



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Determinación taxonómica de *Profilicollis altmani*
Perry, 1942 y *Southwellina hispida* Van Cleave,
1918 (Polymorphidae Mayer, 1933) usando
evidencia morfológica y molecular**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

VIOLETA QUINTERO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
MÉXICO, D. F. 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno	
Apellido paterno	Quintero
Apellido materno	Martínez
Nombre(s)	Violeta
Teléfono	55797783
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	301721358
2. Datos del tutor	
Grado	Dr.
Nombre(s)	José Martín
Apellido paterno	García
Apellido materno	Varela
3. Datos del sinodal 1	
Grado	M. en C.
Nombre(s)	Luis
Apellido paterno	García
Apellido materno	Prieto
4. Datos del sinodal 2	
Grado	Dr.
Nombre(s)	Ulises Jesús
Apellido paterno	Razo
Apellido materno	Mendivil
5. Datos del sinodal 3	
Grado	Dr.
Nombre(s)	Alejandro
Apellido paterno	Zaldivar
Apellido materno	Riverón
6. Datos del sinodal 4	
Grado	Dr.
Nombre(s)	Angélica
Apellido paterno	González
Apellido materno	Oliver
7. Datos del trabajo escrito.	
Título	Determinación taxonómica de <i>Profilicollis altmani</i> Perry, 1942 y <i>Southwellina hispida</i> Van Cleave, 1918 (Polymorphidae Mayer, 1933) usando evidencia morfológica y molecular.
Número de páginas	40 p.
Año	2011

Agradecimientos.

Agradezco los apoyos recibidos por parte de CONACYT (83043) y PAPIIT (215709); también agradezco al Dr. Mario George-Nascimento por la donación de los ejemplares de *Profilicollis altmani*.

Así mismo agradezco al Dr. Martín García Varela por su apoyo y paciencia para la realización de esta Tesis.

Agradezco también al Mtro. Luis García, al Dr. Alejandro Zaldivar, a la Dra. Angélica y al Dr. Ulises Razo por sus comentarios y sugerencias a este trabajo.

Agradezco a mis amigos que me hicieron reír en clase y en el Instituto por sus consejos, el apoyo, las fiestas; a mis maestros por enseñarme y hacerme dar cuenta de que cuando no puedo más, siempre hay un poco más por dar; a mi familia por siempre apoyar mis decisiones, alentarme cuando me equivoco y ser felices cuando yo lo soy.

Al paso del tiempo he aprendido a valorarlos a cada uno de ustedes por esos 5 minutos, días o años que han estado conmigo; gracias.

A mi Mamá Rosita.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Generalidades del Phylum Acanthocephala.	
Ciclo de vida.	
Generalidades de la familia Polymorphidae.	
Historia del género <i>Southwellina</i> Witenberg, 1932.	
Historia del género <i>Profilicollis</i> Meyer, 1931.	
Marcadores moleculares.	
JUSTIFICACIÓN	7
OBJETIVOS.....	8
General.	
Particulares.	
MATERIAL Y MÉTODO.....	9
Colecta del material biológico.	
Aislamiento del DNA genómico.	
Amplificación y secuenciación del gen citocromo oxidasa subunidad I (cox1).	
Purificación de los productos de PCR, clonación y secuenciación.	
Alineamientos múltiples y análisis filogenéticos.	
RESULTADOS.....	16
Caracterizaciones morfológicas.	
<i>Profilicollis altmani</i> .	
Adulto.	
Cistacanto.	
<i>Southwellina hispida</i> .	
Adulto.	
Cistacanto.	
Datos moleculares.	
DISCUSIÓN.	25
<i>Southwellina hispida</i> .	
<i>Profilicollis altmani</i> .	
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS.....	28
ANEXOS	31

INTRODUCCIÓN

Generalidades del Phylum Acanthocephala.

Los acantocéfalos son organismos pseudocelomados que pueden medir desde unas cuantas micras hasta 20 cm. Estos parásitos carecen de sistemas circulatorio y digestivo, su forma es cilíndrica, la cual está revestida por un tegumento sincicial que permite el intercambio de nutrientes y desechos entre el interior y el exterior. El cuerpo de estos gusanos se encuentra dividido en dos regiones. La parte anterior comprende la proboscis (estructura de fijación), la cual está cubierta de ganchos, el cuello, un receptáculo de la proboscis retráctil y un par de lemniscos que funcionan como sistema hidráulico y permiten la extensión de la proboscis. En el segmento posterior se encuentran los aparatos reproductores de ambos sexos. Los machos presentan 2 testículos, una o varias glándulas de cemento. Las hembras presentan una campana uterina un útero (Amin 1987, Brusca y Brusca, 2000) (Ver Fig. 1). Aproximadamente se han descrito 1,150 especies clasificadas en 4 clases: Polyacanthocephala, Palaeacanthocephala, Archiacanthocephala y Eoacanthocephala. Esta clasificación está basada en caracteres morfológicos ecológicos y moleculares (Amin, 1987; Brusca y Brusca, 2000; García-Varela et al. 2002; García-Varela y Nadler, 2006).

Ciclo de vida.

Los acantocéfalos adultos son endoparásitos que se fijan en el intestino de su huésped vertebrado definitivo por medio de la proboscis. Las hembras liberan huevos maduros al medio ambiente (acuático o terrestre) a través de las heces, éstos son ingeridos por un huésped intermediario (artrópodo) en el que se desarrollan 3 estadios larvales: acantor, acantela y cistacanto. Este último estadio es la fase infectiva del parásito. Cuando el huésped definitivo ingiere el huésped intermediario con los cistacantos desarrolla el parásito adulto completando su ciclo de vida (Nickol y Crompton, 1985). Fig 2.

