



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
SISTEMÁTICA

**SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DEL GÉNERO *Syndesmis*  
(FRANCOIS, 1886) (PLATYHELMINTHES: RHABDOCELA:  
UMAGILLIDAE) SIMBIONTES DE EQUINOIDEOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
**BIÓL. NALLELY GEORGINA RUIZ TORRES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: M. EN C. LUIS GARCÍA PRIETO**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSARIO MATA LÓPEZ**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, Cd.Mx.

AGOSTO, 2017



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
SISTEMÁTICA

**SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DEL GÉNERO *Syndesmis*  
(FRANCOIS, 1886) (PLATYHELMINTHES: RHABDOCELA:  
UMAGILLIDAE) SIMBIONTES DE EQUINOIDEOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
**BIÓL. NALLELY GEORGINA RUIZ TORRES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: M. EN C. LUIS GARCÍA PRIETO**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSARIO MATA LÓPEZ**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, Cd.Mx.

AGOSTO, 2017



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de mayo de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RUIZ TORRES NALLELY GEORGINA** con número de cuenta 302226863 con la tesis titulada "**Sistemática filogenética del género *Syndesmis* (Francois, 1886) (Platyhelminthes: Rhabdocela: Umagillidae) simbioses de equinoideos**", realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA**:

Presidente: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUZMÁN CORNEJO  
Secretario: M. EN C. LUIS GARCÍA PRIETO  
Suplente: DRA. LORENA GARRIDO OLVERA  
Suplente: DRA. ROSARIO MATA LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 31 de julio de 2017.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (583329) para la realización de mis estudios de maestría.

Al programa de Apoyos de Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento para una estancia de investigación.

Al Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa por fungir como mi tutor principal.

A la Dra. Rosario Mata López y al M. en C. Luis García Prieto por sus valiosas aportaciones como mi Comité Tutoral.

## ÍNDICE

<b>Lista de figuras y cuadros</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>4</b>
I.    Sistemática filogenética	4
II.   Phylum Platyhelminthes Minot, 1876	6
III.  Clase Turbellaria	7
IV.  Familia Umagillidae (Platyhelminthes, Rhabdocoela) y su posición filogenética	10
V.   Código de Barras Genético (mini-barcode) y su uso en el reconocimiento de especies en platelmintos no-Neodermata.	13
<b>Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>Objetivos</b>	<b>15</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>16</b>
I.    Recolecta de hospederos y planarias simbioses	16
II.   Técnicas morfológicas	18
III.  Técnicas moleculares	19
IV.  Análisis Filogenéticos	22
V.   Distancias genéticas	24
<b>Resultados</b>	<b>25</b>
I.    Registro de planarias simbioses.	25
II.   Descripción morfológica de las especies de <i>Syndesmis</i> Francois, 1886	27
III.  Filogenia molecular del género <i>Syndesmis</i> Francois, 1886.	41
IV.  Divergencia genética intraespecífica e interespecífica de las especies <i>Syndesmis</i>	43
V.   Filogenia molecular del infraorden Neodalyellida	44
<b>Discusión General</b>	<b>46</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>52</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>53</b>
<b>Anexos</b>	<b>63</b>

## Lista de figuras y cuadros

Figura 1. Árbol de las relaciones filogenéticas de los platelmintos, con base en el gen ribosomal 18S.	8
Figura 2. Hipótesis filogenética bajo Inferencia Bayesiana del Orden Dalytyphloplanida, con base en los genes concatenados 18S+28S rADN.	9
Figura 3. Esquema que muestra la morfología interna de <i>Syndesmis</i> sp.	11
Figura 4. Distribución geográfica de las especies del género <i>Syndesmis</i> .	13
Figura 5. Localidades de recolecta de los erizos de mar (Echinoidea) hospederos de las planarias analizadas en el presente estudio.	16
Figura 6. Mapa de localidades de recolecta de <i>Syndesmis</i> spp. del el presente estudio.	26
Figura 7. Vista ventral de un organismo completo de <i>Syndesmis collongistyla</i> , recolectado en las costas de Veracruz, México.	29
Figura 8. Lámina de estructuras morfológicas de <i>Syndesmis collongistyla</i> .	30
Figura 9. Vista ventral de un organismo completo de <i>Syndesmis franciscana</i> , recolectado en las costas de Goleta Pier, California, EUA.	33
Figura 10. Lámina de estructuras morfológicas de <i>Syndesmis franciscana</i> .	34
Figura 11. Vista ventral de un organismo completo de <i>Syndesmis n. sp.</i> , recolectado en las costas de Oaxaca, México.	37
Figura 12. Lámina de estructuras morfológicas de <i>Syndesmis n. sp.</i>	40
Figura 13. Filogenia molecular del género <i>Syndesmis</i> Francois, 1886.	42
Figura 14. Filogenia molecular del Infraorden Neodalyellida.	45

## Lista cuadros

Cuadro 1. Lista de especies validas para el género <i>Syndesmis</i> .	12
Cuadro 2. Número de hospederos revisados en el presente trabajo en las localidades muestreadas.	17
Cuadro 3. Holotipos revisados del género <i>Syndesmis</i> .	19
Cuadro 4. Oligonucléotidos utilizados en el presente estudio.	21
Cuadro 5. Lista de matrices y objetivo de cada una en el presente estudio.	22
Cuadro 6 Hospederos y simbioses obtenidos en el presente estudio.	25
Cuadro 7. Composición específica del género <i>Syndesmis</i> Francois, 1886, presentando sus caracteres diagnósticos, hospederos y localidades.	38
Cuadro 8. Distancias genéticas entre las especies del género <i>Syndesmis</i> analizadas en el presente estudio.	43

## Resumen

El origen de las relaciones simbióticas ha sido uno de los temas de mayor interés dentro de la biología evolutiva. En este sentido, el phylum Platyhelminthes es considerado un grupo modelo para investigar la radiación adaptativa y relaciones evolutivas de los organismos que han desarrollado este tipo de asociaciones. Un número reducido de hipótesis filogenéticas con base en datos moleculares han incluido organismos considerados “transicionales” entre los organismos de vida libre y los parásitos estrictos, los cuales pueden ser piezas claves para investigar las relaciones evolutivas y evolución de las asociaciones en el grupo. Uno de estos grupos “transicionales” es el género *Syndesmis*, el cual pertenece a la familia Umagillidae, la más numerosa de turbelarios simbióticos con 68 especies válidas, la mayoría de ellas asociadas a equinodermos. Las especies del género *Syndesmis* han sido escasamente estudiadas a nivel mundial, lo cual es particularmente evidente en México en donde sabemos relativamente poco sobre su distribución, taxonomía, historia evolutiva, así como sobre las especies de equinodermos a las que se asocia. Por tal motivo en el presente trabajo se investigó la posición filogenética de tres especies: *Syndesmis franciscana* (asociada a *Strongylocentrotus franciscanus* y *Strongylocentrotus purpuratus*, California, E.U.A), *Syndesmis collongistyla* (asociada a *Echinometra lucunter*, Veracruz, México) y una especie nueva recolectada en las costas de Oaxaca (asociada al equinodermo *Echinometra vanbrunti*), dentro del infraorden Neodalyellida. Para ello se utilizaron los genes ribosomales 18S rDNA y 28S rDNA aplicando de métodos de inferencia filogenética robustos (Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana). Nuestros resultados establecen la pertenencia del género *Syndesmis* a la familia Umagillidae y confirman la monofilia de ésta, lo cual es congruente con la taxonomía tradicional basada en morfología, al presentar sus integrantes un órgano copulador con estilete esclerotizado. De la misma forma, la aparición de las formas simbióticas en distintas ramas de los árboles filogenéticos sugiere orígenes múltiples de estas asociaciones entre los neodaliyelidos.

La identificación morfológica de las planarias fue complementada con el estudio del material tipo de 15 especies del género depositadas en el National Museum of Natural History Collections (USNM). A partir de este análisis se detectaron tres nuevos caracteres que proponemos sean utilizados en la identificación de las especies: ancho y forma de la base del estilete del pene; forma de los cilios del epitelio y de las células de la epidermis. Finalmente, la diversidad genética interespecífica evaluada con los marcadores mitocondriales: citocromo C oxidasa subunidad I (COI) y citocromo b (Cyt b), señala una alta divergencia; mientras que la variación genética intraespecífica de las poblaciones estudiadas del Golfo de México, identifican que pertenecen a una sola especie, ya que se encontró nula variación entre las poblaciones a pesar de estar separadas entre sí por más de 500 kilómetros.

## Abstract

The origin of symbiotic relationships has been a trending topic in evolutionary biology. Just a few phylogenetic hypotheses had considered organisms referred as “transitional” which are key parts in the understanding of evolutive relationships in the phylum plathelminths. *Syndesmis* belongs to this group of organisms and has not been extensively studied. Our objective was to find the phylogenetic position of three species; *Syndesmis franciscana* (*Strongylocentrotus franciscanus* y *Strongylocentrotu purpuratus*, California, E.U.A), *Syndesmis collongistyla* (*Echinometra lucunter*, Veracruz, México) and a new species collected in Oaxaca associated with the echinometra vanbrunti. To do this we analyzed 18S and 28S rDNA sequences using robust phylogenetic inference methods (Parsimony, Maximum likelihood and Bayesian inference). We found out that *Syndesmis* is located inside Umagillidae family and support the monophyly of the family; this is also consistent with traditional taxonomy since they have a copulative organ with estilete esclerotizado. Finally the different phylogenetic positions suggest multiple origins inside neodalyellos since they implement different feeding strategies.

Morphological identification of planarias was complemented with the study of the type material of 15 species of the genus *Syndesmis*, deposited in the USNM (National Museum of Natural History) collection. From this analysis we detected three new characters which we propose to be used in the identification of the species: width and shape of the base of the penile stylet; and form of the epithelium cilia and epidermal cells. Finally, the interspecific genetic diversity evaluated with the mitochondrial markers: cytochrome C oxidase subunit I (COI I) and cytochrome b (Cyt b), indicates a high divergence; while the intraspecific genetic variation of the studied populations from the Gulf of Mexico, suggest that they belong to a single species, since there was null variation among the populations in spite of being separated from each other by more than 500 kilometers.

## Introducción

### I. Sistemática Filogenética

Desde la publicación del libro “El Origen de las especies” por Charles Darwin en 1859, se suscitó un quiebre epistémico sobre la conceptualización de las especies y cómo los seres vivos evolucionan a partir de ancestros comunes (Delsuc, et al., 2005); sin embargo, existe mucha discusión sobre la validez de trazar el desarrollo de la sistemática filogenética a partir del trabajo de Darwin (Desalle et al., 2002). El establecimiento de la sistemática filogenética como rama formal de la biología fue a partir de la contribución del entomólogo alemán Willi Hennig (1913-1976). Las obras de Hennig produjeron cinco planteamientos básicos: 1) Las relaciones que proporcionan la cohesión de organismos vivos y extintos, son relaciones genealógicas, 2) Este tipo de relaciones existen para el individuo dentro de las poblaciones, poblaciones dentro de las especies y entre las mismas especies, 3) Todos los demás tipos de relaciones (e.g., similitud, ecología) tienen una máxima relevancia cuando son comprendidos bajo un contexto de genealogía descendiente, 4) La descendencia genealógica entre las especies puede recuperarse mediante la búsqueda de caracteres particulares (innovaciones evolutivas o sinapomorfias) que documenta estas relaciones. Además, no todas las similitudes que surgen a través de descendencia son igualmente aplicables a descubrir relaciones particulares; unas son aplicables a un determinado nivel de investigación, mientras que otras son aplicables a diferentes niveles de pregunta y 5) De las muchas maneras de clasificar organismos, el mejor sistema de referencia es el que refleje las relaciones genealógicas de las especies por clasificar.

Hennig (1950, 1966) y otros autores han replanteado estas cinco ideas, aunque algunos conceptos siguen siendo básicos en esta disciplina (i.e. monofilia, apomorfia y plesiomorfia) y otros se han descartado o refinado. Hoy en día, la sistemática filogenética es una de las escuelas principales de la taxonomía; considera que una clasificación natural es aquella basada en relaciones genealógicas, siendo una de sus grandes misiones reconstruir y proporcionar detalles sobre el árbol de la vida (Schmitt, 2016).

Actualmente dentro de la biología, la sistemática filogenética se ha convertido en un campo muy dinámico y en constante diversificación; este empuje y renovación simultáneos son debidos, al menos, al establecimiento de la cladística como principal método para inferir las relaciones filogenéticas, donde las especies son las unidades fundamentales de la sistemática y de los estudios ecológicos y evolutivos. Tradicionalmente, el reconocimiento de las especies se ha basado en caracteres morfológicos presentes en los organismos, aunque en grupos con variación morfológica reducida dicho reconocimiento resulta problemático. La solución de este problema ha avanzado recientemente gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular y genómica, revolucionado el campo de la sistemática (Wheeler & Giribet, 2016).

Los métodos filogenéticos basados en caracteres más empleados son Parsimonia (P), Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). En el método de Parsimonia, los datos son comprendidos como sitios individuales de nucleótidos o caracteres, el objetivo es encontrar un árbol con el menor número de pasos (cambios), es decir el principio de parsimonia afirma que la explicación más simple es preferible a las más complejas. La mayoría de los filogenetistas encuentran este principio apropiado en la elección de árboles evolutivos con el fin de minimizar el número de pasos evolutivos para explicar un conjunto de datos (Kannan & Wheeler, 2012). Entre las ventajas de la parsimonia está que es un método relativamente sencillo de comprender, ha sido ampliamente estudiado matemáticamente y se han creado programas de cómputo muy potentes. Las limitantes de utilizar Parsimonia son que puede proporcionar información engañosa cuando las tasas de cambio nucleotídicos varían en las diferentes ramas de un árbol, representadas por los datos de las secuencias. Estas variaciones producen una gama de longitudes en las ramas, con ramas largas que representan periodos largos o tasas de sustitución elevadas, provocando el problema de *long branch attraction* (LBA) (Mount, 2008).

Los métodos probabilísticos (ML e IB), representan un enfoque paramétrico para el estudio de la filogenia, y su criterio para evaluar las topologías de los árboles se calcula con referencia a un modelo evolutivo explícito. Felsenstein (1981) fue el primero en proponer un algoritmo en el análisis de ML en secuencias de ADN; este método ha sido especialmente preciso para la construcción de filogenias moleculares. Una ventaja bajo del enfoque de ML es la posibilidad de comparar los diferentes árboles y modelos evolutivos dentro de un marco estadístico; sin embargo, al igual que otros métodos que se basan en un criterio de optimalidad, ML se ve obstaculizado por las dificultades computacionales al obtener el árbol más óptimo incluso con datos relativamente sencillos, principalmente porque no solo depende de la topología del árbol, sino también de otros parámetros, incluyendo longitudes de rama (Guindon & Gascuel, 2003).

La inferencia Bayesiana es una poderosa herramienta filogenética que hizo frente a una serie de preguntas complejas de la biología evolutiva. A pesar de usar los mismos modelos de evolución que ML, IB está basada en la probabilidad posterior que es interpretada como la probabilidad de encontrar el árbol correcto, es decir el árbol con la mejor probabilidad posterior es elegida como la mejor estimación filogenética, esto se calcula con una serie de modelos de Markov, de la evolución estándar de los caracteres (Huelsenbeck et al., 2001).

## II. Phylum Platyhelminthes Minot, 1876

El phylum Platyhelminthes (del griego platy = plano y helminto = gusano) incluye entre 29,500 a 30,000 especies, algunas de ellas figuran entre las especies más importantes desde un punto de vista ecológico, médico y económico (Caira & Littlewood, 2013). Son gusanos simples, vermiformes, triploblásticos, no segmentados (Cestoda incluye especies con estróbilo), con simetría bilateral, aplanados dorsoventralmente y con un aparato digestivo incompleto (Brusca et al., 2016). Se distribuyen en una gran variedad de ambientes; las formas de vida libre se pueden encontrar en ambientes marinos, de agua dulce y húmedos terrestres; mientras que la mayoría de las especies incluidas en el infraorden Neodermata son parásitos de vertebrados con ciclos de vida complejos (Aguado et al., 2016); además existen algunas formas comensales ó parasitas de otros invertebrados, la mayoría marinos (Felty, 2007).

A pesar de presentar una morfología relativamente simple, los platelmintos exhiben novedades evolutivas únicas dentro de los Metazoa, como una tercera carpa germinal, simetría bilateral, cefalización y órganos y sistemas sofisticados y tendencia a la centralización del sistema nervioso (Brusca et al., 2016); lo anterior ocasionó radiaciones importantes dentro del grupo (Littlewood & Waeschenbac, 2015).

Tradicionalmente, los platelmintos se han considerado un phylum independiente que comprende a cuatro clases: Monogenea, Trematoda, Cestoda y Turbellaria (Hyman, 1951); posteriormente Ehlers (1985) con base en caracteres morfológicos, dividió al phylum en tres grupos: Acoelomorpha (Acoelela+Nemertodermatida), Cataenulida y Rhabditophora (incluyendo a las formas parasitas). Con el acceso a un mayor número de datos moleculares (secuencias de ADN) y el incremento en las investigaciones sobre las relaciones filogenéticas dentro del phylum, se estableció fuertemente la monofilia de Cataenulida y Rhabditophora, dejando a los Acoelomorfos como el clado basal de animales bilaterales y excluyéndolos de los “gusanos planos” y dando una visión nueva sobre el phylum (Littlewood & Waeschenbac, 2015).

Dentro de los platelmintos , las relaciones entre los Rhabditophoros aún no están resueltas a pesar de décadas de estudios; únicamente queda bien soportada la monofilia de la infraclase Neodermata, un grupo formado por los parásitos estrictos y que incluye a los monogeneos, trematodos y cestodos. Neodermata se caracteriza por presentar varias sinapomorfias, como la presencia de receptores sensoriales en la región anterior del cuerpo, incorporación de axonema en los espermatozoides, integración de hospederos vertebrados en sus ciclos de vida y el reemplazo de una epidermis ciliada en su etapa larval por una neodermis (Baguña & Riutort, 2004). La neodermis es la estructura más característica de Neodermata y de acuerdo con Tyler & Tayles (1997) presenta cuatro características fundamentales: ser sincitial, carecer de cilios, presentar núcleos por debajo de la membrana basal y debe contener múltiples ramificaciones entre la membrana basal y la capa superficial.

Las hipótesis filogenéticas más recientes, realizadas con base en datos moleculares, mitogenomas, genomas y transcriptomas, otorgan un cúmulo de información muy extenso que permite dar una nueva visión acerca de las interrelaciones de los gusanos planos (Solà et al., 2015); tal es el caso de los estudios realizados por Laumer et al. (2015) y Egger et al. (2015), en los cuales recuperan nuevamente la monofilia de Neodermata; sin embargo, la clase Cestoda resultó estar más relacionada con Trematoda que con Monogenea, rechazando el concepto de la utilización de Cercomeromorpha.

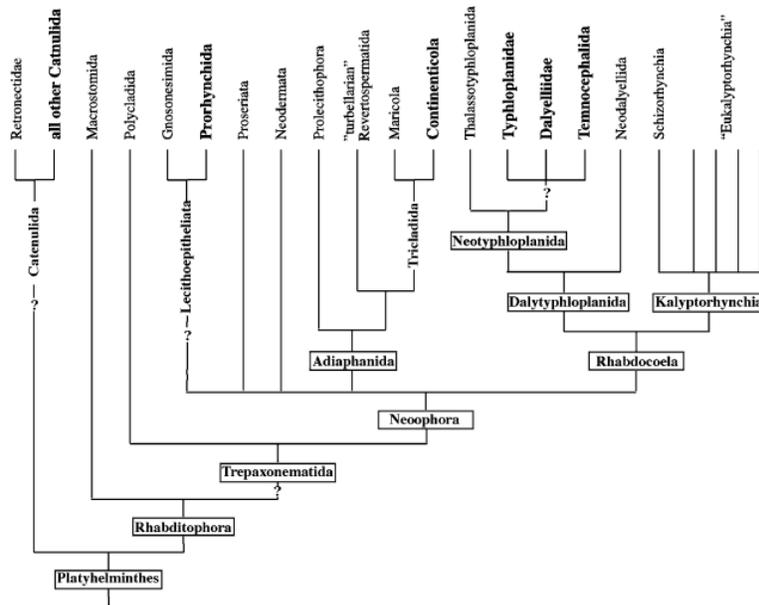
Los 12 órdenes incluidos en el Subphylum Rhabditophora: Haplopharyngia, Macrostomida, Polycladida, Prorhynchida, Gnosonesimora, Dalytyphloplanida, Kalptorhynchia, Unguiphora, Lithophora, Tricladida, Prolecithophora y Fecampiida, son conocidos como turbelarios. Sus interrelaciones filogenéticas aún están lejos de comprenderse por el número reducido de organismos de los distintos taxones incluidos en los análisis y la falta de estudios morfológicos en la mayoría de los grupos (Brusca et al., 2016; Aguado et al., 2016).

### **III. Clase Turbellaria**

Los miembros de la clase Turbellaria, están caracterizados principalmente por presentar una epidermis ciliada, la cual es considerada como un carácter plesiomórfico; son principalmente animales acuáticos de vida libre, con un aparato digestivo carente de ano y un relleno sólido de masa celular mesenquimal entre la epidermis y el intestino, sin embargo, éste representa un grupo consistentemente recuperado como parafilético (Katayama, 1996; Riutort, 2014).

La clase está dividida en 12 órdenes (dependiendo de los autores), incluidos en el subphylum Rhabditophora, uno de los grupos monofiléticos establecidos en las distintas inferencias filogenéticas para los platelmintos (Laumer et al., 2015). Dentro de los Rhabditophora los órdenes de los turbelarios fueron divididos en Archoophoros (con gónadas femeninas homocelulares, huevos entolecíticos y segmentación espiral cónica) y Neophoros (gónadas femeninas heterocelulares y embriones ectolecíticos); sin embargo, existen muchas discrepancias en la conformación de los Rhabditophora (Riutort, 2012).

De forma esquemática, Schockaert et al. (2006) combinan distintos cladogramas bajo diferentes enfoques filogenéticos para evaluar y generar información congruente para la interpretación de los órdenes de los turbelarios; sin embargo existen muchas dudas por las inconsistencias en la información y el bajo soporte de clados, quedando aún por responderse numerosas preguntas sobre la filogenia de este grupo (Fig. 1).



**Figura 1.** Árbol de las relaciones filogenéticas de los platelmintos, basado en el gen ribosomal 18S, (tomado de Schockaert et al., 2006).

Entre los grupos más estudiados está la clase Rhabdocoela Ehrenberg, 1831. El primer trabajo sistemático dentro de esta clase (taxón más numeroso, con alrededor de 1,530 especies) fue realizado por Willems et al. (2005) con base en caracteres moleculares (secuencias del gen 18S rDNA). De acuerdo con este estudio, Rhabdocoela forma un grupo monofilético conformado por dos taxones: Kalyptorhynchia Graff, 1905 y Dalytyphloplanida Willems, Wallberg, Jondelius, Littlewood, Backeljau, Schockaert, & Artois, 2006. Esta hipótesis contradice la filogenia propuesta por Ehlers (1985) basada en caracteres morfológicos. Recientemente Steenkiste et al., (2013), incorporando organismos simbiotes y comensales, así como marinos y de agua dulce, realizaron un análisis filogenético de la superfamilia de turbelarios Dalytyphloplanida; para ello utilizaron la secuencias completas del gen 18S rDNA y secuencias parciales del 28S rDNA bajo un enfoque de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, de un total de 168 especies (81 marinas, 76 de agua dulce y 11 simbiotes). Estos autores concluyeron que las relaciones simbióticas en el grupo ocurrieron cuatro veces independientemente dentro de Dalytyphloplanida, determinando con ello que muchas de las familias tradicionales no son monofiléticas. No obstante, tales autores sugieren que los clados formados pueden ser reconocidos formalmente con base en su propuesta filogenética (Fig. 2), pero ésta debe estar respaldada por estudios morfológicos exhaustivos para cada grupo establecido.

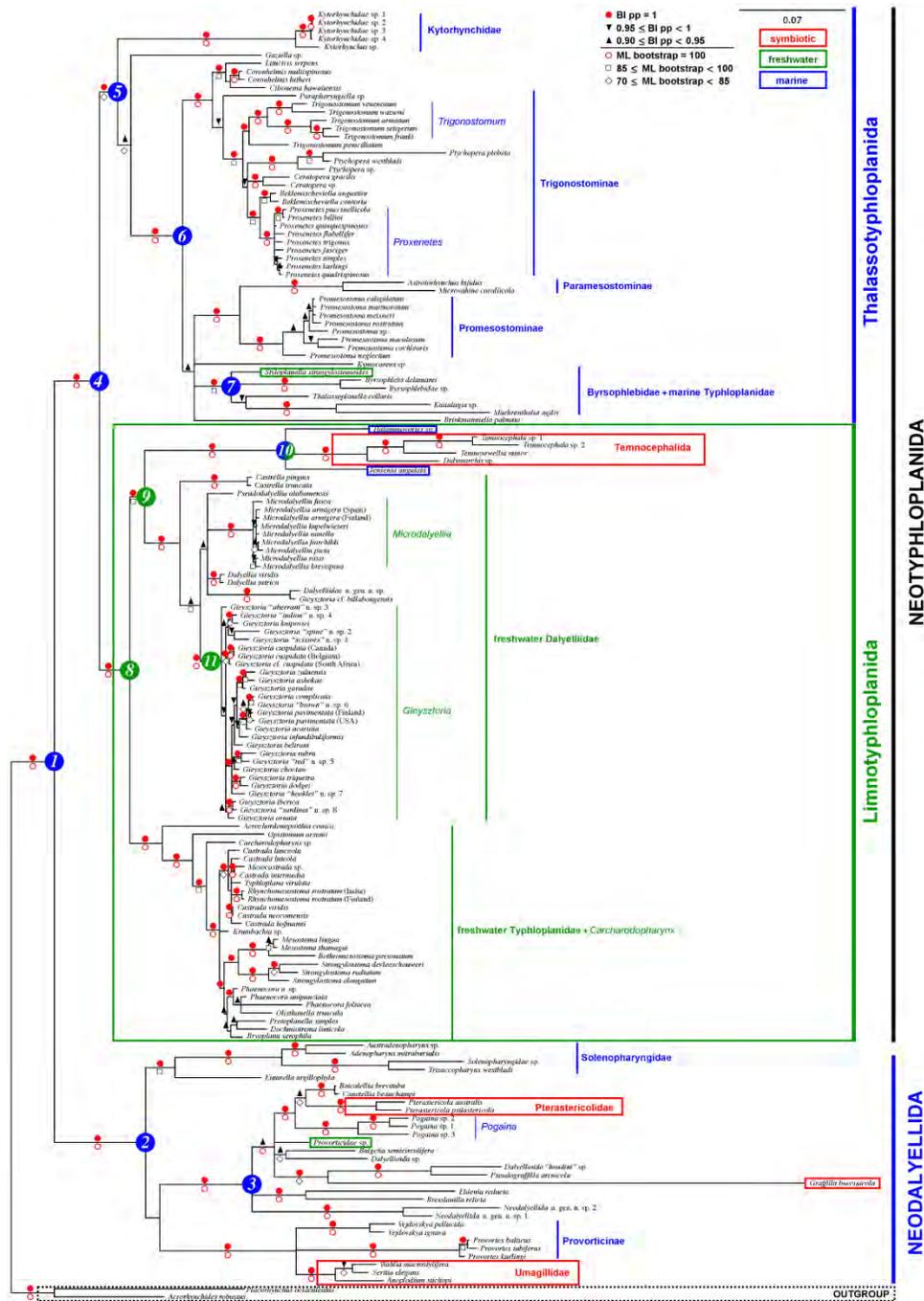


Figura 2. Hipótesis filogenética bajo Inferencia Bayesiana del orden Dalytyphloplanida, basado en los genes concatenados 18S+28S rADN (tomado de Steenkesten, 2013).

