

TESIS DEFENDIDA POR
Tiago José Pereira
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Axayácatl Rocha-Olivares

Director del Comité

Dr. Manuel Mundo-Ocampo

Miembro del Comité

Dra. Meritxell Riquelme

Miembro del Comité

Dra. Silvia E. Ibarra Obando

Miembro del Comité

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera

*Coordinador del Posgrado en Ecología
Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado*

20 de Junio de 2008

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ECOLOGÍA MARINA**

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD DE
NEMÁTODOS MARINOS DE VIDA LIBRE (ENOPLIDA) EN LAS COSTAS DE
BAJA CALIFORNIA**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:
TIAGO JOSÉ PEREIRA

Ensenada, Baja California, México, Junio del 2008.

RESUMEN de la tesis de Tiago José Pereira, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, México. Junio 2008.

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD DE NEMÁTODOS MARINOS DE VIDA LIBRE (ENOPLIDA) EN LAS COSTAS DE BAJA CALIFORNIA

Resumen aprobado por:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Director de Tesis

Determinar la diversidad existente en nuestro planeta es una tarea ineludible y se ha convertido en un reto para las diferentes áreas de la biología. El saber con qué especies se trabaja es parte fundamental de cualquier estudio ecológico y evolutivo. Sin embargo, el esfuerzo involucrado en la determinación taxonómica ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas de identificación, como es el código de barras de ADN. En este estudio se evaluó la diversidad morfológica y molecular de la nematofauna marina (Enoplida) en las costas de Baja California, México. Para ello, se utilizó un enfoque holístico contemplando la taxonomía tradicional basada en la morfología y la genética molecular (genes 18S y 28S del ADN_r) con el objetivo de comparar ambas líneas de evidencia (morfología vs. molecular) así como la utilidad de los genes (18S vs. 28S). Se analizaron un total de 160 organismos provenientes de siete localidades representando el Golfo de California y playas del Pacífico frente a la Península de Baja California. Se identificaron un total de 16 géneros y cinco familias. Las familias más representativas fueron Thoracostomopsidae y Oncholaimidae con seis y tres géneros, respectivamente. El género *Trileptium* fue el más ampliamente distribuido ocurriendo en cinco de las localidades. Análisis morfométricos apoyados con los datos moleculares indicaron que este género representa varias morfoespecies (ANOSIM, $p < 0.05$). Los resultados morfológicos y moleculares no fueron concordantes en su totalidad. Se sugiere que las diferencias ontogénicas aunadas a la plasticidad fenotípica dentro del grupo fueron responsables por dicha discordancia. Los genes utilizados presentaron algunas diferencias en cuestiones prácticas como el éxito en amplificaciones vía PCR y calidad de las secuencias así como en la resolución taxonómica (el gen 28S fue más variable), pero por lo general resultaron en topologías congruentes (ILD, $p > 0.05$) lo que muestra que ambas regiones pueden ser utilizadas en futuros trabajos de código de barras de ADN para una mejor evaluación de la nematofauna marina. El éxito de este trabajo sugiere que la aplicación de un enfoque holístico podrá ayudar a la mejor evaluación de la diversidad de los nemátodos marinos, particularmente en lugares en donde estos estudios son aún incipientes.

Palabras clave: nemátodos marinos, morfología, genética molecular, 28S, 18S, código de barras de ADN, México

ABSTRACT of the thesis presented by Tiago José Pereira as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico June 2008.

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ASSESSMENT OF THE FREE LIVING
MARINE NEMATODE DIVERSITY (ENOPLIDA) FROM THE COASTS OF
BAJA CALIFORNIA**

Determining the levels of diversity in the biosphere has become an inescapable task and represents a considerable challenge for most areas in biology. Knowing the identity of a species represents a central part for any ecological and evolutionary study. However, the considerable effort needed for taxonomic determination has led to the development of new approaches, such as DNA barcoding. In this study, the morphological and molecular diversity of marine nematodes (Enoplida) from the coasts of Baja California, Mexico was assessed. A holistic approach contemplating traditional morphology-based taxonomy and molecular genetics (sequences from 18S and 28S rDNA genes) was used in order to compare both approaches (morphology vs. genetic), and to assess the usefulness of both genes (18S vs. 28S). A total of 160 organisms were analyzed from seven localities of the Pacific in the Baja California Peninsula and in the Gulf of California. Sixteen genera were identified from five Enoplid families. The most representative families were Thoracostomopsidae and Oncholaimidae, with six and three genera, respectively. The genus *Trileptium* (Thoracostomopsidae) was the most widespread being present in five localities. Morphometric analyses supported by molecular results showed that this genus represents many morphospecies (ANOSIM, $p < 0.05$). Morphological and molecular results were not completely consistent. We suggest that ontogenetic differences and phenotypic plasticity contributed to the observed discrepancy between morphology and genetics. The rDNA genes 18S and 28S showed some differences in performance, such as PCR success and the quality of DNA sequence data, as well as in taxonomic resolution (28S was more variable), but in general both topologies were congruent (ILD, $p > 0.05$) indicating that, both genes can be used for future DNA barcoding aimed at a better assessment of the marine nematofauna. The successful results of this study suggest that a holistic approach can play a significant role in the proper assessment of the diversity of marine nematodes, particularly in places where this research is still incipient.

Dedicatorias

Quiero dedicar esa conquista a las personas más importantes en mi vida, mi querida familia: mis hermanos Lucas, Junior y Angela, gracias por existir; mis papas Nair y Manoel, mis ejemplos como persona; mi hermosa sobrina Sofia, el regalo divino de la casa; y también a una persona muy especial y que siempre estuvo conmigo, mi novia Mirayana (gracias *Preta*).

¡Sólo les quiero decir, mil gracias por apoyarme siempre, aún estando tan lejos, amo
ustedes y los quiero mucho!

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), por proporcionarme mi beca de estudios durante el período en que estuve en CICESE, en particular al proyecto SEMARNAT-CONACYT 2004-C01-300 denominado *Bioninventario Estratégico de la Nematofauna del Golfo de California* en el que se enmarcó mi investigación.

A toda la familia CICESE, técnicos, trabajadores de los diferentes departamentos, maestros y investigadores, por ser mi casa durante estos 2.5 años.

A mis compañeros del laboratorio de ecología molecular (LabEcoMol), los que estuvieron y los que aún siguen presentes (Yuma, Carina, Jimena, Nancy, Ismael y Mariana), y a mis queridas compañeras nematólogas, Ruth y Arely.

A mi gran amiga Laura, por la ayuda con las muestras en campo y por proporcionarme un excelente viaje por la Baja.

A mis innumerables amigos del posgrado en Ecología Marina, en especial a Ruth, Jushiro y Omar, por me ayudaren muchísimo en las situaciones más difíciles.

A John Hyde del Southwest Fisheries Science Center de la NOAA, por la gran ayuda con la secuenciación de las muestras.

A mi comité de tesis, Dra. Meritxell, Dra. Silvia y Dr. Manuel, por el apoyo y orientación durante esa caminata.

Finalmente, un agradecimiento especial al Dr. Rocha-Olivares, por me haber dado la oportunidad de concretizar ese gran objetivo que fue mi maestría; la oportunidad de aprender y conocer tantas cosas y personas, por haber dirigido mi tesis y por apoyarme durante todo ese tiempo.

¡Les agradezco a todos!

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas	xii
I. Introducción.....	1
I.1 La diversidad y los próximos retos	1
I.2 Taxonomía clásica vs. genética molecular	4
I.3 Marcadores moleculares.....	5
II. Antecedentes.....	7
II.1 Los nemátodos marinos de vida libre	7
II.2 Estudios moleculares en nemátodos: el uso del 18S y 28S	8
II.3 La nematofauna marina en México	12
III. El presente estudio	14
III.1 Importancia	14
III.2 Hipótesis de trabajo	15
III.3 Objetivos	16
<i>III.3.1 General</i>	<i>16</i>
<i>III.3.2 Particulares</i>	<i>16</i>
IV. Metodología.....	17
IV.1 Área de estudio	17

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV.2 Muestreo en campo	17
IV.3 Procesamiento en laboratorio	20
<i>IV.3.1 Separación de los organismos del sedimento</i>	20
<i>IV.3.2 Identificación de la nematofauna</i>	22
<i>IV.3.2.1 Selección y aislamiento de especímenes</i>	22
<i>IV.3.2.2 Identificación</i>	22
<i>IV.3.3 Extracción de ADN</i>	26
<i>IV.3.4 Amplificación vía PCR</i>	26
<i>IV.3.5 Purificación y secuenciación de ADN</i>	27
IV.4 Análisis de Datos	28
<i>IV.4.1 Análisis morfológicos</i>	28
<i>IV.4.2 Edición de las secuencias</i>	29
<i>IV.4.3 Análisis moleculares</i>	30
V. Resultados	32
V.1 Caracterización morfológica	32
<i>V.1.1 Familia Thoracostomopsidae</i>	34
<i>V.1.1.1 Trileptium Cobb, 1933</i>	34
<i>V.1.1.1.1 Trileptium sp1 y Trileptium sp2</i>	36
<i>V.1.1.1.2 Trileptium sp3</i>	38
<i>V.1.1.1.3 Trileptium sp4</i>	38
<i>V.1.1.1.4 Trileptium sp5</i>	39
<i>V.1.1.1.5 Trileptium sp6</i>	39
<i>V.1.1.2 Enoploides Ssaweljev, 1912</i>	48
<i>V.1.1.3 Epacanthion Wieser, 1914</i>	53
<i>V.1.1.4 Mesacanthion Filipjev, 1927</i>	55

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.1.1.5 <i>Mesacanthoides</i> Wieser, 1953.....	58
V.1.1.6 <i>Oxyonchus</i> Filipjev, 1927.....	60
V.1.1.7 <i>Thoracostomopsidae n.i.</i>	62
V.1.2 Familia <i>Oncholaimidae</i>	64
V.1.2.1 <i>Oncholaimus</i> Dujardin, 1845	64
V.1.2.2 <i>Metoncholaimus</i> Filipjev, 1918.....	69
V.1.2.3 <i>Viscosia</i> De Man, 1980	72
V.1.3 Familia <i>Enchilidiidae</i>	74
V.1.3.1 <i>Pareurystomina</i> Micoletzky, 1930	74
V.1.3.2 <i>Enchilidiidae n.i.</i>	76
V.1.4 Familia <i>Ironidae</i>	76
V.1.4.1 <i>Thalassironus</i> De Man, 1888	76
V.1.4.2 <i>Trissonchulus</i> Cobb, 1920.....	76
V.1.5 <i>Enoplido n.i.</i>	77
V.1.6 Familia <i>Rhabdonemaniidae</i>	82
V.1.6.1 <i>Rhabdodemia</i> Baylis y Daubney, 1926	82
V.2 Caracterización molecular	84
V.2.1 <i>Amplificaciones</i>	84
V.2.2 <i>Secuencias</i>	85
V.2.3 Gen 28S	88
V.2.3.1 Filogenia del gen 28S	88
V.2.4 Gen 18S	91
V.2.4.1 Filogenia del gen 18S	91
V.2.5 Congruencia entre 18S y 28S	94
VI. Discusión	96

CONTENIDO (continuación)

	Página
<i>VI.1 Diversidad del orden Enoplida</i>	96
<i>VI.2 Morfología vs. genética molecular</i>	99
<i>VI.3 Resolución taxonómica y congruencia de los genes</i>	102
VII. Conclusión	105
VIII. Referencias	106

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Número de especies conocida y estimada de algunos grupos animales.....	2
Figura 2. Porcentaje de trabajos publicados con el tema de especies gemelas (triángulo rojo) y especies crípticas (círculos azules)	4
Figura 3. Organización general de los genes ribosomales eucariotas.....	8
Figura 4. Reconstrucción filogenética de la nematofauna marina del sur de Inglaterra a partir de un fragmento de 345 pb del gen 18S.....	11
Figura 5. Sitios de muestreo en el Golfo de California y Península de Baja California.....	18
Figura 6. Esquema simplificado del método de flotación según Somerfield y Warwick (1996) para la extracción de la meiofauna del sedimento.	21
Figura 7. Pasos realizados durante la selección e identificación de los organismos por microscopía óptica.	23
Figura 8. Esquema ejemplificando los parámetros morfométricos analizados.	25
Figura 9. Genes ribosomales nucleares destacando las regiones amplificadas vía PCR.....	26
Figura 10. Cromatograma de una secuencia ya editada para el gen 28S.....	30
Figura 11. MDS evidenciando la diferenciación del género <i>Trileptium</i> entre las diferentes localidades	35
Figura 12. MDS evidenciando la separación de las dos morfoespecies dentro del género <i>Trileptium</i> en la localidad de Santa Clara.....	38
Figura 13. <i>Trileptium</i> sp1, juvenil (Santa Clara).	41
Figura 14. <i>Trileptium</i> sp2, macho (Santa Clara).	42
Figura 15. <i>Trileptium</i> sp3, (izquierda) hembra y (derecha) macho (Bahía LA).	43
Figura 16. <i>Trileptium</i> sp4, hembra (Cerritos).	44
Figura 17. <i>Trileptium</i> sp5, macho (San Felipe).	45

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
Figura 18. <i>Trileptium</i> sp6, hembra H1 (Playa del Faro).....	46
Figura 19. <i>Trileptium</i> sp6, hembra H2 (Playa del Faro).....	47
Figura 20. <i>Enoploides</i> , macho M1 (San Felipe).....	50
Figura 21. <i>Enoploides</i> , macho M2 (San Felipe).....	51
Figura 22. <i>Enoploides</i> , hembra (San Felipe).....	52
Figura 23. <i>Epacanthion</i> , juvenil (San Carlos).....	54
Figura 24. <i>Mesacanthion</i> , macho (Santa Clara).....	57
Figura 25. <i>Mesacanthoides</i> , macho (Santa Clara).....	59
Figura 26. <i>Oxyonchus</i> , macho (Santa Clara).....	61
Figura 27. Thoracostomopsidae <i>n.i.</i> , juvenil (Santa Clara).....	63
Figura 28. MDS evidenciando la separación de machos (símbolos verde) y hembras (símbolos rojos) dentro del género <i>Oncholaimus</i> en la localidad de La Paz.....	66
Figura 29. <i>Oncholaimus</i> , hembra (La Paz).....	67
Figura 30. <i>Oncholaimus</i> , macho (La Paz).....	68
Figura 31. <i>Metoncholaimus</i> , hembra (Playa del Faro).....	70
Figura 32. <i>Metoncholaimus</i> , macho (Playa del Faro).....	71
Figura 33. <i>Viscosia</i> , (izquierda) hembra y (derecha) macho (San Carlos).....	73
Figura 34. <i>Pareurystomina</i> , macho (Santa Clara).....	75
Figura 35. Enchilidiidae <i>n.i.</i> , hembra (La Paz).....	78
Figura 36. <i>Thalassironus</i> , macho (Santa Clara).....	79

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
Figura 37. <i>Trissonchulus</i> (Bahía L.A.)	80
Figura 38. Enoplida <i>n.i.</i> (San Carlos)	81
Figura 39. <i>Rhabdodemia</i> , macho (Santa Clara).....	83
Figura 40. Gel de agarosa evidenciando la amplificación de muestras	84
Figura 41. Cromatograma mostrando la calidad de las secuencias para ambos los genes ..	85
Figura 42. Cladogramas obtenidos con Parsimonia Máxima (A) y con Verosimilitud Máxima (B) para el gen 28S.....	89
Figura 43. Filograma obtenido con el método algorítmico del Vecino más Cercano (VC) para el gen 28S.....	90
Figura 44. Cladogramas obtenidos con Parsimonia Máxima (A) y con Verosimilitud Máxima (B) para el gen 18S.....	92
Figura 45. Filograma obtenido con el método algorítmico del Vecino más Cercano (VC) para el gen 18S.....	93
Figura 46. Cladogramas obtenidos con PM (A) y con VM (B) a partir de los genes 28S y 18S	95

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Recopilación de trabajos ínter específicos realizados para el grupo Nematoda con diferentes genes (nucleares y mitocondriales).....	10
Tabla II. Localidades muestreadas con sus respectivos datos de temperatura (°C), salinidad (ppm), posición geográfica (Lat. N/Long. W), fecha de muestreo y características particulares.....	19
Tabla III. Caracteres morfométricos analizados para la identificación de los organismos.	24
Tabla IV. Perfil de termociclado para los dos pares de cebadores utilizados en la amplificación vía PCR.....	27
Tabla V. Volumen de los ingredientes utilizados en la reacción de secuenciación para cada gen de acuerdo al volumen de PCR purificado.....	28
Tabla VI. Número de organismos identificados para cada género/familia en las diferentes localidades estudiadas.....	33
Tabla VII. Valores de R global (diagonal superior) y de nivel significancia P (diagonal inferior) derivados del análisis de similitud (ANOSIM) comparando las posibles morfoespecies del género <i>Trileptium</i> . Los valores en negritas son significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989) a un $\alpha = 0.05$ para toda la tabla.	36
Tabla VIII. Valores de R global (diagonal superior) y de nivel significancia P (diagonal inferior) derivados del análisis de similitud (ANOSIM) comparando las localidades en que se presentó el género <i>Trileptium</i> . Los valores en negritas son significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989) a un $\alpha = 0.05$ para toda la tabla.	36
Tabla IX. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para las diferentes morfoespecies de <i>Trileptium</i>	40
Tabla X. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para <i>Enoplides</i> de la localidad de San Felipe (AGC).	49
Tabla XI. Parámetros morfológicos de <i>Epacanthion</i> de la localidad de San Carlos (Pacífico).....	53
Tabla XII. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) de <i>Mesacanthion</i> de las localidades de Santa Clara (SC) y San Carlos (SCA).....	56

LISTA DE TABLAS (continuación)

	Página
Tabla XIII. Parámetros morfológicos para <i>Mesacanthoides</i> de la localidad de San Clara (AGC).....	58
Tabla XIV. Parámetros morfológicos para la morfoespecie <i>Oxyonchus</i> de la localidad de Santa Clara (AGC).....	60
Tabla XV. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para el género no identificado de la familia Thoracostomopsidae de la localidad de Santa Clara (AGC).....	62
Tabla XVI. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para <i>Oncholaimus</i> de la localidad de La Paz (GC).....	65
Tabla XVII. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para el género <i>Metoncholaimus</i> de la localidad Playa del Faro (Pacífico).....	69
Tabla XVIII. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para el género <i>Viscosia</i> de la localidad San Carlos (Pacífico).....	72
Tabla XIX. Parámetros morfológicos para el género <i>Pareurystomina</i> de la localidad Santa Clara (AGC).....	74
Tabla XX. Parámetros morfológicos para Enchilidiidae n. i., Enoplida n.i. y para el género <i>Thalassironus</i>	77
Tabla XXI. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para el género <i>Rhabdodemia</i> de la localidad Santa Clara (AGC).....	82
Tabla XXII. Origen y número de organismos secuenciados para los diferentes géneros con su(s) respectiva(s) secuencia(s) de identidad máxima para el gen 18S.....	86
Tabla XXIII. Origen y número de organismos secuenciados para los diferentes géneros con su(s) respectiva(s) secuencia(s) de identidad máxima para el gen 28S.....	87

I. Introducción

I.1 La diversidad y los próximos retos

Determinar la diversidad existente en nuestro planeta se ha convertido en un gran desafío para las diferentes áreas de la biología, ya que la identificación de las especies es parte fundamental de cualquier estudio ecológico y evolutivo (Bhadury *et al.*, 2006a; Derycke *et al.*, 2008). Para alcanzar ese propósito se han desarrollado iniciativas científicas para catalogar las especies y sus relaciones evolutivas en varios grupos taxonómicos (Blaxter *et al.*, 2005). Como ejemplo, podemos mencionar el proyecto Árbol de la Vida (“Tree of Life” o “ToL”, por sus siglas en inglés) cuyo objetivo es determinar las relaciones filogenéticas de todos los taxa vivientes y extintos (Maddison *et al.*, 2007). Otro ejemplo es el Código de Barras de la Vida (“Barcoding of Life Data Systems” o “BOLD”, por sus siglas en inglés) en el cual se pretende reunir la información molecular de todas las especies incluyendo aquellas que aún están por describirse (Ratnasingham y Hebert, 2007).

Actualmente se estima que el número de especies animales es del orden de 10 millones, de las cuales solamente cerca de 1.5 millones han sido descritas (May, 1988; Blaxter, 2004; Waugh, 2007), y apenas se conoce el 5-10% de todas las especies animales y vegetales estimadas (Coomans, 2002). Por otra parte, existe una discrepancia considerable en la proporción de especies descritas entre los diferentes grupos taxonómicos (Figura 1). En los grupos de vertebrados y moluscos, se han descrito el 80% o más del total de especies estimadas, mientras que en los de tardígrados y nemátodos, de los cuales se estima una alta abundancia y diversidad, existe un número limitado de especies descritas (Blaxter, 1998; 2003; Lamshead y Boucher, 2003; Baldwin *et al.*, 2004; Blaxter *et al.*, 2004; Blaxter *et al.*, 2005). En el caso de los nemátodos, especialmente los marinos, la diversidad estimada, aunque muy debatida, puede ser superior a un millón de especies (Lamshead, 1993).

No obstante, la comunidad científica ha reconocido que estamos experimentando una extinción en masa sin precedentes, y que una parte importante de las especies que se está perdiendo aún no ha sido descrita (Lewis, 2006). Por consiguiente, muchas especies

corren el riesgo de desaparecer de la biosfera quedándose en el anonimato. Esto se agudiza en grupos altamente diversos con una infraestructura taxonómica “precaria” como es el caso de los nemátodos marinos, debido a los métodos laboriosos para su identificación, claves taxonómicas restringidas a escasas áreas geográficas y conocimiento adecuado en la taxonomía del grupo. (De Ley, 2000; Coomans, 2002; De Ley y Bert, 2002; Cook *et al.*, 2005; Bickford *et al.*, 2006). Adicionalmente, la literatura señala que los métodos tradicionales de identificación por si solos son incapaces de lograr describir todos los aspectos de la biodiversidad, lo que los hace ser fácilmente ignorados (Blaxter, 1998; De Ley *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006a).

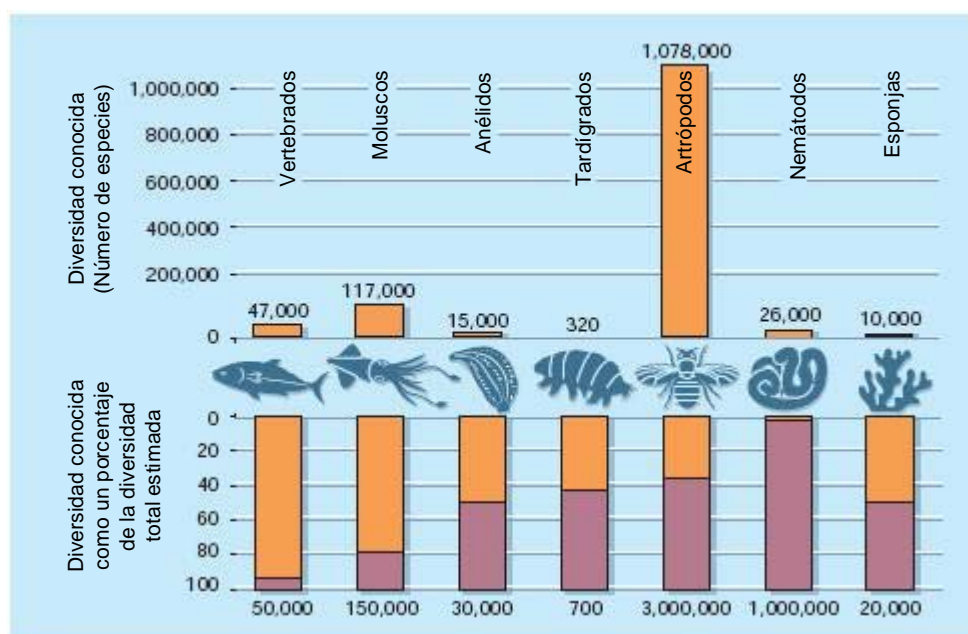


Figura 1. Número de especies conocidas y estimadas de algunos grupos animales. El histograma superior indica el número de especies descritas para cada grupo mientras que el inferior indica el número de especies descritas (región naranja) como un porcentaje de la diversidad total estimada (región morada) (Modificada de Blaxter, 2003).

La existencia de especies crípticas, especies morfológicamente idénticas que presentan una gran divergencia genética y especies gemelas, especies cercanamente emparentadas que son difíciles o imposibles de distinguir morfológicamente, torna el escenario aún más complejo (Knowlton, 1993; Pfenninger *et al.*, 2003; Rocha-Olivares *et*

al., 2004; Sáez y Lozano, 2005; Bickford *et al.*, 2006). En invertebrados metazoarios pequeños como los nemátodos (talla < 2mm y peso seco < 5µg), las especies crípticas y gemelas son aún más difíciles de ser identificadas con base en los criterios morfológicos (Rocha-Olivares y Vetter, 1999).

Numerosos estudios han documentado grados elevados de diferenciación genética entre poblaciones, incompatibles con los niveles de diferenciación intraespecífica, lo que sugiere la existencia de especies crípticas. La especiación críptica ha sido demostrada en diferentes grupos taxonómicos, principalmente a través de las herramientas moleculares (Figura 2) (Bickford *et al.*, 2006); insectos (Paterson, 1991), copépodos (Rocha-Olivares *et al.*, 2001; Rocha-Olivares *et al.*, 2004); mariposas (Hebert *et al.*, 2004), nemátodos marinos (Derycke *et al.*, 2005; Derycke *et al.*, 2006; Bhadury *et al.*, 2008), nemátodos parásitos (Blouin, 2002; Martín-Sánchez *et al.*, 2003), briozoarios (Gómez *et al.*, 2007), y rotíferos (Gomez y Snell, 1996). Knowlton (1993) propone que muchas de las especies gemelas existentes en los grupos marinos pueden ser reflejo de una evaluación inadecuada de los caracteres morfológicos por lo que se han propuesto nuevas herramientas con el fin de solucionar estos problemas (Blaxter, 1998; De Ley y Bert, 2002; De Ley *et al.*, 2005). El uso del código de barras de ADN, una analogía al código de barra de los productos comerciales, se presenta como una posible alternativa para minimizar el esfuerzo involucrado en la identificación de las especies (Hebert *et al.*, 2003a; Stoeckle, 2003).