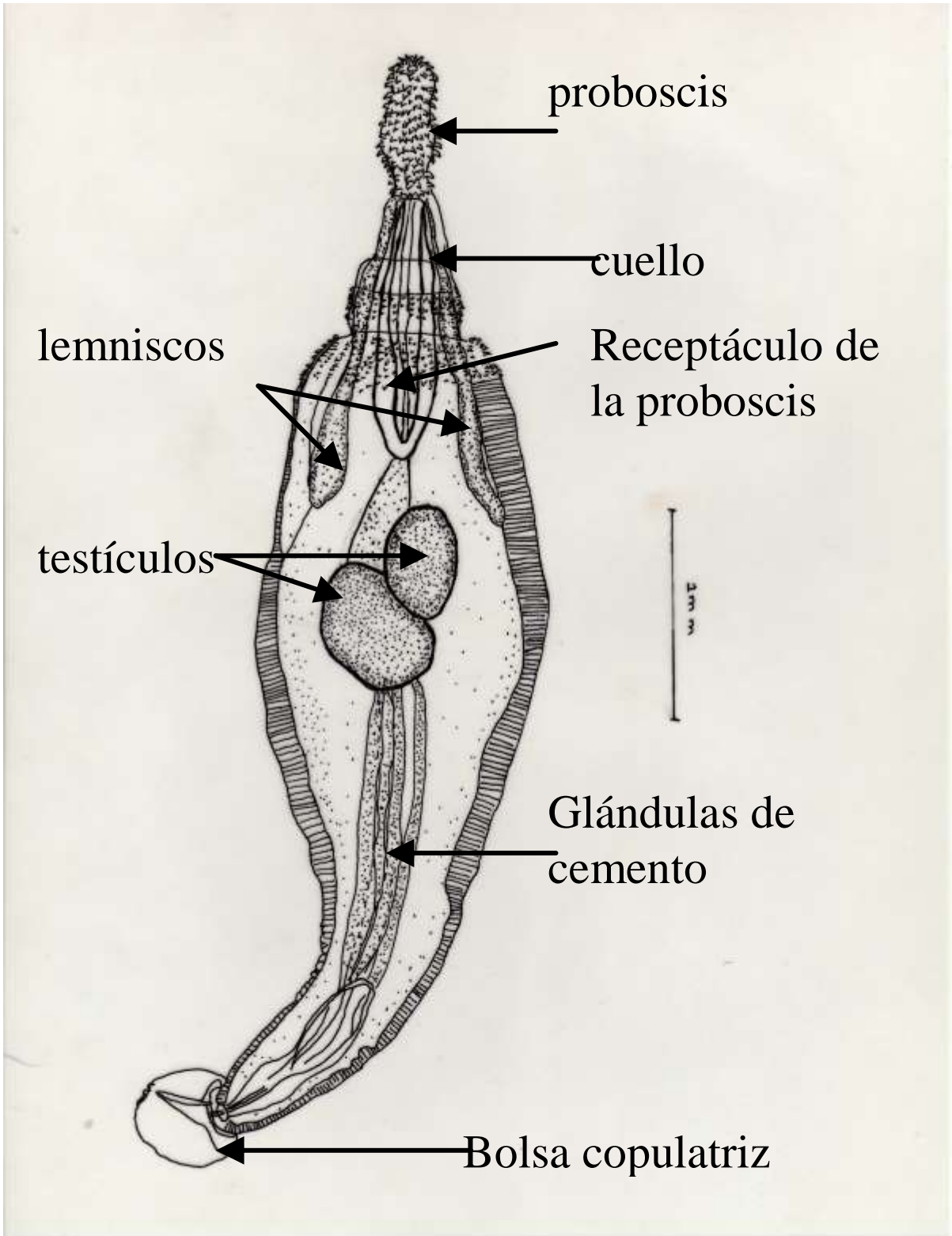


Fig. 1 Morfología general de un Acanthocephalo

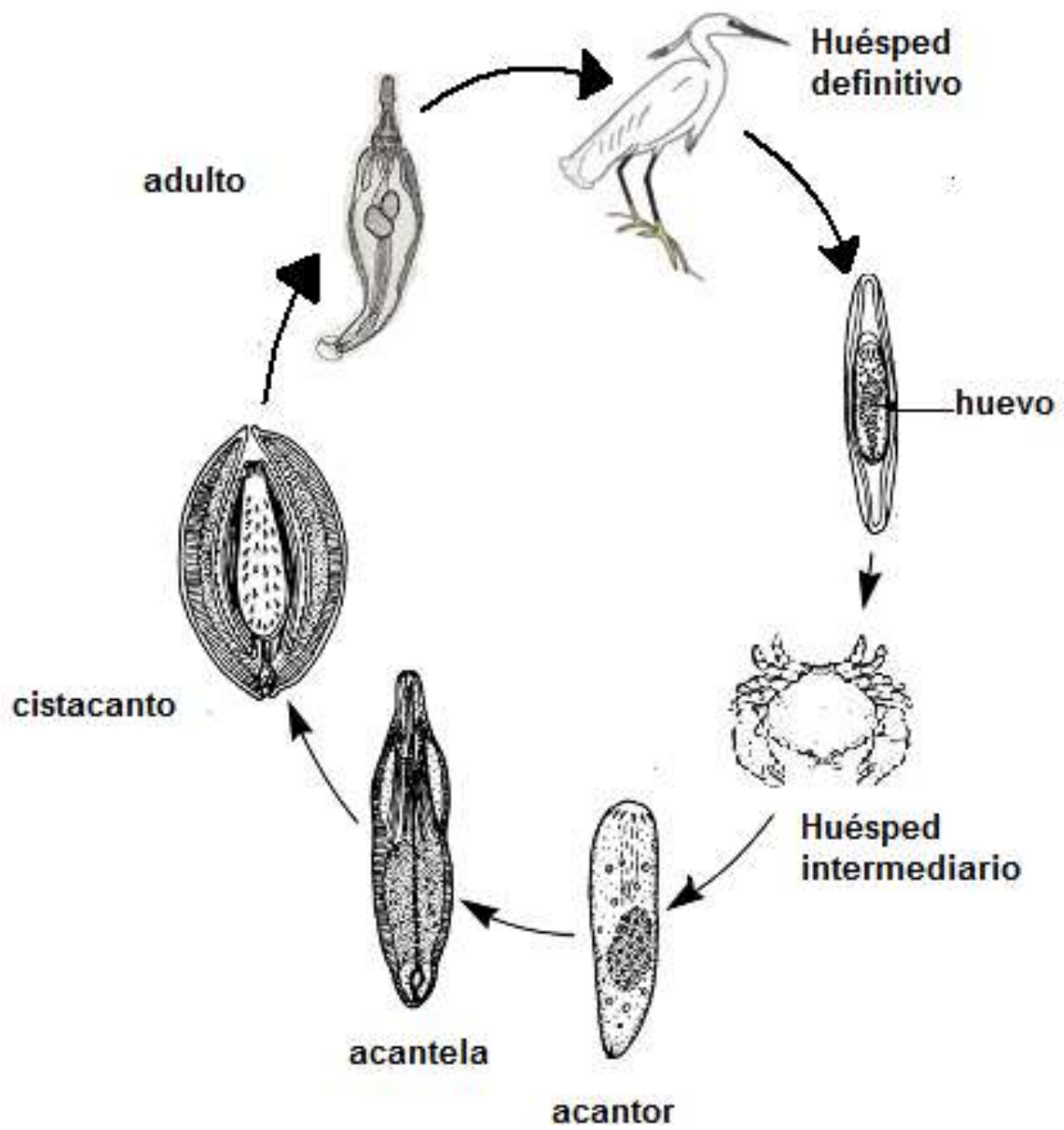


Fig. 2 Ciclo de vida de un Acanthocéfalo

Generalidades de la familia Polymorphidae.

La familia Polymorphidae Meyer, 1931 (Paleacanthocephala) es un grupo representado por endoparásitos de aves ictiófagas, anátidos y mamíferos marinos distribuidos en todo el mundo. La familia está constituida por 127 especies clasificadas en 10 géneros (Schmidt, 1973, Aznar et al. 2006). Los diferentes géneros de Polymorphidae se distinguen por la forma de la proboscis, el patrón de espinas en el tronco, el cual es característico de cada género, los machos presentan de 4 a 8 glándulas de cemento (Tabla 1).

Género	Huésped intermediario	Huésped definitivo
<i>Andracantha</i> Schmidt, 1975	Crustáceos	Aves marinas (cormoranes)
<i>Arhythmorhynchus</i> Luhe, 1911	Decápodos	Aves marinas y dulceacuícolas (garzas, cormoranes)
<i>Bolbosoma</i> Porta, 1908.	Eufausiáceos	Ballenas
<i>Pseudocorynosoma</i> Aznar, et al., 2006	Anfípodos	Anátidos
<i>Diplospinifer</i> Fukui, 1929		Cetáceos
<i>Profilicollis</i> Luhe, 1911	Decápodos	Aves marinas
<i>Hexaglandula</i> Petrochenko, 1950	Decápodos	Aves dulceacuícolas
<i>Polymorphus</i> Luhe, 1911	Anfípodos	Aves marinas y dulceacuícolas
<i>Southwellina</i> Witenberg, 1932	Decápodos	Aves marinas
<i>Corynosoma</i> Luhe, 1904	Anfípodos	Mamíferos marinos (pinnípedos) y aves marinas

Tabla 1. Composición genérica de la familia Polymorphidae.

Historia del género *Southwellina* Witenberg, 1932.

Los miembros del género *Southwellina* son endoparásitos que usan aves ictiófagas como huéspedes definitivos y decápodos como huéspedes intermediarios; sin embargo, en sus ciclos también intervienen peces, anfibios y reptiles que funcionan como huéspedes paraténicos facilitando el transporte y dispersión a sus huéspedes definitivos. Basado en caracteres morfológicos, el género está clasificado en 3 especies; *S. hispida* Witenberg, 1932; *S. macracanthus* Ward and Winter, 1952 y *S. dimorpha* Schmidt, 1973 (Schmidt, 1973; Amin, 1985). Todas estas especies se caracterizan por presentar un tronco espinoso con un ensanchamiento en la parte anterior y un adelgazamiento en la parte posterior, la proboscis es cilíndrica armada con numerosos ganchos, cuello conspicuo, receptáculo de la proboscis de doble pared muscular, lemniscos cortos, dos testículos en la región anterior con cuatro glándulas de cemento tubulares. La especie tipo del género, *Southwellina hispida*, fue descrita originalmente como *Arhythmorhynchus hispidus* parasitando al ave *Nycticorax nycticorax* en Japón (Fukui, 1929). Witenberg (1932) consideró *A. hispidus* como una especie diferente del género *Arhythmorhynchus* y transfirió la especie a un nuevo género, *Southwellina*, el cual posteriormente fue reconocido como válido en las clasificaciones morfológicas (Schmidt, 1973; Yamaguti, 1963; Amin, 1985).

Historia del género *Profilicollis* Meyer, 1931.

Los miembros del género *Profilicollis* son endoparásitos de aves acuáticas que usan a decápodos como huéspedes intermediarios. Basado en caracteres morfológicos el género está compuesto por 12 especies distribuidas en todo el mundo (Nickol et al., 1999, 2002). Morfológicamente el género se caracteriza por poseer un cuello largo, una proboscis esférica, tronco espinado y receptáculo de la proboscis con doble pared muscular, los machos presentan cuatro glándulas de cemento tubulares, y los huevos carecen de prolongación polar en las hembras. La especie tipo del género, *Profilicollis botulus* Van Cleave, 1916, fue registrada en Maine, Inglaterra asociada al pato marino

(common eider) *Somateria mollissima* (Lei Ching,1989). La especie analizada en este trabajo de tesis, *Profilicollis altmani* Perry, (1942), fue descrita parasitando el intestino de las gavias *Melanitta perspicillata* Linnaeus 1758 y *Melanitta deglandi* Bonaparte 1850, en la bahía de Monterey, California, USA. *P. altmani* se caracteriza por tener un cuerpo alargado y cilíndrico recubierto con espinas en la región anterior, los machos miden 10.5 mm de largo y las hembras 12.25 mm de largo, poseen cuello largo y delgado de 1.38 mm de largo, la proboscis tiene forma esférica u ovoide y mide 0.7 mm de ancho por 0.8 mm de largo, y está cubierta de 28 hileras de ganchos longitudinales con 11 ganchos en cada fila. El receptáculo de la proboscis es de doble pared muscular. Los lemniscos son más cortos que el receptáculo de la proboscis. Los machos presentan dos testículos esféricos que ocupan más de dos terceras partes del cuerpo.

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares más utilizados para diferenciar especies o poblaciones de acantocéfalos son las regiones de los ITS (Internal Transcribed Spacer) del RNA ribosomal y los genes del DNA mitocondrial COX 1y NDH4, los cuales codifican a proteínas y además tienen una tasa de cambio mayor que los genes ribosomales (Steinauer et al., 2007; García-Varela y Pérez Ponce de León, 2008; Martínez Aquino et al., 2009; Cruickshank, 2002). El DNA mitocondrial en eucariontes es circular, con aproximadamente 16,569 pares de bases y se ha utilizado como marcador molecular para diferenciar especies y poblaciones debido a su alta tasa de mutación y a su herencia materna la cual es independiente al DNA nuclear (Cruickshank, 2002, Benesh, 2006; Steinauer et al., 2007).

JUSTIFICACIÓN.

En el presente proyecto de tesis 2 especies de Polymorphidos, *Southweliina hispida* y *Profilicollis altmani* se encontraron parasitando el intestino y la cavidad corporal de sus hospederos definitivos e intermediarios respectivamente. Debido a sus diferencias morfológicas en sus estadios de desarrollo y la amplia distribución geográfica de sus hospederos se dificulta su correcta determinación taxonómica. Por lo tanto estos parásitos representan perfectos modelos para emplear herramientas moleculares y morfológicas con el objetivo de caracterizar a las especies correctamente.

OBJETIVOS.

General.

- Caracterizar morfológica y molecularmente a las especies *Profilicollis altmani* y *Southwellina hispida*.

Particulares

- Estimar las distancias genéticas entre las poblaciones de *Profilicollis altmani* y *Southwellina hispida*, usando secuencias del citocromo oxidasa subunidad 1 del DNA mitocondrial.
- Proponer una hipótesis filogenética de las poblaciones *Profilicollis altmani* y *Sowthwellina hispida* usando secuencias del citocromo oxidasa subunidad 1.
- Realizar las redescpciones morfológicas de los adultos y cistacantos de *Profilicollis altmani* y *Southwellina hispida*.

MATERIAL Y MÉTODO

Colecta del material biológico.

Se realizaron viajes de campo a diferentes localidades de México en donde se colectaron peces y aves ictiófagas (Tabla 2). Los intestinos de cada huésped fueron extraídos y colocados en cajas de petri con solución salina al 0.75 %. Posteriormente el intestino se examinó bajo el microscopio estereoscópico en busca de acantocéfalos. En el actual proyecto 3 especímenes adultos, 3 cistacantos de *S. hispida*, más 4 adultos y un cistacanto de *P. altmani* se preservaron en etanol al 100% para conservar el material genético. Otros especímenes se colocaron en agua destilada a 4°C por 24 horas con el objetivo de que los organismos evertieran la proboscis. Posteriormente se preservaron en etanol al 70% para su identificación morfológica.

El material preservado para el estudio morfológico fue teñidos con Paracarmín de Meyer (Anexo 1), para hacer preparaciones permanentes usando bálsamo de Canadá. Los ejemplares se midieron usando un microscopio óptico (marca Olympus® modelo, BX40F-3, Japón) y un ocular micrométrico. Las medidas de los organismos están dadas en milímetros. Los organismos fueron identificados usando las claves morfológicas de Petrochenko (1958) y Yamaguti (1963). Los ejemplares de referencia se depositaron en la Colección Nacional de Helmintos del Instituto de Biología de la UNAM (Tabla 2).

Aislamiento del DNA genómico.

Los organismos preservados directamente en etanol absoluto se colocaron en 100 µl de una solución de digestión que es una mezcla (100mM Tris HCl pH 7.6, 200mM NaCl, 10% Sarkosyl, Proteinasa K, y Agua Ultrapura). Posteriormente la solución con el tejido se incubó a 56 °C por 12 horas. Finalmente el DNA fue aislado con el reactivo de DNAzol siguiendo el método de Chomczynski, et al., 1997 de Invitrogene (Anexo 2). El DNA fue resuspendido en 25 µl de agua bidestilada.