#### IV. Familia Umagillidae (Platyhelminthes, Rhabdocoela) y su posición filogenética

Numerosas hipótesis se han propuesto para explicar el origen de los principales linajes de parásitos (Neodermata) y simbioses dentro de los platelmintos. Un punto clave para entender el origen y la evolución de los Neodermata es el identificar dentro de los platelmintos no-Neodermata a su grupo hermano (Littlewood et al., 1999, 2001). En la mayoría de los análisis pre-cladísticos, una aproximación consistía en investigar a los organismos con características ecológicas intermedias (simbioses y foréticos) y asumir que estas características eran transicionales entre los organismos de vida libre y los estrictamente parásitos (Rohde, 1994, Jennings, 1997, Littlewood et al., 2001a).

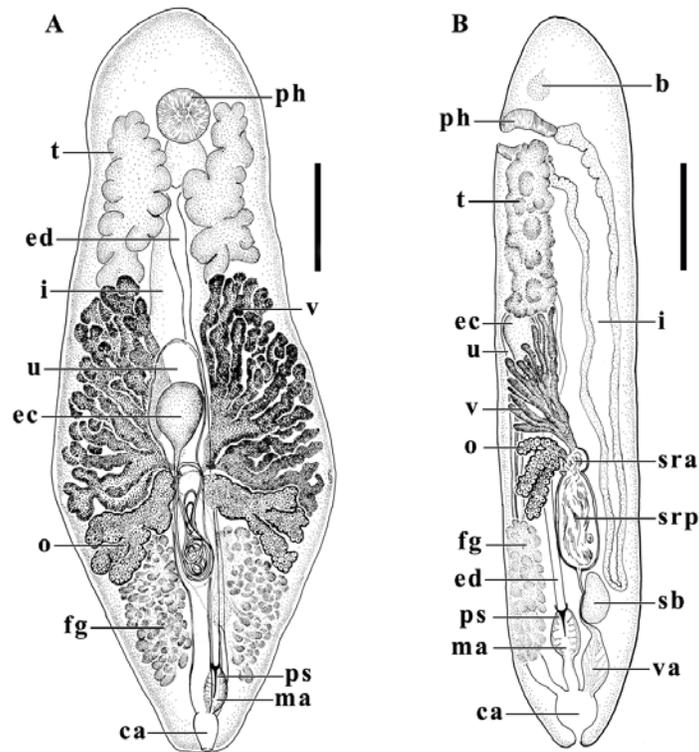
Sin embargo, todos estos estudios no han incluido a uno de los grupos más grandes de turbelarios simbioses, la familia Umagillidae Wahl, 1910 (Platyhelminthes, Rhabdocoela), con un total de 68 especies válidas (Doignon & Artois, 2006). Este grupo de rhabdocelos habitan el celoma o tubo digestivo de los equinodermos y en algunos casos de sipuncúlidos. Las características de la relación simbiótica de los umagillidos con sus huéspedes ha sido motivo de controversia; mientras que unos autores los consideran como comensales (Hyman 1955; Snyder 1980), otros han informado que su alimentación está basada en los tejidos y fluidos del cuerpo del huésped o del contenido del tubo digestivo, por lo que son tratados aparentemente como endoparásitos (Shinn 1981; Cannon 1982); más recientemente, Jennings (1997) afirma que los umagillidos representan una transición completa de la depredación entozoica al endoparasitismo.

La familia Umagillidae es de especial interés, ya que constituye el grupo más numeroso de endosimbioses pertenecientes a la clase Turbellaria; la forma de vida de los miembros de esta familia ha servido como argumento a favor de la opinión generalmente aceptada de que los Neodermata se derivan de Rhabdocoela (Rohde, 1994, Jennings, 1997). Es interesante señalar que casi todos los umagillidos se asocian con equinodermos, los cuales son filogenéticamente próximos a los vertebrados (Jennings, 1997). Por tal motivo la naturaleza simbiótica de los umagillidos, se considera un elemento clave para entender el origen de las simbioses dentro del phylum Platyhelminthes. A pesar de lo anterior, la información sobre los umagillidos es muy escasa; por ejemplo, el ciclo de vida de estos organismos sólo está registrado para cuatro especies: *Anoplodium hymanae* Shinn, 1983 y *Whalia pulchella* Kozloff & Shinn, 1987, asociados con holoturoideos, *Fallacohospes inchoatus* Kozloff, 1965 a crinoideos y *Syndesmis franciscana* a equinodermos, por lo que el conocimiento de sus relaciones simbióticas es casi nulo, al igual de sus relaciones filogenéticas (Cannon, 1982).

Dentro de la familia Umagillidae se encuentra el género *Syndesmis* Sillman, 1881. En este género están incluidas 24 especies asociadas con equinodermos. *Syndesmis* ha sido escasamente estudiado a nivel mundial; para la región Neotropical únicamente se tiene el registro de *Syndesmis collongistyla* (Hertel et al., 1990) en Puerto Rico, Jamaica y Haití (Doignon & Artosis, 2006) y para la región Andina a

*Syndesmis patagonica* Brogger & Ivanov, 2010 de Puerto Madryn, Argentina (Brogger & Ivanov, 2010). Particularmente en México se sabe poco sobre su distribución, taxonomía, historia evolutiva y las especies de equinodermos a las que se asocia. El único estudio realizado hasta la fecha con este grupo fue efectuado por Pineda-López (1981), quien registró a *Syndesmis franciscana* en tres localidades del Pacífico mexicano: Mazatlán, Sinaloa, Las Peñas, Michoacán y Carrizalillo, Oaxaca, como simbiote del erizo de mar *Echinometra vanbrunti*.

De manera general, los miembros del género *Syndesmis* (Fig. 3) se caracterizan por presentar una morfología relativamente sencilla: cuerpo pequeño de menos de 1 cm, epidermis ciliada, con una faringe anterior, testículos lobulados en la tercera parte del cuerpo, ovarios dendríticos, pene cuticularizado provisto de estilete, útero largo y una cápsula del huevo con un largo filamento enrollado (Kozloff & Westervelt, 1987).



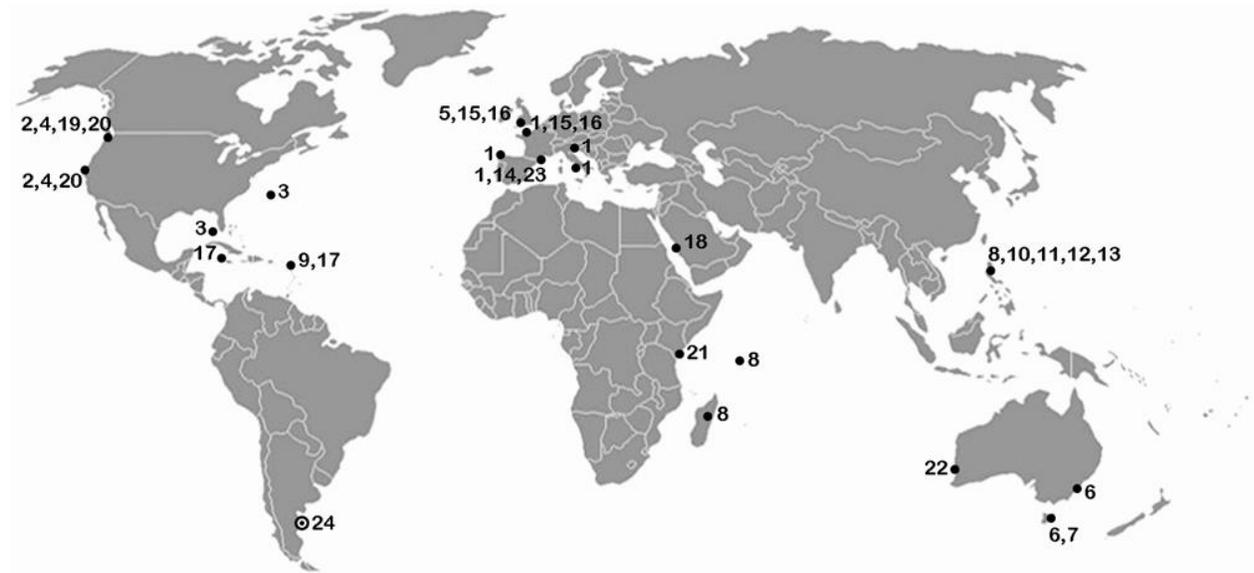
**Figura 3.** Esquema que muestra los órganos internos del género *Syndesmis*. A. *Syndesmis* completo, vista dorso-ventral. B. Reconstrucción sagital. Abreviaciones: b, cerebro; ca, atrio común; ec, capsula del huevo; ed, conducto eyaculador; fg, filamento glandular; i, intestino; ma, atrio masculino; o, ovario; sb, bursa seminal; sra, receptáculo seminal anterior; srp, receptáculo seminal poster; ph, faringe; ps, estilete del pene; t, testículo; u, útero; v, vitellarium; va, vagina (tomado de Brogger & Ivanov, 2010).

Los miembros del género se distribuyen en el Atlántico Norte, Pacífico Norte, Pacífico Occidental, Mediterráneo, Mar Rojo, Océano Indico, Golfo de México y Mar Caribe (Cuadro 1, Fig. 4) (Brogger & Ivanov, 2010).

Cuadro 1. Lista de especies válidas para el género <i>Syndesmis</i>			
Especie de <i>Syndesmis</i>	Hospedero	Localidad	Referencia
<i>Syndesmis echinorum</i>	<i>Paracentrotus lividus</i>	Banyuls/Marseilla/Roscoff (Francia), Galicia (España)	Francois, 1886; Kazloff & Westervelt, 1987; Briot, 1906; Barel & Kramers, 1970; Lamas Seco & Rodriguez Babio, 1978; Cifrian et al., 1992;
	<i>Sphaerechinus granularis</i>	Naples/Trieste (Italia), Umf (Croacia), Marseille/Banyuls (Francia)	Russo, 1895; Wahl., 1909; Von Graff, 1903; Briot, 1906; Kozloff & Westervelt, 1987
	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> <i>Psammechinus miliaris</i>	Alexandrowsk (Rusia) Galicia (España)	Von Graff, 1903 Lamas Seco & Rodriguez Babio, 1978
<i>Syndesmis franciscana</i>	<i>Strongylocentrotus franciscanus</i>	California (EUA)	Lehman; 1946, Giese, 1958; Jennings & Mettrick, 1968; Barnes, 1969; Jennings & Mettrick, 1969, Hertel et al., 1990
	<i>Strongylocentrotus pallidus</i>	Estado de Washington (EUA)	Orihel, 1952, Shinn, 1980, 1981, 1983, 1984; Shinn & Cloney, 1986
	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Estado de Washington (EUA)	Shinn, 1980, 1981, 1983, 1984, Shinn & Cloney, 1986; Westervelt & Kozloff, 1992; Shinn, 1993
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	California (EUA)	Lehman, 1946; Giense, 1958; Barnes, 1968; Mettrick & Boddington, 1972,
	<i>Lytechinus anamesus</i>	California (EUA)	Holt & Mettrick, 1975; Hertel et al., 1990 Barnes, 1969; Hertel et al., 1990
<i>Syndesmis antillarum</i>	<i>Diadema antillarum</i>	Dry Tortugas, Florida/Bermuda (EUA)	Powers, 1935; Stunkard & Corliss, 1951/ Snyder, 1980/Westblad, 1953
<i>Syndesmis dendrastrorum</i>	<i>Dendraster excentricus</i>	California/Estado de Washington (EUA)	Stunkard & Corliss, 1950, 1951; Smith, 1973/ Orihel, 1952; Shinn, 1981,1984,1988
<i>Syndesmis atriovillosa</i>	<i>Spatangus purpureus</i>	Plymouth (Inglaterra)	Westbland, 1953
<i>Syndesmis punicea</i>	<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	Tasmania/Sydney	Hickman, 1956/ McRae, 1959; Rodhe & Watson, 1988
	<i>Amblypneustes ovum</i>	Tasmania	Hickman, 1956
<i>Syndesmis pallida</i>	<i>Echinocardium cordatum</i>	Tasmania	Hickman, 1956
<i>Syndesmis glandulosa</i>	<i>Diadema setosum</i>	Madagascar/ Filipinas	Hyman, 1960/ Komschlies & Vande Vause & 1980
	<i>Echinothrix calamaris</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vause & 1980/ Martens & De Clerck, 1994
<i>Syndesmis evelinae</i>	<i>Echinometra lucunter</i>	Saint-Barthélémy	Marcus, 1968; Hertel et al.,1990; Hertel & Duszynski, 1991
<i>Syndesmis compacta</i>	<i>Echinometra oblonga</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vusse, 1980
<i>Syndesmis mammilata</i>	<i>Echinometra oblonga</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vusse, 1980
<i>Syndesmis philippinensis</i>	<i>Echinometra oblonga</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vusse, 1980
<i>Syndesmis alcalai</i>	<i>Heterocentrotus mammillatus</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vusse, 1980
<i>Syndesmis aethopharynx</i>	<i>Paracentrotus lividus</i>	Banyuls (Francia)	Westervelt & Kozloff, 1990
<i>Syndesmis albida</i>	<i>Echimus esculentus</i>	Plymouth (Inglaterra)/Roscoff (Francia)	Barel & Kramers, 1970; Westervelt & Kozloff, 1990
<i>Syndesmis rubida</i>	<i>Echimus esculentus</i>	Plymouth (Inglaterra)/Roscoff (Francia)	Geddes, 1880, Silliman, 1881; Cuétot, 1892, 1990; Shipley, 1901; Barel & Kramers, 1970; Westervelt & Kozloff, 1990
<i>Syndesmis collongistyla</i>	<i>Echinometra lucunter</i>	Saint-Berthélémy (Jamaica)	Hertel et al., 1990
	<i>Echinometra viridis</i> <i>Lytechinus variegatus</i>	Jamaica Jamaica/Puerto Rico/Haiti	Nappi & Crawford, 1984; Hertel et al., 1990 Ubelaker et al., 1988; Hertel et al., 1990; Vass & Nappi, 1998/ Hyman, 1960; Jones & Canton 1970/ Jones & Canton 1970
	<i>Lytechinus williamsi</i> <i>Tripneustes ventricosus</i>	Jamaica Puerto Rico	Hertel et al., 1990 Jones & Canton 1970
<i>Syndesmis inconspicua</i>	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Estado de Washington (EUA)	Orihel, 1952; Shinn, 1981, 1983, 1984; Westervelt & Kozloff, 1992
	<i>Strongylocentrotus pallidus</i>	Estado de Washington (EUA)	Shinn, 1981, 1983, 1984
<i>Syndesmis neglecta</i>	<i>Allocentrophus fragilis</i>	California/Estado de Washington (EUA)	Berger & Profant, 1960; Westervelt & Kozloff, 1992/ Giese, 1958; Boolootian et al., 1959/ Hyman, 1960
<i>Syndesmis longicanalis</i>	<i>Tripneustes gratilla</i>	Kenia	Moens & Martens, 1992, Gevaerts et al., 1993; Moens et al., 1994; Gevaerts et al., 1995
	<i>Toxopneustes pileolus</i>	Kenia	Moens & Martens, 1992, Gevaerts et al., 1993; Moens et al., 1994; Gevaerts et al., 1995
<i>Syndesmis cannoni</i>	<i>Ammotrophus gratilla</i>	Este de Australia	Jondelius, 1996
<i>Syndesmis echiniacuti</i>	<i>Echinus actutus</i>	Banyuls, Port-Vendres (Francia)	Francois, 1886, Kozloff, 1997

Con base en los esquemas de clasificación recientes, la familia Umagillidae conforma un grupo monofilético, sin embargo, el número de taxa incluidos (tres taxones en estos análisis es reducido como para emitir una conclusión sólida hasta el momento. La inclusión de especies de *Syndesmis* en un análisis

filogenético contribuiría a probar dicha monofilia y además, podría arrojar luz sobre la posición filogenética de la familia Umagillidae, una pieza clave para entender el origen de las relaciones simbióticas dentro de los platelmintos.



**Figura 4.** Distribución geográfica de las especies del género *Syndesmis*. 1. *Syndesmis echinorum*, 2. *S. franciscana*, 3. *S. antillarum*, 4. *S. dendrastrorum*, 5. *S. atriovillosa*, 6. *S. punicea* 7. *S. pallida*, 8. *S. glandulosa*, 9. *S. evelinae*, 10. *S. compacta*, 11. *S. mammilata* 12. *S. philippinensis*, 13. *S. alcalai*, 14. *S. aethopharynx*, 15. *S. albida*, 16. *S. rubida*, 17. *S. collongistyla*, 18. *S. obhoriensis*, 19. *S. inconspicua*, 20. *S. neglecta*, 21. *S. longicanalis*, 22. *S. cannoni*. 23. *S. echiniacuti*, 24. *S. patagónica* (tomado de Brogger & Ivanov, 2010).

#### V. Códigos de Barras Genéticas (barcodes) y su uso en el reconocimiento de especies en platelmintos no-Neodermata.

Ante la supuesta carencia de caracteres morfológicos que permitan la identificación específica de gusanos planos no-neodermatos, el uso de datos moleculares ha propiciado una nueva ruta que ha ayudado a contrarrestar tales limitantes y a reafirmar las determinaciones taxonómicas y sus relaciones filogenéticas dentro de estos grupos. Las primeras aproximaciones fueron llevadas a cabo exclusivamente con secuencias moleculares ribosomales 18S rDNA (Riutort et al. 1993, Joffe et al. 1995, Rohde et al. 1995, Campos et al. 1998) y 28S rDNA (Litvaitis & Rohde 1999); sin embargo, a medida que se intensificó el uso de esta región, muchas limitaciones fueron observadas, particularmente dificultades al realizar el alineamiento y bajas tasas de sustitución (Vanhove et al., 2013). Debido a lo anterior, se exploraron otros genes que proporcionaran información nueva, entre ellos el citocromo C oxidasa (COI), usado en la técnica de identificación molecular de organismos denominada “código de barras genético” (Hebert et al., 2003b).

Estos códigos son secuencias cortas (400-800 pb) estandarizadas de la región mitocondrial COI, que en principio deberían ser fácilmente generadas y caracterizadas para todas las especies. Dicha técnica es particularmente prometedora para taxones poco estudiados y para organismos donde la identificación morfológica es complicada; asimismo, ha mostrado su utilidad para identificar organismos que presentan dimorfismo sexual y estadios larvales, carentes de rasgos morfológicos (Kress & Erickson, 2008; Kvist, 2013).

Algunas de las características importantes del COI, que justifica su uso y practicidad es que siendo un gen mitocondrial, tiene herencia materna, carece de intrones, no experimenta recombinación y los primers universales están disponibles para gran parte del reino animal (Folmer et al., 1994, Hebert et al., 2003a); sin embargo es cuestionable (Stoeckle, 2003, Radulovici et al., 2010; Taylor & Harris, 2012). Otro gran atractivo es que las distancias genéticas intraespecíficas suelen ser más bajas que las distancias interespecíficas (Hebert et al., 2003b).

Entonces, ¿Cuál es el estado actual del código de barras genético en los gusanos planos no-neodermatos? A pesar de sus múltiples ventajas y que en otros grupos de invertebrados la utilización de códigos de barras genéticos ha sido muy común, en el caso de la mayoría de los platelmintos no-neodermatos su uso se continúa restringiendo debido principalmente a la escases de información molecular en las grandes bases de datos (GenBank y BOLD Systems), al fallido diseño de primers y a la alta contaminación, limitando estudios sobre aspectos filogeográficos, estructura poblacional y sobre todo en su objetivo principal, la identificación de especies y la detección especies crípticas (Vilas et al., 2005, Locke et al., 2010b, Nadler & Pérez-Ponce de León 2011, Jörger & Schrödl, 2013).

La historia taxonómica del género *Syndesmis* es particularmente compleja, debido a la aparente homogeneidad morfológica entre las especies y a la falta de acuerdo entre los autores sobre los caracteres diagnósticos (Doignon & Artois, 2006); adicionalmente, muchas descripciones originales son poco detalladas y ambiguas. En este sentido, uno de los objetivos del presente trabajo es evaluar el potencial de COI para proporcionar una base sólida para la distinción entre las especies del grupo.

## Hipótesis

La propuesta filogenética molecular más reciente sobre el infraorden Neodalyellida, establece la monofilia de esta familia Umagillidae con base en la inclusión de sólo tres especies. La incorporación de tres especies más, pertenecientes al género *Syndesmis*, no incluido previamente, permitirá poner a prueba la monofilia de la familia.

## Objetivos

### General:

Establecer mediante el uso de caracteres moleculares (genes 18S y 28S), la posición filogenética de tres especies de *Syndesmis* (Platyhelminthes: Umagillidae), simbioses de erizos de mar, dentro del infraorden Neodalyellida.

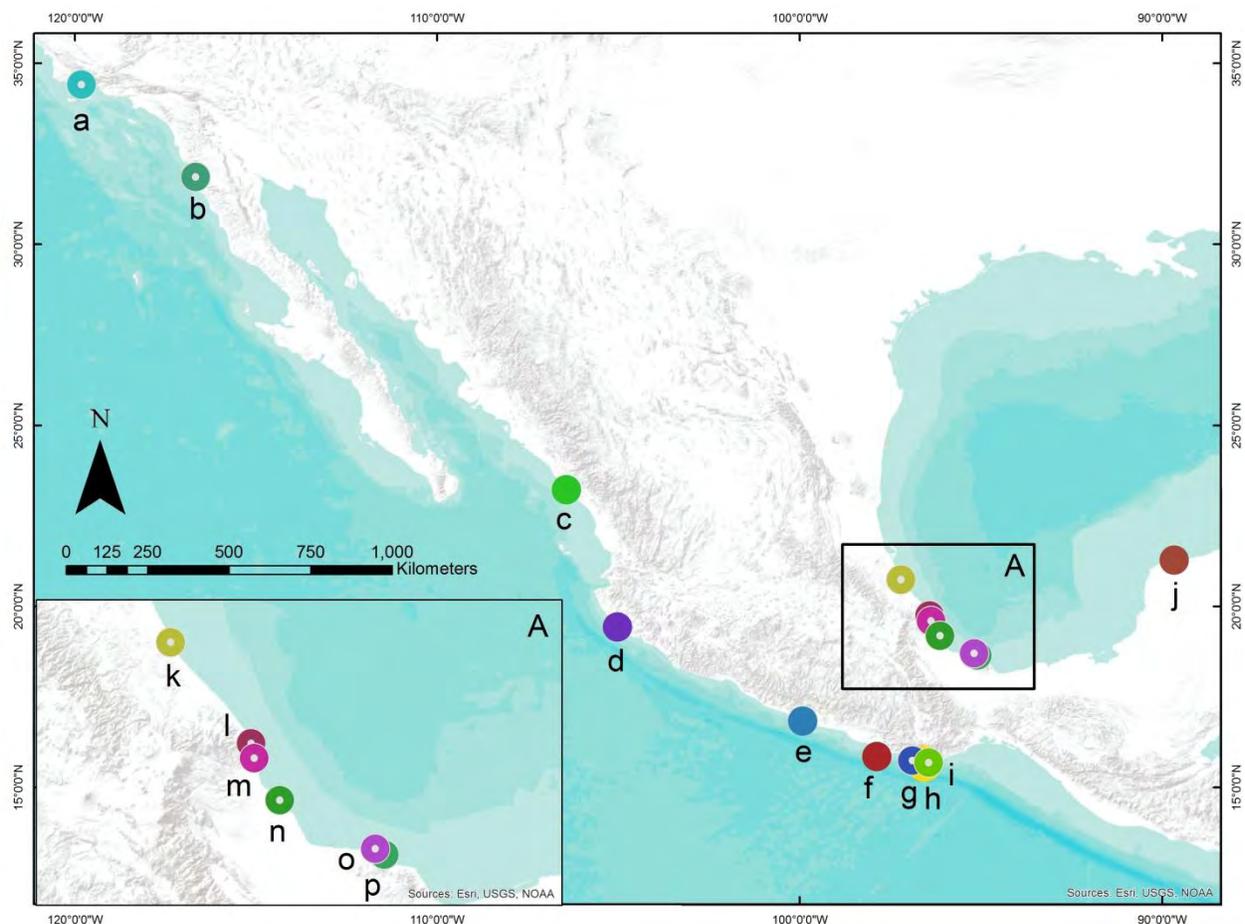
### Particulares:

- Poner a prueba la monofilia de la familia Umagillidae y el género *Syndesmis*, así como su posición dentro del infraorden Neodalyellida a partir el uso de genes ribosomales 18S y 28S.
- Caracterizar morfológica y molecularmente la diversidad de planarias simbioses de equinodermos estudiadas.
- Evaluar la eficacia de la región mitocondrial del código de barras genético (barcode), para la separación de las especies del género *Syndesmis*.
- Analizar la diversidad genética de las poblaciones de *Syndesmis collongistila*, en Veracruz, México.

## Materiales y Métodos

### I. Recolecta de hospederos y planarias simbiotas

Entre abril de 2014 y julio de 2016 se recolectaron erizos marinos (Echinodermata: Echinoidea) en 17 localidades de litorales de México (9 en el Océano Pacífico y 8 en el Atlántico) y una localidad de California, EUA (Fig. 5). Los ejemplares fueron capturados manualmente en el litoral rocoso, a una profundidad menor a 2 metros. En total obtuvieron 268 individuos pertenecientes a siete especies de equinodermos (Cuadro 2).



**Figura 5.** Localidades de recolección de los Echinodermata (Echinoidea) hospederos de las planarias analizadas en el presente estudio. Océano Pacífico: **a)** Goleta Pier, Santa Barbara, California EUA, **b)** Punta Morro, Baja California, **c)** Mazatlán, Sinaloa, **d)** Playa Cayeritos, Jalisco, **e)** Playa Manzanillo, Guerrero, **f)** Carrizalillo, Oaxaca, **g)** Mazunte, Oaxaca, **h)** Playa del Amor, Oaxaca **i)** Agua Blanca, Oaxaca, **j)** Playa Tijera, Golfo de México: **k)** Puerto Progreso, Yucatán, **l)** Barra de Cazones, Veracruz, **m)** Playa Muñecos, Veracruz, **n)** La Mancha, Veracruz, **o)** Montepío, Veracruz, **p)** Roca Partida, Veracruz y **q)** Veracruz, Veracruz.