El código de barras de ADN utiliza pequeños fragmentos/secuencias de ADN de una región estándar del genoma que funciona como huella lo que permite identificar a las especies en cualquier fase de su desarrollo ontogénico (“DNA Barcoding” o “DNA Barcode” por sus siglas en inglés) (Blaxter, 2003; Hebert *et al.*, 2003b; Blaxter, 2004; Bhadury *et al.*, 2006b; Sonnenberg *et al.*, 2007). El código de barras de ADN es una iniciativa muy reciente (“Consortium for Barcode of Life” o “CBOL” por sus siglas en inglés) y fue propuesta inicialmente por Hebert y colaboradores (2003b), sin embargo ha recibido mucha atención en los últimos años debido, principalmente, a su utilidad para la identificación taxonómica y al potencial de la información molecular para inferir las relaciones filogenéticas entre las especies (De Ley, 2000). Se han sugerido diferentes regiones del genoma para la aplicación del código de barras de ADN, regiones que

permitan diferenciar a los organismos a nivel de especie (Blaxter, 2004; Ratnasingham y Hebert, 2007). Dos aspectos importantes en torno de la utilización del código de barras de ADN para la identificación y descubrimiento de especies son: (1) la interpretación y validez de la información genética molecular frente a la taxonomía clásica (basada en la morfología) y (2) la utilización de un gen “universal” para la identificación de toda la biota.

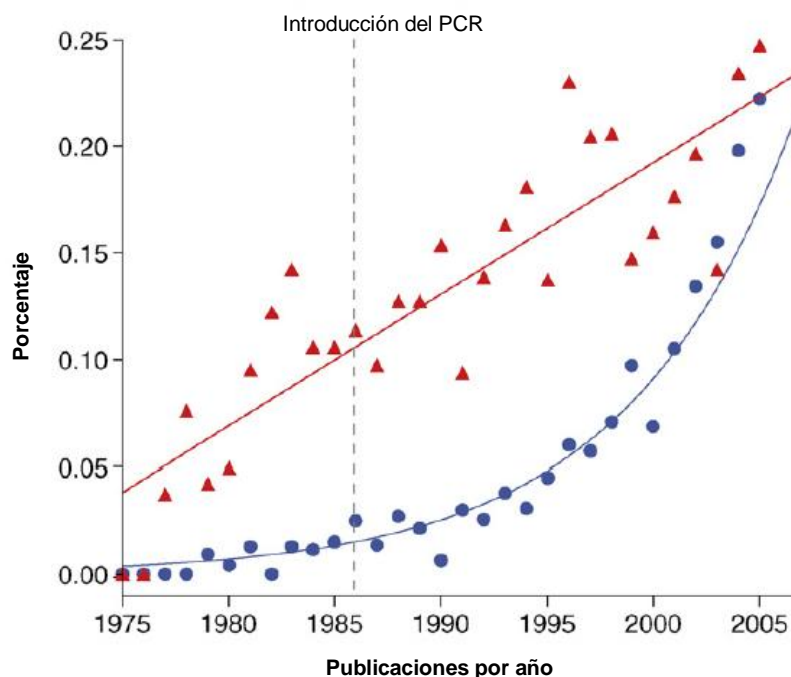


Figura 2. Porcentaje de trabajos publicados con el tema de especies gemelas (triángulo rojo) y especies crípticas (círculos azules) en la literatura especializada en los últimos 30 años. Se indica el año de invención de la PCR (Modificada de Bickford *et al.*, 2006).

I.2 Taxonomía clásica vs. genética molecular

La taxonomía apoya casi todas las investigaciones biológicas y en la ecología dicha contribución es aún más relevante. A pesar de su gran importancia, actualmente existe una crisis grave de expertos taxónomos en la comunidad científica (De Ley, 2000; Coomans, 2002; Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Cook *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006a). Mientras que la sistemática filogenética parece haber renacido, la disminución de taxónomos y la depreciación de la taxonomía son cada vez más preocupantes.

La filogenia se ha convertido en una herramienta muy aceptada y útil. El propósito principal de esta disciplina es la estimación de las relaciones evolutivas entre los organismos. En la práctica, la descripción taxonómica consistente en nombrar y asignar un nivel taxonómico a un organismo, se ha desplazado a un segundo plano (Nei y Kumar, 2000). La relevancia de la filogenética molecular se ha incrementado especialmente después de la creciente accesibilidad a técnicas moleculares, catalizada por la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction” o “PCR” por sus siglas en inglés), el desarrollo de herramientas bioinformáticas necesarias para los análisis filogenéticos, así como por el incremento en la capacidad de cómputo para ejecutarlas. En consecuencia, la sistemática molecular ha experimentado una revolución conceptual y metodológica al mismo tiempo que la taxonomía tradicional ha sufrido una devaluación (Coomans, 2002).

Esto por consiguiente, refleja la necesidad de adoptar nuevas herramientas para la identificación de las especies, la cual se ha basado principalmente en criterios morfológicos. En particular, la caracterización taxonómica de los nemátodos marinos de vida libre se ha realizado esencialmente a través de la microscopía óptica. No obstante, problemas asociados al uso inadecuado y a limitaciones de la microscopía, añadidos a la falta de experiencia pueden resultar en observaciones e interpretaciones incorrectas (De Ley, 2000; Coomans, 2002; De Ley y Bert, 2002).

I.3 Marcadores moleculares

Los marcadores utilizados en los estudios de genética molecular han evolucionado a lo largo del tiempo (enzimas de restricción, microsatélites, secuencias de ADN) buscando siempre una mejor resolución genética para la diferenciación de poblaciones o especies (Awise, 1994; Parker *et al.*, 1998). El uso de un marcador en particular va a depender fundamentalmente del objetivo del estudio a ser realizado. Características como la tasa evolutiva o mutacional del marcador, su grado de polimorfismo, el enfoque estadístico disponible así como aspectos pragmáticos de tiempo y costo de los análisis son generalmente considerados (Parker *et al.*, 1998; Sonnenberg *et al.*, 2007).

Para los estudios de códigos de barras se han sugerido algunas regiones del ADN como posibles “marcadores universales”. El gen citocromo oxidasa *c* sub-unidad I (COX I por sus siglas en inglés) del ADN mitocondrial (ADNmt) ha ganado mucha atención en estudios ínter específicos debido a su capacidad de diferenciar los organismos a nivel de especie en varios taxa animales (Bermingham y Moritz, 1998; Blouin *et al.*, 1998; Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Derycke *et al.*, 2007), presentando una base de datos de aproximadamente 17000 secuencias (Blaxter, 2004). Si bien presenta un alto poder de resolución, el COX I también tiene limitaciones, como por ejemplo la distinción entre híbridos y la ausencia de cebadores universales para realizar la PCR (Blaxter, 2004; Sonnenberg *et al.*, 2007).

Entre los otros marcadores candidatos para los estudios de código de barras se encuentran algunos genes del ADN ribosomal (ADNr) nuclear: las sub-unidades pequeña y grande, 18S y 28S respectivamente (“Small Subunit” o “SSU” y “Large Subunit” o “LSU” por sus siglas en inglés), los espaciadores intertranscritos (“Inter transcribed Spacers” o “ITS-1” e “ITS-2” por sus siglas en inglés) y el gen 16S del ADNmt, este último particularmente para organismos procariontes. Según Blaxter (2004) los ITS presentan muchas inserciones y borrados (“Indels” en inglés) por lo que puede dificultar su alineamiento (Fenton *et al.*, 1998; Rocha-Olivares *et al.*, 2004; Derycke *et al.*, 2005; Derycke *et al.*, 2006). Se considera que los genes 18S y 28S parecen presentar las características ideales para los estudios ínter específicos como es el código de barras de ADN: (1) son genes universales presentes en todos los organismos, (2) presentan grupos de cebadores que trabajan bien en muchos taxa, y (3) presentan tanto regiones conservadas que facilitan el alinamiento múltiple como variables que proveen la información requerida para diferenciar las especies (Nadler, 1992; Blaxter, 2004; De Ley *et al.*, 2005; Sonnenberg *et al.*, 2007).

II. Antecedentes

II.1 Los nemátodos marinos de vida libre

Los nemátodos marinos de vida libre son organismos microscópicos, que presentan una alta riqueza de especies (Heip y Vincx, 1985; Vranken *et al.*, 1986), son considerados los metazoarios más abundantes de la biosfera y casi siempre dominan la meiofauna (organismos bentónicos que habitan los intersticios sedimentarios con tamaños menores a 1000/500 μm y mayores a 63/45 μm) en sedimentos blandos del fondo marino y estuarino (Heip y Vincx, 1985; Boucher y Lamshead, 1995; Lamshead y Boucher, 2003). Las densidades en que se presentan son muy altas pudiendo llegar hasta alrededor de un millón por m^2 en ambientes con características físicas, químicas y biológicas muy distintas (Chandler y Fleeger, 1983; Heip y Vincx, 1985; Vranken *et al.*, 1986). Por ejemplo, en estuarios de fondos limosos y pantanos pueden presentar densidades de hasta 20 millones por m^2 (Warwick *et al.*, 1998).

Los nemátodos marinos también se caracterizan por ser altamente diversos. Aunque controvertida, Lamshead (1993) propuso una estimación del número de especies para este grupo alrededor de 100 millones, argumentando que ambientes poco conocidos como el océano profundo podrían albergar gran parte de esa diversidad (Lamshead y Boucher, 2003). La complejidad funcional del grupo puede ser una posible explicación del gran número de especies. Estos organismos también se caracterizan por presentar una repartición de los recursos ecológicos, es decir, explotan de distintas formas el alimento y el hábitat disponible en el bentos. Ellos pueden alimentarse de bacterias, detritos orgánicos, algas, otros nemátodos, oligoquetos e inclusive pequeños poliquetos, permitiéndoles sustentar una gran diversidad (Heip y Vincx, 1985; Derycke *et al.*, 2005).

Debido a su gran abundancia y diversidad, los nemátodos marinos presentan un papel ecológico muy importante en los procesos de descomposición y reciclaje de nutrientes y por lo tanto han probado ser excelentes bioindicadores (Bongers y Ferris, 1999; Austen, 2004). Su utilidad como bioindicadores reside en que pueden dar una respuesta rápida a los cambios sufridos por el ambiente gracias a que poseen un período de

vida corto (por lo general), un desarrollo directo sin fase larval planctónica, una íntima relación con el sedimento y una alta fecundidad (Warwick *et al.*, 1990).

A pesar de ser un grupo altamente representativo en el bentos, lo cual se observa a través de sus valores de abundancia y diversidad, los nemátodos marinos de vida libre permanecen muy poco estudiados. Desafortunadamente, casi todas las especies de nemátodos marinos han sido descritas en una pequeña área geográfica (Coomans, 2002). Los ambientes marinos de países como Bélgica e Inglaterra son los sitios más conocidos con respecto a la diversidad de la nematofauna marina. Hasta la fecha, las claves más utilizadas para la identificación de estos organismos son las desarrolladas por Platt y Warwick (1983; 1988) y por Warwick y colaboradores (1998) las cuales describen justamente la nematofauna marina de Inglaterra.

II.2 Estudios moleculares en nemátodos: el uso del 18S y 28S

Los estudios ínter específicos en nemátodos, tanto sobre el código de barras de ADN como la filogenia del grupo, han utilizado principalmente fragmentos/regiones de los genes 18S y 28S del ADNr nuclear, genes de copias múltiples que se presentan en repeticiones en tándem separadas por espacios ínter génicos (Long y David, 1980) (Figura 3). Sin embargo, la gran mayoría de estos estudios se relacionan con nemátodos parásitos y terrestres, mientras que pocos incluyen a los nemátodos marinos de vida libre (Tabla I).

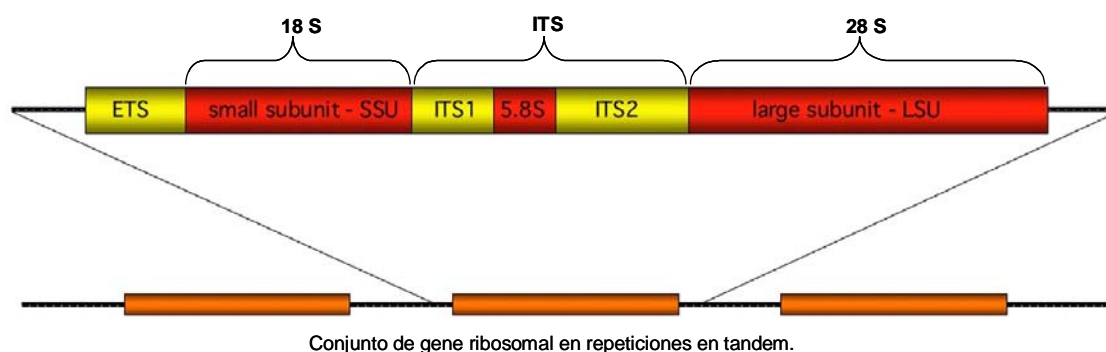


Figura 3. Organización general de los genes ribosomales eucariotas evidenciando la repetición en tándem de los genes (Modificada de Sonnenberg *et al.*, 2007).

Floyd y colaboradores (2002) desarrollaron un método para la identificación de nemátodos terrestres basado en la “Unidad Taxonómica Operacional Molecular” (Molecular Operational Taxonomic Unit o MOTU, por sus sigla en inglés) que consiste básicamente en identificar las especies con la ayuda de secuencias de ADN. Amplificando y secuenciando un fragmento de 450 pares de bases (pb) del gen 18S, estos autores encontraron 23 MOTUs (definidos como aquellos con una similitud > 99.5% en su secuencia de ADN) entre un total de 240 secuencias, las cuales podrían ser asignadas a unidades taxonómicas morfológicamente definidas (Operational Taxonomic Unit o OTU, por su sigla en inglés) usando una base de datos molecular de referencia.

Blaxter y colaboradores (2005) compararon el éxito de amplificación en PCR y secuenciación para los genes 18S y COX I en nemátodos y otros organismos de la meiofauna y constataron que para el primero fue de aproximadamente 85% mientras que para el segundo fue menor al 40%. Según estos autores, los cebadores universales empleados para amplificar la región del COX I (HCO y LCO, (Folmer *et al.*, 1994)) necesitan en primera instancia de una optimización para que sean realmente útiles para el código de barras de ADN en la meiofauna. Bhadury y colaboradores (2006a; 2008), en un estudio con nemátodos marinos, también abandonaron las regiones COX I y 28S debido a sus fallas en la amplificación vía PCR en muchos representantes de la nematofauna.

Los pocos trabajos moleculares ínter específicos con nemátodos marinos se han enfocado casi en su mayoría al código de barras de ADN, aunque algunos se refieren a estudios filogenéticos y sistemática molecular (De Ley *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006a; Meldal *et al.*, 2007; Bhadury *et al.*, 2008). Recientemente, Bhadury y colaboradores (2006a) evaluaron la eficiencia del gen 18S como posible marcador para el código de barras de ADN en nemátodos marinos de vida libre. Comparando los resultados de la identificación morfológica (taxonomía tradicional) con la identificación molecular, ellos encontraron que el 97% de las especies secuenciadas (en un total de 40 organismos) correspondieron a los taxa previamente determinados morfológicamente (Figura 4). Para trabajos de evaluación de impacto/disturbios y monitoreo ambiental en los cuales los nemátodos son muy utilizados, esta técnica puede ser de gran ventaja, ya que permite

ahorrar tiempo durante el procesamiento de las muestras haciendo más rápida la identificación de la nematofauna (Bhadury *et al.*, 2006a).

Tabla I. Recopilación de trabajos ínter específicos realizados para el grupo Nematoda con diferentes genes (nucleares y mitocondriales).

Enfoque del Trabajo	Marcador Utilizado	Formas de Vida	Referencia
<i>Filogenia</i>	18S ADNr	PAR/TER	(Blaxter <i>et al.</i> , 1998)
	18S ADNr y COX I	TER	(Blaxter <i>et al.</i> , 2005)
	18S ADNr	MAR/PAR/TER	(Blaxter, 1998)
	ND4 (ADNmt)	PAR	(Blouin <i>et al.</i> , 1998)
	18S ADNr	PAR/TER	(Holterman <i>et al.</i> , 2006)
	18S ADNr	MAR	(Kampfer <i>et al.</i> , 1998)
	18S ADNr	MAR/PAR/TER	(Meldal <i>et al.</i> , 2007)
	18S ADNr	PAR/TER	(Nadler <i>et al.</i> , 2006)
	18S y 28S ADNr	PAR	(Nadler, 1992)
	18S ADNr	PAR	(Oliveira <i>et al.</i> , 2004)
	18S ADNr	PAR	(Rusin <i>et al.</i> , 2001)
	18S ADNr	MAR/PAR/TER	(Smythe <i>et al.</i> , 2006)
	18S ADNr	PAR	(Baldwin <i>et al.</i> , 2004)
	28S ADNr	PAR	(Chen <i>et al.</i> , 2003)
	28S ADNr	PAR	(Chilton <i>et al.</i> , 2003)
	28S ADNr	MAR/PAR/TER	(Litvaitis <i>et al.</i> , 2000)
	18S y ITS ADNr	PAR	(Dorris <i>et al.</i> , 1999)
	18S y 28S ADNr	PAR	(Chilton <i>et al.</i> , 2006)
	18S ADNr	PAR	(Nadler <i>et al.</i> , 2007)
	18S, ITS (ADNr) COX I (ADNmt)	PAR	(Perlman <i>et al.</i> , 2003)
<i>Filogeografía</i>	ITS ADNr y Cyt <i>b</i> (ADNmt)	PAR	(Nieberding <i>et al.</i> , 2008)
	Cyt <i>b</i> (ADNmt)	PAR	(Nieberding <i>et al.</i> , 2005)
<i>Taxonomía molecular</i> <i>Código de barras</i>	18S ADNr	MAR	Bhadury <i>et al.</i> 2006a
	18S ADNr	MAR	Bhadury <i>et al.</i> 2005
	18S ADNr	MAR	Bhadury <i>et al.</i> 2006b
	18S ADNr	MAR	Bhadury <i>et al.</i> 2007
	18S ADNr	MAR	Cook <i>et al.</i> 2005
	28S ADNr	MAR	De Ley <i>et al.</i> 2005
	18S ADNr	TER	Floyd <i>et al.</i> 2002

MAR: marinos, TER: terrestres, para nemátodos de vida libre y PAR: nemátodos parásitos (plantas, invertebrados y vertebrados). ADNmt y ADNr: ADN mitocondrial y ribosomal, respectivamente.

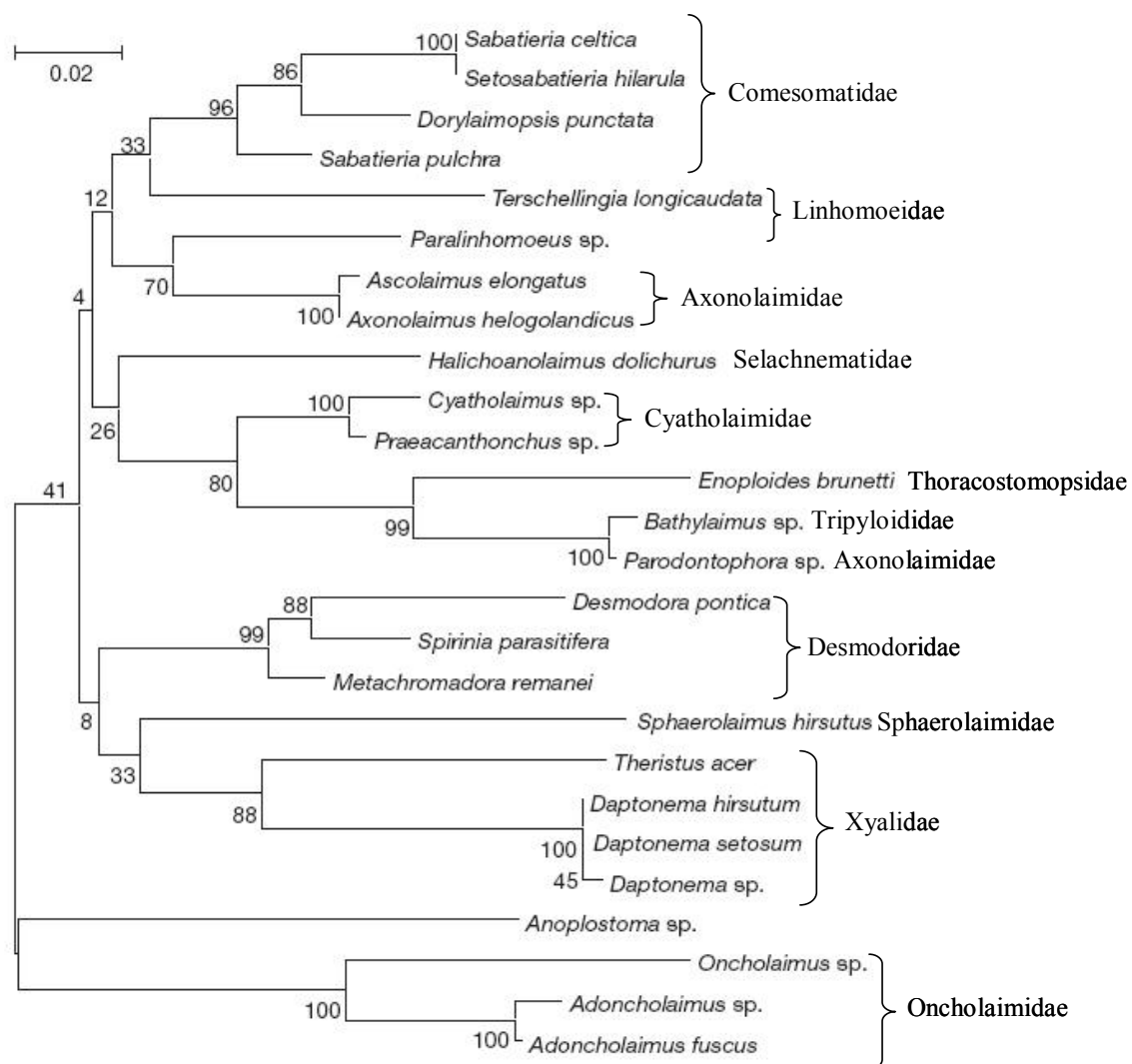


Figura 4. Reconstrucción filogenética de la nematofauna marina del sur de Inglaterra a partir de un fragmento de 345 pb del gen 18S con el método del vecino más cercano (escala: 0.02 sustituciones por sitio (Modificada de Bhadury *et al.*, 2006a).

La utilización de la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés) de productos de PCR ha sido otra técnica empleada para determinar la diversidad de la meiofauna marina (Cook *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006b). Los últimos autores han demostrado que el método puede ser una herramienta rápida y eficiente para explorar la composición de la comunidad meiofaunal, particularmente de los nemátodos marinos, sin embargo ellos también concluyen que sólo los organismos más abundantes (dominantes) en las muestras pueden ser identificados a través de ese método.

II.3 La nematofauna marina en México

Los trabajos sobre la nematofauna marina realizados en México, principalmente en el Golfo de México y Golfo de California, han sido en su mayoría de carácter descriptivo o ecológico asociando la distribución de las especies a las características del ambiente en los cuales la resolución taxonómica casi siempre está limitada al nivel de género (De Jesús-Navarrete, 1993; De Jesús-Navarrete y Gómez, 1999; De Jesús-Navarrete y Herrera-Gómez, 2002; De Jesús-Navarrete, 2003).

Estudios de carácter taxonómico más robusto fueron realizados por Castillo-Fernández y colaboradores. En uno de ellos Castillo-Fernández y Lamshead (1990) describieron tres nuevas especies en su revisión del género *Elzalia* (Nematoda: Xyalidae) en zonas de producción de petróleo del Golfo de México. Además, estos autores discuten la relevancia de las especies gemelas en la nematología marina. Más tarde, Castillo-Fernández y Decraemer (1993) registraron una gran diversidad (96 especies) para la Sonda de Campeche y la descripción de una especie nueva, *Cheironchus paravorax*.

De Jesús-Navarrete (2007a) estudió la nematofauna de Isla Socorro, aparentemente el único trabajo que aborda la nematofauna del Pacífico Mexicano, y registró la ocurrencia de 30 especies, siendo *Metachromadora* y *Rhyps* los géneros más abundantes. Este mismo autor (2007b) estudió la nematofauna asociada a bancos arrecifales en el caribe mexicano (Banco Chinchorro e Isla Mujeres). En total, identificó 34 géneros de 17 familias, siendo todos nuevos registros para México.

Para el Golfo de California, Mundo-Ocampo y Baldwin (1996) realizaron un estudio preliminar para la nematofauna intermareal, registrando la ocurrencia de 12 especies. Mundo-Ocampo y colaboradores (2007) compararon dos sitios intermareales en la región del Alto Golfo, describiendo la ocurrencia de 67 y 55 géneros para Punta Estrella y Santa Clara, respectivamente. Los autores concluyen que la región presenta una biodiversidad similar, a nivel de familia, a otros sitios intermareales del mundo, en particular a los de Europa.

En un trabajo más reciente, Holovachov y colaboradores (2008) describieron cuatro nuevas especies de la familia Ceramonematidae (dos de *Ceramonema*, una de *Pselionema* y una de *Pterygonema*) utilizando microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido.

Según estos autores, muchas de las especies encontradas en el Alto Golfo de California (AGC en lo sucesivo) pueden ser nuevas para la ciencia.

Hasta la fecha, existe solamente un estudio de carácter molecular que haya incluido la nematofauna marina de México (De Ley *et al.*, 2005). Dicho trabajo se llevó acabo en el AGC (San Felipe y Santa Clara). Utilizando video-microscopía digital (VCE por sus siglas en inglés) y secuencias del gen 28S del ADNr para identificar la nematofauna; los autores señalaron la existencia de al menos 32 especies según las secuencias de ADNr analizadas (un total de 37 secuencias). Además, ellos resaltan la importancia de utilizar un enfoque integrando la morfología y la genética molecular para la identificación de especies en grupos poco conocidos como los nemátodos marinos de vida libre.

III. El presente estudio

III.1 Importancia

La necesidad de conocer la diversidad actual se ha convertido en un gran reto para cualquier investigación en el ámbito biológico ya que las especies juegan un papel clave en la comprensión de los patrones y procesos ecológicos y evolutivos. Sin embargo, sabemos que la identificación de las especies involucra esfuerzo, principalmente en grupos pobremente explorados y que presentan un tamaño pequeño (~ 1 mm) como es el caso de los nemátodos marinos de vida libre. También sabemos que los métodos tradicionales de identificación de la nematofauna, basados fundamentalmente en la morfología, por si solos no pueden proporcionar la resolución adecuada para permitir la identificación de todas las especies (p. ej., especies crípticas y gemelas). Además, dichos métodos dependen de un buen equipo, entrenamiento y experiencia para lograr una identificación confiable. Por lo tanto, el uso de una herramienta alternativa que maximice el proceso de identificación es más que necesario.

