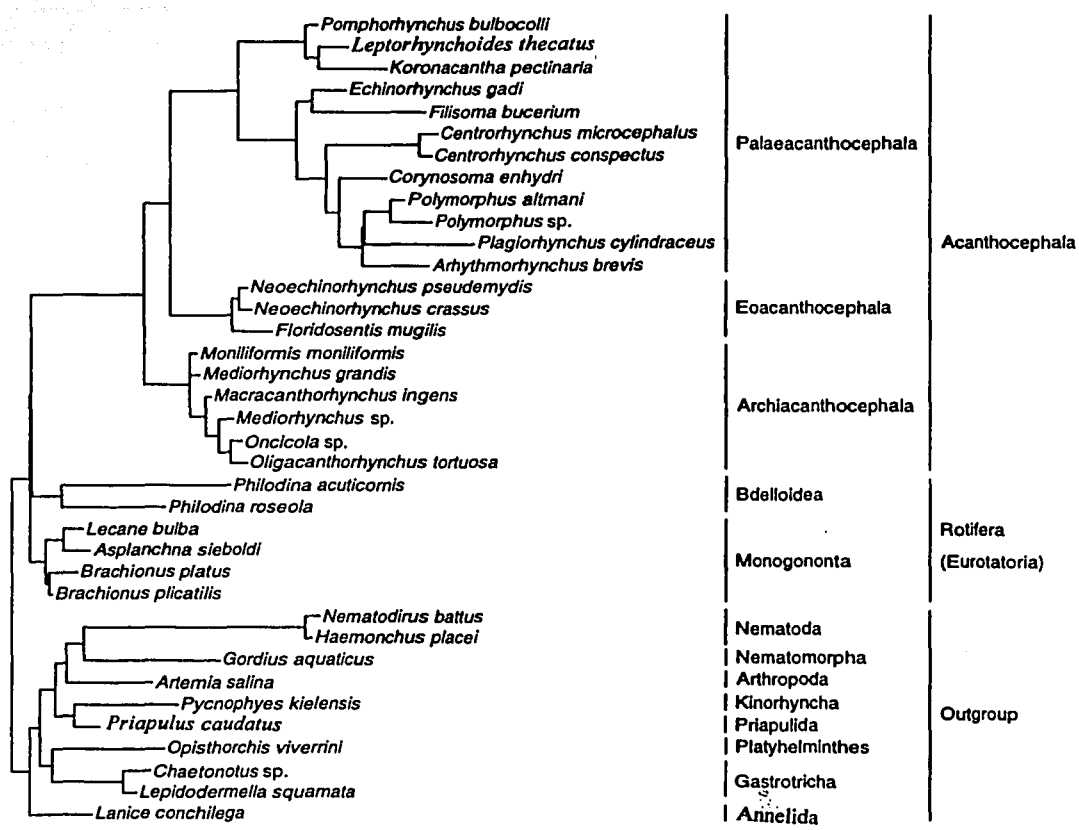


Fig. 13. Nuestra base de datos expandida del 18S RNA ribosomal usando los criterios de alineamiento de Garey *et al.*, (1996). El árbol correspondiente a la hipótesis de Eurotatoria es parafilético y Acanthocephala como grupo hermano de Bdelloidea, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta). El $-\ln$ de verosimilitud para el árbol es 27015.414

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

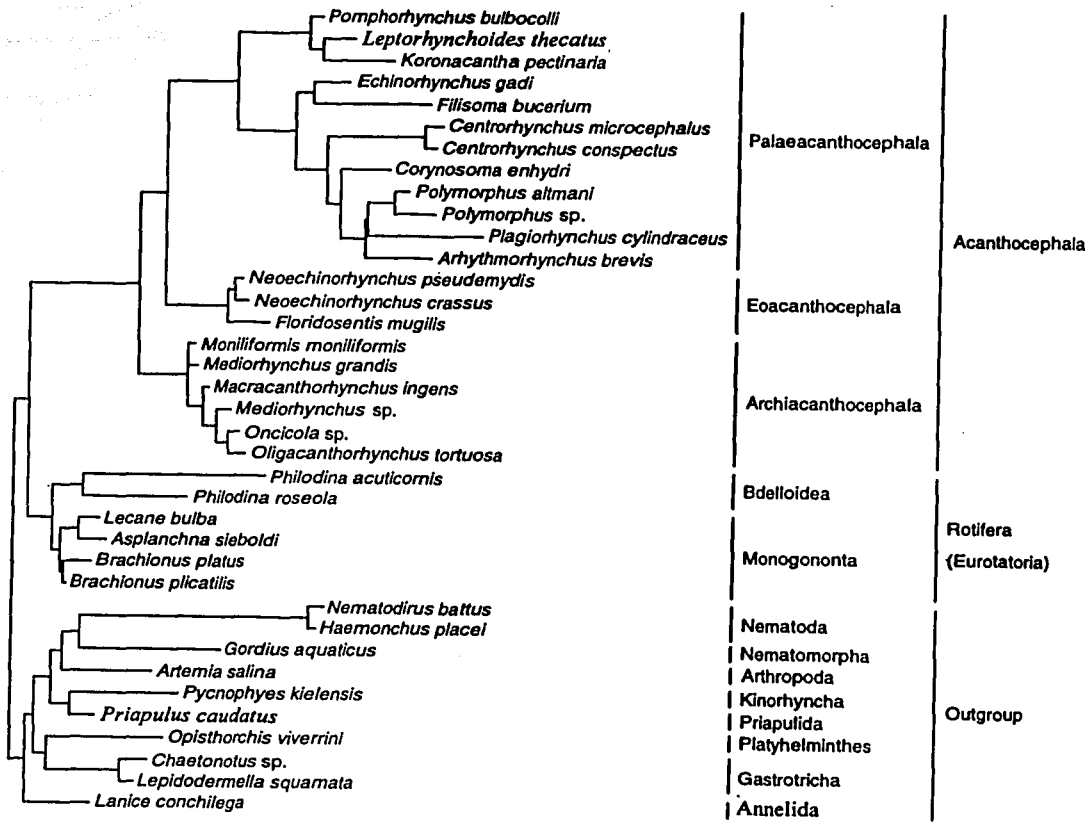


Fig. 14. Nuestra base de datos expandida del 18S RNA ribosomal usando los criterios de alineamiento de Garey *et al.*, (1996). El árbol obtenido del forzando de ramas donde Eurotatoria es monofilético, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)). El $-\ln$ de verosimilitud para esta topología es 27004.101, esta hipótesis es un poco más probable ($p = 0.052$), al mostrado en la figura 13.

(Eoacanthocephala, Archiacanthocephala)), este árbol mostró un valor de $-\ln 24253.250$. La proporción de sitios invariables fue de 0.089, con una distribución gamma de 0.521. Otra hipótesis alternativa propuesta fue la relación de ((Palaeacanthocephala, Archiacanthocephala) (Eoacanthocephala), el $-\ln$ para esta topología fue 24253.502. La proporción de sitios invariables obtenida del árbol fue 0.89 y la distribución gamma de 0.522. Basados en los resultados de la prueba de Kishino y Hasegawa (1989), se pudo concluir que las topologías alternativas de las tres clases del phylum Acanthocephala son menos probables que la hipótesis original (Fig. 15). Las diferencias en $-\ln$ entre las topologías ((Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala) Archiacanthocephala) y (Palaeacanthocephala (Eoacanthocephala, Archiacanthocephala)), fue 21.52, con una desviación estándar = 8.79, $t = 2.461$ y una $p = 0.014$. Las diferencias en $-\ln$ para las topologías ((Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala) Archiacanthocephala) y ((Palaeacanthocephala, Archiacanthocephala) (Eoacanthocephala) fue 21.804 con una desviación estándar = 8.731, $t = 2.497$ y una $p = 0.013$.

6.8 Relaciones filogenéticas para determinar la existencia de la clase *Polyacanthocephala*

Una vez establecidas las relaciones filogenéticas del phylum Acanthocephala con el phylum Rotifera, así como entre las tres clases principales del phylum Acanthocephala, se procedió a examinar una propuesta reciente, en el sentido de incluir una nueva clase denominada Polyacanthocephala. El alineamiento del gen 18S RNA ribosomal para esta nueva base de datos expandida incluyó 22 secuencias de acantocéfalos que representan las clases Archiacanthocephala, Eoacanthocephala, Palaeacanthocephala (incluyendo todas las secuencias usadas para la definición de las clases en el análisis anterior), y la clase propuesta como Polyacanthocephala, más 16 secuencias que se usaron como grupos externos, formaron una matriz de datos de 39 taxa con 2308 posiciones de nucleótidos alineados. La prueba de verosimilitud mostró que el mejor modelo para la base de datos fue General Time Reversible (GTR) (Rodríguez *et al.*, 1990), con sitios invariables (+I) y una tasa heterogénea (+G; Yang, 1994). La proporción de sitios invariables fue = 0.096, con una distribución gamma = 0.554. El análisis de máxima verosimilitud usando este modelo mostró un solo árbol con

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

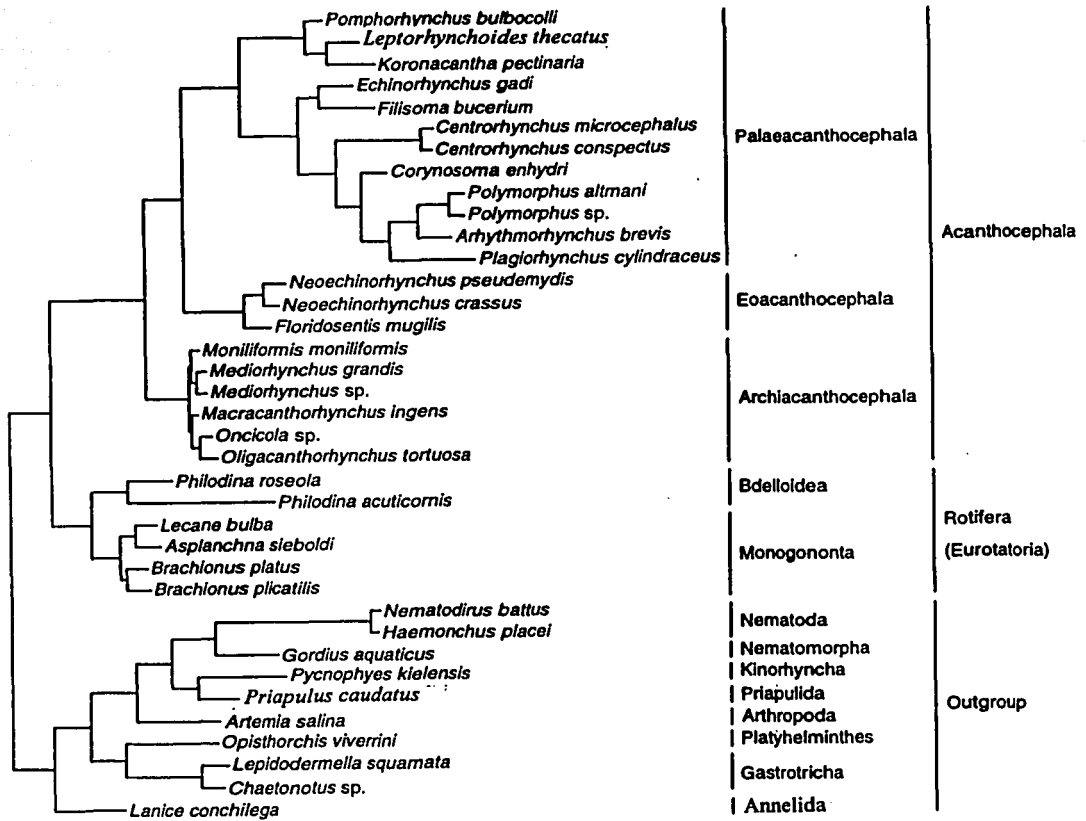


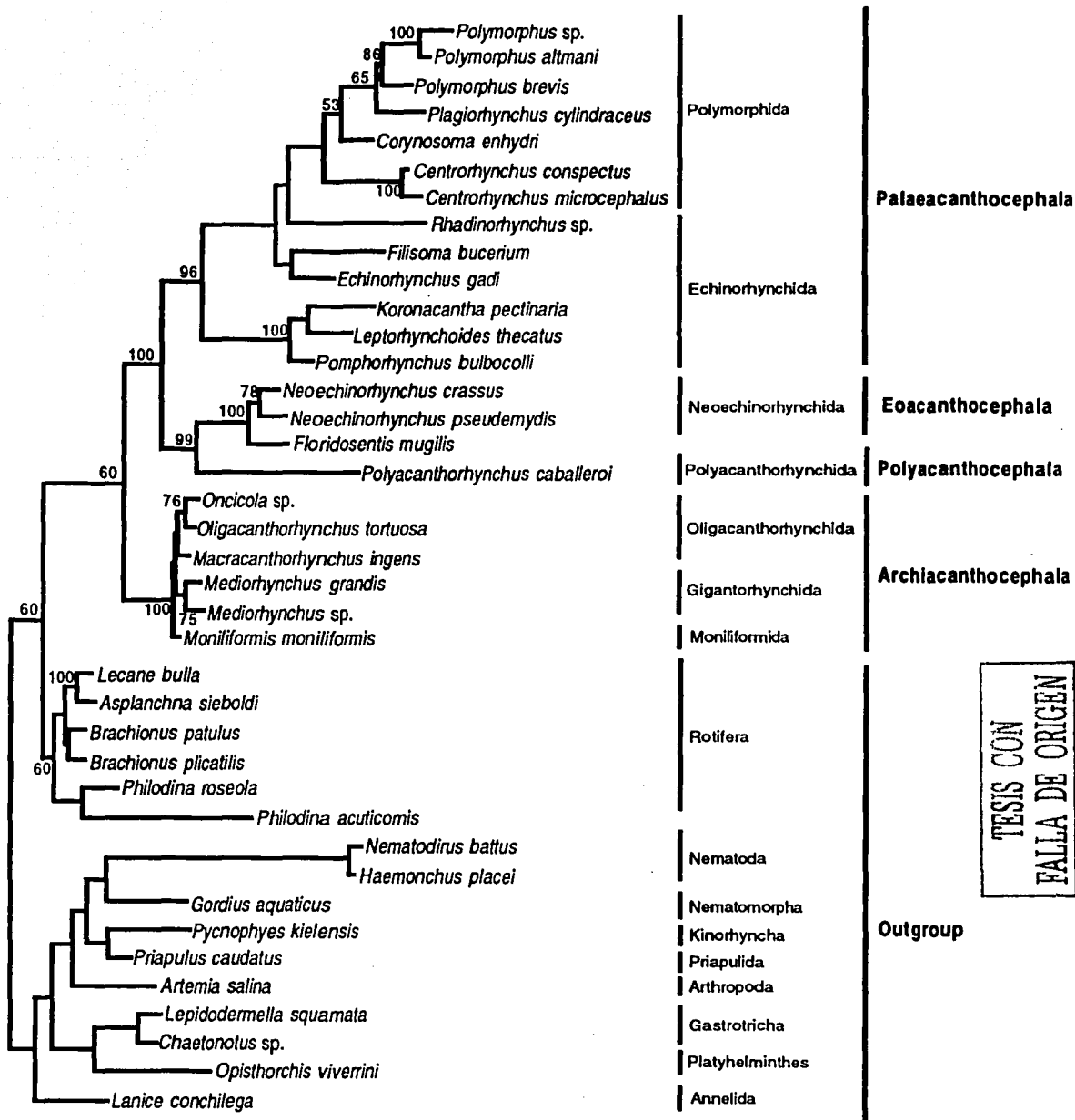
Fig. 15. Análisis de nuestra base de datos expandida del 18S RNA ribosomal con nuestros criterios de alineamiento y adicionado las secuencias de Garey *et al.*,(1996). El árbol es consistente con la hipótesis de que Eurotatoria es monofilético (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta). El $-\ln$ de verosimilitud es 24231.689. Esta topología es significativamente mejor ($p = 0.023$) que la hipótesis alternativa ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta).

-ln de 29512.680. Nuevamente, el phylum Acanthocephala es monofilético con Archiacanthocephala como la clase más basal. Polyacanthocephala aparentemente es el grupo hermano de Eoacanthocephala y ambas clases forman un clado que es grupo hermano de Palaeacanthocephala (Fig. 16). Para apoyar esta hipótesis, nuevos análisis de máxima verosimilitud se realizaron introduciendo topologías alternativas (((*Rhadinorhynchus* sp., Polyacanthocephala,) Eoacanthocephala,) Archiacanthocephala), y (((*Leptorhynchoides thecatus*, Polyacanthocephala,) Eoacanthocephala,) Archiacanthocephala). Las especies de *Rhadinorhynchus* sp y *Leptorhynchoides thecatus* son miembros de la familia Rhadinorhynchidae para la cual Polyacanthocephala fue previamente asignado (Golvan, 1962). El -ln de verosimilitud para la primera topología alternativa fue de 29804.552 y para la segunda fue de 29828.225. Basados en el resultado de la prueba de Kishino-Hasegawa, ambas topologías alternativas son menos probables a la mostrada en la Figura 28. Las diferencias en -ln de verosimilitud para los árboles (((*Rhadinorhynchus* sp., Polyacanthocephala) Eoacanthocephala,) (Archiacanthocephala)) es 291.872 (SD = of 34.624, t= 8.429 and P < 0.05). Las diferencias para (((*Leptorhynchoides thecatus*, Polyacanthocephala) Eoacanthocephala,) (Archiacanthocephala)) es 315.544 (SD = of 36.009, t= 8.762 and P < 0.05). Por lo tanto la hipótesis (((Eoacanthocephala, Polyacanthocephala,) Palaeacanthocephala), (Archiacanthocephala)) es correcta.

Esta topología también fue apoyada a través del análisis de máxima parsimonia, el árbol resultante tuvo 5,629 pasos con un índice de consistencia de 0.441. Las relaciones entre las clases Acanthocephala fueron apoyadas con altos valores de bootstrap, también la posición de *Rhadinorhynchus* sp. y *Leptorhynchoides thecatus* dentro de Palaeacanthocephala, y la posición de *P. caballeroi* como grupo hermano de Eoacanthocephala, fueron fuertemente apoyadas.

6.9 Análisis filogenético de la clase Archiacanthocephala usando el 16S RNA mitocondrial

Con el objeto de analizar las relaciones dentro de una sola clase de acantocéfalos, se procedió a obtener secuencias de tres diferentes genes, 16S y COI de origen mitocondrial, y los ITS1 e ITS2, así como del 5.8S de origen nuclear. Con respecto al



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 16. Árbol resultante del análisis de Máxima verosimilitud usando nuestra base de datos expandida incluyendo las secuencias de *Polyacanthorhynchus caballeroi* y *Rhadinorhynchus sp.* El $-\ln$ de verosimilitud para el árbol es 29512.680. Los números adyacentes a las ramas representan el porcentaje de 1000 búsquedas de bootstrap.

gene 16S rRNA mitocondrial, se obtuvieron secuencias parciales de 439 a 494 pares de bases (pb), provenientes de cinco especies de acantocéfalos. El promedio del porcentaje de G+C fue de 35%. El largo de las secuencias alineadas para las especies de acantocéfalos, más tres especies de rotíferos, fue de 467 pb. La prueba de verosimilitud mostró que el mejor modelo de evolución para esta base de datos fue Hasegawa-Kishino-Yano (HKY; Hasegawa *et al.*, 1985), con una tasa heterogénea (+G; Yang, 1994), tasa de transiciones/transversiones = 1.3091, con sitios no variables y una distribución gamma = 0.663. El análisis de ML mostró un solo árbol con un $-\ln$ 2570.98444. Todas las ramas fueron significativamente positivas ($p < 0.001$). El árbol mostró Archiacanthocephala como monofilético. El orden más basal fue Gigantorhynchida (*Mediorhynchus* sp.). Los ordenes Moniliformida (*M. moniliformis*) y Oligacanthorhynchida (*O. tortuosa*, *Oncicola* sp. y *M. ingens*) fueron los más derivados (Fig. 17).

6.91 COI de Archiacanthocephala

A su vez, la base de datos para COI contenía 527 nucleótidos alineados para cinco especies de acantocéfalos y tres rotíferos. El porcentaje del contenido de G+C fue 35%. La prueba de verosimilitud indicó que el mejor modelo para esta base de datos es Transiciones (TIM; Rodríguez *et al.*, 1990), con sitios invariables (+I), con una tasa de sustitución igual para todos los sitios (Yang, 1994). La proporción de sitios invariables fue = 0.5267. El análisis de ML usando este modelo mostró un solo árbol con un $-\ln$ 3360.95. La topología de este árbol mostró a Moniliformida como el orden más basal. Los ordenes Gigantorhynchida y Oligacanthorhynchida son más derivadas. Todas las ramas fueron significativamente positivas ($P < 0.001$), con valores moderados de bootstrap (Fig. 18).

6.92 18S rRNA nuclear de Archiacanthocephala

Esta base de datos consistió de ocho taxa con 1790 nucleótidos alineados. La prueba de verosimilitud indicó que el mejor modelo para esta base de datos fue Tamura-Nei (TrN; Tamura y Nei, 1993), con una tasa heterogénea (+G; Yang, 1994). El parámetro de la distribución gamma fue = 0.4012, con sitios no variables. El análisis de

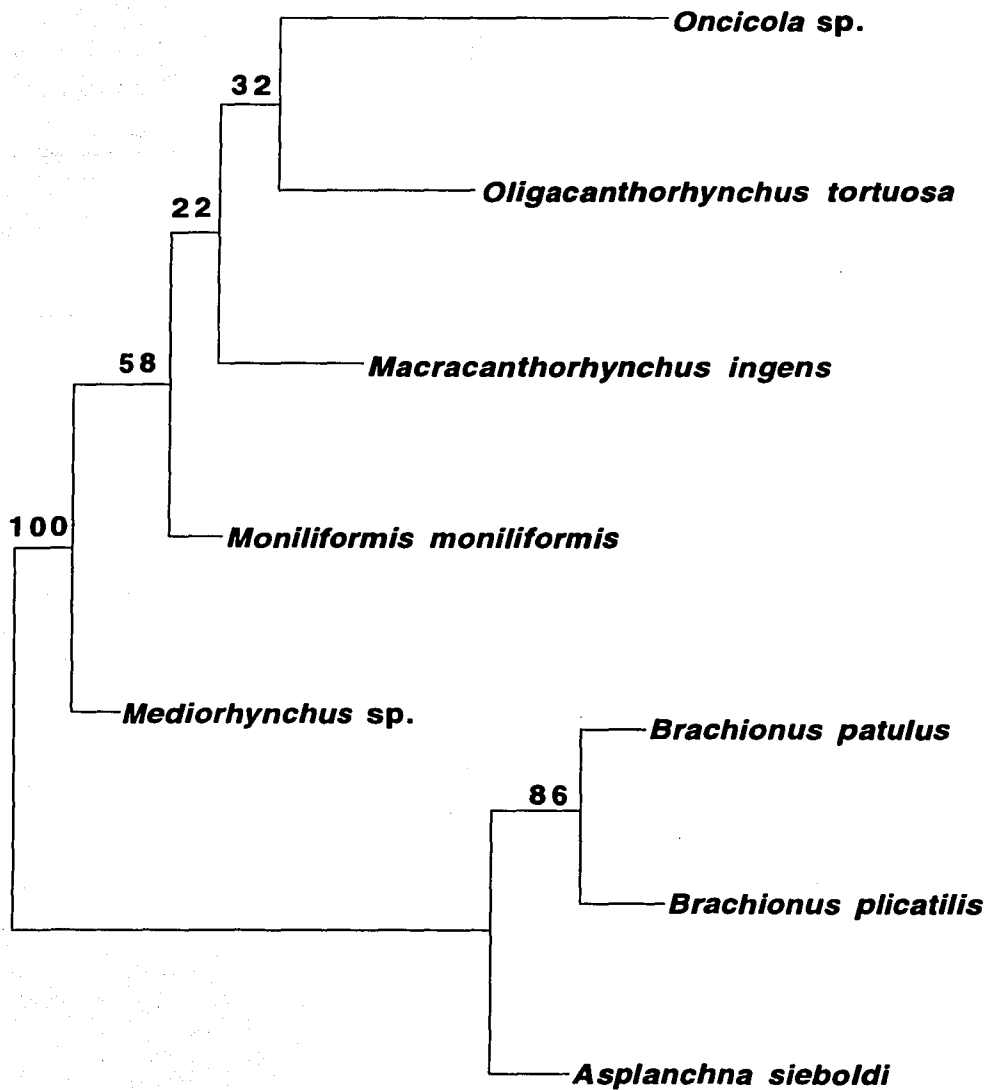


Fig. 17. Árbol de máxima verosimilitud basado en secuencias parciales del 16S rRNA mitocondrial. El $-\ln$ de verosimilitud es 2570.98. El largo de las ramas es proporcional a la sustitución de nucleótidos. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1000 búsquedas de bootstrap.

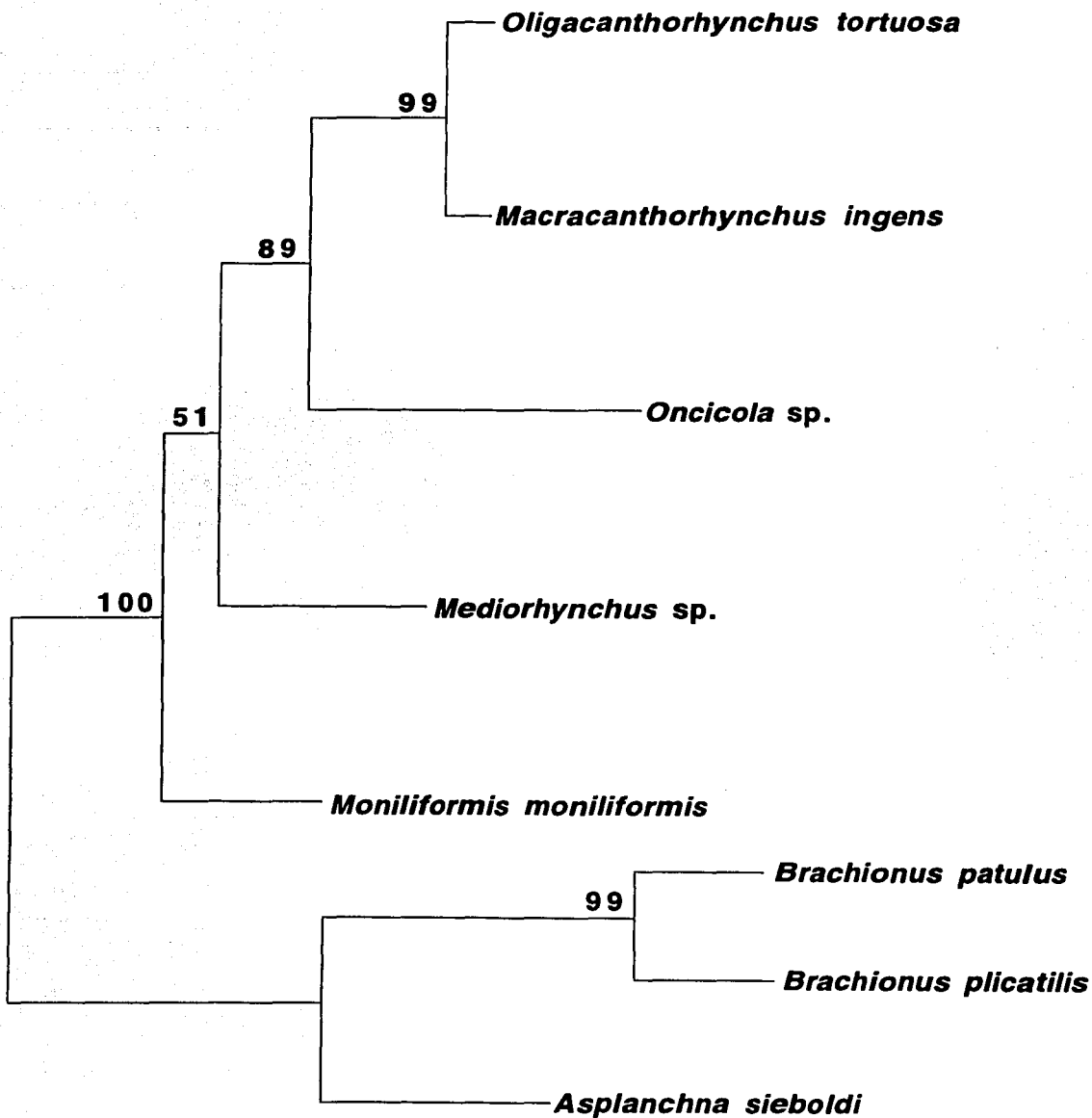


Fig. 18. Árbol de máxima similitud basado en secuencias parciales del citocromo oxidasa I (COI) del DNA mitocondrial. El $-\ln$ de verosimilitud es 3360.95. El largo de las ramas es proporcional a la sustitución de nucleótidos. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1000 búsquedas de bootstrap.

ML usando este modelo, mostró un solo árbol con un $-\ln 4914.53011$. La topología mostró que el orden más basal fue Moniliformida (*M.moniliformis*) y por lo tanto los ordenes Gigantorhynchida (*Mediorhynchus* sp.) y Oligacanthorhynchida (*M. ingens*, *Oncicola* sp., y *O. tortuosa*), son los más derivados. Todas las ramas fueron significativamente positivas ($p < 0.001$), con altos valores de bootstrap, excepto para la rama de *Mediorhynchus* sp., la cual mostró un valor de bootstrap de 47% (Fig. 19).

6.93 RNA nuclear de ITS1-5.8S-ITS2 de Archiacanthocephala

La amplificación del ITS1-5.8S-ITS2 resultó en un producto de 678-758 pb de largo para todos las taxa, con le excepción de *Mediorhynchus* sp., el cual tuvo 1198 pb. Esta base de datos consistió de 7 taxa con 1214 nucleótidos alineados. El promedio del contenido de G+C fue 46%. La prueba de verosimilitud indicó que el mejor modelo para esta base de datos fue Transversiones (TVM; Rodríguez *et al.*, 1990), con la tasa heterogénea (+G; Yang, 1994). El parámetro de la distribución gamma fue = 0.6076, con sitios no variables. El análisis de ML usando este modelo mostró un árbol con un $-\ln 8058.48695$. El árbol mostró la misma topología con el árbol construido con la base de datos del gen 18S RNA ribosomal. Todas las ramas fueron significativamente positivas ($p < 0.001$), con altos valores de bootstrap (Fig. 20).

6.94 Análisis combinado incluyendo secuencias mitocondriales de COI y 16S RNA y secuencias nucleares 18S RNA de Archiacanthocephala

Los tres genes formaron una matriz de datos de 2780 nucleótidos alineados. La prueba de verosimilitud mostró que el modelo que mejor se ajustaba a esta base de datos fue el de Transversiones (TVM; Rodríguez *et al.*, 1990), con sitios invariables (+I) y una tasa heterogénea (+G; Yang, 1994). La distribución gamma fue = 0.480, con una proporción de sitio invariables = 0.25. El análisis de ML usando este modelo mostró un solo árbol con un $-\ln 11440.73$. Todas las ramas fueron significativamente positivas ($p < 0.001$), con altos valores de bootstrap (Fig. 21). El árbol obtenido tiene la misma topología al nivel de ordenes con los árboles construidos para el COI mitocondrial, 18S y los ITS1-5.8-ITS2.

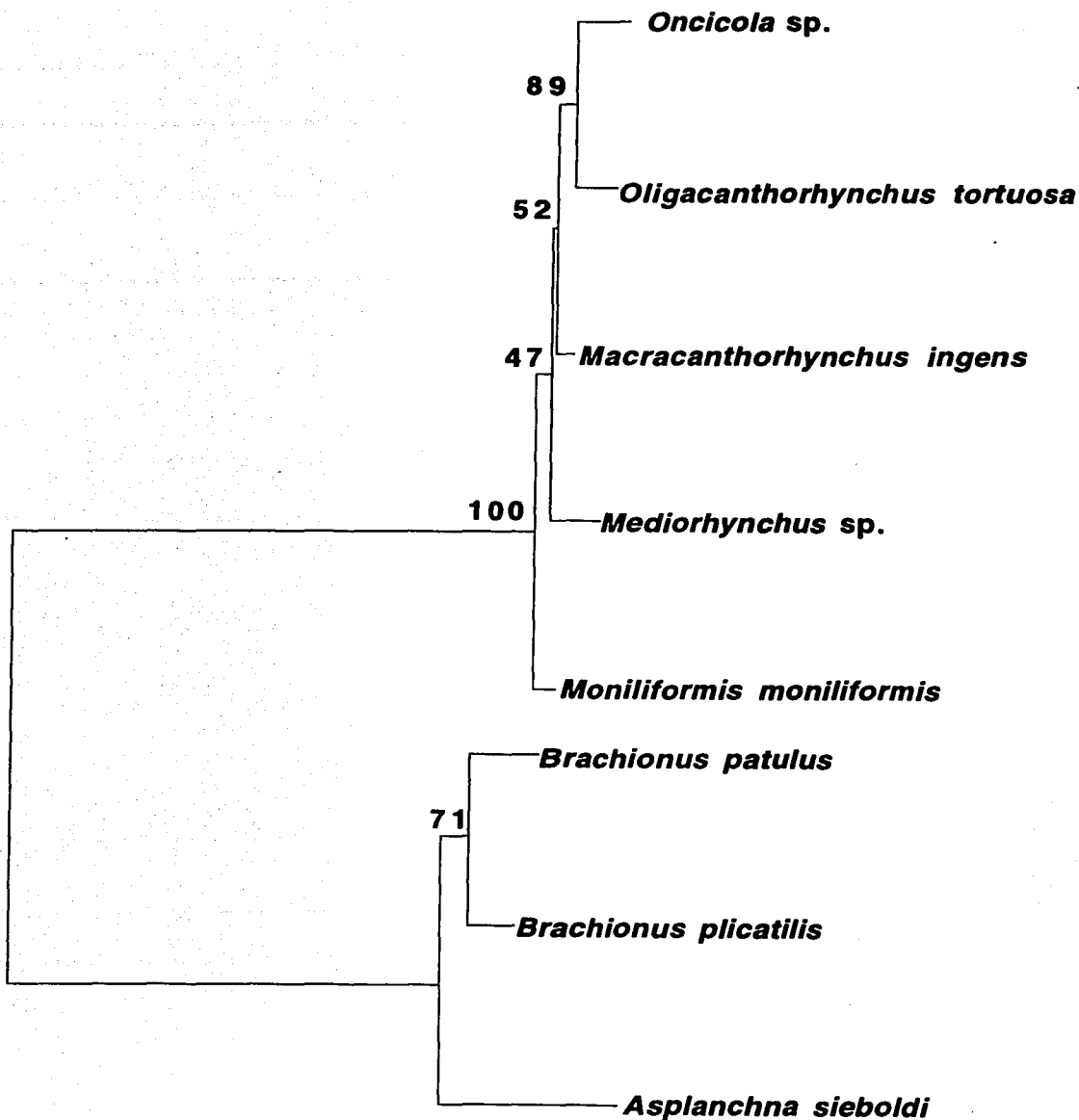


Fig. 19. Árbol de máxima verosimilitud basado en secuencias del 18S rRNA del DNA nuclear. El $-\ln$ de verosimilitud es 4914.53. El largo de las ramas es proporcional a la sustitución de nucleótidos. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1000 búsquedas de bootstrap.