Los erizos de mar fueron trasladados en contenedores con agua marina para su posterior disección y búsqueda de planarias. Se revisaron órganos internos (celoma, intestino, gónadas, etc.) bajo el microscopio estereoscópico para verificar la presencia de planarias simbiotes. La mayoría de las planarias simbiotes encontradas fueron fijadas en formol al 4% caliente y conservadas en alcohol al 70% para estudios morfológicos, con excepción de algunos ejemplares representativos de cada especie de erizo y de cada localidad, los cuales fueron conservados en alcohol al 96% y mantenidos a -20° C para estudios de biología molecular. Adicionalmente se conservaron fragmentos del intestino y gónadas de los hospederos en alcohol al 96% a -20°C, con el fin de confirmar su identificación taxonómica mediante el uso de herramientas moleculares. La identificación morfológica de los hospederos fue realizada siguiendo la clave de Hendler et al. (1995), literatura especializada y con el apoyo de la M. en C. Daniela Yepes Gaurisas del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR) de Colombia.

<b>Cuadro 2. Número de hospederos revisados en el presente trabajo en las localidades muestreadas.</b>			
<b>Hospedero</b>	<b>Localidad</b>	<b>N° de hospederos revisados</b>	<b>Estado</b>
<i>Echinometra lucunter</i>	Barra de Cazones	20	Veracruz, México
	Playa Muñecos	14	
	La Mancha	8	
	Montepío	12	
	Roca Partida	8	
	Puerto de Veracruz	8	
	Puerto Progreso	40	Yucatán, México
<i>Echinometra vanbrunti</i>	Punta Morro	3	Baja California, México
	Playa Manzanillo	8	Guerrero, México
	Mazatlán	6	Sinaloa, México
	Carrizalillo	22	Oaxaca, México
	Playa del Amor	35	
	Mazunte	24	
	Agua Blanca	15	
	Playa Tijera	18	
<i>Diadema mexicanum</i>	Playa Manzanillo	12	Guerrero, México
<i>Eucidaris thovarsii</i>	Playa Manzanillo	7	
<i>Lytechinus variegatus variegatus</i>	Puerto de Veracruz	5	Veracruz, México
<i>Strongylocentrotus franciscanus</i>	Goleta Pier, Santa Barbara	7	California, E.U.A
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Goleta Pier, Santa Barbara	4	

## II. Técnicas morfológicas

Los ejemplares de *Syndesmis* fijados en formol fueron teñidos mediante la técnica de paracarmín de Meyer de acuerdo con Lamothe-Argumedo (1997) (ANEXO 1); posteriormente fueron montados en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá para la observación de las estructuras en un microscopio óptico. Seis planarias; [Montepío (n=2), Veracruz, Agua Blanca (n=2), Oaxaca, México y Goleta Pier, Santa Barbara (n=2), Estados Unidos de Norte América], fueron incluidas en parafina para realizar cortes histológicos laterales de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de grosor. Todas las secciones fueron teñidas con hematoxilina de Harris y Eosina; finalmente fueron montadas en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá (ANEXO 2). Adicionalmente, 5 ejemplares de Montepío (n=2), Agua Blanca (n=1) y Goleta Pier (n=2), fueron utilizados para su estudio con microscopía electrónica de barrido (MEB), siendo deshidratados en alcoholes graduales hasta llegar al absoluto. Posteriormente fueron secados a punto crítico con  $\text{CO}_2$  y montados para ser cubiertos con una mezcla de oro y paladio y ser observados en el microscopio Hitachi S2460N en el Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad I, en el Instituto de Biología, UNAM. Las técnicas anteriormente señaladas fueron utilizadas para evaluar los caracteres tradicionalmente usados para describir y determinar las especies de este grupo de planarias. El material de referencia fue depositado en la Colección Nacional de Invertebrados, Instituto de Biología, UNAM, Ciudad de México.

La identificación morfológica, redescrición y descripción de los ejemplares se efectuó con el apoyo de literatura especializada sobre el grupo. Las medidas de las diferentes estructuras se presentan en micrómetros con excepción de largo y ancho de los individuos, las cuales están en milímetros. Para cada medida se proporciona el intervalo, seguido del valor promedio, su desviación estándar y el número de individuos donde se logró visualizar (n).

Para corroborar la identidad de los individuos recolectados en este estudio, se realizaron comparaciones contra los holotipos de 15 de las 24 especies descritas actualmente, depositados en la Colección de Invertebrados, National Museum of Natural History (NMNH), del Smithsonian Institution, Whashington, D.C., EUA (Cuadro 3).

<b>Cuadro 3. Holotipos revisados del género <i>Syndesmis</i></b>	
<b>Especies de <i>Syndesmis</i></b>	<b>Número de Catalogo USMN</b>
<i>S. albida</i>	1376214
<i>S. alcalai</i>	1370791
<i>S. collongistyla</i>	80833
<i>S. echinorum</i>	1374479
<i>S. glandulosa</i>	75246
<i>S. mamilata</i>	1370879
<i>S. neglecta</i>	1376870
<i>S. philippinensis</i>	1370793
<i>S. rubida</i>	137612
<i>S. vechiniacuti</i>	-
<i>S. aethopharynx</i>	81036
<i>S.compacta</i>	1370795
<i>S.dendrastrorum</i>	1346552
<i>S.evelinae</i>	81538
<i>S.inconspicua</i>	1376868

### III. Técnicas moleculares

#### III.I. Extracción ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de 41 individuos de *Syndesmis* (30 para las localidades de Veracruz, 3 para Agua Blanca y 10 para Goleta Pier) y de tejido de los hospederos (6 *Echinometra lucunter* y 9 *Echinometra vanbrunti*) utilizando los kits PROMEGA y Wizard® SV Genomic DNA purification system y DNeasy® blood & tissue kits (Qiagen, Inc) y siguiendo protocolos establecidos por los fabricantes. Las extracciones finales se eluyeron en 100 µl de agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20°C, posteriormente fue evaluada la calidad y concentración del ADN utilizando el NanoDrop 2000.

#### III.II Amplificación por PCR.

La amplificación de los fragmentos de los dos genes nucleares ribosomales 18S rDNA ( $\pm 1780-1800$  pb) y 28S ribosomal DNA ( $\pm 600$  pb) y dos genes mitocondriales Citocromo C oxidasa I (COI I) ( $\pm 290$  pb) y Citocromo b ( Cytb b) ( $\pm 450$  pb), se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por

sus siglas en inglés). Los oligonucleótidos (iniciadores o primers) empleados para las reacciones y programas de amplificación se señalan en la Cuadro 4. Cada reacción de PCR incluyó 0.6l  $\mu$ l (10 mM) de cada primer, 12.9  $\mu$ l de agua, 2  $\mu$ l de 10x Buffer, 1.2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l DNP, BSA 0.5 $\mu$ l, 0.2  $\mu$ l de Taq polimerasa (Bioline) y 1  $\mu$ l de ADN genómico para hacer un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l. Los productos de PCR fueron verificados en un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed™. Los productos de PCR se neutralizaron con ExoSAP-IT® (Affymetrix, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ciclos de secuenciación se realizaron mediante BigDye® Terminator v3.1 Cycle kit de secuenciación (Applied Biosystems, Inc.) y los productos se purificaron por filtración a través Sephadex™ (GE Healthcare) en columnas hidratadas. Un ABI 3730 secuenciador de ADN automatizado se utilizó para generar las secuencias de ADN. El trabajo de biología molecular se realizó en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad del Instituto de Biología de la UNAM y en los Laboratories of Analytical Biology (LAB) del National Museum of Natural History (NMNH),, Smithsonian Institution, EUA.

### III.III. Ensamblaje y edición de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas, ensambladas y editadas (eliminación de ambigüedades y errores de lectura del secuenciador) con el programa Geneious 5.17 (Biomatters; <http://www.geneious.com/>) (Kearse et al., 2012), y se analizaron mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando el sitio web de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar que los fragmentos de DNA pertenecieran a los organismos bajo estudio y descartar una posible contaminación de la muestra.

**Cuadro 4. Forward (F) y Reverse (R) de los marcadores utilizados en el presente estudio**

<b>Locus</b>	<b>Organismo utilizado</b>	<b>Región</b>	<b>Secuencia del marcador</b>	<b>Régimen de PCR</b>	<b>Referencia</b>
<b>18S rDNA</b>		18SA	5'AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	95°C por 3 min, 35 ciclos: 95°C por 30s, 53°C por 30s, 72°C por 30s y 72°C por 5 min.	Apakupakul (1999)
		18SB	5'TGATCCTTCCGCAGGTTACCT-3'		
		18SL	5'CCAACTACGAGCTTTTAACTG-3'		
		18SC	5'CGGTAATTCCAGCTCCAATAG-3'		
		18SY	5'-CAGACAAATCGCTCCACCAAC-3'		
		18SO	5'-AAGGGCACCACCAGGAGTGGAG-3'		
<b>28S rDNA</b>	simbionte	28SA	5'-GACCCGTCTTGAAGCACG-3'	95°C por 3min, 35 ciclos: 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 60s y 71°C por 5min	Whiting, (2002), Prendini et al (2005).
		28SBout	5'-CCCACAGCGCCAGTTCTGCTTACC-3'		
<b>COI I</b>		COIF (F)	5'-CCNGGDTTTGGDATDRTWTCWCA-3'	95°C por 3 min, 35 ciclos: 94°C por 30s, 45°C por 30s, 72°C por 60s y 72°C por 5 min	Lázaro et al (2009)
		COIR (R)	5'-CCWGTYARMCCHCCWAYAGTAAA-3'		
<b>Cyt b</b>		cytb424-444	5'-CAGGAAACAGCTATGACCGWTAYGTWYTWCCWTGRGGWCARAT-3'	95°C por 3 min, 35 ciclos: 94°C por 30s, 44°C por 30s, 72°C por 60s y 72°C por 5 min	Jondelius et al (2002) Regier & Shi (2005)
		cytb876-847	5'-TGTA AACGACGGCCAGTGCRTAWGCRAAWARRAARTAYCAYTCWGG-3'		
<b>COI I</b>	hospedero	COIF	5'CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3'	95°C por 3 min, 35 ciclos: 94°C por 45s, 55°C por 1:10 min, 72°C por 1:20 min y 72°C por 5 min	Palumbi, (1996)
		COIA	5'-AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3'		

### III. Análisis Filogenéticos

El total de secuencias obtenidas en el presente trabajo (n=41) para dos genes ribosomales (18S y 28S) y dos mitocondriales (COI I y Cyt b) del género *Syndesmis*, fueron analizadas de manera conjunta con las de integrantes del Infraorden Neodalyellida disponibles en GenBank y reportadas por Steenkiste et al., (2013) (ANEXO 3). Las secuencias homólogas utilizadas como grupos externos para cada uno de los genes fueron obtenidas también a través de la base de datos GenBank: *Temnocephala* sp. (AJ228802 (28S), AJ405990 (COI) y KC869919 (Cyt b)), *Proxenetes karlingi* (KC529535 (28S) y KC529409 (18S)), *Trigonostomun venenosum* (KC529543 (28S) y KC529417 (18S)) y *Kytorhynchidae* sp. 1 (KC529527 (28S) y KC529401 (18S)).

Cada una de las particiones fue alineada utilizando el sitio web MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) en su versión en línea <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> (Edgar, 2004), empleando los parámetros designados por default por el programa, posteriormente los alineamientos fueron visualizados, editados manualmente y concatenados utilizando el programa MESQUITE v. 3.04 (Madison & Madison, 2015).

En total se ensamblaron tres matrices que incluyen distintas combinaciones de genes y terminales, dependiendo del tipo de pregunta a plantear (Cuadro 5).

<b>Cuadro 5. Lista de matrices y objetivo de cada una en el presente estudio.</b>			
<b>Matriz</b>	<b>Taxones</b>	<b>Genes</b>	<b>Problema</b>
<b>1</b>	Taxones del Superorden Neodalyellida	18S y 28S	Ubicar filogenéticamente a las especies de <i>Syndesmis</i> dentro de Neodalyellida para evaluar la monofilia de la familia a la que pertenecen, Umagillidae.
<b>2</b>	Género <i>Syndesmis</i>	COI I, Cyt b y 28S	Evaluar las relaciones filogenéticas del género <i>Syndesmis</i>
<b>3</b>	Género <i>Syndesmis</i>		Evaluar la diversidad genética del género <i>Syndesmis</i>

Genes individuales, tanto mitocondriales como ribosomales fueron analizados por separado para determinar que la señal filogenética<sup>1</sup>, fuera similar entre los conjuntos de datos.

Las relaciones filogenéticas para genes individuales y concatenados fueron investigadas mediante tres enfoques filogenéticos: Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

#### a) Parsimonia

El análisis de Parsimonia se realizó en el programa TNT (Goloboff et al., 2008), usando los algoritmos de New Technology con la opción de Ratchet y “tree fusing” activados, con 100 réplicas. Todos los caracteres fueron considerados con el mismo peso y no-aditivos. Los Gaps fueron tratados como datos faltantes. Los valores de Bootstrap fueron obtenidos con 1000 pseudoréplicas, usando una adición aleatoria de taxones y TBR branch swapping. Los índices de Consistencia (IC) y de retención (IR) fueron obtenidos en TNT utilizando el siguiente script:

```
macro= ;
report= ;
var =
  0 themin
  1 themax
  + CIs [ ( ntrees + 1 ) ]
  + RIs [ ( ntrees + 1 ) ]
  + this
;
set themin minsteps ;
set themax maxsteps ;
loop 0 ntrees
  progress #1 (ntrees+1) Calculating indices... ;
  set this length[#1] ;
  set CIs[#1] 'themin/'this' ;
  set RIs[#1] ('themax'-this)/('themax'-themin) ;
  stop
progress/ ;
report= ;
macfloat 3 ;
maketable CIs Consistency index ;
maketable RIs Retention index ;
proc/ ;
```

#### b) Métodos Probabilísticos

Para los métodos probabilísticos las matrices de genes individuales y concatenadas, se les asignó el modelo evolutivo más apropiado mediante el uso del programa JModelTest v.2.1.6 (Posada, 2008), utilizando el criterio de información Akaike (AIC) (Akaike, 1973); cada modelo obtenido presentó valores de delta (lnL) de 0.0000, sugiriendo una evidencia sustancial (Burnham et al., 2011).

---

<sup>1</sup> La señal filogenética, es definida como la tendencia de las especies relacionadas a aparecer más unas que otras, que las especies dibujadas al azar en el árbol; este patrón es de gran interés en distintas áreas de la biología evolutiva y ecológica (Münkemüller, et al., 2012). Münkemüller, T., S. Lavergne, B. Bzeznik, S. Dray, T. Jombart, K. Schiffrers & W. Thuiller. (2012). How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in ecology and evolution*. 3(4):743-756.

Los árboles obtenidos a partir de Máxima Verosimilitud (ML), se implementado a través del programa RAxMLGUI v 1.3 (Silvestro & Michalak, 2012) con una interface en Python, con parámetros estimados en conjunto para cada partición. Se realizaron 100 corridas independientes. Para obtener el soporte de las ramas se realizó un análisis de bootstrap con 1000 pseudoreplicas empleando el modelo de evolución nucleotídica GTR+I+G.

El análisis de Inferencia Bayesiana, se realizó en el programa Mr.Bayes 3.2.5 (Ronquist et al., 2012), empleando un modelo de evolución GTR+I+G (nst = 6; rates = invgamma). El análisis fue llevado a cabo bajo dos corridas de cuatro cadenas de Markov, cada una de ellas por 20 millones de generaciones, muestreando cada 1000 generaciones; el 25% de los arboles fue descartado (burn-in 2.5). Los archivos de salida fueron visualizados en TRACER v1.6 (Rambau et al., 2014), para corroborar la convergencia de cadenas.

Los árboles se exportaron a FigTree v. 1.4.3, para visualizar los valores de bootstrap y probabilidad posterior (pp). En todos los casos, las ramas que se consideraron fuertemente soportadas fueron las que obtuvieron valores de bootstrap (BS) entre 0.70 y 0.95 de probabilidad posterior (IB) de acuerdo con Alfaro et al. (2003).

## VI. Distancias genéticas

Las distancias genéticas no corregidas (p) y distancias utilizando el modelo de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980), para los genes mitocondriales: COI y Citocromo b y el gen ribosomal 28S para las especies del género *Syndesmis* así como para las poblaciones de *Syndesmis collongystila*, se estimaron en el programa PAUP versión 4.06 (Swofford, 1998).

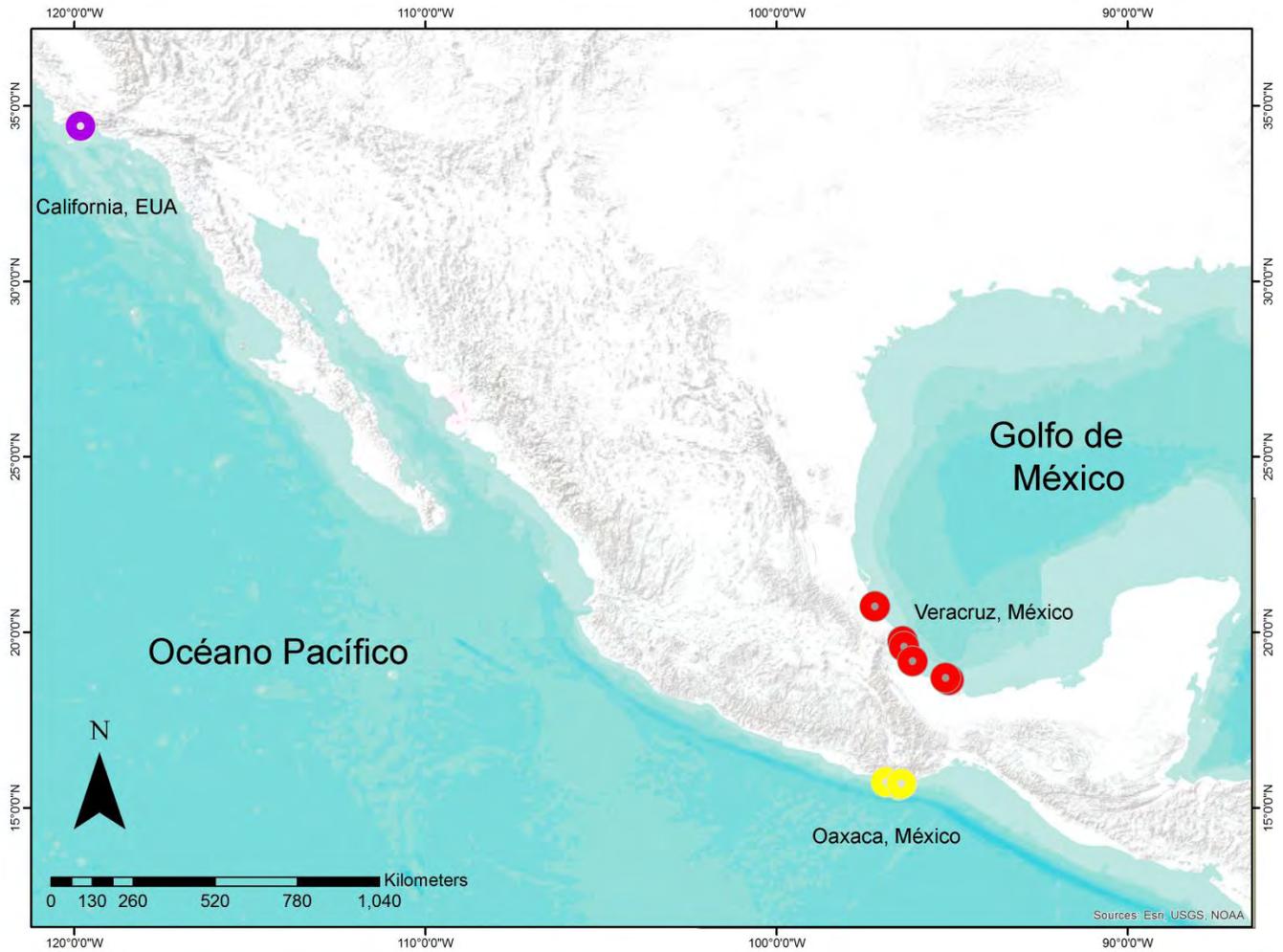
## Resultados

### I. Registro de planarias simbiotes.

En total se revisaron 268 erizos de mar pertenecientes a 7 especies de 18 localidades de México y EUA; de éstas, únicamente 149 hospederos de cuatro especies fueron positivas como hospederos de 93 turbelarios endosimbiontes (Cuadro 6, Fig. 6).

**Cuadro 6. Hospederos y simbiotes obtenidos en el presente estudio.**

Hospedero	Localidad	Coordenadas (grados)		Nº de hospederos revisados con endosimbiontes	Simbiotes Morfología/Molecular
		Latitud N	Longitud O		
<i>Echinometra lucunter</i> (Golfo de México, México)	Barra de Cazonos	20.742	97.195	20	7/5
	Playa Muñecos	19.74675	96.40528	14	5/5
	La Mancha	19.60041	96.37206	8	5/5
	Montepío	18.64714	95.0921	12	8/5
	Roca Partida	18.70518	95.18124	8	5/5
	Puerto de Veracruz	19.18564	96.12191	8	-/4
<i>Echinometra vanbrunti</i> (Oaxaca, México)	Playa del Amor	15.659	96.507	35	6/5
	Agua Blanca	15.747	96.881	15	2/3
	Playa Tijera	15.687	96.442	18	2/-
<i>Strongylocentrotus franciscanus</i> (California, EUA)	Goleta Pier	34.414	119.821	7	3/5
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (California, EUA)	Goleta Pier	34.414	119.821	4	3/5



**Figura 6.** Mapa de localidades positivas para el género *Syndesmis* en el presente estudio.

## II. Descripción morfológica de las especies de *Syndesmis* Francois, 1886

Los turbelarios simbioses de erizos de mar se asignaron a tres especies del género *Syndesmis*: *Syndesmis collongystila* Hertel, Duszynski & Ubelaker, 1990 del Estado de Veracruz, México, *Syndesmis franciscana* Lehman, 1946 de California, EUA y finalmente una especie nueva *Syndesmis* del Estado de Oaxaca, México

La descripción morfológica de los ejemplares adultos se presenta a continuación:

**Rhabditophora** Ehlers, 1985

**Rhabdocoela** Ehrenberg, 1831

**Dalytyphloplanida** Willems, Wallberg, Jondelius, Littlewood, Backeljau, Schockaert, & Artois, 2006

**Neodalyellida** Willems, Wallberg, Jondelius, Littlewood, Backeljau, Schockaert, & Artois, 2006

**Umagillidae** Wahl, 1910

***Syndesmis*** Francois, 1886

***Syndesmis collongystila*** Hertel, Duszynski & Ubelaker, 1990

Redescripción con base en 29 ejemplares de cinco localidades del Estado de Veracruz (Montepío, Roca Partida, Barra de Cazones, Playa Muñecos, La Mancha y Puerto de Veracruz). Gusanos de color rojo brillante, con forma ovalada, con algunos individuos adelgazándose ligeramente en el extremo posterior. Cuerpo cubierto de cilios desiguales (Figura 8.4); la región dorsal presenta cilios uniformes, mientras que en la región ventral los cilios son desiguales y más largos que en la región dorsal. Las células epiteliales cuboidales están en una sola hilera (Figura 8.5). Presenta una longitud total de 1.65-2.12 ( $1.88 \pm 0.17$ ,  $n=25$ ) y una anchura máxima de 0.921 ( $1.15 \pm 0.18$ ,  $n=25$ ) al nivel de la parte media del cuerpo. El aparato digestivo consta de una boca anteroventral, situada en la línea media del cuerpo, donde abre una faringe doliforme y musculosa que mide 0.13-0.195 ( $0.15 \pm 0.021$ ,  $n=25$ ), que a su vez se continúa con un intestino sacular, que se extiende sobre la línea media, dorsal a los aparatos reproductores, hasta el inicio de los folículos glandulares.

Presenta un par de testículos globulares, pre-ecuatoriales, separados o ligeramente sobrelapados a los folículos vitelógenos; miden 0.227-0.46 ( $0.32 \pm 0.07$ ,  $n=25$ ) de largo por 0.22-0.39 ( $0.27 \pm 0.06$ ,  $n=25$ ) ancho. Vesícula seminal posterior a la faringe; se continúa con un conducto eyaculador que a su vez desemboca en el pene. Estilete del pene quitinoide, con el extremo proximal grueso ( $0.108 \pm 0.021$ ,  $n=11$ ); inicia en la región posterior de los testículos; mide 0.175-0.219 ( $0.197 \pm 0.03$ ,  $n=3$ ) de largo; atrio masculino no distinguible, únicamente presenta atrio común. El poro genital abre en la parte posterior del cuerpo. Folículos vitelógenos posteriores a los testículos, 0.373-0.582 ( $0.5 \pm 0.06$ ,  $n=25$ ) de largo por 0.409-0.627 ( $0.509 \pm 0.065$ ,  $n=25$ ) de ancho, teniendo de 4 a 5 ramas. El aparato reproductor femenino consta de 2 ovarios lobulados, situados posteriores a los folículos vitelógenos; miden 0.109-0.172 ( $0.142 \pm 0.02$ ,  $n=25$ ) de largo por 0.282-0.382 ( $0.315 \pm 0.03$ ,  $n=25$ ) de ancho, con 2-3 lóbulos terminales. Receptáculo seminal no distinguible. Los filamentos glandulares son posteriores y ocupan la cuarta parte del cuerpo, con 0.318-0.509 ( $0.40 \pm 0.08$ ,  $n=25$ ) de largo por 0.273-0.592 ( $0.46 \pm 0.14$ ,  $n=25$ ) de ancho. La cápsula del huevo maduro es redondeada, con una coloración ámbar

y con un largo de 0.095-0.132 ( $0.11 \pm 0.001$ ,  $n=25$ ) y un ancho de 0.088-0.117 ( $0.11 \pm 0.001$ ,  $n=25$ ), presentando un filamento que llega al atrio genital común (Figura 7).

Localidad: Barra de Cazones (20°44'31.2", 97° 11'41.99"), Playa Muñecos (19°44'48.29"N 96°24'19"), La Mancha (19°36'1.47"N 96°22'19.41"O), Montepío (18°38'49.70"N 95°0'31.56"O), Roca Partida (18°42'18.64" N 95°10'52.46") Puerto de Veracruz (19°11'8.30" N 96°7'18.87"O), Veracruz, México.

Hospedero: *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) Linnaeus, 1758

Sitio de Infección: Tracto digestivo.

Intensidad de Infección: 1-14 simbioses por hospedero.