La genética molecular nos da el acceso a la variabilidad directamente heredable (ADN), por lo que grupos que han permanecido aislados reproductivamente, aspecto fundamental para el concepto biológico de especie, pueden ser detectados por su divergencia genética a pesar de que no se hayan diferenciado morfológicamente, como en el caso de las especies crípticas y gemelas. Si bien los estudios moleculares en nemátodos marinos han aumentado en los últimos años, esta información se encuentra restringida geográficamente y se limita a unos pocos países europeos.

El Golfo de California, ha sido reconocido como el sexto centro de endemismo marino y punto de radiación de la biodiversidad (Gilligan, 1980; Hendrickx, 1996; Teske *et al.*, 2002; Brusca y Hendrickx, 2004). Dicha diversidad es resultado de procesos evolutivos ocurridos en una dinámica geológica y climática compleja (Bernardi *et al.*, 2003) y sólo podrá ser conservada si es descrita y conocida adecuadamente. En países tropicales como México el estudio de la nematofauna marina es aún incipiente por lo cual muchas de las especies encontradas pueden ser nuevas para la ciencia.

Estudios como el código de barras de ADN nos pueden ayudar a maximizar la identificación de la nematofauna y así conocer mejor la diversidad dentro del grupo. Sin embargo no se ha podido definir qué región del genoma realmente podría ser tomada como marcador estándar. En este estudio se propone comparar ambos enfoques (morfológico vs. molecular) para evaluar la diversidad así como las dos regiones más utilizadas para el código de barras en nemátodos marinos, los genes 18S y 28S del ADNr. Realizar estas comparaciones nos ayudará a (1) elucidar cuál región presenta las mejores características para ser utilizada en trabajos de código de barras, (2) comprender mejor las relaciones existentes entre las especies (filogenia), (3) conocer mejor la diversidad dentro del grupo Nematoda en el área de estudio, (4) generar datos importantes, que serán incorporados a bases de datos ampliamente reconocidas (p. ej. GenBank, ToL) así como (5) establecer bases, un punto de referencia, para futuras investigaciones.

III.2 Hipótesis de trabajo

En este estudio, al comparar la taxonomía tradicional con la genética molecular, a través de los genes 18S y 28S, se plantean las siguientes hipótesis:

La primera hipótesis se refiere a la resolución proporcionada por ambos enfoques, morfológico y genético, en la evaluación de la diversidad.

H1: Se espera encontrar una correspondencia entre las diferentes posibles morfoespecies y las entidades moleculares (secuencias). PREDICCIÓN: Por lo tanto cada morfoespecie previamente determinada será representada por una secuencia única.

La segunda hipótesis hace una comparación entre los dos genes utilizados en virtud de que ellos pueden presentar tasas evolutivas/mutacionales distintas y por lo tanto proporcionarnos una diferente resolución taxonómica a partir de las secuencias analizadas.

H2: Los dos genes, 18S y 28S, son igualmente útiles para el código de barras. PREDICCIÓN: Por lo tanto, encontraremos topologías congruentes en los árboles filogenéticos reconstruidos a partir de estos dos genes.

III.3 Objetivos

III.3.1 General

Evaluar la diversidad de los nemátodos marinos de vida libre (orden Enoplida) en el Golfo de California y en la costa Pacífico de Baja California, México, utilizando una perspectiva morfológica y molecular.

III.3.2 Particulares

- a. Identificar morfológicamente los organismos representantes del orden Enoplida a través de fotos digitales y análisis morfométricos.
- b. Identificar molecularmente los organismos a través de las secuencias proporcionadas por los genes 18S y 28S del ADNr nuclear.
- c. Comparar la viabilidad de los dos genes para estudios de códigos de barras, es decir, el porcentaje de éxito en las amplificaciones y la calidad de las secuencias.
- d. Comparar la resolución taxonómica y la congruencia entre los dos genes.
- e. Comparar la concordancia entre la morfología y la genética molecular.
- f. Contribuir a bases de datos sometiendo los archivos moleculares y foto-digitales de los organismos identificados (p. ej. GenBank, BOLD, ToL).

IV. Metodología

IV.1 Área de estudio

Se seleccionaron tres sitios en la costa del Pacífico Mexicano frente a la Península de Baja California y cuatro en el Golfo de California (Figura 5). En la costa del Pacífico Mexicano, se tomaron muestras de dos playas próximas a Laguna Manuela y también en San Carlos, ambas localidades dentro de Bahía Vizcaíno (centro de la península), además de una localidad al sur de la península (Cerritos, Baja California Sur). En el Golfo de California, se eligió una localidad en la región sureña, La Paz; una localidad en la región de las grandes islas, Bahía de Los Ángeles; y dos localidades en el Alto Golfo, Santa Clara y San Felipe.

IV.2 Muestreo en campo

En cada localidad, se recolectaron los organismos en las zonas intermareales. Con un nucleador de 2 cm de diámetro por 10 cm de altura, se tomaron 3 muestras de sedimento y se preservaron de inmediato en DESS (solución de DMSO 20%, EDTA a 0.25M y pH 7.5 y NaCl a saturación), esto, nos permitió realizar tanto el trabajo morfológico como molecular en los mismos organismos (Seutin y Boag, 1991; Dawson *et al.*, 1998; Yoder *et al.*, 2006). Además, se tomaron muestras de sedimento para caracterizar la granulometría de cada sitio, que en general variaron entre arena fina y gruesa. Se tomaron datos de salinidad y temperatura del agua *in situ* así como las coordenadas geográficas (Tabla II).

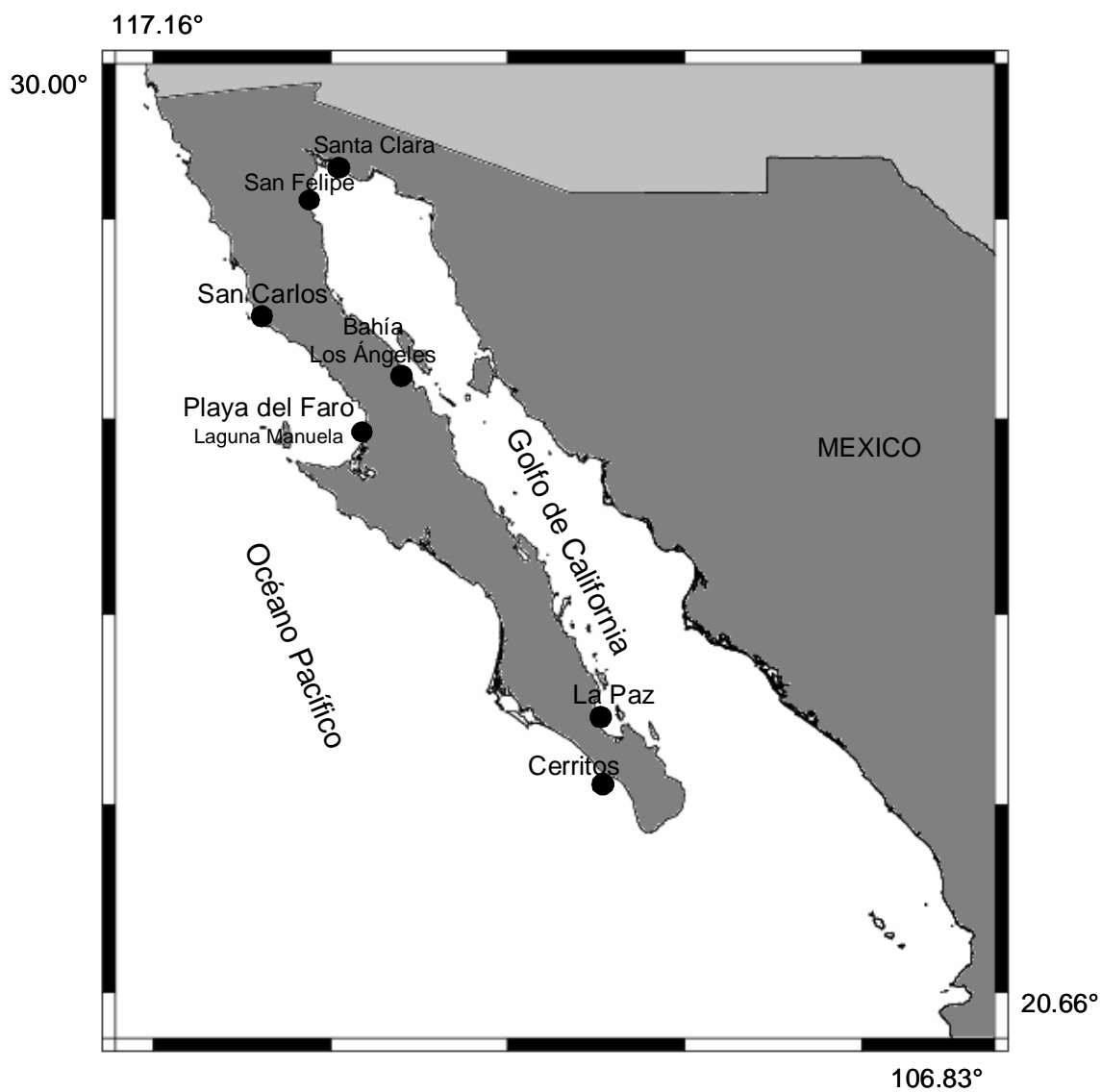


Figura 5. Sitios de muestreo en el Golfo de California y Península de Baja California.

Tabla II. Localidades muestreadas con sus respectivos datos de temperatura (°C), salinidad (ppm), posición geográfica (Lat. N/Long. W), fecha de muestreo y características particulares.

Área	Localidad*	Temp.	Sal.	Posición	Fecha	Notas Ecológicas
Golfo	La Paz (LP)	22	36	24°09.912' 110°18.843'	17-11-07	Playa arenosa en la ensenada de La Paz frente al malecón; con gran desarrollo urbano, arena fina.
	Bahía Los Ángeles (BLA)	-	-	28°58'4.20" 113°32'27.00"	15-08-06	Playa de arena fina en la zona central del Golfo de California. Sin ocupación urbana y con amplitudes grandes de marea.
	San Felipe (SF)	32	35.5	31° 07.817 114° 53.018	27-07-07	Zona intermareal en la costa de San Felipe conocida como cebador estero; área prístina presentando mareas con gran amplitud, arena gruesa.
	Santa Clara (SC)	30.5	35	31° 41.133 114° 30.519	28-07-07	Playa arenosa justo en frente del pueblo de Santa clara; zona con marea de gran amplitud, arena fina a gruesa.
Pacífico	Playa del Faro (PF)	26	36	28°14'21.58" 114° 6'13.62"	24-05-07	Playa arenosa en el Pacífico con una extensión pequeña, arena gruesa, sin oleaje.
	San Carlos (SCA)	-	-	29°37'21.72" 115°29'1.62"	25-05-07	Playa arenosa, frente al campo pesquero de San Carlos, arena fina, oleaje fuerte, sin ocupación.
	Cerritos (CE)	28	35	23°19.740' 110°10.548'	21-11-06	Playa arenosa cercana al pueblo de Todos Santos, sin ocupación, oleaje fuerte, (arena fina a gruesa).

* Las abreviaciones posteriores a los nombres de las localidades de estudio serán utilizadas en las siguientes tablas.

IV.3 Procesamiento en laboratorio

IV.3.1 Separación de los organismos del sedimento

Para extraer los organismos del sedimento, primeramente se lavaron las muestras en un juego de tamices con luz de malla de 1000 y 63 μm . El material retenido en la malla de 1000 μm , en su mayoría detritos, fue descartado. Una vez que las muestras ya estaban lavadas, es decir, que todo el material fino como arcilla y limo ya había sido descartado, la extracción de la fauna retenida en la malla de 63 μm siguió el método de flotación propuesto por Somerfield y Warwick (1996). Este proceso consiste básicamente en saturar el sedimento residual y la fauna con Ludox TM-50. La densidad específica del Ludox TM-50 es de 1.40 g cm^{-3} por lo cual se disminuyó hasta 1.15 g cm^{-3} con el objetivo de maximizar la extracción de los organismos (Jonge y Bouwman, 1977).

Utilizando una piseta conteniendo Ludox TM-50 (1.15 g cm^{-3}) se transfirió cada muestra del tamiz de 63 μm a un vaso de precipitados de 300 mL. Posteriormente, se aforó el vaso hasta 250 mL con Ludox TM-50 y se agitaron las muestras con un agitador de vidrio para resuspender el material (Figura 6). Después de dejar reposar la suspensión por 50 minutos, se filtró el material resuspendido con un tamiz de 63 μm y se almacenó cada muestra en un frasco debidamente etiquetado conteniendo DESS. Se repitió el proceso de resuspensión tres veces para cada muestra con el objetivo de retirar al máximo la fauna existente en el sedimento.

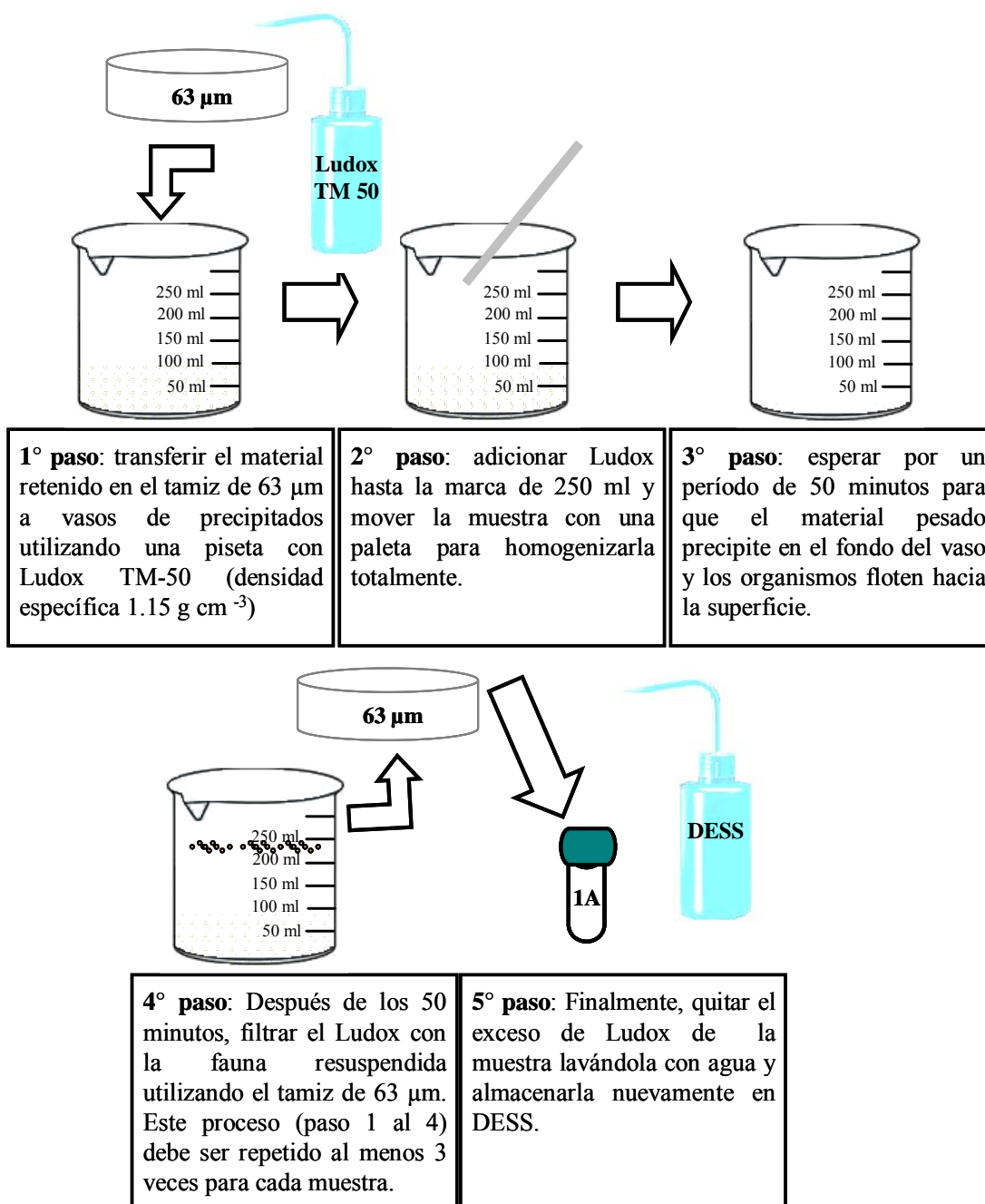


Figura 6. Esquema simplificado del método de flotación según Somerfield y Warwick (1996) para la extracción de la meiofauna del sedimento.

IV.3.2 *Identificación de la nematofauna*

La identificación de los organismos puede ser dividida básicamente en dos etapas, (1) selección/aislamiento de los organismos bajo el microscopio de disección y (2) identificación en el microscopio compuesto.

IV.3.2.1 *Selección y aislamiento de especímenes*

El criterio de selección de los organismos estuvo dirigido a los representantes del orden Enoplida (uno de los tres grandes órdenes de nemátodos marinos de vida libre), debido a que estos organismos presentan un tamaño mayor que los miembros de otros órdenes, en consecuencia, se puede trabajar mejor sin un equipo de microscopía de alta resolución y también asegura una mayor cantidad de ADN en las extracciones. Para el aislamiento de los especímenes se tomó una alícuota de cada muestra con una micropipeta (aproximadamente 1 mL) y se transfirió dicho volumen a un recipiente cóncavo de vidrio (“*embryo dish*”) para la selección de los individuos. Bajo el microscopio de disección (OLYMPUS Modelo SZX7, magnificación máxima 56x), se seleccionaron los organismos individualmente con la ayuda de un pincel especial transfiriéndoles a otro recipiente con agua destilada/esterilizada para la remoción de los trazos de DESS (Figura 7). Se enjuagaron los organismos al menos 3 veces para asegurarse de la total remoción de las sales y posteriormente se siguió con la identificación.

IV.3.2.2 *Identificación*

Para la identificación, se seleccionaron organismos que se encontraron íntegros y en buen estado morfológico por lo que el número de hembras y machos varió entre las localidades y géneros. Los especímenes se transfirieron individualmente a porta objetos temporales para su identificación. Este paso consiste básicamente en poner el organismo en una gota de agua destilada/esterilizada y taparlo con un cubre objetos. Una vez en el microscopio compuesto con contraste de interferencia diferencial (OLYMPUS-BX51), se tomaron fotos de cada organismo con una cámara digital (OLYMPUS U-TV0.5C-3) acoplada al microscopio a diferentes magnificaciones (4x2x, 10x2x, 40x2x, y 60x2x). Se

utilizaron las imágenes para análisis morfométricos más detallados utilizando el programa IMAGE J.

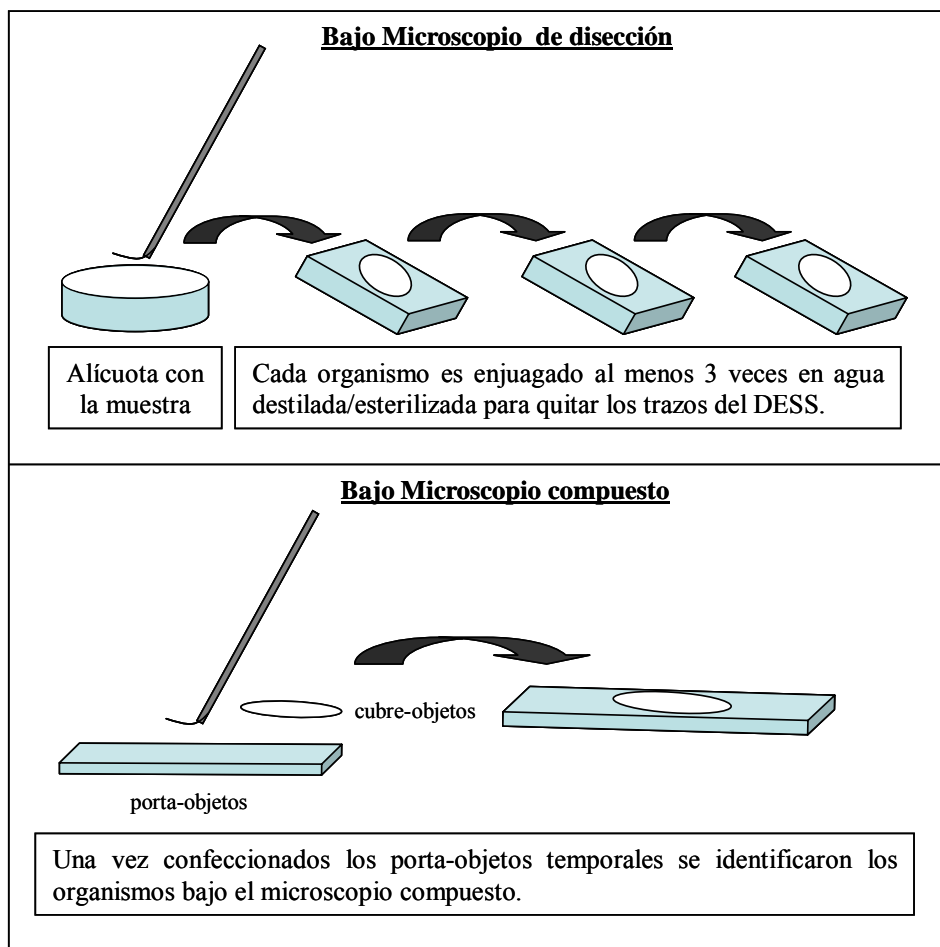


Figura 7. Pasos realizados durante la selección e identificación de los organismos por microscopía óptica.

Se identificaron los organismos hasta género, cuando posible, con base en los caracteres morfológicos, en las mediciones realizadas (Tabla III) y apoyándonos en claves taxonómicas (Platt y Warwick, 1983) así como en base de datos electrónicas especializadas (NEMYS - <http://nemys.ugent.be/>). Es importante resaltar que los análisis morfométricos

se realizaron después sobre las imágenes digitales de los organismos ya que una vez identificados los organismos fueron destruidos en el proceso de extracción de ADN.

Tabla III. Caracteres morfométricos analizados para la identificación de los organismos.

CARACTERÍSTICA MORFOMÉTRICA	SIMBOLO
<i>1- Largo Total</i>	LT
<i>2- Largo del esófago</i>	LE
<i>3- Razón largo total diámetro máximo (LT/DM)</i>	<i>a</i>
<i>4- Razón largo total largo del esófago (LT/LE)</i>	<i>b</i>
<i>5- Razón largo total largo de la cola (LT/LC)</i>	<i>c</i>
<i>6- Diámetro de la cabeza</i>	DC
<i>7- Largo de la seta cefálica anterior</i>	LSFa
<i>8- Largo de la seta cefálica posterior</i>	LSFp
<i>9- Largo de la cavidad bucal</i>	LB
<i>10- Ancho de la cavidad bucal</i>	AB
<i>11- Diámetro de la región anal</i>	DA
<i>12- Diámetro máximo</i>	DM
<i>13- Distancia del anillo nervioso a la región anterior</i>	DN
<i>14- Largo de la espícula en línea recta (machos)</i>	LER
<i>15- Largo de la espícula en arco (machos)</i>	LEA
<i>16- Largo del gubernaculum (machos)</i>	LG
<i>17- Posición de la vulva (%) con respecto al tamaño total (hembras)</i>	V %
<i>18- Largo de la cola</i>	LC

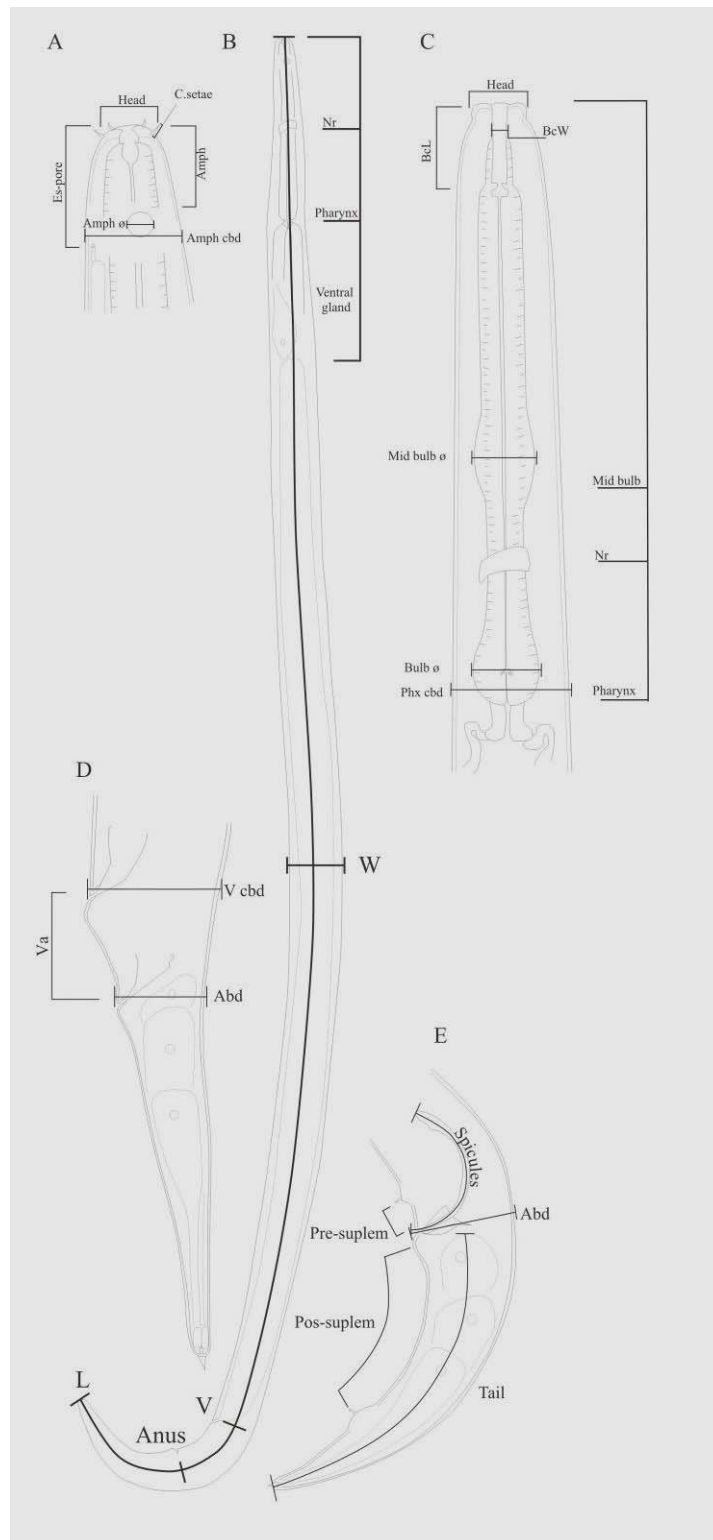


Figura 8. Esquema ejemplificando los parámetros morfométricos analizados. Proporcionado por Fonseca, 2007.