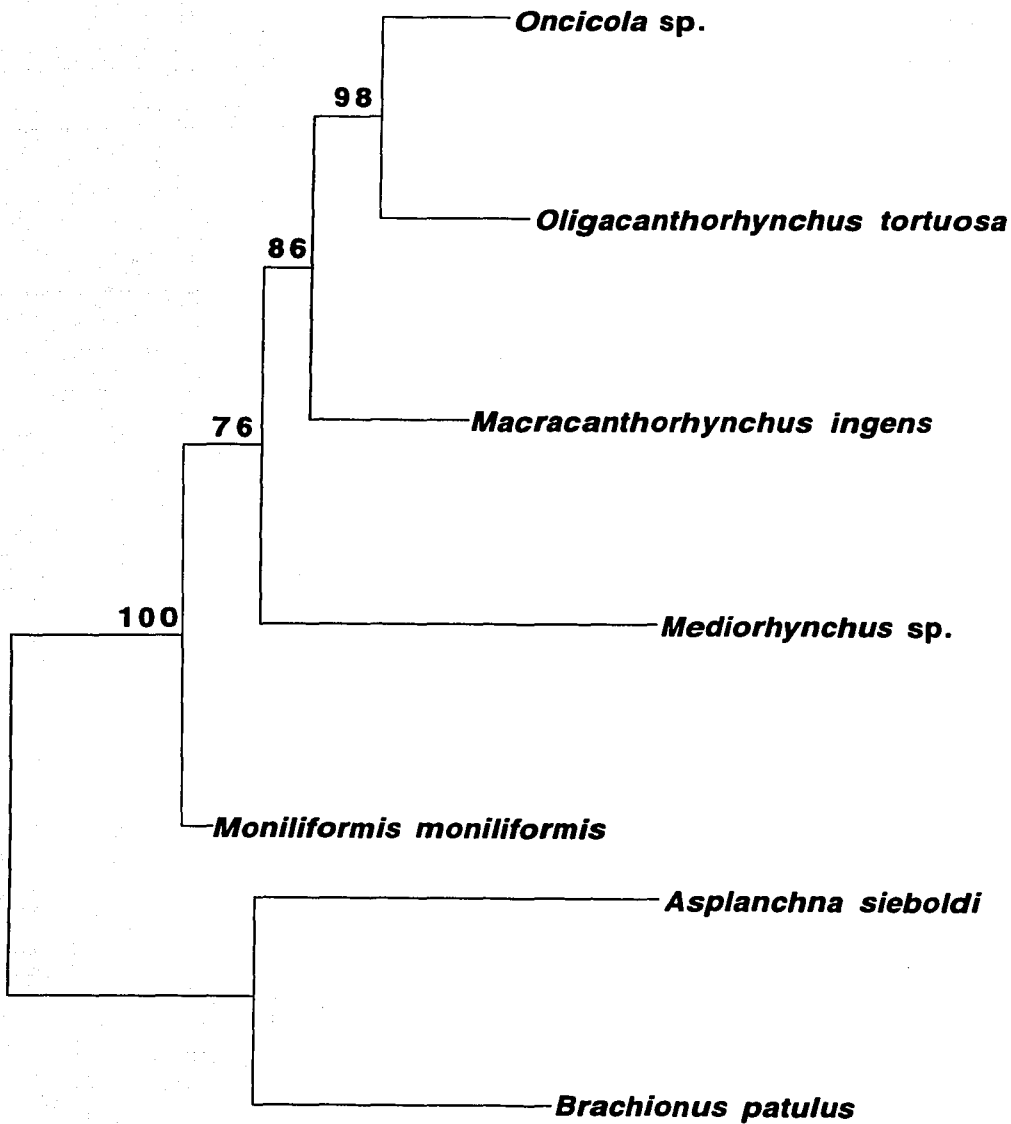


Fig. 20. Árbol de máxima verosimilitud basado en secuencias de los espaciadores transcritos internos ITS1-ITS2 así como el gen 5.8S del rRNA nuclear. El $-\ln$ de verosimilitud es 8058.49. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1000 búsquedas de bootstrap.

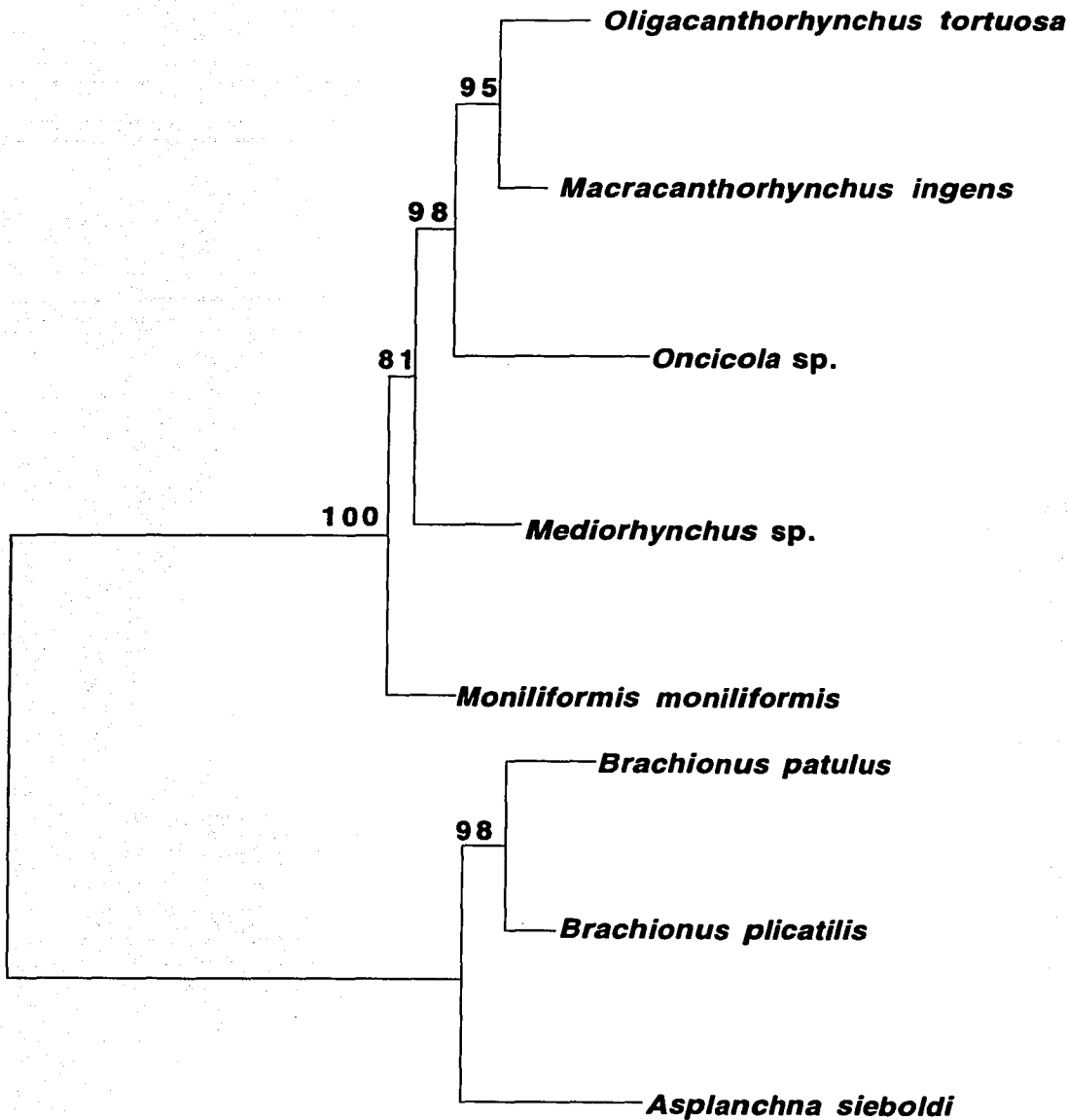


Fig. 21. Árbol de máxima verosimilitud obtenido del análisis combinado incluyendo secuencias mitocondriales del COI y 16S RNA y secuencias nucleares del 18S rRNA. El ln de verosimilitud es 11440.73. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1000 búsquedas de bootstrap.

6.95 Análisis del ITS1, ITS2 y 5.8S RNA ribosomal del género *Corynosoma*

Para profundizar en el análisis de Acanthocephala, se llevó al cabo un análisis incluyendo 10 especies de *Corynosoma*, que es uno de los géneros más diversos del phylum. Para ello, se obtuvieron secuencias de los espaciadores transcritos internos ITS1, ITS2, así como del gen 5.8S del RNA ribosomal. Un fragmento que incluyó el ITS 1, ITS2 y 5.8S RNA ribosomal, como el extremo 5' de la subunidad mayor (28S) fue amplificado, clonado y secuenciado para 10 especies del género *Corynosoma* y dos especies del género *Polymorphus* que fueron usados como grupos externos. Las especies utilizadas se muestran en la Tabla 4. El largo total del ITS 1, 5.8S e ITS 2 vario de 837 pb (varias especies) a 862 pb (*C. cetaceum*). ITS 1, contenía 191 sitios constantes, 196 sitios variable y 58 sitios informativos para parsimonia. El ITS 2, contenía 169 sitios constantes, con 198 variable y parsimonia uso solo 60 sitio. El contenido de G+C vario de 46% al 48% in ITS1, 39% al 47% en ITS2, y de 44 tal 48%, en 5.8S. El contenido total de GC fue 44% al 48%.

El alineamiento contenía 12 taxa con 892 nucleótidos. La prueba inicial de verosimilitud indicó que el mejor modelo para esta base de datos fue (HKY; Hasegawa *et al.*, 1985), con tasa heterogénea (+G; Yang, 1994), una tasa de transición/transversión de 1.94, con una distribución gamma de 1.57. El análisis de ML mostró un solo árbol con un $-\ln$ 3513.47. La topología resultante mostró que el género *Corynosoma* es monofilético *C. cetaceum* fue la especie más basal. El árbol mostró varios clados, uno incluyó dos especies (*C. australe* y *C. bullosum*), otro incluyó a (*C. validum* y *C. villosum*), mientras que *C. caspicum*, es la especie hermana del clado compuesto por *C. alaskensis*, *C. hamanni*, *C. enhydri* y *C. strumosum* (Fig. 22).

El análisis de máxima parsimonia solo uso 125 caracteres de un total de 892 pb alineados. Los restantes nucleótidos resultaron no informativos. El resultado de la búsqueda, mostró 3 árboles de 579 pasos, con un índice de consistencia de 0.919. Los árboles diferían en la posición de *C. alaskensis* con respecto a los otras tres especies del clado. El árbol consenso se muestra en la Figura 23; este árbol tuvo una topología similar al árbol obtenido por máxima verosimilitud, excepto por la politomía que incluyó a *C. alaskensis* y *C. hamanni*.

Tabla. 4. Taxa usados.

Nombre del Taxón.	Largo y GC% de ITS1	Largo y GC% de ITS2	Largo y GC% 5.8S	Largo total y GC%	No. Acceso	Huésped definitivo
<i>Corynosoma australe</i>	364 48	318 48	163 46	845 47	AF286307	<i>Otaria byronia</i>
<i>Corynosoma bullosum</i>	364 48	317 48	164 48	845 48	AF286308	<i>Mirounga leonina</i>
<i>Corynosoma caspicum</i>	357 47	318 47	164 47	839 47	AF286309	<i>Phoca caspica</i>
<i>Corynosoma cetaceum</i>	313 48	308 40	163 45	784 44	AF286310	<i>Pontoporia blainvillei</i>
<i>Corynosoma enhydri</i>	357 47	316 47	164 47	837 47	AF286311	<i>Enhydra lutris</i>
<i>Corynosoma hamanni</i>	358 48	316 46	164 48	838 47	AF286312	<i>Leptonychotes weddelli</i>
<i>Corynosoma strumosum</i>	357 48	316 46	164 48	837 47	AF286313	<i>Phoca largha</i>
<i>Corynosoma validum</i>	362 47	317 47	164 47	843 47	AF286314	<i>Odobenus rosmarus</i>
<i>Corynosoma villosum</i>	362 48	316 48	164 48	842 48	AF286315	<i>Eumetopias jubatus</i>
<i>Corynosoma alaskensis.</i>	357 47	316 47	164 48	837 47	AF461420	<i>Phocaena vomerina</i>
<i>Polymorphus sp.</i>	322 46	247 50	164 47	733 48	AF461421	<i>Anas platyrhynchos</i>
<i>Polymorphus brevis</i>	311 48	291 39	164 44	766 44	AF286306	<i>Nycticorax nycticorax</i>

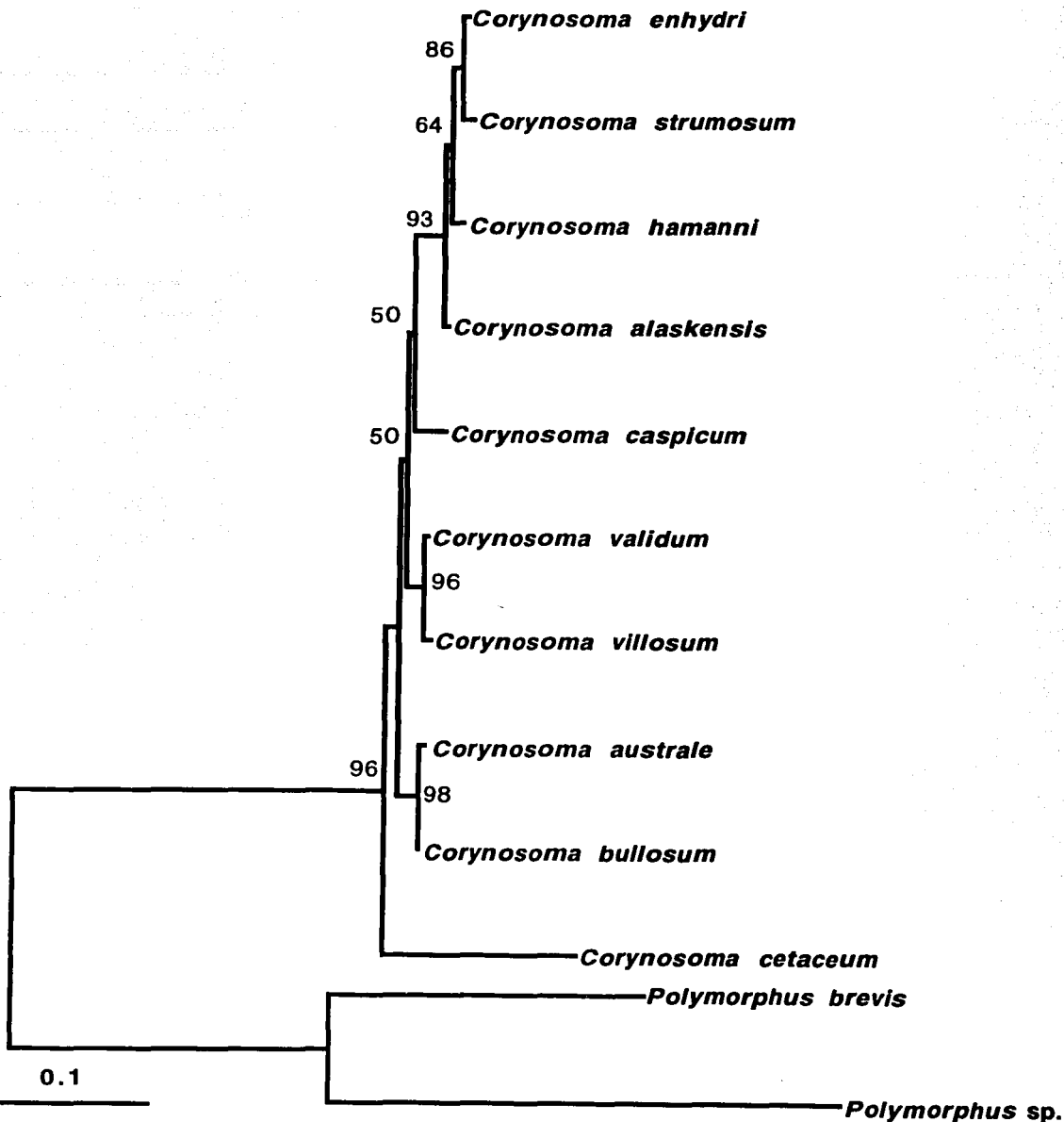


Fig. 22. Árbol de máxima verosimilitud basado en secuencias de los espaciadores transcritos internos ITS1-ITS2 así como el gen 5.8S del rRNA nuclear para 10 especies del género *Corynosoma*. El $-\ln$ de verosimilitud es 3150.99. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1000 búsquedas de bootstrap.

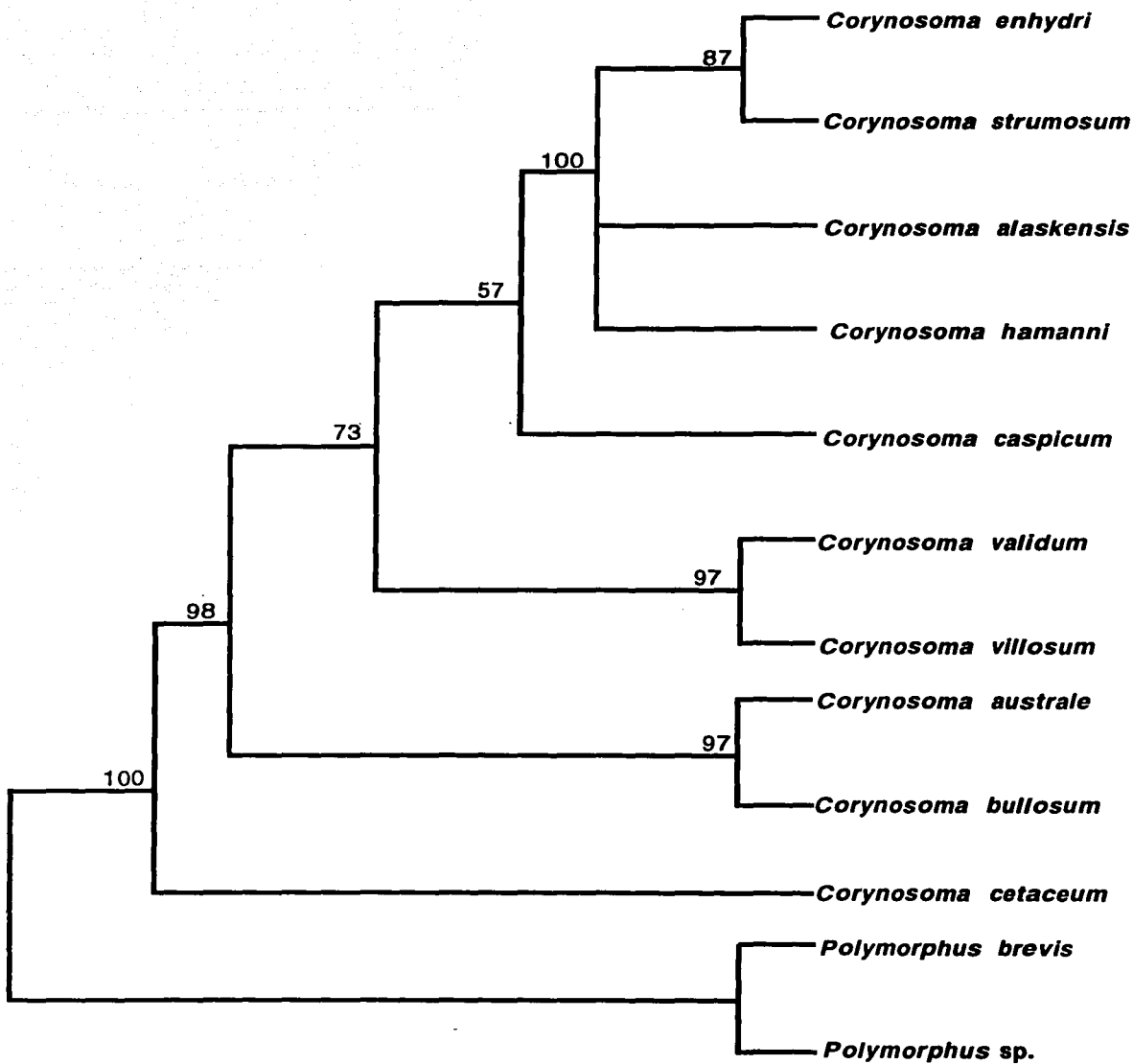


Fig. 23. Árbol consenso de máxima parsimonia para 10 especies del género *Corynosoma*. El número adyacente a las ramas indica el porcentaje de 1000 búsquedas de bootstrap.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Relación entre Acanthocephala y Rotifera

Trabajos recientes basados en caracteres morfológicos y moleculares sugieren que el phylum Acanthocephala es el grupo hermano del phylum Rotifera (Winnepennincky *et al.*, 1995; Wallace *et al.*, 1996). También se ha considerado al phylum Acanthocephala como un subtaxon dentro de Rotifera (Lorenzen, 1985; Garey *et al.*, 1996, 1998). En el presente proyecto de tesis, uno de los objetivos planteados fue esclarecer la relación entre Acanthocephala y Rotifera, para ello se usaron 6 nuevas secuencias del 18S RNA del phylum Rotifera (2 pertenecientes a la clase Bdelloidea y 4 de la clase Monogononta). Los análisis de máxima verosimilitud mostraron que Rotifera es monofilético, como grupo hermano de Acanthocephala, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)), estos resultados difieren con la hipótesis propuestas por Garey *et al.*, (1996, 1998), quienes encontraron que la clase Bdelloidea era grupo hermano de Acanthocephala, (Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta)).

¿Porque difieren nuestras conclusiones de las obtenidas por Garey *et al.*, (1996, 1998)? Pueden mencionarse cuatro principales razones: la primera es la diferencia en las regiones secuenciadas; la segunda son las diferencias en el alineamiento (este punto es particularmente importante, ya que los alineamientos pueden tener un factor de subjetividad); la tercera son las diferencias en los taxa muestreados y la cuarta son las diferencias en los métodos de inferencia filogenética.

En el presente proyecto de tesis comparamos 4 diferentes alineaciones o bases de datos: la alineación de Garey *et al.*, (1998) para genes mitocondriales 16S RNA; la alineación de Garey *et al.*, (1996) para genes nucleares 18S RNA; las secuencias generadas en este trabajo fueron alineadas con las secuencias de Garey *et al.*, (1996), de acuerdo a sus criterios de alineación; las secuencias de Garey *et al.*, (1996), fueron alineadas con nuestras secuencias, usando nuestro criterio de alineación. Los árboles resultantes de estos análisis se muestran en las Figuras 11-15. Nuestro análisis es mucho más amplio ya que comparamos diferentes bases de datos e incluimos una base de datos expandida del 18S RNA ribosomal, la cual contaba con más taxa de las que analizó Garey *et al.*, (1996). Además, el número de muestras adicionales es un punto importante

para resolver la relación entre Acanthocephala y Rotifera, en el presente trabajo incluimos una secuencia del bdelloideo *Philodina roseola*; es decir que nuestro análisis incluyó dos secuencias más de rotíferos. La rama de *Philodina acuticornis* aparentemente es más larga que las otras especies de Rotifera, debido a una alta tasa de sustitución (Mark Welch, 2001).

A pesar de lo anterior, la hipótesis de la inclusión de Acanthocephala en Rotifera no puede ser rechazada todavía, ya que nuestro análisis, ni otro ha incluido secuencias del gen 18S RNA ribosomal de la clase Seisonoidea del phylum Rotifera. Las dos especies descritas de Seisonoidea son parásitas de crustáceos. La clase Seisonoidea bien pudiera representar la clase más basal de los Rotíferos, lo cual significa que el phylum Acanthocephala todavía pudiera resultar ser un subtaxón de Rotíferos, pero solo como grupo hermano de Eurotatoria (Bdelloidea y Monogononta). De hecho, este es el esquema propuesto en un estudio reciente, basado en secuencias de una proteína de estrés térmico (*heat shock*) denominada hsp82 del DNA nuclear, en donde los Acanthocephala aparecen como un grupo hermano de rotíferos de la clase Seisonoidea (Mark-Welch, 2000).

La filogenia de los invertebrados ha sufrido una profunda transformación a raíz de la introducción de los métodos de inferencia molecular. La posición del phylum Acanthocephala dentro de los Metazoarios ha sido estudiada en diferentes ocasiones usando el gen 18S RNA ribosomal como marcador molecular. El phylum Acanthocephala ha sido ubicado como uno de los grupos triploblasticos más basales dentro de los metazoarios (Telford y Holland, 1993; Giribet y Ribera 1998; Littlewood *et al.*, 1998; Winnepenninckx *et al.*, 1998; Wirz *et al.*, 1999; Giribet, 2000). Independientemente de la cuestión tratada arriba de si Acanthocephala forma parte de Rotifera, queda claro que ambos phyla están cercanamente relacionados. En los nuevos esquemas, el phylum generalmente forma un clado con Rotifera que ha sido denominado como Syndermata (Carranza *et al.*, 1997; Littlewood *et al.*, 1998; Winnepenninckx *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha erigido un nuevo phylum: Cycliophora (formado por simbioses) que aparece como el grupo hermano de Syndermata (Winnepenninckx *et al.*, 1998). Trabajos recientes basados en caracteres morfológicos y moleculares han propuesto que Acanthocephala y Rotifera, junto con Gnathostomulida, Gastrotricha y

Platyhelminthes forman el infrareino llamado Platyzoa (Cavalier-Smith 1998; Giribet *et al.*, 2000).

7.2 Relaciones filogenéticas dentro del Phylum Acanthocephala

Los análisis filogenéticos basados en secuencias del gen 18S RNA ribosomal apoyan la hipótesis de que Acanthocephala es un grupo monofilético e independiente que incluye tres sub-clados monofiléticos, cada uno de los clados concuerda con la clasificación morfológica de este grupo de parásitos (Bullock, 1969; Amin, 1985; 1987). Las relaciones filogenéticas dentro del phylum Acanthocephala definidas por caracteres morfológicos han sido controvertidas, ya que cada una de las clases Archiacanthocephala (Haffner, 1950; Golvan, 1959), Eoacanthocephala (Van Cleave, 1948; Petrotschenko, 1956) y Palaeacanthocephala (Lang 1953), han sido propuestas como las de aparición más temprana dentro del phylum. Los análisis filogenéticos basados en secuencias del gen 18S de RNA ribosomal sugieren que Archiacanthocephala es la clase ancestral. Por lo tanto, las clases Eoacanthocephala y Palaeacanthocephala formaron un clado derivado (ver Figura 15). Las relaciones filogenéticas dentro de la clase Palaeacanthocephala son también congruentes con la clasificación morfológica de este grupo de parásitos, ya que la clase tiene 2 órdenes: Echinorhynchida (*Filisoma bucerium*, *Leptorhynchoides thecatus*, *Rhadinorhynchus* sp., *Koronacantha pectinaria*, *Pomphorhynchus bulbocolli* y *Echinorhynchus gadi*) y Polymorphida (*Centrorhynchus micocephalus*, *Centrorhynchus conspectus*, *Plagiorhynchus cylindraceus*, *Polymorphus* sp. , *Polymorphus altmani*, *Polymorphus brevis* y *Corynosoma enhydri*). Las relaciones filogenéticas dentro de la clase Archiacanthocephala también son consistentes con la existencia de tres órdenes: Moniliformida (*Moniliformis moliformis*), Giganthorhynchida (*Mediorhynchus* sp., y *Mediorhynchus grandis*) y Oligacanthorhynchida (*Oncicola* sp., *Oligacanthorhynchus tortuosa* y *Macracanthorhynchus ingens*; Fig. 15).

7.3 ¿Es Polyacanthocephala una clase real?

En 1987 se propuso que el phylum Acanthocephala está formado por cuatro clases en lugar de las tres clases tradicionalmente aceptadas (Amin, 1987). Basado en un

análisis de caracteres morfológicos, 4 especies de Polyacanthocephala, que anteriormente pertenecía a la subfamilia Rhadinorhynchidae, dentro de la clase Palaecanthocephala (Petrenchenko, 1956; Golvan, 1962), fueron erigidas como una nueva clase: Polyacanthocephala. Nuestro análisis basado en secuencias del gen 18S RNA (Fig. 16) sugieren que Polyacanthocephala está más relacionada con Eoacanthocephala, que con Palaecanthocephala, lo que apoya el concepto de que Polyacanthocephala representa una clase diferente dentro del Phylum. Sin embargo, la posibilidad de que Polyacanthocephala sea un nuevo orden dentro de Eoacanthocephala no puede ser rechazada todavía, ya que se requiere incluir un mayor número de secuencias de Polyacanthocephala.

7.4 Relaciones filogenéticas de la clase Archiacanthocephala

Otro objetivo de este trabajo fue evaluar las relaciones filogenéticas dentro de la clase Archiacanthocephala usando los genes del 16S RNA y COI del DNA mitocondrial, los cuales son heredados de forma materna e independiente del DNA nuclear, además, los genes mitocondriales se encuentran en un gran número de copias altamente conservadas, y han sido ampliamente usados en análisis filogenéticos (Avice *et al.*, 1987). El gen 16S RNA ribosomal en promedio evoluciona 3.2 veces más rápido que el 18S RNA nuclear. El árbol obtenido con secuencias parciales del gen 16S RNA mostró Archiacanthocephala como un grupo monofilético en acuerdo con los recientes análisis basados en secuencias del gen 18S RNA nuclear y en caracteres morfológicos (Near *et al.*, 1998; Garcia-Varela *et al.*, 2000; Monks, 2001). Sin embargo, la topología de Archiacanthocephala tuvo valores bajos de bootstrap. Este análisis mostró al orden Gigantorhynchida (*Mediorhynchus* sp.), como el más basal dentro de la clase.

En contraste, nuestro análisis basado en secuencias codificantes del COI, colocó a Moniliformida como el orden más basal dentro de Archiacanthocephala, en acuerdo con los árboles construidos con el 18S RNA, ITS1-5.8S-ITS2 y su combinado. La tasa de substitución en promedio para el COI fue 1.1 veces más rápida que el 16S RNA mitocondrial, sin embargo, cuando se eliminó la tercera posición de los codones de COI, la tasa de evolución fue 1.31 veces más lenta que el 16S RNA mitocondrial, indicando que estas diferencias en la tasa de substitución son debidas principalmente a cambios

sinónimos permitidos en la tercera posición, la cual evoluciona más rápido que la primera y segunda posición (Li, 1997).

Nuestro análisis basado en secuencias del gen 18S RNA ribosomal, también colocó a Moniliformida como el orden más basal dentro de la clase. El árbol mostró ramas cortas, lo que refleja una tasa baja de evolución al nivel de nucleótidos, sin embargo, este árbol mostró la misma topología al árbol construido con ITS1-5.8S-ITS2 (Fig. 20).

Otra región secuenciada para evaluar las relaciones filogenéticas dentro Archiacanthocephala, fue el segmento de ITS1-5.8S-ITS2, el cual tiene una tasa de evolución más rápida que el 18S y 28S RNA. La región del ITS1-5.8S-ITS2 ha sido usada frecuentemente para resolver relaciones entre grupos cercanamente relacionados (Hillis y Dixon, 1991). En el presente trabajo encontramos que el ITS de Archiacanthocephala tiene una tasa alta de sustitución a nivel de nucleótidos, en especial *Mediorhynchus* sp., que mostró la rama más larga dentro de la clase. Ambos ITS contienen pequeñas unidades repetidas que son responsables de las variaciones en su longitud. La duplicación e inserción de pequeños segmentos de nucleótidos es una característica común de los ITS de parásitos, por ejemplo, fragmentos repetidos se ha encontrado en el ITS1 del Digéneo *Dolichosaccus* (Luton *et al.*, 1992), también en *Schistosoma haematobium* se ha encontrado el mismo fenómeno en ITS2 (Kane y Rollinson, 1994). Las relaciones filogenéticas inferidas a partir del segmento ITS1-5.8S-ITS2, estuvieron completamente de acuerdo con los árboles construidos con el 18S RNA nuclear y el combinado (ver abajo). En promedio la tasa de sustitución de ITS1-5.8-ITS2 fue 1.31 más rápida que el 16S RNA mitocondrial, 1.2 veces que el COI y 3.3 veces más rápida que el 18S RNA nuclear. La tasa alta de mutación mostrada en esta región puede ser debida a una baja o nula restricción funcional (Hillis y Dixon, 1991).

Las diferencias entre todas las topologías obtenidas fueron mínimas; el 16S RNA mitocondrial colocó al orden Gigantorhynchida como el grupo más basal. Para resolver la controversia del grupo más basal dentro de la clase Archiacanthocephala, realizamos un análisis combinado usando tres genes: el DNA mitocondrial para la COI y para el 16S y el DNA nuclear para 18S. El resultado del análisis combinado confirmó que Moniliformida es el orden más basal dentro de Archiacanthocephala, y por lo tanto, los

ordenes Gigantorhynchida y Oligacanthorhynchida fueron los grupos más derivados. Estudios previos han demostrado que el uso de una mayor extensión y número de secuencias, o el uso de bases de datos combinadas, como en este ejemplo, son necesarios para apoyar o refutar algunas hipótesis filogenéticas (Cummings *et al.*, 1995; 1999; Otto *et al.*, 1996).

Aunque el número de taxa de Archiacanthocephala usados en nuestro análisis fue reducido, la organización de cada orden a través de los análisis individuales y el combinado son altamente congruentes con la clasificación tradicional de este grupo de parásitos basada en caracteres morfológicos (Bullock, 1969; Amin, 1985).

En este proyecto de tesis el orden Oligacanthorhynchida fue el grupo mejor representado con tres géneros (*Oncicola*, *Oligacanthorhynchus* y *Macracanthorhynchus*). Un rasgo distintivo de este grupo son la presencia de protonefridios (sistema excretor). El estudio de este carácter, había llevado a sugerir anteriormente que Oligacanthorhynchida es el grupo más basal del phylum Acanthocephala. Ello se debe a que los protonefridios son considerados como un rasgo primitivo proveniente de rotíferos de vida libre. Además, usando los caracteres morfológicos del protonefridio, los rotíferos habían sido considerados como el grupo hermano del phylum Acanthocephala (Haffner, 1950; Golvan, 1959). En nuestros análisis, como se discutió arriba, Oligacanthorhynchida siempre ocupó la posición más derivada en todos los árboles. Por lo tanto, la presencia de protonefridios en Oligacanthorhynchida aparentemente representa la persistencia de un rasgo primitivo (plesiomórfico) que fue posteriormente perdido en todos los acantocéfalos.

7.5 Relaciones filogenéticas de 10 especies del género *Corynosoma*

Finalmente, nuestro análisis del phylum Acanthocephala incluyó un estudio enfocado a establecer las relaciones filogenéticas dentro del género *Corynosoma*. Las secuencias de 10 especies de *Corynosoma* registradas en este trabajo de tesis difieren en tamaño con respecto a otros helmintos, por ejemplo, algunas especies de Platyhelminthes han mostrado varios segmentos repetidos de 100 pb y 50 pb en ITS1 e ITS2 respectivamente, aunque estas unidades repetidas no fue encontrada en *Corynosoma*, sin embargo la función de estos segmentos repetidos no es conocida (Luton

et al., 1992; Kane y Rollinson, 1993; Morgan y Blair, 1995). El contenido de G+C señalado para el género *Corynosoma* también es diferente al de otros grupos de Platyhelminthes. La variación en tamaño y contenido de G+C en ITS1 e ITS2 entre los grupos puede ser debida a una rápida tasa de cambio permitido en estas regiones no-codificantes.