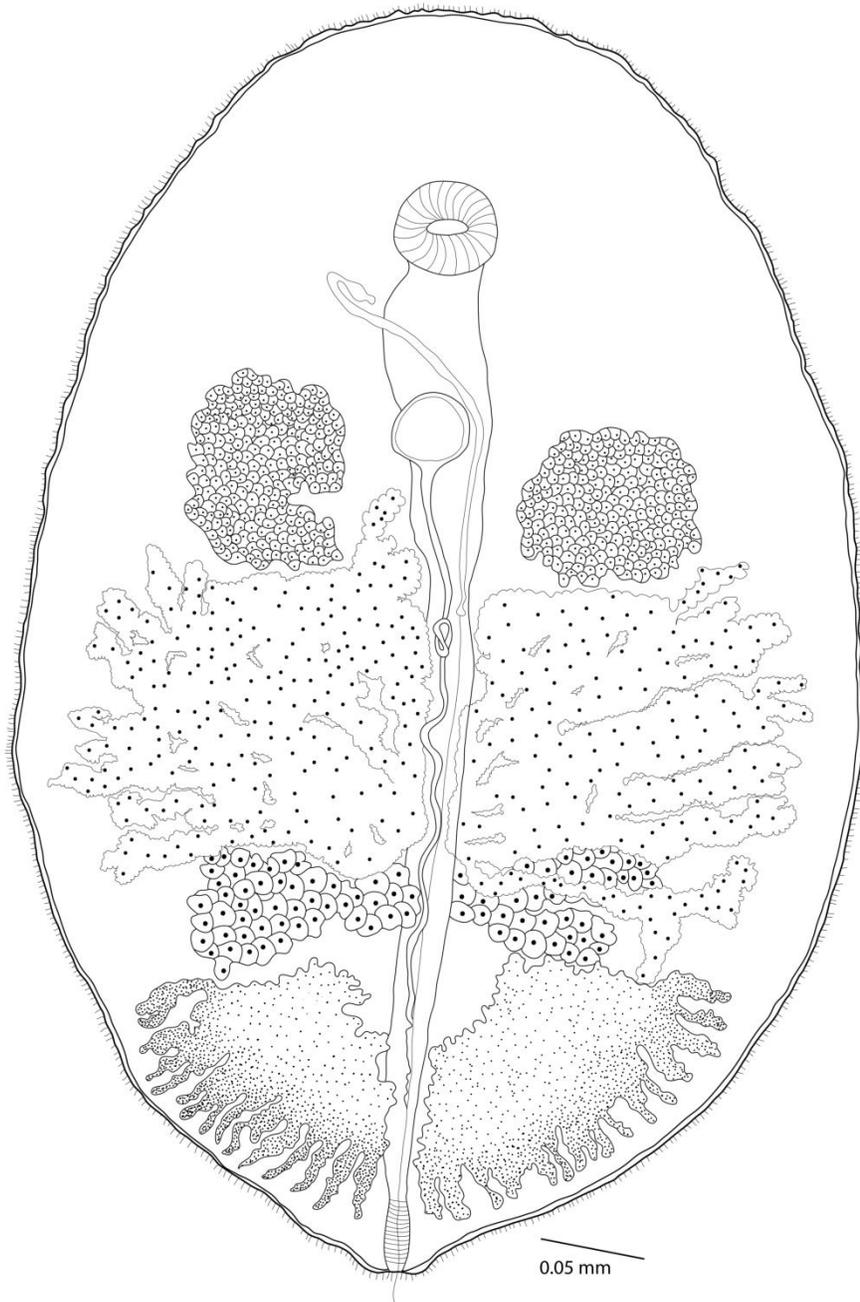
Material depositado: voucher CNIN (Colección Nacional de Invertebrados), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

### **Comentarios taxonómicos:**

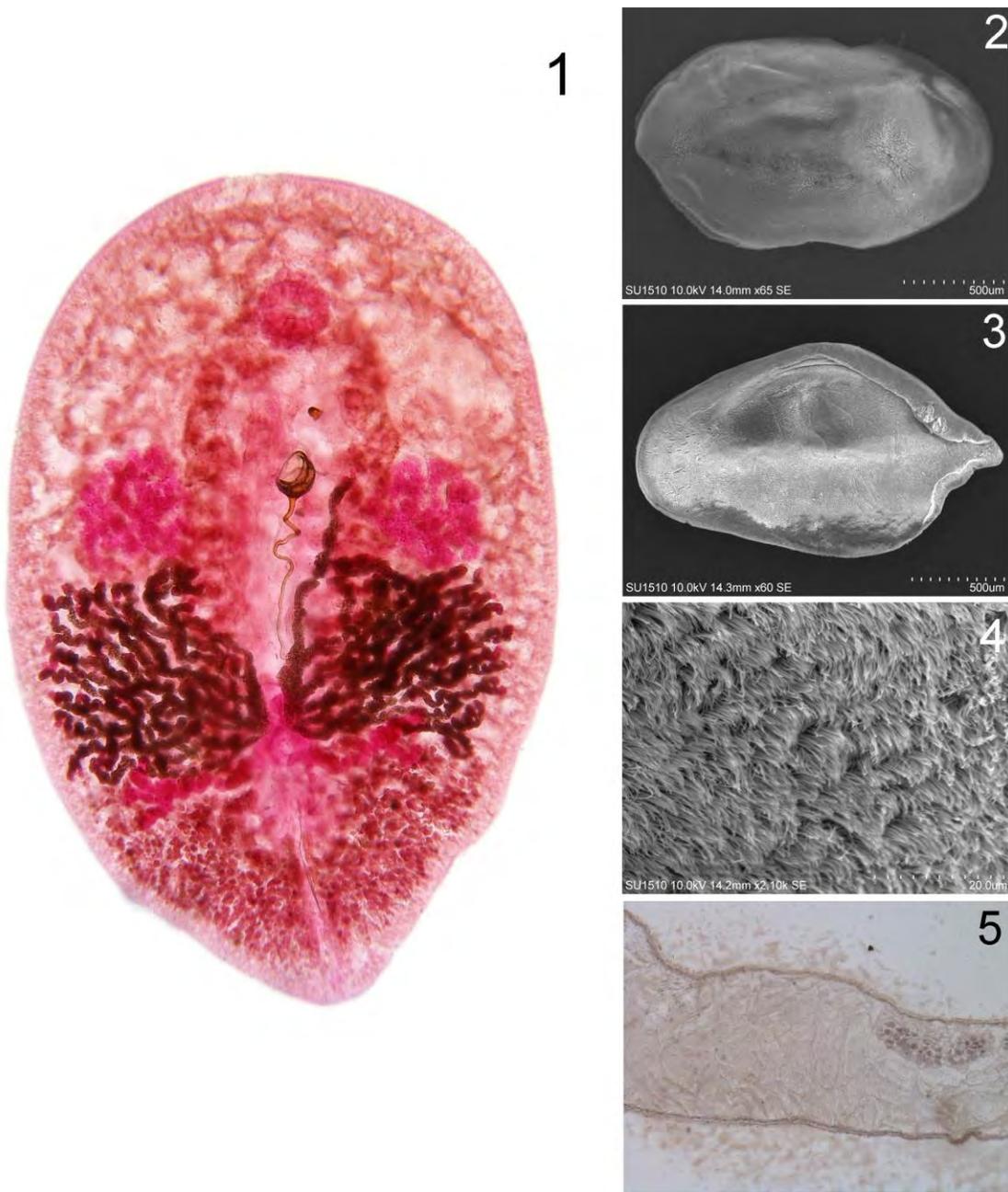
Este material corresponde a la especie *Syndesmis collongistyla* de acuerdo con la descripción original de la misma realizada por Herten et al. (1990), quienes la registraron como simbiote del erizo *Echinometra lucunter* en el Mar Caribe (Discovery Bay, Jamaica). La identificación se basó en la compatibilidad de las características de nuestro material con las diagnósticas de esta especie de planaria: longitud total del cuerpo entre 1.65-2.12 mm (contra 1.10-2.80 mm en la descripción original); ancho máximo de 0.92-1.39, contra 0.70-1.50 mm del material tipo; forma globular de los testículos y longitud del estilete del pene de 731 a 1143  $\mu\text{m}$  contra 640 a 1350  $\mu\text{m}$  referido por Herten et al. (1990).

El género *Syndesmis* está constituido por 24 especies (Broogger & Ivanov, 2010); *S. collongistyla* difiere del resto por presentar el estilete del pene más largo (640-1350  $\mu\text{m}$ ), el cual es el principal carácter utilizado para la separación de taxones dentro del género de acuerdo con Stunkard & Colligns, (1951). *Syndesmis collongistyla* presenta características morfológicas muy similares a *Sydemis antillarum*, ambas especies distribuidas en el Mar Caribe. No obstante, *S. collongistyla* difiere de *S. antillarum* por el tamaño del cuerpo, (1.10-2.80 mm contra 1.00-150 mm, respectivamente) y por la forma de los testículos (dendrítica en *S. antillarum* y globulares y compactos en *S. collongistyla*). Adicionalmente, el útero en *S. collongistyla* se localiza en la región media del cuerpo, mientras que en *S. antillarum* está ubicado en la porción anterior del mismo. Para finalizar, como se señaló antes, el tamaño del estilete del pene de ambas especies es distinto, ya que en *S. collongistyla* alcanza en promedio 981  $\mu\text{m}$  de largo, mientras que en *S. antillarum* varía entre 260 a 600  $\mu\text{m}$  (Snyder, 1980).

En el presente trabajo se registra por primera vez a *S. collongistyla* en el Golfo México, en el Estado de Veracruz, México, como simbiote de *Echinometra lucunter*, contribuyendo al conocimiento de su distribución geográfica y confirmando su especificidad hospedadora.



**Figura 7.** Vista ventral de un organismo completo de *Syndesmis collongistyla*, recolectado en las costas de Veracruz, México.



**Figura 8.** *Syndesmis collongistyla*, Veracruz, México. **1.** Vista ventral total de un organismo teñido con paracarmín de Meyer, exhibiendo la capsula del huevo, **2.** Vista dorsal de un individuo, en microscopia electrónica, **3.** Vista ventral de un individuo, mediante microscopia electrónica de barrido, **4.** Acercamiento a los cilios uniformes del epitelio dorsal, mediante microscopia electrónica de barrido y **5.** Corte longitudinal de la región media, mostrando células epiteliales cuboidales en una sola hilera.

*Syndesmis franciscana* Lehman, 1946

Redescripción con base en 7 organismos adultos, recolectados en Goleta Pier, Santa Barbara, California, Estados Unidos de América. Gusanos aplanados dorsoventralmente, redondeados de la parte anterior y fuertemente atenuados en el extremo posterior. Presentan una longitud máxima de 1.735-2.614 ( $1.95 \pm 0.317$ ,  $n=7$ ) y un ancho máxima a la altura de los testículos de 0.964-1.521 ( $1.239 \pm 0.20$ ,  $n=7$ ). El cuerpo entero está cubierto por un epitelio ciliado uniformemente (Fig.10.2 y 10.3). Boca situada en la superficie ventral, en el extremo anterior del cuerpo. Faringe muscular fuerte típicamente doliforme, con glándulas faríngeas; mide 0.109-0.77 ( $1.26 \pm 1.93$ ,  $n=7$ ) y se comunica con el intestino por medio de un esófago corto. Intestino simple, se extiende en la línea media del cuerpo y termina al inicio de los filamentos glandulares.

El aparato reproductor masculino consta de dos testículos lobulados, situados lateralmente en la parte anterior del cuerpo; testículo derecho mide 0.391-0.627 ( $0.53 \pm 0.08$ ,  $n=7$ ) de largo por 0.209-0.409 ( $0.288 \pm 0.06$ ,  $n=7$ ) de ancho; testículo izquierdo 0.354-0.536 ( $0.478 \pm 0.05$ ,  $n=7$ ) por 0.209-0.409 ( $0.323 \pm 0.08$ ,  $n=7$ ), respectivamente. Presenta dos tubos pareados que se unen en la parte media y desembocan en unas pequeñas vesículas espermiducales que se comunican con un conducto común dorsal al útero a lo largo de la línea media (conducto eyaculador), que finaliza al formar el pene. El estilete se extiende hasta la tercera parte del cuerpo, alcanzando el atrio masculino. La longitud total del estilete del pene es de 0.245-0.991 ( $0.4917 \pm 0.346$ ,  $n=4$ ). Los folículos vitelógenos se localizan posterior a los testículos, son ramificados con 8 a 9 lóbulos y cubren la mayoría de los espacios ventrolaterales en el tercio medio del cuerpo; posterior a los folículos vitelógenos se encuentran un par de ovarios, uno a cada lado de la línea media; cada ovario se ramifica entre 3 y 5 lóbulos; el ovario izquierdo presenta un largo 0.136-0.373 ( $0.254 \pm 0.08$ ,  $n=7$ ) y 0.254-0.564 ( $0.35 \pm 0.10$ ,  $n=7$ ) de ancho y el ovario derecho 0.1-0.3 ( $0.23 \pm 0.06$ ,  $n=7$ ) por 0.191-0.55 ( $0.36 \pm 0.13$ ,  $n=7$ ), respectivamente. Útero ventral; se extiende hacia el extremo anterior opuesto al atrio común, sobrepasando la región ecuatorial del cuerpo. En el extremo anterior del útero se localiza la cápsula del huevo, es quitinoide con un largo filamento enrollado que llega a la región media de los folículos glandulares. La cápsula presenta un largo de 0.130-0.55 ( $0.34 \pm 0.20$ ,  $n=4$ ) por 0.172-0.728 ( $0.45 \pm 0.26$ ,  $n=4$ ) de ancho. El cuarto posterior del cuerpo está ocupada por los filamentos glandulares que se comunican por pequeños ductos con el atrio femenino; los filamentos glandulares miden 0.35-0.82 ( $0.56 \pm 0.16$ ,  $n=7$ ) de largo por 0.172-0.72 ( $0.45 \pm 0.26$ ,  $n=7$ ) de ancho. El atrio común es una cavidad alargada en el extremo posterior en el que el atrio femenino abre ventralmente; el atrio masculino y el estilete del pene abren en la parte media. En la periferia del extremo posterior se localiza el poro genital común que abre ventralmente al exterior (Fig.9).

Localidad: Goleta Pier, Santa Barbara, California (34°01'19"N 118°28'53"O), Estados Unidos de América.

Hospederos: *Strongylocentrotus franciscanus* Linnaeus, 1758 y *Strongylocentrotus purpuratus* Stimpson, 1857).

Sitio de Infección: Tubo digestivo.

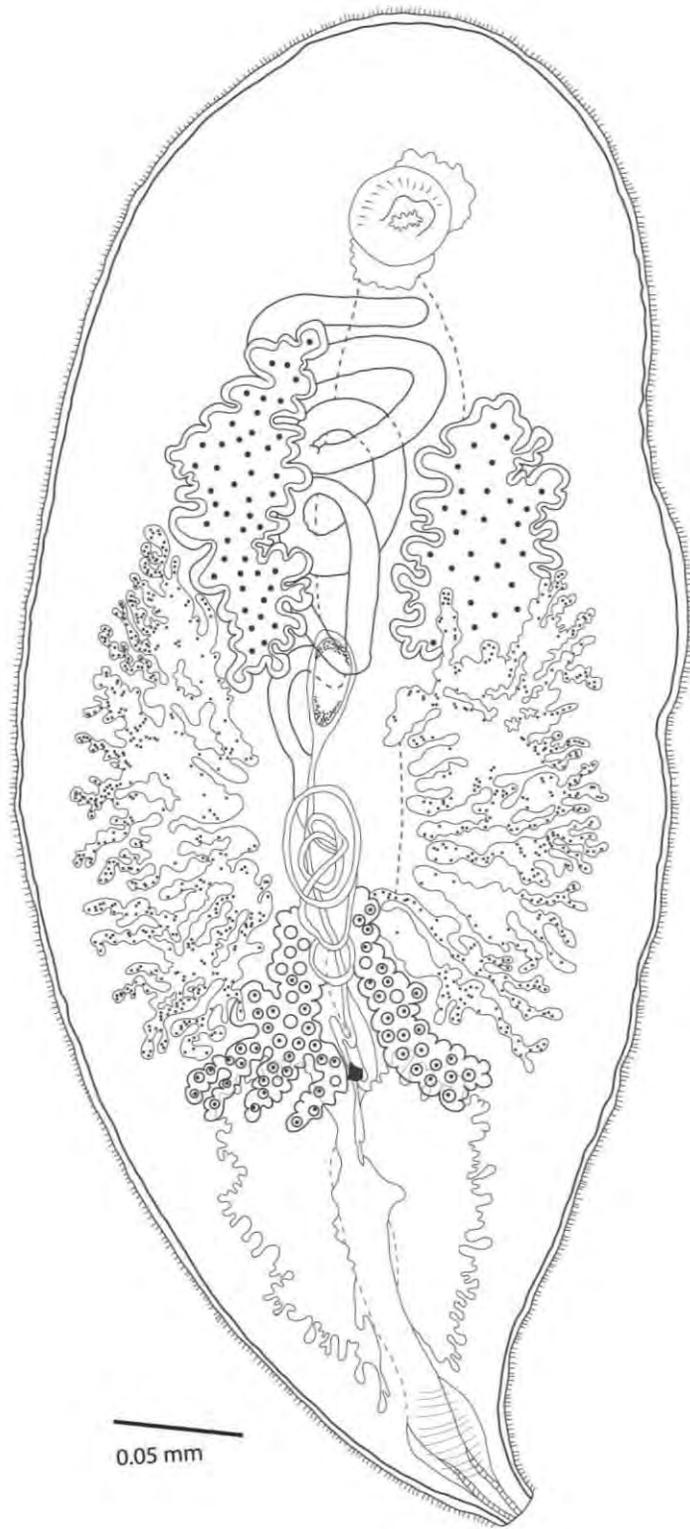
Intensidad de Infección: 1-6 simbioses por hospedero.

Material depositado: Voucher CNIN (Colección Nacional de Invertebrados), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

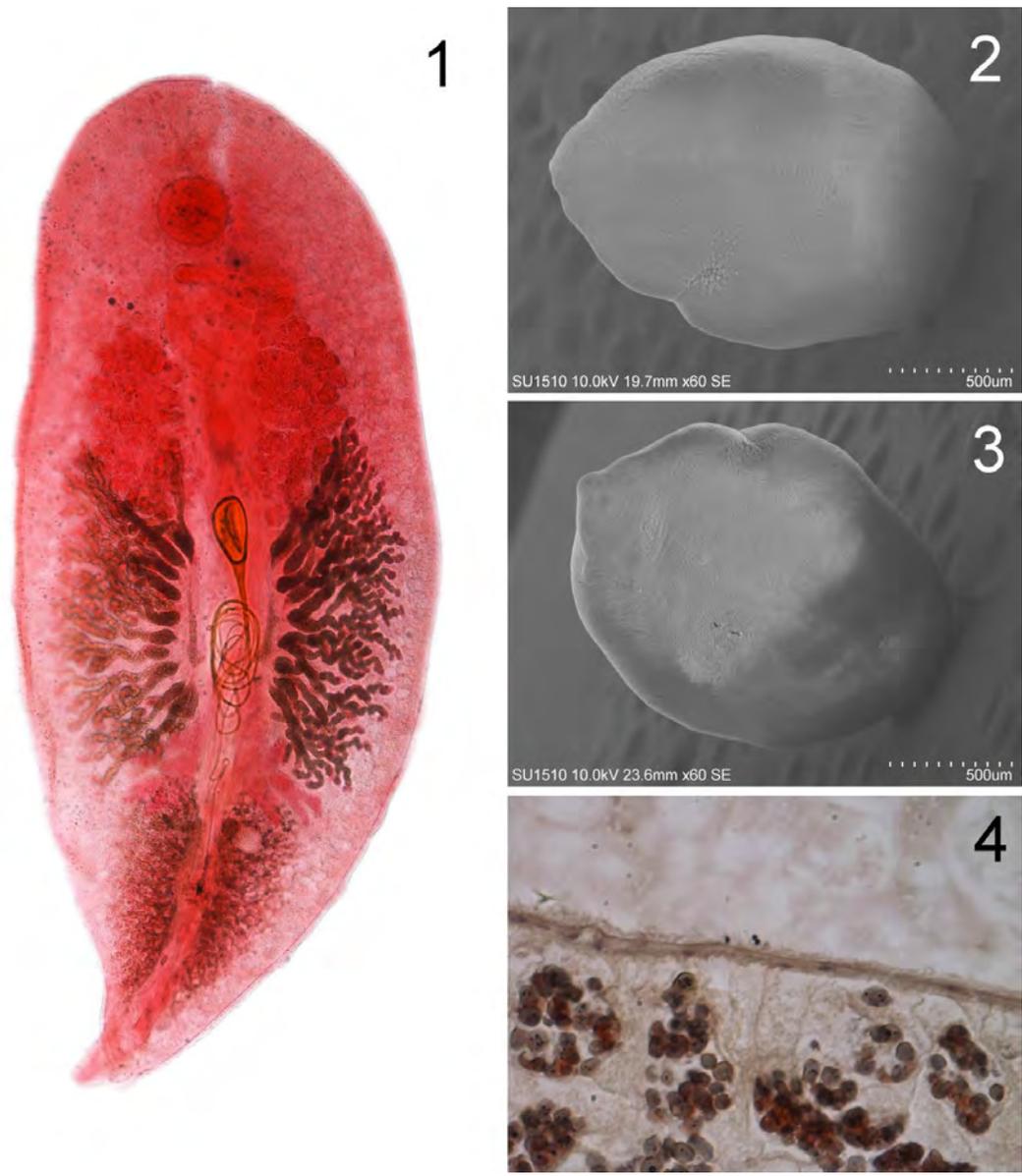
Comentarios taxonómicos:

Las planarias recolectadas en los erizos *Strongylocentrotus franciscanus* y *Strongylocentrotus purpuratus* de la costa de California, EUA, pertenecen a la especie *Syndesmis franciscana*. Esta identificación se realizó con base en la descripción original de la especie efectuada por Lehman (1946) y en la redescipción de la misma llevada a cabo por Stunkard y Corliss (1951). Nuestro material coincide en características diagnósticas de esta especie tales como: 1) longitud del cuerpo; 2) ancho máximo; 3) lobulación de los testículos; 3) posición post-ovárica del estilete del pene; 4) longitud del estilete y 5) conducto eyacular dando una vuelta a la altura de los folículos vitelógenos (Cuadro 6). *Syndesmis franciscana* se distingue de las otras 23 especies de planarias simbioses descritas para este género por mostrar uno de los estiletos del pene más largos dentro del género (principal carácter morfológico para la distinción entre especies), el cual oscila entre 666-1000 µm. Sin embargo, el intervalo encontrado en los organismos descritos en el presente trabajo va de 245-991 µm, por lo que este carácter debe ser revisado con mayor detalle en la especie californiana (Cuadro 6).

*Syndesmis franciscana* se distingue de *Syndesmis collongistyla*, por presentar una longitud promedio mayor a la especie del Golfo de México (1.85 mm, 1.80 mm, respectivamente) promedios que coinciden con los de las especies analizadas en este estudio; adicionalmente por la posición de la base del estilete que la especie californiana es post-ovárica y en la especie del Golfo de México es muy variable. Además de los caracteres morfológicos, ambas planarias son simbioses de distintos hospederos *Syndesmis collongistyla* es simbiote de *Echinometra lucunter*, *Echinometra viridis*, *Lytechinus variegatus*, *Lytechinus williamsi* y *Tripneustes ventricosus*, mientras que *Syndesmis franciscana* se encuentra asociada a *Strongylocentrotus franciscanus*, *Strongylocentrotus pallidus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus anamesus*; ambas especies se distribuyen en regiones marítimas distintas, la primera está en el Golfo de México y Caribe y la segunda al norte del Océano Pacífico.



**Figura 9.** Vista ventral de un organismo completo de *Syndesmis franciscana*, recolectado en las costas de Goleta Pier, California, EUA.



**Figura 10. *Syndesmis franciscana*, Goleta Pier, Santa Barbara, California, EUA: 1.** Vista ventral de una preparación total de un organismo teñido con paracarmín de Meyer, **2.** Vista dorsal de un individuo, examinado en el microscopio electrónico de barrido, **3.** Vista ventral de un individuo, mediante microscopía electrónica de barrido y **4.** Corte longitudinal de la región media, mostrando células cuboidales del epitelio en una sola hilera.

### *Syndesmis n. sp.*

Descripción con base en 10 organismos adultos, recolectados en tres localidades del estado de Oaxaca, México (Playa del Amor, Agua Blanca y Playa Tijera). Gusanos aplanados dorsoventralmente, en vivo son de color rojo brillante con una franja marrón que recorre la región media del cuerpo de la superficie dorsal. Longitud total de 1.54-2.27 ( $1.90 \pm 0.28$ ,  $n=10$ ) y ancho máximo a la altura de los folículos vitelógenos de 0.464-0.964 ( $0.694 \pm 0.180$ ,  $n=10$ ). Epitelio ciliado uniforme, a excepción de la región media ventral donde se observan unas almohadillas rugosas mediante el uso de microscopia de barrido (Fig. 12.2 y 12.3); en cortes histológicos éstas muestran numerosos núcleos con células cuboidales en tándem (Fig. 12.5 y 12.6). El aparato digestivo está constituido por una boca ubicada en la superficie ventral, que continua con una faringe doliforme fuertemente muscular, con un diámetro de 0.119-1.147 ( $0.147 \pm 0.0094$ ,  $n=10$ ); ésta se comunica con un esófago corto que conecta a un intestino simple con proyecciones laterales, que corre dorsalmente en la línea media del cuerpo y se observa hasta la mitad de los folículos vitelógenos.

El aparato reproductor masculino consta de un par de testículos amorfos, ubicados en los campos laterales en el primer tercio del cuerpo, posteriores a la faringe; el testículo izquierdo mide 0.263-0.418 ( $0.34 \pm 0.065$ ,  $n=7$ ) de largo y 0.191-0.354 ( $0.264 \pm 0.069$ ,  $n=7$ ) de ancho; el derecho presenta un longitud de 0.273-0.391 ( $0.328 \pm 0.035$ ,  $n=7$ ) y un ancho de 0.163-0.327 ( $0.251 \pm 0.057$ ,  $n=7$ ), sin sobrelaparse con los folículos vitelógenos. De cada testículo se origina un conducto eferente que se unen en la región media y forman el conducto eyaculador, el cual se ensancha para constituir una vesícula seminal situada posterior a la faringe. El conducto eyaculador se extiende hacia la región posterior y presenta un trayecto continuo por la línea media donde gira en 2 ocasiones, la primera a nivel de las vitelógenas y la segunda al de testículos; la base del estilete, con forma de X asimétrica, se localiza en el segundo tercio del cuerpo, cercana a la región de los ovarios. El conducto eyaculador, próximo a la base del estilete, mide  $0.321 \pm 0.053$ , ( $n=10$ ) de ancho. El estilete del pene está esclerotizado y mide 0.732-0.8 ( $0.76 \pm 0.025$ ,  $n=9$ ) de largo.