IV.3.3 Extracción de ADN

Posteriormente a la identificación, cada organismo fue cortado en tres o cuatro porciones (dependiendo del tamaño) con una navaja estéril sobre un porta objetos conteniendo 5 μL de solución de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl_2 , 0.45% NP40, 0.45% Tween20). Finalmente se transfirió la mezcla a un tubo de 0.2 mL conteniendo 20 μl de solución de lisis. Todo el procedimiento se realizó bajo el microscopio de disección para evitar la pérdida del espécimen. Una vez que los organismos fueron cortados y transferidos a la solución de lisis, se colocaron inmediatamente en hielo para evitar la degradación del ADN.

A continuación, se incubaron las muestras a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por un período de 15 a 30 minutos (hasta que se congelaran). La digestión de las proteínas se realizó mediante el uso de la proteinasa K (10 mg ml^{-1} stock). Se agregaron 2 μl de proteinasa K en cada muestra y se incubaron por una hora a $65\text{ }^\circ\text{C}$ seguido de 10 minutos a $95\text{ }^\circ\text{C}$, esto último para neutralizar la proteinasa. Estas incubaciones se realizaron en un termoclicador (MJ RESEARCH PTC-200) para evitar posibles problemas con la evaporación de las muestras. Al final, se centrifugaron las muestras por 1 minuto a una velocidad de 13 000 rpm. Se utilizaron 2.5 μl del sobrenadante, conteniendo el ADN, para reacciones de PCR de 25 μl .

IV.3.4 Amplificación vía PCR

Para la PCR se emplearon cebadores específicos para los genes nucleares 18S y 28S de nemátodos (De Ley *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006a) (Tabla 3). Como ya se mencionó, ambas regiones han sido muy utilizadas en trabajos de carácter inter específico (Figura 9).



Figura 9. Genes ribosomales nucleares destacando las regiones amplificadas vía PCR (Modificada de Sonnenberg *et al.*, 2007).

Las amplificaciones se realizaron en un volumen total de 25 μl conteniendo 2.5 μl de la extracción de ADN, 10 μl (gene 18S) y 15 μl (gene 28S) de dNTPs (0.5 mM para cada dNTP), 2.5 μl de buffer 10X (15 mM de MgCl_2), 1 μl de cada cebador (para el 18S:

MN18F y 22R; y para el 28S: D2A y D3B, todos a 10 μM), 0.75 μl de la enzima Finnzyme (1U/ μl) para el 28S y 1.0 μl de *Taq polimerasa* (NEB, 5U/ μl) para el 18S. Se utilizó la enzima Finnzyme para el gen 28S debido al bajo éxito en las amplificaciones con la *Taq polimerasa*. Se aforaron los volúmenes hasta 25 μl agregando 2.25 μl (28S) y 7.25 μl (18S) de agua destilada/desionizada. Las condiciones del perfil de termociclado para cada gen/par de cebadores se presentan en la Tabla IV.

Tabla IV. Perfil de termociclado para los dos pares de cebadores utilizados en la amplificación vía PCR.

Gen/Cebadores	Fase	Temp.	Tiempo	Ciclos
18S MN18F(CGCGAATRGCTCATTACAACAGC) 22R (GCCTGCTGCCTTCCTTRGA) ~ 350 pb	Des. Inicial	95° C	5 min.	1
	Des.	95° C	30 seg.	37
	Anillamiento	56° C	60 seg.	37
	Extensión	72° C	90 seg.	37
	Extensión f.	72° C	5 min.	1
28S D2A (ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG) D3B (TCGGAAGGAACCAGCTACTA) ~ 800 pb	Des. Inicial	94° C	5 min.	1
	Des.	94° C	30 seg.	30
	Anillamiento	55° C	60 seg.	30
	Extensión	72° C	2 min.	30
	Extensión f.	72° C	7 min.	1

R= Código IUPAC equivalente a A o G debido a que no es un sitio conservado

Se verificó el éxito de las amplificaciones mediante electroforesis en geles de agarosa 1.5 % (3 g de agarosa para 200 mL de TBE a 0.5X) teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg ml⁻¹). Se visualizaron con luz UV las bandas producidas para cada gen y se compararon con escalera de tamaño molecular. Finalmente, se capturó la imagen del gel y se archivó la foto para posteriores evaluaciones.

IV.3.5 Purificación y secuenciación de ADN

Para purificar los productos de PCR se siguió el protocolo de limpieza de EXOSAP-IT®. Este producto contiene dos enzimas hidrolíticas: exonucleasa y fosfatasa alcalina de camarón, la primera rompe los enlaces fosfodiéster del ADN de una sola hebra y la segunda elimina los grupos fosfato de los dNTPs. La proporción empleada de EXOSAP-IT: producto PCR fue de 1:2.5.

La reacción fue sometida a una incubación a 37°C durante 15 minutos seguida de una a 80°C por 15 minutos para desnaturalizar las enzimas. Después de purificado el producto de PCR se hicieron las reacciones de secuenciación para 133 muestras (66 para el 18S y 67 para el 28S). Para cada producto de PCR se secuenciaron ambas hebras del ADN para cada gen con los mismos cebadores de la PCR (total de 266 reacciones). El volumen total de las reacciones de secuenciación fue de 12 µl, sin embargo la proporción de cada ingrediente varió entre las muestras justamente porque el volumen de ADN purificado fue distinto (Tabla V). Las reacciones se sometieron al siguiente perfil de termociclado: un periodo de desnaturalización inicial de 1 minuto a 94° C; seguido de 25 ciclos de 10 segundos a 94° C, 10 segundos a 50° C y 4 minutos a 60° C.

Los productos de la secuenciación se sometieron a electroforesis de poliacrilamida en capilar en un secuenciador automático Gene Analyzer ABI 3100 (Applied Biosystems Inc, California). Se priorizaron los organismos que presentaron una amplificación de calidad, es decir, que mostraron una banda buena/fuerte en el gel de agarosa.

Tabla V. Volumen de los ingredientes utilizados en la reacción de secuenciación para cada gen de acuerdo al volumen de PCR purificado.

Ingredientes	Volumen de ADN/Gen				
	18S (3.5 µl)	18S (4.2 µl)	28S (3.5 µl)	28S (4.9 µl)	28S (5.6 µl)
<i>Agua dde</i>	4.5 µl	3.6 µl	3.5 µl	1.3 µl	0.2 µl
<i>Cebador (1 µM)</i> <i>Forward o reverse</i>	3.0 µl	3.0 µl	3.0 µl	3.0 µl	3.0 µl
<i>BigDye</i>	1.0 µl	1.2 µl	2.0 µl	2.8 µl	3.2 µl
Total	8.5 µl	7.2 µl	8.5 µl	7.1 µl	6.4 µl
AND	3.5 µl	4.2 µl	3.5 µl	4.9 µl	5.6 µl
Total final	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl

IV.4 Análisis de Datos

IV.4.1 Análisis morfológicos

La identificación taxonómica se realizó comparando los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos con los de las especies descritas disponibles en la literatura (ver

Tabla III). Los datos morfométricos de los géneros que presentaron variación morfológica, como el género *Trileptium*, se analizaron estadísticamente como se describe a continuación.

Se construyeron matrices de disimilitud basadas en los caracteres analizados. Las matrices se analizaron como distancias Euclidianas normalizadas sin transformación previa de los datos. A partir de las matrices, se realizó el análisis no paramétrico de escalamiento multi-dimensional (“Multidimensional Scaling” o “MDS” por sus siglas inglés) para evaluar la segregación morfométrica de las distintas morfoespecies. Posteriormente se realizó el análisis de similitud (“Analysis of Similarities” o “ANOSIM” por sus siglas en inglés) para determinar el grado y la significancia de las diferencias ($p < 0.05$). Se sometieron los valores de significancia a la corrección secuencial de Bonferroni considerando un $\alpha = 0.05$ para evitar la ocurrencia del error tipo I (Rice, 1989). Se utilizó el análisis de porcentajes similares (“Similar percentage” o “SIMPER” por sus siglas en inglés) para examinar la contribución de los caracteres morfológicos en la disimilitud entre las morfoespecies (grupos). Todos los análisis multi-variados se realizaron con el paquete estadístico PRIMER versión 5.2.4 (Clarke y Gorley, 2001). Cuando se detectaron variaciones morfológicas cualitativas y cuantitativas significativas en un género, se subdividió a los organismos en morfoespecies nombradas como: sp1, sp2 y así sucesivamente.

IV.4.2 Edición de las secuencias

Previo a los análisis moleculares, las secuencias obtenidas para cada gen, 18S y 28S, pasaron por un proceso de edición. Dicho proceso consiste en verificar la calidad de las secuencias y corregir posibles errores de lectura o artefactos creados durante la secuenciación. La edición de las secuencias se realizó con la ayuda del programa CodonCode Aligner versión 2.0.1 y consistió básicamente en: (1) corregir las inconsistencias entre las dos hebras de ADN de un mismo organismo y (2) la existencia de los indels (bases faltantes) entre las secuencias de organismos distintos (Figura 10).

Para probar la confiabilidad de las secuencias obtenidas en este trabajo, éstas se sometieron a un análisis de similitud de secuencias con la herramienta bioinformática

BLAST en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> (Benson *et al.*, 2008)), con la que se comparan las secuencias de este trabajo con todas las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos (ver Tablas XXII y XXIII). Una vez confirmada la calidad de las secuencias, se siguieron con los análisis moleculares.

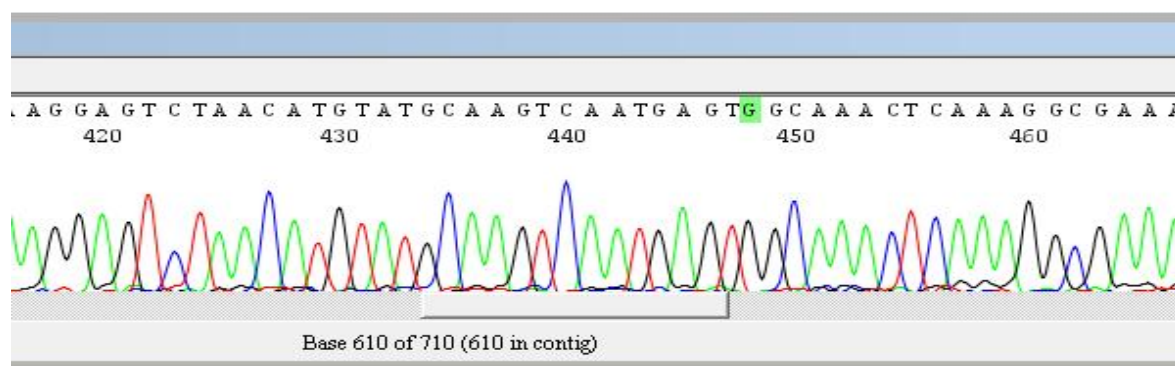


Figura 10. Cromatograma de una secuencia ya editada para el gen 28S. Cada pico de color corresponde a una base nitrogenada (rojo, timina; verde, adenina; negro, guanina y azul, citosina).

IV.4.3 Análisis moleculares

Primeramente, las secuencias de los genes 18S y 28S fueron alineadas en ClustalX 2.0 separadamente utilizando los parámetros iniciales del programa (Thompson *et al.*, 1997; Chenna *et al.*, 2003). De los alineamientos de cada gen se identificaron 19 secuencias distintas para el gen 18S y 20 para el gen 28S. Características descriptivas de los genes como la composición nucleotídica, los sitios conservados, sitios variables, sitios parsimonia-informativos y sitios con mutaciones únicas se obtuvieron a través del programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Previo a los análisis filogenéticos, el mejor modelo evolutivo apropiado para cada gen fue determinado con el programa Modeltest 3.7 (Posada y Crandall, 1998) usando los valores de Verosimilitud Máxima obtenidos en PAUP 4.0 beta (Swofford, 1998). Para la elección del modelo se utilizó el Criterio de Información Akaike (AIC por sus siglas en inglés) (Posada y Buckley, 2004). Posteriormente, se calcularon las relaciones filogenéticas

utilizando los modelos evolutivos GTR+I+G y TVMef+I+G para los genes 28S y 18S, respectivamente.

Se aplicaron tres métodos distintos para las reconstrucciones filogenéticas entre las secuencias para ambos genes. La Parsimonia Máxima (PM) y la Verosimilitud Máxima (VM) se realizaron con una búsqueda heurística (1000 replicaciones) con el programa PAUP 4.0 beta (Swofford, 1998). Para el método de Vecino más Cercano (VC), primero se calculó en PAUP 4.0 beta una matriz de verosimilitud máxima con el modelo de mayor ajuste (ver párrafo anterior) que se utilizó en el programa MEGA 4.0 para la reconstrucción del árbol (Tamura *et al.*, 2007). Los valores de bootstrap no paramétrico, un indicativo de la robustez de las ramas en los árboles, se calcularon con 1000 replicaciones para PM y VC y con 100 replicaciones para VM. Las secuencias de la familia Thoracostomopsidae se consideraron como un grupo interno (ingroup), mientras que las secuencias de las demás familias se consideraron como un grupo externo (outgroup) para enraizar los árboles.

La prueba de incongruencia por diferencia de tamaño (“Incongruence Length Difference” o “ILD” por sus siglas en inglés) fue aplicada para verificar la congruencia entre los genes 18S y 28S (Farris *et al.*, 1994;, 1995). Dicho análisis se realizó usando búsquedas heurísticas con 1000 replicaciones con el programa PAUP 4.0 beta (Swofford, 1998) bajo el criterio de PM. Aceptada la hipótesis nula de congruencia ($p > 0.05$), es decir, que los genes 18S y 28S presentaron topologías congruentes, se utilizaron los 1123 caracteres, (798 bases del gen 28S y 325 del 18S), para reconstruir nuevos árboles. Nuevamente, se empleó el método de PM y VM, este último con un modelo evolutivo reajustado, GTR+I+G pero con tasas de sustitución distintas al primero modelo. Se realizaron búsquedas heurísticas con 1000 pseudo replicaciones para una nueva reconstrucción filogenético tanto para PM como para VM. Los valores de bootstrap no paramétrico se obtuvieron con 1000 (PM) y 100 (VM) replicaciones.

V. Resultados

V.1 Caracterización morfológica

De los 160 especímenes analizados, se identificaron morfológicamente 16 géneros de nemátodos pertenecientes a 5 familias distintas representantes del orden Enoplida (Tabla VI). El número de organismos identificados para cada género reflejó su abundancia relativa en las muestras. Los géneros de la familia Thoracostomopsidae *Enoploides* (en Santa Felipe), *Mesacanthion* (principalmente en Santa Clara) y *Trileptium* (en las demás localidades) fueron aquellos con el mayor número de organismos identificados.

Entre estos, *Trileptium* fue el más abundante con 57 organismos identificados. Además, ese género ocurrió en todas las localidades de estudio con excepción de La Paz (Golfo de California Sur) y San Carlos (Pacífico). En Santa Clara, AGC, *Trileptium* presentó variaciones morfológicas (cualitativas y cuantitativas) por lo cual se diferenció en dos posibles morfoespecies, *Trileptium* sp1 y *Trileptium* sp2. No obstante, *Trileptium* también presentó variaciones morfométricas claras entre las distintas localidades sugiriendo la existencia de posibles morfoespecies adicionales (ver sección V.1.1.1).

Con respecto a las localidades, Santa Clara fue donde se encontró el mayor número de organismos identificados ($n = 58$), así como géneros y familias distintos (nueve y cuatro, respectivamente). En San Felipe se identificó un total de 35 organismos, representando solamente dos géneros. Por otro lado, en San Carlos en la costa del Pacífico se analizó un total de 11 organismos con cuatro géneros y tres familias. Es importante señalar que en esta última localidad no se logró identificar a uno de estos géneros ni su familia, por lo cual se asignó solamente como representante del orden Enoplida. Además, no se pudieron identificar otros dos géneros, uno representante de la familia Thoracostomopsidae (en Santa Clara) y uno de la familia Enchilidiidae (en La Paz).

Tabla VI. Número de organismos identificados para cada género/familia en las diferentes localidades estudiadas.

ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	Localidad *							
			Golfo				Pacífico			
			SC	SF	BLA	LP	SCA	PF	CE	Total
ENOPLIDA	ENCHELIDIIDAE	<i>n.i.</i>				1				1
		<i>Pareurystomina</i>	2							2
	IRONIDAE	<i>Thalassironus</i>	1							1
		<i>Trissonchulus</i>			1					1
	ONCHOLAIMIDAE	<i>Oncholaimus</i>				9				9
		<i>Metoncholaimus</i>						8		8
		<i>Viscosia</i>					8			8
	RHABDONEMANIIDAE	<i>Rhabdodemia</i>	10							10
	THORACOSTOMOPSIDAE	<i>n.i.</i>	2							2
		<i>Enoploides</i>		20						20
		<i>Epacanthion</i>					1			1
		<i>Mesacanthion</i>	34				1			35
		<i>Mesacanthoides</i>	2							2
		<i>Oxyonchus</i>	2							2
		<i>Trileptium</i>	5	15	24				2	11
<i>n.i.</i>					1				1	
Total			58	35	25	10	11	10	11	160

* Las abreviaciones de las localidades de estudio son iguales a aquellas presentadas en la Tabla II. *n.i.*, no identificado.

V.1.1 Familia *Thoracostomopsidae*

Thoracostomopsidae es considerada una familia de nemátodos marinos depredadores que habitan comúnmente ambientes intermareales y submareales someros de fondos arenosos, aunque también se han descrito algunas especies en ambientes de agua dulce (Nicholas, 1993; Nicholas, 2007). Estos son nemátodos marinos relativamente grandes (Greenslade y Nicholas, 1991; Nicholas, 2007). La familia está dividida en tres subfamilias: *Thoracostomominae*, *Enoplolaiminae* y *Trileptiinae*, sus características morfológicas incluyen una cavidad bucal armada con mandíbulas y dientes, esófago bien desarrollado y setas cefálicas largas. Indudablemente, la familia *Thoracostomopsidae* fue la más representativa en este estudio con siete géneros: *Enoploides*, *Epacanthion*, *Mesacanthion*, *Mesacanthoides*, *Oxyonchus*. (subfamilia *Enoplolaiminae*), *Trileptium* (subfamilia *Trileptiinae*) y uno no identificado.

V.1.1.1 *Trileptium* Cobb, 1933

Trileptium fue el género más abundante y ocurrió en casi todas las localidades de estudio. Dicho género presenta un cuerpo cilíndrico desde la región anterior (cápsula cefálica) hasta la cloaca (apertura en la región de la cola). Su cavidad bucal presenta mandíbulas poco desarrolladas pero con un diente (onchia) bien desarrollado. Un órgano suplementar sencillo en la región ventral, encontrado en muchos representantes de la familia *Thoracostomopsidae*, puede estar o no presente (Nicholas, 2007). El MDS realizado con los organismos representando las diferentes morfoespecies evidenció una clara separación debido principalmente a las diferencias morfométricas en los parámetros a , c y LT (Figura 11).

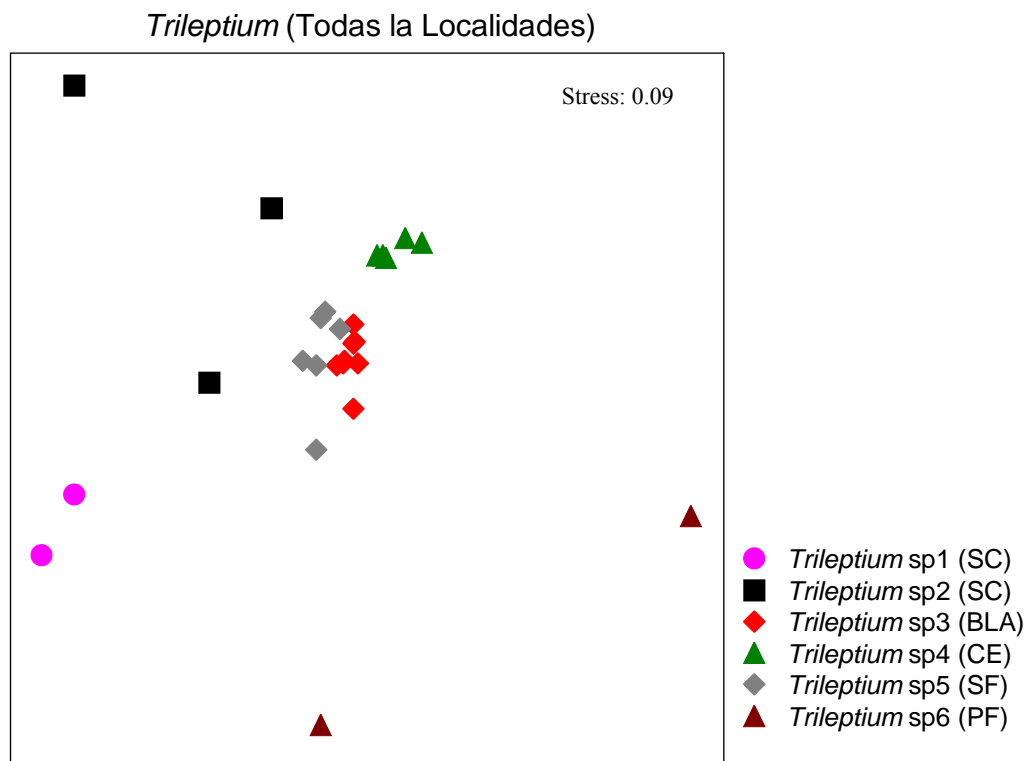


Figura 11. MDS evidenciando la diferenciación del género *Trileptium* entre las diferentes morfoespecies (Las abreviaciones de las localidades son las mismas presentadas en la Tabla II).

Los organismos representando las morfoespecies *T. sp2* (Santa Clara, (AGC) y *T. sp6* (Playa del Faro, Pacífico) fueron los que presentaron la mayor variabilidad morfológica interna, mientras que aquellos procedentes de las localidades de Cerritos (Pacífico), San Felipe (AGC) y Bahía L. A. (GC) fueron menos variables. El análisis de similitud (ANOSIM) confirmó la significancia de las diferencias ($R= 0.715$, $p=0.001$) entre casi todas las posibles morfoespecies. Sin embargo, después de aplicar la corrección de Bonferroni, sólo las diferencias entre *Trileptium sp5* y *T. sp3* y entre *T. sp5* y *T. sp4* permanecieron significativas (Tabla VII). Aunque son significativamente diferentes, *Trileptium sp3* (BLA) y *T. sp5* (SF) se mostraron más similares entre si que con las demás morfoespecies (Figura 11). No obstante, el ANOSIM confirmó que los *Trileptium* de las diferentes localidades son significativamente distintos entre si, excepto los de Playa del Faro (PF) que no se mantuvieron significativamente distintos posteriormente a la corrección de Bonferroni (Tabla VIII). Debido a que los análisis estadísticos evidenciaron

la existencia de diferencias significativas en el género *Trileptium*, en lo sucesivo se presentan los resultados para cada posible morfoespecie.

Tabla VII. Valores de R global (diagonal superior) y de nivel significancia P (diagonal inferior) derivados del análisis de similitud (ANOSIM) comparando las posibles morfoespecies del género *Trileptium*. Los valores en negritas son significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989) a un $\alpha = 0.05$ para toda la tabla.

	<i>T. sp1</i>	<i>T. sp2</i>	<i>T. sp3</i>	<i>T. sp4</i>	<i>T. sp5</i>	<i>T. sp6</i>
<i>T. sp1</i>		0.667	1	0.746	1	0.5
<i>T. sp2</i>	0.2		0.925	0.918	0.858	0.667
<i>T. sp3</i>	0.022	0.006		1	0.598	0.931
<i>T. sp4</i>	0.048	0.018	0.004		0.933	0.818
<i>T. sp5</i>	0.036	0.012	0.002	0.002		0.885
<i>T. sp6</i>	0.333	0.1	0.022	0.048	0.036	

Tabla VIII. Valores de R global (diagonal superior) y de nivel significancia P (diagonal inferior) derivados del análisis de similitud (ANOSIM) comparando las localidades en que se presentó el género *Trileptium*. Los valores en negritas son significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989) a un $\alpha = 0.05$ para toda la tabla.

	BLA	CE	SC	SF	PF
BLA		1	0.746	0.601	0.931
CE	0.003		0.628	0.933	0.818
SC	0.002	0.008		0.555	0.636
SF	0.001	0.002	0.002		0.875
PF	0.022	0.048	0.048	0.036	

Las abreviaciones de las localidades de estudio son iguales a aquellas presentadas en la Tabla II.

V.1.1.1.1 *Trileptium sp1* y *Trileptium sp2*

En total se identificaron cinco organismos del género *Trileptium* en la localidad de Santa Clara (AGC) que corresponden a dos posibles morfoespecies (Figuras 13 y 14). Según la literatura (Platt y Warwick, 1983), existen nueve especies válidas descritas para el género *Trileptium*. Este género es similar a *Enoplolaimus* (otro representante de la familia

Thoracostomopsidae) por sus setas cefálicas (número, arreglo y largo), sin embargo difiere de ésta y otros géneros de la familia por la forma de la espícula y gubernaculum así como la presencia de un suplemento pre-cloacal (generalmente). No se observaron similitudes claras de los individuos identificados como *Trileptium* con alguna de las especies ya descritas en la literatura.

Sólo dos organismos juveniles (J1 y J2) de *Trileptium* sp1 fueron aislados por lo cual no se pudieron observar caracteres sexuales, fundamentales para su identificación a nivel de especie. *T. sp1* fue caracterizado por valores mayores en casi todos los parámetros morfológicos analizados, principalmente en el largo total del cuerpo (LT), aun siendo juveniles, y en las razones a (LT/DM), b (LT/LE) y c (LT/LC). Por otro lado, *T. sp2* fue representado por organismos adultos, uno macho (M) y una hembra (H), además de un juvenil (J). Para esta morfoespecie se pudo observar una espícula relativamente larga pero sin la presencia de un suplemento pre-cloacal (Figura 14d). *T. sp2* presentó mayores valores para el largo de la cola (LC), ancho de la cavidad bucal (AB) y diámetro máximo del cuerpo (DM) (Tabla IX).

Además de estas diferencias cuantitativas, las dos morfoespecies presentaron variaciones en la ornamentación de la cutícula. Mientras *T. sp1* presentó una cutícula lisa, patrón general observado en los organismos del orden Enoplida, *T. sp2* exhibió una cutícula estriada con líneas transversales marcadas. Dicha ornamentación puede ser vista con mayor facilidad en los representantes adultos de la última morfoespecie (Figura 14c). El MDS realizado con los parámetros morfológicos mostró una clara separación entre las dos posibles morfoespecies *T. sp1* y *T. sp2* (Figura 12). Sin embargo el análisis de similitud (ANOSIM) realizado a posteriori no detectó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellas. Aunque no fueron significativas, las diferencias más evidentes entre esas dos posibles morfoespecies fueron los parámetros a (LT/DM) y c (LT/LC), siendo mayores en *T. sp1*.