Nombre de la especie	No. de muestra	Huésped	Localidad	Coordenadas Norte	Oeste	Registro en la CNHE
<i>Southwellina hispida</i>	1 ^{Δ(A)}	ND	Mar Báltico, Finlandia.	ND	ND	
	2 ^{Δ(A)}	<i>Tigrisoma mexicanum</i>	Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México	18° 42' 13.4"	95° 45' 27.9"	5769
	3 ^{Δ(A)}	<i>Ardea alba</i>	Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México.	18° 42' 13.4"	95° 45' 27.9"	6735
	4 ^{Δ(A)}	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México.	18° 42' 13.4"	95° 45' 27.9"	6736
	5 ^{Φ(C)}	<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México.	18° 42' 13.4"	95° 45' 27.9"	6687
	6 ^{Δ(A)}	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Los Chivos, Veracruz, México.	18° 56' 13"	95° 58' 08"	6720
	7 ^{Δ(A)}	<i>Egretta garzetta</i>	El Espino, Tabasco, México.	18°28'18.9"	92°39'14.9"	5770
	8 ^{Δ(A)}	<i>Egretta tricolor</i>	Laguna de términos, Campeche, México.	18° 59'	91° 58'	6717
	9 ^{Δ(A)}	<i>Ardea alba</i>	Ría Celestún, Yucatán, México.	20° 54' 15.5"	90° 20' 34.4"	6691
	10 ^{Φ(C)}	<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	Ría Celestún, Yucatán, México.	20° 54' 15.5"	90° 20' 34.4"	6686
	11 ^{Φ(C)}	<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	Ría Lagartos, Yucatán, México.	21° 35' 54.1"	88° 09' 24.6"	6688
	12 ^{Φ(C)}	<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	El corchito Progreso, Yucatán, México.	21° 16' 40.6"	89° 38' 38.8"	6692
	13 ^{Δ(A)}	<i>Pelecanus occidentalis</i>	Laguna Madre, Tamaulipas, México.	24° 29' 00"	97° 45' 00"	6739
	14 ^{Φ(C)}	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	Tres Palos, Guerrero, México.	16°47'47"	99°44'30"	6718
	15 ^{Δ(A)}	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Tres Palos, Guerrero, México.	16°47'47"	99°44'30"	6719
	16 ^{Δ(A)}	<i>Tigrisoma mexicanum</i>	La Tovar, Nayarit, México.	21°32'00"	105° 17'22"	6712
	17 ^{Δ(A)}	<i>Ardea herodias</i>	La Tovar, Nayarit, México.	21°32'00"	105° 17'22"	6716
	18 ^{Δ(A)}	<i>Butorides virescens</i>	La Tovar, Nayarit, México.	21°32'00"	105° 17'22"	6715
	19 ^{Δ(A)}	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	La Tovar, Nayarit, México.	21°32'00"	105° 17'22"	6714
	20 ^{Δ(A)}	<i>Anhinga anhinga</i>	La Tovar, Nayarit, México.	21°32'00"	105° 17'22"	6713
	21 ^{Δ(A)}	<i>Phalacrocorax auritus</i>	Guerrero Negro, Baja California Sur, México.	27° 57' 32"	114° 03'22"	6690
	22 ^{Δ(A)}	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Guerrero Negro, Baja California Sur, México.	27° 57' 32"	114° 03' 22"	6689
	23 ^{Δ(A)}	<i>Botaurus lentiginosus</i>	San Quintin, Baja California Norte, México.	30°24'057"	115°54'72"	6738
<i>Profilicollis altmani</i>	1 ^{Δ(A)}	<i>Enhydra lutris</i>	Monterey Bay, California, Estados Unidos.	ND	ND	5777
	2 ^{Δ(A)}	<i>Melanitta perspicillata</i>	Monterey Bay, California, Estados Unidos.	ND	ND	5767
	3 ^{Δ(A)}	<i>Larus pipixcan</i>	Caleta Lengua, Chile	ND	ND	5776
	4 ^{Δ(A)}	<i>Larus dominicus</i>	Caleta Lengua, Chile	ND	ND	
	5 ^{Ω(C)}	<i>Emerita analoga</i>	Caleta Lengua, Chile	ND	ND	
<i>Profilicollis botulus</i>	1 ^{Δ(A)}	<i>Somateria mollissima</i>	Dinamarca.	ND	ND	5768
	2 ^{Δ(A)}	<i>Anas platyrhynchos</i>	Estados Unidos.			
<i>Polymorphus brevis</i>	1 ^{Δ(A)}	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Michoacán, México.	9°56'0"	101°50'11"	5778
	2 ^{Δ(A)}	<i>Egretta thula</i>	Guerrero, México.	17°8'22"	100°38'30"	5766
	3 ^{Δ(A)}	<i>Egretta caerulea</i>	Yuriria, Guanajuato, México.	20°13'43"	101°15'38"	1377
<i>Hexaglandula corynosoma</i>	1 ^{Δ(A)}	<i>Nyctanassa violacea</i>	Papaloapan, Tlacotalpan, Veracruz, México.	18° 42' 13.4"	95° 45' 27.9"	5765
	2 ^{Δ(A)}	<i>Nyctanassa violacea</i>	El Espino, Tabasco, México.	18°28'18.9"	92°39'14.9"	5771
	3 ^{Δ(A)}	<i>Nyctanassa violacea</i>	Ría Lagartos, Yucatán, México.	21° 35' 54.1"	88° 09' 24.6"	5773
	4 ^{Ω(C)}	<i>Uca spinicarpa</i>	Merida, Yucatán, México.	21°32'00"	105° 17'22"	6048
	5 ^{Δ(A)}	<i>Nyctanassa violacea</i>	La Tovar, Nayarit, México.	21°32'00"	105° 17'22"	5772
<i>Plagiorhynchus cylindraceus</i>				ND	ND	

Tabla 2. Información de las especies analizadas en el presente trabajo. No de muestra, huésped, Localidad. Los números de las muestras están relacionados con el árbol de la figura 8. ND = No determinado. Δ =aves. Φ=peces. Ω=decápodo.(A)=Adulto.(C)=Cistacanto

Amplificación y secuenciación del gen citocromo oxidasa subunidad I (cox 1)

La amplificación de la subunidad I del gen mitocondrial cox 1 se llevó a cabo por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l, con 2 μ l de DNA genómico; 2.5 μ l de buffer de reacción 10X, 1.5 μ l de $MgCl_2$, 0.5 μ l de dNTP's (Promega, Madison USA), 1 μ l del primer 507 forward (5'-AGTTCTAATCATAARGATATYGG-3'); 1 μ l del primer 588 reversa (3'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-5'), (Folmer et al., 1994) 0.125 μ l de la enzima (equivalente a 0.5 U) Taq polimerasa Platinum, (Invitrogene) y finalmente 16.375 μ l de agua destilada. Las muestras se corrieron en un termociclador (PTC 100, MJ Research Inc) con un programa que consistía de un paso inicial de desnaturalización de 94 °C por 3 minutos, un período de alineación de 1 min. a 40 °C y un período de extensión por 72 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos. El programa se completó con un período de extensión final de 72 °C por 5 minutos. Los productos amplificados fueron separados y visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en un buffer de Tris-Borato-EDTA (Fig. 3 y Fig. 4)

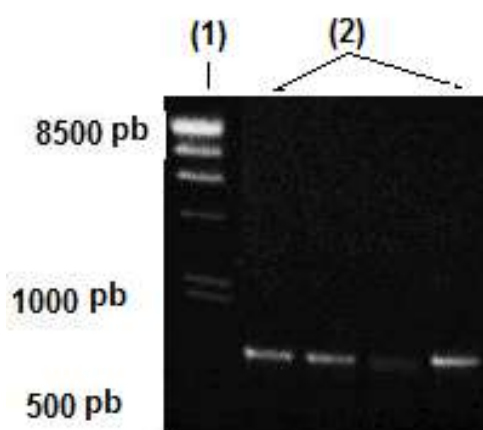


Fig. 3 Electroforesis de los productos de amplificación de COX1 por PCR, analizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. (1) Marcador de peso molecular. (2) Productos amplificados.

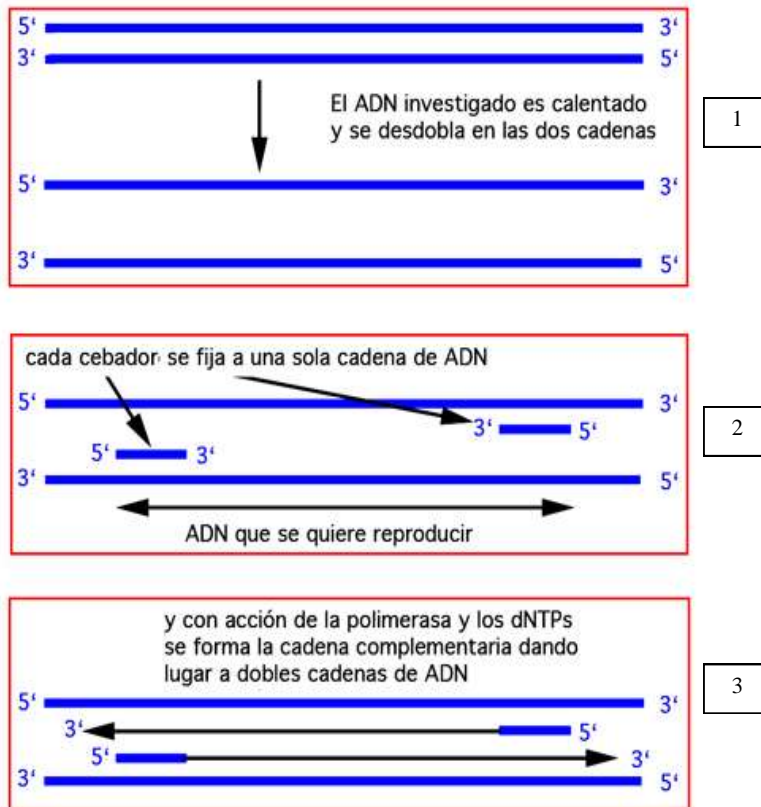


Fig. 4. Esquema de la cadena de la polimerasa en donde se describe la reacción de amplificación. (1) Desnaturalización. (2) Alineación. (3) Extensión.