La variación nucleotídica entre las especies de *Corynosoma*, fue del 1 y el 4 %, mientras que *C. cetaceum*, tuvo una variación del 10 al 11% con respecto a otras especies del género *Corynosoma*, este nivel de variación es razonable para especies congénéricas. Por ejemplo, Kane y Rollinson (1993) encontraron una variación del 0.9% entre *S. haematobium* y *S. intercalatum*. Morgan y Blair (1995), también encontraron una variación del 1 al 4% en especies de *Echinostoma* (Digenea, Platyhelminthes). En contraste, la variación nucleotídica entre el género *Corynosoma* y *Polymorphus* sp, o *Polymorphus brevis*, fue de 38 y 43% respectivamente.

C. cetaceum, fue la especie más basal en los análisis de máxima verosimilitud y máxima parsimonia (Figs.22 y 23). La diagnosis de *C. cetaceum* ha sido controversial basado en caracteres morfológicos, ya que ha sido sinónimo de *Polymorphus arctocephali* (Smales, 1986), aunque un nuevo trabajo sugiere que *Polymorphus arctocephali* Smales, 1986 es sinónimo de *Corynosoma cetaceum* (Aznar, 1999). *C. cetaceum* ha sido encontrado en el estomago de cetáceos del Hemisferio Sur, este hábitat es inusual para un acantocéfalo, ya que todos los acantocéfalos adultos son parásitos del intestino de sus huéspedes definitivos (Aznar *et al.*, 1994, 2001).

Los árboles de máxima verosimilitud y máxima parsimonia mostraron la misma topología para el clado formado por *C. australe* y *C. bullosum*, estas especies comúnmente se asocian a *Mirounga leonine*, *Phalacrocorax atriceps*, *Lobodon carcinophaga*, así como a focidos y otaridos de la Antártica (Zdzitowiecki, 1989). La relación entre *C. validum* y *C. villosum* es razonable ya que ambas especies son parásitos de focas del Pacífico Norte (Shults, 1982). *C. caspicum* es endémico del mar caspio parásito de *Phoca caspica*.

La especie *C. alaskensis* y *C. hamanni* se agruparon en un clado, estas dos especies son parásitas de *Enhydra lutris* y de focas del Pacífico Norte. La especie *C. strumosum* ha sido encontrada en focidos, otaridos, en mamíferos no marinos, aves e

incluso el humano (Schmidt, 1971; Richardson y Cole, 1997; Hoberg *et al.*, 1997). El gran número de huéspedes usados por *C. strumosum* y otras especies de *Corynosoma*, se debe a que los cistacantos (estadio larval) son parásitos de un gran número de peces, los cuales son ingeridos por los huéspedes definitivos.

Las secuencias de ITS1, ITS2 y 5.8S de RNA ribosomal mostraron suficiente variación para diferenciar 8 especies nominales del género *Corynosoma*. La relación de *C. hamanni* y *C. alaskensis* no pudieron ser diferenciadas usando parsimonia, sin embargo las relaciones entre las especies se resolvieron cuando usamos el método de máxima verosimilitud, aunque *C. hamanni* y *C. alaskensis* mostraron ramas cortas, como resultado de una reciente separación entre las especies o por una baja tasa de sustitución al nivel de nucleótidos.

Este proyecto representa el primer estudio para determinar las relaciones filogenéticas de este grupo de acantocéfalos usando las regiones de los espaciadores transcritos internos como marcadores moleculares. La hipótesis postulada se tiene que considerar tentativa del género *Corynosoma*, hasta en tanto no se incluyan más secuencias que permitan completar la historia evolutiva de este género de parásitos.

VIII. METAS FUTURAS

Un proyecto que se deriva de este trabajo de tesis doctoral es esclarecer las relaciones filogenéticas de Palaeacanthocephala, esta clase esta compuesta por dos órdenes: Echinorhynchida y Polymorphida. El orden Echinorhynchida contiene diez familias con 60 géneros. El orden Polymorphida está compuesto por tres familias con 19 géneros. Los miembros de la clase usan a peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos como huéspedes definitivos. La hipótesis filogenética derivada del análisis de las secuencias del gene 18S RNA ribosomal nos permitirá entender con mayor certeza las relaciones entre estos parásitos y la relación con sus huéspedes definitivos. Otro objetivo que se puede alcanzar es realizar un análisis comparativo, incluyendo caracteres morfológicos y ecológicos de los parásitos. Con esto, se pretende establecer una hipótesis de reloj molecular, siempre y cuando las secuencias del 18S rRNA evolucionen a la misma tasa, si esta hipótesis se cumple entonces se estimará los tiempos de divergencia entre los taxa analizados.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adlar RD, Barker SC, Blair D, Cribb TH (1993). Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *Int. J. Parasitol.* 23:423-425.
- Aleshin VV, Milyutina IA, Kedrova OS, Vladychenskaya NS, Petrov NB (1998). Phylogeny of *Nematoda* and *Cephalorhyncha* derived from 18S rDNA. *J. Mol. Evol.* 47:597-605.
- Amin OM (1985) Classification. In: Crompton DWT, Nickol BB (eds) *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, London, pp 27-72
- Amin OM (1987) Key to the families and subfamilies of Acanthocephala with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a New Order (Polyacanthorhynchida). *J. Parasitol.* 73:1216-1219.
- Amin OM (1992) Review of the genus *Polymorphus* Lúhe, 1911 (Acanthocephala: Polymorphidae), with the synonymization of *Hexaglandula* Petrochenko, 1950, and *Subcorynosoma* Hoklova, 1967 and a key to the species. *Qatar. Univ. Sci. J.* 12: 115-123.
- Amin OM, Dezfuli SB (1995) Taxonomic notes on *Polyacanthocephala kenyensis* (Acanthocephala: Polyacanthorhynchidae) from lake Naivasha, Kenya. *J. Parasitol.* 81:76-79.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lam BT, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Aznar FJ, Balbuena JA, Raga JA (1994) Helminth communities of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinean waters. *Can. J. Zool.* 72:702-706.
- Aznar FJ, Bush J, Raga JA (1999) *Polymorphus arctocephali* Smales, 1986, a synonym of *Corynosoma cetaceum* Johnston & Best 1942 (Acanthocephala: Polymorphidae). *Syst. Parasitol.* 44: 59-70.
- Aznar, F.J., Bush A.O., Balbuena J.A. & Raga J.A. (2001) *Corynosoma cetaceum* in the stomach of franciscanas, *Pontoporia blainvillei* (cetacea): an exceptional case of habitat selection by an acanthocephala. *J. Parasitol.* 87:536-541.
- Baldwin BG (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Mol. Phylogenetics. Evol.* 1:3-16.

- Baverstock PR, Fielke R, Johnson AM, Bray AB, Beveridge L (1991) Conflicting phylogenetic hypotheses for the parasitic platyhelminths tested by partial sequencing of 18S ribosomal RNA. *Intl. J. Parasitol.* **21**: 329-339.
- Blair D, Campos A, Cummings MP, Lacleste JP (1996). Evolutionary biology of parasitic platyhelminths: The role of molecular phylogenetics. *Parasitology Today.* **2**:67-71.
- Bowles J, Blair D, Mcmanus DP (1995) A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **4**:103-109.
- Brown WM (1985) The mitochondrial genome of animals. *In*: MacIntyre RJ (ed) *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York, pp 95-130
- Brusca RC, Brusca GJ (1990) *Invertebrates*. Sinauer, Sunderland, MA
- Bullock WL (1969) Morphological features as tool and pitfall in acanthocephalan systematics. *In*: Schmidt GD (eds) *Problems in systematics of parasites*. University Park Press, Baltimore, pp 9-45.
- Campos A, Cummings MP, Reyes JL, Lacleste JP (1998) Phylogenetic relationships of platyhelminthes based on 18S ribosomal gene sequences. *Mol. Phylogenetic. Evol.* **10**:1-10.
- Carranza S, Bagueña J, Riutort M (1997) Are the platyhelminthes a monophyletic group?. An assessment using 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**:485-497.
- Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* **73**:203-266.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1964) Analysis of human evolution. *In* " Genetic Today" (Geerts SJ Ed.), pp 923-33, Proc. Int.Congr. Genet., 11th. The Hague the Netherlands: Pergamon.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum.Genet.* **19**:233-257.
- Clark RB (1979) Radiation of the Metazoa. *In*: Houses MR (eds) *The Origins of major invertebrate groups*. Academic Press, New York, pp 55-101
- Conway Morris S, Crompton DWT (1982) The origins and evolution of the Acanthocephala. *Biol. Rev.* **57**:85-115.
- Cummings MP, Otto SP, Wakeley J (1995) Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **12**:814-822.
- Cummings MP, Otto SP, Wakeley J (1999) Genes and other samples of DNA sequence data for phylogenetic inference. *Biol. Bull.* **196**:345-350.

- Després L, Imbert-Establet D, Combes C, Bonhomme F (1992). Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiations of schistosomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1**:295-304.
- De Ridder M (1956) Enkele beschouwingen over de taxonomie der raderdieren. *Natuurwet. Tijdschr.* **38**:160-166.
- Devereux JR, Haerberli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the Vax. *Nucleic Acids Res.* **12**:387-395.
- Felsenstein J (1978). Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* **27**:401-410.
- Felsenstein J (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368-376.
- Felsenstein J (1984). Distance methods for inferring phylogenies: A justification. *Evolution.* **38**:16-24.
- Felsenstein J (1988). Phylogenies from molecular sequences: Inferred and reliability. *Annu. Rev. Genet.* **22**:521-565.
- Felsenstein J (1999) PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.572c. University of Washington, Seattle, Washington.
- Fitch, W. M. and Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science.* **155**:279-278.
- García-Varela M, Pérez-Ponce de León G, De la Torre P, Cummings MP, Sarma SSS, Lacleste JP (2000) Phylogenetic relationships of acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* **50**: 532-540.
- Garey RJ, Near TJ, Nonnemacher MR, Nadler SA (1996) Molecular evidence for Acanthocephala as a subtaxon of Rotifera. *J. Mol. Evol.* **43**:287-292.
- Garey RJ, Schmidt-Rhaesa A, Near TJ, Nadler SA (1998) The evolutionary relationships of rotifers and acanthocephalans. *Hydrobiologia.* **387/388**:83-91.
- Gaut, B.S. and Lewis, P. O. (1995). Success of maximum likelihood in four-taxon case. *Mol. Boil. Evol.* **12**:152-162.
- Giribet G, Distel DL, Polz M, Sterrer W, Wheeler WC (2000) Triploblastic relationships with emphasis on the Acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cyclopoda, Platyhelminthes and Chaetognatha: A combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* **49**: 539-562.

- Giribet G, Ribiera C (1998) The position of arthropods in the animal kingdom: A search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny. *Mol. Phylogenetics and Evol.* **9**: 481-488.
- Golvan YJ (1959) Protonephridies et taxonomie des acanthocéphales. Proceedings of the Fifteenth (London) International Congress of Zoology, 960
- Golvan YJ (1962) Le phylum Acanthocephala (Quatrieme note). La classe des Archiacanthocephala (A. Mayer 1931). *Ann. Parasitol. Humm. Comp.* **37**:1-72.
- Graybeal A (1998) Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem. *Sys. Biol.* **47**:9-17.
- Haffner K (1950) Organisation und systematische stellung der Acanthocephala. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **145**:245-274.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**:160-174.
- Hennig W (1950) Grundzüge einer theorie der phylogenetischen systematik. Deutsche Zentralverlag, Berlin.
- Higgins DG, Sharp PM (1988) Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene.* **73**:237-244.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetics inference. *Q. Rev. Biol.* **66**: 411-453.
- Hillis DM, Moritz C, Mable KB (1996) "Molecular systematic". Sinauer Associate. Sunderland, MA.
- Hoberg EP, Henny CJ, Hedstrom OR, Grove RA (1997) Intestinal helminths of river otters (*Lutra canadensis*) from the Pacific northwest. *Parasitology.* **83**:105-108.
- Hyman LB (1951) The invertebrates, vol. III: pseudocoelomate groups. McGraw-Hill, New York
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In " Mammalian proteins metabolism" (Munro HN. Ed), pp 21-132. Academy Press, NY.
- Kane RA, Rollinson D (1994) Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal spacers of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalum* and *Schistosoma matterni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **63**: 153-156.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111-120.
- Kimura M (1981) Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:454-458.

- Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from sequence data and branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* **229**:170-179.
- Kitching IJ, Forey LP, Humphries JC, Williams MD (1998) "Cladistics". Oxford University Press.
- Korbsrisate S, Mongkolsuk S, Haynes JR, England D, Sirisinha S (1991) Nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA-encoding gene from *Opisthorchis viverrini*. *Gene*. **105**:259-261.
- Lang K (1953) Die Entwicklung des Eies von *Priapulidus caudatus* Lam und die systemische Stellung der Priapuliden. *Arkiu. Zoo.* **5**:321-348.
- Lee SB, Taylor JW (1991). Phylogeny of five fungal-like protocystan phytophthora species inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **8**:620-640.
- Lewis PO (2000) Workshop on Molecular Evolution. Marine Biology Laboratory. Woodshole, MA.
- Littlewood, JTD, Telford MJ, Clough KA, Rohde K (1998) Gnathostomulida an enigmatic metazoan phylum from both morphological and molecular perspectives. *Mol. Phylogenetics. Evol.* **9**: 72-79.
- Li WH (1997) "Molecular evolution". Sinauer, Sunderland, MA.
- Li WH, Graur D (1991) Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Lorenzen S (1985) Phylogenetic aspects of pseudocoelomate evolution. In: Conway Morris S, George JD, Gibson R, Platt HM (eds) The Origins and relationships of lower invertebrates. Clarendon Press, Oxford, pp 210-223
- Luton K, Walker D, Blair D (1992) Comparison of ribosomal internal transcribed spacer from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda:Digenea). *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**:323-328.
- Marcus E (1958) On the evolution of the animal phyla. *Quart. Rev. Biol.* **33**:24-58.
- Mark Welch DB (2000) Evidence from a protein-coding gene that acanthocephalans are rotifers. *Invert. Biol.* **119**:17-26.
- Mark Welch DB, Meselson MS (2001) Rates of nucleotide substitution in sexual and anciently asexual rotifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:6720-4.

- Melone G, Ricci C, Segers H, Wallace RL (1998) Phylogenetic relationships of phylum Rotifera with emphasis on the families of Bdelloidea. *Hydrobiologia*. **387/388**:101-107.
- Monks S (2001) Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters. *Syst. Parasitol.* **48**: 81-116.
- Morgan TAJ, Blair D (1995) Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology*. **111**:609-615.
- Morris SC (1993) The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature*. **361**: 219-225.
- Near JT, Garey JR, Nadler SA (1998) Phylogenetic relationships of the acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenetic. Evol.* **10**:287-298.
- Nei M (1975) Molecular populations genetics and evolution. North-Holland, Amsterdam
- Nei M (1991) Relative efficiencies of different tree making methods for molecular data. *In: Phylogenetic analysis of DNA sequences*. Oxford. University. Press. New York.
- Nei M (1996) Genetic structure of human populations. II. Differentiation of blood groups gene frequencies among isolated populations. *Heredity*. **21**:183-190.
- Nei M (1996*) Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu. Rev. Genet.* **30**:371-340
- Nelles L, Fang BL, Volckaert G, Vandenberghe A, Wachter DR (1984) Nucleotide sequence of a crustacean 18S ribosomal RNA gene and secondary structure of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. *Nuclei. Acids. Res.* **12**:8749-8768.
- Nielsen C, Scharff N, Eibye-Jacobsen D (1996) Cladistic analysis of the animal kingdom. *Biol. J. Linn. Soc.* **57**:385-410
- Nickol BB, Crompton DWT (1985) Biology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, London
- Otto SP, Cummings MP, Wakeley J (1996) Inferring phylogenies from DNA sequence data the effects of sampling. *In: Harvey PH, Leigh Brown AJ, Maynard Smith J, Nee S (eds) New Uses for New Phylogenies*. Oxford University Press, Oxford, pp 103-115
- Pages MDR, Holmes EC (1998) Molecular evolution a phylogenetic approach. Oxford
- Patterson C, Williams DM, Humphries CJ (1993) Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**:153-188.
- Petrochenko VI (1956) Acanthocephala of domestic and wild animals. *In: Skrjabin KI*

- (ed) Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow, pp 465.
- Pleyte KA, Duncan SD, Philips RB (1992) Evolutionary relationships of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA. *Mol. Phylogenetics. Evol.* **1**: 223-230.
- Posada D, Crandall KA (1988) Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatic.* **9**: 817-818.
- Richardson DJ, Cole RA (1997) Acanthocephala of the bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) in North America. *J. Parasitol.* **83**:540-541.
- Rodríguez F, Oliver JF, Marin A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**:485-501.
- Ruppert EE, Barnes RD (1994) Invertebrate Zoology Saunder, New York
- Rzhetsky A, Nei A (1992) A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* **9**:945-967.
- Saitou N (1988) Property and efficiency of the maximum likelihood method for molecular phylogeny. *J. Mol. Evol.* **27**:261-273.
- Saitou N, Nei M, (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schmidt G.D. (1971) Acanthocephala infection of man with two new records. *J. Parasitol.* **57**: 582-584.
- Shults LM (1982) Helminths of the spotted seal, *Phoca largha*, from the Bering Sea. *J. W. Disease.* **18**: 59-62.
- Smales LR (1986) Polymorphidae (Acanthocephala) from Australian mammals with description of two new species. *Sys. Parasitol.* **8**: 91-100.
- Sanger FFS, Nicklen AR, Coulson A (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-5467.
- Storch V, Welsch U (1969) Über den Aufbau des Rotatorienintegumentes. *Z. Zellforsch.* **95**: 405-414.
- Swofford D (1999) PAUP* 4.0d65, *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Swofford D (2000) PAUP* 4.0b7, *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swofford D, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM (1996) Phylogenetic inference *In*: "Molecular systematics" (Hillis DM, Moritz C, Mable BK Eds,) pp. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
- Telford MJ, Holland PWH (1993) The phylogenetic analysis of the Chaetognaths: a molecular analysis. *Mol. Biol. Evol.* 10:660-676.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson T J (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 4673-4680.
- Van Cleave HJ (1948) Expanding horizons in the recognition of a phylum. *J. Parasitol.* 34:1-20.
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:615.
- Wainwright PO, Hinkle G, Sogin ML, Stickel SK (1993) Monophyletic origin of the metazoan: An evolution link with Fungy. *Science.* 260: 340-342.
- Wallace RL, Claudia R, Giulio M (1996) A cladistic analysis of pseudocoelomates (aschelminth) morphology. *Invert. Biol.* 2:104-112.
- Wallace RL, Colburn RA (1989) Phylogenetic relationships within the phylum Rotifera: orders and genus Notholca. *Hydrobiologia.* 186/187:311-318.
- Winnepenninckx B, Backelau T, Kristensen RM (1998) Relation of new phylum Cycliophora. *Nature.* 393: 636-638.
- Winnepenninckx B, Backeljau T, Mackey LY, Brooks JM, Wachter DR, Kumar S, Garey JR (1995) 18S rRNA data indicate that the Aschelminthes are polyphyletic in origin and consist of at least three distinct clades. *Mol. Biol. Evol.* 12:1132-1137.
- Wirz A, Pucciarelli S, Miceli C, Tongiogi P, Balsamo M (1999) Novelty in phylogeny of Gastrotricha: Evidence from 18S rRNA gene. *Mol. Phylogenetics. Evol.* 13: 314-318.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271
- Yang Z (1994) Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J. Mol. Evol.* 39:105-111.

- Zarlenga DS, Stringfellow F, Nobary M, Lichtenfels JR (1994) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid differentiation. *Exper. Parasitol.* **78**:28-36.
- Zdzitowiecki K (1989) New data on the morphology and distribution of two acanthocephalans, *Andracantha baylisi* (Zdzitowiecki, 1986) comb. n. and *Corynosoma australe* Johnston 1937. *Acta. Parasitologica. Polonia.* **34**: 167-172.
- Zdzitowiecki K, Zadrony T (1999) Endoparasitic worms of *Harpagifer antarcticus* Nybelin, 1947 of the South Shetland Islands (Antarctic). *Acta. Parasitologica.* **36**: 125-130.
- Zharkikh A(1994) Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **39**:315-329.

APÉNDICE I

Análisis filogenético Molecular

INTRODUCCIÓN

Todas las formas vivientes están relacionadas por un ancestro común; reconstruir estas relaciones es uno de los principales objetivos de la biología evolutiva. Para la sistemática molecular, un árbol filogenético es una hipótesis basada en un análisis matemático que modela la historia evolutiva de un grupo de secuencias u organismos. La sistemática molecular transforma la información proveniente de las secuencias de DNA y proteínas en un árbol filogenético a través de un gran número de métodos, los cuales crean inevitables controversias. Existen dos formas de tratar los datos; esta división puede ayudar a entender las diferencias entre las técnicas de construcción de un árbol filogenético. Los métodos fenéticos convierten las secuencias alineadas en una matriz de distancias formada por pares, mientras que los métodos discretos (máxima parsimonia y máxima verosimilitud) consideran independientemente cada sitio (nucleótido y aminoácido) (Felsenstein, 1981; Swofford, 1996; 1999). Estas y otro tipo de propuestas para la construcción de árboles filogenéticos son discutidos en el presente capítulo.

MÉTODOS DE MÁXIMA PARSIMONIA

El cladismo es un método de clasificación que agrupa a los taxa en un sistema de relaciones jerárquicas. El cladismo puede ser usado para organizar cualquier dato comparativo y ha sido usado ampliamente en la sistemática. El método cladista fue implementado por Hennig (1950), quien usó los conceptos de ancestro y descendencia propuestos por Darwin, estudiando los procesos de transformación morfológica y de especiación a la luz del proceso evolutivo. El objetivo del cladismo es formar grupos hermanos usando caracteres, morfológicos, ecológicos, fisiológicos o moleculares, aplicando el criterio de parsimonia o menor número de pasos. Los resultados son expresados en términos de diagramas de ramas ó cladogramas, que hacen referencia a las relaciones genealógicas (Page y Holmes, 1998).

Estados de los Caracteres

Hennig (1950) identificó varios estados de un carácter: al carácter que se encuentra en la morfología ancestral lo definió como plesiomórfico; los caracteres con morfología lejana del ancestro los nombró como apomórficos. Los grupos hermanos son formados por la identificación de caracteres apomórficos o sinapomórficos, que derivan del ancestro común más reciente. Hennig también identificó los caracteres autopomórficos, definiéndolos como rasgos distintivos de taxa terminales. Los caracteres simplesiomórficos son rasgos más primitivos heredados de un ancestro más remoto que el ancestro común, sin embargo, estos caracteres son irrelevantes para el cladismo (Fig. 1). Finalmente, los caracteres homoplásicos son reconocidos como convergencias, regresiones o paralelismos (Kitching *et al.*, 1998)

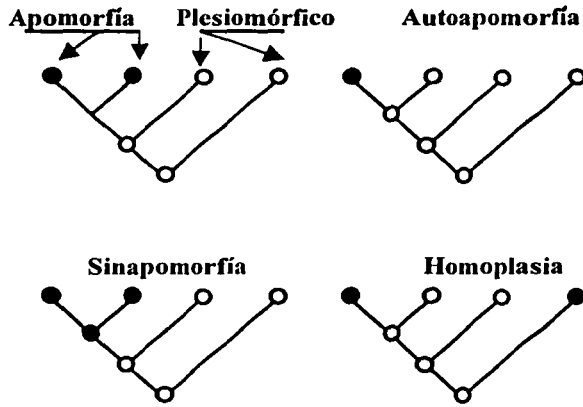
Grupos

Hennig identificó tres grupos basados en caracteres ancestrales y derivados. Un grupo monofilético incluye al ancestro común y a todos sus descendientes. Un grupo parafilético es aquel en el que no todos los taxa supuestamente descendientes de un ancestro común son incluidos en el grupo. Los grupos parafiléticos son reconocidos por caracteres simplesiomórficos. Un grupo polifilético presenta convergencias o conflictos de no-homología. La relaciones de los grupos polifiléticos son oscuras ya que sus taxa no tienen una historia filogenética común o real y no pueden ser reconocidos por sinapomorfias (Fig. 2).

Construcción de Cladogramas

Métodos exactos

Los métodos computacionales basados en la escuela cladista se dividen en exactos y heurísticos. Los métodos exactos garantizan encontrar uno o todos los cladogramas más cortos o de menor número de pasos. Con estas búsquedas, todas las topologías posibles son estimadas a partir de un cladograma inicial sin raíz, al que se le adicionan de uno a uno todos los taxa, calculándose la longitud de cada cladograma hasta encontrar el más corto.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1. Terminología usada por Henning para describir caracteres ancestrales (O) y derivados (●) (Tomado de Pages y Holmes, 1998).

Monofilético	Homología = Sinapomorfia	
Parafilético	Simplesiomórfico	
Polifilético	Homoplasia	

Fig. 2. Grupos reconocidos por Henning, definidos en términos de caracteres. El grupo monofilético es reconocido por homologías (sinapomorfías). El grupo parafilético es formado por caracteres simplesiomórficos y el grupo polifilético presenta homoplasias (Tomado de Pages y Holmes, 1998).

Búsquedas Exhaustivas

Dentro de los métodos exactos, se encuentran las búsquedas exhaustivas (Figura 3). Inicialmente, tres taxa son seleccionados para formar un árbol sin raíz totalmente resuelto. Posteriormente, se adiciona un cuarto taxón a cada una de las tres ramas del árbol inicial. En seguida, se agrega un quinto taxón que es probado en cada una de las 5 ramas de los tres cladogramas previos, lo que resulta en 15 topologías posibles. Este procedimiento se continúa hasta que todos los taxa son adicionados al cladograma. Finalmente, se calcula la longitud de todos los cladogramas y el árbol más corto es seleccionado como óptimo (más parsimonioso). En la práctica, la búsqueda del cladograma más parsimonioso se convierte en un problema computacional ya que la adición de un nuevo taxón aumenta exponencialmente el número de cladogramas por analizar. Para una búsqueda que incluye 6 taxa se evalúan alrededor de 105 cladogramas y para 20 taxa se forman 2×10^{20} topologías. Por este motivo las búsquedas exhaustivas solo se realizan con un número reducido de taxa (Swofford, 2000).

Búsquedas por Branch-and-Bound

Este método exacto se asemeja a búsqueda exhaustiva en el sentido de que construye cladogramas por adición secuencial de taxa, pero no requiere examinar todas y cada una de las topologías posibles. La búsqueda por branch-and-bound comienza por estimar un cladograma formado a través de una búsqueda heurística (ver abajo). La longitud del cladograma es retenido como referencia. Al desarrollarse la construcción de una nueva ruta o cladograma, el largo de las topologías parciales son calculadas a cada paso y comparadas con el árbol de referencia. Tan pronto como el largo del árbol parcial excede al valor de referencia, la construcción del cladograma es abandonada, puesto que la adición de más taxa incrementará el largo del árbol. De esta forma, el número de cladogramas a completar se reduce considerablemente, en comparación con el método exhaustivo. Cuando una ruta es completada y todos los taxa han sido adicionados sin rebasar la longitud del árbol de referencia, el cladograma es retenido como una topología alternativa y el proceso de Branch-and-Bound continúa. Sin embargo, cuando el largo del cladograma resultante es menor al de referencia, esta topología o valor es usada como la nueva referencia para subsecuentes búsquedas (Fig. 4)(Swofford, 2000). La búsqueda por Branch-and-

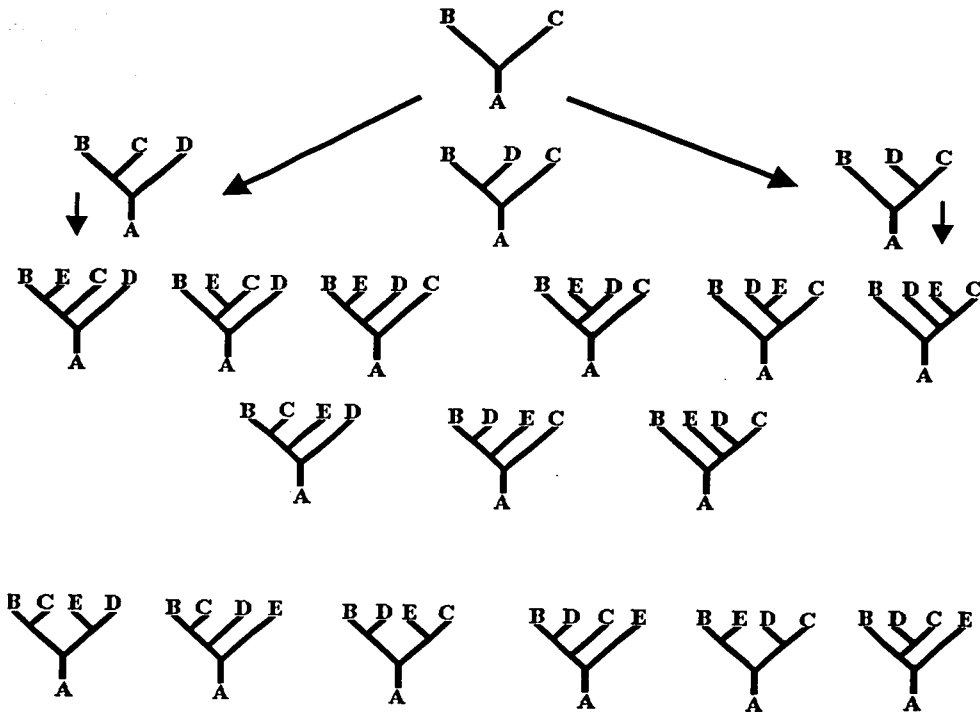


Fig. 3. Método de una búsqueda exhaustivas para determinar el cladograma más parsimonioso (Tomado de Swofford, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

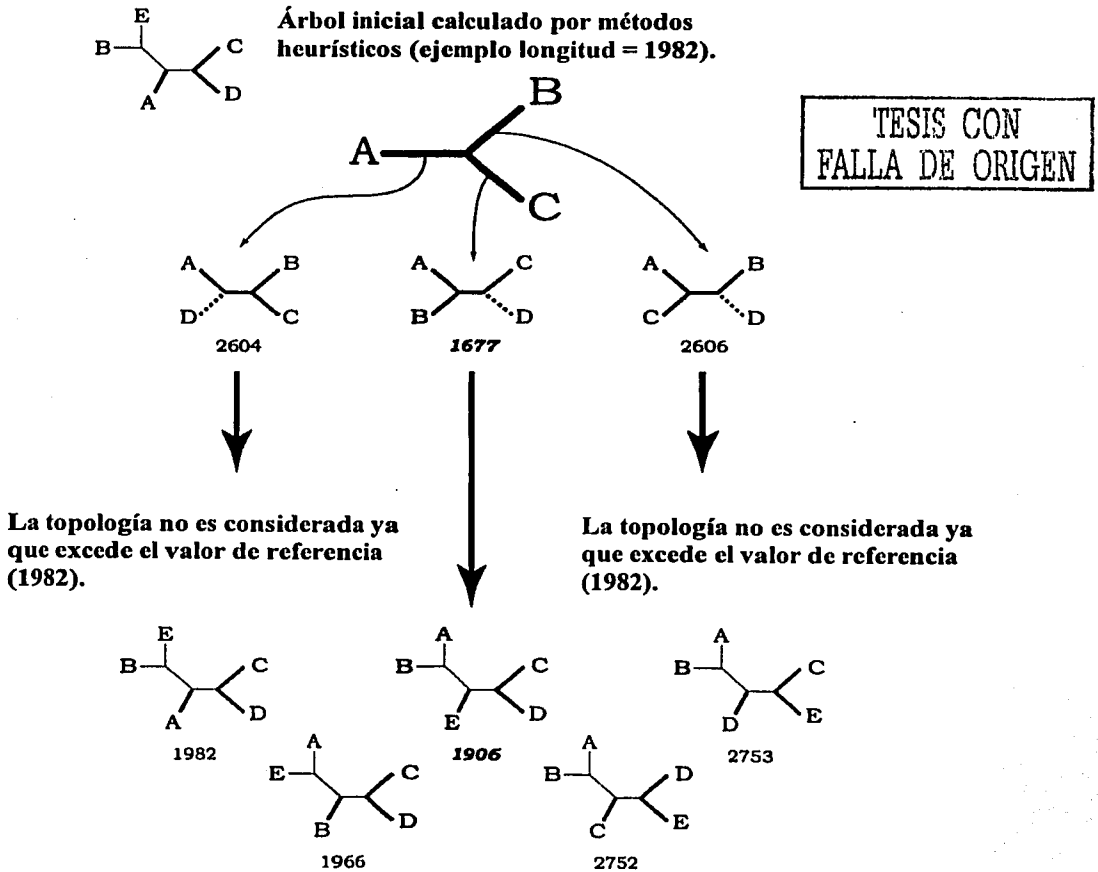


Fig. 4. Diagrama del método de Branch-and-Bound, para encontrar el cladograma más parsimonioso (Tomado de Lewis, 2000).

Bound normalmente se lleva a cabo durante un número definido de ciclos. Al final, cuando resultan varias topologías con la misma longitud, normalmente se procede a buscar una topología o árbol consenso.

Métodos Heurísticos

Cuando una base de datos es demasiado grande, frecuentemente se recurre a las búsquedas heurísticas, que esencialmente consisten en pruebas de ensayo-error, por lo que no garantizan encontrar el árbol mas corto posible, pero reducen el tiempo computacional.

Como una analogía, un grupo de alpinistas pretende alcanzar la cima de la montaña lo más rápido posible. El ascenso se realiza con neblina lo que dificulta la visión. Con el objetivo de alcanzar la cima en el menor tiempo posible, los alpinistas caminan sobre la montaña en línea ascendente, sin embargo, la montaña puede tener varias colinas y valles por lo que alcanzar la cima más cercana es referido como un óptimo local, esto significa que los alpinistas alcanzaron el pico más cercano a su punto de salida (óptimo local). Una estrategia para escalar colinas y encontrar el óptimo global es que los alpinistas salten horizontalmente de un pico a otro trepando por varias colinas. Con este método se maximiza la oportunidad de alcanzar la verdadera cima y por lo tanto encontrar el óptimo global (Fig. 5). La analogía de los picos altos equivale a los cladogramas más cortos. El método heurístico realiza una búsqueda y construye una topología, esto es equivalente al punto de partida de los alpinistas. Para encontrar el óptimo global frecuentemente se usa la opción de Branch-Swapping que equivale a saltar entre colinas (Kitching *et al.*, 1998).