Aparato reproductor femenino con ovarios pareados en lados opuestos, posteriores a los folículos vitelógenos; el ovario derecho mide 0.218-0.391 ( $0.276 \pm 0.069$ ,  $n=10$ ) de largo por 0.081-0.191 ( $0.128 \pm 0.039$ ,  $n=10$ ) de ancho, ovario izquierdo 0.127-0.273 ( $0.170 \pm 0.066$ ,  $n=5$ ) por 0.081-0.318 ( $0.214 \pm 0.098$ ,  $n=5$ ), respectivamente; usualmente cada ovario tiene de 2 a 3 ramificaciones. La vagina nace a la altura de los folículos vitelógenos; corre ventralmente hasta alcanzar al atrio genital común. El útero corre en la región media del cuerpo; contiene un huevo incluido en una capsula del huevo quitinosa madura de color ámbar, 0.047-0.101 ( $0.07 \pm 0.016$ ,  $n=7$ ) de longitud y 0.069-0.106 ( $0.08 \pm 0.01$ ,  $n=7$ ) de anchura. Presenta un filamento largo fuertemente enrollado que llega a la región media de los folículos vitelógenos. Posterior a los ovarios están los folículos glandulares que ocupan el último tercio del cuerpo; miden 0.309-0.646 ( $0.45 \pm 0.124$ ,  $n=9$ ) de largo por 0.209-0.455 ( $0.322 \pm 0.077$ ,  $n=9$ ) de ancho (Fig. 11).

Localidad tipo: Playa del Amor, Oaxaca, México (15° 39' 33.4'' N y 96° 30' 28.6 O).

Hospedero tipo: *Echinometra vanbrunti* Agassiz, 1863 (Echinodermata: Echinoidea)

Sitio de Infección: Tubo digestivo.

Otras localidades: Agua Blanca y Playa Tijera, Oaxaca

Intensidad de Infección: 1-5 simbioses por hospedero.

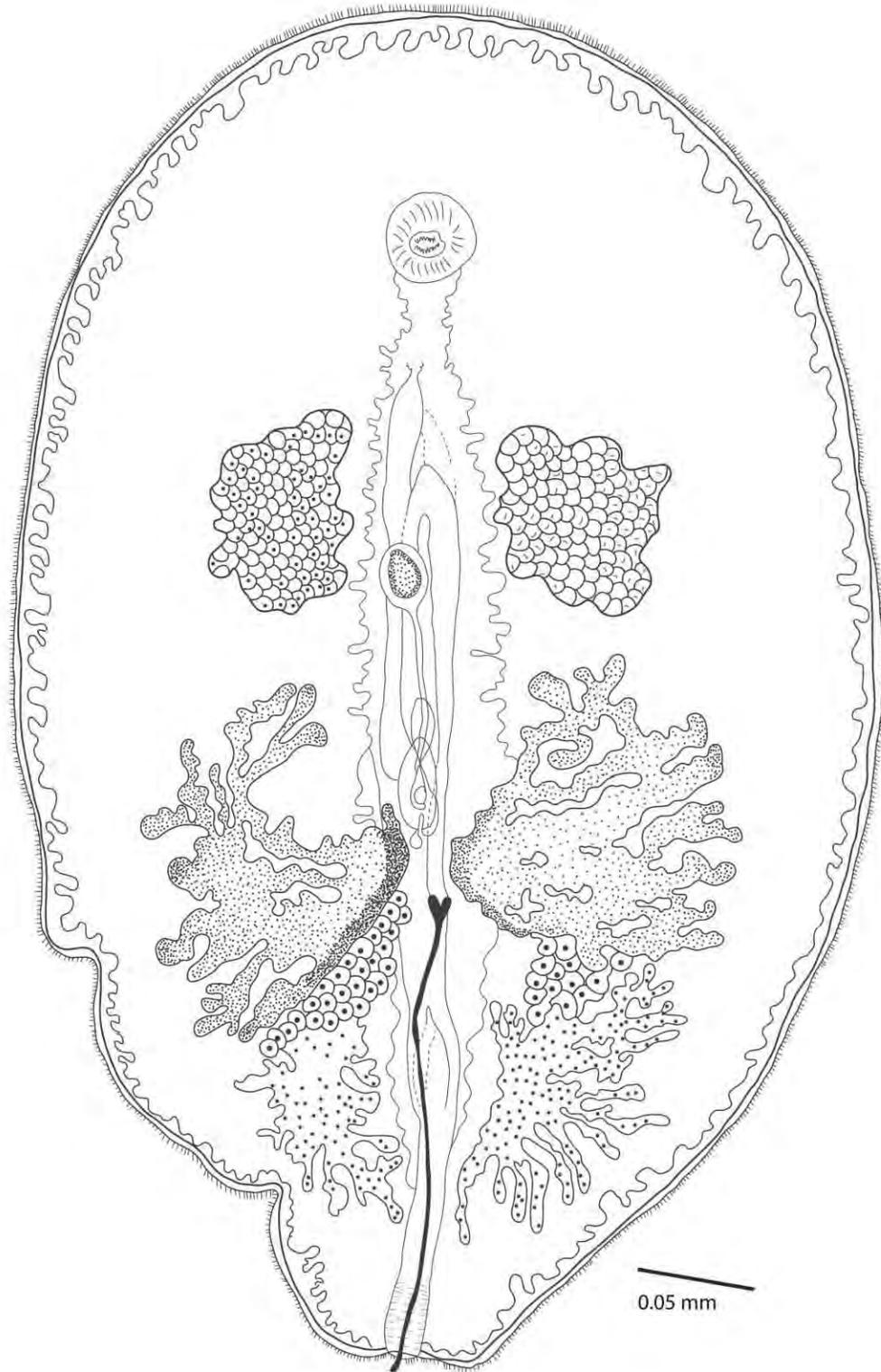
Material depositado: Holotipo CNIN (Colección Nacional de Invertebrados), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

#### Comentarios taxonómicos:

De las 24 especies de umagíllidos simbioses de equinodermos descritas hasta la fecha, la especie nueva se puede distinguir fácilmente por el tamaño del estilete, siendo una de las tres especies con estiletos más largos, el cual mide 737-800  $\mu\text{m}$  (Cuadro 7); las otras dos especies con estiletos largos son *Syndesmis franciscana* Lehman, 1946 (666-1,000  $\mu\text{m}$ ) y *Syndesmis collongistyla* Hertel, Duszynski & Ubelaker, 1990 (640-1,350  $\mu\text{m}$ ). Adicionalmente, *Syndesmis* n. sp., puede diferenciarse de estas dos últimas por el ancho máximo del cuerpo, ya que mientras la nueva especie es de 0.69 (0.46-0.96 mm), en *S. franciscana* es casi del doble [1.02 (0.95-1.05)] al igual que en *S. collongistyla* [1.10 (0.70-1.55)].

El carácter diagnóstico más conspicuo de la especie nueva es el ancho de la base del estilete del pene; al compararla con los 15 holotipos de las especies del género a los que tuvimos acceso, incluido el de *S. collongistyla* y material de la localidad tipo de *S. franciscana*, se observó que mostraba un ancho máximo a este nivel de 321  $\mu\text{m}$ , en comparación con el intervalo en que oscila esta estructura en las otras especies, que va de 65  $\mu\text{m}$  en *Syndesmis aethopharynx* (Westervelt & Kozloff, 1990) (USNM 81036) hasta 151.9 en *Syndesmis glandulosa* (USNM 75246) y *Syndesmis evelinae* (Marcus, 1968) (USNM 81538). En *Syndesmis collongistyla* la base del estilete mide 108  $\mu\text{m}$  (USNM 80833) y en material de referencia de *S. franciscana* 135  $\mu\text{m}$  (CNHE 000544, 000545, 000546, 000553 y 000556). Adicionalmente, *Syndesmis* n. sp., se distingue de las 24 especies del género por ser simbiose del tubo digestivo de *Echinometra vanbrunti* Agassiz, 1863, erizo para el que no se había sido registrado ninguna planaria simbiose de éste género. Otras planarias se han registrado asociadas a erizos del género *Echinometra*: *Syndesmis compacta* Komschlies & Vande-Vusse, 1980, *Syndesmis mammilata* Komschlies & Vande-Vusse, 1980 y *Syndesmis philippinenensis* Komschlies & Vande-Vusse, 1980 a *Echinometra oblonga* Blainville, 1825 y *Syndesmis evelinae* y *Syndesmis collongistyla* como simbioses de *Echinometra lucunter* Linnaeus, 1758; no obstante, su morfología (particularmente el ancho de la base del estilete), permite su distinción.

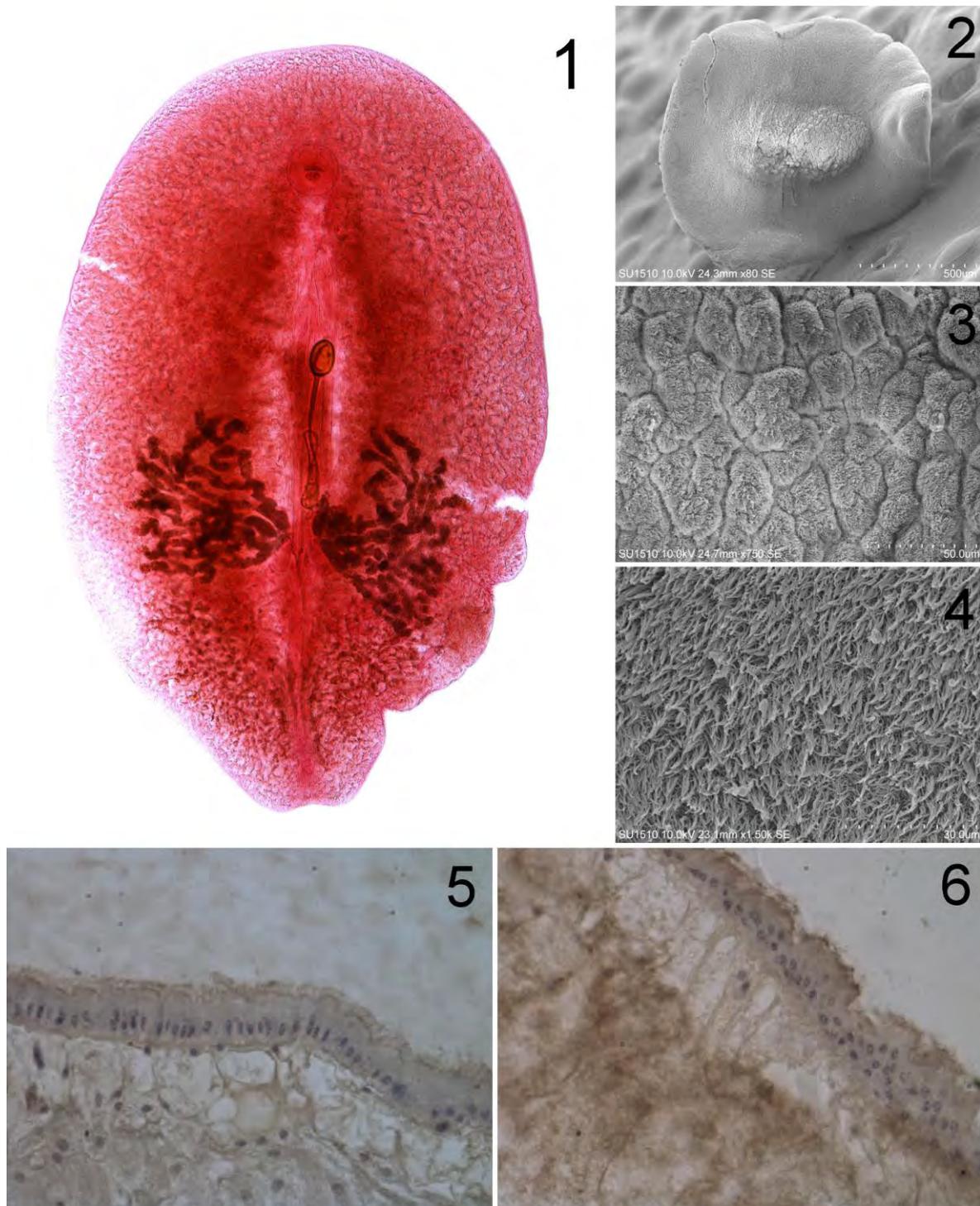
El hallazgo de *Syndesmis* n. sp., representa un nuevo registro para *Echinometra vanbrunti* (Agassiz, 1863) como hospedero de rabdocelos simbioses. Adicionalmente *Syndesmis* n. sp., representa el primer registro de estos umagíllidos en la costa del Pacífico Mexicano; los últimos registros para esta región marítima son los de *Syndesmis incospicua* y *Syndesmis neglecta* por Westervelt y Kozloff (1992) en el Estado de Washington y California, EUA (Doignon & Artois, 2006).



**Figura 11.** Vista ventral de un organismo completo de *Syndesmis* sp., recolectado en las costas de Oaxaca, México.

Cuadro 7. Composición específica del género <i>Syndesmis</i> Francois, 1886, presentando sus caracteres diagnósticos, hospederos y localidades.							
Especie de <i>Syndesmis</i>	Longitud del cuerpo (mm)	Ancho del cuerpo (mm)	Longitud del estilete del pene (µm)	Ancho de la base del estilete del pene (µm)	Hospedero	Distribución original	Referencia
<i>S. aethopharynx</i>	(4 máximo)	1.20	50	65	<i>Paracentrotus lividus</i>	Francia	Westervelt & Kozloff (1990)
<i>S. albida</i>	3.50	1.00	1,000	108.5	<i>Echinus esculentus</i>	Inglatera, Francia	Kozloff & Westervelt (1990)
<i>S. alcalai</i>	1.99 (1.65–2.32)	1.14 (0.76–1.50)	309 (252–408)	86	<i>Heterocentrotus mammilatus</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vusse (1980b)
<i>S. antillarum</i>	(1–1.50)		(333–500)	-	<i>Diadema antillarum</i>	Florida, EUA	Stunkard & Corliss (1951)
<i>S. atriovillosa</i>	2		150	-	<i>Spatangus purpureus</i>	Inglatera	Westblad (1953)
<i>S. cannoni</i>	(0.90–1.20)		47–50	-	<i>Ammotrophus arachnoides</i>	Australia	Jondelius (1996)
<i>S. collongistyla</i>	1.80 (1.10–2.80)	1.10 (0.70–1.50)	981 (640–1,350)	86	<i>Echinometra lucunter</i> , <i>E. viridis</i> , <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>L. williamsi</i> , <i>Tripneustes ventricosus</i>	Jamaica, Puerto Rico y Haití	Hertel et al (1990)
<i>S. compacta</i>	1.02 (0.80–1.16)	0.63 (0.58–0.79)	300 (228–348)	65	<i>Echinometra oblonga</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vusse (1980a)
<i>S. dendrastrorum</i>	(1.00–2.50); (0.52–1.23)	(0.26–0.66)	74		<i>Dendraster excentricus</i>	California, EUA	Stunkard & Corliss (1951), Smith (1973)
<i>S. echimacuti</i>	(3.10 máximo)	1.00	180	-	<i>Echinus acutus</i>	Francia	Kozloff (1997)
<i>S. echinorum</i>	(5.00 máximo)	1.20	200	130.2	<i>Paracentrotus lividus</i> , <i>Sphaerechinus granularis</i> , <i>Psammechinus miliaris</i>	Francia, España, Italia, Croacia y Rusia	François (1886) Kozloff & Westervelt (1987)
<i>S. evelinae</i>	1.60 (0.99–2.43)	0.73 (0.41–1.00)	320 (190–368)	151.9	<i>Echinometra lucunter</i>	San Bartolomé	Marcus (1968), Hertel & Duszynski (1991)
<i>S. franciscana</i>	(2.00–3.00); 1.85 (1.56–2.01)	(1.60–2.50); 1.02 (0.95–1.05)	(666–1,000)	135	<i>Strongylocentrotus franciscanus</i> , <i>S. pallidus</i> , <i>S. droebachiensis</i> , <i>S. purpuratus</i> , <i>Lytechinus anamesus</i>	California, EUA	Lehman (1946), Jennings & Mettrick (1968)
<i>S. glandulosa</i>	1.90 (1.43–2.67); 1.40	0.85 (0.62–1.13)	270 (228–305)	151.9	<i>Diadema setosum</i> , <i>Echinothrix calamaris</i>	Filipinas	Hyman (1960), Komschlies & Vande Vussen (1980a)
<i>S. inconspicua</i>	(5.00 máximo)	2.50	200	108.5	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Washington, EUA	Westervelt & Kozloff (1992)

<i>S. longicanalis</i>	1.55 (0.91–2.44)	0.86 (0.50–1.32)	478 (296–838)	-	<i>Tripneustes gratilla</i> , <i>Toxopneustes pileolus</i>	Kenia	Moens et al (1994)
<i>S. mammilata</i>	1.77 (1.29–2.22)	0.65 (0.57–0.76)	280 (192–360)	130.2	<i>Echinometra oblonga</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vusse (1980b)
<i>S. neglecta</i>	(3.50 máximo)	2.00	(125–160)	86	<i>Alloccentrotus fragilis</i>	Washington, EUA	Westervelt & Kozloff (1992)
<i>S. obhoriensis</i>	(3.00–4.00)	(0.70–1.80)	Muy corto	-	<i>Echinothrix diadema</i>	Mar rojo	Beltagi & Mandura (1991)
<i>S. pallida</i>	(1.30–1.70)	(0.80–1.16)	(134–137)	-	<i>Echinocardium cordatum</i>	Tasmania	Hickman (1956)
<i>S. patagonica</i>	1.68 (1.32–2.33)	0.59 (0.40–0.69)	36 (25–50)	-	<i>Arbacia dufresnii</i>	Argentina	Brogger & Ivanov (2010)
<i>S. philippinensis</i>	2.00 (1.43–3.09)	1.48 (0.98–2.09)	500 (260–600)	108.5	<i>Echinometra oblonga</i>	Filipinas	Komschlies & Vande Vusse (1980b)
<i>S. punicea</i>	(2.00–4.70)	(1.20–2.40)	668	-	<i>Heliocidaris erythrogramma</i> , <i>Amblypneustes ovum</i>	Tasmania, Australia	Hickman (1956)
<i>S. rubida</i>	3.50	1.30	170–190	86	<i>Echinus esculentus</i>	Inglaterra, Francia	Kozloff & Westervelt (1990)
<i>S.n. sp.</i>	1.90 (1.54–2.27)	0.69 (0.46–0.96)	761 (737–800)	321.5	<i>Echinometra vanbrunti</i>	Oaxaca, México	Presente estudio



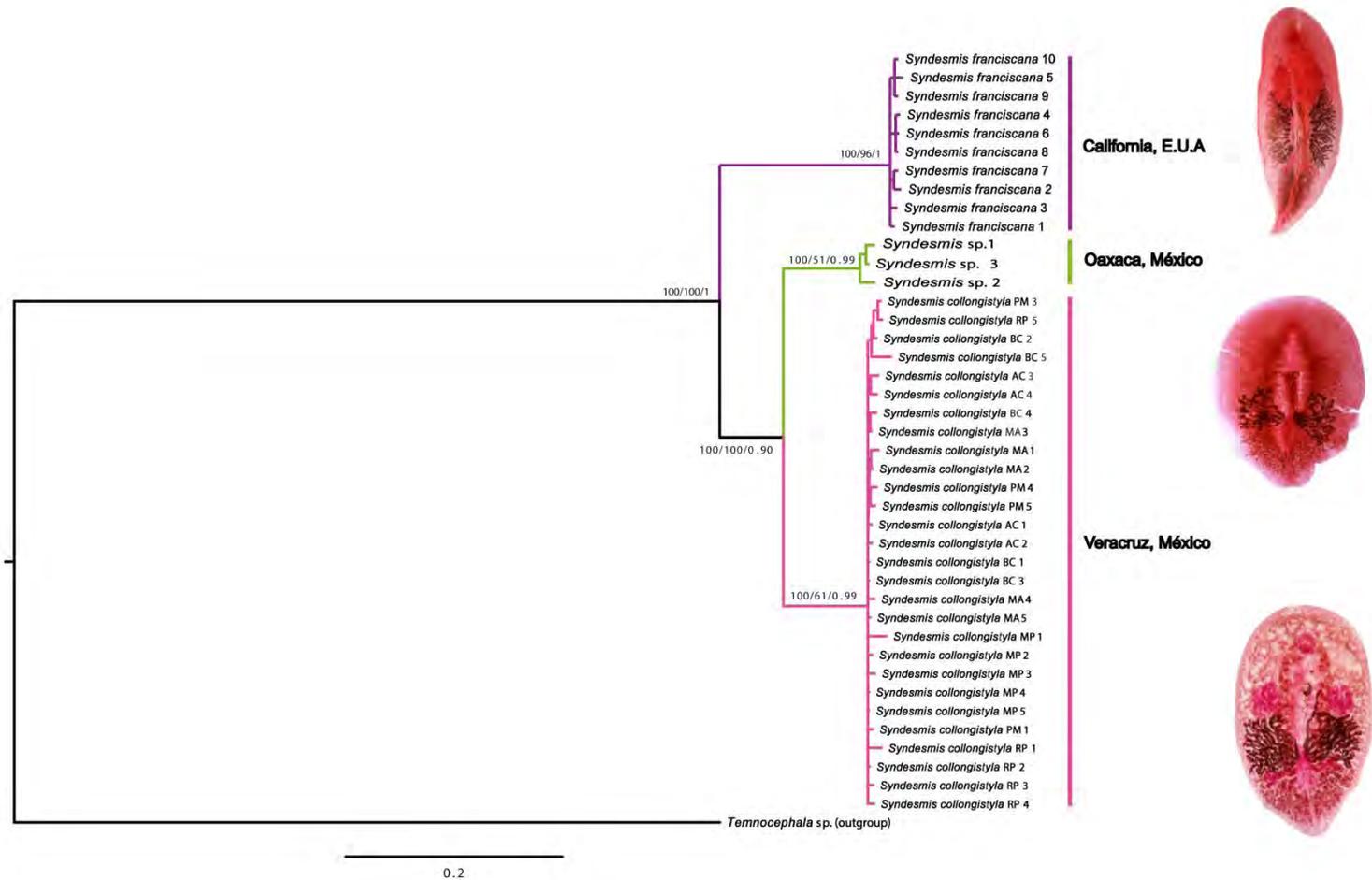
**Figura 12. *Syndesmis n. sp.*, Oaxaca, México:** 1. Vista ventral de una preparación total de un organismo teñido con paracarmin de Meyer, exhibiendo la capsula del huevo, 2. Vista ventral de un individuo, mostrando en la región media almohadillas, bajo microscopia electrónica de barrido, 3. Acercamiento a las almohadillas en la región media ventral del epitelio, mediante microscopia electrónica de barrido, 4. Acercamiento a los cilios en la región dorsal del epitelio, mediante microscopia electrónica de barrido, 5. Corte longitudinal de la región dorsal, mostrando células epiteliales cuboidales en una sola hilera y 6. Corte longitudinal de la región media ventral, mostrando células epiteliales cuboidales en tándem.

### III. Filogenia molecular del género *Syndesmis* Francois, 1886.

La longitud de cada matriz de caracteres moleculares fue de 525 pb para el gen ribosomal 28S, 298 pb para el gen mitocondrial citocromo C oxidasa, y de 450 pb para el gen mitocondrial citocromo b; la matriz final concatenada incluyó 1273 pb alineadas.

El análisis de parsimonia de los genes concatenados (28S+COI I+ Cyt b), arrojó 4 árboles más parsimoniosos con una longitud de 705 pasos, un índice de Consistencia (IC) de 0.85 y un índice de Retención (IR) de 0.94; el árbol de consenso estricto de los genes concatenados se muestra en el (ANEXO 4). El análisis de Máxima Verosimilitud arrojó un árbol de máxima credibilidad con una verosimilitud de -4758.984 (ANEXO 4).

Los tres genes utilizados de manera individual y conjunta, tanto ribosomales (28S) como mitocondriales (COI I y Cyt b) y bajo los tres métodos filogenéticos empleados recuperaron topologías compatibles entre sí (ANEXOS 5), con algunos cambios en el arreglo de las terminales, pero muestran que el género *Syndesmis* es un grupo monofilético, conformado por dos clados con valores de bootstrap y probabilidad posterior altos (Figura 13, Árbol de Inferencia Bayesiana). El primero de estos clados lo integran las muestras de California, EUA, que corresponden a la especie *Syndesmis franciscana* (p=1). El segundo clado lo constituyen dos linajes con altos valores de soporte en sus ramas: la especie *Syndesmis collongistyla* del estado de Veracruz en el Golfo de México y su grupo hermano, la nueva especie del Pacífico Mexicano (*Syndesmis* n. sp.)



**Figura 13.** Hipótesis filogenética del género *Syndesmis* obtenido bajo Inferencia Bayesiana en Mr. Bayes, de la matriz concatenada de los genes 28S + COI I + Cyt b; los valores de bootstrap (MP)/ bootstrap (MV)/probabilidad posterior (pp) se muestran en los internodos de las ramas.

#### IV. Divergencia genética intra e interespecífica de las especies de *Syndesmis*

Los rangos de divergencia genética interespecífica oscilaron entre 10-20% para el gen COI I (distancias p) y 11-23% (K2p), mientras que para el citocromo b variaron de 14-22% (distancias p) y 15-24% (K2p); finalmente el gen 28S los rango de divergencia genética para las distancias p están entre 0-2 % y bajo el modelo K2p de 0-3 % (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Distancias genéticas entre las especies del género *Syndesmis* analizadas en el presente estudio.**

	Distancias (p)			Distancia K2p		
	%			%		
	COI	Citocromo b	28S	COI	Citocromo b	28S
<i>Syndesmis franciscana</i> vs <i>Syndesmis collongistyla</i>	19-20	18-20	2	22-24	20-26	3
<i>Syndesmis franciscana</i> vs <i>Syndesmis</i> n. sp.	18-19	19-20	2	21-22	22-24	3
<i>Syndesmis collongistyla</i> vs <i>Syndesmis</i> n. sp.	10-11	13-16	0	11-12	15-18	0

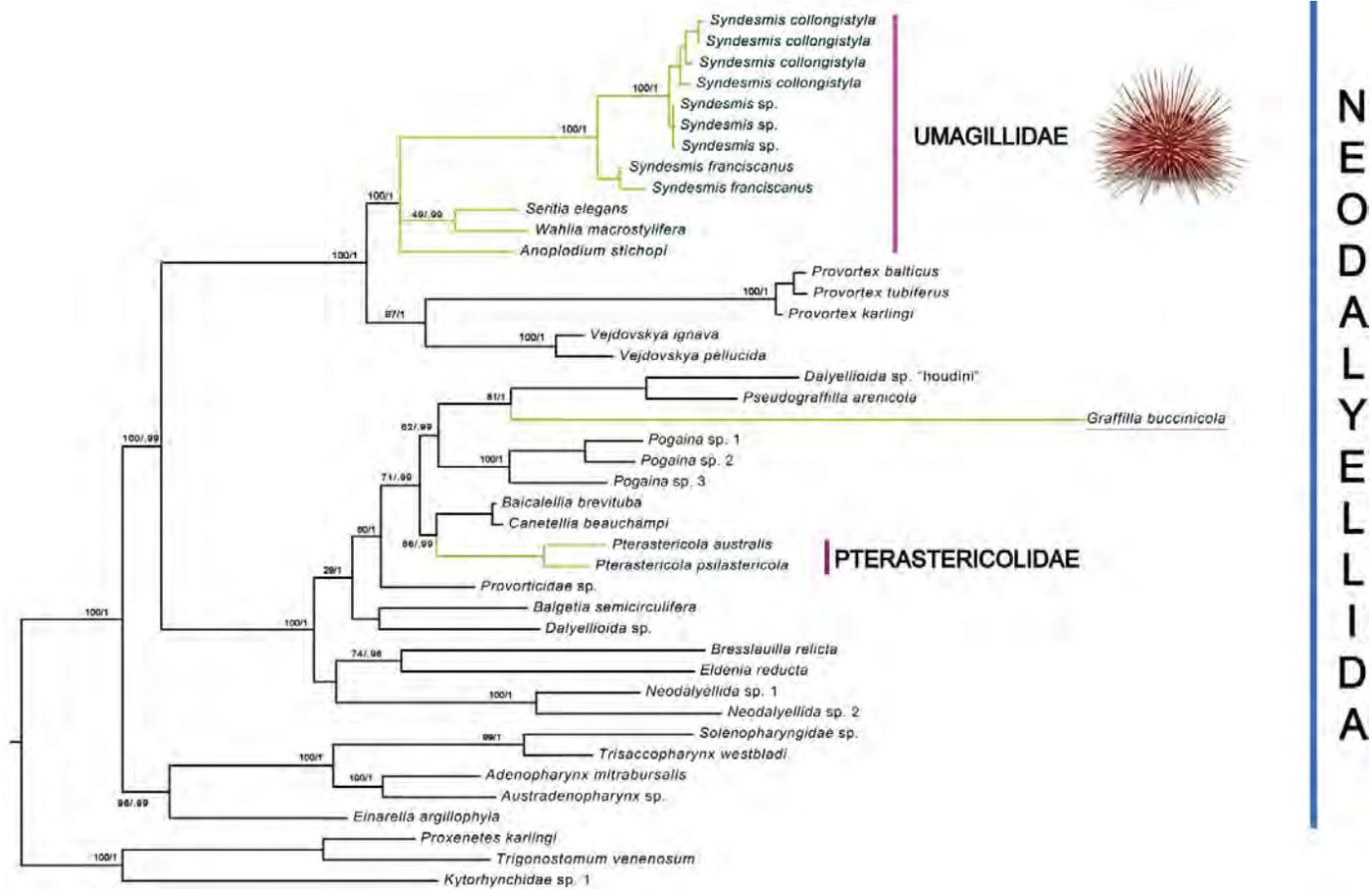
La divergencia estimada de las distancia no corregidas (p) y bajo el modelo de Kimura dos parámetros (K2p) intraespecífica de las poblaciones de *Syndesmis collongistyla* en el estado de Veracruz, México; entre las seis localidades muestreadas utilizando el gene mitocondrial COI I oscilan entre 0-1 % y mientras que en el ribosomal 28S fueron nulas (0%) ambos marcadores mostraron valores bajos en comparación al gen citocromo b (1-3%, distancias p) y (1-4%, K2p), encontrando mayor divergencia bajo este marcador.