Purificación de los productos de PCR, clonación y secuenciación

Los productos de PCR se incubaron a 37°C durante 15 minutos con las enzimas EXO-SAP, (USB ®). Posteriormente los productos se incubaron a 80°C por 15 min para desactivar las enzimas (Fig. 5). Otros productos de PCR fueron filtrados usando las columnas de milipore (Ultra-Free Mc, Amicon). Posteriormente se ligaron al vector utilizando el Kit de PGEM-T Vector system II (Promega) usando la siguiente mezcla de reacción, 5µ del Buffer de Ligación 2X, 1µ de la T4 DNA Ligasa, 0.7 µl del Vector PGEM-T (50ng) y 3.3 µl del producto de PCR previamente filtrado con las columnas millipore. Finalmente la reacción de ligación se incubó a 4°C por 12 horas. 5µl de la mezcla de ligación se usó para realizar la transformación de los plásmidos recombinantes usando células competentes (*Escherichia coli* cepa JM109) y los reactivos IPTG, X-Gal y un antibiótico (Ampicilina 50 ng/ml). Las colonias bacterianas con los plásmidos recombinantes que contenían el inserto de interés se crecieron en medio bacteriano LB (Luria broth) con ampicilina por 24 horas, para aislar el plásmido recombinante utilizamos el kit de purificación de QIAGEN. La reacción de secuenciación de los productos de PCR y de los plásmidos se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 10 µl, que contenía, 2 µl buffer, 1 µl del primer, 2µl Big Dye, 2 µl de agua megapura y 3 µl de DNA de los productos de PCR. Finalmente la reacción de secuenciación fue corrida en un secuenciador automático marca Perkin Elmer ABI prism modelo 310 (Applied Biosystems).

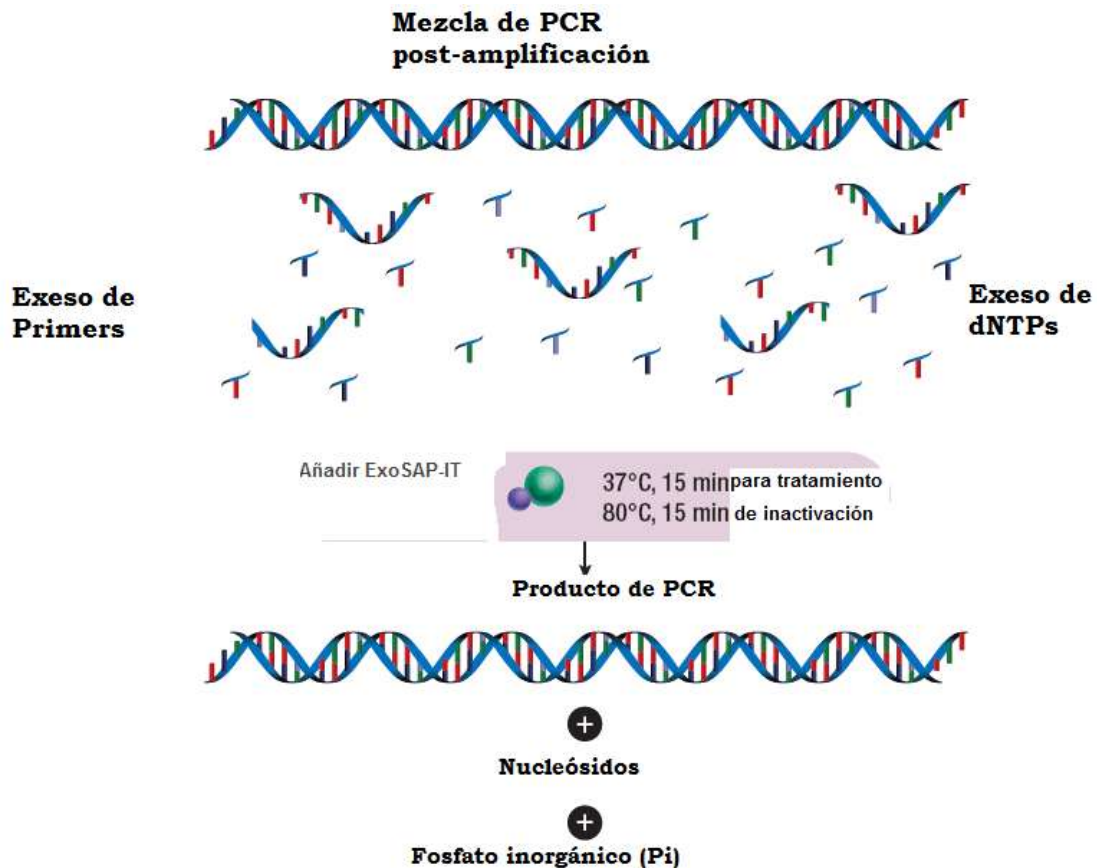


Fig. 5. Reacción de Exo-Sap utiliza dos enzimas hidrolíticas, Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina ácida. Ambas enzimas remueven el exceso los dNTPs y primers de las reacciones de PCR.

Alineamientos múltiples y análisis filogenéticos.

Los electroferogramas derivados del secuenciador automático fueron evaluados y ensamblados con el programa de cómputo CODONCODE Corporation (VERSION 1.5.2). Las secuencias consenso del *cox 1* de cada población fueron alineadas con el programa de cómputo Clustal X (Thompson, J.D. et al, 1997). En total 23 secuencias del *cox 1* de *S. hispida*, más 5 secuencias de *P. altmani* fueron alineadas con una base de datos del *cox 1*, formando una base de datos total de 39 taxa con 655 nucleótidos. Las distancias genéticas entre los taxa fueron estimadas usando el método de Jukes-Cantor (1969). Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo con el método de Neighbor-joining (NJ) y de Máxima Parsimonia

Tres secuencias de *Polymorphus brevis*, 2 de *Profilicollis botulus*, 5 de *Hexaglandula corynosoma* y una secuencia de *Plagiorhynchus cylindraceus* fueron empleadas como grupos externos en el análisis, debido a que estas especies tiene una cercana relación con los géneros bajo estudio (García-Varela y Pérez Ponce de León, 2008).

El soporte de las ramas de los árboles fue estimado usando el método de bootstrap con 10,000 réplicas.

RESULTADOS

Caracterizaciones morfológicas

Los parásitos colectados en el intestino de aves acuáticas (ver tabla 2), peces y decápodos presentaban 2 morfotipos, uno de ellos concuerda con la descripción de *P. altmani* (Perry, 1942), Van Cleave, 1947 y el otro con la descripción de *S. hispida* (Van Cleave, 1925). Cabe señalar que en miembros de Polymorphidae los caracteres morfológicos claves para identificar a las especies son: Tamaño y forma de la proboscis, número de los ganchos en la proboscis, patrón de espinación en el tronco, número de glándulas de cemento en machos y el tipo de hospedero definitivo.

Profilicollis altmani (Perry, 1942)

Adulto

La caracterización de esta especie está basada en 10 organismos, 3 hembras y 7 machos. En general los adultos de *P. altmani* presentan un cuerpo cilíndrico de 6.167 mm de largo y un ancho de 1.344 mm con un cuello largo y retraíble de 1.516 mm de largo. La parte anterior del cuerpo tiene pequeñas espinas. La proboscis es de forma esférica o bulbosa, mide entre 0.804 mm y 0.836 mm de ancho y está cubierta con 28 hileras de ganchos con 11 ganchos en cada hilera. El receptáculo de la proboscis es de doble pared muscular y mide 1.81 mm de largo, los lemniscos son de menor tamaño que el receptáculo de la proboscis. Los machos presentan 2 testículos esféricos que abarcan una gran parte del cuerpo, 4 glándulas de cemento tubulares y alargadas que se extienden hasta la región posterior del cuerpo (Fig. 6). Las hembras presentan huevos semiesféricos de 0.050 mm de largo. (Fig. 7).

Cistacanto.

Los cistacantos de *P. altmani* se caracterizan por presentar un cuerpo cilíndrico de menor tamaño que el adulto, 2.433 mm de largo por 0.939 mm de ancho, un cuello largo retráctil de 2.34 mm de largo. La parte anterior del tronco está cubierta de un anillo de espinas al igual que en los adultos. La proboscis es de forma esférica y mide 1.69 mm de largo por 1.36 mm de ancho. La proboscis está armada de 28 hileras de ganchos con 11 ganchos en cada hilera. Las características morfológicas de la proboscis son semejantes al adulto. La diferenciación sexual depende del estado de maduración del cistacanto, en algunos organismos es posible identificar algunos órganos como los testículos que empiezan a ser ligeramente visibles.

***Southwellina hispida* (Van Cleave, 1925)**

Adulto.

La presente descripción está basada en 7 ejemplares, 3 hembras y 4 machos. Los adultos presentan un cuerpo semiovalado con un ensanchamiento en la parte anterior y de forma cónica en la parte posterior. Miden 4.95 mm de largo por 1.04 mm de ancho. La proboscis es de forma subcilíndrica ensanchada en la parte media y de 0.66 mm de largo, provista de 24 hileras de ganchos longitudinales con 15 ganchos en cada hilera. El cuello mide 0.48 mm de largo. El receptáculo de la proboscis de doble pared muscular mide 1.113 mm de largo. Los lemniscos miden 1.24 mm de largo. El tronco presenta dos franjas de espinas separadas por una zona sin ellas. Los machos tienen dos testículos en la región posterior del cuerpo que miden 0.453 de largo por 0.32 mm de ancho. Los machos exhiben 4 glándulas de cemento tubulares de 1.37 mm (Fig.9), mientras que las hembras son ligeramente más grandes que los machos; tienen una campana uterina y los huevos miden 0.16 mm y presentan una membrana intermedia sin prolongación polar (Fig.8).

Cistacanto

La presente descripción esta basada en 9 ejemplares. Los cistacantos de *S. hispida* colectados en peces son de menor talla en comparación con los adultos. Además muestran dos hileras de espinas en la parte anterior del tronco como en los adultos. El largo total del cuerpo es mide en promedio 2.49 mm. La proboscis mide 0.73 mm de largo, los ganchos de la proboscis apicales y basales miden 0.039 mm, mientras que los gancho medios son más grandes midiendo 0.045 mm. El receptáculo de la proboscis mide 1.12 mm de largo. Los paquetes musculares son muy evidentes en la parte anterior del cuerpo (Fig. 10).

Datos moleculares

Las distancias genéticas estimadas entre las 23 poblaciones de *S. hispida* y las 5 poblaciones de *P. altmani*, tienen un rango de divergencia genética del 0.1% al 5 % y del 0.7% al 2.7% respectivamente. Particularmente la divergencia genética entre los cistacantos de *S. hispida* colectados en *C. urophthalmus* fue del 0.4 al 0.9% de divergencia. El análisis de NJ mostró que, las 23 poblaciones de *S. hispida* y las 5 poblaciones de *P. altmani* forman dos grupos monofiléticos independientes, con un soporte de bootstrap del 100 %. El análisis de NJ también mostró que otros aislados representando 3 especies: *Hexaglandula corynosoma*, *Profilicollis botulus* y *Polymorphus brevis* son monofiléticos con altos valores de bootstrap (Fig. 11).