Método de Intercambio de Ramas (Branch Swapping)

Con el método Branch-Swapping, el árbol óptimo o el más parsimonioso puede ser encontrado. Para incrementar la eficiencia en la búsqueda se pueden seguir varias estrategias. El método más simple es el intercambio del vecino cercano (Nearest Neighbor Interchanges; NNI). Cada rama interna de un árbol define regiones locales ó sub-árboles conectados entre sí. Un sub-árbol es intercambiado a otro lado del árbol y como resultado se obtienen dos arreglos, calculándose la longitud de ambos arreglos (Fig. 6). Otro método es el de Poda y Conexión de Ramas (Sub-tree Pruning-Regrafting; SPR) que forma varios sub-árboles, Vg. un grupo que incluye tres taxa F, G y H, que son removidos del árbol original (Fig. 7). El sub-árbol es

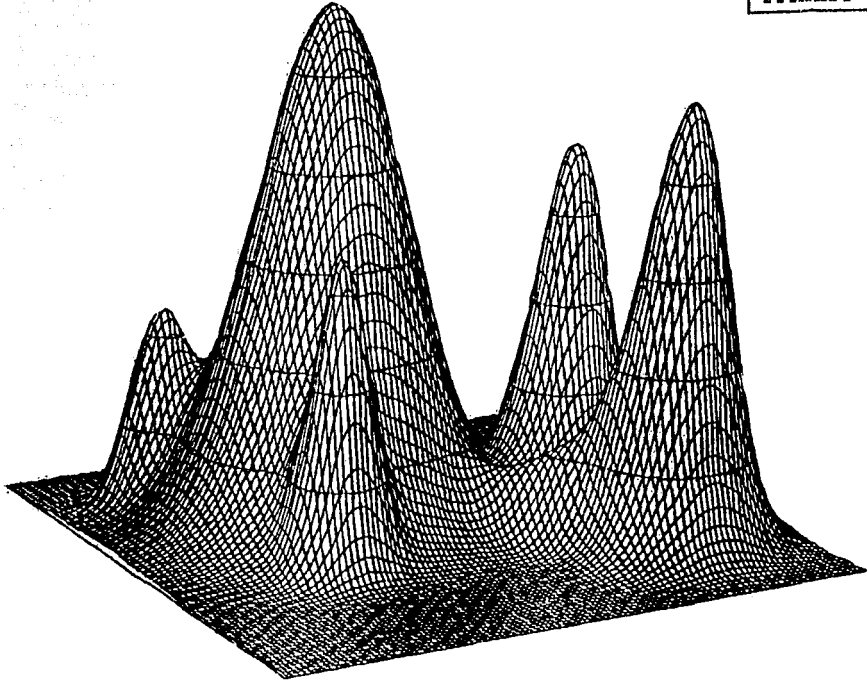


Fig. 5. Esquema de una búsqueda heurística. El árbol más corto representa la cima más alta, sin embargo alcanzar esta cima depende del punto de partida. Un tipo de búsquedas de escalada de colinas puede garantizar encontrar un optimo local sin embargo, las búsquedas de Branch-swapping puede garantizar encontrar el optimo global y alcanzar la cima más alta (Tomado de Lewis, 2000).

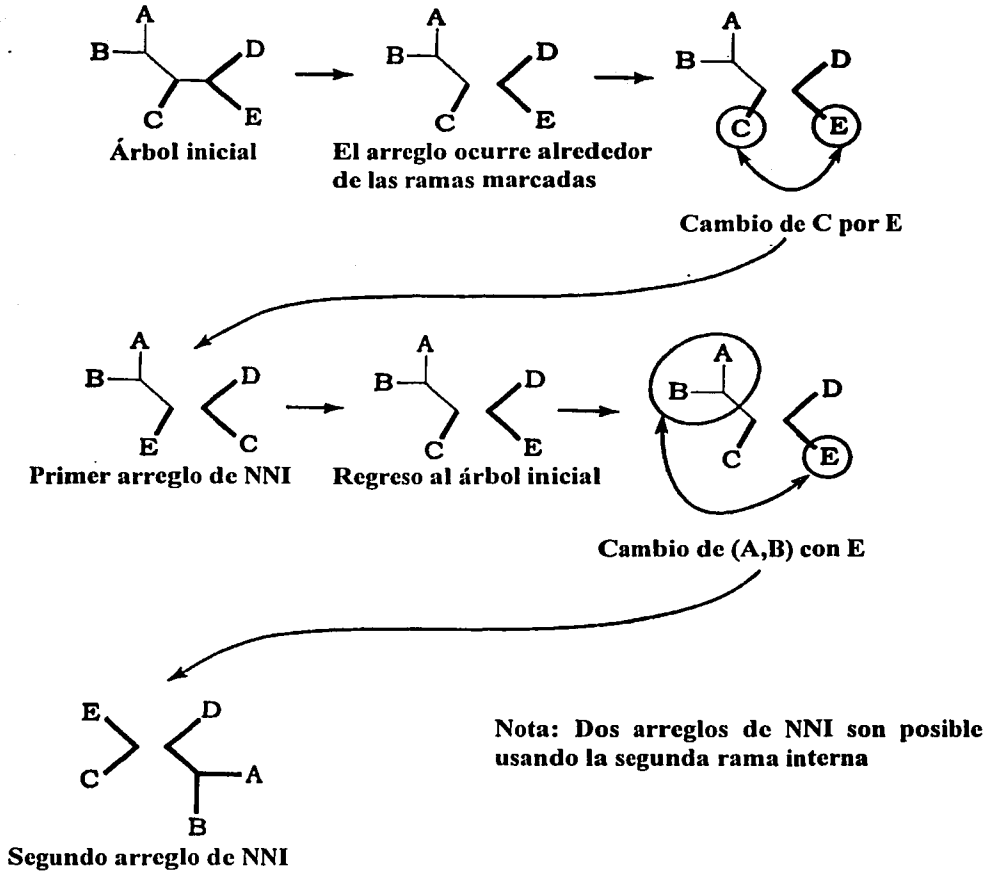


Fig. 6. Diagrama de búsqueda de NNI usando el método de Branch-Swapping, para encontrar el árbol más parsimonioso (Tomado de Lewis, 2000).

conectado en otra posición del árbol original y se calcula la longitud del nuevo árbol. El procedimiento continúa hasta que todos los sub-árboles son removidos, conectados y evaluados (Fig. 7). Finalmente, el método de corte y reconexión binaria (Tree-Bisection-Reconnection; TBR), construye un árbol inicial, el cual es cortado en dos sub-árboles, que a su vez son conectados en diferentes ramas y todas las posibles combinaciones de los pares conectados son evaluados (Fig. 7; Swofford, 2000).

MÉTODOS DE DISTANCIA

Los métodos de distancia o fenéticos, calculan distancias evolutivas entre pares de secuencias para un árbol filogenético. Para calcular las distancias evolutivas frecuentemente se usan mínimos cuadrados, mínima evolución u otros criterios. Las distancias son estimadas a partir del número de sustituciones por sitios de nucleótidos o aminoácidos. Actualmente hay un gran número de métodos de distancia para construir árboles filogenéticos, sin embargo, todos los métodos están basados en principios de mínimos cuadrados y de mínima evolución.

Método de mínimos cuadrados

El método de mínimos cuadrados compara la suma mínima de las diferencia entre las distancias de los pares observados y las distancia de los pares estimados para varias topología y selecciona la topología de menor valor entre los pares (Nei, 1996).

Método de mínima evolución (ME)

El largo de las ramas es estimado usando mínimos cuadrados. La suma total (S) del largo de las ramas es comparada para cada una de las posibles topologías. La topología que muestra el menor valor de S es seleccionada como el árbol más probable (Edwards y Cavalli-Sforza, 1964; Fitch y Margoliash, 1989). Aunque el método de mínima evolución es estadísticamente sencillo, requiere de un gran tiempo computacional para examinar las diferentes topologías. Inicialmente, se construye un árbol por el método de descomposición de estrella (Neighbor-Joining; NJ, ver abajo) es construido y un grupo de topologías similares son evaluadas para encontrar el árbol con el valor de S más pequeño (temporalmente árbol de ME). Una vez encontrado el árbol más corto,

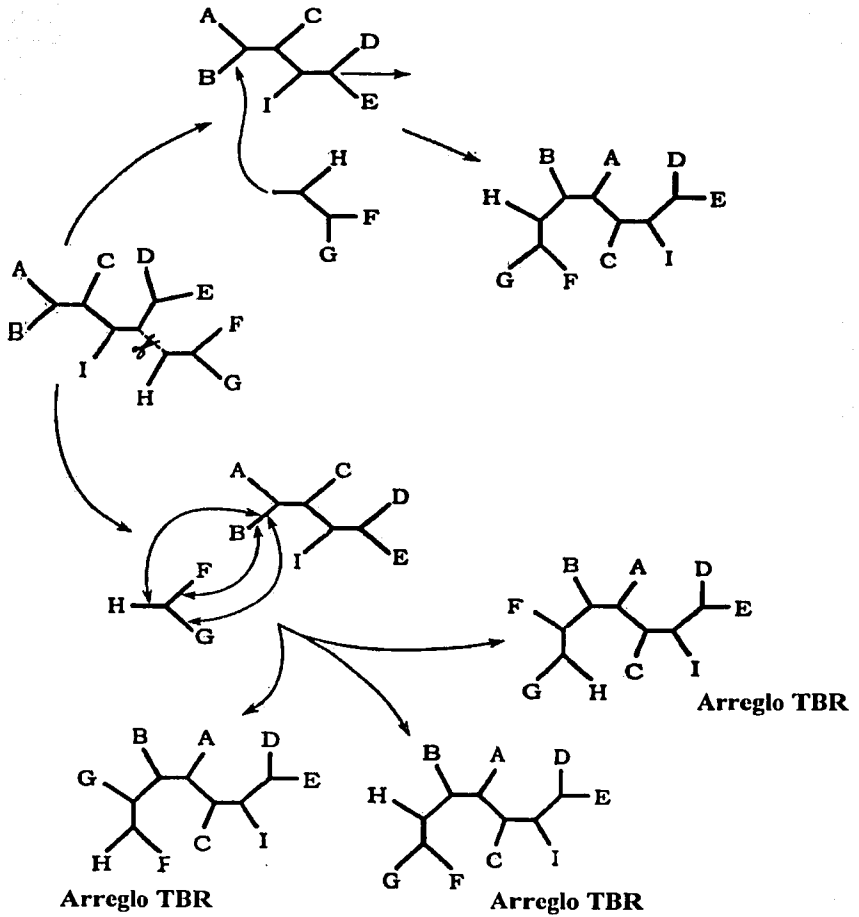


Fig. 7. Búsqueda de SPR y TBR usando el método de Branch-Swapping, para encontrar el árbol más corto (Tomado de Lewis, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

un nuevo grupo de topologías similares al árbol de ME son examinadas para encontrar nuevamente el menor valor de S. Este procedimiento continua hasta que se encuentra el árbol con el menor valor de S, el cual se conoce como árbol de ME (Rzhetsky y Nei 1992).

Método de Agrupamiento por Pares con Media Aritmética (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean; UPGMA)

El método fue originalmente desarrollado para construir fenogramas que reflejan la similitud fenotípica entre los taxa. Sin embargo, también puede ser usado para construir árboles filogenéticos siempre y cuando la tasas de evolución sea constantes entre los diferentes linajes, por consiguiente existe una relación lineal entre las distancias evolutivas y el tiempo de divergencia (Sokal y Michener, 1958). El método del UPGMA emplea un algoritmo secuencial de grupos en donde las relaciones topológicas son inferidas en orden decreciente de similitud y el árbol filogenético es construido por pares. El método identifica dos OTUS (unidades taxonómicas operacionales) que presentan un menor valor de distancia, posteriormente, este par es tratado como un solo OTUS, referido como un OTUS compuesto. Subsecuentemente un nuevo grupo de OTUS, es identificado por su alta similitud y adicionado al fenograma El proceso continúa hasta que todo los OTUS son adicionados al árbol (Fig. 8) (Li y Graur, 1991).

Método de descomposición en estrella (Neighbor-Joining; NJ)

El método de descomposición en estrella une a todos los taxa terminales por un nodo común. Posteriormente se evalúa el criterio óptimo para todo los posibles árboles que son construidos por la unión de dos nodos terminales formando un nuevo grupo (Fig. 9 paso 2). El árbol con la mayor similitud es salvado para la próxima búsqueda. Posteriormente, en cada paso se forman nuevos grupos, reduciendo el número de ramas conectadas por el nodo central. El proceso continúa hasta que todos los árboles son binarios (Fig. 9 paso 3) (Saito y Nei, 1987).

MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

El método de máxima verosimilitud (ML) infiere la historia evolutiva de los organismos en términos de probabilidad, este método fue introducido a la sistemática molecular por Cavalli-sforza y Edwards (1967), quienes lo usaron para estimar la filogeneia con frecuencias alélicas.

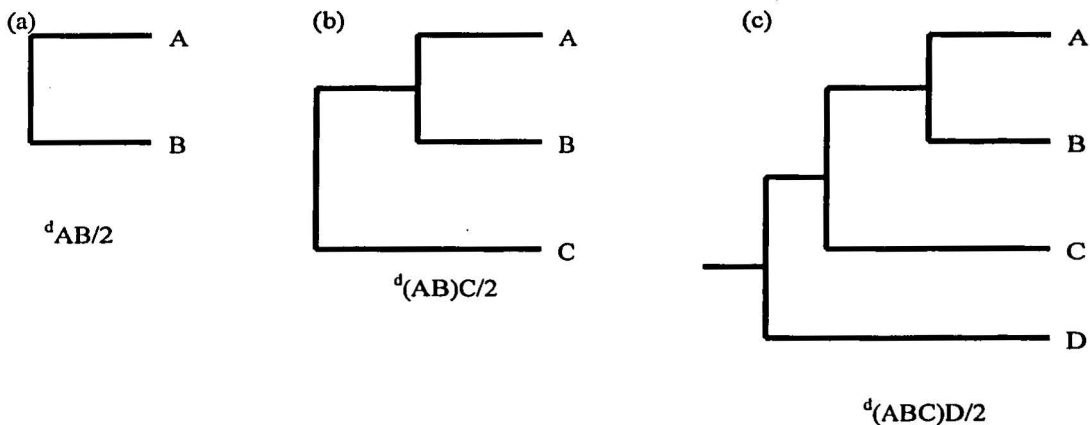


Fig. 8. Construcción de un árbol filogenético para cuatro OTUS según el método de UPGMA (Tomado de Hillis *et al.*, 1996).

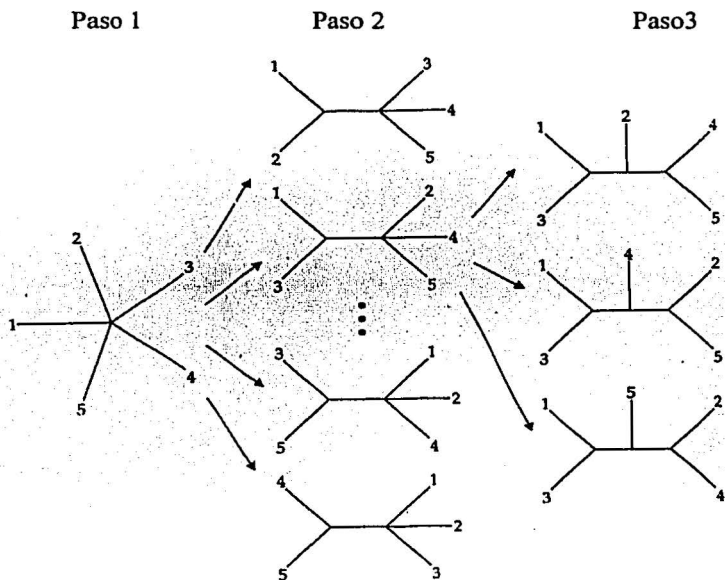


Fig. 9. Método de descomposición en estrella. En cada paso el criterio óptimo para un par de grupos es evaluado, el mejor árbol encontrado en cada paso se convierte en el punto de partida para la próxima búsqueda (Tomado de Hillis *et al.*, 1996).

Sin embargo, el método no fue usado debido a problemas computacionales. Actualmente las computadoras son mucho más veloces y el método de ML ha ganado amplio uso (Hasegawa *et al.*, 1985; Saitou, 1988). Recientemente, el método de ML ha sido usado en secuencias de DNA y proteínas (Felsenstein 1981;1984). ML requiere un modelo de probabilidad para calcular la sustitución de nucleótidos. Cada modelo de evolución estima la probabilidad de cambio de un nucleótido a otro para cada rama en un intervalo de tiempo (Fig. 10).

El método de ML asume que los nucleótidos evolucionan independientemente por lo que la probabilidad se estima para cada sitio y finalmente se calcula un valor de verosimilitud total. Para calcular la verosimilitud de un sitio *j*, se consideran todas las posibilidades de evolución para cada sitio, esto es $4 \times 4 = 16$ posibilidades consideradas en cada sitio. Por este motivo el método de ML requiere gran capacidad computacional. Una vez calculado el logaritmo de la verosimilitud de cada sitio, se estima la suma logarítmica de todos los sitios y se obtiene un promedio.

Modelos de Evolución

Para usar el método de ML en un análisis filogenético, es necesario especificar un modelo de evolución. Estos son incluidos en la familia de Tiempo Reversible General (General-Time-Reversible; GTR) (Fig. 11). Los modelos* son listados a continuación, de los más simples a los más complejos:

Jukes-Cantor (JC). Asume una frecuencia de bases igual y que todas las sustituciones son iguales (tasa de clasificación aaaaaa) (Jukes y Cantor 1969).

Felsenstein 1981 (F81). Asume frecuencias de bases variable y que todas las sustituciones son iguales (aaaaaa)(Felsenstein, 1981).

Kimura 2- Parámetros (K80). Asume frecuencia de bases igual y frecuencias variables en transiciones y transversiones (abaaba) (Kimura, 1980).

Hasegawa-Kishino-Yano (HKY). Asume frecuencia de bases variable y frecuencias variables en transiciones y transversiones (abaaba) (Hasegawa *et al.*, 1995).

Tamura-Nei (TrN). Asume frecuencia de bases variable e igual frecuencia en transiciones y transversiones (abaaea) (Tamura y Nei, 1993).

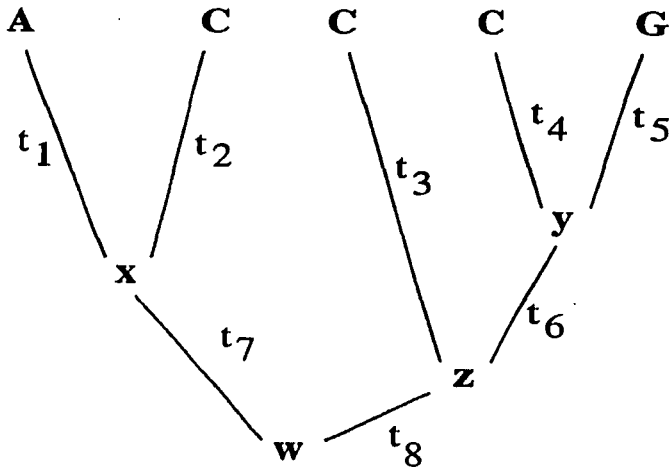


Fig. 10. Para calcular la probabilidad de los datos ACCCG, se suma la probabilidad de las diferentes rutas de evolución para encontrar los nucleótidos originales, se realizan hipótesis de caracteres ancestrales, donde los nucleótidos desconocidos son X, Y, Z y W. (La probabilidad de cambio en el tiempo depende del modelo de evolución)

$$L = \sum_{X} \sum_{Y} \sum_{Z} \sum_{W} P(W) P(X/w, t_7) P(A/x, t_1) P(C/x, t_2) P(Z/w, t_8) P(C/z, t_3) P(Y/z, t_6) P(C/y, t_4) P(G/y, t_5)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Kimura modelo de 3 Parámetros (K3P). Asume frecuencia de bases variable, igual frecuencia en transiciones, y frecuencia variable en transversiones (abccba) (Kimura, 1981).

Modelo de Transición (TIM). Asume frecuencia de bases variable, frecuencia en transiciones variable e igual frecuencia en transversiones (abccea) (Rodríguez *et al.*, 1990).

Modelo de Transversion (TVM). Asume frecuencia de bases variable, frecuencia variable en transversiones y frecuencias iguales en transiciones (Rodríguez *et al.*, 1990).

Modelo simétrico (SYM). Asume igual frecuencia de bases con matriz de sustitución simétrica (A para T = T para A)(abcdef) (Zharkikh, 1994).

Tiempo Reversible General (GTR). Asume frecuencia de bases variable con matriz de sustitución simétrica (abcdef) (Rodríguez *et al.*, 1990).

Distribución Gamma (G). Asume una tasa de variación de sitio a sitio (Rodríguez *et al.*, 1990).

Proporción de sitios invariables (I). Asume sitios constantes en una base de datos.

*Las sustituciones de purinas a purinas y de pirimidinas a pirimidinas son conocidas como transiciones. Las transversiones son los cambios de purinas a pirimidinas y de pirimidinas a purinas (AC/GT) y (AT/CG). Las agrupaciones mencionadas anteriormente en cada modelo simbolizan la tasa de sustitución de a = AC, b = AG, c = AT, d = CG, e = CT y f = GT.

Tasa heterogénea a través de los sitios

Para todos estos modelos la probabilidad de cambio del estado i al estado j depende de la interacción del tiempo de duración t y de la tasa de sustitución μ , a través de su producto μt (Felsenstein, 1981). Una rama puede ser larga porque puede representar un largo periodo de tiempo evolutivo o porque la tasa de sustitución es alta.

Los modelos de ML asumen que todos los sitio evolucionan a la misma tasa, la violación de este supuesto puede traer grandes consecuencias. Por ejemplo, algunas inferencias que usaron el modelo de ML, asumiendo una tasa de cambio homogénea, pueden ser inconsistentes cuando el verdadero proceso evolutivo tiene una tasa variable entre cada sitio, aun cuando todos los otros aspectos del proceso son modelados perfectamente (Gaut y Lewis, 1995). Si los sitios tienen una

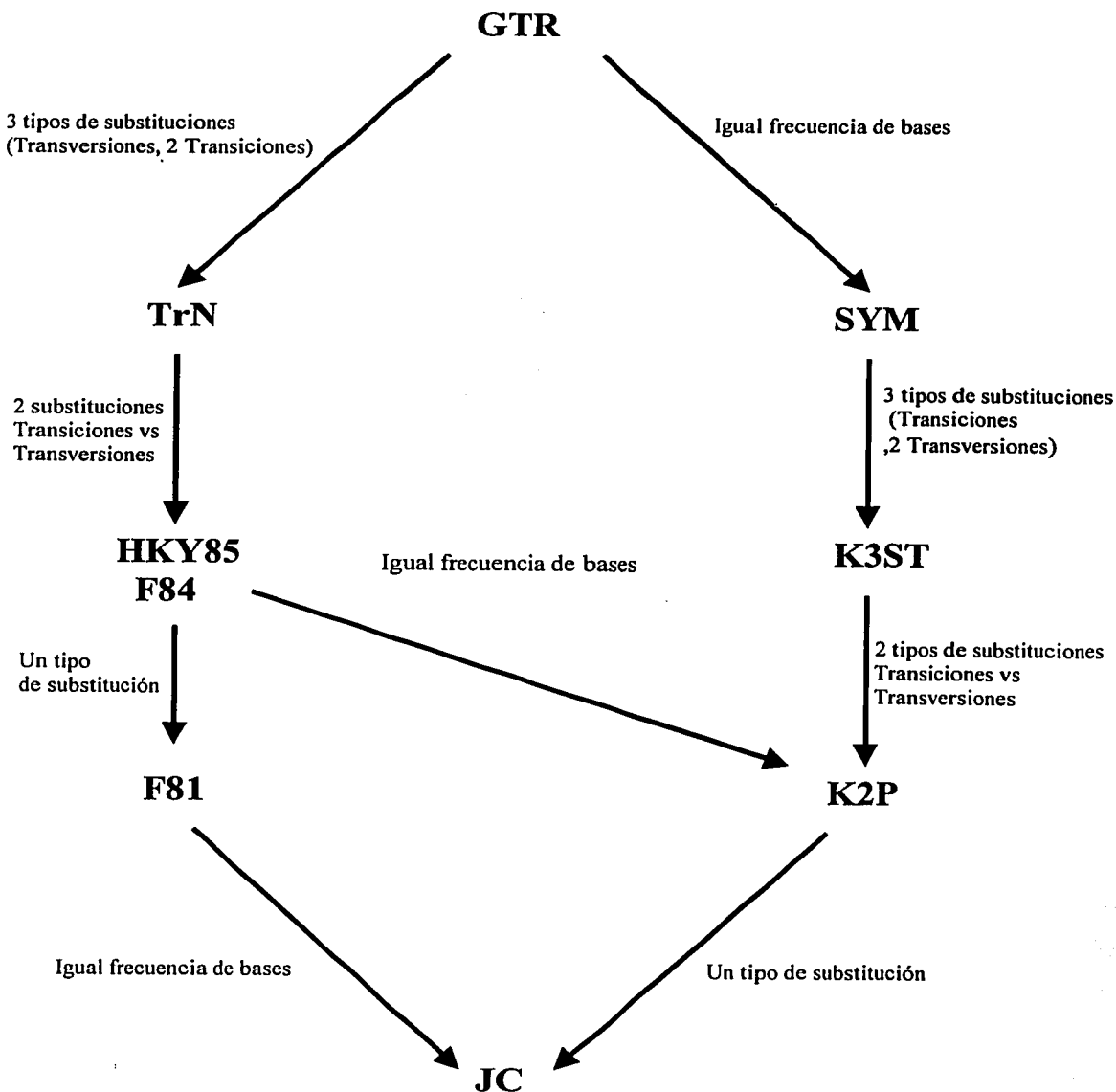


Fig. 11. Relación entre los modelos de sustitución que conforma la familia del General-Time-Reversible (Tomado de Hillis *et al.*, 1996).

fuerte variación en la tasa de variación, entonces, los sitios que son resistentes al cambio, debido a una restricción selectiva positiva, pueden ocultar la cantidad de cambio real y por lo tanto los sitios parecen evolucionar más rápidamente. Esto produce que ML sobreestime la cantidad de sustituciones y por lo tanto muestre ramas grandes, lo que se define como un error positivo, es decir que una alta divergencia en las secuencias puede aparentar grupos cercanos cuando no lo son (Felsenstein, 1978).

La distribución continua comúnmente usada para modelar la tasa heterogénea es la distribución gamma (Γ) (Yang, 1993). La distribución Γ tiene dos parámetros, la forma del parámetro α y la escala β .

La forma del parámetro α es igual al inverso del coeficiente al cuadrado de variación de la tasa de sustitución, así que cuando α incrementa la distribución converge en un modelo de una tasa igual (Fig. 12)

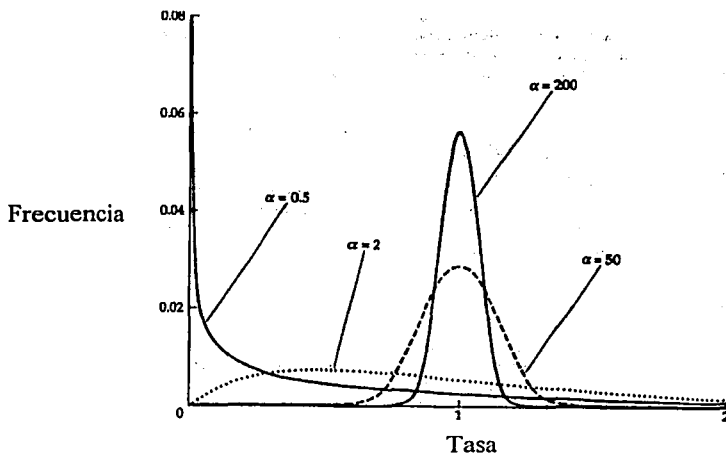


Fig 12. Distribución Gamma para 4 diferentes valores del parámetro α . Cuando α es pequeño muchos de los sitios evolucionan lentamente, mientras que unos cuantos sitios tienen una moderada o alta tasa de cambio. Cuando α tiende a infinito todos los sitios tienen una tasa igual a 1, es decir que evolucionan a la misma tasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Bootstrap

Los bootstrap es una técnica computacional que ha sido frecuentemente usada como una medida para estimar el nivel de confiabilidad de las hipótesis filogenéticas (Felsenstein, 1985). Las propiedades estadísticas de la técnica en el contexto filogenético aparentemente es complejo, aunque estudios recientes han permitido un mejor entendimiento de la técnica (Felsenstein y Kishino, 1993).

Para explicar el procedimiento de bootstrap, se especifica la hipótesis nula antes de analizar los datos y se asume que esta ha sido propuesta. El ejemplo que se muestra abajo contiene dos subgrupos: (1) OTUS 1 y 2 están agrupado en un clado y (2) OTUS 3 y 4 están en otro clado. El OTUS 5 es el grupo externo. Una secuencia de DNA del largo N es obtenida de cada OTU y las secuencias son las siguientes:

Taxa	Secuencias
1	GCAGTAC....
2	GTAGTACT....
3	ACAATACC....
4	ACAACACT....
5	GCGGCATT....

Para estimar el nivel de confianza de las sub-hipótesis 1 y 2, se realizan bootstrapping en las secuencias muestreadas para generar N_b seudomuestras. En cada seudomuestra, un sitio es seleccionado al azar de la muestra original. Por ejemplo el sexto sitio de una secuencia es colocado en el primer sitio. Otro sitio es nuevamente seleccionado al azar de la muestra original; el primer sitio es colocado en la segunda posición en la seudo-muestra. Este procedimiento continúa hasta que N sitios son escogidos. Las seudo-muestras son usadas para construir el árbol para los sub-grupos (1,2), para cada agrupación se obtiene un escore, de 1 si el OTUS 1 y 2 se agrupan juntos. Este procedimiento completa una replica de bootstrap. El procedimiento es repetido N_b veces y la proporción de replicas de bootstrap, en donde el sub-grupo (1,2) aparecen juntos es tomado como el valor de bootstrap; el soporte para el sub-grupo (3,4) es obtenido de forma similar al procedimiento anterior. El método de bootstrap esta basado en seudo-replicas, las

cuales son generadas por muestras al azar de la matriz de datos original con re-emplazamientos para crear una nueva matriz de caracteres del mismo largo como la matriz original (Efrom, 1979; Felsenstein, 1985). La frecuencia con la que una rama es encontrada en el análisis de las pseudo-replicas es reconocido como la proporción de bootstrap (Hillis *et al.*, 1996).

El método de bootstrap y de Jackknife, son los métodos más frecuentemente usados para estimar la varianza asociada al factor estadístico. Los métodos usan una técnica de re-muestreo ya que opera estimando la varianza de la distribución de la muestra por re-muestreo de la base de datos original. Los bootstrap y la prueba de jackknife difieren en la forma que el re-muestreo es realizado. En la prueba de bootstrap, los datos son muestreados aleatoriamente con re-emplazamientos de la base de datos original hasta que una nueva base de datos del mismo largo es obtenida. El método de jackknife re-muestra la base de datos original por una disminución del valor de k y re-estima la diferencia entre $n - k$ observada (Hillis *et al.*, 1996).

Pruebas de comparación entre dos árboles

Un gran número de pruebas estadísticas han sido descritas para comparar dos árboles, si el árbol A es significativa mejor que el árbol B, o si las diferencias son debidas a errores aleatorios.

Para el método de parsimonia se describió la prueba no paramétrica de Templeton (1983), la cual compara dos árboles, la prueba usa la suma del rango del número de pasos requeridos para cada carácter en cada uno de los árboles, si los caracteres son uniformemente pesados y no requieren mas que un cambio adicional en ambos árboles entonces se gana un sitio. Esta simple prueba compara el número de caracteres a favor de los caracteres de los dos árboles. La prueba asume que los errores aleatorios, son igualmente probables para los dos árboles. La prueba pregunta sobre el soporte de una hipótesis (árbol) y si está es significativamente mejor que el árbol esperado (Hillis *et al.*, 1996).

Para comprar dos topologías usando el método de máxima verosimilitud se desarrollo la prueba de Kishino y Hasegawa (1989), esta prueba es usada para estimar las diferencias del log de verosimilitud. El análisis de verosimilitud muestra el largo de las ramas en una topología (hipótesis nula) sobre el modelo explicito de evolución de caracteres. El árbol puede ser simulado con un modelo de evolución y los datos pueden ser analizados sobre un criterio de máxima verosimilitud. La distribución esperada de las diferencias en el escore de log de

verosimilitud entre el árbol óptimo y el árbol alternativo (hipótesis nula) puede ser generado sobre el supuesto que la hipótesis nula es correcta. Si las diferencias del árbol comparado en la prueba estadística excede el 95%, entonces los dos árboles son significativamente diferentes $p < 0.05$ y la hipótesis nula es rechazada (Hillis *et al.*, 1996).

Simulaciones

Las simulaciones computacionales han sido usadas para explorar la eficiencia de los métodos de reconstrucción filogenética. En el ejemplo presentado en esta revisión se vario la tasa de sustitución en todos los sitios y también se vario la tasa de sustitución en algunas partes del árbol, estos dos parámetros pueden ser representado por un diagrama de simulación espacial (Fig. 13).

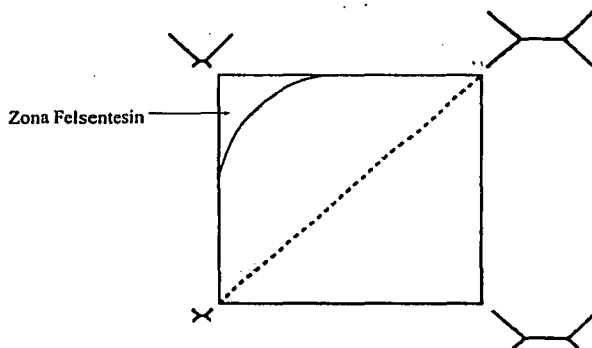


Fig. 13. Árbol en el espacio obtenido a través de simulaciones computacionales. En cada esquina del cuadrado corresponde a un árbol, al lo largo de la línea punteada la tasa de sustitución es la misma en cada uno de los ejes del árbol. El árbol de la parte superior izquierda y derecha muestran diferente tasa de sustitución. La zona superior izquierda esta la zona Felsenstein donde parsimonia es inconsistente.

En la Figura 14 se muestra el funcionamiento del método de UPGMA y del método de parsimonia sobre condicionales similares, en donde se espera que UPGMA funcione mejor con una tasa de sustitución constante. Hay un alto grado de éxito a lo largo de la línea diagonal en la gráfica. El árbol más distante a la línea diagonal es menos exitoso en recobrar la hipótesis

original. Por otro lado parsimonia no requiere de un reloj molecular y muestra un amplio rango de largo de ramas que puede ajustar. La región superior izquierda en blanco es llamada la zona Felsenstein donde se forma en long-branch-attraction (atracción de ramas largas) donde parsimonia es incapaz de inferir una topología correcta (Page y Holmes, 1998).