## V. Infraorden Neodalyellida

El alineamiento del gen 18S del Infraorden Neodalyellida, consistió en 34 terminales y 1848pb; mientras que el alineamiento del 28S incluyó 35 terminales y 1798 pb . La matriz concatenada de los dos genes ribosomales comprendió 35 terminales con un total de 3646 pb.

Los árboles generados a partir de los genes individuales y concatenados, bajo los tres métodos de inferencia filogenética, arrojan topologías compatibles entre si (ANEXO 6). Neodalyellida está conformado por tres clados (A, B y C) con valores de soporte altamente significativos. El análisis de parsimonia de los genes concatenados (18S+28S), arrojó un árbol más parsimoniosos con una longitud de 7422 pasos, un índice de Consistencia (IC) de 0.478 y un índice de Retención (IR) de 0.611; el árbol de consenso estricto de los genes concatenados e individuales se muestra en el (ANEXO 7). El método de Máxima Verosimilitud arrojó un árbol de máxima credibilidad con una verosimilitud de -38914.59 de los genes concatenados (ANEXO 7).

En el arbol obtenido por Inferencia Bayesina (Fig. 14), se observa que el Clado A está constituido por la familia Umagillidae más los géneros *Provortex* y el género *Vejdovskya* pertenecientes a la familia Provorticidae. Umagillidae está integrada por las tres especies del género *Syndesmis* teniendo como grupo hermano a los géneros *Seritia* (*Seritia elegans*), *Whalia* (*Whalia macrostityfera*) y *Anoplodium* (*Anoplodium stichopi*), confirmando la monofilia de la familia. El Clado B lo integran un complejo de dos familias (Graffillidae, Pterastericolidae), diferentes géneros (*Canetellia*, *Baicalellia*, *Pogaina*, *Balgetia*, *Eldenina*, *Provorticidae* sp.) y taxones no descritos. Finalmente el Clado C está compuesto por el género *Einarella* de la familia Promesostomidae, más la familia Solenopharyngidae.



**Figura 14.** Hipótesis filogenética del infraorden Neodalyellida basada en la combinación de los genes ribosomales 18S y 28S, obtenido mediante el método filogenético de Inferencia Bayesiana en el programa Mr.Bayes 3.2.5. En color verde se muestran los taxones recolectados en el present trabajo. Los valores de bootstrap (ML) y probabilidad posterior (pp) se muestran en los nodos internos. Los Clados marcados con una franja rosa y sus ramas de color verde, indican los orígenes independientes de las relaciones simbióticas (comensales ó parasitas) dentro del Infraorden.

## Discusión General

Históricamente la taxonomía de las especies del género *Syndesmis* ha sido problemática; principalmente las especies se han determinado por el largo y ancho de los organismos así como por la longitud y posición del estile del pene (Stunkard & Corliss, 1951). Sin embargo, en muchos casos, tales identificaciones son dudosas por la insuficiencia de las descripciones originales de la mayoría de las especies, así como por la realización de sinonimias confusas, literatura antigua y de difícil acceso, y en general, falta de unificación en la elección de caracteres diagnósticos (Doignon & Artois, 2006). Casos similares ocurren en la mayoría de los grupos de turbelarios; es por eso que publicaciones recientes (e.g., Lago et al., 2015; Álvarez et al., 2015; Álvarez & Riutort, 2014 y Sluys et al., 2013) han sugerido la necesidad de reevaluar el estatus de las especies actuales, incluyendo el examen del material tipo y que la descripción de nuevas especies deba basarse en múltiples evidencias como la combinación de datos moleculares. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se utilizó por primera vez este tipo de información (genes ribosomales y mitocondriales) y de esta forma reforzamos la separación y distinción de las especies evaluadas. No obstante, el uso de los caracteres propuestos por Stunkard y Corliss (1951) permitieron la identificación morfológica de dos especies ya conocidas: *Syndesmis franciscana* de California, E.U.A y *Syndesmis collongistyla* de Veracruz, México y de una nueva especie (*Syndesmis* n. sp.) de Oaxaca, México.

Complementariamente, la revisión del material tipo de 15 de las 24 especies descritas para este género ayudó a detectar las distintas formas y dimensiones de la base del estilete del pene en cada una, carácter altamente conservado por ser una estructura esclerotizada, que no sufre alteraciones en los procesos de fijación, tinción y montaje de los organismos. Este carácter proporciona una fuerte evidencia para la distinción de las especies evaluadas, por lo que los proponemos como nuevos caracteres diagnósticos para la separación de las especies que integran al género *Syndesmis*. Adicionalmente, la obtención de las primeras fotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de especies del género *Syndesmis* y en general de toda la familia Umagillidae, permitió detectar la gran variación en la cobertura de cilios epiteliales entre las especies (Fig. 8 (4), 10 (2 y 3) y 12 (3 y 4)). De igual manera, mediante la realización de cortes histológicos, se observaron diferencias claras en la forma y el arreglo de las células de las epidermis; ambos caracteres nos permitieron llevar a cabo una identificación más robusta de las especies evaluadas. Su utilidad deberá comprobarse a través del estudio de un mayor número de especies bajo estas técnicas.

El uso de marcadores ribosomales 18S y 28S se han utilizado ampliamente para los análisis filogenéticos en rabdocelos (Willems et al., 2006, Van Steenkiste et al., 2013), por su fácil amplificación utilizando primers universales (28S, Whiting, 2002; Prendini et al., 2005 y 18S, Apakupakul et al. 1999)

y porque la mayoría de las especies tienen secuencias únicas de estos marcadores (Park, 2007; Vanhove et al., 2013); lo anterior convierte a esta región en un marcador útil para los distintos enfoques genéticos de la sistemática a nivel de grandes grupos; sin embargo, su utilidad a nivel de distinción de especies es muy reducida ya que son genes muy conservados.

El empleo de códigos de barras genéticos ha sido exitoso para la identificación de especies de animales y es particularmente útil como herramienta para la identificación de taxones morfológicamente similares o para grupos que requieren metodologías especializadas para su identificación (Batouska, et al., 2016; Sundberg et al., 2016), pero rara vez han sido formalmente probados en grupos problemáticos como los rabdocelos (incluido el género *Syndesmis*); en el presente estudio se probó formalmente que los marcadores mitocondriales citocromo C oxidasa I (COI I) y citocromo b (Cyt b), resultaron ser efectivos para diferenciar estas especies de planarias, a pesar de amplificar secuencias cortas (mini-barcode); asimismo, no hubo contaminación de las muestras del hospedero con quien se asocian, los cronogramas se interpretaron fácilmente y los protocolos estandarizados en el presente estudio pueden ser utilizados para otros grupos rabdocelos; lo anterior contradice a trabajos previos donde se señala que la limitación para el uso de los códigos de barras en rabdocelos es la difícil amplificación del COI I del grupo (Vanhove et al., 2013). Por esta razón muchos estudios sobre rabdocelos consideran como mejores candidatos a los genes ribosomales y claramente es evidente por el número de secuencias disponibles en GenBank hasta el 26 abril de 2017: 18S (383), 28S (329) COI I (70) y Cyt b (1). En total, en nuestro estudio se reconocen 3 especies genéticamente diferenciadas, dos de las cuales pertenecen a especies previamente descritas (*Syndesmis collongistila* y *Syndesmis franciscana*) y una especie nueva *Syndesmis* n. sp., de Oaxaca, México, asociada al erizo *Echinometra vanbrunti*, confirmadas por los caracteres morfológicos descritos previamente.

La comparación interespecífica de las secuencias del gen mitocondrial citocromo C oxidasa, citocromo b y del gen ribosomal 28S para las tres especies estudiadas, arrojó diferencias importantes; las divergencias genéticas con base en distancias no corregidas (p) y Kimura dos parámetros (K2p) entre las tres especies son muy altas, en comparación con otras especies de gusanos planos no-Neodermata previamente reportadas (Lago et al., 2013). Lago y colaboradores indicaron que la divergencia genética para el gen citocromo C oxidasa I en planarias terrestres osciló entre 3.3% y 14.4 bajo el modelo de Kimura dos parámetros; estos autores consideran que dichos valores son suficientes para definir especies genéticamente distintas; por lo tanto, podemos establecer que los valores obtenidos en nuestro estudio [10-20% para el gen COI con distancias p y 11-23% para K2p y 14 y 22% (distancias p) y 15-24% (K2p) para el citocromo b] son suficientes para identificar especies del género *Syndesmis*; sin embargo es necesario su aplicación en otras especies para corroborar dichos resultados.

Cabe señalar que es necesario ampliar la representación de secuencias de genes mitocondriales en las bases de datos públicas (Genbank y BOLD Systems), para ampliar el uso de códigos de barras genéticos hacia organismos no modelo, los cuales actualmente están muy poco representados (Álvarez-Presas et al., 2012; 2014 y 2015). En el caso de las planarias simbiontes del género *Syndesmis* que estudiamos, su representación antes de este trabajo era nula y es especialmente importante su incorporación a las bases de datos mencionadas, ya que su estudio está vinculado a una identificación morfológica previa.

Los valores de divergencia interespecifica obtenidos para los genes COI I y Cyt b (mitocondriales) en el presente estudio son muy elevados en comparación con los registrados para el gen ribosomal 28S (Cuadro 8); de esta forma, la utilización de genes mitocondriales proporciona una base sólida para reforzar la distinción entre especies, ya que los valores registrados en nuestro estudio son suficientes para realizarla, contrario a lo que se ha observado en otros gusanos planos (Lago et al., 2013; Zhang et al., 2014). Este aspecto es importante ya que permite incorporar nueva información al conocimiento de este grupo de rhabdocelos logrando una aproximación taxonomía integrativa (Schlick et al., 2009; Sluys et al. 2013). Sin embargo, a nivel intraespecifico las poblaciones de *Syndesmis collongystila* en el Golfo de México presentaron muy poca variación en ambos genes; para el Cyt b se obtuvieron valores entre 1 y 4% con el modelo Kimura dos parámetros y los genes COI I y 28S arrojaron valores de 0; estos resultados indican que las seis poblaciones muestreadas de esta planaria en el Golfo de México, representan la misma misma especie con una estructura genética homogénea a pesar de estar separadas por mas de 500 km; este fenómeno ha sido previamente reportado en otras especies de invertebrados marinos, principalmente equinodermos (Leisson et al., 2001; Kinlan & Gaine, 2003) y moluscos (Fernández et al., 2015); lo anterior ha sido atribuido a que la mayoría de estos organismos presentan estadios larvales que pueden ser capaces de viajar cientos de kilómetros durante su desarrollo, y generalmente estas especies tienen una estructura genética homogénea en toda su área geográfica de distribución y unicamente estructuras oceanograficas grandes podrían arrojar quiebres biográficos importantes, que modifiquen estos patrones genéticos (Palumbi, 1992, 1994; Kinlan & Gaine, 2003).

Con base en los análisis filogenéticos moleculares y la complementación de los mismos con análisis morfológicos, se confirmó la presencia de una especie nueva: *Syndesmis* n. sp., de Oaxaca, México, asociada al erizo *Echinometra vanbrunti*. Este resultado nos muestra que la utilización de genes mitocondriales da una resolución fuerte para distinguir entre las especies evaluadas, con información ribosomal (28S), mitocondrial (COI y citocromo b) y morfológica.

Nuestro trabajo representa la primera propuesta filogenética con bases moleculares para las especies del género *Syndesmis*; los distintos análisis filogenéticos, tanto de los genes individuales y concatenados indican que las especies evaluadas establecen al género *Syndesmis* como monofilético y al

igual que los datos morfológicos muestran la presencia de tres especies con correspondencia geográfica y hospedatoria; en nuestros resultados destaca la conformación del clado entre *S. collongistyla* que se distribuye en el Golfo de México y *Syndesmis* n. sp., en el Océano Pacífico mexicano como grupos hermanos, pues se esperaría que esta última tuviera una relación más cercana entre la nueva especie y *S. franciscana* por pertenecer ambas a la misma región marítima, el Océano Pacífico.

No obstante, las relaciones filogenéticas encontradas pueden explicarse en términos biogeográficos, con base en las barreras que separan a las planarias estudiadas, provocando un evento de vicarianza, es decir, el surgimiento de una barrera geológica que fragmentó la distribución de la especie ancestral de la cual evolucionaron ambas especies (Morrone, 2007), hipótesis similar a la propuesta para los hospederos que habitan. McCartney et al. (2000), señalaron que los procesos de cladogénesis de los erizos de mar *Echinometra lucunter* y *E. vanbrunti* (hospederos de las planarias analizadas en el actual trabajo) fueron provocados por el surgimiento del Istmo de Panamá. De acuerdo con estos autores, ambas especies de erizos son hermanas, lo cual estaría sugiriendo un proceso de coespeciación entre hospederos y sus especies simbioses. Este concepto es fuertemente aceptado en los procesos de diversificación en los simbioses; principalmente en aquellos que son específicos hacia sus hospederos, divergiendo los asociados como consecuencia directa de la diferenciación de sus hospederos (Hafner & Nadler, 1988). Sin embargo, esto debe comprobarse con patrones cofilogenéticos, estudios comparativos de las tasas de especiación y evolución en la asociación hospedero-simbionte y demostrar una historia en común, ofreciendo interesantes posibilidades para un análisis de congruencia biogeográfica y eventos de coespeciación (Page, 2003; Vienne et al., 2012).

### **Relaciones filogenéticas del Infraorden Neodalyellida**

El resultado de la reconstrucción filogenética de los genes ribosomales concatenados 18S+28S (Figura 11), que hemos recuperado en el actual estudio; muestra en términos generales que nuestros resultados concuerdan con hipótesis previas (Jondelius & Thollessen, 1992, Willems et al., 2006 y Steenkiste et al., 2013), de que el Infraorden Neodalyellida es un grupo monofilético, compuesto por los grupos Solenopharyngidae, Pterisrastericollidae+Graffilla y Provorticinae+Umagillidae.

La inclusión de nuestro objeto de estudio el género *Syndesmis* en las reconstrucciones filogenéticas anteriormente mencionadas, confirma la monofilia de la familia Umagillidae, esta agrupación se ve reforzada al ser todos los géneros analizados como simbioses de equinodermos (Doignon & Artois, 2006) y por la presencia de un gonoporo caudal y una válvula bursal, en términos morfológicos (Jondelius & Thollessen, 1992); sin embargo las interrelaciones de la familia ha estado debatidas en varias interpretaciones (Cannon, 1982, Jondelius & Thollessen, 1992, y Steenkiste et al., 2013). Los datos moleculares utilizados en el presente trabajo indican que los umagillidos están divididos

en dos clados: uno integrado por las tres especies del género *Syndesmis* y el otro clado conformado por los géneros *Whalia*+*Seritia* y *Anoplodium*. Los caracteres compartidos entre los integrantes de *Syndesmis* es la presencia de un estilete del pene esclerotizado largo y los nuevos caracteres propuestos en el presente estudio (ver resultados morfológicos) y por ser simbioses exclusivamente de equinodermos irregulares (Doignon & Artois, 2006). El género *Whalia* y *Seritia* presentan dos importantes sinapomorfias: vesícula seminal anterior a la mitad del cuerpo y un estilete del pene corto, por su parte el género *Anoplodium* es simbiote de la cavidad de los pepinos de mar (Holothuroidea) y presenta únicamente un ovario y estructuras genitales no esclerotizadas (Cannon, 1982).

Anterior a la integración del género *Syndesmis* en análisis moleculares, la familia Umagillidae y Provorticinae, mostraban una politomia (Steenkiste et al., 2013), y había sido fuertemente discutida su relación por Karlingi (1956); sin embargo nuestros resultados logran una diferenciación fuertemente apoyada por los valores de bootstrap y probabilidad posterior en nuestras distintas reconstrucciones filogenéticas.

La hipótesis filogenética del infraorden Neodalyellida, indica tres eventos independientes del surgimiento de estrategias simbióticas dentro de este grupo. Los acontecimientos ecológicos y evolutivos que ocasionaron los múltiples orígenes de las relaciones simbióticas o la transición de una vida comensal a parasita aun no están muy claros en los gusanos no-neodermata; particularmente para la familia Umagillidae siendo la familia más grande con individuos simbioses, por lo tanto es necesario la integración de un mayor número de estudios desde un punto de vista ecológico, fisiológico, especificidad hospedadora, preferencias nutricionales para poder profundizar en estos animales y tener mas claro la línea evolutiva que conocemos actualmente de este grupo.

Canon (1982), propone que las formas comensales del celoma de holoturoideos (*Anoplodium*) surgieron de organismos asociados al intestino de sus hospederos (*Whalia* y *Seritia*), sin embargo Steenkiste et al (2013), sugiere con su propuesta filogenética que esta hipótesis no puede comprobarse sin la integración de un mayor número de organismos simbioses, nuestro análisis propone lo contrario a lo de Canon (1982), ya que las formas del celoma son el grupo más basal dentro de nuestra filogenia; siendo los grupos intestinales los que divergieron posteriormente.

Pterastericolidae incluye también especies simbioses de equinodermos pero exclusivamente de la clase Asteroidea (estrellas de mar), anteriormente había sido vinculado a varios grupos de dalyeloideos e incluso Neodermata por su naturaleza simbiote (Cannon, 1986, Jondelius, 1992 (a) y Jondelius, 1992 (b)); sin embargo Rohde et al (1993), a raíz de trabajos con el gen 18S, descarta dicha propuesta y desde el trabajo de Willems et al., (2006) y confirmado por Steenkiste et al (2013) y el presente estudio, quedan incluidos a los Neodalyellida; por su parte la familia Graffillidae es un grupo polifilético de organismos

endosimbiontes de gasterópodos, son organismos micrófagos y dependen directamente del alimento pre-digerido de sus hospederos (Jennings & Phillips, 1978).

Estos resultados confirman que las relaciones simbióticas en rabdocelos marinos se originaron varias veces de manera independiente a partir de diferentes estrategias nutricionales (Jennins, 1977; Halton, 1997); lo anterior eventualmente los pudo haber llevado a una simbiosis obligada en algunos clados, por ejemplo la familia Umagillidae. Este fenómeno se ha observado en la mayoría de los phyla de metazoarios que presentan organismos con alguna estrategia simbiótica (Weistein & Kuris, 2016), i.e., 223 ocasiones en todos los grupos de metazoarios; particularmente para el phylum Platyhelminthes se habían reportado tres eventos de origen independiente y con la integración de los endosimbiontes del género *Syndesmis* este número aumenta a cuatro. Sin embargo el conocimiento sobre los grupos de turbelarios que presentan algún tipo de relación simbiótica aun esta muy limitado, aspecto que impide conocer los procesos de diversificación del grupo para mejorar el entendimiento de su evolución (Brooks et al., 2013).

## Conclusiones

- Se redescriben dos especies del género *Syndesmis*: *S. collongistyla* asociada a *Echinometra lucunter* de Veracruz, México, *S. franciscasana* asociada a *Strongylocentrotus franciscanus* y *Strongylocentrotus purpuratus* de California, EUA.
- Se describe una nueva especie del género *Syndesmis* asociada a *Echinometra vanbrunti* de Oaxaca, México.
- Todas las especies constituyen nuevos registros para las localidades muestreadas y *S. collongistyla* es reportada por primera vez en el país.
- Se propone la forma y ancho de la base del estilete, el arreglo y forma de los cilios del epitelio y de las células de la epidermis, como caracteres diagnóstico para la descripción taxonómica de las especies que integran el género *Syndesmis*.
- La evidencia molecular respalda la existencia de tres especies genéticamente diferenciadas, con base en los genes utilizados.
- Se confirma la monofilia de la familia Umagillidae y el género *Syndesmis* con base en caracteres moleculares obtenidos de los genes 18S rDNA y 28S rDNA.
- Se considera que las relaciones simbióticas dentro del Infraorden Neodalyellida presentan orígenes múltiples con base en estrategias nutricionales independientes.
- Los bajos niveles de divergencia genética revelan poca o nula variación en las poblaciones analizadas del Golfo de México, a pesar de estar separadas por más de 500 km.
- La utilización de marcadores mitocondriales COI I (mini-barcode) y Cyt b resultó ser efectiva para realizar una propuesta filogenética sobre el género y para descubrir la riqueza del grupo, contribuyendo en gran medida a la construcción de una mejor clasificación taxonómica. Además, los datos moleculares permitieron inferir historias evolutivas que no podrían ser reveladas sólo sobre bases morfológicas.

## Bibliografía

- Aguado, M. T., C. Grande, M. Gerth, C. Bleidorn, & C. Noreña. (2016). Characterization of the complete mitochondrial genomes from Polycladida (Platyhelminthes) using next-generation sequencing. *Gene*. 575:199-205.
- Akaike, H. (1973). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B. N. Csaki, F. (Eds). Second International Symposium on Information Theory. Akademia Kiado. Budapest, Hungary, 267-281.
- Alfaro M.E., S. Zoller, & F. Lutzoni. (2003). Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Molecular Biology and Evolution*. 20: 255- 266.
- Álvarez-Presas, M.; Mateos, E.; Vila-Farré, M.; Sluys, R.; Riutort, M. (2012). Evidence for the persistence of the land planarian species *Microplana terrestres* (Müller, 1774) (Platyhelminthes, Tricladida) in microrefugia during the Last Glacial Maximum in the northern section of the Iberian Peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 64:491-499.
- Álvarez, P. M., & M. Riutort. (2014). Planarian (Platyhelminthes, Tricladida) Diversity and Molecular Markers: A New View of an Old Group. *Diversity*. 6: 323-338.
- Álvarez, P. M., S. V. Amaral, F. Carbayo, Z. A. M. Leal, & M. Riutort. (2015). Focus on the details: morphological evidence supports new cryptic land flatworm (Platyhelminthes) species revealed with molecules. *Organisms Diversity & Evolution*. 15: 379-403.
- Apakupakul, K., M. E. Siddall & E. M. Bureson. (1999). Higher-level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 350-359.
- Baguñá, J. & M. Riutort. (2004). Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Canadian Journal of Zoology*. 82: 168-193.
- Batovska, J., M. J. Blacket, K. Brown, & S. E. Lynch. (2016). Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution*. 6: 3001-301.
- Beltagi, S. & A.S. Mandura. (1991). *Syndesmis obhoriensis* new species an endoparasite turbellarian (Rhabdocoela: Umagillidae) of the sea urchin *Echinothrix diadema* in the Red Sea (Jeddah). *Journal of King Abdulaziz University*. 4:43-55.
- Brogger, M. & V. A. Ivanov. (2010). *Syndesmis patagonica* n. sp. (Rhabdocoela: Umagillidae) from the sea urchin *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea) in

- Patagonia, Argentina. *Zootaxa*. 2442: 60-68.
- Brooks, D.R., & D. A. McLennan. (1993). Macroevo­lutionary patterns of morphological diversification among parasitic flatworms (Platyhelminthes, Cercomeria). *Evolution*. 47: 495-509.
  - Brusca R. C., W. Moore, & S. M. Shuster. (2016). *Invertebrates*, 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 602 p.
  - Bumham, K. P., D. R. Anderson, & K. P. Huyvaert. (2011). AICc model selection in the ecological and behavioral sciences: some background, observations and comparisons. *Behavioral Ecology & Sociobiology*. 65: 23:35.
  - Caira, J. N., & D. T. J. Littlewood. (2013). Worms, Platyhelminthes. *In: Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press. Waltham, M. A. 437-469 p.
  - Cannon, L.R.G. (1987). Two new rhabdocoel turbellarians, *Umagilla pacifica* sp. n. and *U. karlingi* sp. n. (Umagillidae), endosymbiotic with holothurians (Echinodermata) from the Great Barrier Reef; and discussion of sclerotic structures in the female system of the Umagillidae. *Zoologica Scripta*. 16:297-303.
  - Cannon, L.R.G. 1982. Endosymbiotic umagillids (Turbellaria) from holothurians of the Great Barrier Reef. *Zoologica Scripta* .11:173-188.
  - Delsuc, F., B. Henner, & P. Hervé. (2005). Phylogenomics and the Reconstruction of the tree of life. *Genetics. Nature Reviews*. 6:361-375.
  - DeSalle, R., G. Giribet & W. C. Wheeler. (2002). *Molecular Systematics and Evolution: Theory and Practice*. Berlin: Birkhäuser.
  - Doignon, G. & T. Artois. (2006). Annotated checklist of the umagillid turbellarians infesting echinoids (Echinodermata). *Belgian Journal of Zoology*. 136:101-106.
  - Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32: 1792-1977.
  - Egger, B., F. Lapraz, B. Tomiczek, S. Muller, C. Dessimoz, J. Girstmair, N. Skunca, K. A. Rawlinson, C. B. Cameron & E. Beli. (2015). A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. *Current Biology*. 25: 1347-1353.
  - Ehlers, U. (1985). *Das Phylogenetische System der Plathelminthes*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. German. 317 p.
  - Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17: 368-376.
  - Felty, L. S. (2007). *The Light and Smith Manual: Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon*. University of California Press. London. England. 1006 p.