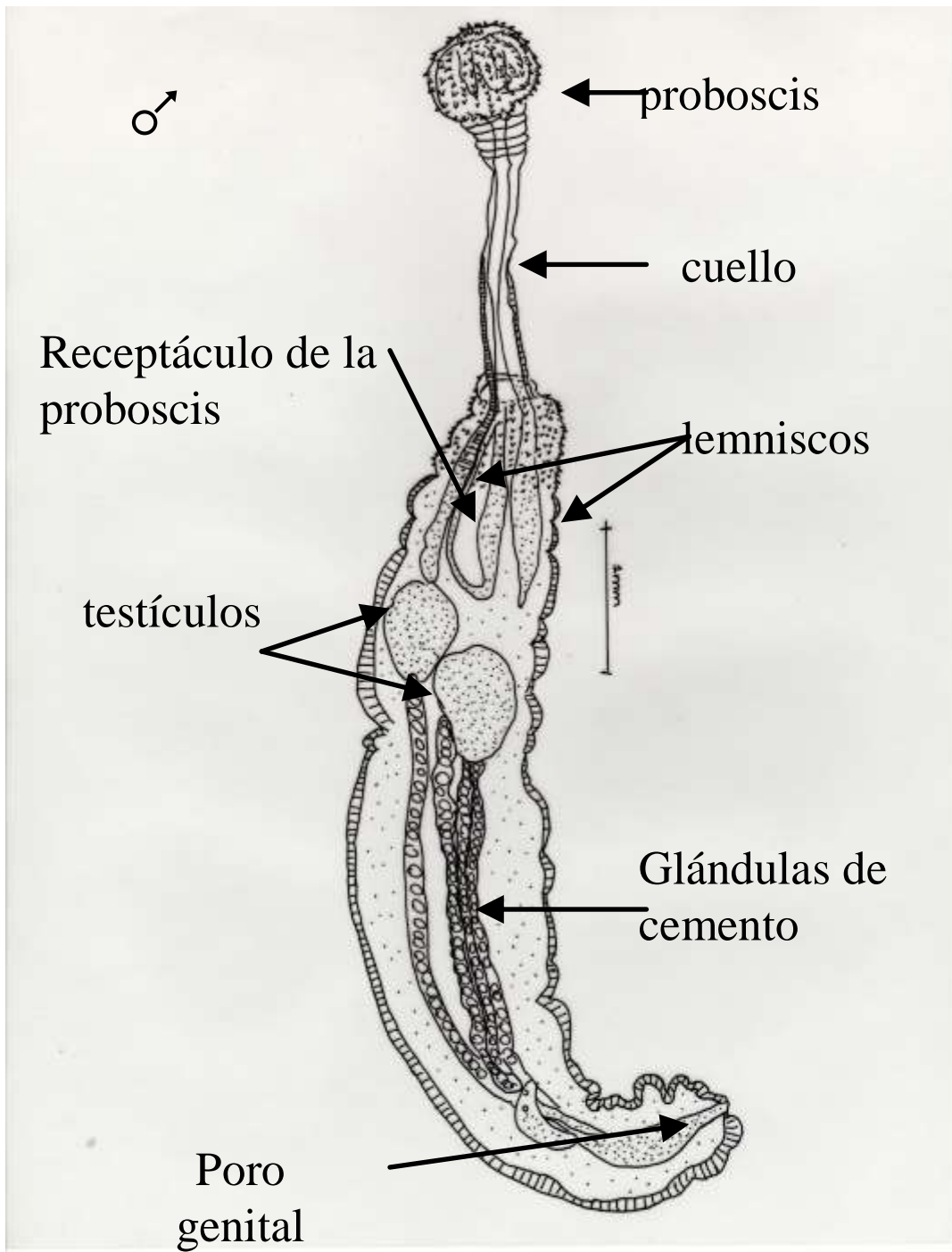


Fig. 6 Dibujo de un macho adulto de *P. altmani*.

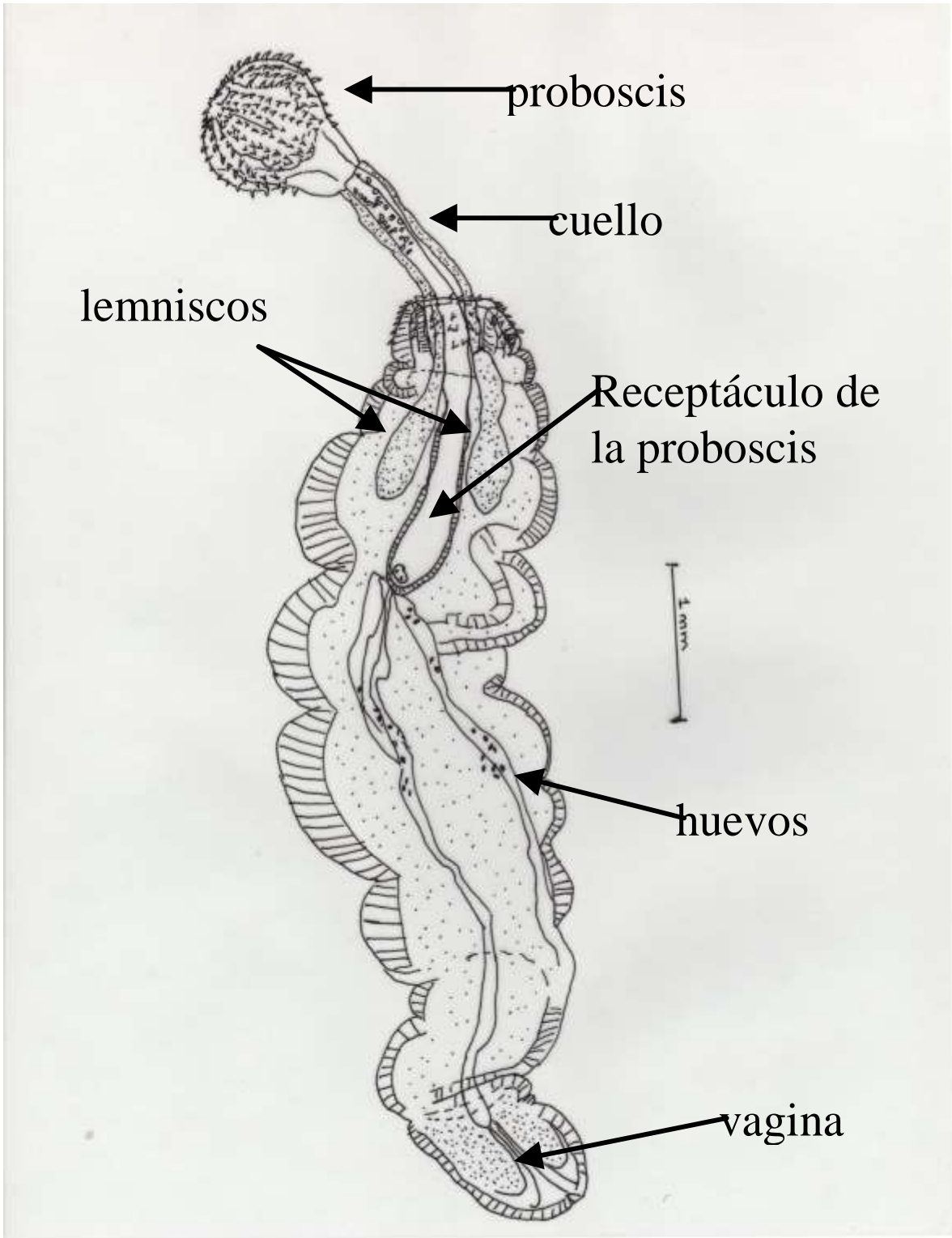


Fig. 7 Dibujo de una hembra adulta de *P. altmani*.

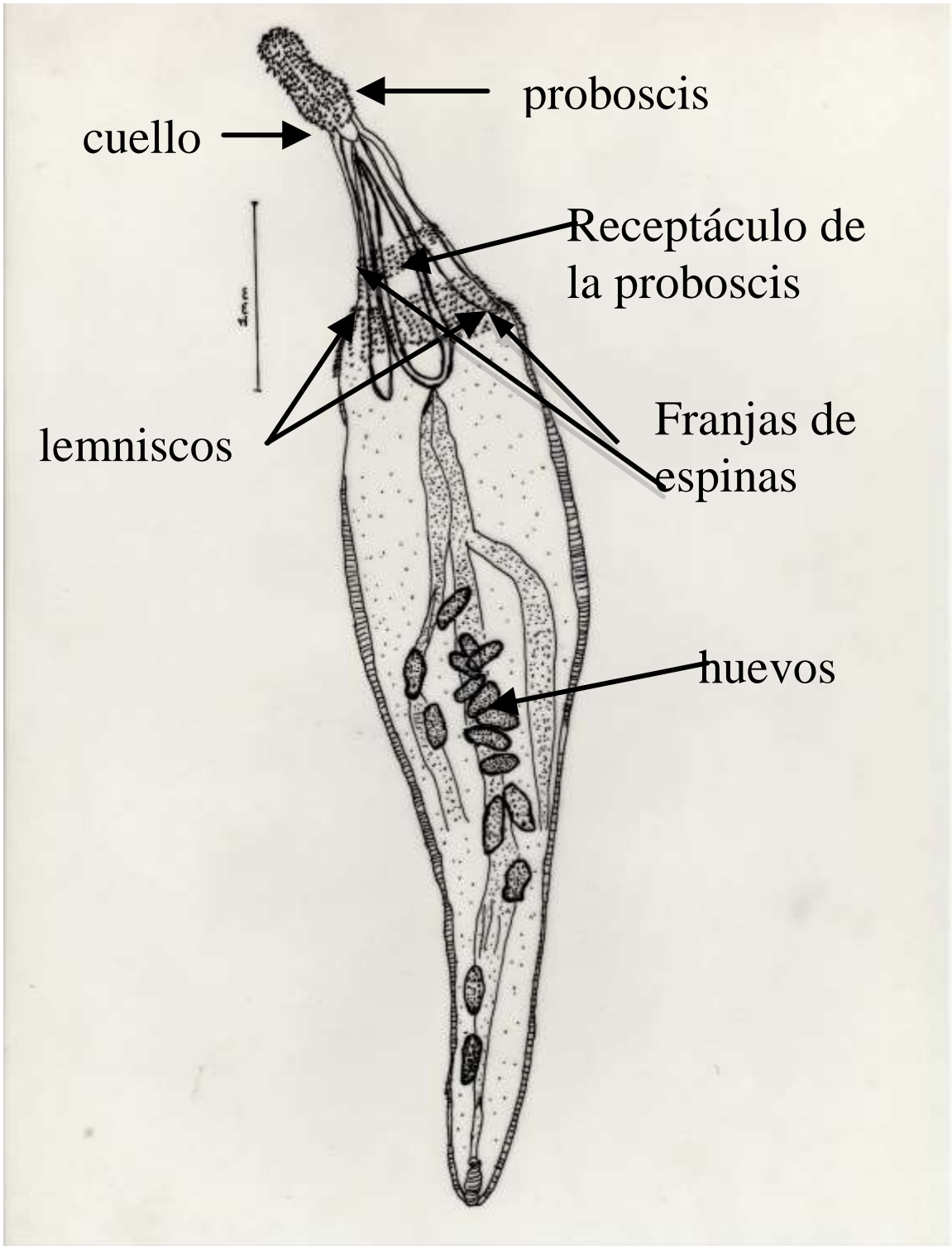


Fig 8. Dibujo de una hembra adulta de *S. hispida*.