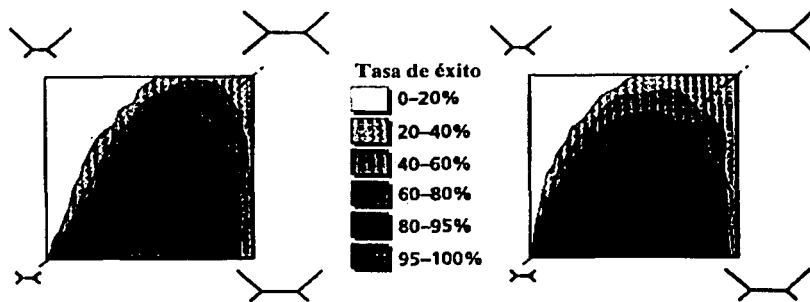


Fig. 14. Simulación del método de UPGMA (izquierda), y del método de Parsimonia (derecha), para construir el árbol correcto sobre ciertos parámetros. La tasa de éxito es el porcentaje de tiempo donde el árbol correcto es reconstruido en la región del parámetro usado en el espacio (Huelsenbeck y Hillis, 1993).

Otro factor que influye en la eficiencia de los métodos filogenéticos es la cantidad de datos disponibles, en la Figura 15. Se muestra el resultado de una simulación computacional para evaluar la eficiencia de varios métodos filogenéticos para la construcción de un árbol compuesto por cuatro taxa. Para esta propuesta se usaron dos supuestos: el primero con una tasa de cambio constante y el segundo con una tasa de substitución heterogénea. En el caso de tasa de cambio constante todos los métodos son consistentes. Pero cuando se usa una tasa de cambio diferente se requiere de un mayor número de sitio para reconstruir el árbol original, aunque los métodos de parsimonia no pesada, neighbour joining, distancias no corregidas y UPGMA mostraron topologías erróneas y por lo tanto inconsistencias. Cuando se usaron tasas de cambio constantes y heterogéneas el método de máxima verosimilitud mostró topologías correctas en ambas simulaciones, además de que ML necesito de un menor número de sitios para construir la topología correctas (Page y Holmes, 1988).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

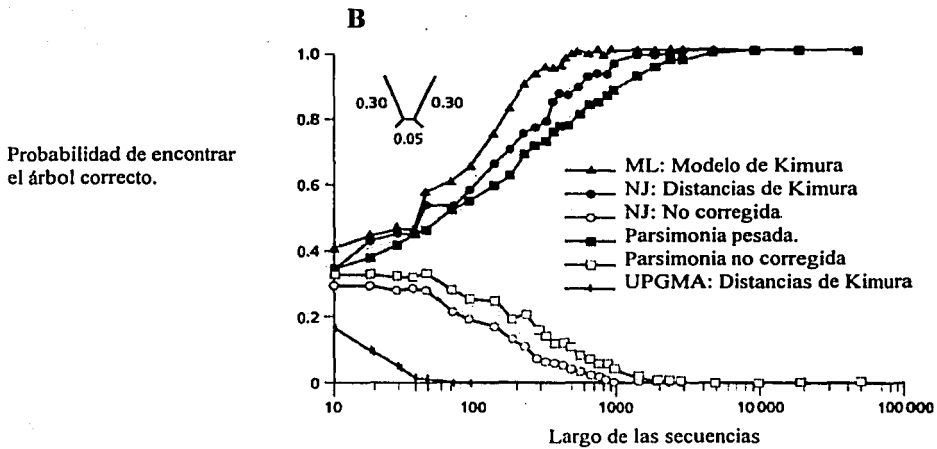
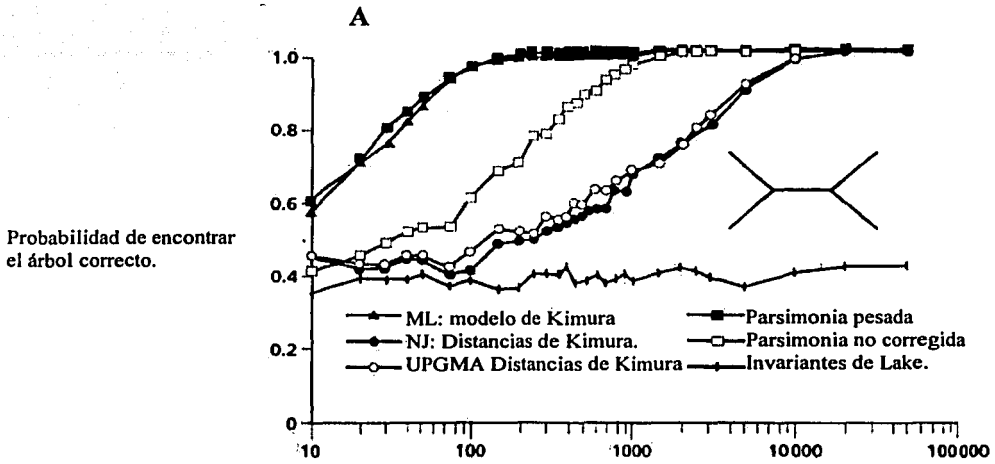


Fig. 15. Eficiencia de diferentes métodos para reconstruir el árbol correcto. (A) Asumiendo una tasa de evolución constante (B) diferente tasa de evolución a lo largo del árbol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONSISTENCIAS E INCONSISTENCIAS DE LOS MÉTODOS DE PARSIMONIA, DISTANCIA Y MÁXIMA VEROSIMILITUD

En esta revisión se han descrito los métodos filogenéticos más usados en análisis filogenéticos moleculares. Las publicaciones recientes usando los métodos de UPGMA, NJ, ME, MP y ML, muestran árboles filogenéticos (topologías) razonables, siempre y cuando se incluya un número suficientemente grande de nucleótidos o aminoácidos en los análisis (Huelsenbeck y Hillis, 1993). En general todos estos métodos producen topologías similares, a menos que la tasa de evolución varíe mucho entre los linajes. Cuando la tasa de evolución varía ampliamente entre los linajes, MP tiende a ser menos eficiente que otros métodos, ya que los eventos de homoplasia son mucho más frecuentes (la probabilidad de homoplasia depende del patrón de sustitución). Sin embargo, cuando el grado de divergencia en las secuencias es pequeño, la homoplasia es rara y el método de parsimonia tiende a ser eficiente. Además MP tiene algunas ventajas sobre otros métodos ya que fácilmente puede incorporar información de los eventos de inserción y delección de las secuencias, también conocidos como "gaps" (Nei, 1996; Swofford, 2000). La crítica principal del método de MP es que está basado en un criterio óptimo específico y no requiere de un modelo de evolución explícito, además de asumir que el árbol que requiere menos sustituciones es mejor que el que requiere más. Cabe hacer notar que el árbol que minimiza el número de sustituciones también minimiza el número de eventos homoplásicos, por ejemplo, paralelismos, convergencias y reversiones (Felsenstein, 1988; Nei, 1991).

El método de distancia UPGMA, asume una tasa de cambio constante para todas las ramas del árbol, sin embargo, cuando algunas secuencias analizadas no son tan extensas, unas ramas aparentan evolucionar mucho más rápido que otras y por lo tanto se viola el supuesto de la tasa constante. Por esta razón, cuando se realiza inferencia filogenética usando UPGMA, comúnmente se encuentran errores en el orden de las ramas (errores topológicos) (Saitou y Nei, 1987).

Los métodos de transformación de distancia como el de neighbor-joining y muchos otros, asumen una tasa diferente de cambio a lo largo de todas las ramas (Saitou y Nei, 1987). Cuando las distancias son pequeñas, la estimación de estas puede ser obtenida fácilmente y por lo tanto el método realiza buenas estimaciones. Además, si la tasa de evolución es variable entre las secuencias, el método es más consistente. En cambio, cuando las secuencias son cortas la estimación de las distancias son sujetas a grandes errores estadísticos, y si las secuencias tienen

también una tasa de cambio constante entre los sitios, la estimación de las distancias es complicada (Nei, 1996).

Comúnmente se piensa que el método de ML es el más consistente, sin embargo, cuando el modelo de evolución usado para evaluar la probabilidad de un árbol dado es seleccionado erróneamente, el resultado no refleja el proceso evolutivo real (Felsenstein, 1988). En principio, los modelos de ML pueden llegar a ser complejos para un análisis evolutivo en particular y el requerimiento computacional alto. Además, los modelos complejos pueden ser más sensibles a errores aleatorios que los modelos más simples (ya que muchos parámetros necesitan ser estimados de la misma base de datos). Por tanto, el método de ML tiende a ser más eficiente cuando la divergencia en las secuencias es muy alta, siempre y cuando la velocidad de sustitución en nucleótidos y aminoácidos sean similares (Hillis *et al.*, 1996).

En años recientes los métodos estadísticos para inferir secuencias ancestrales de aminoácidos han sido redefinidos para esta propuesta se han usado cualquiera de los métodos estadísticos como Parsimonia, máxima similitud y distancias. Las simulaciones computacionales han mostrado que los métodos de máxima similitud y distancias muestran mejores topologías que las obtenidas por el método de máxima parsimonia, sin embargo todos los métodos han mostrado buenos resultados cuando las secuencias analizadas están cercanamente relacionadas (Nei, 1996a; Li, 1997). Actualmente los estudios de evolución molecular cada vez son más comunes, ya que las técnicas del DNA recombinante (Amplificación de DNA, Clonación y secuenciación automatizada) así como las técnicas estadísticas de búsquedas de árboles son mucho más eficientes.

BIBLIOGRAFIA

- Cavalli-Sforza, L. L. and Edwards, A. W. F. (1964). Analysis of human evolution. In " Genetic Today" (Geerts SJ Ed.), pp 923-33, Proc. Int. Congr. Genet., 11th. The Hague the Netherlands: Pergamon.
- Cavalli-Sforza, L. L. and Edwards, A. W. F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19:233-257.
- Efron, B. (1979). Bootstrapping methods: Another look at the jackknife. *Ann. Stat.* 7:1-26
- Felsenstein, J. (1978). Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27:401-410.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368-376.
- Felsenstein, J. (1984). Distance methods for inferring phylogenies: A justification. *Evolution.* 38:16-24.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: Inferred and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22:521-565.
- Felsenstein, J. and Kishino, H. (1993). Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? A reply to Hillis and Bull. *Syst. Biol.* 42:193-200.
- Fitch, W. M. and Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science.* 155:279-278.
- Gaut, B.S. and Lewis, P. O. (1995). Success of maximum likelihood in four-taxon case. *Mol. Boil. Evol.* 12:152-162.
- Hasegawa, M. Kishino, H. and Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22:160-174.

- Hennig, W. (1950). Grundzüge einer theorie der phylogenetischen systematik. Deutsche Zentralverlag, Berlin.
- Hillis, D. M. Moritz, C. and Mable, K. B. (1996). "Molecular systematic". Sinauer Associate. Sunderland, MA.
- Huelsenbeck, J. P. and Hillis, D. M. (1993). Phylogenetic methods in the four-taxon case. *Syst. Biol.* **45**, 92-98.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *In* "Mammalian proteins metabolism" (Munro HN. Ed), pp 21-132. Academy Press, NY.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111-120.
- Kimura, M. (1981). Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:454-458.
- Kitching, I. J. Forey, L. P. Humphries, J. C. and Williams, M. D. (1998). "Cladistics". Oxford University Press.
- Lewis P. O. (2000). Workshop on Molecular Evolution. At Marine Biology Laboratory. Woodshole, MA.
- Li, W. H. (1997). "Molecular evolution". Sinauer, Sunderland, MA.
- Li, W. H. and Graur, D. (1991). Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Nei, M. (1975). Molecular populations genetics and evolution. North-Holland, Amsterdam
- Nei, M. (1991). Relative efficiencies of different tree making methods for molecular data. *In*: Phylogenetic analysis of DNA sequences. Oxford. University. Press. New York.

- Nei, M. (1996). Genetic structure of human populations. II. Differentiation of blood groups gene frequencies among isolated populations. *Heredity*. **21**:183-190.
- Nei, M. (1996*). Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu. Rev. Genet.* **30**:371-340
- Page, M. D. R and Holmes, E. C. (1998). "Molecular evolution a phylogenetic approach". Oxford.
- Rodríguez, F. Oliver, J. F. Marin, A. and Medina, J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**: 485-501.
- Rzhetsky, A. and Nei, A. (1992). A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* **9**:945-967.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Saitou, N. (1988). Property and efficiency of the maximum likelihood method for molecular phylogeny. *J. Mol. Evol.* **27**:261-273.
- Sokal, R. R. and Michener C. D. (1958). A statistic method for evaluating systematic relationships. University of Kansas. *Sci. Bull.* **28**:1409-1438.
- Swoffordm, D. Olsen, G. J. Waddell, P. J. and Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic inference *In*: "Molecular systematics" (Hillis DM, Moritzi C, Mable BK Eds,) pp. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swofford, D. (1999). PAUP* 4.0d65, *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swofford, D. (2000). PAUP* 4.0b7, *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 512-526.
- Zharkikh, A. (1994). Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **39**:315-329.

APÉNDICE II

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Phylogenetic Relationships of Acanthocephala Based on Analysis of 18S Ribosomal RNA Gene Sequences

Martín García-Varela,¹ Gerardo Pérez-Ponce de León,² Patricia de la Torre,¹ Michael P. Cummings,³ S.S.S. Sarma,⁴ Juan P. Laclette¹

¹ Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, A.P. 70228, 04510 México D.F., México

² Department of Zoology, Instituto de Biología, UNAM, A.P. 70228, 04510 México D.F., México

³ The Josephine Bay Paul Center for Comparative Molecular Biology and Evolution, Marine Biological Laboratory, 7 MBL Street, Woods Hole, MA 02543-1015, USA

⁴ Carrera de Biología, Escuela Nacional de Estudios Profesionales, UNAM, A.P. 316, 54090 Edo. de México, México

Received: 12 October 1999 / Accepted: 8 February 2000

Abstract. Acanthocephala (thorny-headed worms) is a phylum of endoparasites of vertebrates and arthropods, included among the most phylogenetically basal triploblastic pseudocoelomates. The phylum is divided into three classes: Archiacanthocephala, Palaeacanthocephala, and Eoacanthocephala. These classes are distinguished by morphological characters such as location of lacunar canals, persistence of ligament sacs in females, number and type of cement glands in males, number and size of proboscis hooks, host taxonomy, and ecology. To understand better the phylogenetic relationships within Acanthocephala, and between Acanthocephala and Rotifera, we sequenced the nearly complete 18S rRNA genes of nine species from the three classes of Acanthocephala and four species of Rotifera from the classes Bdelloidea and Monogononta. Phylogenetic relationships were inferred by maximum-likelihood analyses of these new sequences and others previously determined. The analyses showed that Acanthocephala is the sister group to a clade including Eoacanthocephala and Palaeacanthocephala. Archiacanthocephala exhibited a slower rate of evolution at the nucleotide level, as evidenced by shorter branch lengths for the group. We found statistically significant support for the monophyly of Rotifera, represented in our analysis by species from the clade

Eurotatoria, which includes the classes Bdelloidea and Monogononta. Eurotatoria also appears as the sister group to Acanthocephala.

Key words: Acanthocephala — Archiacanthocephala — Eoacanthocephala — Palaeacanthocephala — Rotifera — Eurotatoria — Bdelloidea — Monogononta — 18S rRNA — Phylogeny

Introduction

The phylum Acanthocephala includes approximately 1150 described species with indirect life cycles always involving arthropods as intermediate hosts and vertebrates as definitive hosts (Nickol and Crompton 1985). The phylum is divided into three classes—Archiacanthocephala, Palaeacanthocephala, and Eoacanthocephala—although a fourth class, Polyacanthocephala, has recently been proposed (Amin 1987). The classification of the phylum is based mostly on the location of the lacunar canals, the persistence of ligament sacs in females, the number and type of cement glands in males, the number and size of proboscis hooks, and the host taxonomy and ecology (Bullock 1969; Amin 1985).

Acanthocephala has been considered to be related to a number of other phyla, including Rotifera, Nematoda, Nematomorpha, Gastrotricha, Kinorhyncha, and Priapulida. Together, these phyla of pseudocoelomate organ-

Correspondence to: Dr. Juan Pedro Laclette; e-mail: Laclette@servidor.unam.mx

isms are usually known as Aschelminthes (Hyman 1951; Marcus 1958; Clark 1979; Brusca and Brusca 1990; Rupert and Barnes 1994). However, a recent phylogenetic analysis using 18S rRNA gene sequences provided support for the hypothesis that Aschelminthes is polyphyletic and consists of at least three distinct clades (Winnepeninckx et al. 1995). Based on four synapomorphies derived from a morphological study, it has been suggested that Acanthocephala and Rotifera represent a monophyletic group (Lorenzen 1985). It has also been proposed that Acanthocephala is sister to the class Bdelloidea (Rotifera) and, hence, that Rotifera is paraphyletic based on analysis of 18S rRNA gene sequences (Garey et al. 1996, 1998). Finally, a recent study based on a protein-coding gene also suggests that acanthocephalans are rotifers (Mark Welch 2000), although the sisterhood between Acanthocephala and Bdelloidea is not supported.

We sequenced the near-complete 18S rRNA gene from nine species of Acanthocephala, from the classes Archiacanthocephala, Palaeacanthocephala, of Eoacanthocephala, and four species of Rotifera, from the classes Bdelloidea and Monogononta. These two classes are generally included in a clade designated Eurotoraria (De Ridder 1956; Wallace and Colbum 1989; Melone et al. 1998; Mark Welch 2000). Maximum-likelihood analysis of sequences from these taxa, and others obtained from GenBank, including 12 Acanthocephalan species, 2 Rotifera species, and 10 species from other phyla, was conducted. Several phylogenetic hypotheses were tested: (1) Acanthocephala and Rotifera are monophyletic (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)); (2) Acanthocephala is the sister group to Bdelloidea and composes a clade within Rotifera, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta); and (3) possible relationships among the three classes of Acanthocephala examined, ((Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala) Archiacanthocephala), (Palaeacanthocephala (Eoacanthocephala, Archiacanthocephala)), and ((Palaeacanthocephala, Archiacanthocephala) Eoacanthocephala).

Materials and Methods

Samples

Taxa used in this study are listed in Table 1. Acanthocephala species *Floriadosentis mugilis*, *Oligacanthorhynchus tortuosa*, *Oncicola* sp., *Mediorhynchus* sp., *Centrorhynchus microcephalus*, *Filisoma bucerium*, *Arhythmorhynchus brevis*, *Koronacantha pectinaria*, and *Poly-morphus* sp. were collected from their naturally infected vertebrate hosts, washed three times in saline solution, and preserved in absolute ethanol at 4°C. These worms were stained in Mayer's paracarmine, mounted in Canada balsam, and identified using conventional morphological criteria. Two-liter cultures of the rotifers *Asplanchna sieboldi*, *Brachionus planus*, *Lecane bulba*, and *Phlodina roseola* were sieved, exhaustively washed in sterile-distilled water, and concentrated to 500 μ l.

DNA Manipulations

Genomic DNA was extracted by digestion of specimens with proteinase K (10 mg/ml) in a buffer that contained 200 mM NaOH and 1% SDS and incubated for 2 h at 50°C, followed by standard phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The near-complete 18S rRNA genes were amplified from all genomic DNA samples by the polymerase chain reaction (PCR) using primers that anneal to conserved regions at both ends of the gene: forward, 5'-AGATTAAGCC-ATGCATGGCT-3'; and reverse, 5'-GCAGGTTTCACCTACGGAAA-3' (Garey et al. 1996). Each reaction mixture contained 200 ng of genomic DNA, a 200 mM concentration of each dNTP, 100 pmol of each primer, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂ (final volume, 100 μ l), and 2 U of Taq polymerase. Thermal cycling used an initial denaturation period of 3 min at 94°C, annealing at 50°C for 3 min, and extension at 72°C for 3 min, followed by another 35 cycles of 1 min at the same denaturation, annealing, and extension temperatures. The PCR products were evaluated in 1% agarose gels, purified following the method described by Vogelstein and Gillespie (1979), and resuspended in 20 μ l of sterile-distilled water. The PCR products were blunt-end ligated into M13mp19. After transformation of TG1 cells, two positive clones from each exon containing inserts in opposite orientation were selected for sequencing. The sequencing of inserts in both directions was carried out by the method of chain termination by dideoxynucleotides (Sanger et al. 1977) using M13 primers or primers annealing in conserved internal sequences and ³²S-dATP as radio-nucleotide.

Data Analysis

In addition to the 18S ribosomal gene sequences from 9 species of Acanthocephala and 4 species of Rotifera generated for this work, another 12 sequences of Acanthocephala and of 8 outgroup taxa were obtained from GenBank (Table 1). The sequences were initially aligned using the Clustal algorithm (Higgins and Sharp 1988) in DNAMAN (Lynn BioSoft 1994-97) and then adjusted by eye. The alignment is available from the corresponding author upon request. Phylogenetic relationships were determined by maximum-likelihood analyses (Felsenstein 1981) using the program PAUP* 4.0d65 (Swofford 1999). The tree searching and model fitting were done in successive steps to increase efficiency. An initial tree was generated by neighbor-joining (Saitou and Nei 1987) with proportional distances and other default settings. A likelihood model was fitted to this initial tree to obtain parameters for the next round of searching. The fitted model included estimates of rates for six nucleotide substitution types, nucleotide frequencies, and the proportion of invariant sites. Rates of substitution at variable sites were assumed to follow a gamma distribution of four rate categories, with the average rate for each category represented by the mean. The shape parameter of the gamma distribution, α , was estimated from the data. This likelihood model is a general time-reversible model (Yang 1994) with rate heterogeneity. A single heuristic search was conducted using the model parameters estimated from the initial neighbor-joining tree with random sequence addition and tree bisection-reconnection branch swapping to find an initial maximum-likelihood tree. The same model parameters were then reestimated and the parameter values were used in another maximum-likelihood heuristic search as conducted previously, but with five replicates. Likelihood model parameters were then reestimated on the final tree. To compare specific topologies representing specific phylogenetic hypotheses, constraints were defined and searches for maximum-likelihood trees were conducted using the model and heuristic search strategy described above with parameters estimated on the constraint tree. The difference between maximum-likelihood values for trees representing alternative hypotheses were evaluated using the test of Kishino and Hasegawa (1989) implemented in PAUP*. Other PAUP* program options, where not specifically mentioned, conform to default settings.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 1. Taxa examined

Taxon name	Accession No.	Length (bp), G + C (%)	Host	Reference
Acanthocephala				
<i>Arhythmorhynchus brevis</i>	AF064812	1784, 49	<i>Nycticorax nycticorax</i>	This study
<i>Centrorhynchus conspectus</i>	U41399	1750, 49	<i>Sirix varia</i>	Garey et al. (1996)
<i>Centrorhynchus microcephalus</i>	AF064813	1735, 49	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	This study
<i>Corynosoma enhydri</i>	AF001837	1747, 49	<i>Enhydra lutris</i>	Near et al. (1998)
<i>Echinorhynchus gadi</i>	U88335	1793, 47	<i>Gadus morhua</i>	Alcshin et al. (1998)
<i>Fillsoma bucerium</i>	AF064814	1744, 46	<i>Kyphosus elegans</i>	This study
<i>Floridosentis mugilis</i>	AF064811	1760, 46	<i>Mugil cephalus</i>	This study
<i>Leptorhynchoides thecatus</i>	AF001840	1758, 47	<i>Lepomis cyanellus</i>	Near et al. (1998)
<i>Koronacantha pectinaria</i>	AF092433	1761, 46	<i>Microlepidotus brevipinnis</i>	This study
<i>Macracanthorhynchus ingens</i>	AF001844	1765, 45	<i>Procyon lotor</i>	Near et al. (1998)
<i>Mediorhynchus</i> sp.	AF064816	1758, 45	<i>Casidix mexicanus</i>	This study
<i>Mediorhynchus grandis</i>	AF001843	1769, 45	<i>Sturnella magna</i>	Near et al. (1998)
<i>Moniliformis moniliformis</i>	Z19562	1769, 45	<i>Rattus rattus</i>	Telford and Holland (1993)
<i>Neoechinorhynchus pseudemydis</i>	U41400	1771, 46	<i>Trachemys scripta elegans</i>	Garey et al. (1996)
<i>Neoechinorhynchus crassus</i>	AF001842	1773, 47	<i>Catostomus commersoni</i>	Near et al. (1998)
<i>Oligacanthorhynchus tortuosa</i>	AF064817	1767, 45	<i>Didelphis virginiana</i>	This study
<i>Oncicola</i> sp.	AF064818	1755, 45	<i>Nasua narica</i>	This study
<i>Plagiorhynchus cylindraceus</i>	AF001839	1745, 48	<i>Armadillidium vulgare</i>	Near et al. (1998)
<i>Polymorphus</i> sp.	AF064815	1739, 48	<i>Anas platyrhynchos</i>	This study
<i>Polymorphus almani</i>	AF001838	1745, 48	<i>Enhydra lutris</i>	Near et al. (1998)
<i>Pomphorhynchus bulbocollis</i>	AF001841	1761, 45	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Near et al. (1998)
Rotifera				
<i>Asplanchna sieboldi</i>	AF092434	1728, 46	Free-living	This study
<i>Brachionus plicatilis</i>	U29235	1736, 47	Free-living	Winnepenninckx et al. (1995)
<i>Brachionus platus</i>	AF154568	1745, 45	Free-living	This study
<i>Lecane bulba</i>	AF154566	1733, 47	Free-living	This study
<i>Philodina acuticornis</i>	U41281	1789, 43	Free-living	Garey et al. (1996)
<i>Philodina roseola</i>	AF154567	1747, 46	Free-living	This study
Gastrotricha				
<i>Lepidodermella squamata</i>	U29198	1742, 50	Free-living	Winnepenninckx et al. (1995)
<i>Chaetonotus</i> sp.	AJ001735	1814, 49	Free-living	Littlewood et al. (1998)
Platyhelminthes				
<i>Opisthorchis viverrini</i>	X55357	1992, 51	<i>Homo sapiens</i>	Korbsrisate et al. (1991)
Annelida				
<i>Lanice conchilega</i>	X79873	1809, 51	Free-living	Winnepenninckx et al. (1995)
Nematoda				
<i>Haemonchus placei</i>	L04154	1758, 47	Adult parasite	Zarlenga et al. (1994)
<i>Nematodirus battus</i>	U01230	1758, 47	Adult parasite	Zarlenga et al. (1994)
Nematomorpha				
<i>Gordius aquaticus</i>	X87985	1797, 47	Free-living	Winnepenninckx et al. (1995)
Priapulida				
<i>Priapulid caudatus</i>	X87984	1811, 49	Free-living	Winnepenninckx et al. (1995)
Kinorhyncha				
<i>Pycnophyes kielensis</i>	U67997	1806, 49	Free-living	Unpublished
Arthropoda				
<i>Artemia salina</i>	X01723	2020, 50	Free-living	Winnepenninckx et al. (1995)

Figures were prepared, in part, using the programs RETREE and DRAWGRAM from PHYLIP (Felsenstein 1999).

Results

Near-complete 18S rRNA gene sequences were determined for nine species of Acanthocephala and four species of Rotifera (Table 1). The mean number of nucleotides determined for these sequences was 1756, with a mean proportion G + C of 0.465. Base composition

across all sequences was not significantly heterogeneous ($\chi^2 = 116.588$, 108 df, $p = 0.269$).

Relationships of Acanthocephala to Rotifera

The new sequences, together with others determined previously (Table 1), were aligned and analyzed to infer phylogenetic relationships. Initial analysis showed that Acanthocephala was monophyletic and sister to Rotifera, in contrast to recent analysis, where Acanthocephala appears to be part of Rotifera (Garey et al. 1998). To test if

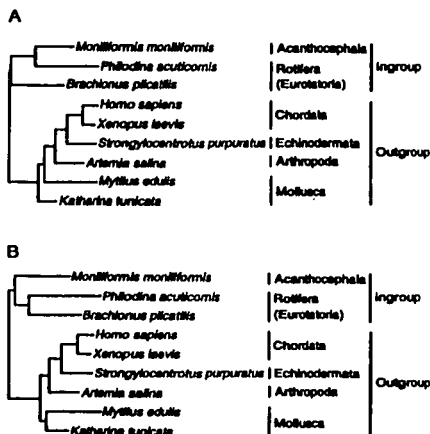


Fig. 1. Phylogenetic trees for Acanthocephala, Eurotatoria, and outgroup taxa based on 16S rRNA gene sequence data of Garey et al. (1998). A This tree corresponds to the hypothesis that Eurotatoria is paraphyletic and Acanthocephala is sister to Eurotatoria class Bdelloidea, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta). The $-ln$ likelihood value for this tree is 4382.478. B This tree is the result of a constraint that Eurotatoria is monophyletic, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)). The $-ln$ likelihood value for this tree, 4384.405, is not significantly less likely ($p = 0.642$) than the tree shown in A. In all trees the branch lengths are proportional to the inferred number of nucleotide substitutions.

the discrepancy was due to differences in the sequence alignments or in the analysis, four nucleotide sequence data sets/alignments were examined: 16S rRNA gene data from Garey et al. (1998), 18S rRNA gene data from Garey et al. (1996), our expanded 18S rRNA gene data using an alignment based on that of Garey et al. (1996), and our expanded 18S rRNA gene data using our own alignment. Both 16S rRNA and 18S rRNA gene data from Garey et al. (1996, 1998) were downloaded from: <http://chuma.cas.usf.edu/~garey/index.html>. The analytical results associated with each of these data sets are discussed in turn. For the description of results the use of Rotifera is maintained in the text, although, conclusions drawn are restricted to relationships among Acanthocephala and Eurotatoria.

16S rRNA Gene Data of Garey et al. (1998). This data set consisted of 9 taxa and 762 aligned nucleotide positions. All five searches resulted in the same maximum-likelihood tree (Fig. 1A), with a topology where Rotifera is paraphyletic, and therefore, Acanthocephala arises from within Rotifera. This tree also has Mollusca paraphyletic. A tree corresponding to the alternative hypothesis, that Rotifera is monophyletic, was generated using searches with a constraint corresponding to this alternative hypothesis. All five searches resulted in the same

Table 2. Relationships of Acanthocephala to Rotifera

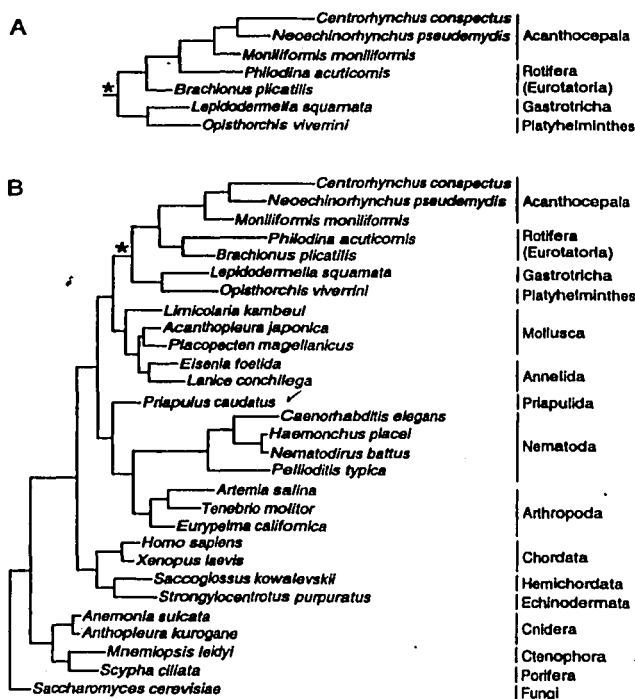
Sequence data sets/alignments	$-ln$ likelihood ^a	Proportion of invariable sites	Gamma shape parameter
16S rRNA (Garey et al. 1999)			
Fig. 1A	4382.478 ¹	0.141	1.316
Fig. 1B	4384.405 ¹	0.141	1.263
18S rRNA (Garey et al. 1996)			
Fig. 2A	23494.397 ²	0.071	0.472
Fig. 2B	23499.077 ²	0.074	0.473
Expanded 18S rRNA, alignment based on Garey et al. (1996)			
Fig. 3	27015.414 ³	0.063	0.637
Fig. 4	27004.101 ³	0.060	0.633
Expanded 18S rRNA, our alternative alignment			
Fig. 5	24231.698 ⁴	0.083	0.513
Not shown	24248.954 ⁴	0.085	0.515

^a Differences in $-ln$ likelihood between the trees representing the two hypotheses, based on the Kishino-Hasegawa test: ¹ = 1.927, is not significant (standard deviation of the difference = 4.138, $t = 0.465$, $p = 0.642$); ² = 4.681, is not significant (standard deviation of the difference = 3.567, $t = 1.312$, $p = 0.190$); ³ = 11.314, is marginally significant (standard deviation of the difference = 5.828, $t = 1.941$, $p = 0.052$); ⁴ = 17.256, is significant (standard deviation of the difference = 7.599, $t = 2.271$, $p = 0.023$).

maximum-likelihood tree (Fig. 1B). Although not specified in the search constraint, this tree has Mollusca monophyletic. The difference in $-ln$ likelihood between the trees representing the two hypotheses is not significant (Table 2).

18S rRNA Gene Data of Garey et al. (1996). This data set consisted of 29 taxa and 2520 aligned nucleotide positions. All five searches resulted in the same maximum-likelihood tree (Fig. 2A), with a topology where Rotifera is paraphyletic and Acanthocephala arises from within Rotifera. A tree corresponding to the hypothesis that Rotifera is monophyletic was generated using searches with a constraint corresponding to this alternative hypothesis. All five searches resulted in the same maximum-likelihood tree (Fig. 2B). The difference in $-ln$ likelihood between the trees representing the two hypotheses is not significant (Table 2).

Expanded 18S rRNA Gene Data with Alignment Based on That of Garey et al. (1996). This data set consisted of 37 taxa and 2527 aligned nucleotide positions. These data include new sequences for nine species of Acanthocephala and four species of Rotifera. With these data we compared two hypotheses. The first, that Acanthocephala is the sister group to Rotifera class Bdelloidea and these two combined form the sister to the rest of Rotifera (Monogononta here), is the hypothesis of Garey et al. (1996, 1998). The second hypothesis is that Acan-



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. Phylogenetic trees for Acanthocephala, Eurotatoria, and outgroup taxa based on 18S rRNA gene sequence data of Garey et al. (1996). **A** This tree corresponds to the hypothesis that Eurotatoria is paraphyletic and Acanthocephala is sister to Eurotatoria class Bdelloidea, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta). The $-\ln$ likelihood value for this tree is 23494.397. The asterisk denotes the location of the subtree in **A** on the full tree in **B**. **B** This tree is the result of a constraint that Eurotatoria is monophyletic, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)). The $-\ln$ likelihood value for this tree, 23499.077, is not significantly less likely ($p = 0.190$) than the tree shown in **A**.

thocephala is the sister group to the whole of Rotifera: this is the hypothesis of Winnepenninckx et al. (1995), Wallace et al. (1996), and Melone et al. (1998). For the constraint searches corresponding to the first hypothesis, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta), all five searches resulted in the same maximum-likelihood tree (Fig. 3). A tree corresponding to the alternative hypothesis, that Acanthocephala is sister to the whole of Rotifera, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)), was generated using searches with a constraint corresponding to this hypothesis. All five searches resulted in the same maximum-likelihood tree with a higher $-\ln$ likelihood value (Fig. 4). The difference in $-\ln$ likelihood between the trees representing the two hypotheses is marginally significant, i.e., if rounded to two significant figures (Table 2). A feature of both trees is a paraphyletic *Mediorhynchus*.