- Folmer, O., M. Black M, W. Hoeh, R. Lutz, & R. Vrijenhoek. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- François, P. (1886). Sur le *Syndesmis*, nouveau type de Turbellariés décrit par, M. W.A. Silliman. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*.103:752-754.
- Goloboff, P. A., J. S. James, & K.C. Nixon. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 1-13.
- Guindon, S., & O. Gascuel. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. 52: 696-704.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S. L. Ball, & J. R. de Waard. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 313-322.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham, & J. R. de Waard. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B (Supplement)* 270: S96-S99.
- Hendler, G., J. E. Miller, D. L. Pawson & P. M. Kier. (1995). *Sea Stars, sea urchins & Allies: Echinoderms of Florida & the Caribbean*. Smithsonian Institution Press, Washington. 390 p.
- Henning, W. (1950). *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*. Deutscher Zentralverlag. Berlin. 370 p.
- Henning, W. (1966). *Phylogenetic systematics*. Urbana: University of Illinois Press. 263 p.
- Hertel, L.A. & D.W. Duszynski. (1991). *Syndisyrix evelinae* (Marcus, 1968) n. comb, from the rock-boring urchin, *Echinometra lucunter*, from St. Barthélemy. *Journal of Parasitology*. 77:638-639.
- Hertel, L.A., D.W. Duszynski, & J.E. Ubelaker. (1990). Turbellarians (Umagillidae) from Caribbean urchins with a description of *Syndisyrix collongistyla* n. sp. *Transactions of the American Microscopical Society*. 109: 273-281.
- Hickman, V.V. (1956). Parasitic Turbellaria from Tasmanian Echinoidea. *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*. 90:169-181.
- Huelsenbeck, J. P., F. Fredrik, R. Nielsen & J. P. Bollback. (2001). Bayesian Inference of Phylogeny and its Impact on evolutionary biology. *Science*. 249: 2310-2314.
- Hyman LH. (1951). *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela. The Acoelomate Bilateria*. Vol 2. New York: McGraw-Hill.

- Hyman, L.H. (1955) The Invertebrates: Echinodermata. The coelomate Bilateria. Vol. IV. McGraw-Hill Book Company. New York. 763 p.
- Hyman, L.H. (1960). New and know umagillid rhabdocoels from echinoderms. American Museum Novitates, 1984: 1-14.
- Jangoux, M. (1990). Diseases of Echinodermata. In Kinne, O. (Ed.), Diseases of Marine Animals. Biologischen Anstalt. Helgoland, Hamburg. 439-567 p.
- Jennings, J. B. (1997). Nutritional and respiratory pathways to parasitism exemplified in the turbellaria. International Journal of Parasitology. 27:679-691.
- Jennings, J.B. & D.F. Mettrick. (1968). Observations on the ecology, morphology and nutrition of the rhabdocoel turbellarian *Syndesmis franciscana* (Lehman, 1946) in Jamaica. Caribbean Journal of Science. 8:57-69.
- Joffe, B. I. & E. E. Kornakova. (2001). Flatworm phylogeneticist: betweenmolecular hammer and morphological anvil, in: Interrelationships of the Platyhelminthes. Littlewood D.T.J.& Bray R.A. (eds), Taylor & Francis, London. 279-291.
- Jondelius, U. (1996). Three echinoderm inhabiting flatworms (Platyhelminthes, Rhabdocoela) from Western Australia. Belgian Journal of Zoology. 126:37-48.
- Jondelius, U., T.I. Ruiz, J. Baguñá, & M. Riutort. (2002). The Nemertodermatida are basal bilaterians and not members of the Platyhelminthes. Zoologica Scripta. 31(2): 201-215.
- Jorger K.M., & M. Schrod. (2013). How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. Frontiers in Zoology 10: 59.
- Kannan, L., & W. C. Wheeler. (2012). Maximum parsimony on phylogenetic networks. Algorithms for Molecular Biology. 7:9.
- Katayama, T., M. Nishioka, & M. Yamamoto. (1996). Phylogenetic Relationships among Turbellarian Orders Inferred from 18S rDNA Sequences. Zoological Science 13:747-756.
- Kearse M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies, & A. Drummond. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28(12): 1647-1649.
- Komschlies, K.L. & F.J. Vande Vusse. (1980a). *Syndesmis compacta* sp. nov. and redescription of *S. glandulosa* Hyman,1960 (Turbellaria: Umagillidae) from Philippine sea urchins. Journal of Parasitology. 66: 664-666.
- Komschlies, K.L. & Vande Vusse, F.J. (1980b). Three new species of *Syndesmis* Silliman, 1881 (Turbellaria: Umagillidae) from Philippine sea urchins. Journal of Parasitology. 66:659-663.

- Kozloff, E. N. & C. A. Jr. Westervelt. (1990). *Syndesmis rubida* sp. nov. and *S. albida* sp. nov. (Turbellaria: Neorhabdocoela: Umagillidae) from the sea urchin *Echinus esculentus*. *Cahiers de Biologie Marine*. 31: 323-332.
- Kozloff, E.N. (1997). *Syndesmis echiniacuti* sp. nov. (Turbellaria: Neorhabdocoela: Umagillidae) from the Mediterranean sea urchin *Echinus acutus*. *Cahiers de Biologie Marine*. 38:97-102.
- Kozloff, E.N. & C.A. Jr Westervelt. (1987). Redescription of *Syndesmis echinorum* François, 1886 (Turbellaria: Neorhabdocoela: Umagillidae), with comments on distinctions between *Syndesmis* and *Syndisyrix*. *Journal of Parasitology*.73: 184-193.
- Kozloff, E.N. & C.A. Westervelt. (1990). *Syndesmis rubida* sp. nov. and *S. albida* sp. nov. (Turbellaria: Neorhabdocoela: Umagillidae) from the sea urchin *Echinus esculentus*. *Cahiers de Biologie Marine*. 31:323-332.
- Kress, W. J., & D. L. Erickson, (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *PNAS*. 105(8):2761-2762.
- Kvist, S. (2013). Barcoding in the dark?: A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 69:39-45.
- Lago, B. D., A. F. A. Fernández, L. Negrete, F. Brusca, C. Damborenea, C. Grande, & C. Noreña. (2016). Morphology and DNA barcodes reveal the presence of the non-native land planarian *Obama marmorata* (Platyhelminthes: Geoplanidae) in Europe. *Invertebrate Systematics*. 29:12-22.
- Lamothe, A. R. (1997). *Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres*. AGT Editor. México D. F. 43 p.
- Laumer, C. E., A. Hejnol, & G. Giribet. (2015). Nuclear genomic signals of the ‘microturbellarian’ roots of platyhelminth evolutionary innovation. *eLife*. 4: 1-31.
- Lázaro, E. M., R. Sluys, M. Pala, G. A. Stocchino, J. Baguña, M. Riutort. (2009). Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the Western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesiidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 52: 835-845.
- Lehman, H.E. (1946). A histological study of *Syndisyrix franciscanus* gen. et sp. nov., an endoparasitic rhabdocoel of the sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. *The Biological Bulletin*. 91:295-311.
- Littlewood, D. T. J. (2008). Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. *Parasite*. 5:333-341.

- Littlewood, D. T. J., T. H. Cribb, P. D. Olson & R. A. Bray. (2001). Platyhelminth phylogenetics a key to understanding parasitism? *Belgian Journal of Zoology*. 131: 35-46.
- Littlewood, D.T.J., & R. A. Bray. (2001) a. The interrelationships of the Platyhelminthes. Taylor & Francis. London, England. 356p.
- Littlewood, D.T.J., & W. Andrea, (2015). Evolution: A Turn Up for the Worms. *Current Biology*. 25: R448-R469.
- Littlewood, D.T.J., K. Rohde, R. A. Bray, & E. A. Herniou. (1999). Phylogeny of the Platyhelminthes and the evolution of parasitism. *Biological Journal of the Linnean Society*. 68: 257–287.
- Litvaitis, M.K & K. Rohde. (1999). A molecular test of platyhelminth phylogeny: inferences from partial 28s rDNA sequences. *Invertebrate Biology*. 118: 42-56.
- Maddison, W. P. & D. R. Maddison. (2015). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04 <http://mesquiteproject.org>
- Marcus, E. (1949). Turbellaria Brasileiros (7). *Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Universidade de S. Paulo. Zoología*. 14:7-156 p.
- Marcus, E. (1968). A new *Syndesmis* from Saint-Barthélemy, Lesser Antilles. *Studies of the Fauna of Curacao and other Caribbean Islands*. 102:134-139.
- McCartney, M. A., Keller, G., & Lessios, H. A. (2000). Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology*. 9:1391-1400.
- Meixner, J. (1926). Beitrag zur Morphologie und zum System der Turbellaria-Rhabdocoela: II. Über Typhlorhynchus nanus Laidlaw und die parasitischen Rhabdocölen nebst Nachträgen zu den Calyptorhynchia. *Zeitschrift Morphology & Okology der Tiere devient Zoomorphology*: 5: 527-624.
- Moens, J.B., E.E. Martens, & E.R. Schockaert. (1994). *Syndesmis longicanalis* sp. nov. An umagillid turbellarian (Plathelminthes) from echinoids from the Kenyan coast. *Belgian Journal of Zoology*. 124:105-114.
- Morrone, J. J. (2007). Hacia una biogeografía evolutiva (Towards an evolutionary biogeography). *Revista Chilena de Historia Natural*. 80: 509-520.
- Mount, W. W. (2008). Maximum Parsimony Method for Phylogenetic Prediction. *Cold Spring Harbor Protocols*. 4:1-6.
- Nadler S.A., & G. Pérez-Ponce de León. (2011). Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology*. 138: 1688–1709.

- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *In* Molecular Systematics (eds Hillis DM, Moritz C & Mable BK). Sinauer Associates, Sunderland, MA. 205-247 p.
- Park, J. K., K. H. Kim, S. Kang, W. Kim, K. S. Eom & D. T. J. Littlewood. (2007). A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evolutionary Biology*.7: 1-13.
- Pineda, L.R.F. (1981). Estudio Taxonómico de algunos turbelarios de las costas de México. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. 1-141.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25:1253-1256.
- Prendini, L., P. Weygoldt, & W. C. Wheeler. (2005). Systematics of the *Damon variegatus* group of African whip spiders (Chelicerata: Amblypygi): Evidence from behaviour, morphology and DNA. *Organisms Diversity & Evolution*. 5: 203-236.
- Radulovici, A.E., P. Archambault, & F. Dufresne. (2010). DNA barcodes for marine biodiversity: moving fast forward? *Diversity* 2: 450-472.
- Rambaut A., M. A. Suchard, D. Xie, & A. J. Drummond. (2014). Tracer v1.6. Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Regier, J. C., & D. Shi. (2005). Increased yield of PCR product from degenerate primers with nondegenerate, non homologous 5' tails. *BioTechniques*. 38: 34, 36, 38.
- Riutort, M. (2014). Platyhelminthes. *In*: Vargas, P., Zardoya, R. (Eds.). *The tree of Life*. Sinauer Associates. 270-280 p.
- Riutort, M., K.G. Fiel., R. A. Raff & J. Baguña. 1993. 18S rRNA sequences and phylogeny of platyhelminthes. *Biochemical Systematics and Ecology*. 21: 71-77.
- Riutort, M., P. M. Álvarez, E. Lázaro, E. Solá & J. Paps. (2012). Evolutionary history of the Tricladida and the Platyhelminthes: an up-to-date phylogenetics and systematic account. *The International Journal of Developmental Biology*. 56: 5-17.
- Rohde, K. (1994). The Origins of parasitism in the platyhelminthes. *International Journal of Parasitology*. 24: 1099-1115.
- Rohde, K. (2001). The Aspidogastrea: an archaic group of Platyhelminthes, *in*: *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Littlewood D.T.J. & Bray R.A. (eds), Taylor & Francis, London. 159-167.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. Van Der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, & J. P. Huelsenbeck. (2012). Mrbayes 3.2: efficient Bayesian

- phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic. Biology.* 61:539–542.
- Schmitt, M. (2016). Willi Henning: a shy man behind a scientific revolution. *In* The Future of Phylogenetics Systematics, the legacy of Willi Hening. Cambridge University Press. Inglaterra. 492p.
  - Schockaert, E. R., E. M. Hooge, R. Sluys, S. Schilling, S. Tyler & T. Artois. (2008). Global diversity of free living flatworms (Platyhelminthes, ‘Turbellaria’) in freshwater. *Hydrobiologia.* 595:41-48.
  - Schockaert, E., M. Hooge, R. Sluys, S. Schilling, S. Tyler & T. Artois. (2008). Global diversity of free living flatworms (Platyhelminthes, ‘Turbellaria’) in freshwater. *Hydrobiologia.* 595:41-48.
  - Shinn, G.L. (1981). The diet of three species of umagillid neorhabdoceol turbellarians inhabiting the intestine of mechinoids. *Hydrobiologia.* 84:155-162.
  - Silvestro, M., & I. Michalak. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RaxML. *Organisms Diversity and Evolution.* 12: 335-337.
  - Sluys, R., E. Sola, K. Gritzalis, M. Vila-Ferré, E. Mateos & M. Riutort. (2013). Integrative delineation of species of Mediterranean freshwater planarians (Platyhelminthes: Tricladida: Dugesiiidae). *Zoological Journal of the Linnean Society.* 169: 523-547.
  - Smith, N.S. (1973). A new description of *Syndesmis dendrasterum* (Platyhelminthes, Turbellaria), an intestinal rhabdoceol inhabiting the sand dollar *Dendraster excentricus*. *The Biological Bulletin.* 145:598-606.
  - Snyder, R.D. (1980). Commensal turbellarians from Bermuda holothurians. *Canadian Journal of Zoology.* 58:1741-1744.
  - Solà, E., M. P. Álvarez, C. F. López, D. T. J. Littlewood, & J. Rozas. (2015). Evolutionary analysis of mitogenomes from parasitic and free-living flatworms. *PLoS One.* 10: e0120081.
  - Steenkiste, N. V., B. Tessens, W. Willems, T. Backeljau, U. Jondelius & T. Artois. (2013). A Comprehensive Molecular Phylogeny of Dalytyphloplanida (Platyhelminthes: Rhabdoceola) Reveals Multiple Escapes from the Marine Environment and Origins of Symbiotic Relationships. *PLoS ONE.* 8:1-13.
  - Stoeckle M (2003). Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience* 53: 796–797.
  - Stunkard, H.W. & J.O. Corliss. (1951). New species of *Syndesmis* and a revision of the family Umagillidae Wahl, 1910 (Turbellaria: Rhabdoceola). *The Biological Bulletin.* 101:319-334.

- Sundberg, P., S. Kvist, & M. Strand, M. (2016). Evaluating the utility of single-locus DNA barcoding for the identification of ribbon worms (phylum Nemertea). *PLoS ONE*. 11: e0155541.
- Swofford, D. L. (1998). *PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Taylor H.R., & Harris W.E. (2012). An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 12: 377-388.
- Tyler, S., & M. S. Tyler. (1997). Origin of the epidermis in parasitic Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology*. 27: 715-738.
- Tyler, S., S. Schilling, M. Hooge, & L.F. Bush (comp.). 2006-2009. Turbellarian taxonomic database. Version 1.5. Available from <http://turbellaria.umaine.edu> (accessed 4 December 2009).
- Vanhove, M.P.M., B. Tessens, C. Schoelinck, UIF. Jondelius, D.T.J. Littlewood, T. Artois, & T. Huysse. (2013). Problematic barcoding in flatworms: A case-study on monogeneans and rhabdocoels (Platyhelminthes). *Zookeys*. 365:355-379.
- Vilas R., C. D. Criscione, M. S. Blouin. (2005). A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology*. 131: 839-846.
- Westblad, E. (1953). New Turbellaria parasites in Echinoderms. *Arkiv for Zoologi*. 5:269-288.
- Westervelt, C.A. & E.N. Kozloff. (1990). *Syndesmis aethopharynx* sp. nov. (Turbellaria: Neorhabdocoela: Umagillidae), from the sea urchin *Paracentrotus lividus*, with notes on a probable third species from this host. *Cahiers de Biologie Marine*. 31: 431-437.
- Westervelt, C.A. & Kozloff, E.N. (1992) Two new species of *Syndesmis* (Turbellaria: Neorhabdocoela: Umagillidae) from the sea urchins *Strongylocentrotus droebachensis* and *Allocentrotus fragilis*. *Cahiers de Biologie Marine*. 33: 115–124.
- Wheeler, W. C. & G. Giribet. (2016). Molecular data in systematics: promise fulfilled, a future beckoning. *In The Future of Phylogenetics Systematics, the legacy of Willi Hening*. Cambridge University Press. Inglaterra. 492p.
- Whiting, M. F. (2002). Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zoologica Scripta*. 31: 93-104.
- Willems, W. R., A. Wallberg, U. Jondelius, D. T. J. Littlewood, T. Backeljau, E. R. Schockaert & T. J. Artois. (2006). Filling a gap in the phylogeny of flatworms: relationships within the Rhabdocoela (Platyhelminthes), inferred from 18S ribosomal DNA

sequences. *Zoologica Scripta*. 35:1-17.

- Zhang G., J. C. Yingyuan-Yang, N. Liu, W. Jiang, S. Gu, X. Wang, & Z. Wang. (2014). Utility of DNA Barcoding in Distinguishing Species of the Family Taeniidae. *Journal of Parasitology*. 100(4):542-546.

## Anexos

### ANEXO 1

#### Técnica de tinción de Paracarmín de Meyer

Ácido carmínico	1.0g
Cloruro de Aluminio hidratado	0.5g
Cloruro de calcio Anhidro	4.0g
Alcohol al 70%	100 ml

#### Procedimiento:

- Lavar los organismos varias veces en alcohol al 70%, para quitar el exceso de fijador hasta que queden de color blanco.
- Lavar en alcohol al 96%, dos cambios de 10 minutos cada uno.
- Teñir con Paracarmín de Meyer, durante 30 a 60 segundos.
- Lavar con alcohol al 96%, para quitar en exceso de colorante durante 5 a más minutos.
- Diferenciar en alcohol acidulado al 2% con ácido clorhídrico, hasta que los bordes del simbionte queden blancos y sus órganos internos sean visiblemente teñidos.
- Lavar en alcohol al 96% por uno a dos minutos, para detener la acción del ácido clorhídrico.
- Lavar en alcohol absoluto durante 20 a 30 minutos.
- Trasparentar en salicilato de metilo graduales (2:1, 2:2, 2:3) por 30 min cada cambio.
- Montar en bálsamo de Canadá, el simbionte deberá quedar ventral, vertical y en el centro de la preparación.
- Etiquetar los datos de colecta.

## **ANEXO 2**

### **Técnicas Histológicas**

#### **Paso 1: Deshidratación para inclusión en Paraplast Plus®**

Colocar muestras en cassettes

Deshidratar en alcoholes graduales las muestras de tejido:

- ETOH 70% por 90 min
- ETOH 83% por 90 min
- ETOH 96% por 90 min
- ETOH 100% por 90 min

Inclusión en Paraplast Plus® con punto de fusión 56-58 °C.

Cortes con un grosor 5-6 µm

Montaje en portaobjetos

#### **Paso 2: Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E)**

- Calentar portaobjetos con los cortes en la estufa a 56-58 °C por 15 min
- Xilol por 5 min
- Xilol por 5 min
- ETOH 100% por 5 min
- ETOH 96% por 5 min
- ETOH 85% por 5 min
- ETOH 70% por 5 min
- ETOH 50% por 5 min
- H<sub>2</sub>O destilada
- Hematoxilina de Harris por 9 min
- H<sub>2</sub>O destilada por 5 min
- H<sub>2</sub>O corriente por 5 min
- Eosina alcoholica por 7 min
- ETOH 70% por 5 min
- ETOH 70% por 5 min
- ETOH 96% por 5 min
- ETOH 100% por 5 min
- Xilol

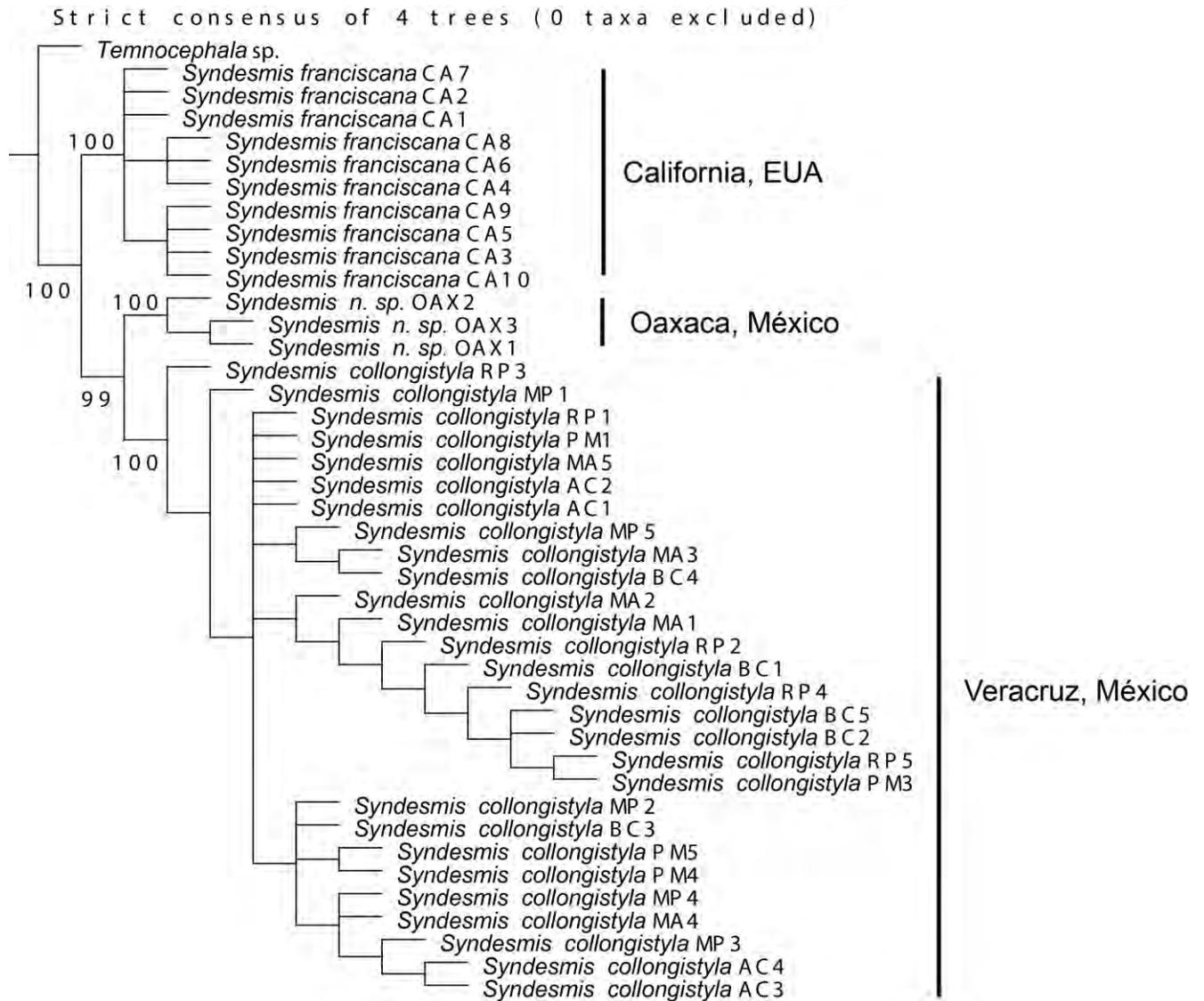
#### **Paso 3: Montaje con Balsamo de Canadá y etiquetado.**

**ANEXO 3**

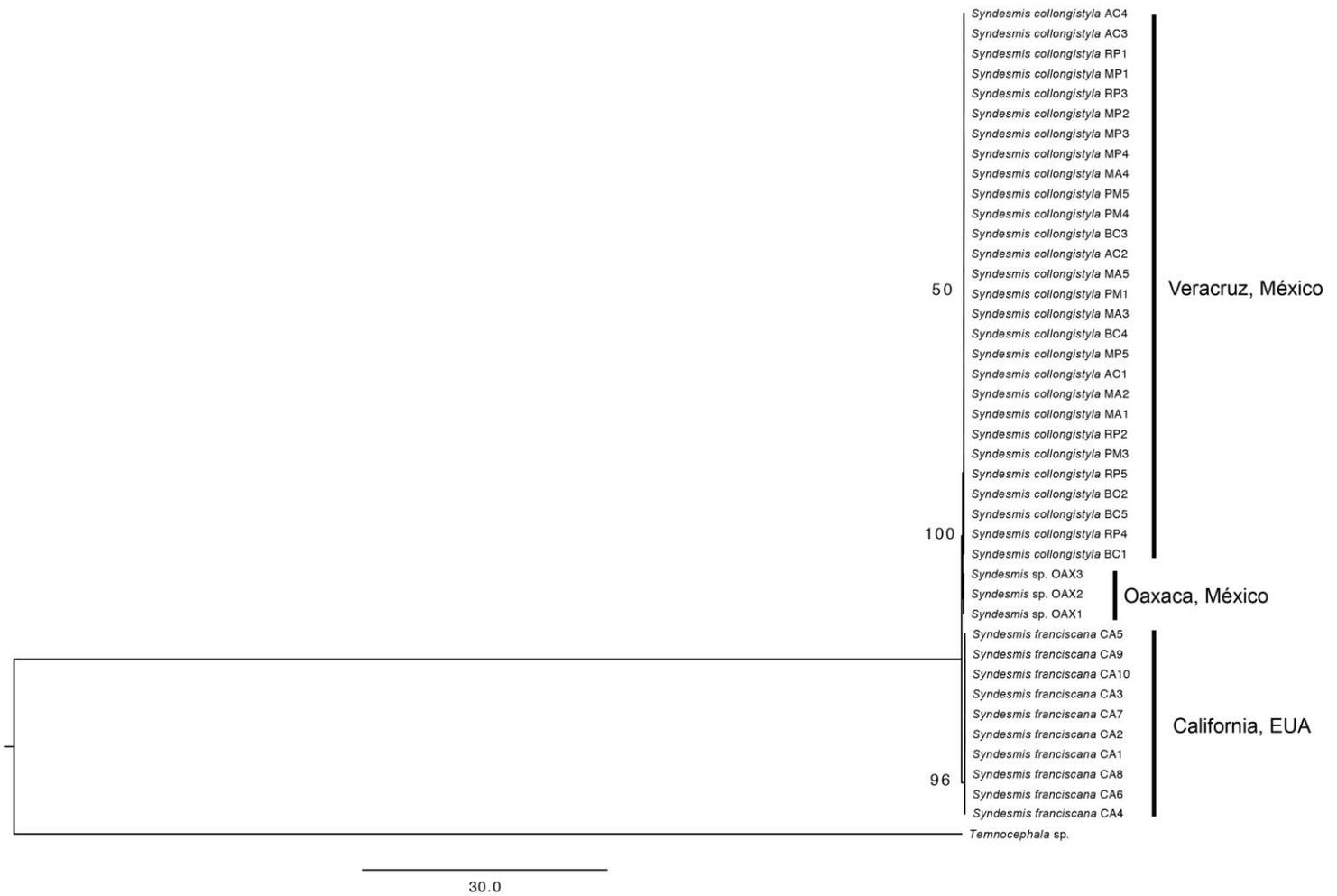
**Números de acceso de GenBank de las especies del Infraorden Neodalyellida**