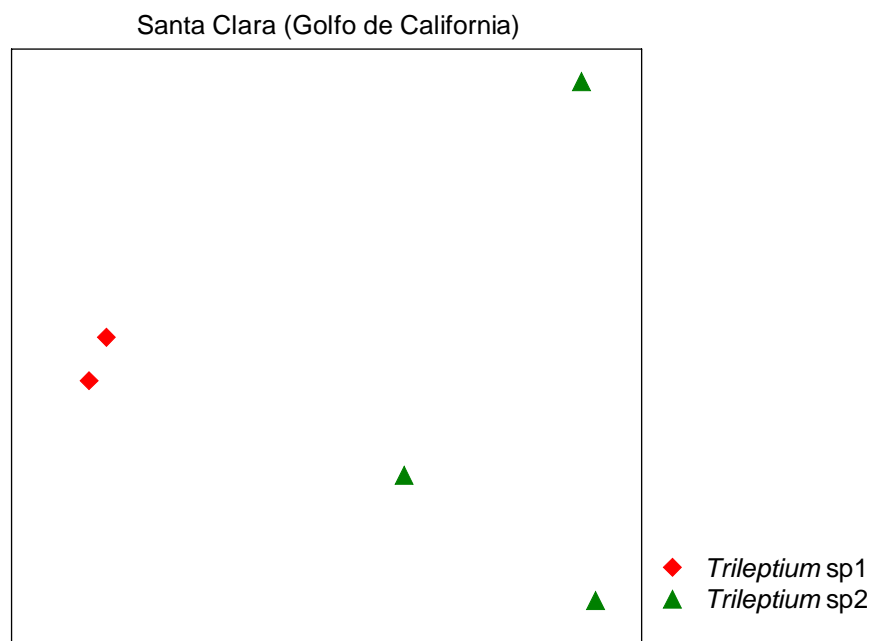


Figura 12. MDS evidenciando la separación de las dos morfoespecies dentro del género *Trileptium* en la localidad de Santa Clara, *Trileptium* sp1 (símbolos rojos) y *Trileptium* sp2 (símbolos verde).

V.1.1.1.2 *Trileptium* sp3

En Bahía de Los Ángeles (Golfo de California), *Trileptium* sp3 no presentó variaciones morfométricas entre los individuos (Tabla IX). Sin embargo, se pudo observar la existencia de algunas variaciones cualitativas entre machos y hembras. Los machos presentaron muchas setas somáticas a lo largo de todo el cuerpo, principalmente en la parte anterior, mientras que las hembras no.

Con respecto a los demás caracteres, no se observaron diferencias significativas entre machos y hembras. En comparación con *T. sp2* (Santa Clara), los machos de *T. sp3*, además de las setas somáticas en la parte anterior, presentan una espícula más larga y también la presencia de un suplemento pequeño (Figura 15).

V.1.1.1.3 *Trileptium* sp4

En la localidad de Cerritos, playa arenosa al sur de la Península de Baja California, *Trileptium* sp4 presentó poca variación morfológica entre los individuos (Tabla IX).

Además, esta morfoespecie estuvo representada por dos individuos juveniles (datos no presentados en las mediciones) y por hembras adultas (la mayoría de los individuos) (Figura 16). De acuerdo a las mediciones realizadas, *T. sp4* es más similar a *T. sp3* y *T. sp5* encontrados en Bahía de Los Ángeles y San Felipe, respectivamente (Figura 11). Los juveniles presentaron diferencias cualitativas con respecto a las hembras lo cual nos sugirió la posible existencia de dos morfoespecies dentro de *Trileptium sp4*.

V.1.1.1.4 *Trileptium sp5*

En la localidad de San Felipe (AGC), *Trileptium sp5* fue representado principalmente por juveniles; solamente se pudo identificar una hembra y un macho de esta morfoespecie (Tabla IX). *T. sp5* es muy similar a *T. sp3* (Bahía de Los Ángeles, Figura 11), sin embargo no presenta el gran número de setas somáticas en la región anterior del cuerpo (Figura 17).

V.1.1.1.5 *Trileptium sp6*

En Playa del Faro, playa situada en Bahía Vizcaíno (en la mitad de la Península de B.C.), se identificaron dos individuos del género *Trileptium*, dos hembras (H1 y H2, Tabla VIII). Estos organismos presentaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre si, lo que explica la variación encontrada para esta morfoespecie en el MDS (Figura 11).

Morfométricamente, mientras que uno de los organismos (H1) se pareció más a *T. sp1* (que presenta cutícula estriada) encontrado en Santa Clara (Figura 11, punto gris inferior), el segundo organismo (H2) presentó características morfológicas similares a *T. sp4* y *T. sp5*, encontrados en las localidades de Cerritos y San Felipe, respectivamente (Figura 11, punto gris a la derecha). Aunque estos dos individuos parecen ser posibles morfoespecies distintas, los consideraremos ambos como *T. sp6* debido a que no se pudo evaluar el polimorfismo dentro de ellas como se hizo para *T. sp1* y *T. sp2* en Santa Clara (Figuras 18 y 19).

Tabla IX. Parámetros morfológicos (media ± desviación estándar e intervalo de valores) para las diferentes morfoespecies de *Trileptium*.

	SC		BLA		CE		SF		PF				
	<i>T. sp1</i>		<i>T. sp2</i>		<i>T. sp3</i>		<i>T. sp4</i>		<i>T. sp5</i>		<i>T. sp6</i>		
	J1	J2	J	M	H	M (4 inds.)	H (4 inds.)	H (4 inds.)	H	M	J (4 inds.)	H1	H2
LT	4.27	4.81	2.16	3.31	3.5	2.00±0.08 1.89-2.08	1.98±0.10 1.90-2.13	1.87±0.10 1.70-1.96	2.47	2.87	2.24±0.24 1.97-2.54	2.92	2.17
LE	0.71	0.76	0.49	1.1	0.64	0.42±0.02 0.38-0.43	0.41±0.03 0.38-0.46	0.51±0.03 0.47-0.55	0.46	0.51	0.44±0.02 0.41-0.46	0.56	0.65
a	65.75	66.75	33.8	47.33	46.03	36.63±2.26 33.55-38.61	35.83±4.64 32.27-42.66	38.35±3.11 33.94-41.64	40.56	49.53	44.52±1.73 42.83-46.20	38.89	45.10
b	5.99	6.32	4.42	3.02	5.47	4.81±0.37 4.39-5.27	4.82±0.15 4.66-5.02	3.63±0.16 3.47-3.89	5.34	5.61	5.09±0.47 4.70-5.74	5.23	3.36
c	25.9	28.11	13.78	18.41	17.94	13.15±0.81 12.38-14.28	12.88±0.45 12.44-13.36	14.33±0.65 13.82-15.38	18.33	19.03	16.49±1.81 13.97-17.86	13.20	16.78
DC	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02 0.02-0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04
LSFp	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04	0.07	0.06±0.01 0.05-0.06	0.03	0.06	0.06	0.06 0.05-0.06	0.05	0.07
LSFa	?	?	?	?	?	0.01	0.01 0.01-0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02
LB	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
AB	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02 0.01-0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01 0.01-0.02	0.01	0.02
DA	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.04 0.04-0.05	0.03 0.03-0.04	0.04 0.03-0.04	0.04	0.04	0.04 0.03-0.04	0.07	0.05
DM	0.07	0.07	0.06	0.07	0.08	0.05±0.01 0.05-0.06	0.06 0.05-0.06	0.05	0.06	0.06	0.05 0.05-0.06	0.08	0.48
DN	?	?	0.14	0.32	0.16	0.11±0.01 0.10-0.12	0.11±0.01 0.10-0.12	0.11±0.01 0.11-0.12	0.12	0.13	0.12±0.01 0.11-0.13	0.16	?
LER	-	-	-	0.09	-	0.11±0.01 0.10-0.12	-	-	-	0.1	-	-	-
LEA	-	-	-	0.09	-	0.12 0.11-0.12	-	-	-	0.11	-	-	-
LG	-	-	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-
V %	-	-	-	-	61.32	-	58.31±0.64 57.69-58.96	61.40±0.66 60.40-61.99	52.3	-	-	59.38	63.88
LC	0.17	0.17	0.16	0.18	0.2	0.15±0.01 0.14-0.17	0.15±0.01 0.15-0.16	0.13±0.01 0.12-0.14	0.14	0.15	0.14±0.01 0.12-0.14	0.22	0.13

* Datos no medibles (?), datos que no se aplican para este organismo (-). Las abreviaciones de las localidades son iguales a aquellas presentas en la Tabla II.

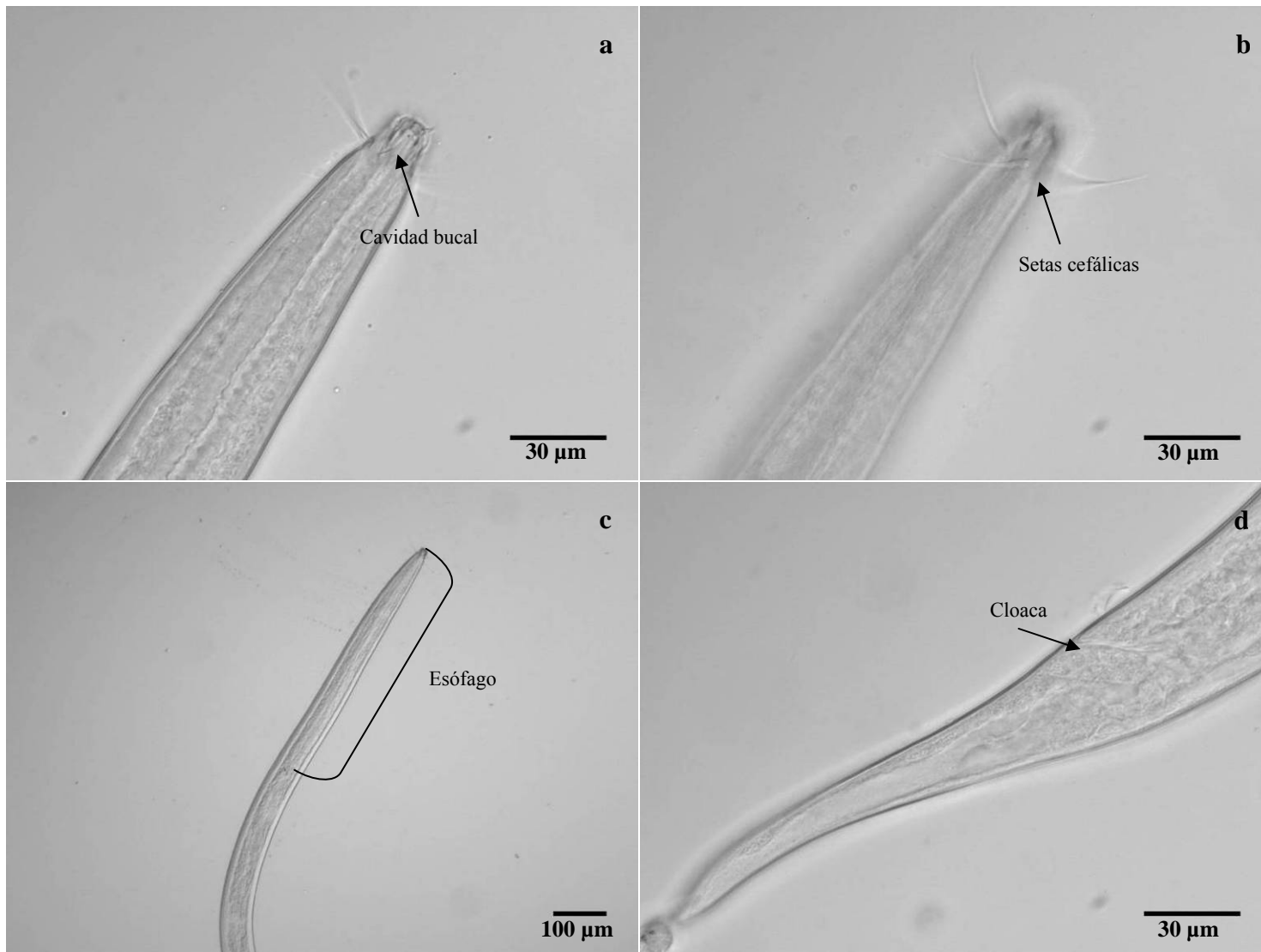


Figura 13. *Trileptium* sp1, juvenil (Santa Clara).

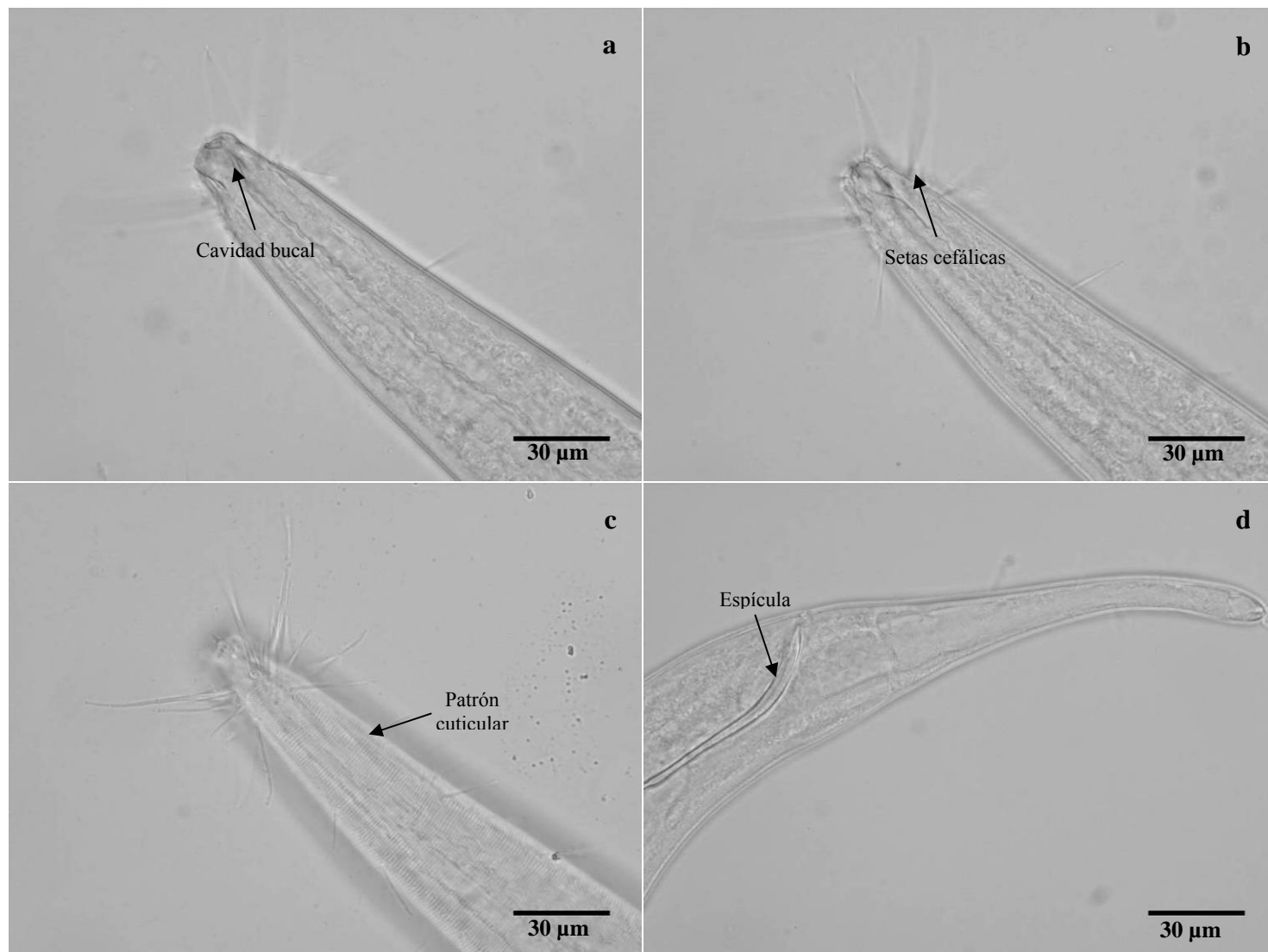


Figura 14. *Trileptium* sp2, macho (Santa Clara).

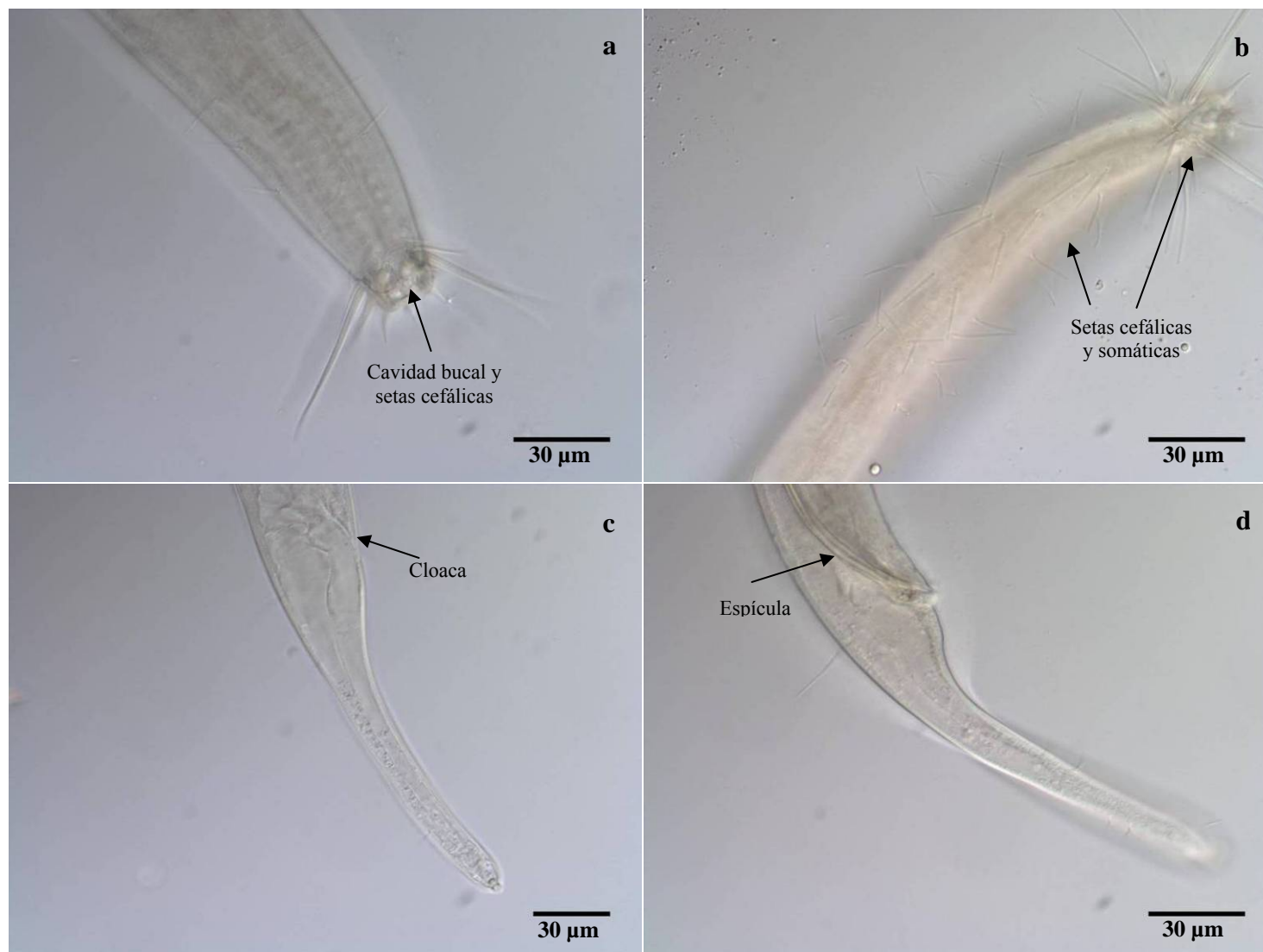


Figura 15. *Trileptium* sp3, (izquierda) hembra y (derecha) macho (Bahía LA).

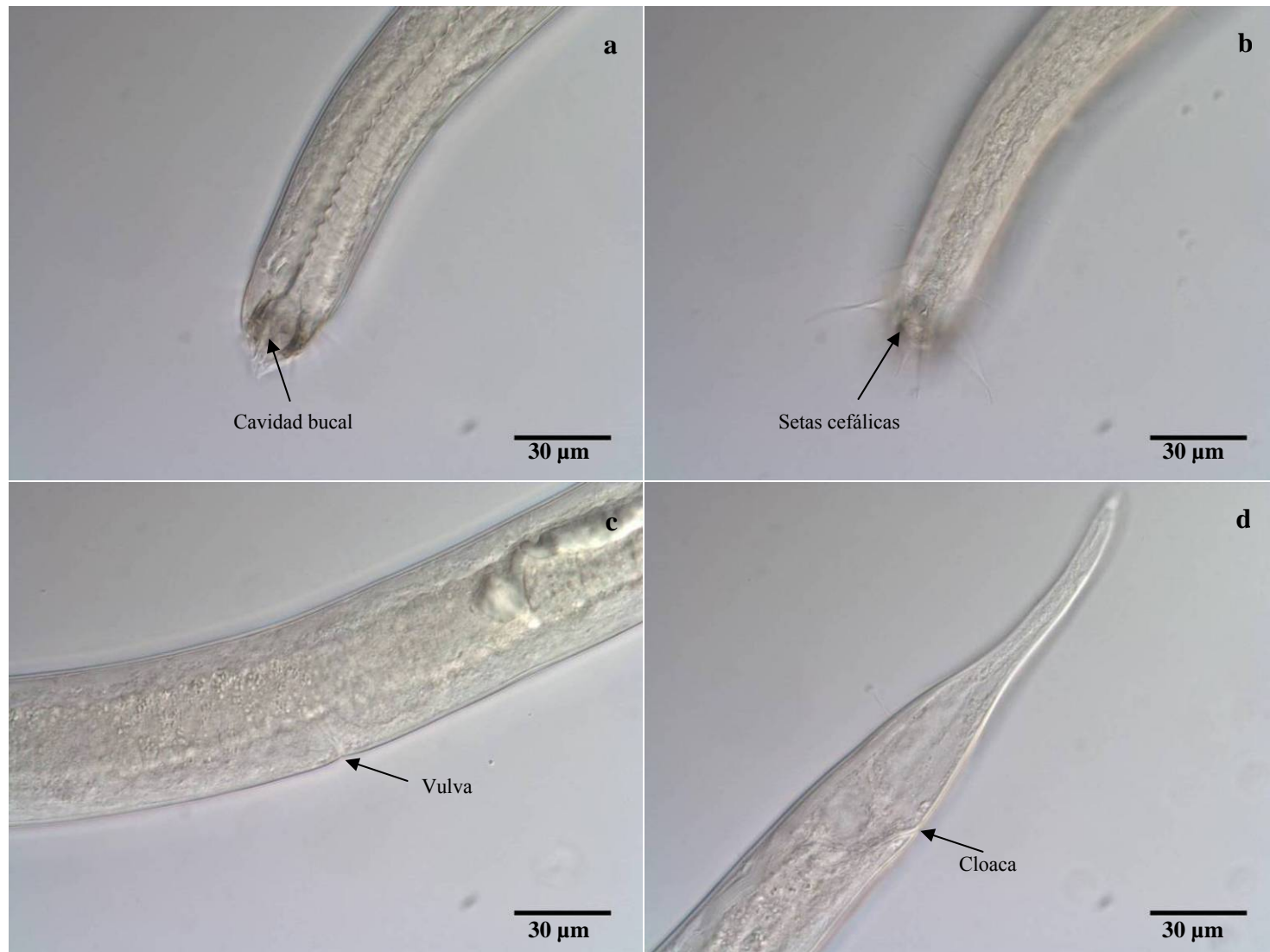


Figura 16. *Trileptium* sp4, hembra (Cerritos).

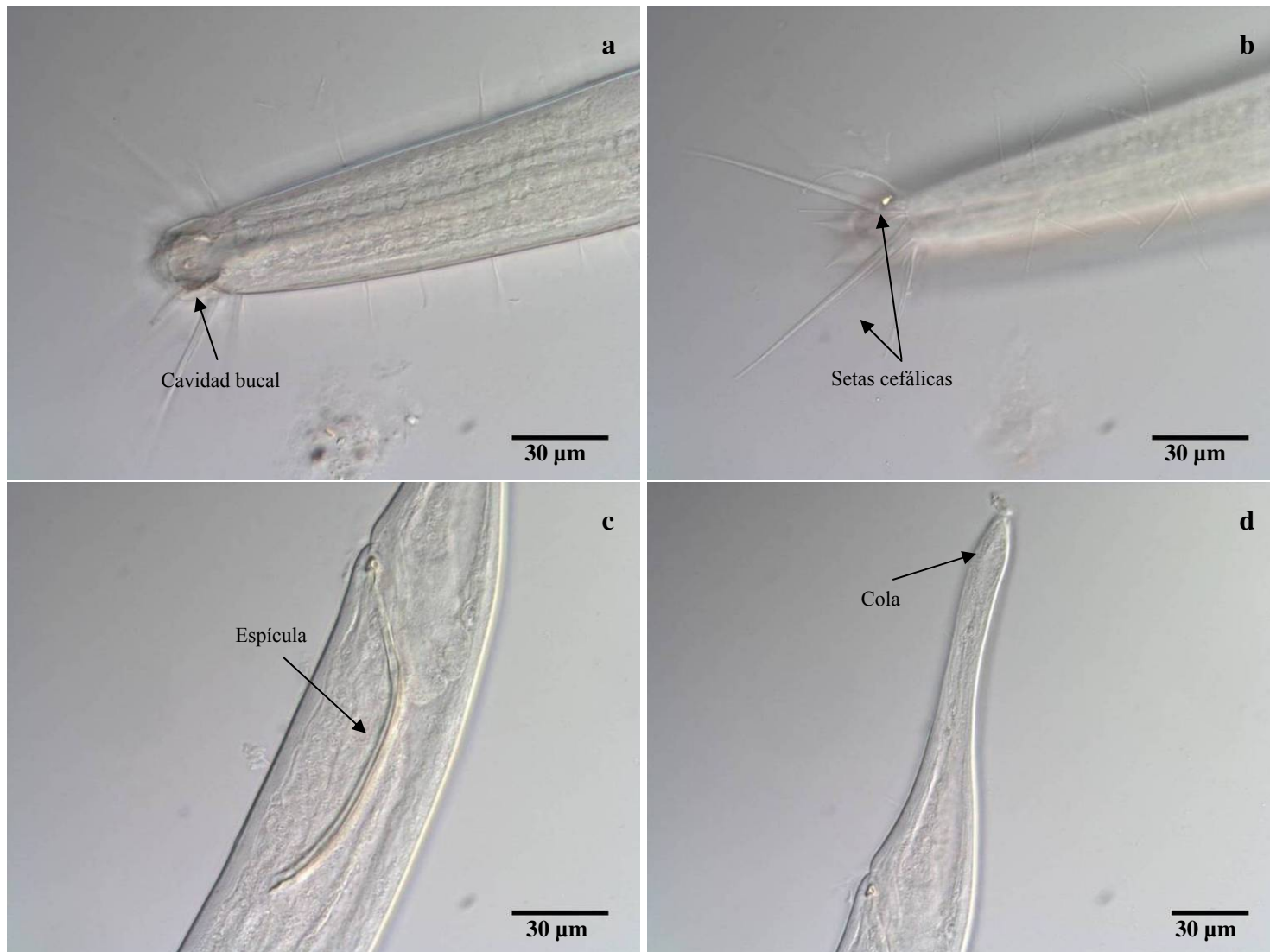


Figura 17. *Trileptium* sp5, macho (San Felipe).