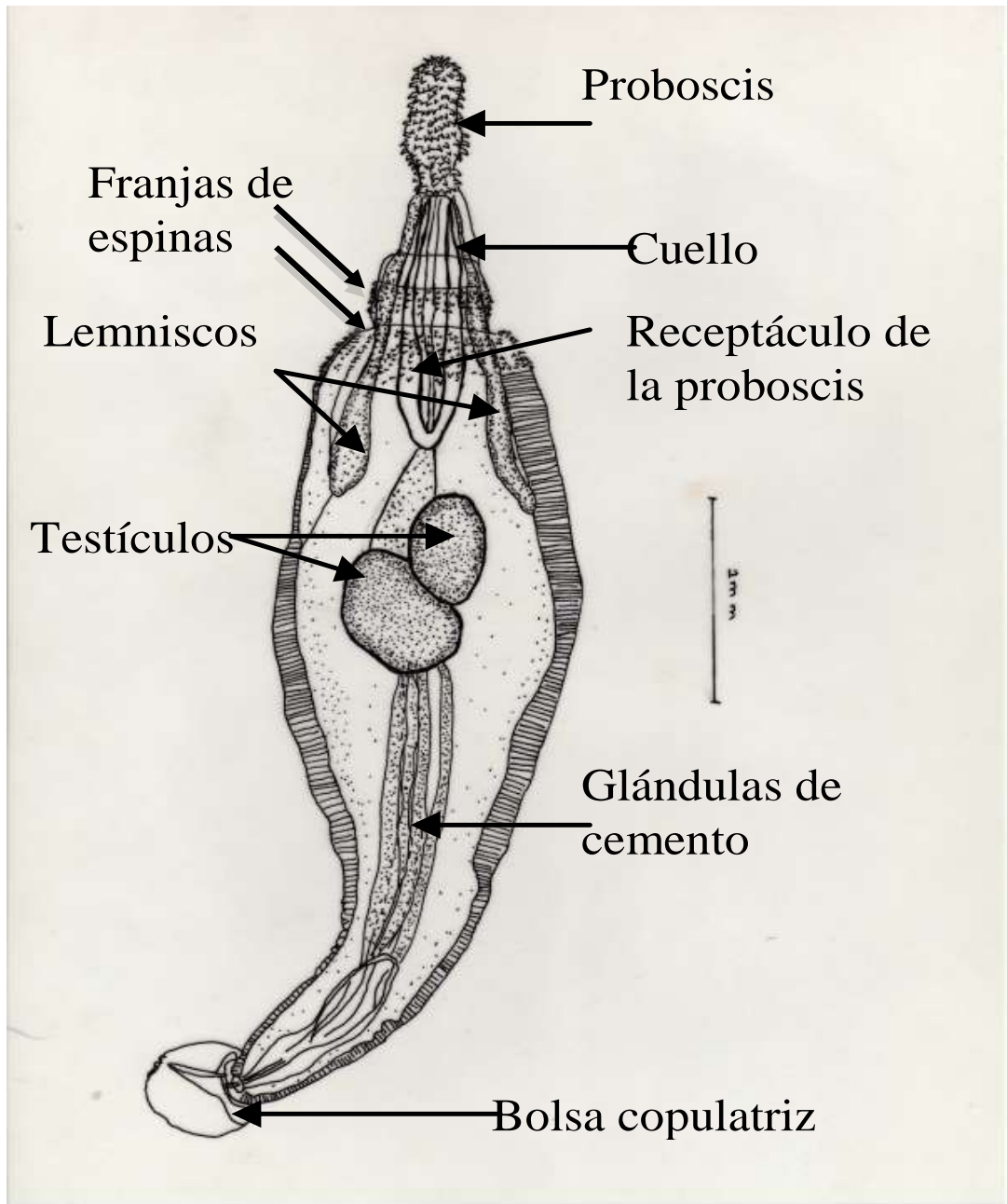


Fig 9. Dibujo de un macho adulto de *S. hispida*.

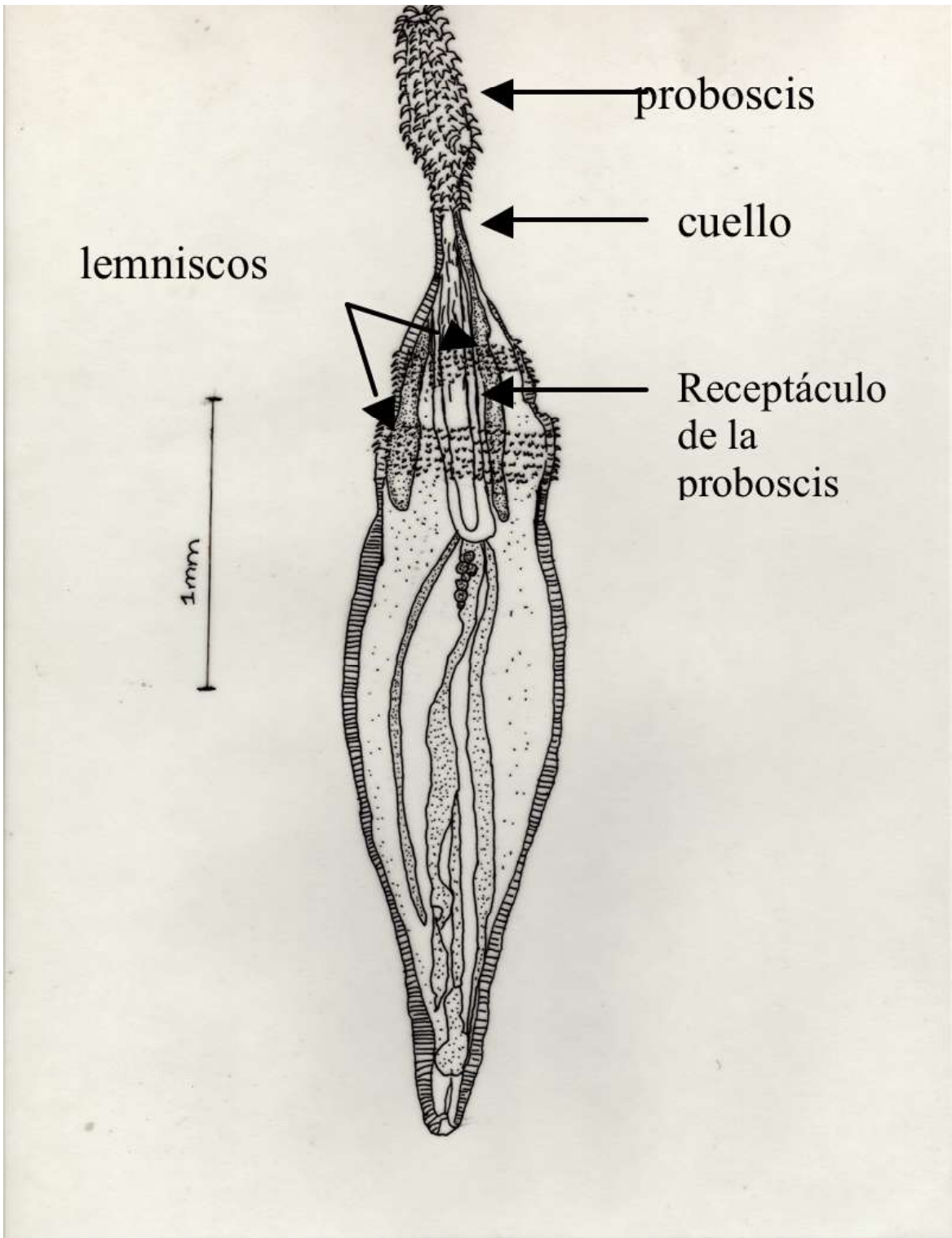


Fig 10. Dibujo de un cistacanto de *S. hispida*.

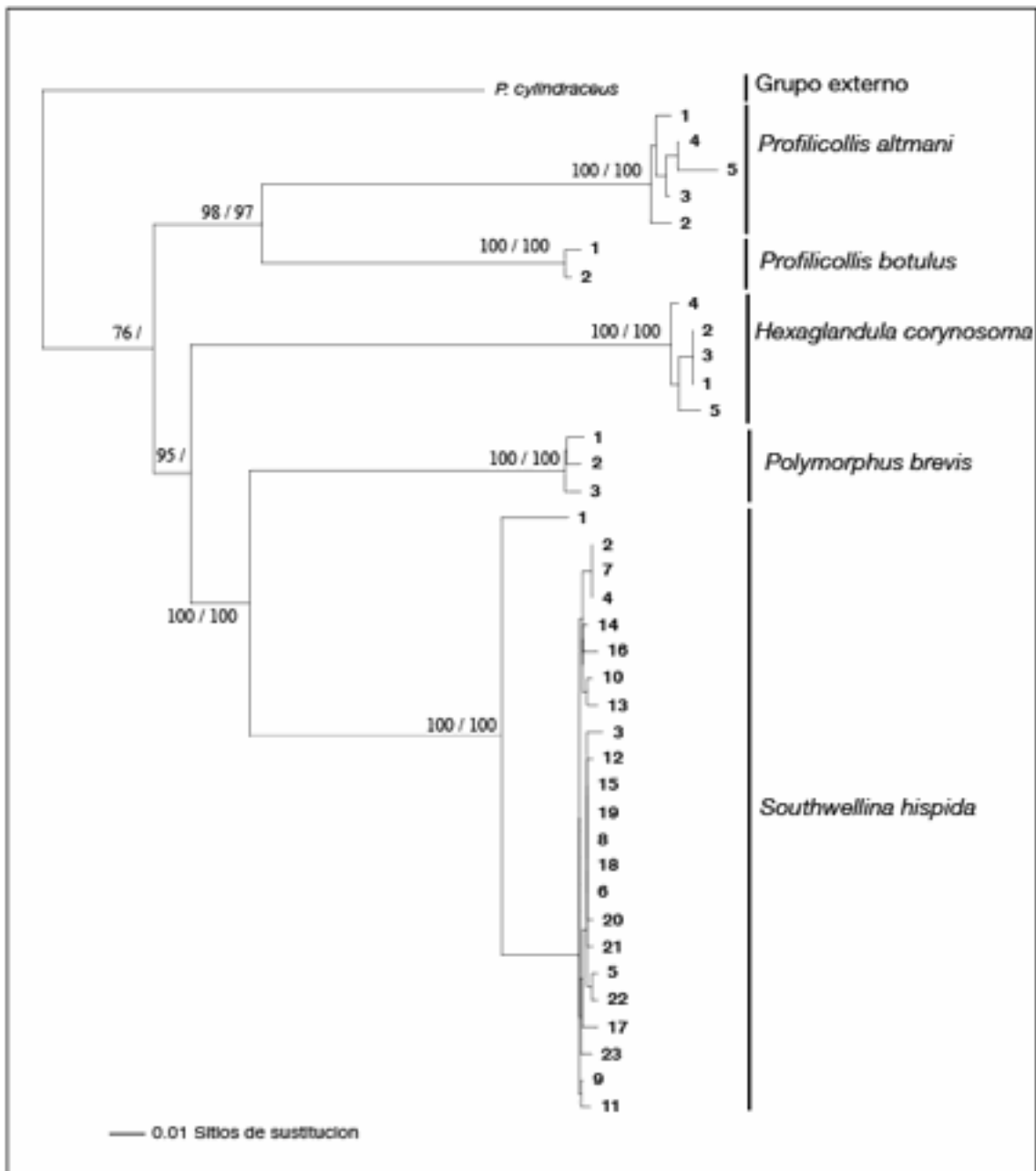


Fig. 11 Árbol derivado del análisis de NJ / MP representando cuatro especies de Polymorfidos. Los números cercanos a los nodos representan los valores de Bootstrap del análisis de NJ / MP.