Taxones	Número de acceso en GenBank/Primers	
	18s	28s
<i>Kytorhynchidae</i> sp. 1	KC529401	KC529527
<i>Adenopharynx mitrabursalis</i>	KC529520	KC529641
<i>Austradenopharynx</i> sp.	KC529521	KC529642
<i>Solenopharyngidae</i> sp.	KC529519	KC529640
<i>Trisaccopharynx westbladi</i>	AY775774	-
<i>Einarella argillophyla</i>	AY775757	-
<i>Baicalellia brevituba</i>	KC529505	KC529630
<i>Canetellia beauchampi</i>	KC529504	KC529629
<i>Pterastericola australis</i>	AJ012518	AY157161
<i>Pterastericola psilastericola</i>	KC529516	KC529637
<i>Pogaina</i> sp. 3	KC529506	KC529631
<i>Pogaina</i> sp. 1	KC529507	KC529632
<i>Pogaina</i> sp. 2	KC529508	KC529633
<i>Provorticidae</i> sp.	KC529509	KC529634
<i>Balgetia semicirculifera</i>	KC529503	KC529628
<i>Dalyellioida</i> "houdini" sp.	KC529522	-
<i>Dalyellioida</i> sp.	KC529523	KC529643
<i>Pseudograffilla arenicola</i>	KC529514	-
<i>Eldenia reducta</i>	KC529502	KC529627
<i>Bresslauilla relictia</i>	KC529515	KC529636
<i>Neodalyellida</i> sp. 1	KC529524	KC529644
<i>Neodalyellida</i> sp. 2	KC529525	KC529645
<i>Vejdovskya pellucida</i>	KC529512	-
<i>Vejdovskya ignava</i>	KC529513	KC529635
<i>Provortex karlingi</i>	KC529510	-
<i>Provortex tubiferus</i>	AJ312269	-
<i>Provortex balticus</i>	KC529511	-
<i>Seritia elegans</i>	KC529517	KC529638
<i>Wahlia macrostylifera</i>	KC529518	KC529639
<i>Anoplodium stichopi</i>	AF167424	-

ANEXO 4

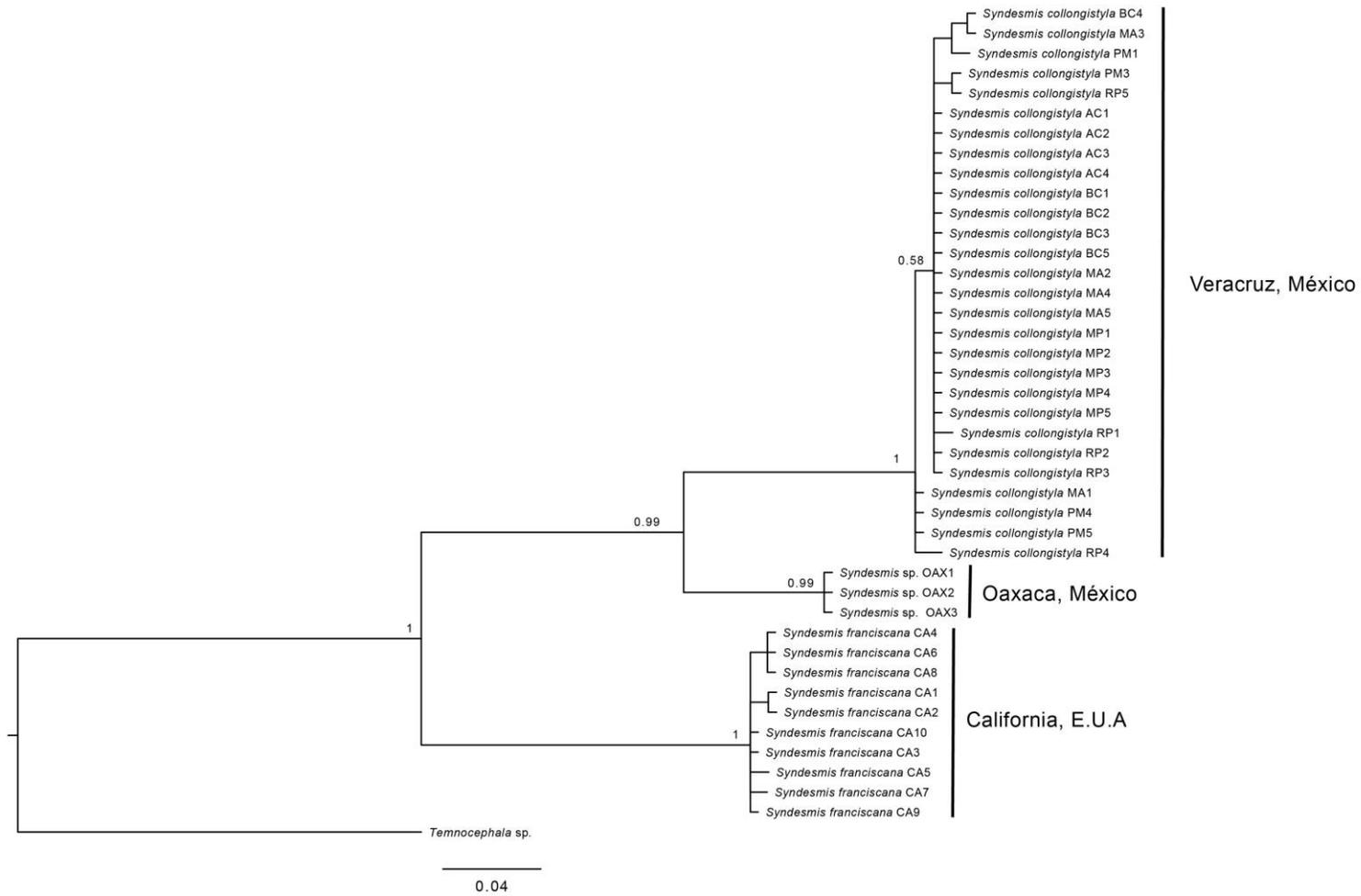


Árbol de consenso estricto de cuatro arboles más parsimoniosos del género *Syndesmis*, resultado de un análisis de Parsimonia en el programa TNT; de un set de datos concatenados (COI+Cyt b+28S), mostrando valores de bootstrap en los internodos de las ramas.

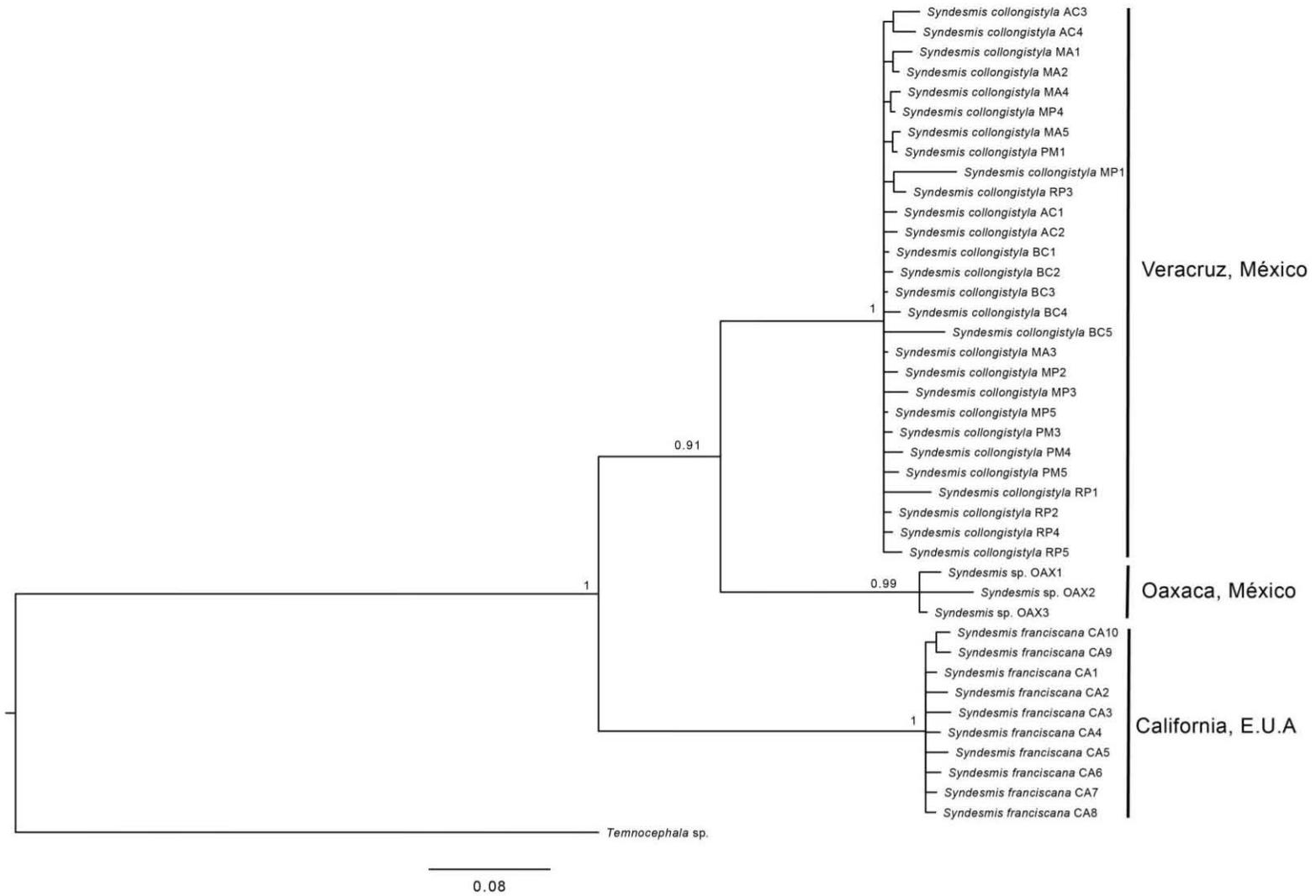


Hipotesis filogenética del género *Syndesmis*, de un análisis probabilístico de Máxima Verosimilitud, implementados en el programa RAXMLGUI v 1.3, de un set de datos concatenados de los genes citocromo C oxidasa, Citocromo b y 28S. Valores de bootstrap mostrados en los nodos de las ramas.

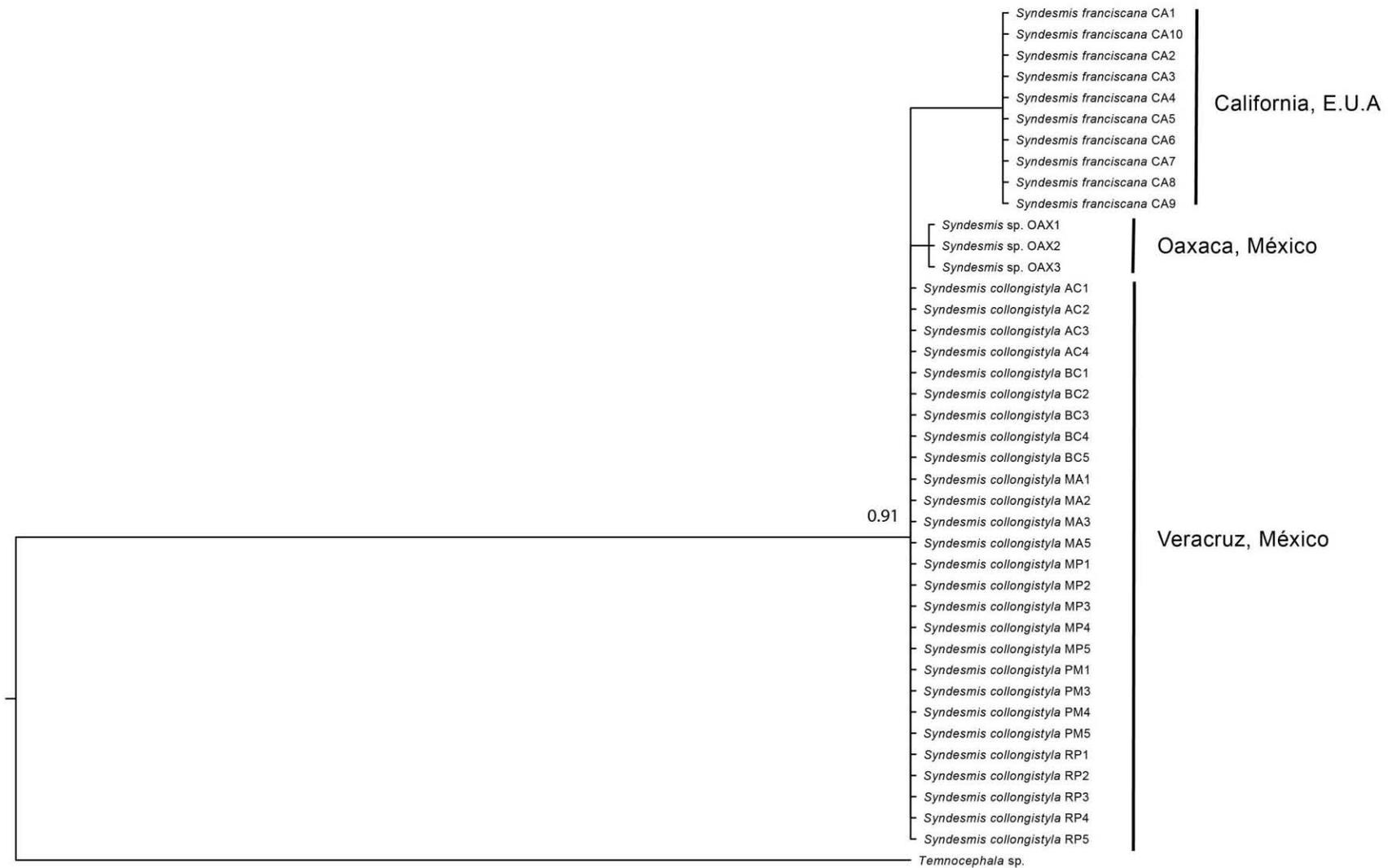
ANEXO 5



Hipótesis filogenética del género *Syndesmis* obtenido bajo Inferencia Bayesiana en Mr. Bayes, del gen citocromo C oxidasa (COI I). Los valores de probabilidad posterior (pp) se muestran en los internodos de las ramas.

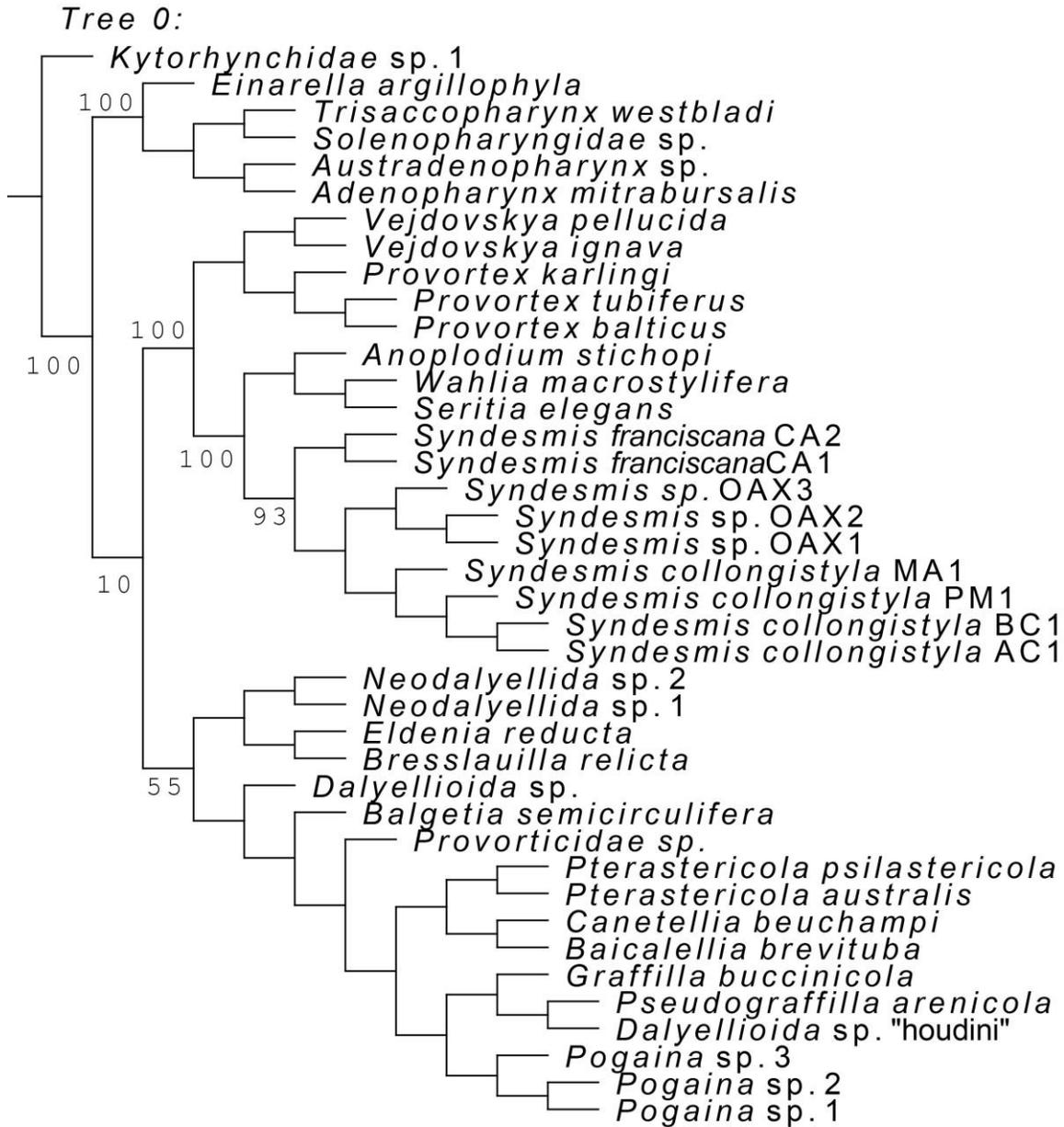


Hipótesis filogenética del género *Syndesmis* obtenido bajo Inferencia Bayesiana en Mr. Bayes, del gen Citocromo B (Cyt B). Los valores de probabilidad posterior (pp) se muestran en los internodos de las ramas.

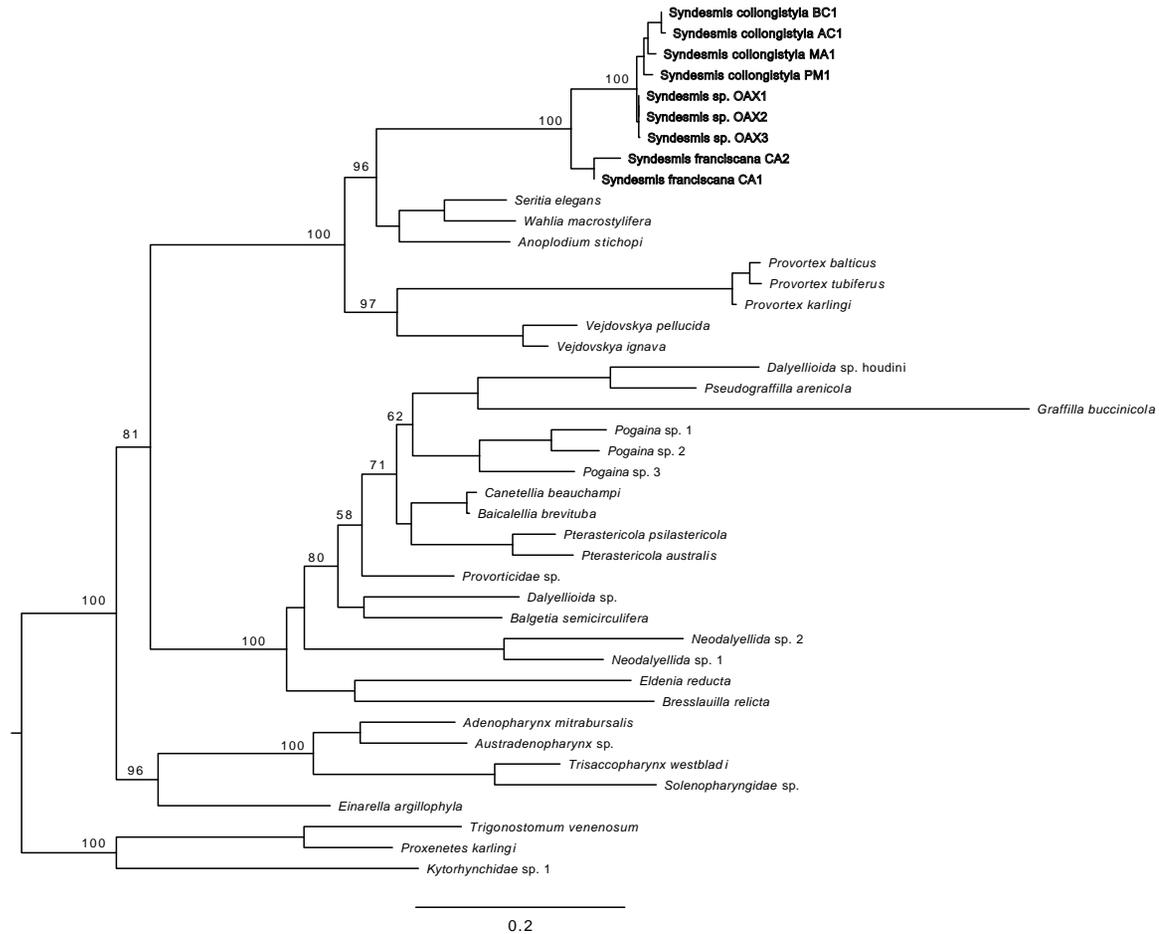


Hipótesis filogenética del género *Syndesmis* obtenido bajo Inferencia Bayesiana en Mr. Bayes, del gen ribosomal 28S. Los valores de probabilidad posterior (pp) se muestran en los internodos de las ramas.

ANEXO 6

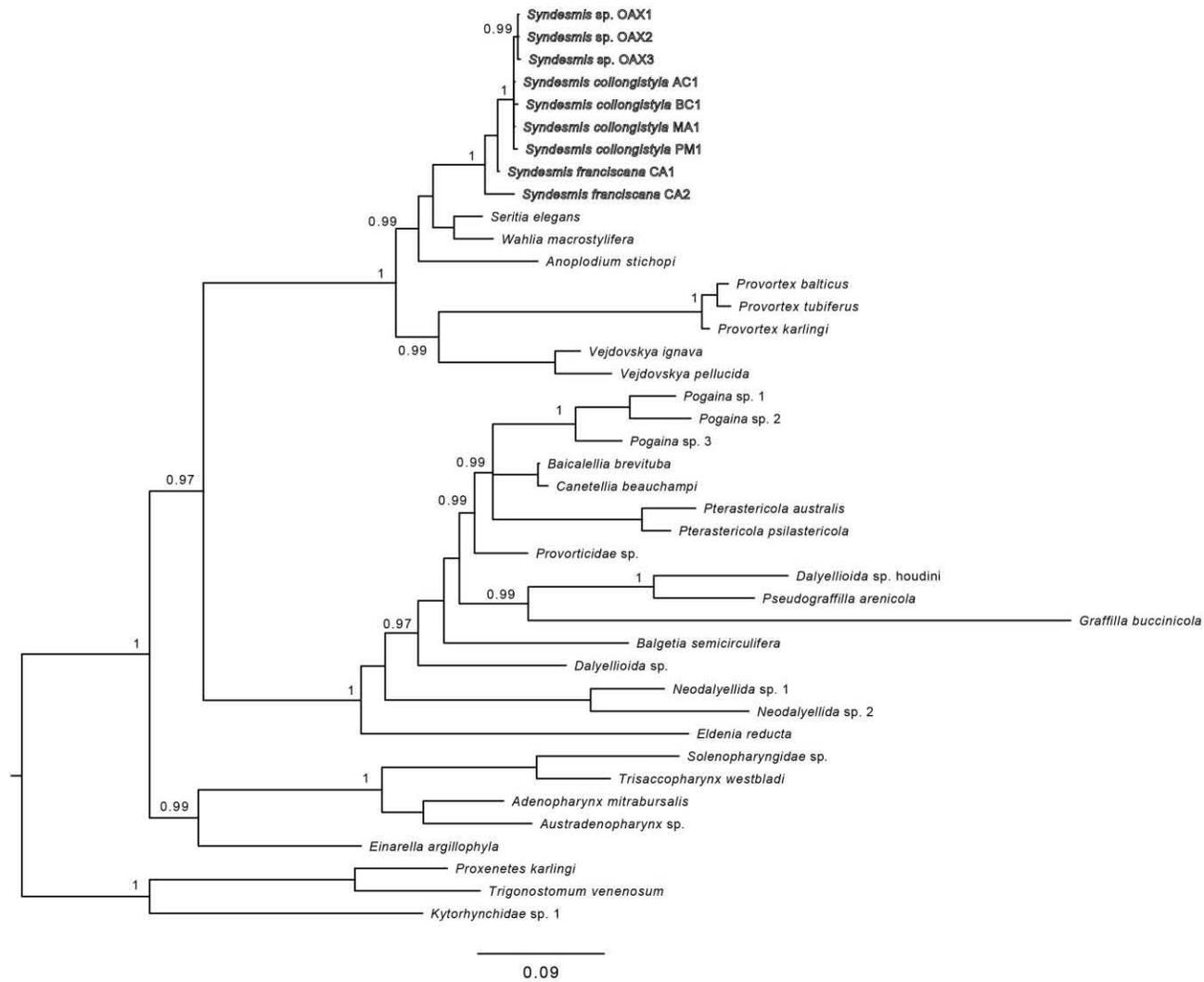


Hipótesis filogenética del infraorden Neodalyellida basada en la combinación de los genes ribosomales 18S y 28S, obtenido mediante el método filogenético de Parsimonia en el programa TNT; mostrando valores de bootstrap en los internodos de las ramas.



Hipotesis filogenética del infraorden Neodalyellida, de un análisis probabilístico de Máxima Verosimilitud, implementados en el programa RAXMLGUI v 1.3, de un set de datos concatenados de los genes ribosomales 18S y 28S. Valores de bootstrap mostrados en los nodos de las ramas.

ANEXO 7



Hipotesis filogenética del infraorden Neodalyellida, de un análisis probabilístico de Inferencia Bayesiana, implementado en el programa en Mr. Bayes, del gen ribosomal 18S. Los valores de probabilidad posterior (pp) se muestran en los internodos de las ramas.