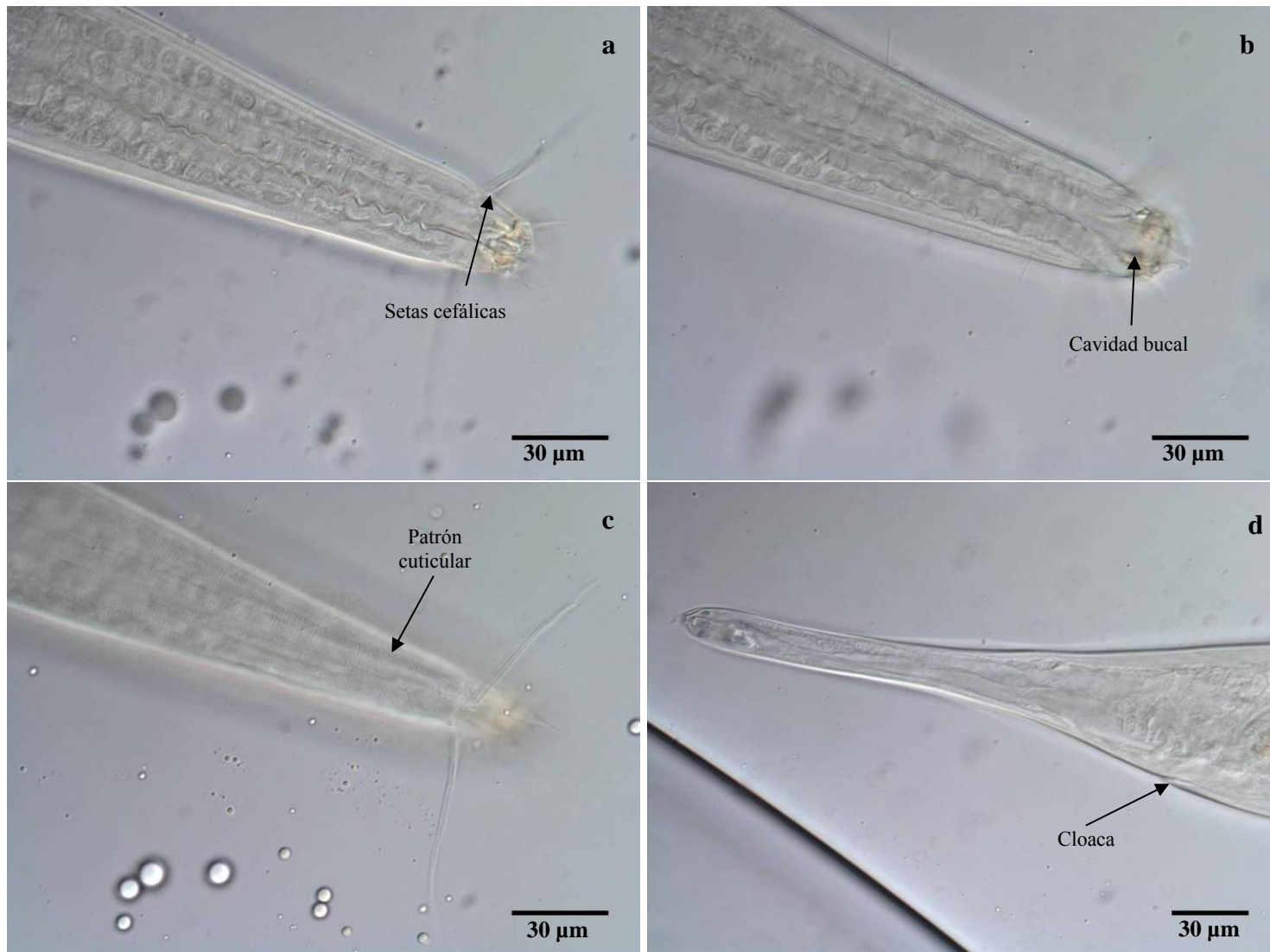


Figura 18. *Trileptium* sp6, hembra H1 (Playa del Faro).

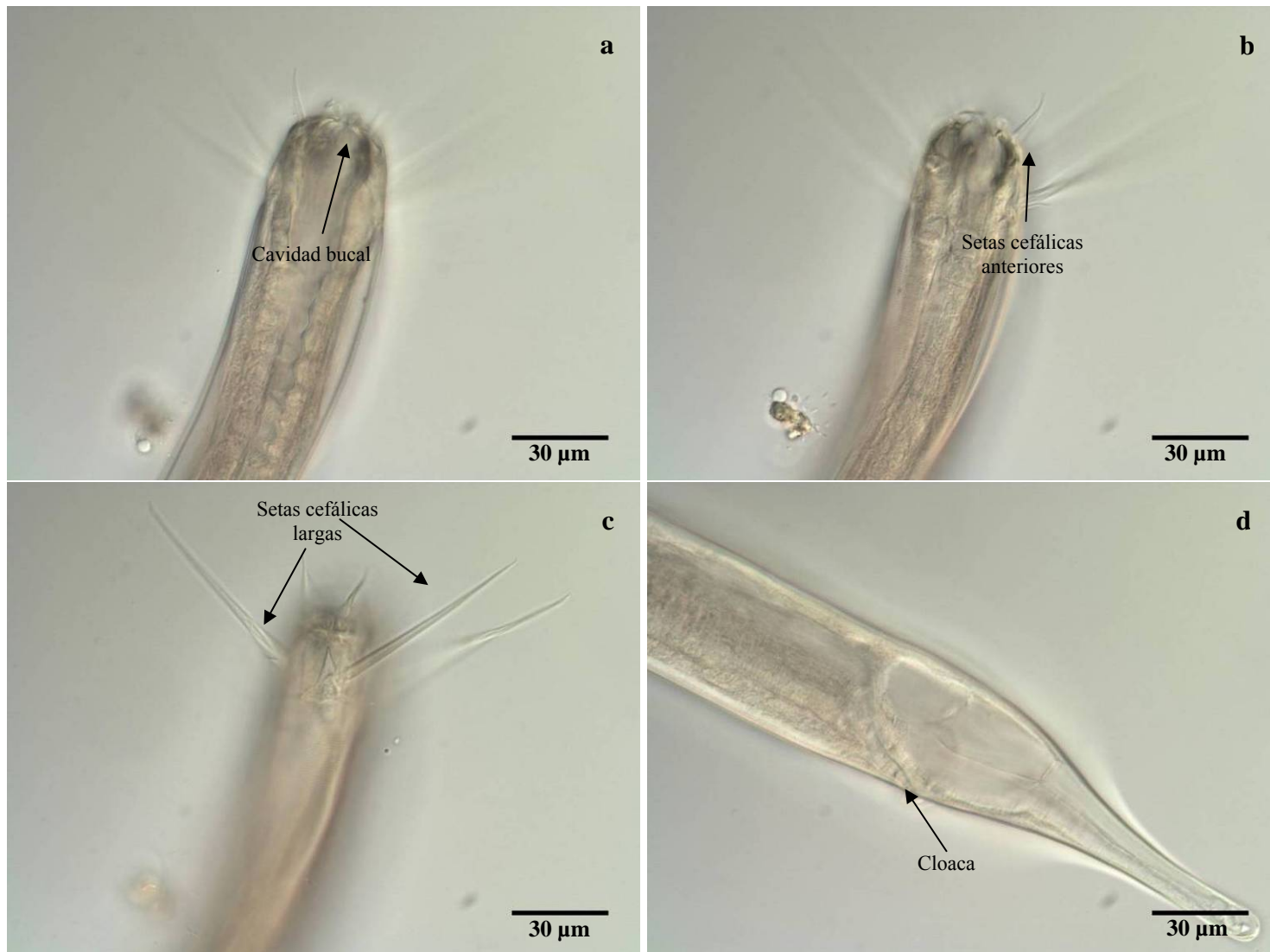


Figura 19. *Trileptium* sp6, hembra H2 (Playa del Faro).

V.1.1.2 *Enoploides* Ssaweljev, 1912

El género *Enoploides* se caracteriza por poseer mandíbulas sólidas y bifurcadas además de un bulbo en la región cefálica. Las especies dentro de este género son muy similares, variando apenas en el largo de las setas cefálicas y de la cola, lo que dificulta una identificación más precisa. Las características del aparato copulatorio de los machos pueden ayudar en la identificación. Platt y Warwick (1983) reportan 24 especies para este género, mientras que en la base de datos especializada Nemys existen 45, de las cuales diez son consideradas especies sinónimas (principalmente de especies del género *Epacanthion*) y nueve presentan un estatus taxonómico dudoso. Igual que el género *Trileptium*, algunas especies de *Enoploides* también han sido descritas en ambientes de agua dulce, como es el caso de *E. stewarti* (Nicholas, 1993; Nicholas y Marples, 1995).

En San Felipe (AGC), *Enoploides* fue el género más frecuente y estuvo representado principalmente por juveniles (datos no presentados en las mediciones). También se pudieron identificar dos machos y cuatro hembras (Tabla X). Este género presenta una cutícula fuertemente estriada (principalmente en la parte anterior del cuerpo) característica no descrita en otras especies de *Enoploides*. La región anterior presenta una cavidad bucal con mandíbulas bien desarrolladas y setas cefálicas largas (Figuras 20-22). Todos los organismos encontrados pertenecen a una misma especie no identificada de *Enoploides* sp. Si bien los dos machos (M1 y M2) presentaron algunas variaciones morfológicas (cuantitativas y cualitativas) (Figuras 20 y 21), es difícil relacionar dicha variación con dos posibles morfoespecies debido a los pocos individuos identificados. Estos organismos presentaron una espícula muy larga (común en *Enoploides*) y un gubernaculum con espinas (Figuras 20 y 21).

Tabla X. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para *Enoploides* de la localidad de San Felipe (AGC).

Hembras (4 inds.)				Machos (2 inds.)			
LT	2.47 \pm 0.17	AB	0.03 \pm 0.01	LT	2.33 \pm 0.23	AB	0.04 \pm 0.01
	2.23-2.62		0.03-0.04		2.17-2.49		0.03-0.05
LE	0.70 \pm 0.06	DA	0.05	LE	0.69 \pm 0.06	DA	0.05 \pm 0.01
	0.62-0.74		0.05-0.06		0.64-0.73		0.05-0.06
a	32.52 \pm 1.75	DM	0.08	a	35.27 \pm 2.23	DM	0.07 \pm 0.01
	31.13-34.93		0.07-0.08		33.69-36.85		0.06-0.07
b	3.52 \pm 0.11	DN	0.15 \pm 0.01	b	3.40 \pm 0.03	DN	0.14
	3.43-3.62		0.13-0.16		3.38-3.42		
c	17.38 \pm 1.27	LER	-	c	18.65 \pm 1.38	LER	0.15 \pm 0.02
	15.68-18.71				17.67-19.63		0.14-0.17
DC	0.05 \pm 0.01	LEA	-	DC	0.05 \pm 0.01	LEA	0.17 \pm 0.01
	0.05-0.06				0.05-0.06		0.16-0.18
LSFp	0.07	LG	-	LSFp	0.07	LG	-
	0.06-0.07				0.07-0.07		
LSFa	0.02	V %	65.41 \pm 1.12	LSFa	0.02	V %	-
	0.02-0.02		63.79-66.39				
LB	0.04	LC	0.14	LB	0.03	LC	0.13
	0.03-0.04		0.14-0.15				0.12-0.13

(-) Datos que no se aplican para este organismo

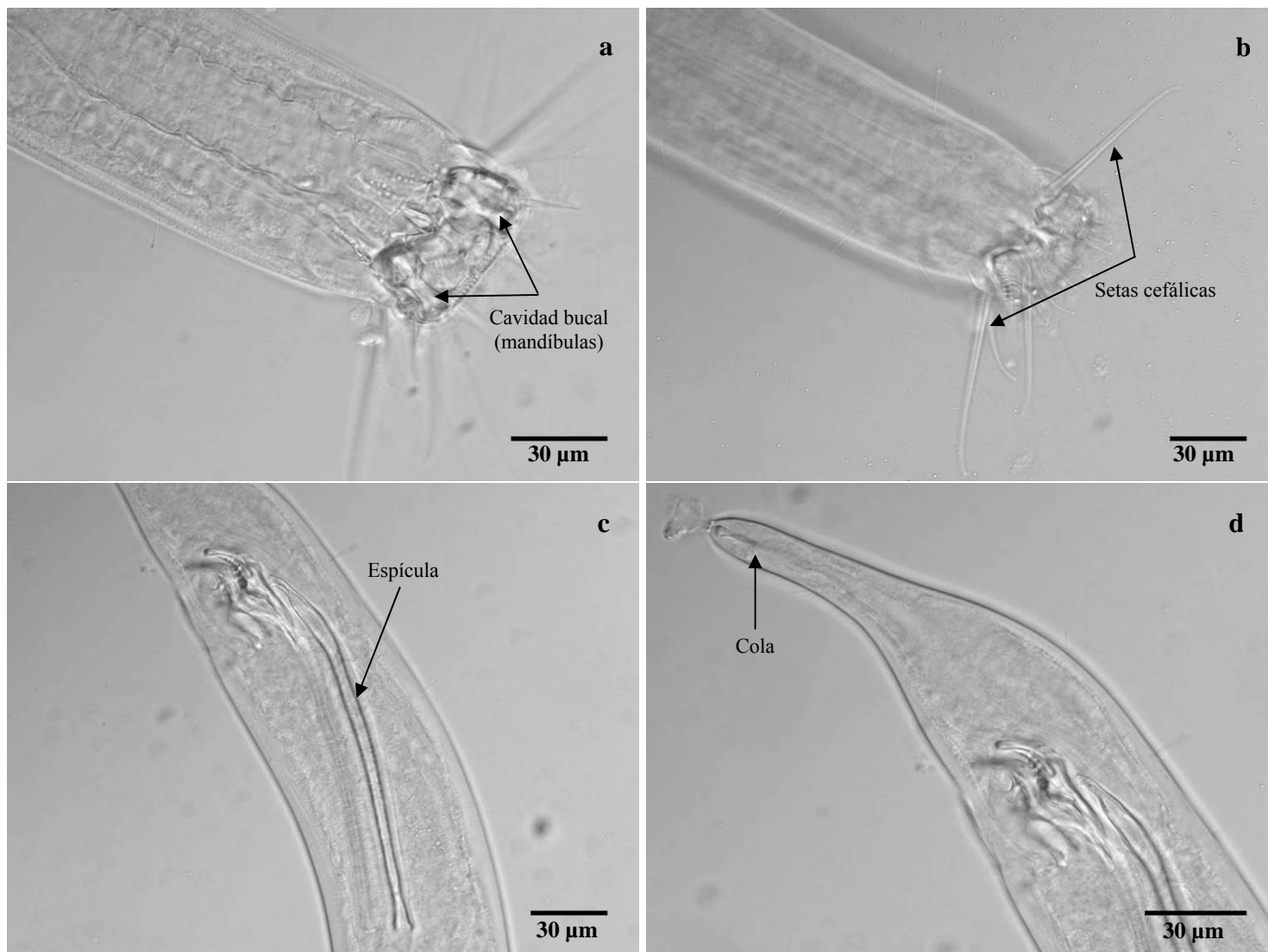


Figura 20. *Enoploides*, macho M1 (San Felipe).

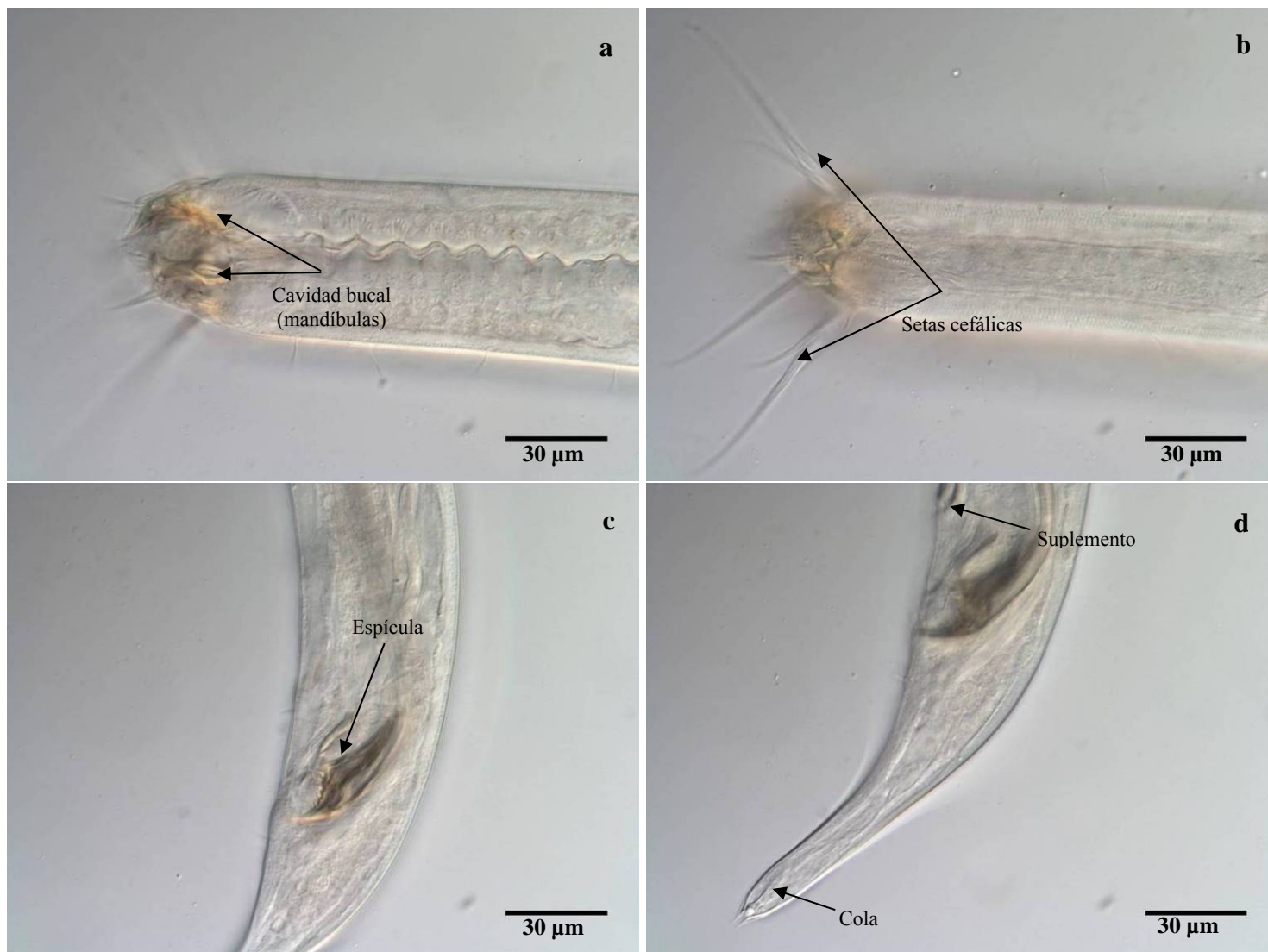


Figura 21. *Enoploides*, macho M2 (San Felipe).

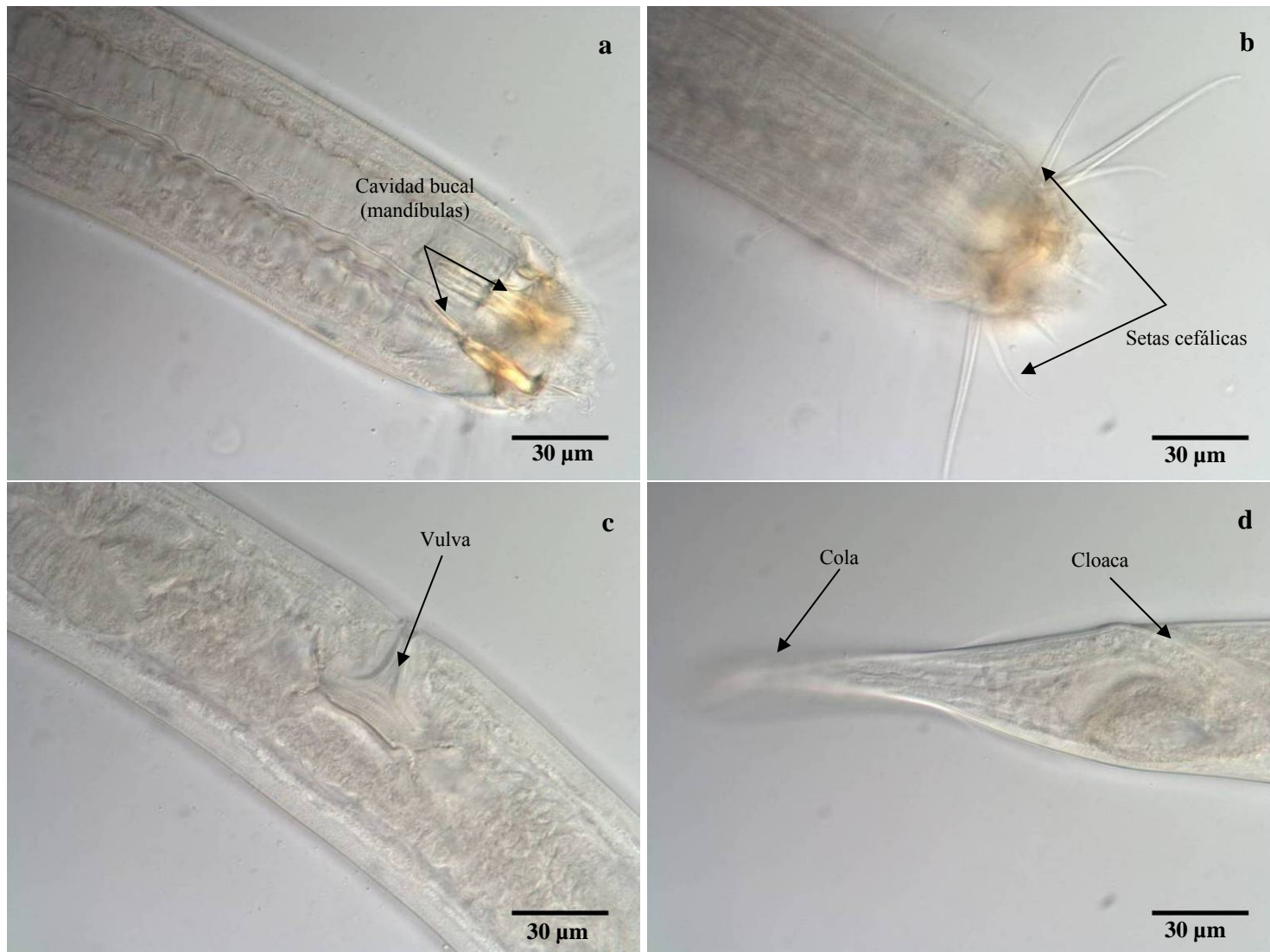


Figura 22. *Enoploides*, hembra (San Felipe).

V.1.1.3 *Epacanthion* Wieser, 1914

Epacanthion es considerado un género heterogéneo, 18 especies en Nemys y 19 según Platt y Warwick (1983), presentando características intermedias entre otros dos géneros: *Enoploides* y *Enoplolaimus*, ambos de la familia Thoracostomopsidae. Sin embargo, *Epacanthion* puede ser diferenciado por presentar mandíbulas más sólidas y un arreglo distinto de las setas cefálicas. En machos, el aparato copulatorio también puede ayudar en la identificación. *Epacanthion* identificado en la localidad de San Carlos (Playa del Pacífico) fue representado por un organismo juvenil. Desafortunadamente, se identificó un único individuo de este género. Sus características morfológicas realmente presentan similitudes con *Enoploides* identificado en San Felipe como es el caso de las mandíbulas bien definidas en la cavidad bucal y las setas cefálicas largas (Tabla XI). Sin embargo, *Epacanthion* no presenta un bulbo en la región anterior del cuerpo y tampoco el mismo patrón de ornamentación en la cutícula. Además, la forma de la cola también difiere entre estos dos géneros (Figura 23).

Tabla XI. Parámetros morfológicos de *Epacanthion* de la localidad de San Carlos (Pacífico).