Expanded 18S rRNA Gene Data with Our Alternative Alignment. This data set consisted of 37 taxa and 2031 aligned nucleotide positions. All five searches resulted in the same maximum-likelihood tree (Fig. 5), with a topology where Rotifera is monophyletic and, as a whole, is the sister group to Acanthocephala, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)). A tree corresponding to the

alternative hypothesis, that Bdelloidea is sister to Acanthocephala, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta), was generated using searches with a constraint corresponding to this hypothesis. All five searches resulted in the same maximum-likelihood tree (not shown). The $-\ln$ likelihood for this tree is lower and the difference between the trees representing the two hypotheses is significant (Table 2). A monophyletic *Mediorhynchus* is a feature of trees produced with this alignment.

Relationships of Classes Within Acanthocephala

Where appropriate taxa are present, all trees showed the same relationship among classes within Acanthocephala: Palaeacanthocephala is sister to Eoacanthocephala and these combined form a group that is sister to Archiacanthocephala, ((Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala) Archiacanthocephala). We examined the support for this relationship by testing it against other possible relationships of these classes using constraint searches on our expanded data set and alignment. The best tree obtained for one alternative, (Palaeacanthocephala (Eoacanthocephala, Archiacanthocephala)), was found in all five searches and has a $-\ln$ likelihood of 24253.250. The

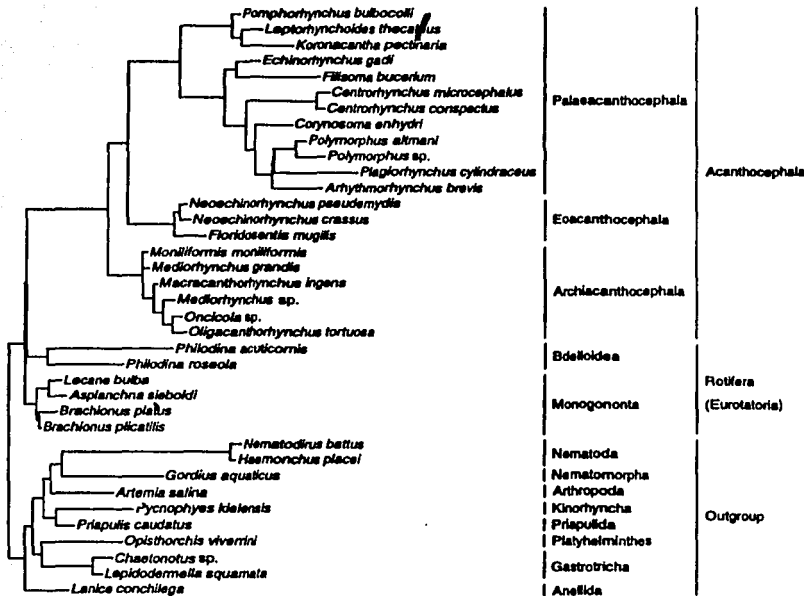


Fig. 3. Phylogenetic tree for Acanthocephala, Eurotatoria, and outgroup taxa based on our expanded 18S rRNA gene sequence data with an alignment based on that of Garey et al. (1996). This tree corresponds to the hypothesis that Eurotatoria is paraphyletic and Acanthocephala is sister to Eurotatoria class Bdelloidea, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta). The $-\ln$ likelihood value for this tree is 27015.414.

proportion of invariable sites for this tree is 0.089 and the gamma shape parameter is 0.521. The best tree for the other alternative, ((Palaeacanthocephala, Archiacanthocephala) Eoacanthocephala), was found in all five searches and has a $-\ln$ likelihood of 24253.502. The proportion of invariable sites for this tree is 0.089 and the gamma shape parameter is 0.522. Based on the results of the Kishino-Hasagawa test, both alternative relationships for the classes within Acanthocephala are significantly less likely than that shown in Fig. 5. The difference in $-\ln$ likelihood between trees for ((Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala) Archiacanthocephala) and (Palaeacanthocephala (Eoacanthocephala, Archiacanthocephala)) is 21.552 (SD of the difference = 8.759, $t = 2.461$, $p = 0.014$). The difference in $-\ln$ likelihood between trees for ((Palaeacanthocephala, Eoacanthocephala) Archiacanthocephala) and ((Palaeacanthocephala, Archiacanthocephala) Eoacanthocephala) is 21.804 (SD of the difference = 8.731, $t = 2.497$, $p = 0.013$).

Discussion

Relationships Among Phyla

Recent molecular and morphological data suggest that Acanthocephala is most closely related to Rotifera (Win-

penninginckx et al. 1995; Wallace et al. 1996). Furthermore, analysis based on morphological characters as well as on 18S ribosomal gene sequences has led to the suggestion that Acanthocephala might be a subtaxon within Rotifera (Lorenzen 1985; Garey et al. 1996, 1998). In our work reported here, the relationships among phyla other than Rotifera and Acanthocephala, including Platyhelminthes, Gastrotricha, Nematoda, Nematomorpha, Priapulida, Kinorhyncha, Arthropoda, and Annelida, as shown in Fig. 5, are highly consistent with other recent reports (e.g., Aleshin et al. 1998). However, hypothesis testing in this study with an expanded data set including six sequences of Rotifera species (two Bdelloidea and four Monogononta), shows that hypotheses other than that of Rotifera monophyly and Rotifera as the sister group to Acanthocephala, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)), are significantly less likely. Therefore, our results are in contrast to those of Garey et al. (1996, 1998), who found that Bdelloidea is the sister group to Acanthocephala, (Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta). However, no conclusion can be reached yet concerning the monophyly of Rotifera as a whole without the inclusion of Seasonidea. The topology of our tree is also supported by a recent analysis using a highly conserved nuclear gene encoding a heat shock protein (hsp 82), where Bdelloidea and Monogononta are monophyletic and form a clade (Eurotatoria) that is the sister

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

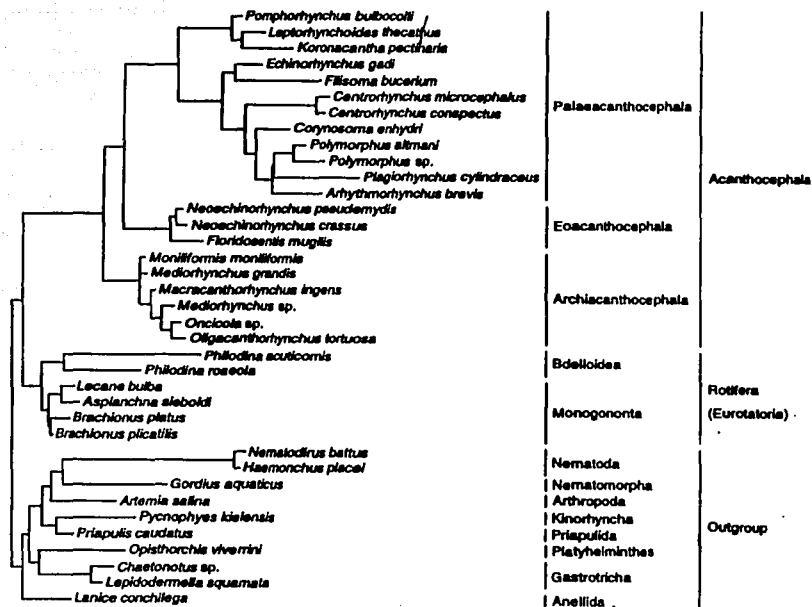


Fig. 4. Phylogenetic tree for Acanthocephala, Eurotatoria, and outgroup taxa based on our expanded 18S rRNA gene sequence data with an alignment based on that of Garey et al. (1996). This tree is the result of a constraint that Eurotatoria is monophyletic (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)). The $-ln$ likelihood value for this tree, 27004.101, is marginally more likely ($p = 0.052$) than the tree shown in Fig. 5.

group of Acanthocephala (Mark Welch 2000). Our results also support the monophyly of Eurotatoria within Rotifera.

Why do our conclusions differ from those of Garey et al. (1996, 1998)? In general, there are four reasons why results may differ between molecular systematic studies: (1) differences in sequence region(s) sampled, (2) differences in sequence alignment (this point is particularly relevant to rRNA gene sequences for which alignments are substantially subjective), (3) differences in taxa sampled, and (4) differences in phylogenetic inference methods. Three of these reasons are relevant here, the exception being the sequence regions sampled, as we examine the same sequence regions, 16S and 18S ribosomal RNA genes.

We examined the same sequence alignments used by Garey et al. (1996, 1998) and our expanded data with an alignment based on that of Garey et al. (1996); the trees resulting from analyses of these alignments are presented in Figs. 1–4. However, we prefer the alignment used to produce the tree in Fig. 5, for several reasons. The resulting tree (Fig. 5) demonstrates one reason for our preference, the monophyly of *Mediorhynchus*.

The importance of taxon sampling in the resolution of phylogenetic relationships has been demonstrated (i.e., Graybeal 1998). Several comparisons in our study used

an expanded data set and thus our sampling of taxa is greater than that of Garey et al. (1996, 1998). Additional sampling breadth might be particularly relevant to testing hypotheses concerning the relationships of Acanthocephala and Rotifera, and our study includes sequence data from *Philodina roseola* and thus has two species of Bdelloidea. The branch for *Philodina acuticornis* appears to be relatively long compared to other species of Rotifera.

We used one of the most sophisticated maximum-likelihood models currently available in an attempt to account for frequency of base change types, unequal base frequencies, invariant sites, and rate variation among sites. Furthermore, hypothesis testing in our study was based on the comparison of likelihood values, rather than on comparisons based on minimum evolution and parsimony.

Given the relative short sequences (762 aligned positions for 16S rRNA gene and up to 2527 for 18S rRNA gene), it might not be surprising that the hypotheses cannot always be statistically distinguished. Studies of the sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis demonstrate that larger samples of sites than considered here are generally needed to resolve phylogenetic relationships clearly (Cummings et al. 1995, 1999; Otto et al. 1996). Therefore, additional se-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

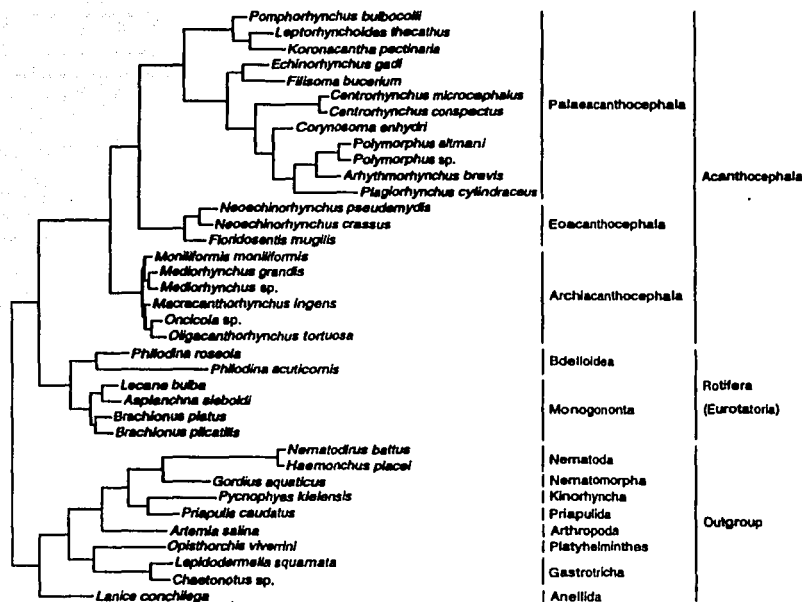


Fig. 5. Phylogenetic tree for Acanthocephala, Eurotatoria, and outgroup taxa based on our expanded 18S rRNA gene sequence data and our alignment. This tree is consistent with the hypothesis that Eurotatoria is monophyletic, (Acanthocephala (Bdelloidea, Monogononta)). The $-ln$ likelihood value for this tree, 24231.698, is significantly more likely ($p = 0.023$) than the tree for the alternative hypothesis, ((Acanthocephala, Bdelloidea) Monogononta).

quence data would be helpful in producing additional analytical results regarding these hypotheses.

Relationships Within Acanthocephala

Our analyses support the hypothesis that Acanthocephala is an independent and monophyletic group that includes three subclades, each of them representing a class in agreement with current classifications of this parasitic group (Bullock 1969; Amin 1985). The class Polyacanthocephala includes a few species that are parasites of fish and crocodiles (Amin 1987); however, no material from Polyacanthocephala was available for the present study. Determination of Polyacanthocephala relationships with other classes included here, based on sequences data, will be the matter of future study. The phylogenetic relationships within Acanthocephala have been controversial. Based on morphological characters, Archiacanthocephala (Haffner 1950; Golvan 1959), Eoacanthocephala (Van Cleave 1948; Petroschenko 1956), and Palaeacanthocephala (Lang 1953) have been alternatively proposed as the earliest-emerging class within the phylum. More recent studies based on morphological

and ecological characters do not result in definitive answers either (Conway Morris and Crompton 1982). Our results based on the analysis of the near-complete sequences of 18S ribosomal genes support the hypothesis that Archiacanthocephala is the basal class of the phylum and the sister group of a clade including Eoacanthocephala and Palaeacanthocephala (Fig. 5).

Within Palaeacanthocephala, the species included in our analysis appear separated in the two orders represented by Echinorhynchida (*F. bucerium*, *L. thecatus*, *K. pectinaria*, *P. bulbocolli*, and *E. gadi*) and Polymorphida (*C. microcephalus*, *C. conspectus*, *P. cylindraceus*, *Polymorphus* sp., *P. altmani*, *A. brevis*, and *C. enhydris*). As is apparent in Fig. 5, the branch lengths for Palaeacanthocephala taxa are generally longer than for taxa of Eoacanthocephala and Archiacanthocephala.

The relationships within Archiacanthocephala also are consistent with the existence of the orders: Moniliformida (*M. moliniformis*), Gigantorhynchida (*Mediorhynchus* sp. and *M. grandis*), and Oligacanthorhynchida (*Oncicola* sp., *O. tortuosa*, and *M. ingens*). Similar results concerning the phylogenetic relationships of the higher taxa of Acanthocephala, for a data set of 11 species, have recently been reported (Near et al. 1998).

Acknowledgments. This work was supported in part by grants from CONACYT, LOO42-M9607 (J.P.L.) and 2676 PN (G.P.P.L.), and from DGAPA-UNAM, IN-207195 (J.P.L.) and IN201396 and IN219198 (G.P.P.L.). M.G.V. is being supported by scholarships from CONACYT and DGAPA-UNAM. Specimens of *Polymorphus* sp. and *Koronacantha pectinaria* were kindly provided by S. Monks.

References

- Aleshin VV, Milyutina IA, Kedrova OS, Vladychenskaya NS, Petrov NB (1998) Phylogeny of *Nematoda* and *Cephalorhyncha* derived from 18S rDNA. *J Mol Evol* 47:597-605
- Amin OM (1985) Classification. In: Crompton DWT, Nickol BB (eds) *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, London, pp 27-72
- Amin OM (1987) Key to the families and subfamilies of Acanthocephala with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida). *J Parasitol* 73:1216-1219
- Brusca RC, Brusca GJ (1990) Invertebrates. Sinauer, Sunderland, MA
- Bullock WL (1969) Morphological features as tool and pitfall in acanthocephalan systematics. In: Schmidt GD (eds) *Problems in systematics of parasites*. University Park Press, Baltimore, pp 9-45
- Clark RB (1979) Radiation of the Metazoa. In: Houses MR (eds) *The origins of major invertebrate groups*. Academic Press, New York, pp 55-101
- Conway Morris S, Crompton DWT (1982) The origins and evolution of the Acanthocephala. *Biol Rev* 57:85-115
- Cummings MP, Otto SP, Wakeley J (1995) Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 12: 814-822
- Cummings MP, Otto SP, Wakeley J (1999) Genes and other samples of DNA sequence data for phylogenetic inference. *Biol Bull* 196:345-350
- De Ridder M (1956) Enkele beschouwingen over de taxonomie der raderdieren. *Natuurwet Tijdschr* 38:160-166
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368-376
- Felsenstein J (1999) PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.52c. University of Washington, Seattle
- Garey RJ, Near TJ, Nonnemaker MR, Nadler SA (1996) Molecular evidence for Acanthocephala as a subtaxon of Rotifera. *J Mol Evol* 43:287-292
- Garey RJ, Schmidt-Rhaesa A, Near TJ, Nadler SA (1998) The evolutionary relationships of rotifers and acanthocephalans. *Hydrobiologia* 387/388:83-91
- Golvan YJ (1959) Protonéphridies et taxonomie des acanthocéphales. Proceedings of the Fifteenth (London) International Congress of Zoology, p 960
- Graybeal A (1998) Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem. *Syst Biol* 47:9-17
- Haffner K (1950) Organisation und systematische stellung der Acanthocephala. *Verh Dtsch Zool Ges* 145:245-274
- Higgins DG, Sharp PM (1988) Clustal: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73:237-244
- Hyman LB (1951) *The invertebrates, Vol III: Pseudocoelomate groups*. McGraw-Hill, New York
- Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from sequence data and branching order in Hominoidea. *J Mol Evol* 229:170-179
- Korbsrisate S, Mongkolkeu S, Haynes JR, England D, Sirisinha S (1991) Nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA-encoding gene from *Opisthorchis viverrini*. *Gene* 105:259-261
- Lang K (1953) Die Entwicklung des Eies von *Priapulus caudatus* Lam und die systemische Stellung der Priapuliden. *Arkiu Zoo* 5:321-348
- Littlewood JTD, Telford MJ, Clough KA, Rohde K (1998) Gnathostomulida an enigmatic metazoan phylum from both morphological and molecular perspectives. *Mol Phy Evol* 9:72-79
- Lorenzen S (1985) Phylogenetic aspects of pseudocoelomate evolution. In: Conway Morris S, George JD, Gibson R, Platt HM (eds) *The origins and relationships of lower invertebrates*. Clarendon Press, Oxford, pp 210-223
- Marcus E (1958) On the evolution of the animal phyla. *Q Rev Biol* 33:24-58
- Mark Welch DB (2000) Evidence from a protein-coding gene that acanthocephalans are rotifers. *Invertebr Biol* 119:17-26
- Melone G, Ricci C, Segers H, Wallace RL (1998) Phylogenetic relationships of phylum Rotifera with emphasis on the families of Bdelloidea. *Hydrobiologia* 387/388:101-107
- Near JT, Garey JR, Nadler SA (1998) Phylogenetic relationships of the acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 10:287-298
- Nickol BB, Crompton DWT (1985) *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, London
- Otto SP, Cummings MP, Wakeley J (1996) Inferring phylogenies from DNA sequence data the effects of sampling. In: Harvey PH, Leigh Brown AJ, Maynard Smith J, Neer S (eds) *New uses for new phylogenies*. Oxford University Press, Oxford, pp 103-115
- Petrotschenko VI (1956) Acanthocephala of domestic and wild animals. In: Skrjabin KI (ed) *Izdatel'stvo, Akademii Nauk SSSR, Moscow*, p 465
- Ruppert EE, Barnes RD (1994) *Invertebrate zoology*. Saunders, New York
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Sanger FFS, Nicklen A, Coulson A (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Swofford D (1999) PAUP* 4.0d65, *phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Telford MJ, Holland PWH (1993) The phylogenetic analysis of the Chaetognaths: A molecular analysis. *Mol Biol Evol* 10:660-676
- Van Cleave HJ (1948) Expanding horizons in the recognition of a phylum. *J Parasitol* 34:1-20
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:615
- Wallace RL, Colburn RA (1989) Phylogenetic relationships within the phylum Rotifera: Orders and genus Notholca. *Hydrobiologia* 186/187:311-318
- Wallace RL, Claudia R, Giulio M (1996) A cladistic analysis of pseudocoelomates (aschelminth) morphology. *Invertebr Biol* 2:104-112
- Winnepenninckx B, Backeljau T, Mackey LY, Brooks JM, Wächter DR, Kumar S, Garey JR (1995) 18S rRNA data indicate that the Aschelminthes are polyphyletic in origin and consist of at least three distinct clades. *Mol Biol Evol* 12:1132-1137
- Yang Z (1994) Estimating the pattern of nucleotide substitution. *J Mol Evol* 39:105-111
- Zarlenga DS, Stringfellow F, Nobary M, Lichtenfels JR (1994) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of Haemonchus (Nematoda: Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid differentiation. *Exp Parasitol* 78:28-36

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE III



ACADEMIC
PRESS

Molecular Phylogenetics and Evolution xxx (2002) xxx-xxx

MOLECULAR
PHYLOGENETICS
AND
EVOLUTION

www.academicpress.com

Short Communication

3 Phylogenetic analysis based on 18S Ribosomal RNA gene
4 sequences supports the existence of class
5 polyacanthocephala (acanthocephala)

6 Martín García-Varela,^a Michael P. Cummings,^b Gerardo Pérez-Ponce de León,^c
7 Scott L. Gardner,^d and Juan P. Laclette^{a,*}

8 ^a Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Mexico, D.F., Mexico

9 ^b Department of Zoology, Instituto de Biología, UNAM, 04510 México, D.F., México

10 ^c The Josephine Bay Paul Center for Comparative Molecular Biology and Evolution, Marine Biological Laboratory, 7 MBL Street, Woods Hole,
11 MA 02543-1015, USA

12 ^d Harold W. Manter Laboratory of Parasitology, W-529 Nebraska Hall, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68588-0514, USA

13 Received 19 June 2001; received in revised form 5 December 2001

14 Abstract

15 Members of phylum Acanthocephala are parasites of vertebrates and arthropods and are distributed worldwide. The phylum has
16 traditionally been divided into three classes, Archiacanthocephala, Palaeacanthocephala, and Eoacanthocephala; a fourth class,
17 Polyacanthocephala, has been recently proposed. However, erection of this new class, based on morphological characters, has been
18 controversial. We sequenced the near complete 18S rRNA gene of *Polyacanthorhynchus caballeroi* (Polyacanthocephala) and
19 *Rhadinorhynchus* sp. (Palaeacanthocephala); these sequences were aligned with another 21 sequences of acanthocephalans repre-
20 senting the three widely recognized classes of the phylum and with 16 sequences from outgroup taxa. Phylogenetic relationships
21 inferred by maximum-likelihood and maximum-parsimony analyses showed Archiacanthocephala as the most basal group within
22 the phylum, whereas classes Polyacanthocephala + Eoacanthocephala formed a monophyletic clade, with Palaeacanthocephala as
23 its sister group. These results are consistent with the view of Polyacanthocephala representing an independent class within
24 Acanthocephala. © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

25 **Keywords:** Acanthocephala; 18S rRNA; Polyacanthocephala; *Polyacanthorhynchus caballeroi*

26 1. Introduction

27 The phylum Acanthocephala consists of endoparas-
28 ites of arthropods and vertebrates, commonly referred
29 to as thorny-headed worms, included among the most
30 basal triploblasts (Brusca and Brusca, 1990; Clark, 1979;
31 Hyman, 1951; Marcus, 1958; Winnepenninckx et al.,
32 1995; Wallace et al., 1996). The phylum has been tra-
33 ditionally divided into three classes, Archiacanthoceph-
34 hala, Palaeacanthocephala, and Eoacanthocephala
35 (Amin, 1985; Bullock, 1969), although a new class,
36 Polyacanthocephala, with one order, one family, one
37 genus (*Polyacanthorhynchus*), and four species has been

recently proposed (Amin, 1987). Three of these species, 38
P. macrorhynchus, *P. caballeroi*, and *P. rhopalorhynchus*, 39
inhabit the digestive tract of south American caimans. 40
The fourth species, *P. kenyensis*, is only known in the 41
larval stage, infecting freshwater fish in Kenya (Amin 42
and Desfuli, 1995). However, erection of this new class 43
has been controversial because polyacanthocephalans 44
were originally included within family Rhadinorhyn- 45
chidae, belonging to Palaeacanthocephala. 46

Recent studies based on sequences of 18S rRNA 47
suggested that the phylum Acanthocephala is a mono- 48
phyletic group with Archiacanthocephala situated as the 49
most basal class of the phylum and, therefore, Eoacan- 50
thocephala + Palaeacanthocephala form a derived clade 51
(García-Varela et al., 2000; Near et al., 1998). However, 52
these analyses did not include sequences from Polyac- 53
anthocephala species. 54

*Corresponding author. Fax: +525-622-3892.

E-mail address: laclette@servidor.unam.mx (J.P. Laclette).

55 The initial proposal of Polyacanthocephala as a
56 separate class (Bullock, 1969; Schmidt and Canaris,
57 1967) was not incorporated into the major taxonomic
58 reviews of Acanthocephala (Amin, 1985; Bullock, 1969).
59 More recently, characters such as trunk spination, lac-
60 unar canal location, number and size of proboscis
61 hooks, female ligament sacs, and male cement gland
62 nuclei have been used to support the Polyacanthocep-
63 hala as a new class (Amin, 1987). In this study we se-
64 quenced the nearly complete 18S ribosomal RNA gene
65 of *P. caballeroi* and *Rhadinorhynchus* sp., which were
66 aligned with 21 sequences of acanthocephalans repre-
67 senting the classes Archiacanthocephala, Palaeacantho-
68 cephala, and Eoacanthocephala.

69 2. Materials and methods

70 2.1. Specimen collection

71 Specimens of *P. caballeroi* were collected from the in-
72 testine of a caiman (*Caiman yacare*) from Bolivia,
73 whereas the specimens of *Rhadinorhynchus* sp. were col-
74 lected from the intestines of fish belonging to the family
75 Scianidae. The worms were washed three times in saline
76 and preserved in liquid nitrogen until DNA extraction.
77 The parasites were identified using conventional mor-
78 phological criteria. The voucher specimens were depos-
79 ited at the Colección Nacional de Helminfos, Inst. de
80 Biología, UNAM.

81 2.2. Characterization of 18S rDNA Gene of *P. caballeroi* 82 and *Rhadinorhynchus* sp.

83 Genomic DNA from *P. caballeroi* and *Rhadinorhyn-*
84 *chus* sp. were extracted and the near complete 18S rDNAs
85 were amplified by PCR using primers Forward 5'-AGAT
86 TAAGCCATGCATGCGT-3' and Reverse 5'-GCAGG
87 TTCACCTACGGAAA-3' as described elsewhere (García-
88 Varela et al., 2000). PCR products were separated and
89 evaluated by electrophoresis through 1% agarose gels.
90 The band containing the amplified DNA was excised
91 from the gel and PCR products were cleaned using the
92 Wizard PCR purification system (Promega). The ampli-
93 fied products were ligated and cloned using plasmid
94 vector pMOSBlue (Amersham) and *Escherichia coli* TG1
95 cells. After purification of the recombinant plasmid with
96 the purification system (Promega), both strands of 18S
97 rDNA gene were sequenced with an Applied Biosystems
98 310 automatic sequencer using ABI Prism dye terminator
99 sequencing kits using M13 universal primers or primers
100 annealing to conserved internal sequences. DNA se-
101 quences were inspected individually and assembled with
102 the program DNAMAN (Lynnon Biosoff, 1994-1997).
103 The near complete 18S rRNA gene sequences for *P. ca-*
104 *balleroi* and *Rhadinorhynchus* sp. have been deposited in

the GenBank/EMBL data sets with the Accession Nos. 105
AF388660 and AY062433, respectively. 106

2.3. Taxa used and sequence alignment 107

The sequences obtained from *P. caballeroi* and 108
Rhadinorhynchus sp. were aligned within an expanded 109
database of 18S rRNA genes, consisting of 37 taxa and 110
2031 aligned nucleotide positions (García-Varela et al., 111
2000), using the programs Clustal W (Thompson et al., 112
1994) and DNAMAN (Lynnon Biosaf, 1994-1997) 113
and were then adjusted by eye. The complete alignment 114
is available from the corresponding author upon 115
request. 116

2.4. Phylogenetic analysis 117

The phylogenetic analysis was carried out with 118
PAUP* 4.0b7a (Swofford, 2000). To determine which 119
model of sequence evolution best fit our data set, a 120
nested likelihood ratio test was performed using Mod- 121
eltest program version 3.0 (Posada and Crandall, 1988). 122
Phylogenetic relationships were inferred using maxi- 123
mum-likelihood (Felsenstein, 1981). Five random taxon 124
addition heuristic searches with Tree Bisection-Recon- 125
nection (TBR) branch swapping were conducted to find 126
an initial maximum-likelihood tree. In these searches, 127
gamma shape parameter, proportion of invariable sites, 128
and nucleotide frequencies were reestimated and the new 129
parameters were used in another series of maximum- 130
likelihood heuristic searches, carried out as above. To 131
compare topologies representing specific phylogenetic 132
hypotheses, constraints were defined, and searches for 133
the maximum-likelihood tree were conducted using the 134
same model and the same heuristic search strategy. 135
Differences between maximum-likelihood values for 136
trees representing alternative hypotheses were evaluated 137
using the test of Kishino and Hasegawa (1989) imple- 138
mented in PAUP*. The resulting tree was drawn using 139
RETREE and DRAWGRAM from PHYLIP (Felsen- 140
stein, 1999). Parsimony analysis was also performed 141
using a test version of PAUP 4.0b7a (Swofford, 2000). In 142
all analyses the gaps were treated as missing data and 10 143
random-addition heuristic searches with TBR branch 144
swapping were conducted to find the smaller tree. To 145
support the inferred tree, bootstrap analyses were car- 146
ried out with 1000 replications. 147

3. Results and discussion 148

Alignment of the near complete 18S rRNA gene se- 149
quences of 23 acanthocephalan species representing 150
classes Archiacanthocephala (with three of four orders: 151
Moniliformida, Gigantorhynchida, and Oligacanthor- 152
hynchida), Eoacanthocephala (with one of two orders: 153

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

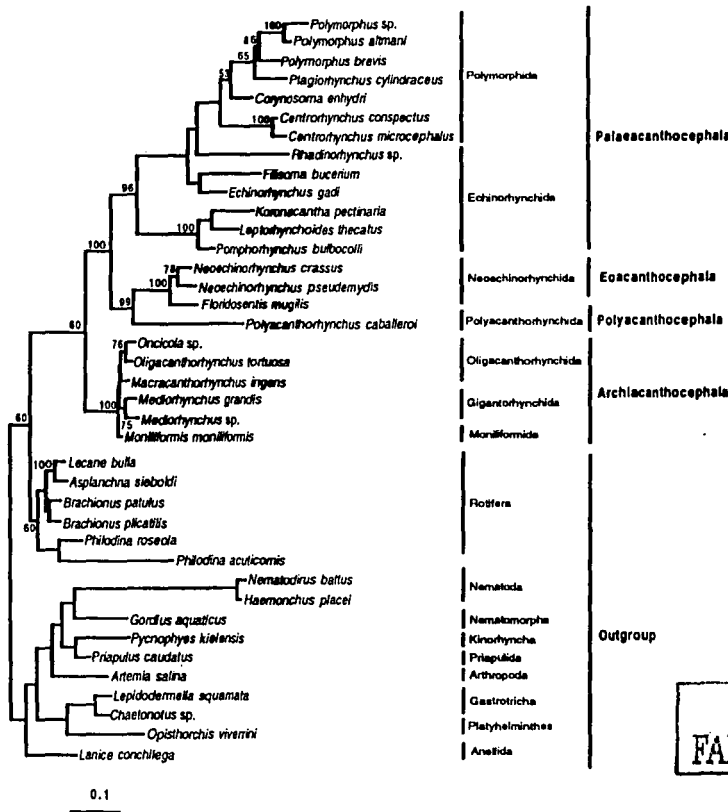


Fig. 1. Single best tree resulting from a maximum-likelihood analysis using our expanded 18S gene sequence data (García-Varela et al., 2000), supplemented with sequences of *Polyacanthorhynchus caballeri* and *Rhadinorhynchus* sp. The $-\ln$ likelihood is 29512.680. Branch lengths are proportional to the inferred amount of nucleotide substitution. Numbers adjacent to branches show the bootstrap values (higher than 50%) from a parallel parsimony analysis. Taxa examined: *Centrorhynchus conspectus* (U4399); *Centrorhynchus microcephalus* (AF064813); *Corynosoma enhydri* (AF001837); *Echinorhynchus gadi* (U88335); *Filisoma bucerium* (AF064814); *Floridosenti mugilis* (AF064811); *Leptorhynchoide thecatus* (AF001840); *Koronacantha pectinaria* (AF092433); *Macracanthorhynchus ingens* (AF001844); *Mediorhynchus* sp. (AF064816); *Mediorhynchus grandis* (AF001843); *Moniliformis moniliformis* (Z19562); *Neoechinorhynchus pseudemydis* (U41400); *Neoechinorhynchus crassus* (AF001842); *Oligacanthorhynchus tortuosa* (AF064817); *Oncicola* sp., (AF064818); *Plagiurhynchus cylindraceus* (AF001839); *Polymorphus* sp. (AF064815); *Polymorphus brevis* (AF064812); *Polymorphus altmani* (AF001838); *Polyacanthorhynchus caballeri* (AF388660); *Pomphorhynchus bulbocollis* (AF001841); *Rhadinorhynchus* sp. (AY062433); *Asplanchna sieboldi* (AF092434); *Brachionus plicatilis* (U29235); *Brachionus patulus* (AF154568); *Lecane bulla* (AF154566); *Philodina acuticornis* (U41281); *Philodina roseola* (AF154567); *Lepidodermella squamata* (U29198); *Chaetonotus* sp. (AJ001735); *Opisthorchis viverrini* (X55357); *Lanice conchilega* (X79873); *Haemonchus placei* (L04154); *Nematodirus vatus* (U01230); *Gordius aquaticus* (X87985); *Priapulits caudatus* (X87984); *Pycnophyes kielensis* (U67997); *Artemia salina* (X01723).

154 Neoechinorhynchida), and Palaecanthocephala (with
155 two of two orders: Echinorhynchida and Polymorphida)
156 plus 16 other outgroup taxa comprised a data set of 39
157 taxa and 2308 sites. The likelihood ratio test indicated
158 that the best model to our data set was the general time
159 reversible model (Rodríguez et al., 1990), with invariable
160 sites (+I) and rate heterogeneity (+G; Yang, 1994). The

proportion of invariable sites = 0.096 and the gamma 161
shape parameter = 0.554. The maximum-likelihood 162
analysis using this model yielded a single best tree with a 163
likelihood score of 29512.680, and all branches were of 164
significantly positive length. The topology of this tree 165
was identical to that obtained in a previous analysis, 166
except for the new branches for *P. caballeri* and 167

168 *Rhadinorhynchus* sp. (García-Varela et al., 2000). The
169 phylum Acanthocephala was monophyletic with Archi-
170 acanthocephala as the most basal class. Polyacantho-
171 cephalia appeared to form a sister group with
172 Eoacanthocephala, separated from Palaeacanthocephala
173 (Fig. 1).