DISCUSIÓN.

Southwellina hispida

Los acantocéfalos adultos recolectados en el intestino de las garzas (*Tigrisoma mexicanum* y *Egretta garzetta*) de Veracruz y los cistacantos recolectados en el intestino de *Cichlasoma urophthalmus* de los estados de Veracruz y Yucatán, fueron identificados como *Southwellina hispida*, ya que presentan características morfológicas que concuerdan con las descritas por Van Cleave, (1973). Es decir nuestros ejemplares presentaron un cuerpo semiovalado con un ensanchamiento en la parte anterior y de forma cónica en la parte posterior. La proboscis es de forma subcilíndrica ensanchada en la parte media, provista de 24 hileras de ganchos longitudinales con 15 ganchos en cada hilera, el cuello es alargado de forma cónica, el tronco contiene dos campos de espinas delimitadas por una sección sin espinas (ver Figura 8). Los machos exhiben 4 glándulas de cemento tubulares. Los huevos tienen una membrana intermedia sin elongaciones polares.

Profilicollis altmani

Los acantocéfalos adultos recolectados en el intestino de las aves *Melanitta perspicillata* de la bahía de Monterey, California. Estados Unidos; *Larus pipixcan*, *Larus dominicus* de las costas de Chile, de la nutria marina *Enhydra lutris* de la bahía de Monterey, California, Estados Unidos y los cistacantos recolectados en el hemocele del decápodo *Emerita analoga* de las costas de Chile, fueron identificados como *P. altmani* por presentar características morfológicas similares, a las presentadas en su descripción original (Perry, 1942). Los ejemplares presentaron un cuerpo cilíndrico recubierto en su parte anterior con espinas, un cuello largo y retraíble con una proboscis esférica recubierta con 11 ganchos longitudinales y con 28 ganchos en cada hilera. Los machos presentaban 2 testículos en tandem y 4 glándulas de cemento. Las hembras grávidas tienen huevos esféricos.

Las especies *S. hispida* y *P. altmani* son endoparásitos generalistas que usan aves ictiófagas y anátidos, como huéspedes definitivos y a decápodos como huéspedes intermediarios, sin embargo también utilizan a peces, anfibios y reptiles como huéspedes paraténicos.

En el actual proyecto de tesis, 3 adultos, 3 cistacantos de *S. hispida*, más 4 adultos y un cistacanto de *P. altmani* fueron recolectados de sus huéspedes definitivos y paraténicos. Las 11 secuencias cox 1 generadas en el proyecto de tesis fueron alineadas con otras 29 secuencias obtenidas de la base de datos gene bank, representando, 3 especies de otros géneros de la familia Polymorphidae. Los análisis filogenéticos de NJ y MP mostraron que los 6 aislados de *S. hispida* más otros 17 aislados de la misma especie conformaron un grupo monofilético con un valor de bootstrap del 100 %. Los 2 aislados de *P. altmani* también formaron un grupo monofilético junto con otros 3 aislados de la misma especie, recibiendo un soporte de bootstrap del 100%. Los valores de distancias genéticas obtenidos entre los cistacantos oscilo del 0.4 al 0.7 % y entre adultos es de 0.1 % al 5 % para *S. hispida* y de 0.9 % al 2.7 % para *P. altmani* (Anexo 3). Estos rangos de divergencia genética son similares a los registrado para poblaciones de otros Polimorfidos por ejemplo: *Polymorphus brevis* Van Cleave, 1916; *Profilicollis botulus* Van Cleave, 1916 y *Hexaglandula corynosoma* Travassos, 1915, los cuales mostraron un rango de divergencia genética poblacional del 1% al 5 % (García-Varela y Pérez-Ponce de León, 2008).

CONCLUSIONES

1. - Los especímenes colectados en aves ictiófagas y en peces de las costas de México fueron determinados como *Southwellina hispida*, mientras que los colectados en aves ictiófagas y decápodos de las costas de Monterey, California, Estados Unidos y de las costas de Chile fueron determinados como *Profilicollis altmani*.

2. - La divergencia genética poblacional de *S. hispida* y *P. altmani* usando el gen *cox 1*, como marcador molecular oscila entre el 0.1 % al 5 % y de 0.9 % al 2.7 % respectivamente.

3. - Los análisis filogenéticos mostraron que los 6 aislados de *S. hispida* secuenciados en este trabajo conforman un clado junto con otras 17 muestras de *S. hispida*, confirmando su determinación taxonómica. Los 2 aislados de *P. altmani* también formaron un clado junto con otras 3 muestras de esta especie.

4. - La presencia de *S. hispida* y *P. altmani* en diversos hospederos definitivos, paraténicos e intermediarios, amplian su rango de distribución.

5. - Las especies analizadas en este estudio muestran variaciones morfológicas que dificultan su identificación a nivel específico, sobre todo en sus fases larvales por lo tanto los datos moleculares pueden ser herramientas alternativas que faciliten la identificación a nivel de especies.

REFERENCIAS.

- Amin, O.M. 1985. Classification. In: Crompton D.W.T. Nickcol B.B. (eds) Biology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, London.
- Amin, O.M. 1987. Key to the families and subfamilies of Acanthocephala with the erection of a new class (Poyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida). J. Parasitol. (73)1216-1219.
- Aznar, F.F., G. Pérez Ponce de Leon., and J. A. Raga. 2006. Status of *Corynosoma* (Acanthocephala: Polymorphidae) based on anatomical, ecological and phylogenetic evidence, with the erection of *Pseudocorynosoma* n. gen. J. Parasitol. (92)548-564.
- Benesh, D.P., Hasu, T., Suomalainen, L. R., Valtonen, E.T., Tirola, M. 2006. Reliability of mitochondrial DNA in an acanthocephalan: the problem of pseudogenes. Int. J. Parasitol. (36)247-54.
- Brusca, RC, Brusca G.J. 2000. Invertebrates. Sinauer, Sunderland , MA.
- Chomczynski P., Mackey K, Drews R., Wilfinger W. 1997. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. Biotechniques. 2(3)550-3
- Cruickshank, R., 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. Syst. App. Acarol. (7)3-14.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotech. 3(5)294-9.
- Fukui, T. 1929. On some Acanthocephala found in Japan. Annot. Zool. Japon. (12)255-270
- García-Varela, M.; Cummings, M. P.; Pérez-Ponce de León, G.; Gardner, S. L.; Lachette, J. P. 2002. Phylogenetic analysis based on 18S ribosomal RNA gene sequences supports the existence of class Polyacanthocephala (Acanthocephala). Mol. Phylogene. Evol. (23)288-292.
- García-Varela, M; Nadler S.A. 2006. Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. Mol. Phylogene Evol. (40(1):61-72.

- García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G. 2008. 2008 Validating the systematic position of *Profilicollis* Meyer, 1931 and *Hexaglandula* Petrochenko, 1950 (Acanthocephala: Polymorphidae) using cytochrome c oxidase (Cox 1). *J Parasitol.* 94(1):212-7.
- Lei Ching, H. 1989. *Profilicollis botulus* (Van Cleave, 1916) From diving ducks and shore crabs of british Columbia. *J. Parasitol.* 75 (1) 33-37.
- Martínez-Aquino, A., M. E. Reyna-Fabián, R. Rosas-Valdez, U. Razo-Mendivil, G. Pérez-Ponce de León y M. García-Varela. 2009. Detecting a complex of cryptic species within *Neoechinorhynchus golvani* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) inferred from ITSs and LSU rDNA gene sequences. *J. Parasitol.* 95(5) 1040-1047.
- Nickol, B.B., Crompton D.W.T. 1985. *Biology of the Acanthocephala.* Cambridge. University Press, London.
- Nickol, B.B., Crompton D.W. T., Searle, D.W. 1999. Reintroduction of *Profilicollis* Meyer, 1931, as a Genus in Acanthocephala: Significance of the Intermediate Host. *J. Parasitol.* 84(4) 716-718.
- Nickol, B.B., Heard, R.W., Smith, N.F. 2002. Acanthocephalans from crabs in the Southern United States, with the first intermediate hosts known for *Arhythmorhynchus frassoni* and *Hexaglandula corynosoma*. *J. Parasitol.* 88(1) 79-83.
- Perry, M.L. 1942. A new species of the acanthocephalan genus *Filicollis*. *J. Parasitol.*, 28 (5) 385-388.
- Petrochenko, V. 1. 1958. Acanthocephala of domestic and wild animals. Vol. II K.I. Skrjabin (ed.), Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow, 478p.
- Steinauer, M.L., Nickol, B.B., Ortí, G. 2007. Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of a highly variable acanthocephalan parasite. *Mol. Ecol.* 16(19) 4097-109.
- Schmidt, G.D. 1973. Resurrection of *Southwellina* Witenber, 1932, with a description of *Southwellina dimorpha* sp. n., and a key to genera in Polymorphidae (Acanthocephala). *J. Parasitol.* , 59(2) 299-305

Thompson, J.D., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* (25) 4876–4882.

Yamaguti, S., 1963. *Systema Helminthum*. Vol 5. Acanthocephala. Nueva York: Interscience.

ANEXO 1.

Técnica de tinción de Paracarmín de Mayer.

1. Los ejemplares conservados en formol al 4% o en OH al 70% deben de ser deshidratados en alcohol al 96% durante 15 minutos.
2. Teñir con paracarmín de mayer durante 10 minutos.
3. Lavar con alcohol al 96% para quitar el exceso de colorante.
4. Diferenciar con alcohol al 96% acidulado al 2% con HCl hasta que el parénquima de los ejemplares estén casi blancos o ligeramente rosados, los bordes transparentes y los órganos internos bien definidos.
5. Deshidratar en alcohol absoluto de 15 a 20 minutos.
6. Aclarar en salicilato de metilo, aceite de clavos o xilol.
7. Montar en resina o en bálsamo de Canadá.
8. Etiquetar.

*Previo a la tinción los organismos deben de ser limpiados del tejido que puedan tener en la proboscis y ser pinchados cuidadosamente en el tórax.

ANEXO 2

Protocolo de extracción de ADN con DNAzol

1. Digestión de los organismos en tubos de 0.5 ml con 100 μ l de la solución de digestión a 56°C durante toda la noche, tapar con Parafilm para evitar la evaporación.