Juvenil (1 ind.)			
LT	2.50	AB	0.03
LE	0.60	DA	0.07
A	22.30	DM	0.11
B	4.17	DN	?
C	11.84	LER	-
DC	0.04	LEA	-
LSFp	0.04	LG	-
LSFa	0.01	V %	-
LB	0.02	LC	0.21

Datos no medibles (?), datos que no se aplican para este organismo (-)

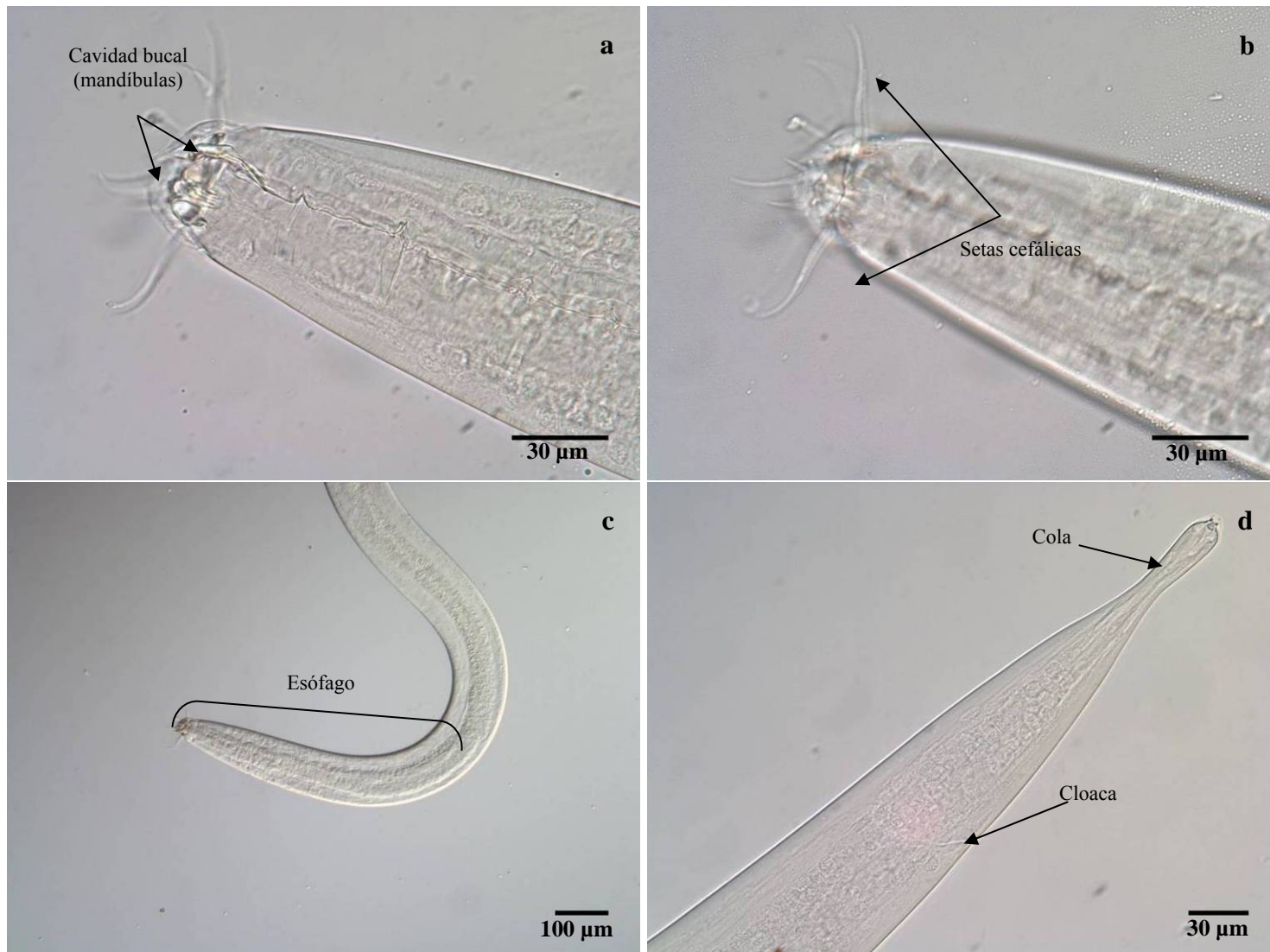


Figura 23. *Epacanthion*, juvenil (San Carlos).

V.1.1.4 *Mesacanthion* Filipjev, 1927

El género *Mesacanthion* fue el más predominante en la localidad de Santa Clara (AGC). Se encontraron principalmente por organismos machos y juveniles, aunque en menor número, se pudieron identificar algunas hembras (Tabla XII). Su estructura mandibular es muy similar a aquella presentada por *Enoplolaimus*, pero sus setas cefálicas son menores así como la espícula presentada por los machos. Platt y Warwick (1983) reportan 37 especies para este género. Por otro lado, en la base de datos Nemys existen 48 especies descritas para el género *Mesacanthion* (dos especies en estatus dudoso y otras cuatro consideradas sinónimas).

Mesacanthion se caracterizó por poseer una cavidad bucal con tres mandíbulas bien definidas, un esófago bien desarrollado y una cutícula lisa. Los machos de este género presentaron muchas setas somáticas, principalmente en la parte anterior del cuerpo. La espícula no presenta gubernaculum y también es relativamente menor que aquella presentada por *Trileptium* y *Enoplolaimus* (Figura 24). Algunas variaciones morfológicas como la definición de las mandíbulas nos llevaron a creer en la existencia de dos posibles morfoespecies dentro de ese género en la localidad de Santa Clara.

También se registró la ocurrencia de un *Mesacanthion* juvenil en la localidad de San Carlos, en el Pacífico Mexicano. Dicho espécimen es muy parecido a *Mesacanthion* encontrado en Santa Clara, con mandíbulas y setas cefálicas muy similares además de la forma del cuerpo (Figura. 24). Sin embargo, todos los valores de los parámetros morfológicos medidos fueron mayores para *Mesacanthion* de Santa Clara (Tabla XII).

Tabla XII. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) de *Mesacanthion* de las localidades de Santa Clara (SC) y San Carlos (SCA).

	SC		SCA
	M (4 inds.)	H (4 inds.)	J
LT	3.44 \pm 0.18 3.33-3.71	3.57 \pm 0.26 3.39-3.75	1.37
LE	0.93 \pm 0.06 0.88-1.01	0.99 \pm 0.03 0.97-1.00	0.4
a	46.03 \pm 1.09 44.93-47.53	36.99 \pm 0.31 36.77-37.21	44.13
b	3.71 \pm 0.09 3.60-3.80	3.62 \pm 0.16 3.51-3.74	3.46
c	13.07 \pm 0.71 12.21-13.88	14.43 \pm 1.98 13.02-15.83	7.56
DC	0.04 0.04-0.05	0.05	0.02
LSFp	0.04 0.03-0.04	0.03 0.03-0.04	0.02
LSFa	0.02	0.02	?
LB	0.03	0.04	0.02
AB	0.03 \pm 0.01 0.02-0.04	0.04	0.02
DA	0.05 \pm 0.01 0.04-0.06	0.05 \pm 0.01 0.05-0.06	0.28
DM	0.07 0.07-0.08	0.10 \pm 0.01 0.09-0.10	0.03
DN	0.14	0.15	0.12
LER	0.04 0.04-0.05	-	-
LEA	0.05 \pm 0.01 0.04-0.06	-	-
LG	-	-	-
V %	-	58.59 \pm 0.83 58.00-59.18	-
LC	0.26 \pm 0.01 0.26-0.27	0.25 \pm 0.02 0.24-0.26	0.181

Datos no medibles (?), datos que no se aplican para este organismo (-)

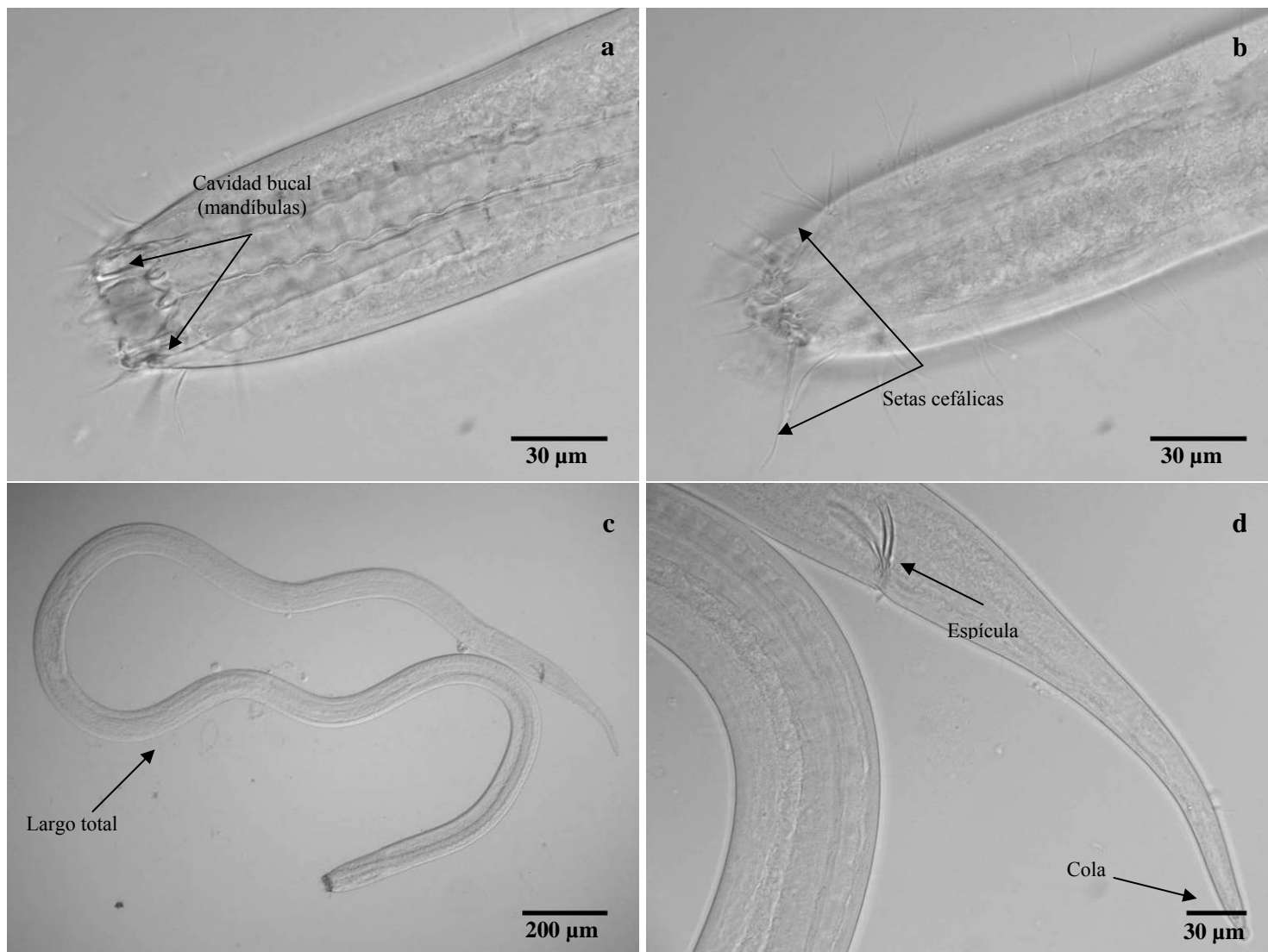


Figura 24. *Mesacanthion*, macho (Santa Clara).

V.1.1.5 *Mesacanthoides* Wieser, 1953

En la localidad de Santa Clara, se identificaron dos organismos del género *Mesacanthoides*, un juvenil y un macho (Tabla XIII). En la base de datos están registradas ocho especies, una con estatus taxonómico dudoso. Este género es muy similar a *Mesacanthion*, con mandíbulas bien definidas y muchas setas somáticas, principalmente en la parte anterior del cuerpo. Sin embargo, esta morfoespecie presenta una cola más delgada y larga comparada a *Mesacanthion*. Además, el macho posee un aparato copulatorio estructuralmente más complejo, las espículas del macho son distintas con un gubernaculum posiblemente fusionado (Figura 25).

Tabla XIII. Parámetros morfológicos para *Mesacanthoides* de la localidad de San Clara (AGC).

Juvenil (1 ind.)				Macho (1 ind.)			
LT	1.87	AB	0.02	LT	1.95	AB	0.02
LE	0.33	DA	0.04	LE	0.32	DA	0.04
a	33.95	DM	0.06	a	34.28	DM	0.06
b	5.66	DN	?	b	6.09	DN	?
c	7.65	LER	-	c	9.92	LER	-
DC	0.04	LEA	-	DC	0.03	LEA	0.04
LSFp	0.04	LG	-	LSFp	0.04	LG	-
LSFa	0.01	V %	-	LSFa	0.01	V %	-
LB	0.02	LC	0.24	LB	0.02	LC	0.20

(?) Datos no medibles, (-) datos que no se aplican para este organismo

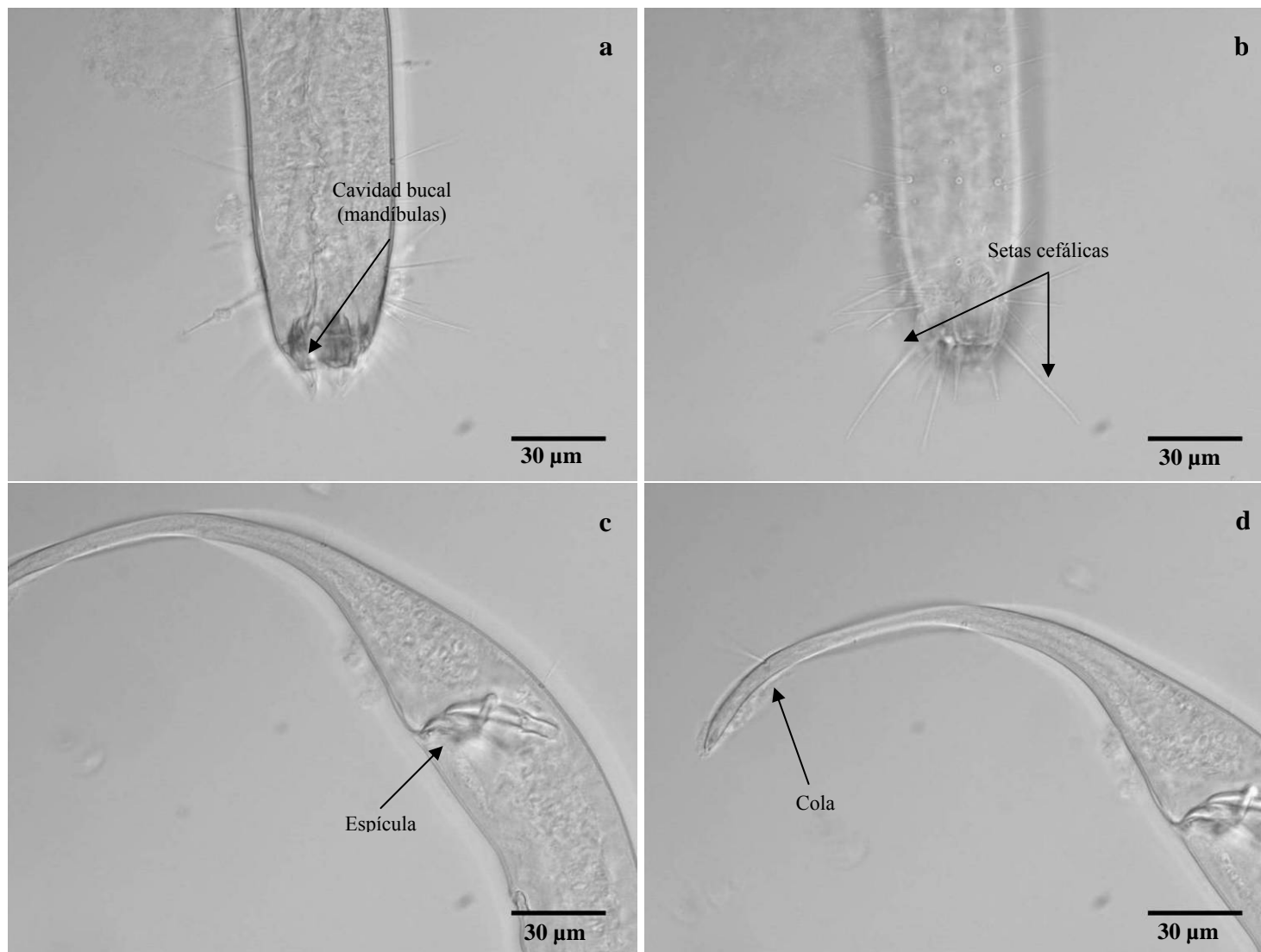


Figura 25. *Mesacanthoides*, macho (Santa Clara).

V.1.1.6 *Oxyonchus* Filipjev, 1927

Oxyonchus fue encontrado en la localidad de Santa Clara (AGC) y estuvo representado por dos especímenes machos (Tabla. XIV). Los individuos de este género presenta una cavidad bucal grande con un diente sub-ventral muy prominente. Sus setas cefálicas también son largas y la cutícula presenta una leve estriación. La espícula en estos dos individuos es relativamente grande con un gubernaculum bien desarrollado (Figura 26). En la base de datos Nemys se reportan 19 especies para este género.

Según Nicholas (2004), el género *Oxyonchus* es muy común en playas arenosas y zonas submareales someras con fondos arenosos. Dicho género es muy similar a *Enoplolaimus*. De hecho, se transfirieron algunas especies del género *Enoplolaimus* al género *Oxyonchus* cuando este fue descubierto y descrito. La principal diferencia del género con respecto a los demás representantes de la familia Thoracostomopsidae está en el número, forma y arreglo de los dientes en la cavidad bucal.

Tabla XIV. Parámetros morfológicos para la morfoespecie *Oxyonchus* de la localidad de Santa Clara (AGC).

Machos (2 inds.)			
LT	2.56±0.50 2.21-2.91	AB	0.03
LE	0.75±0.03 0.72-0.77	DA	0.07
A	31.92±5.08 28.33-35.51	DM	0.08
B	3.43±0.51 3.07-3.79	DN	0.14 0.13-0.14
C	9.66±1.16 8.84-10.47	LER	0.07
DC	0.04	LEA	0.09±0.01 0.08-0.09
LSFp	0.07	LG	0.05
LSFa	0.02	V %	-
LB	0.03	LC	0.26±0.02 0.25-0.28

(-) Datos que no se aplican para este organismo

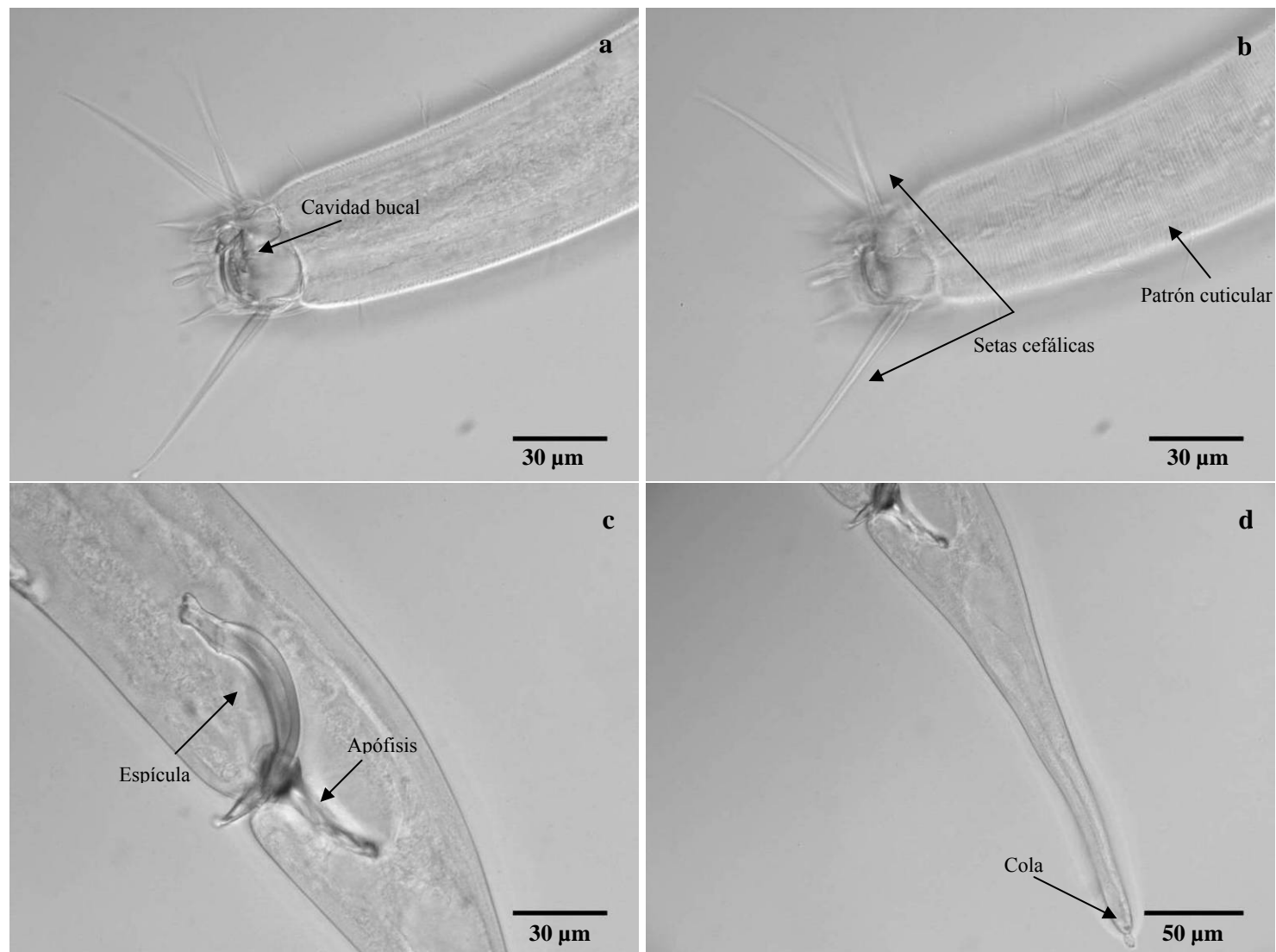


Figura 26. *Oxyonchus*, macho (Santa Clara).

V.1.1.7 Thoracostomopsidae *n.i.*

También se registró la ocurrencia de dos individuos juveniles de la familia Thoracostomopsidae, los cuales no se pudieron determinar a un nivel taxonómico inferior. De acuerdo a sus características morfológicas, estos dos organismos son representantes de la subfamilia Enoplolaiminae, al igual que gran parte de los otros géneros ya mencionados. Estos dos individuos fueron los nemátodos más grandes registrados en este estudio, con un largo total del cuerpo de aproximadamente 6 mm (Tabla XV). Además, presentan dos dientes bien desarrollados y denticulos, características comunes en los representantes del orden Enoplida. Por otro lado, su cutícula es ligeramente estriada, patrón poco común dentro del orden, como ya se había registrado para *T. sp1* de la localidad de Santa Clara y *Enoploides* en San Felipe (Figura 27).

Tabla XV. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para el género no identificado de la familia Thoracostomopsidae de la localidad de Santa Clara (AGC).

Juvenil (2 inds.)			
LT	6.06 \pm 0.42 5.76-6.36	AB	0.04
LE	1.06 \pm 0.03 1.04-1.08	DA	0.07 0.07-0.08
a	69.74 \pm 11.05 61.92-77.55	DM	0.09 \pm 0.01 0.08-0.09
b	5.72 \pm 0.24 5.54-5.89	DN	?
c	41.55 \pm 6.88 36.68-46.42	LER	-
DC	0.06 0.05-0.06	LEA	-
LSFp	0.04	LG	-
LSFa	?	V %	-
LB	0.04 0.04-0.05	LC	0.15 \pm 0.01 0.14-0.16

(?) Datos no medibles, (-) datos que no se aplican para este organismo

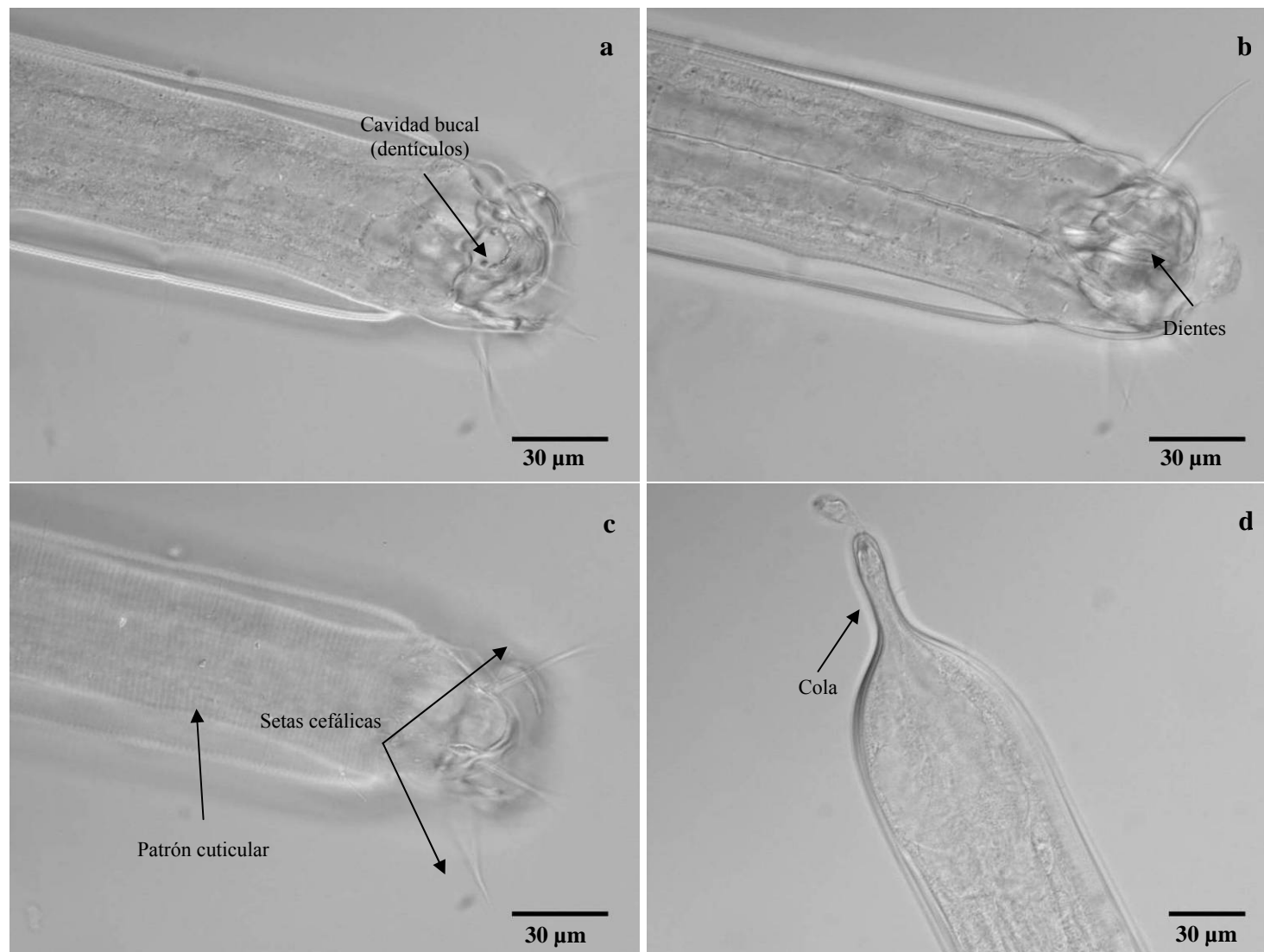


Figura 27. *Thoracostomopsidae n.i.*, juvenil (Santa Clara).