174 To test the support for this hypothesis, new maximum-
175 likelihood analyses were carried out introducing the
176 alternative topologies [((*Rhadinorhynchus* sp., Polyacantho-
177 cephalia) Eoacanthocephala) (Archiacanthocephala)]
178 or [((*Leptorhynchoides thecatus*, Polyacanthocephala)
179 Eoacanthocephala) (Archiacanthocephala)] as con-
180 straints. *Rhadinorhynchus* sp. and *L. thecatus* are mem-
181 bers of the Rhadinorhynchidae family to which
182 Polyacanthocephala was previously assigned (Golvan,
183 1962). In both cases, all searches resulted in the same
184 maximum-likelihood trees (not shown). The $-\ln$ likeli-
185 hood score for the first alternative topology was
186 29804.552, whereas the score for the second was
187 29828.225. Based on the results of the Kishino-Hasegawa
188 test, both alternative topologies are significantly less
189 likely than that shown in Fig. 1. The difference in the $-\ln$
190 likelihood between trees for [((*Rhadinorhynchus* sp.,
191 Polyacanthocephala) Eoacanthocephala) (Archiacantho-
192 cephalia)] is 291.872 (SD = of 34.624, $t = 8.429$,
193 $P < 0.05$). The difference between trees for [((*L. thecatus*,
194 Polyacanthocephala) Eoacanthocephala) (Archiacantho-
195 cephalia)] is 315.544 (SD = of 36.009, $t = 8.762$,
196 $P < 0.05$). Therefore, the hypothesis [((Eoacanthocephala,
197 Polyacanthocephala) Palaeacanthocephala) (Archi-
198 acanthocephala)] is correct. This topology was also
199 supported through a parsimony analysis, which yielded a
200 single tree of 5629 steps long, with a consistency index of
201 0.441. Bootstrap values (higher than 50%) resulting from
202 this analysis are presented on equivalent branches of the
203 tree in Fig. 1. Relationships among classes of Acantho-
204 cephalia were supported by high bootstrap values. Also,
205 the position of *Rhadinorhynchus* sp. and *L. thecatus* within
206 Palaeacanthocephala or the position of *P. caballeroi* as
207 the sister group of Eoacanthocephala were also well
208 supported.

209 Based on morphological characters, the four species
210 of Polyacanthocephala were formerly included in the
211 subfamily Rhadinorhynchidae, within Palaeacantho-
212 cephalia (Golvan, 1962; Petrotschenko, 1956). However,
213 our results based on sequence data showing Polyacantho-
214 cephalia as the sister group of Eoacanthocephala are
215 consistent with the concept that Polyacanthocephala
216 represents a different class within the phylum Acantho-
217 cephalia. Nevertheless, because only one of the two orders
218 of Eoacanthocephala was represented in our study,
219 the possibility that Polyacanthocephala constitutes a
220 new order within Eoacanthocephala cannot be excluded.
221 Additional sequences are required in the analysis to
222 further detail the position of polyacanthocephalans
223 within the phylum.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from
CONACYT, L0042-M9607 (J.P.L.), DGAPA-UNAM
IN-207195 (J.P.L.), PADEP 102324 (M.G.V.), and
Fundación Miguel Alemán, A.C (J.P.L.). M.G.V. is
being supported by scholarships from CONACYT and
DGAPA-UNAM. M.P.C. is funded by grants from the
National Aeronautics and Space Administration, the
National Science Foundation, and the Alfred P. Sloan
Foundation. We thank Patricia de la Torre for technical
assistance during DNA sequencing.

References

- Amin, O.M., 1985. Classification. In: Crompton, D.W.T., Nickol, B.B. (Eds.), *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 27-72.
- Amin, O.M., 1987. Key to the families and subfamilies of Acanthocephala with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida). *J. Parasitol.* 73, 1216-1219.
- Amin, O.M., Desfuli, S.B., 1995. Taxonomic notes on *Polyacanthocephala kenyensis* (Acanthocephala: Polyacanthorhynchidae) from lake Naivasha, Kenya. *J. Parasitol.* 81, 76-79.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 1990. *Invertebrates*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Bullock, W.L., 1969. Morphological features as tool and pitfall in acanthocephalan systematics. In: Schmidt, D.G. (Ed.), *Problems in Systematics of Parasites*. University Park Press, Baltimore, pp. 9-45.
- Clark, R.B., 1979. Radiation of the Metazoa. In: Houses, M.R. (Ed.), *The Origins of Major Invertebrate Groups*. Academic Press, New York, pp. 55-101.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.
- Felsenstein, J., 1999. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package)*, ver. 3.572c. University of Washington, Seattle.
- García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G., De la Torre, P., Cummings, M.P., Sarma, S.S.S., Lacleite, J.P., 2000. Phylogenetic relationships of acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 50, 532-540.
- Golvan, Y.J., 1962. Le phylum des Acanthocephala. (Quatrième note). La classe des Archiacanthocephala (A. Meyer 1931). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 37, 1-72.
- Hyman, L.B., 1951. *The Invertebrates*. Vol III: Pseudocoelomates Groups. McGraw-Hill, New York.
- Kishino, H., Hasegawa, M., 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from sequence data and branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* 29, 170-179.
- Marcus, E., 1958. On the evolution of the animal phyla. *Q. Rev. Biol.* 33, 24-58.
- Near, J.T., Garey, J.R., Nadler, S.A., 1998. Phylogenetic relationships of the acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10, 287-298.
- Petrotschenko, V.I., 1956. Acanthocephala of wild and domestic animals. *Akad. Nauk SSSR* 1.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1988. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 9, 817-818.
- Rodriguez, F., Oliver, J.F., Marin, A., Medina, J.R., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142, 485-501.

224

235

236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

88

- 283 Schmidt, G.D., Canaris, A.G., 1967. Acanthocephala from Kenya
284 with descriptions of two new species. *J. Parasitol.* 53, 634-637.
- 285 Swofford, D., 2000. PAUP 4.0b7a, Phylogenetic Analysis Using
286 Parsimony (and Other Methods). Sinauer, Sunderland, MA.
- 287 Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W:
288 improving the sensitivity of progressive multiple sequence
289 alignment through sequence weighting, position specific gap
290 penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-
291 4680.
- Wallace, R.L., Ricci, C., Melone, G., 1996. A cladistic analysis of
292 pseudocoelomates (aschelminth) morphology. *Invertebr. Biol.* 115,
293 104-112.
- Winnepeninckx, B., Backeljau, T., Mackey, L.Y., Brooks, J.M.,
294 Wachter, D.R., Kumar, S., Garey, J.R., 1995. 18S rRNA data
295 indicate that the Aschelminthes are polyphyletic in origin and consist
296 of at least three distinct clades. *Mol. Biol. Evol.* 12, 1132-1137.
- 297 Yang, Z., 1994. Estimating the patterns of nucleotides substitution. *J.*
298 *Mol. Evol.* 39, 105-111.
- 299
300

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE IV

Phylogenetic Relationships of Archiacanthocephala (Acanthocephala) Based on Gene Sequences of 16S, 5.8S and 18S rRNA, Internal Transcribed Spacers 1 and 2, and COI

Martin Garcia-Varela*, Michael P. Cummings[†] and Juan P. Laclette*

***Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, A.P. 70228, 04510 México D.F., México. [†]The Josephine Bay Paul Center for Comparative Molecular Biology and Evolution, Marine Biological Laboratory, 7 MBL Street, Woods Hole, MA 02543-1015 USA**

Running title: Phylogenetic Relationships of Archiacanthocephala

**Corresponding author:
Dr. Juan Pedro Laclette
Department of Immunology
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
A.P. 70228, 04510 México D.F.
México**

**laclette@servidor.unam.mx
Tel. (525) 622-3844
Fax. (525) 622-3892**

ABSTRACT

Members of the class Archiacanthocephala are endoparasites of terrestrial mammals and birds distributed worldwide. The class comprise four orders: Apororhynchida, Gigantorhynchida, Moniliformida and Oligacanthorhynchida, each with a single family. The classification of Archiacanthocephala is based on morphological and ecological characters. To better understand the phylogenetic relationships among the Archiacanthocephala we examined five species of Archiacanthocephalans that represent three orders (Gigantorhynchida, Moniliformida and Oligacanthorhynchida) and three outgroup species of Rotifera class Monogononta. For these taxa we analysed partial mitochondrial gene sequences for COI and 16S rRNA, the nuclear genes for 5.8S and 18S rRNA including the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2).

The phylogenetic relationships were inferred by maximum-likelihood analysis data for each gene and for the sequences of COI, 16S rRNA and 18S rRNA combined. All analyses yielded Archiacanthocephala as monophyletic. Moniliformida appeared as the most basal order in all analysis except when the 16S data set was used alone. Oligacanthorhynchida is a more derived group within Archiacanthocephala. This is in contrast to proposals placing Oligacanthorhynchida ancestral to Archiacanthocephala and to all Acanthocephala, based on the presence of protonephridia (excretory system). Thus, the presence of protonephridia is a primitive trait that has been conserved in Oligacanthorhynchida and lost in other taxa within Acanthocephala.

Key words: Archiacanthocephala, mitochondrial COI, 16S rRNA, ITS1-5.8S-ITS2, 18S rRNA

INTRODUCTION

Members of the class Archiacanthocephala are parasites of terrestrial mammals and birds, distributed worldwide. The class is divided into four orders: Apororhynchida, Gigantorhynchida, Moniliformida and Oligacanthorhynchida each with a single family. The classification of Archiacanthocephala is based mostly on morphological characters such as the presence of a retractable proboscis (except Apororhynchida, which has a non-retractable proboscis without receptacle), proboscis shape, size of trunk, presence of protonephridia (excretory system; present in Oligacanthorhynchida) and type of definitive host (Bullock, 1969; Amin, 1985). Members of Archiacanthocephala exhibit an indirect life cycle, involving insects, myriapods or other arthropods as intermediate hosts and terrestrial mammals or birds as definitive hosts. Archiacanthocephala species may involve paratenic hosts, such as amphibians, turtles, snakes and lizards. These paratenic hosts may be subsequently eaten by the definitive hosts, which results in their infection (Nickol and Crompton, 1985).

The phylogenetic relationships within Acanthocephala have been controversial. Based on morphological characters, Archiacanthocephala (Haffner, 1950; Golvan, 1959), Eoacanthocephala (Van Cleave, 1948; Petrochenko, 1956), and Palaeacanthocephala (Lang, 1953) have been alternatively proposed as the earliest-emerging class within the phylum. More recent studies based on sequences of 18S rRNA (Near *et al.* 1998; García-Varela *et al.* 2000) suggested that the phylum Acanthocephala is a monophyletic group with three subclades, in agreement with the morphological classification of this group of parasites (Bullock, 1969; Amin, 1985). Studies based on morphological characters and DNA sequence data suggest that Archiacanthocephala is the most basal class in the phylum, and that the classes Palaeacanthocephala and Eoacanthocephala form sister groups (Near *et al.* 1998; García-Varela *et al.* 2000; Monks, 2001). Archiacanthocephala

exhibited a slower rate of evolution at the nucleotide level, as evidenced by shorter branch lengths for genes encoding 18S rRNA (García-Varela *et al.* 2000).

The aim of this study was examine the phylogenetic relationships within of Archiacanthocephala using five species that represent three orders (Oligacanthorhynchida, Gigantorhynchida and Moniliformida) and three species of Rotifera, class Monogononta, as outgroup taxa. In this research we used several different sequence regions including mitochondrial genes, which are inherited independently and evolving more rapidly than nuclear DNA. These include the gene encoding 16S rRNA, and the gene for cytochrome oxidase subunit I (COI), which is reported as one of the most conserved genes in the mitochondrial genome. Both genes have been widely used to resolve phylogenetic relationships among higher level taxa (Brown, 1985; Avise *et al.* 1987). Also included were the nuclear genes for 18S and 5.8S rRNA along with the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). This design also allowed for comparison of the variation among these genomic regions.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Taxa used in this study are listed in Table 1. The specimens of *Mediorhynchus* sp. (Gigantorhynchida), *Oncicola* sp., *Oligacanthorhynchus tortuosa* and *Macracanthorhynchus ingens* (Oligacanthorhynchida) were collected from the digestive tract of their definitive hosts, and the sample of DNA from *Moniliformis moniliformis* (Moniliformida) was provided by D. Mark Welch. The specimens collected were washed three times in saline solution and preserved in ethanol at 4°C. Several specimens were stained with Mayer's paracarmine, mounted in Canada balsam, and identified using conventional morphological criteria. Cultures (2 L) of the rotifers *Brachionus patulus*, *Asplanchna sieboldi* were sieved, repeatedly washed in sterile-distilled water, and

concentrated to 500 μ l.

DNA manipulations

Genomic DNA was extracted from the specimens as previously described (García-Varela *et al.* 2000); the worms and rotifers were placed in a solution containing 200 mM NaOH and 1% SDS and incubated for 2 h at 50°C with 10 mg/ml of proteinase K, followed by standard phenol/chloroform extraction and precipitation with isopropanol (Sambrook *et al.* 1989).

Amplification of mitochondrial genes for 16S, COI and the nuclear 5.8S rRNA including ITS1 and ITS2, were carried out by PCR in 100 μ l reaction mixtures containing about 50 ng of genomic DNA from each species, 200 mM of each dNTP, 10mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 3 mM MgCl₂, 100 pmol of each primer (Table 2), and 5 U of Taq polymerase (GIBCO-BRL). Thermal cycling used an initial denaturation period at 94°C for 3 min, annealing at 50°C (COI and 16S) or 54°C to (ITS1, ITS2 and 5.8S) for 3 min and extension at 72°C for 3 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C (COI and 16S) or 54°C (ITS1, ITS2 and 5.8S) and 1 min at 72°C. Temperature cycling completed with a final extension period of 10 min at 72°C. The PCR products were separated and evaluated by electrophoresis through 1% agarose gels.

The band containing the amplified DNA was excised from the gel and the double-stranded PCR products were isolated using the Wizard PCR purification system (Promega). Both strands of the purified PCR products were sequenced with an Applied Biosystems 310 automatic sequencer using ABI Prism dye terminator sequencing kits and the primers indicated in Table 2. DNA sequences were inspected individually and assembled with the program DNAMAN (Lynnon Biosoff 1994-97). Variation among sequences was confirmed by inspection of sequencer trace curves.

Data analysis

The gene sequences of COI, 16S, 5.8S and 18S rRNA as well as ITS1 and ITS2, of five

acanthocephalans species that represented three orders (Oligacanthorhynchida, Gigantorhynchida and Moniliformida) and tree species of rotifers from Monogononta were aligned with the PILEUP algorithm included in the GCG software package version 7 (Devereux *et al.* 1984), and then manually adjusted. The alignments are available from the corresponding author upon request. The phylogenetic analyses were carried out with PAUP* 4.0b7a (Swofford, 2000). To determine which model of sequences evolution best fit each sequence region, we performed a nested likelihood ratio test (LRT) to compare the fit of the nested GTR (General Time Reversible) family of nucleotide substitution models (Rodríguez *et al.* 1990) using Modeltest program version 3.0 (Posada and Crandall, 1998).

Phylogenetic relationships were inferred using maximum likelihood analyses (Felsenstein, 1981) using model parameters previously determined for each data set. Branch-and-bound searches were performed for each dataset. The robustness of the inferred trees was evaluated using the bootstrap (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates, again with branch-and-bound searches. The figures were prepared, in part with the programs RETREE and DRAWGRAM from PHYLIP (Felsenstein, 1999).

RESULTS

16S rRNA

Fragments of 439 to 494 bp corresponding to the mitochondrial 16S rRNA from five species of Acanthocephala were sequenced. The aligned sequences length was 467 bp and the average GC content of the taxa was 35%. The likelihood ratio test indicated that the model with best fit for these data was the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY; Hasegawa *et al.* 1985) model with rate heterogeneity (+ G; Yang, 1994), a transition/transversion ratio of 1.31 and a gamma shape parameter of 0.66. The maximum likelihood analysis using this model yielded a single best tree with a -ln likelihood of 2570.98. All branches were significantly positive ($p < 0.001$). The tree showed that the class

Archiacanthocephala is a monophyletic group. The most basal order was Gigantorhynchida (*Mediorhynchus* sp.) and therefore the orders Moniliformida (*M. moniliformis*) and Oligacanthorhynchida (*M. ingens*, *Oncicola* sp. and *O. tortuosa*) are more derived (Fig. 1).

COI

This data set consisted of 527 aligned nucleotide positions with an average GC content of 35%. The likelihood ratio test indicated that the model that best fit this data set was the Transition model (TIM; Rodríguez *et al.* 1990), with invariant sites (+ I) and equal rates for all sites (Yang, 1994). The estimated proportion of invariant sites was 0.5267. The maximum likelihood analysis using this model yielded a single best tree with a $-\ln$ likelihood of 3360.95. The topology of this tree had Moniliformida as the most basal order with Gigantorhynchida and Oligacanthorhynchida appearing as derived orders. All branches were significantly positive ($p < 0.001$) with moderate bootstrap values (Fig. 2).

18S nuclear rRNA

This data set consisted of 8 taxa and 1790 aligned nucleotide positions, and was taken from the study of García-Varela *et al.* (2000). The likelihood ratio test indicated that the model with best fit for these data was the Tamura-Nei model (TrN; Tamura and Nei, 1993) with rate heterogeneity (+ G; Yang, 1994). The estimated gamma shape parameter was 0.40. The maximum likelihood analysis using this model yielded a single best tree with a $-\ln$ likelihood of 4914.53. The tree showed that the most basal order was Moniliformida (*M. moniliformis*) and therefore the Gigantorhynchida (*Mediorhynchus* sp.) and Oligacanthorhynchida (*M. ingens*, *Oncicola* sp. and *O. tortuosa*) are more derived. All branches were significantly positive ($p < 0.001$) with high bootstrap values, except for the branch for *Mediorhynchus* sp., which had a bootstrap value of 47% (Fig. 3).

ITS 1-5.8S-ITS 2 nuclear rRNA

Amplification of ITS1-5.8S-ITS2 resulted in products of 678 to 758 bp in length for all taxa,

with the exception of *Mediorhynchus* sp., which had a length of 1198 bp. The data set consisted of 7 taxa and 1214 aligned nucleotide positions with an average GC content of 46%. The likelihood ratio test indicated that the model with best fit was the Transversion model (TVM; Rodríguez *et al.* 1990) with rate heterogeneity (+ G; Yang, 1994). The gamma shape parameter = 0.61 and no invariable sites. The maximum likelihood analysis using this model yielded single best tree with a $-\ln$ likelihood of 8058.49. The tree showed the same topology than the determined for nuclear 18S rRNA. All the branches were significantly positive ($p < 0.001$) with high bootstrap values (Fig. 4).
Combined analysis of COI, 16S mitochondrial rRNA and 18S nuclear rRNA

The three genes comprised a total of 2780 aligned nucleotide position. The likelihood ratio test indicated that the model with best fit for the combined data was the Transversion model (TVM; Rodríguez *et al.* 1990), with invariable sites (+ I) and rate heterogeneity (+ G; Yang, 1994). The estimated gamma shape parameter was 0.48 and the estimated proportion of invariant sites was 0.25. The maximum likelihood analysis using this model yielded a single best tree with a $-\ln$ likelihood of 11440.73. This analysis showed the same topology among orders than those reconstructed with COI, 18S and ITS1-5.8S-ITS2. All branches were significantly positives ($p < 0.001$) with high bootstrap values (Fig. 5).

DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the phylogenetic relationships within Archiacanthocephala using different sequence regions. We used two mitochondrial genes that have been used widely for phylogenetic analysis (Avisé *et al.* 1987): the 16S rRNA and the enzyme COI, because they are inherited independently from nuclear DNA and contain sufficient numbers of highly conserved copies. The 16S rRNA gene is evolving 3.2 times more rapidly than the 18S rRNA nuclear and provided sufficient signal for the establishment of phylogenetic relationships among closely related taxa. The tree obtained from 16S rRNA sequences showed the class

Archiacanthocephala as a monophyletic group, in agreement with recent analyses based on 18S rRNA and on morphological characters (Near *et al.* 1998; Garcia-Varela *et al.* 2000; Monks, 2001). However, the topology within Archiacanthocephala that was supported by low bootstrap values was the only analysis showing Gigantorhynchida (*Mediorhynchus* sp.) as the most basal order within the class (Figure 1).

Analysis based on COI coding sequence, placed Moniliformida as the most basal order within Archiacanthocephala, in agreement with the trees built from 18S RNA, ITS1-5.8S-ITS2 and the combined dataset (Figures 2-5). The rate of nucleotide substitution for COI was 1.1 times faster than for mitochondrial 16S rRNA. However, when the third position of codons in COI were excluded for the comparison, the substitution rate was 1.31 times slower than 16S rRNA. This result indicating that these differences in substitution rates are most likely due to synonymous substitutions at third positions occurring at a higher than substitutions at first and second positions as is commonly noted (e.g., Li, 1997).

The analysis based on the 18S rRNA dataset, also placed Moniliformida as the most basal order within the class. The length of branches in the tree resulting from the 18S rRNA gene sequences reflects the slow rate of nucleotide substitution, however, this tree showed the same topology of that obtained from the ITS1-5.8S-ITS2 dataset (Figure. 3).

Another sequence region used to evaluate phylogenetic relationships within Archiacanthocephala was the segment ITS1-5.8S-ITS2, which evolves more rapidly than 18S and 28S rRNA genes, and has been used to solve phylogenetic relationships among closely related taxa (Hillis and Dixon, 1991). We found that ITS from Archiacanthocephala had a high rate of substitution at the nucleotide level, especially in *Mediorhynchus* sp. with the longest branch within the class. Both ITS regions also exhibited repeat units that are responsible for their length variation. Duplication and insertion of small nucleotide segments is a common trait in ITS from parasites, for

example, repeated fragments have been reported for ITS1 of *Dolichosaccus* (Luton *et al.* 1992) and for ITS2 of *Schistosoma haematobium* (Kane and Rollinson, 1994). The phylogenetic relationships inferred from sequences of ITS1-5.8S-ITS2 were in complete agreement with the trees built using nuclear 18S rRNA and the combined dataset, but showed slight differences to mitochondrial COI and 16S rRNA. Substitution rates of ITS1-5.8S-ITS2 was 1.3 times faster than 16S rRNA, 1.2 times faster than COI and 3.3 times that of 18S rRNA. The higher velocity of variation showed in this segment can be due to fewer functional constraints (Hillis and Dixon, 1991).

The placement of Moniliformida as the most basal order within class Archiacanthocephala was not part of the tree with the highest likelihood based on analysis of the 16S rRNA dataset. Previous studies have demonstrated that using larger datasets gives better results in phylogenetic analysis (Cummings *et al.* 1995; 1999; Otto *et al.* 1996). We performed a phylogenetic analysis based on a combined dataset including three gene regions: mitochondrial COI and 16S rRNA as well as nuclear 18S rRNA. Results of this combined analysis confirmed Moniliformida as the most basal order within Archiacanthocephala.

Although the number of taxa sampled within each order of Archiacanthocephala is still small, the organization within orders, inferred through analysis using separated or combined datasets, are congruent with the traditional classification of this class based on morphological characters (Bullock, 1969; Amin, 1985). Oligacanthorhynchida was the best represented order in this study with three genera (*Oncicola*, *Oligacanthorhynchus* and *Macracanthorhynchus*). A distinctive trait of Oligacanthorhynchida is the excretory system with flame cells. Presence of this protonephridia led to the suggestion that Oligacanthorhynchida was the most basal order within the phylum Acanthocephala, because protonephridia is considered as a primitive trait, shared with free-living members from related phyla such as rotifers (Haffner, 1950; Golvan, 1959). However, our analyses do not support this hypothesis, as Oligacanthorhynchida always occupied a derived position in our

trees. Therefore, presence of protonephridia in Oligacanthorhynchida appears to represent the persistence of a plesiomorphic trait that was secondarily lost in all other Acanthocephala.

This work represents the first study on the phylogenetic relationships within Archiacanthocephala using sequence data. The phylogenetic hypotheses proposed here about the evolutionary history of this class of acanthocephalans is still incomplete until taxa from order Apororhynchida are included. Determination of the relationships between Apororhynchida, with few species of bird parasites, and the orders included here will be the matter of a future study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. de la Torre and A. González-Oliver for their technical assistance. This work was supported in part by grants from DGAPA-UNAM IN-207195 (J. P. L.) PADEP 102324 (M. G. V.) and MGV is being supported by scholarships from CONACYT and DGAPA-UNAM. M.P.C is supported by grants from NASA, NSF and the Alfred P. Sloan Foundation.

REFERENCES

- Amin, O. M. (1985). Classification. In "Biology of the Acanthocephala". (D. W. T Crompton, and B. B. Nickol, Eds.), pp. 27-72. Cambridge University Press, Cambridge.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lam, b. T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., and Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.
- Brown, W. M. (1985). The mitochondrial genome of animals. In "Molecular Evolutionary Genetics" (R. J. MacIntyre, Ed.), pp. 95-130. Plenum, New York.

- Bullock, W. L. (1969). Morphological features as tool and pitfall in acanthocephalan systematics. *In* "Problems in Systematics of Parasites" (D. G. Schmidt, Ed.), pp. 9-45. University Park Press, Baltimore.
- Cummings, M. P., Otto, S. P., and Wakeley, J. (1995). Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 814-822.
- Cummings, M. P., Otto, S. P., and Wakeley, J. (1999). Genes and other samples of DNA sequence data for phylogenetic inference. *Biol. Bull.* **196**: 345-350.
- Devereux, J. R., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the Vax. *Nucleic Acids Res.* **12**: 387-395.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.
- Felsenstein, J. (1999). PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.572c. University of Washington, Seattle.
- García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G., De la Torre, P., Cummings, M. P., Sarma, S. S. S., and Laclette, J. P. (2000). Phylogenetic relationships of acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* **50**: 532-540.
- Golvan, Y. J. (1959). Protonephridies et taxonomie des acanthocéphales. *Proc. 15th London Int. Congr. Zool.* 960.
- Haffner, K. (1950). Organisation und systematische stellung der Acanthocephala. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **145**: 245-274.

- Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**: 160-174.
- Hillis, D. M., and Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetics inference. *Q. Rev. Biol.* **66**: 411-453.
- Kane, R. A., and Rollinson, D. (1994). Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal spacers of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalum* and *Schistosoma materni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **63**: 153-156.
- Lang, K. (1953). Die entwicklung des eies von *Priapulidus caudatus* lam und die systemische stellung der priapuliden. *Arku. Zoo.* **5**: 321-348.
- Li, W. H. (1997). "Molecular evolution". Sinauer, Sunderland, MA.
- Luton, K., Walker, D., and Blair, D. (1992). Comparison of ribosomal internal transcribed spacer from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda:Digenea). *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**: 323-328.
- Monks, S. (2001). Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters. *Syst. Parasitol.* **48**: 81-116.
- Near, J. T., Garey, J. R., and Nadler, S. A. (1998). Phylogenetic relationships of the acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **10**: 287-298.
- Nickol, B. B., and Crompton, D. W. T. (1985). "Biology of the Acanthocephala". Cambridge University Press, London.
- Otto, S. P., Cummings, M. P., and Wakeley, J. (1996). Inferring phylogenies from DNA sequence data the effects of sampling. In "New Uses for New Phylogenies". (P. H. Harvey, A. J. Leigh Brown, J. Maynard Smith, and S. Nee, Eds.), pp. 103-115. Oxford University Press, Oxford.
- Palumbi, S. R. (1996). Nuclei acids II: The polymerase chain reaction. In "Molecular Systematic"

- (D. H. Hillis, C. Moritz and B. K. Mable, Eds.), 2nd ed., pp 205-247. Sinauer, Sunderland, MA.
- Posada, D., and Crandall, K. A. (1988). Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatic*. **9**: 817-818.
- Petrochenko, V. I. (1956). "Acanthocephala of Wild and Domestic Animals". Vol. 1, Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow.
- Rodríguez, F., Oliver, J. F., Marin, A., and Medina, J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**: 485-501.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, NY.
- Swofford, D. (2000). PAUP* 4.0b5a, *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 512-526.
- Van Cleave, H. J. (1948). Expanding horizons in the recognition of a phylum. *J. Parasitol.* **34**: 1-20.
- Yang, Z. (1994). Estimating the patterns of nucleotides substitution. *J. Mol. Evol.* **39**: 105-111.

LEGENDS

FIG. 1. Maximum likelihood tree based on DNA sequence of the mitochondrial gene for 16S rRNA. The $-\ln$ likelihood is 2570.98. Branch lengths are proportional to the inferred amount of nucleotide substitution and numbers adjacent branches indicate percentages of 1000 bootstrap replicates supporting the partition.

FIG. 2. Maximum likelihood tree based on DNA sequence of all the positions of the mitochondrial COI. The $-\ln$ likelihood is 3360.95. Branch lengths are proportional to the inferred amount of nucleotide substitution and numbers adjacent branches indicate percentages of 1000 bootstrap replicates supporting the partition.

FIG. 3. Maximum likelihood tree based on DNA sequence of 18S nuclear rRNA. The $-\ln$ likelihood is 4914.53. Branch lengths are proportional to the inferred amount of nucleotide substitution and numbers adjacent branches indicate percentages of 1000 bootstrap replicates supporting the partition.

FIG. 4. Maximum likelihood tree based on DNA sequence of ITS 1, 5.8S and ITS 2 rRNA. The $-\ln$ likelihood is 8058.49. Branch lengths are proportional to the inferred amount of nucleotide substitution and numbers adjacent branches indicate percentages of 1000 bootstrap replicates supporting the partition.

FIG. 5. Maximum likelihood tree based on DNA sequence of combined mitochondria COI, 16S mitochondrial rRNA and 18S nuclear rRNA. The $-\ln$ likelihood is 11440.73. Branch lengths are proportional to the inferred amount of nucleotide substitution and numbers adjacent branches indicate percentages of 1000 bootstrap replicates supporting the partition.

Table 1. Taxa Examined.

Taxon name	18S RNA Length (bp), G + C (%)	Accession. No.	ITS Length (bp), G + C (%)	Accession No.	COI Length (bp), G + C (%)	Accession No.	16S RNA, Length (bp), G + C (%)	Accession No.	host
Acanthocephala									
<i>Macracanthorhynchus ingens</i>	1765, 45	AF001844	719, 42	AF416414	524, 38	AF416997	445, 37	AF325129	<i>Procyon lotor</i>
<i>Mediorhynchus</i> sp.	1758, 45	AF064816	1198, 52	AF416413	524, 36	AF416996	443, 34	AF325130	<i>Casidix mexicanus</i>
<i>Moniliformis moniliformis</i>	1769, 45	Z19562	705, 38	AF416415	524, 40	AF416998	403, 36	AF108107	<i>Rattus rattus</i>
<i>Oligacanthorhynchus tortuosa</i>	1767, 45	AF064817	700, 38	AF416417	524, 39	AF416999	445, 34	AF325128	<i>Didelphis virginiana</i>
<i>Oncicola</i> sp.	1755, 45	AF064818	678, 35	AF416416	524, 39	AF417000	439, 43	AF325127	<i>Nasua narica</i>
Rotifera									
<i>Brachionus patulus</i>	1745, 45	AF154568	685, 40	AF416412	527, 37	AF416995	481, 30	AF325132	Free-living
<i>Brachionus plicatilis</i>	1736, 47	U29235			653, 42	AF266935	448, 30	AF108106	Free-living
<i>Asplanchna sieboldi</i>	1728,46	AFO92434	758, 39	AF416411	524, 33	AF416994	494, 32	AF325131	Free-living

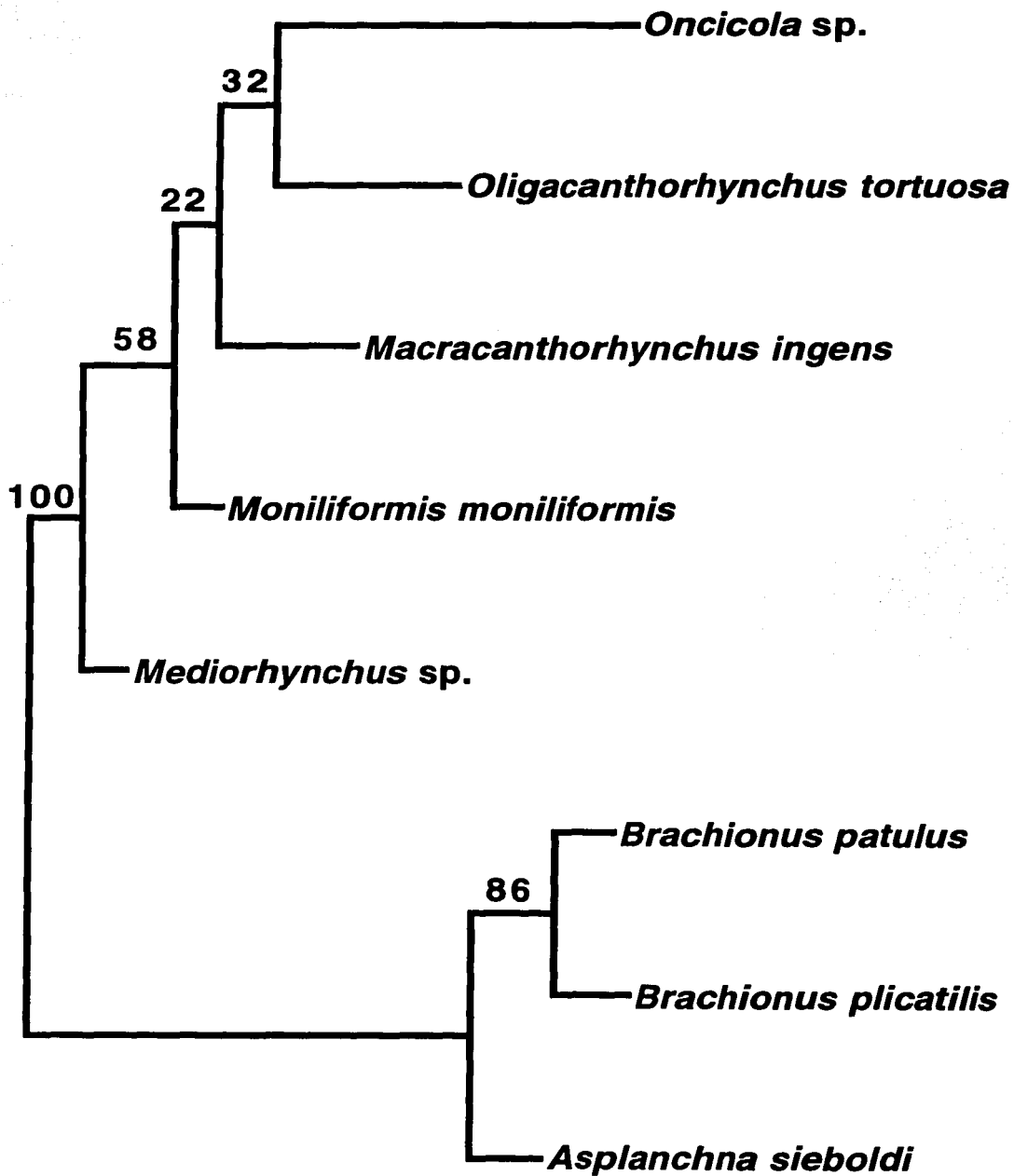
Table 2. Sequencing (S) and amplification (A) primers used in this study.