Solución de digestión por 100 μ l por muestra:

Para preparar 1 ml

- 100 μ l de 100mM Tris HCl pH 7.6
 - 100 μ l de 200mM NaCl
 - 200 μ l de 0.5M EDTA pH 8.0
 - 100 μ l de 10% Sarkosyl
 - 10 μ l de Proteinasa K
 - 490 μ l de Agua ultrapura
2. Desactivar la Proteinasa k incubando los tubos a 95°C durante 15 minutos en el termociclador.
 3. Agitar los tubos. Centrifugar las muestras por 5 minutos a 10 000 rpm.
 4. Retirar el sobrenadante con una pipeta y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
 5. Agregar 1ml de DNAzol al tubo que contiene el sobrenadante y agitar el contenido por inversión.
 6. Añadir 4 μ l de Polyacrol.
 7. Agitar el contenido del tubo por inversión.
 8. Agregar 0.5 ml de etanol 100% y agitar.
 9. Incubar la muestra a temperatura ambiente por 5 minutos.
 10. Centrifugar a 7 mil rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 11. Remover el sobrenadante por decantación.

12. Lavar el DNA dos veces con 800 μ l de etanol al 75% (Retirando el sobrenadante por decantación). A 7 mil rpm por 5 minutos cada vez.
13. Centrifugar el tubo por unos segundos y remover el etanol restante con ayuda de una micropipeta.
14. Secar el tubo a temperatura ambiente.
15. Resuspender el DNA en 25 μ l de agua ultrapura.

ANEXO 3. Matriz de distancias genéticas expresadas en porcentaje.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 <i>P. cylindraceus</i>	-																	
2 <i>P. altmani</i> 1	30.0	-																
3 <i>P. altmani</i> 2	30.2	0.9	-															
4 <i>P. altmani</i> 3	30.2	0.9	01.5	-														
5 <i>P. altmani</i> 4	31.9	1.9	02.7	1.0	-													
6 <i>P. altmani</i> 5	29.9	1.0	01.3	0.4	1.5	-												
7 <i>P. botulus</i> 1	30.2	21.5	21.5	21.6	22.5	21.5	-											
8 <i>P. botulus</i> 2	30.0	21.2	21.0	21.2	21.7	21.0	0.6	-										
9 <i>H. corynosoma</i> 1	32.2	29.0	28.8	29.3	31.5	29.1	28.8	29.3	-									
10 <i>H. corynosoma</i> 2	32.6	29.4	29.3	29.7	31.9	29.6	29.3	29.7	0.4	-								
11 <i>H. corynosoma</i> 3	32.6	29.4	29.3	29.7	31.9	29.6	29.3	29.7	0.4	0.0	-							
12 <i>H. corynosoma</i> 4	32.6	29.4	29.3	29.7	31.9	29.6	29.3	29.7	0.4	0.0	0.0	-						
13 <i>H. corynosoma</i> 5	32.0	29.9	29.7	29.9	32.0	29.7	29.6	30.0	1.5	1.0	1.0	1.0	-					
14 <i>P. brevis</i> 1	28.2	29.9	29.4	29.9	31.0	29.4	25.0	24.8	25.8	25.8	25.8	25.8	25.6	-				
15 <i>P. brevis</i> 2	28.0	30.3	29.9	30.3	31.4	29.9	25.4	25.3	26.1	26.1	26.1	26.1	25.9	0.9	-			
16 <i>P. brevis</i> 3	28.2	30.0	29.6	30.0	31.2	29.6	25.3	25.1	26.1	26.1	26.1	26.1	25.9	0.9	0.9	-		
17 <i>S. hispida</i> 1	28.5	28.2	27.7	28.3	29.5	28.0	25.8	25.3	25.8	26.2	26.2	26.2	26.2	18.9	18.7	18.7	-	
18 <i>S. hispida</i> 2	29.3	27.9	28.2	28.0	29.1	27.9	25.4	25.0	25.9	26.4	26.4	26.4	26.7	20.0	19.8	19.8	4.5	-
19 <i>S. hispida</i> 3	29.4	28.5	28.5	28.7	29.7	28.5	25.6	25.1	26.5	27.0	27.0	27.0	27.3	20.4	20.3	20.3	4.7	1.0
20 <i>S. hispida</i> 9	29.3	28.2	28.2	28.3	29.3	28.2	25.1	24.7	26.1	26.5	26.5	26.5	26.8	19.6	19.5	19.5	4.2	0.6
21 <i>S. hispida</i> 12	29.3	28.2	28.2	28.3	29.4	28.2	25.4	25.0	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	19.8	20.0	20.0	4.7	0.7
22 <i>S. hispida</i> 11	29.6	27.9	28.2	28.0	29.1	27.9	25.4	25.0	25.8	26.2	26.2	26.2	26.5	20.0	19.8	19.8	4.5	0.6
23 <i>S. hispida</i> 5	29.1	28.2	28.2	28.3	29.3	28.2	25.4	25.0	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.5	0.9
24 <i>S. hispida</i> 20	29.0	28.3	28.3	28.5	29.5	28.3	25.4	25.0	26.4	26.8	26.8	26.8	27.1	19.8	19.6	19.6	4.7	0.7
25 <i>S. hispida</i> 22	28.8	28.2	28.2	28.3	29.5	28.2	25.4	25.0	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.5	0.9
26 <i>S. hispida</i> 21	29.0	28.2	28.2	28.3	29.4	28.2	25.4	25.0	26.1	26.5	26.5	26.5	26.8	20.1	20.0	20.0	4.4	0.7
27 <i>S. hispida</i> 14	29.3	28.0	28.3	28.2	29.3	28.0	25.6	25.1	26.1	26.5	26.5	26.5	26.8	20.1	20.0	20.0	4.7	0.4
28 <i>S. hispida</i> 15	29.1	28.2	28.2	28.3	29.4	28.2	25.3	24.8	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.5	0.6
29 <i>S. hispida</i> 19	29.1	28.2	28.2	28.3	29.4	28.2	25.3	24.8	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.5	0.6
30 <i>S. hispida</i> 23	29.0	28.0	28.0	28.2	29.1	28.0	25.3	24.8	25.8	26.2	26.2	26.2	26.5	19.5	19.3	19.3	4.7	0.7
31 <i>S. hispida</i> 8	29.1	28.2	28.2	28.3	29.4	28.2	25.3	24.8	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.5	0.6
32 <i>S. hispida</i> 18	29.1	28.2	28.2	28.3	29.4	28.2	25.3	24.8	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.5	0.6
33 <i>S. hispida</i> 17	29.1	27.9	27.9	28.0	29.0	27.9	25.3	24.8	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.8	0.9
34 <i>S. hispida</i> 16	29.7	28.2	28.5	28.3	29.5	28.2	25.6	25.1	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.8	0.7
35 <i>S. hispida</i> 6	29.1	28.2	28.2	28.3	29.4	28.2	25.3	24.8	26.2	26.7	26.7	26.7	27.0	20.0	19.8	19.8	4.5	0.6
36 <i>S. hispida</i> 10	29.4	27.9	28.2	28.0	29.2	27.9	25.3	24.8	25.9	26.4	26.4	26.4	26.7	19.8	20.0	19.6	4.8	0.6

37 <i>S. hispida</i> 13	29.6	28.0	28.3	28.2	29.3	28.0	25.4	25.0	26.1	26.5	26.5	26.5	26.7	19.5	19.6	19.3	5.0	0.7
38 <i>S. hispida</i> 4	29.3	27.9	28.2	28.0	29.1	27.9	25.4	25.0	25.9	26.4	26.4	26.4	26.7	20.0	19.8	19.8	4.5	0.0
39 <i>S. hispida</i> 7	29.3	27.9	28.2	28.0	29.1	27.9	25.4	25.0	25.9	26.4	26.4	26.4	26.7	20.0	19.8	19.8	4.5	0.0

	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
19 <i>S. hispida</i> 3	-																	
20 <i>S. hispida</i> 9	0.7	-																
21 <i>S. hispida</i> 12	0.6	0.45	-															
22 <i>S. hispida</i> 11	1.0	0.30	0.76	-														
23 <i>S. hispida</i> 5	0.7	0.61	0.45	0.91	-													
24 <i>S. hispida</i> 20	0.6	0.45	0.30	0.76	0.45	-												
25 <i>S. hispida</i> 22	0.7	0.61	0.45	0.91	0.30	0.45	-											
26 <i>S. hispida</i> 21	0.6	0.45	0.30	0.76	0.45	0.30	0.45	-										
27 <i>S. hispida</i> 14	0.9	0.45	0.61	0.45	0.76	0.61	0.76	0.61	-									
28 <i>S. hispida</i> 15	0.4	0.30	0.15	0.61	0.30	0.15	0.30	0.15	0.45	-								
29 <i>S. hispida</i> 19	0.4	0.30	0.15	0.61	0.30	0.15	0.30	0.15	0.45	0.00	-							
30 <i>S. hispida</i> 23	0.9	0.45	0.61	0.76	0.76	0.61	0.76	0.61	0.61	0.45	0.45	-						
31 <i>S. hispida</i> 8	0.4	0.30	0.15	0.61	0.30	0.15	0.30	0.15	0.45	0.00	0.00	0.458	-					
32 <i>S. hispida</i> 18	0.4	0.30	0.15	0.61	0.30	0.15	0.30	0.15	0.45	0.00	0.00	0.458	0.00	-				
33 <i>S. hispida</i> 17	1.0	0.61	0.76	0.91	0.91	0.76	0.91	0.76	0.76	0.61	0.61	0.763	0.61	0.61	-			
34 <i>S. hispida</i> 16	1.2	0.76	0.91	0.76	1.06	0.91	1.06	0.91	0.61	0.76	0.76	0.916	0.76	0.76	1.06	-		
35 <i>S. hispida</i> 6	0.4	0.30	0.15	0.61	0.30	0.15	0.30	0.15	0.45	0.00	0.00	0.458	0.00	0.00	0.61	0.76	-	
36 <i>S. hispida</i> 10	1.0	0.61	0.76	0.61	0.91	0.76	0.91	0.76	0.45	0.61	0.61	0.763	0.61	0.61	0.91	0.76	0.61	-
37 <i>S. hispida</i> 13	1.2	0.76	0.91	0.76	1.06	0.91	1.06	0.91	0.61	0.76	0.76	0.916	0.76	0.76	1.06	0.91	0.76	0.45
38 <i>S. hispida</i> 4	1.0	0.61	0.76	0.61	0.91	0.76	0.91	0.76	0.45	0.61	0.61	0.763	0.61	0.61	0.91	0.76	0.61	0.61
39 <i>S. hispida</i> 7	1.0	0.61	0.76	0.61	0.91	0.76	0.91	0.76	0.45	0.61	0.61	0.763	0.61	0.61	0.91	0.76	0.61	0.61

	37	38	39
37 <i>S. hispida</i> 13	-		
38 <i>S. hispida</i> 4	0.76	-	
39 <i>S. hispida</i> 7	0.76	0.00	-