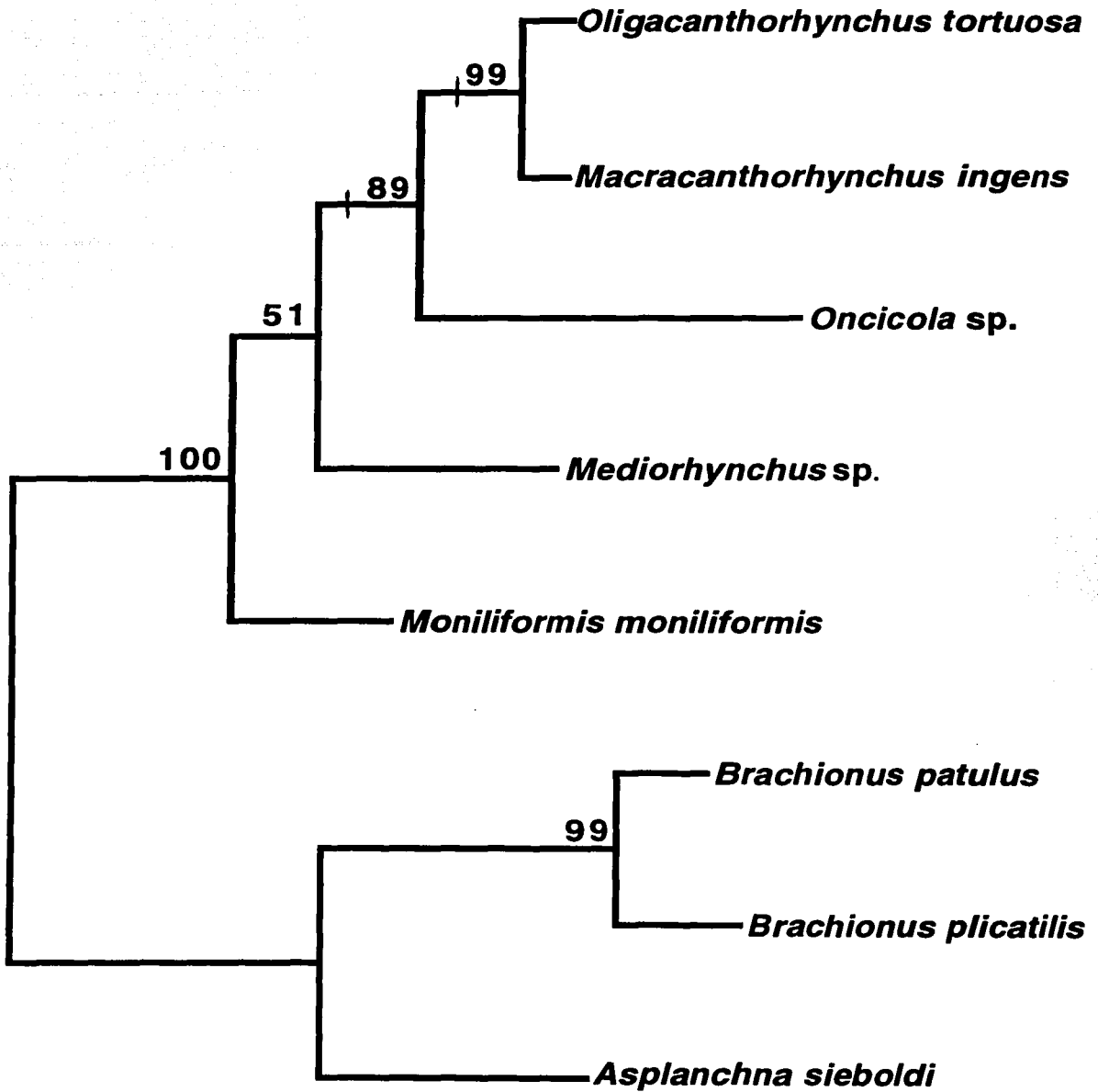
Name	Sequences	Strand	Use
16S rRNA			
LRN ^a	5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'	Light	A, S
LRJ ^a	5' CTCCGGTTTGAACTCAGATCA 3'	Heavy	A, S
COI			
CIN ^b	5' CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC 3'	Light	A, S
CIJ ^b	5' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3'	Heavy	A, S
ITS1-5.8S-ITS2 nuclear rRNA			
BD1 ^c	5' GTCGTAACAAGGTTTCCGTA 3'	Forward	A, S
BD2 ^c	5' TATGCTAAATTCAGCGGGT 3'	Reverse	A, S

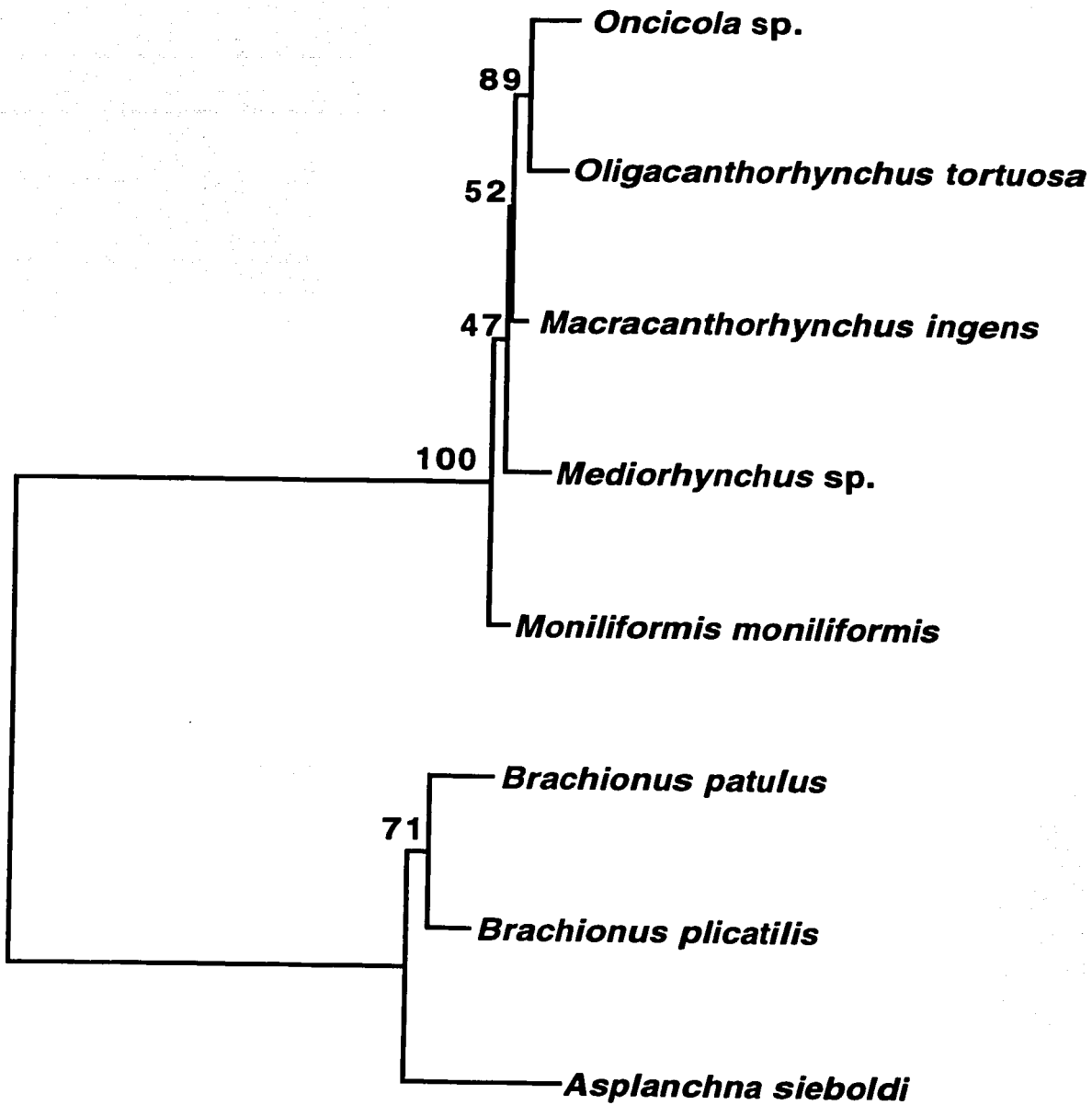
^a Palumbi (1996).

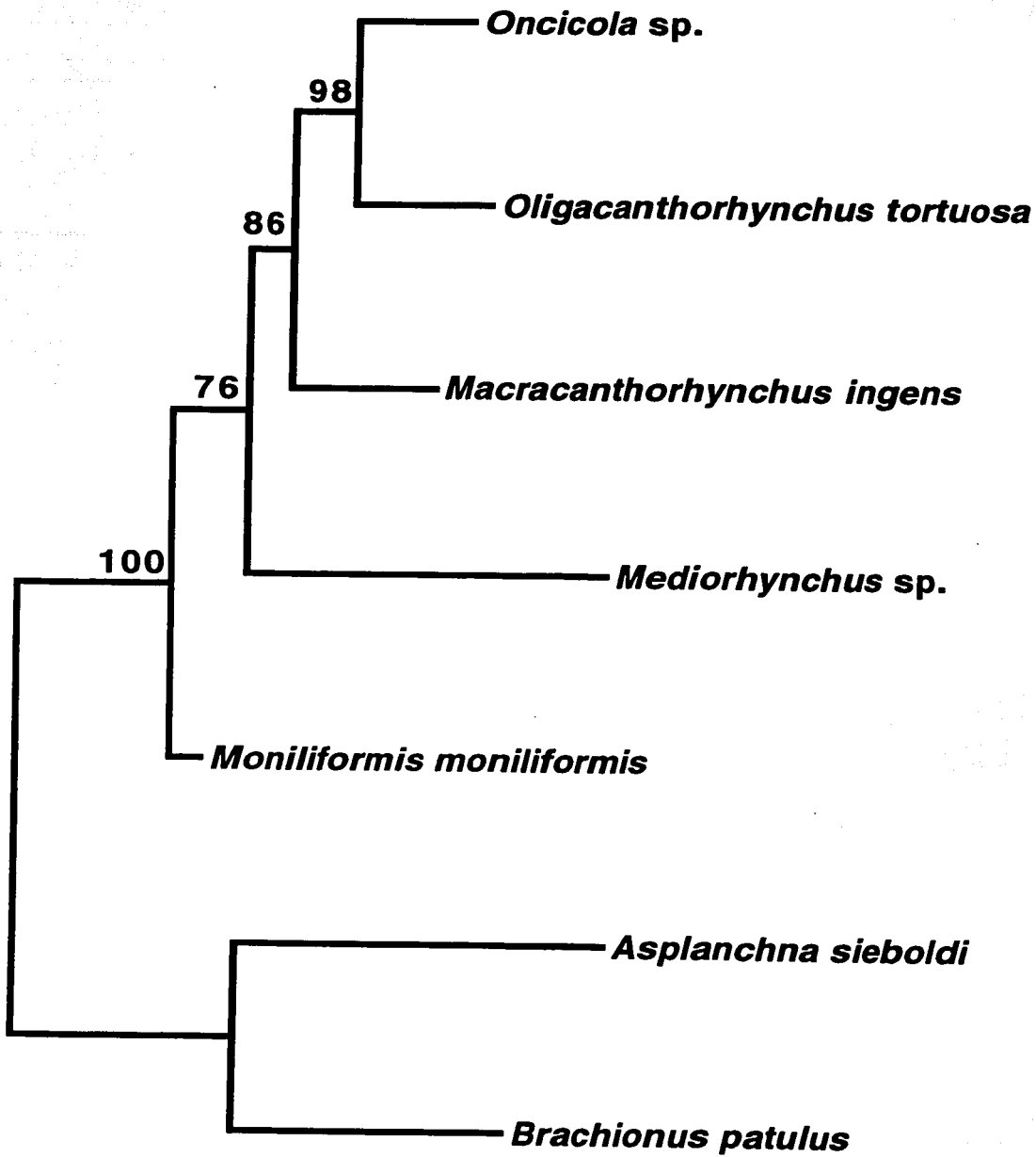
^b Palumbi (1996).

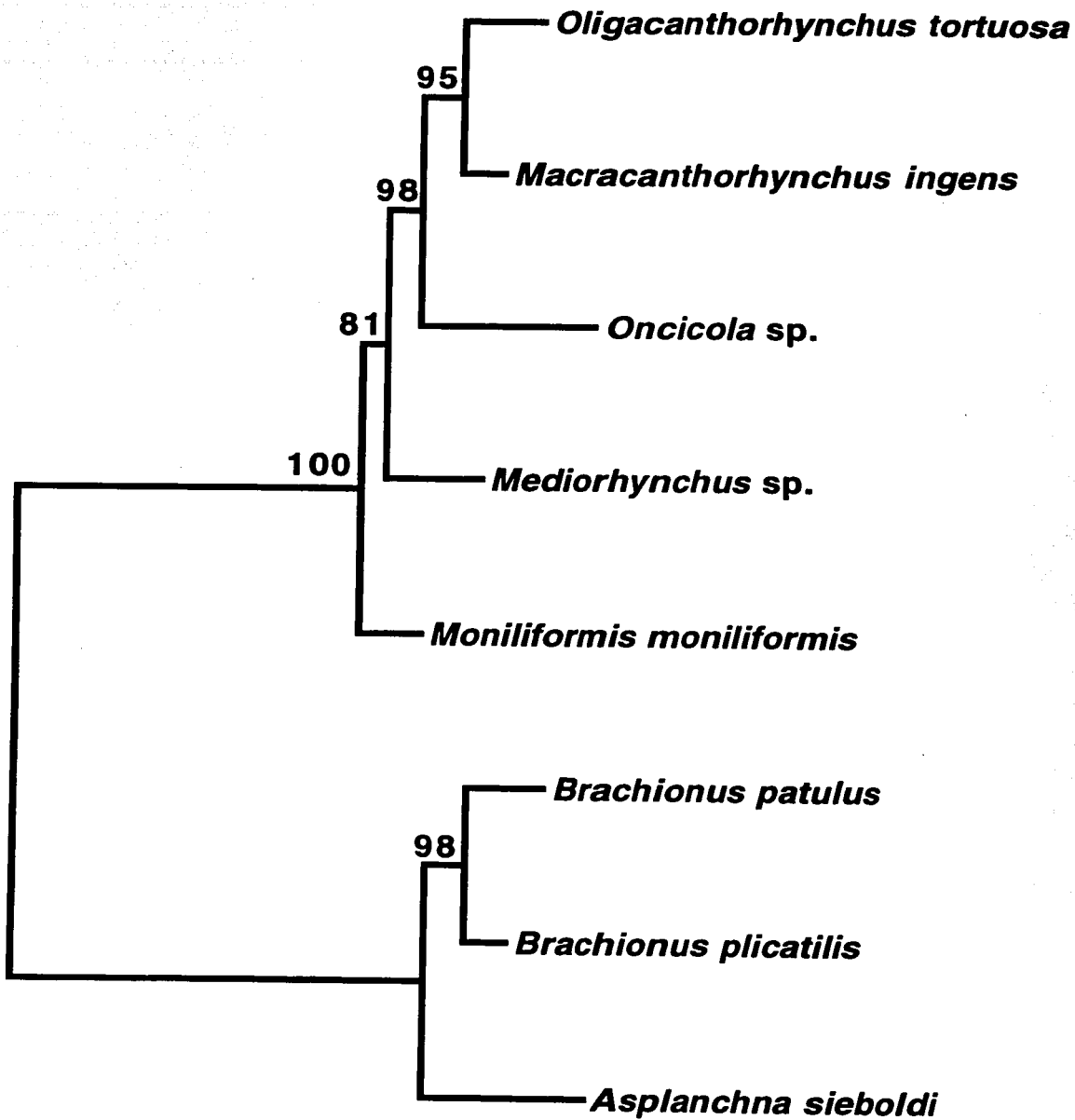
^c Luton *et al.* (1992).











APÉNDICE V

Molecular phylogeny of the genus *Corynosoma* (Acanthocephala) using sequences of 5.8S ribosomal RNA genes and internal spacer regions ITS 1 and ITS 2.

M. García-Varela¹, G. Pérez-Ponce de León², F. J. Aznar³, D. Piñero⁴ and J. P. Lacleste¹

¹Dept. of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, A.P. 70228, 04510 México D.F., México

²Dept. of Zoology, Instituto de Biología, UNAM, A.P. 70228, 04510 México D.F., México

³Dept. of Animal Biology and Cavanilles Research Institute of Biodiversity and Evolutionary Biology, University of Valencia, Burjasot, Valencia, Spain.

⁴Dept. of Evolutionary Ecology, Instituto de Ecología, UNAM, A.P. 70228, 04510 México D.F., México

Corresponding author:
Dr. Juan Pedro Lacleste
Dept. of Immunology,
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM,
A.P. 70228, 04510 México D.F.
México
Tel. (525) 622-3844
Fax. (525) 622-3892
E-mail: lacleste@servidor.unam.mx

Abstract

Members of the genus *Corynosoma* (Acanthocephala) are parasites inhabiting the digestive tract of marine mammals and sea birds. Their generic classification is based on morphological characters such as the size and number of hooks in the proboscis, and the number of spines in the dorsal and ventral regions of the body. We evaluated the phylogenetic relationships of 10 nominal species of *Corynosoma*, through analysis of internal transcribed spacer sequences (ITS 1, ITS 2) and of 5.8S ribosomal RNA. Maximum likelihood analysis indicated that *Corynosoma* is a monophyletic group. *C. cetaceum* was placed as the most basal species. The tree yielded several clades, one including 2 species (*C. australe* and *C. bullosum*), other included (*C. validum* and *C. villosum*), other clade include just *C. caspicum*, which was the sister species to the clade formed by *C. alaskensis*, *C. hamanni*, *C. enhydri* and *C. strumosum*. Maximum parsimony analyses showed the same topology, except for the polytomy, which included *C. alaskensis* and *C. hamanni*. The nucleotide variation among the species of *Corynosoma* had a range of 0.6 to 4 % for ITS (except to *C. cetaceum* which had a variation of 10 to 11% with respect other members of the genus *Corynosoma*). *C. cetaceum* had a high rate of substitution at the nucleotide level, as evidence it shows longest branch.

Introduction

Corynosoma constitutes one of the most diverse genus within acanthocephalans, including 38 species distributed worldwide, which are parasites of marine mammals and sea birds (Golvan, 1994). Species of *Corynosoma* are small to medium sized organisms with spines in the dorsal/ventral regions of the body with a proboscis armed of 14-28 longitudinal rows of 8-18 hooks each. Variation in these morphological traits is used to establish species differentiation. Members of the genus *Corynosoma* exhibit an indirect life cycle, involving a crustacean (amphipod or isopod) as intermediate host and a marine mammal or sea bird as definitive host (Nickol, 1985). Several species of *Corynosoma* involve paratenic hosts, e.g. fish of the family Nototheniidae (Moser & Cowen, 1991; Zdzitowiecki & Zadrony, 1999), that feed upon infected intermediate hosts and are eaten by the definitive host (Nickol, 1985).

Ribosomal DNA (rDNA) can be used as molecular marker for examination of phylogenetic relationships and identification of species (Hillis & Dixon, 1991). As in other eukaryotes, the rDNA of acanthocephalans contains tandemly repeated transcriptional units, which are separated by intergenic spacers. Within each transcriptional unit, both internal transcribed spacers separate the 18S small subunit (18S rDNA) from the 5.8S and the 28S large subunit (28S rDNA). The coding regions show small sequence divergence among closely related species, whereas the internal transcribed spacer regions ITS 1 and ITS 2 may exhibit high variability. The fast rate of evolution of both spacers allows using them as molecular markers for the study of relationships among closely related species. Moreover, the ITS 1 and ITS 2 regions are small (800-1200 bp), with highly conserved regions in the contiguous coding sequences that facilitate amplification by PCR (Lee & Taylor, 1991;

Baldwin, 1992; Pleyte *et al.* 1992). ITS 1 in Digenea showed considerable interspecific variation between congeneric species (Luton *et al.* 1992) and have successfully been used to discriminate among species of *Schistosoma* (Després *et al.* 1992; Bowles *et al.* 1995). ITS 2 has also been compared across species of fasciolids (Adlar *et al.* 1993). Moreover ITS 1, ITS 2, as well as 5.8S ribosomal genes have been used to differentiate between species of *Echinostoma* (Morgan & Blair, 1995). These and other studies have shown that internal transcribed spacers can be sensitive indicators for the discrimination of closely related species.

The aim of this study was to investigate the phylogenetic relationships of 10 *Corynosoma* species, through analysis of ITS 1, ITS 2 and 5.8S ribosomal RNA (rRNA).

Materials and methods

Samples

Taxa used in this study are listed in Table 1. Adult acanthocephalans were collected from the digestive tract of their definitive hosts. The specimens collected were washed three times in saline solution and preserved in ethanol at 4°C. Several specimens were stained with Mayer's paracarmine, mounted in Canada balsam and identified using conventional morphological criteria.

DNA isolation and purification

Genomic DNA was extracted from individual specimens of acanthocephalans as described previously (García-Varela *et al.* 2000); the worms were placed in a solution containing 200 mM NaOH, 1% SDS and incubated for 2 h at 50°C with 10 mg/ml of proteinase K, followed by standard phenol/chloroform extraction and precipitation with isopropanol.

PCR amplification and sequencing of DNA

Amplification of ITS 1, 5.8S and ITS 2 was carried out by PCR in 100 µl of reaction mixture containing about 10-50 ng of genomic DNA from each species, 200 mM of each dNTP, 10mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 3 mM MgCl₂, 100 pmol of each primer: (forward primer 5'- GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3' and reverse 5'- ATACGAATTTAAGTCGCCCA-3' (Morgan & Blair, 1995), and 5 U of Taq polymerase (GIBCO-BRL). Thermal cycling used an initial denaturation period at 94°C for 3 min, annealing at 54°C for 3 min and extension at 72°C for 3 min, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 54°C and 1 min at 72°C, and was completed with a final extension

period of 10 min at 72°C. PCR fragments were examined by 1% agarose gel electrophoresis and purified by adsorption to glass powder and resuspended in 20 µl of sterile-distilled water (Vogelstein & Gillespie, 1979). PCR products were cloned into pMosblue vector following the instructions from the manufacturer (Amersham International p/c). Colonies that were positive by blue/white selection were screened for PCR. Three clones positives from each species containing insert were sequencing in both directions using two universal primers with the Applied Biosystems 310 automatic sequence, using ABI Prism dye terminator sequencing kits. DNA sequences were inspected individually and assembled with the program DNAMAN (Lynnon Biosoff 1994-97).

Alignment of sequences and phylogenetic analysis

Sequences of 10 species of *Corynosoma* and two species of the genus *Polymorphus* that were used as outgroup, were aligned using Clustal W (Thompson *et al.* 1994), followed by manual adjust (Fig. 1). Phylogenetic relationships were inferred by maximum likelihood method using PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002), to determine which model of evolution best fitted by the data set, we performed a nested likelihood ratio test (LRT) to compare the fit of the nested GTR (General Time Reversible) family of nucleotide substitution models (Rodríguez *et al.* 1990), using Modeltest program version 3.0 (Posada & Crandall, 1998). After the evolution model was determined, heuristic searches were performed to find the best maximum likelihood tree. The robustness of the inferred tree was evaluated using bootstrap of 1000 replicates (Felsenstein, 1981). Maximum parsimony analyses also were carried out using a test version of PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). In the analysis the gaps were treated as missing data and the branch-and-bound algorithm was utilized to inferred

trees. The robustness of resulting trees were evaluated using 1000 replicates of bootstrap. Figures were prepared, in part using the programs RETREE and DRAWGRAM from PHYLIP (Felsenstein, 1999).

Results

The complete ITS 1, ITS 2 and 5.8S rRNA as well as a 5' stretch of the large subunit rRNA were PCR amplified, cloned and sequenced for 10 species of *Corynosoma* and two species of *Polymorphus*, used as outgroup (Table 1). The total length of ITS 1, 5.8S and ITS 2 varied from 837 bp (several species) to 862 bp (*C. cetaceum*). ITS 1 contains 191 sites constant, 196 sites were used for maximum likelihood and the parsimony method only 58 sites were informative. ITS 2 contains 169 constant sites with 198 informative for maximum likelihood. To parsimony 60 sites were informative. The G+C contents varied from 46% to 48% in ITS1, 39% to 47% in ITS2, and 44 to 48%, in 5.8S. The total GC contents varied from 44% to 48%.

Sequence alignment and phylogenetic analysis

The data set consisted of 12 taxa and 926 aligned nucleotide positions. The likelihood ratio test indicated that the model with best fit for the data set was the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY; Hasegawa *et al.* 1985) model with a heterogeneity rate: (+G; Yang, 1994), a transition/transversion ratio of 1.94, and with a gamma shape parameter of 1.57. Maximum likelihood analysis using this model yielded a single best tree with a -ln likelihood of 3513.47. The tree showed that *Corynosoma* is a monophyletic group. *C. cetaceum* appeared was placed as the most basal species in the tree. The tree yielded several clades, one

including 2 species (*C. australe* and *C. bullosum*), other included (*C. validum* and *C. villosum*) other clade include just *C. caspicum* which was the sister species to the clade formed by *C. alaskensis*, *C. hamanni*, *C. enhydri* and *C. strumosum* (Fig. 2).

The alignment also contained 125 informative sites for the maximum parsimony method. This analysis yielded 3 trees of 579 steps long with a consistency index of 0.919. The 3 cladograms differed in their placement of *C. alaskensis*, which either clustered with *C. enhydri* and *C. strumosum* or formed a sister species with *C. hamanni*. The consensus tree using 50% majority rule (Fig. 3), had the same topology than the tree built through maximum likelihood, except for the polytomy which included *C. alaskensis* and *C. hamanni*.

Discussion

The sequences of 10 species of *Corynosoma* reported here, differed in size and GC content with respect to other groups of helminths, i. e., some species of Platyhelminthes show several repeated segments of 100 and 50 bp in the ITS 1 and ITS2, respectively (Luton, *et al.* 1992; Kane & Rollinson, 1993; Morgan & Blair, 1995). Repeats of this nature were not found in *Corynosoma*, however the function of these repeating units is unknown. The GC content found in *Corynosoma* species was also different from other groups of Platyhelminthes. Variation in size and GC content of ITS1 and ITS2 among groups might be due to a faster rate of change occurring in these non-coding regions.

The nucleotide variation among the species of *Corynosoma* had a range of 0.6 to 4 % for ITS (except to *C. cetaceum* which had a variation of 10 to 11% with respect other members of the genus *Corynosoma*, as evidence *C. cetaceum* had longest branch), however the level of variation seems to be adequate in congeneric species. For example: variation between ITS of *S. haematobium* and *S. intercalatum* is 0.9% (Kane & Rolliston, 1993), whereas *Echinostoma* species show 1.1 to 3.7% variation (Morgan & Blair, 1995). In contrast, nucleotide variation among genus *Corynosoma* and *Polymorphus* sp. or *P. brevis* was, 38% and 46%, respectively.

C. cetaceum was the most basal species in maximum likelihood and maximum parsimony analyses (Figs.2 and 3). The diagnosis of *C. cetaceum* has been controversial when considering morphological traits, as it has been proposed to be a synonymy of *Polymorphus arctocephali* (Smales, 1986), although a new study suggested that *Polymorphus arctocephali* Smales, 1986 is synonym of *Corynosoma cetaceum* (Aznar, 1999). *C. cetaceum* has been found in the stomach of cetacean from Southern Hemisphere,

this habitat is unusual to acanthocephalans, due that all the adults acanthocephalans parasites the intestine of their definitive hosts (Aznar *et al.* 1994, 2001).

Maximum likelihood and maximum parsimony trees showed the same relationships to the clade, composed by *C. australe* and *C. bullosum*, this species has been recorded in *Mirounga leonine*, *Phalacrocorax atriceps* and *Lobodon carcinophaga* from, Antarctica. Whereas *C. australe* has been found in phocids and otariids from South Australia, South Africa, Antarctica and South America (Zdzitowiecki, 1989). The relationship among *C. validum* and *C. villosum* also is congruent, due that both species are associate to phocids from North Pacific (Shults, 1982). *C. caspicum* is endemic species from Caspian sea associate to *Phoca caspica*.

The species *C. alaskensis* and *C. hamanni* were included in a clade them have been found in *Enhydra lutris* and phocids from North Pacific respectively, whereas *C. enhydri* only has been recorded in *Enhydra lutris* from North Pacific. *C. strumosum* has been recorded in phocids, otariids, and not marine mammals, eagles, including human, although it represent only an accidental infection (Schmidt, 1971; Richardson & Cole, 1997; Hoberg *et al.* 1997). The wide numbers of hosts used by *C. strumosum* and other species of *Corynosoma* could be due that the cystacanths (larval stage), parasite several fishes, which are preys of different definitive hosts.

The sequences from internal spacer ITS 1, ITS 2 and the region coding 5.8S ribosomal RNA, displayed sufficient variation to discriminate among 8 nominal *Corynosoma* species investigated here. *C. hamanni* and *C. alaskensis* could not be differentiated using maximum parsimony method. However relationships among these species were resolved when used maximum likelihood method, although showed short

branches as result of a recent divergence or by low nucleotide substitution rates among the species.

Our study represents the first attempt to determine the phylogenetic relationships among congeneric species of acanthocephalans using this region of nuclear DNA as molecular markers. The phylogenetic hypothesis proposed here, still provide partial evidence about genus *Corynosoma*; inclusion of more sequences is necessary for a better understanding on the evolutionary history of these parasites.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from CONACYT, LOO42-M9607 (J. P. L.), PADEP 102327 (M. G. V.) and 2676 PN (G. P. P. L.), from DGAPA-UNAM IN-207195 (J. P. L.) and IN201396 (G. P. P. L.), DGES PB96-0801 and 1FD97-1147 (F. J. A.). MG V is being supported by scholarships from CONACYT and DGAPA-UNAM. F.J. Aznar benefits from a post-doctoral contract of the M.E.C. of Spain. Mihail Yurakhno, Albert Shostack, Enrique Crespo and Anindo Choudhury kindly provided specimens of *Corynosoma*. We also thank Patricia de la Torre for her technical assistance.

References

- Aldar, R.D., Barker, S.C., Blair, D. & Cribb, T.H. (1993) Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *International Journal of Parasitology*, **23**, 423-425.
- Aznar, F.J., Balbuena J.A. & Raga, J.A. (1994) Helminth communities of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinean waters. *Canadian Journal of Zoology*, **72**, 702-706.
- Aznar, F.J., Bush J. & Raga, J.A. (1999). *Polymorphus arctocephali* Smales, 1986, a synonym of *Corynosoma cetaceum* Johnston & Best 1942 (Acanthocephala: Polymorphidae). *Systematic Parasitology*, **44**, 59-70.
- Aznar, F.J., Bush A.O., Balbuena J.A. & Raga J.A. (2001) *Corynosoma cetaceum* in the stomach of franciscanas, *Pontoporia blainvillei* (cetacea): an exceptional case of habitat selection by an acanthocephala. *Journal of Parasitology*, **87**:536-541.
- Baldwin, B.G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **1**, 3-16.
- Bowles, J., Blair, D. & Mcmanus, D.P. (1995) A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **4**, 103-109.
- Després, L., Imbert-Establet, D., Combes, C. & Bonhomme, F. (1992) Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiations of schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **1**, 295-304.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, **17**, 368-376.

Felsenstein, J. (1999) PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.572. University of Washington, Seattle.

García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G., De la Torre, P., Cummings, M.P., Sarma, S.S.S. & Lacleste, J.P. (2000) Phylogenetic relationships of acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **50**, 532-540.

Golvan, Y. J. (1994) Nomenclature of the Acanthocephala. *Research and Reviews in Parasitology*, **54**, 135-205.

Hasegawa, M., Kishino, H & Yano, T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 160-174.

Hillis, D.M. & Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetics inference. *Quarterly Review of Biology*, **66**, 411-453.

Hoberg, E.P., Henny, C.J., Hedstrom, O.R. & Grove, R.A. (1997) Intestinal helminths of river otters (*Lutra canadensis*) from the Pacific northwest. *Parasitology*, **83**, 105-108.

Kane, R.A. & Rollinson, D. (1993) Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal spacers of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalum* and *Schistosoma matterni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **63**, 153-156.

Lee, S.B. & Taylor, J.W. (1991) Phylogeny of five fungal-like protocystan phytophthora species inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*, **8**, 620-640.

Luton, K., Walked, D. & Blair, D. (1992) Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology*, **56**, 323-328.

- Morgan, T.A.J. & Blair, D. (1995) Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology*, **111**, 609-615.
- Moser, M. & Cowen, R.K. (1991) The effects of periodic eutrophication on parasitism and stock identification of *Trematomus bernacchii* (Pisces: Nototheniidae) in McMurdo Sound, Antarctica. *Journal of Parasitology*, **4**, 551-556.
- Nickol, B.B (1985) *Biology of Acanthocephala*. Cambridge: Cambridge University Press. 307 pp.
- Pleyte, K.A., Duncan, S.D. & Philips, R.B. (1992) Evolutionary relationships of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **1**, 223-230.
- Posada, D & Crandall, K.A. (1988) Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **9**, 817-818.
- Richardson, D.J. & Cole, R.A. (1997) Acanthocephala of the bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) in North America. *Journal of Parasitology*, **83**, 540-541.
- Rodríguez, F., Oliver, J.F., Marin, A. & Medina, J.R. (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal Theoretical Biology*, **142**, 817-818.
- Smales, L. R (1986) Polymorphidae (Acanthocephala) from Australian mammals with description of two new species. *Systematic Parasitology*, **8**, 91-100.
- Schmidt G.D. (1971) Acanthocephala infection of man with two new records. *Journal of Parasitology*, **57**, 582-584.
- Shults, L.M. (1982) Helminths of the spotted seal, *Phoca largha*, from the Bering Sea.

Journal Wile Disease, **18**, 59-62.

Swofford, D. L. (2002) PAUP 4.0b10 Phylogenetic analysis using parsimony (and others methods). Sinauer Associate, Sunderland, MA.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.

Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**, 615-619.

Yang, Z. (1994). Estimating the patters of nucleotides substitution. *Journal of Molecular Evolution*, **39**, 105-111.

Zdzitowiecki, K. (1989) New data on the morphology and distribution of two acanthocephalans, *Andracantha baylisi* (Zdzitowiecki, 1986) comb. n. and *Corynosoma australe* Johnston 1937. *Acta Parasitologica Polonia*, **34**, 167-172.

Zdzitowiecki, K. & Zadrony, T. (1999) Endoparasitic worms of *Harpagifer antarcticus* Nybelin, 1947 of the South Shetland Islands (Antarctic). *Acta Parasitologica*, **44**, 125-130.

Legends to figures

Fig. 1. Alignment of 10 *Corynosoma* species and two outgroups. ITS 1, 5.8S and ITS 2. (5' to 3'). Dot (.) indicates identities with sequence on top; hyphen (-) indicates alignment gaps.

Fig. 2. Maximum likelihood tree based on DNA sequences of ITS 1, ITS 2 and 5.8S rRNA. The $-\ln$ likelihood was 3513.47. Branch lengths are proportional to the inferred amount of nucleotide substitution; numbers adjacent to branches indicate percentage of 1000 replicates of bootstrap.

Fig. 3. Consensus tree from the analysis of maximum parsimony. Numbers adjacent to branches indicate percentage of 1000 replicates of bootstrap.