V.1.2 Familia Oncholaimidae

Oncholaimidae fue la segunda familia más importante en este estudio, siendo representada por tres géneros: *Oncholaimus* (en la localidad de La Paz, Golfo de California), *Metoncholaimus* (en Playa del Faro, Pacífico) y *Viscosia* (en San Carlos, también en el Pacífico). Contrariamente a la familia Thoracostomopsidae en la cual casi todos los géneros presentan mandíbulas bien desarrolladas, los representantes de la familia Oncholaimidae no presentan mandíbulas sino dientes dorsales y ventrales bien desarrollados.

Además, en esta familia también se puede observar un anfideo (órgano sensorial) en la región anterior. *Oncholaimus* fue el más representativo con nueve individuos seguido por *Metoncholaimus* y *Viscosia*, ambos con ocho individuos.

V.1.2.1 *Oncholaimus* Dujardin, 1845

Como características generales, *Oncholaimus* presenta un gran diente ventro-lateral y una espícula pequeña sin gubernaculum que le permite ser distinguido de otros oncholaimidos. Además, la presencia de papilas y setas en la región cloacal son considerados caracteres útiles para su identificación. *Oncholaimus* es un género importante dentro de la familia Oncholaimidae con 75 especies descritas (Platt y Warwick, 1983). En la base de datos Nemys, el género presenta más de 100 especies descritas, sin embargo existe una cantidad considerable de sinónimas.

Oncholaimus registrado en La Paz (GC) presenta una cavidad bucal relativamente grande, con un diente dorsal bien desarrollado así como dos dientes ventro-laterales. La cutícula es lisa. También se pudo observar un pequeño anfideo (largo: 13 μm , ancho: 7 μm) en forma de copa en la región cefálica (región anterior) del organismo (Figuras 29 y 30). Los representantes de este género son relativamente grandes, principalmente los machos. En la localidad de La Paz, *Oncholaimus* estuvo representado por seis machos y tres hembras, exhibiendo dimorfismo sexual morfométrico (Tabla XVI).

Tabla XVI. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para *Oncholaimus* de la localidad de La Paz (GC).

Hembras (3 inds.)				Machos (6 inds.)			
LT	3.12 \pm 0.12 2.98-3.22	AB	0.02 0.02-0.03	LT	2.52 \pm 0.59 1.65-3.43	AB	0.02 0.02-0.03
LE	0.47 \pm 0.01 0.45-0.48	DA	0.06 \pm 0.01 0.06-0.07	LE	0.46 \pm 0.07 0.41-0.58	DA	0.04 \pm 0.01 0.03-0.05
A	37.68 \pm 2.68 35.91-40.76	DM	0.08 0.08-0.09	a	38.44 \pm 7.67 28.02-46.96	DM	0.07 \pm 0.01 0.06-0.07
B	6.68 \pm 0.40 6.32-7.11	DN	0.19 \pm 0.01 0.19-0.20	b	5.58 \pm 1.49 3.91-7.32	DN	0.18 \pm 0.01 0.17-0.20
C	13.19 \pm 1.09 12.38-14.43	LER	-	c	32.51 \pm 6.65 22.64-40.33	LER	0.07 0.06-0.07
DC	0.05 0.04-0.05	LEA	-	DC	0.04 0.04-0.05	LEA	0.07 \pm 0.01 0.06-0.07
LSFp	0.01	LG	-	LSFp	0.01	LG	-
LSFa	-	V %	66.97 \pm 0.74 66.21-67.69	LSFa	-	V %	-
LB	0.04	LC	0.24 \pm 0.02 0.22-0.25	LB	0.03	LC	0.08 0.07-0.09

(-) Datos que no se aplican para este organismo.

Estas diferencias pueden ser mejor visualizadas en un MDS tomando en cuenta solamente los caracteres no sexuales, en el cual se observa una clara segregación entre los sexos (Figura 28). Si bien los organismos analizados fueron pocos y cada sexo presenta variabilidad morfométrica, principalmente los machos, el análisis de similitud (ANOSIM) realizado a posteriori confirmó la significancia de las diferencias entre los grupos formados ($R=0.586$, $p=0.024$). De acuerdo al análisis de porcentajes similares (SIMPER), los parámetros *a* (LT/DM) y *c* (LT/LC) fueron los que más contribuyeron (91%) para la diferenciación entre machos y hembras, presentando valores mayores para los machos.

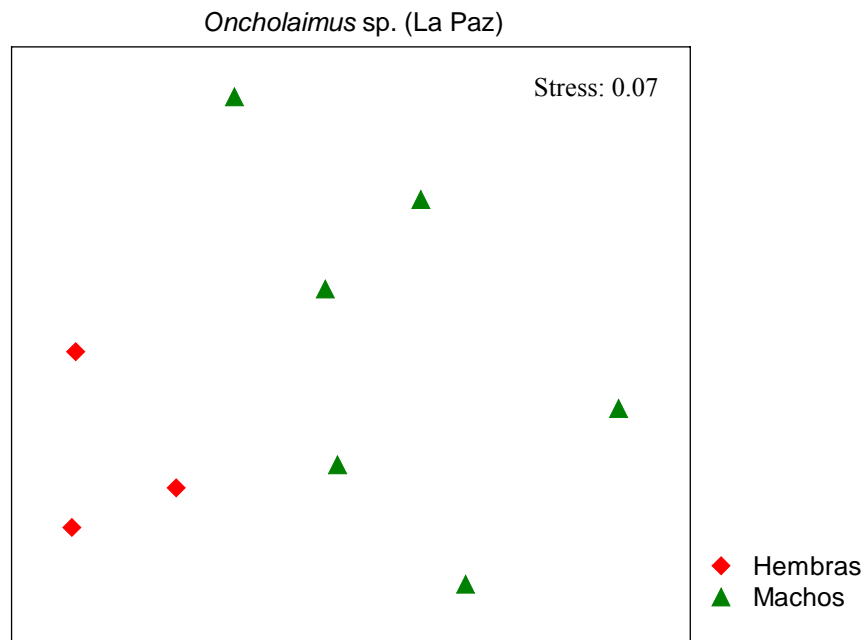


Figura 28. MDS evidenciando la separación de machos (símbolos verdes) y hembras (símbolos rojos) dentro del género *Oncholaimus* en la localidad de La Paz.

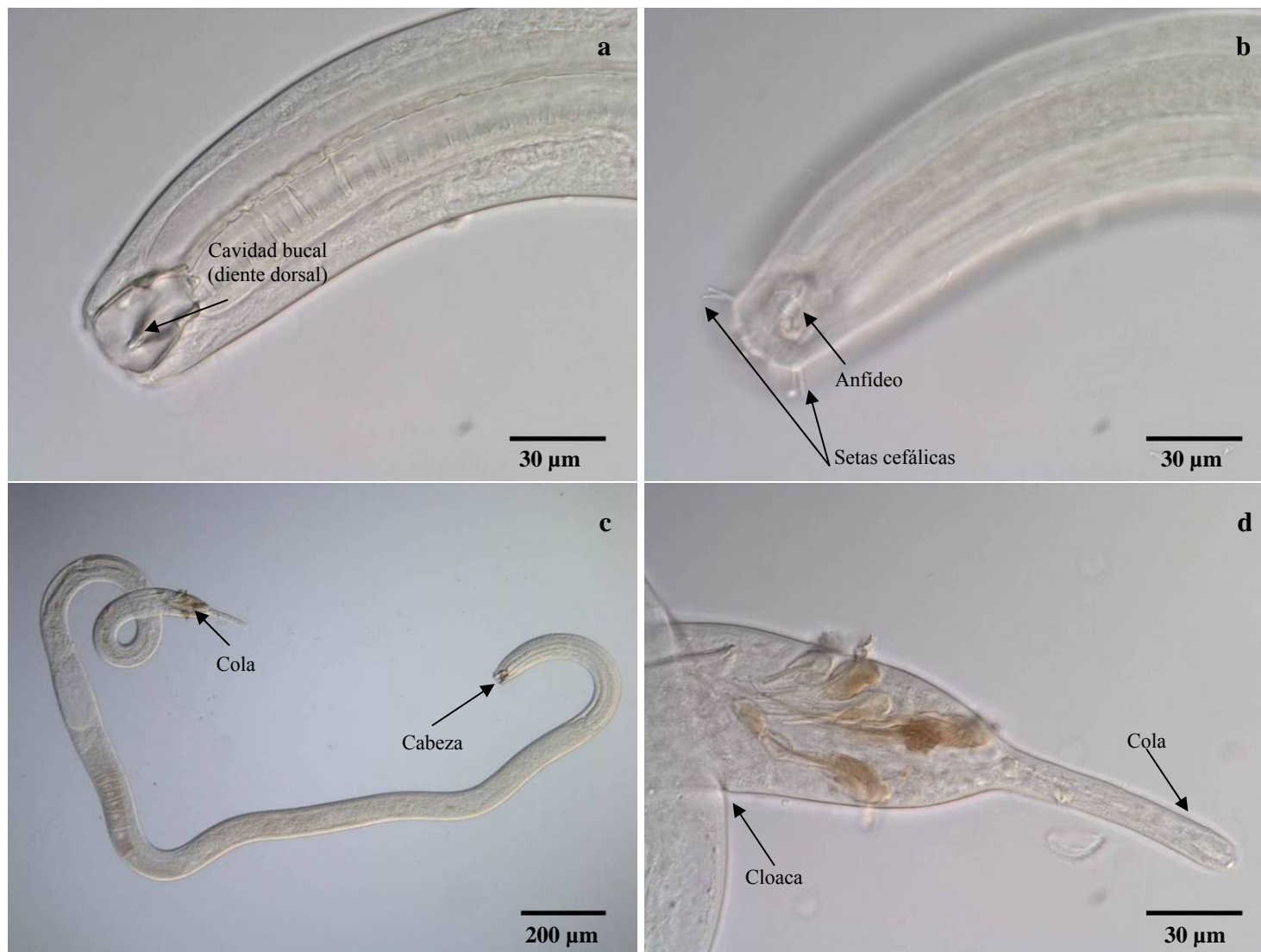


Figura 29. *Oncholaimus*, hembra (La Paz).

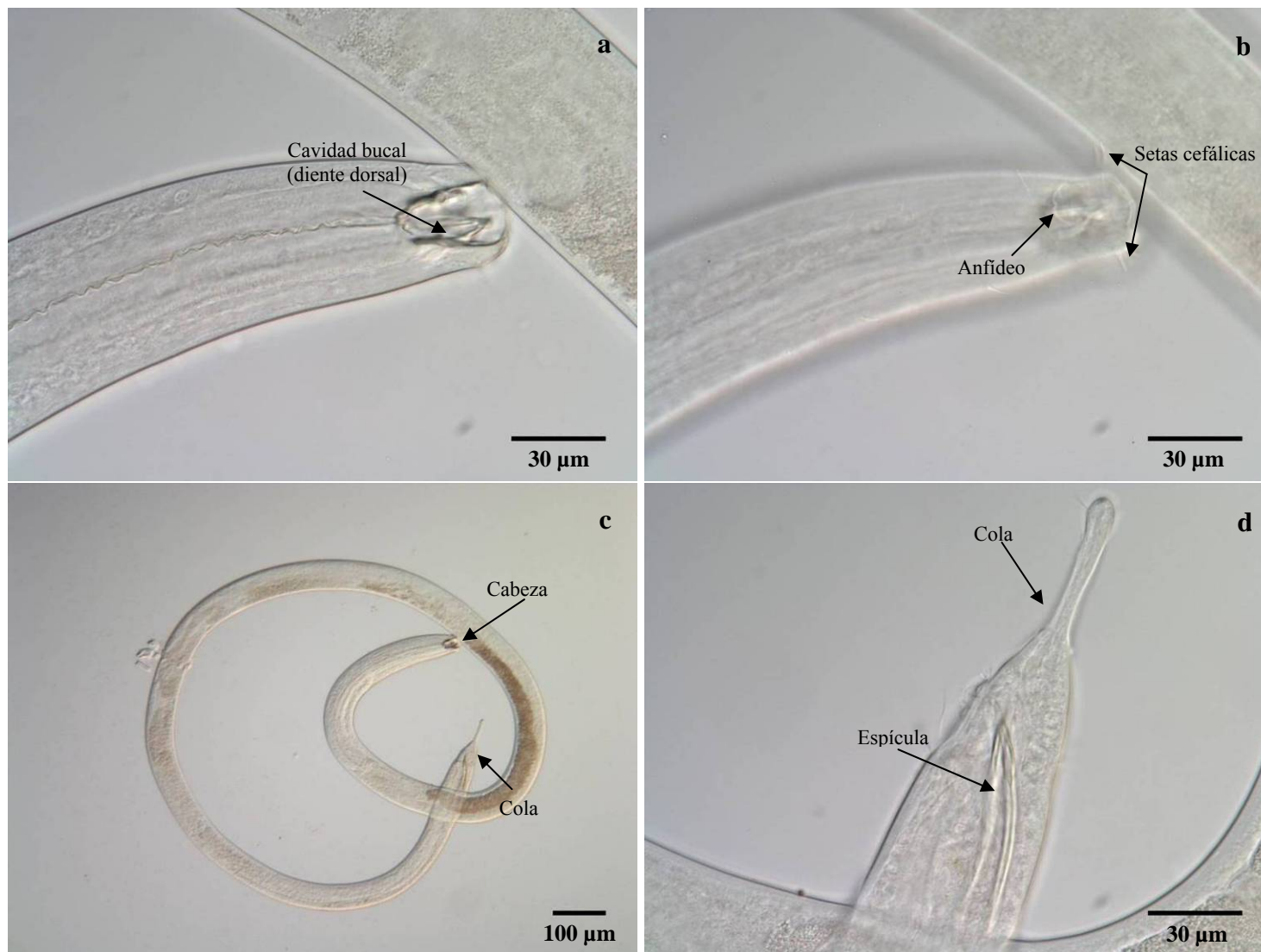


Figura 30. *Oncholaimus*, macho (La Paz).

V.1.2.2 *Metoncholaimus* Filipjev, 1918

El género *Metoncholaimus* es muy similar a *Oncholaimus* excepto en la forma de la espícula presentada por los machos, generalmente alargada y delgada. Por otro lado, algunas especies de *Metoncholaimus* pueden presentar espículas cortas pero presentan un gubernaculum, a diferencia de *Oncholaimus* que no lo posee. De acuerdo a Platt y Warwick (1983), existen 15 especies válidas, mientras que en el Nemys están reportadas 21 especies.

En Playa del Faro (Pacífico Mexicano), *Metoncholaimus* estuvo representado por organismos machos (n = 2), hembras (n = 2) y juveniles (n = 4). Este género presenta grandes similitudes con el género *Oncholaimus* encontrado en la localidad de La Paz, cavidad bucal larga, dientes bien desarrollados además del anfideo en forma de copa en la parte anterior. La diferencia entre estos dos géneros se da principalmente por el largo de la espícula de los machos, que generalmente es mayor en *Metoncholaimus*. Por otro lado, la descripción de *Metoncholaimus* incluye la presencia de un gubernaculum (generalmente) no observado en nuestros organismos (Tabla XVII). Este último género también presentó una cutícula levemente estriada, a diferencia de *Oncholaimus* cuyo patrón es totalmente liso (Figuras 31 y 32).

Tabla XVII. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para el género *Metoncholaimus* de la localidad Playa del Faro (Pacífico).

Hembras (2 inds.)				Machos (2 inds.)			
LT	3.49 \pm 0.25 3.31-3.66	AB	0.04	LT	3.78 \pm 0.06 3.74-3.82	AB	0.05
LE	0.68 \pm 0.09 0.62-0.75	DA	0.03 0.03-0.04	LE	0.98 \pm 0.02 0.97-1.00	DA	0.06
A	58.25 \pm 6.87 53.39-63.10	DM	0.06	a	45.29 \pm 1.18 44.45-46.12	DM	0.08 0.08-0.09
B	5.19 \pm 1.07 4.44-5.95	DN	0.20 \pm 0.01 0.20-0.21	b	3.84 \pm 0.01 3.83-3.85	DN	0.22
C	90.65 \pm 18.08 77.87-103.44	LER	0.11 \pm 0.01 0.10-0.12	c	47.66 \pm 3.04 45.51-49.81	LER	101.00
DC	0.05 \pm 0.01 0.04-0.06	LEA	0.12 \pm 0.01 0.11-0.12	DC	0.07 0.06-0.07	LEA	101.00
LSFp	0.02 0.02-0.03	LG	-	LSFp	0.03	LG	101.00
LSFa	-	V %	-	LSFa	-	V %	78.64 \pm 1.06 77.89-79.39
LB	0.06 0.06-0.07	LC	0.04 \pm 0.01 0.03-0.05	LB	0.08	LC	0.08 \pm 0.01 0.08-0.09

(-) Datos que no se aplican para este organismo.

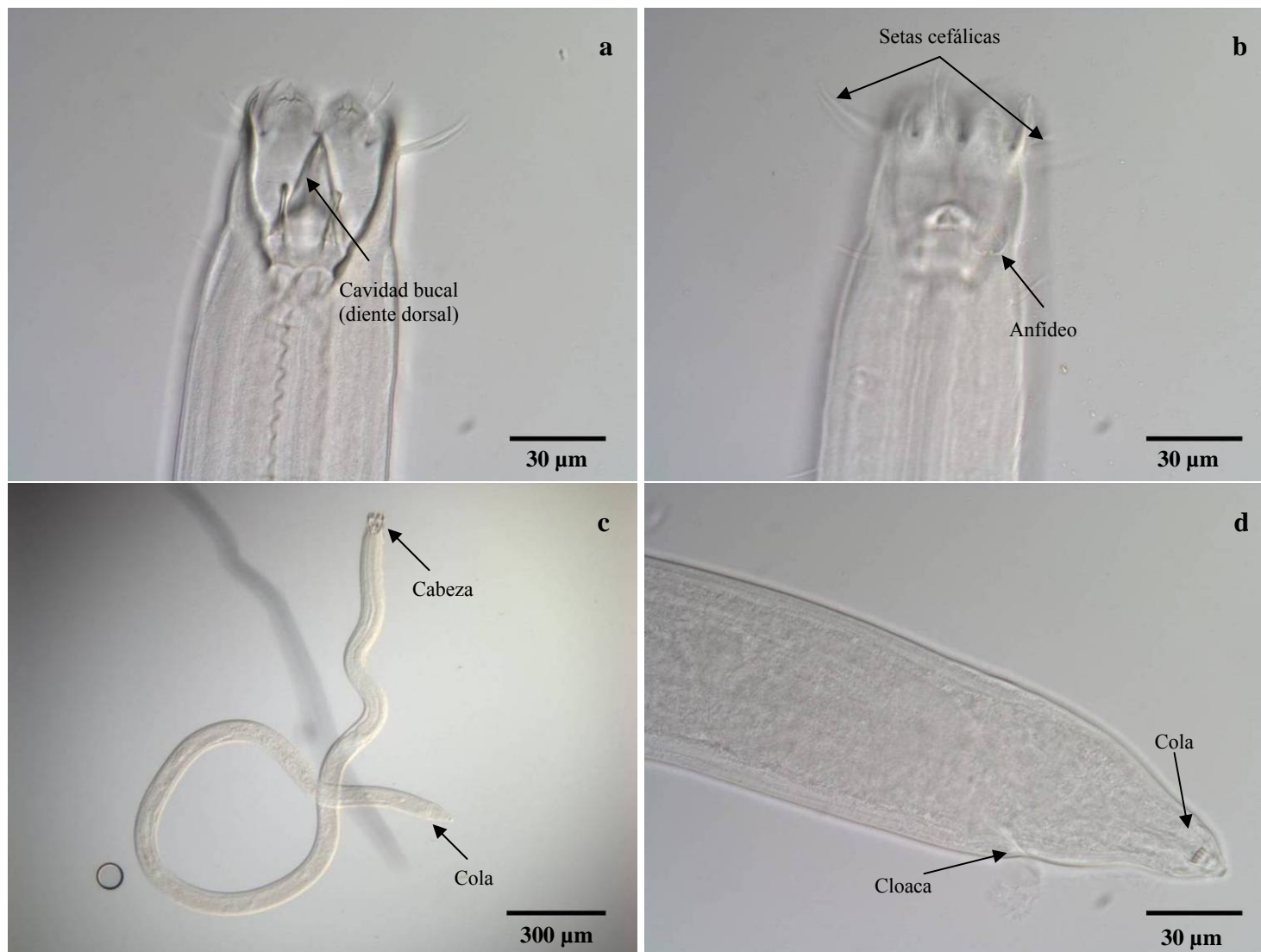


Figura 31. *Metoncholaimus*, hembra (Playa del Faro).

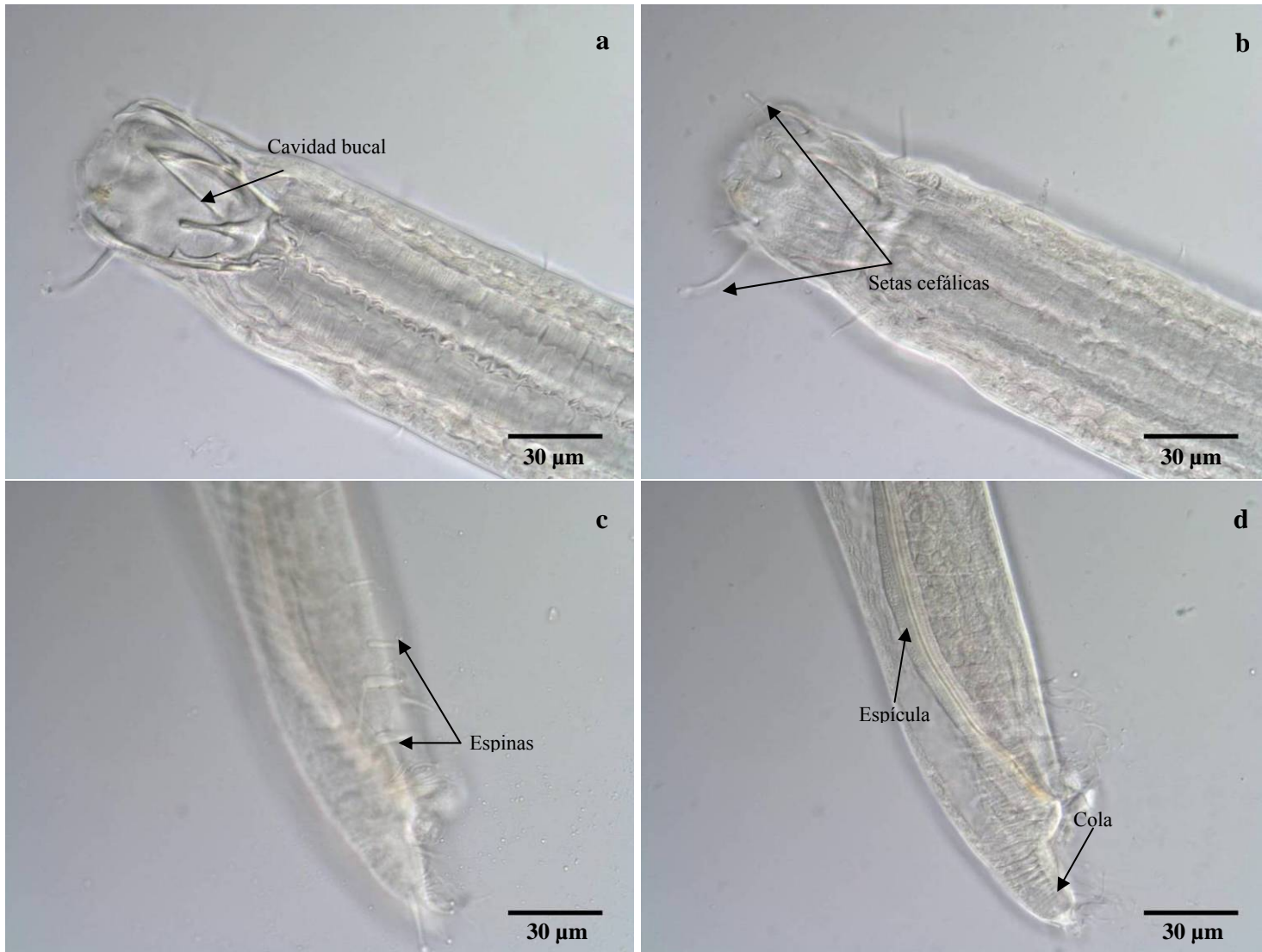


Figura 32. *Metoncholaimus*, macho (Playa del Faro).

V.1.2.3 *Viscosia* De Man, 1980

Viscosia es considerado otro importante género dentro de la familia Oncholaimidae con 60 especies descritas (Platt y Warwick, 1983). Nemys reporta la existencia de 110 especies para este género.

El género *Viscosia* registrado en playa San Carlos (Pacífico) presentó algunas similitudes con respecto a *Oncholaimus* y *Metoncholaimus*, el anfileo en forma de copa y pequeñas setas cefálicas. Por otro lado, *Viscosia* se caracterizó por organismos muy pequeños, los menores entre los géneros identificados en el presente estudio (Tabla XVIII). Dicho género estuvo representado principalmente por machos, los cuales presentan espículas pequeñas en forma de L, además de una cola pequeña y cóncava (Figura 33).

Tabla XVIII. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para el género *Viscosia* de la localidad San Carlos (Pacífico).

Machos (3 inds.)				Hembras (2 inds.)			
LT	1.56 \pm 0.06 1.53-1.63	AB	0.01	LT	1.55 \pm 0.11 1.47-1.63	AB	0.01
LE	0.26 \pm 0.01 0.24-0.26	DA	0.02	LE	0.29 \pm 0.01 0.29-0.30	DA	0.03
a	51.32 \pm 5.84 44.85-56.21	DM	0.03	a	41.36 \pm 0.58 40.94-41.77	DM	0.04
b	6.14 \pm 0.30 5.82-6.42	DN	?	b	5.28 \pm 0.23 5.12-5.45	DN	?
c	19.43 \pm 1.29 18.05-20.61	LER	0.02 0.02-0.03	c	17.73 \pm 1.11 16.94-18.51	LER	-
DC	0.02 0.02-0.03	LEA	0.03	DC	0.03 0.02-0.03	LEA	-
LSFp	0.01	LG	-	LSFp	0.01	LG	-
LSFa	-	V %	-	LSFa	-	V %	54.34 \pm 1.15 53.53-55.16
LB	0.02	LC	0.08 \pm 0.01 0.07-0.09	LB	0.02	LC	0.09

(?) Datos no medibles, (-) datos que no se aplican para este organismo.

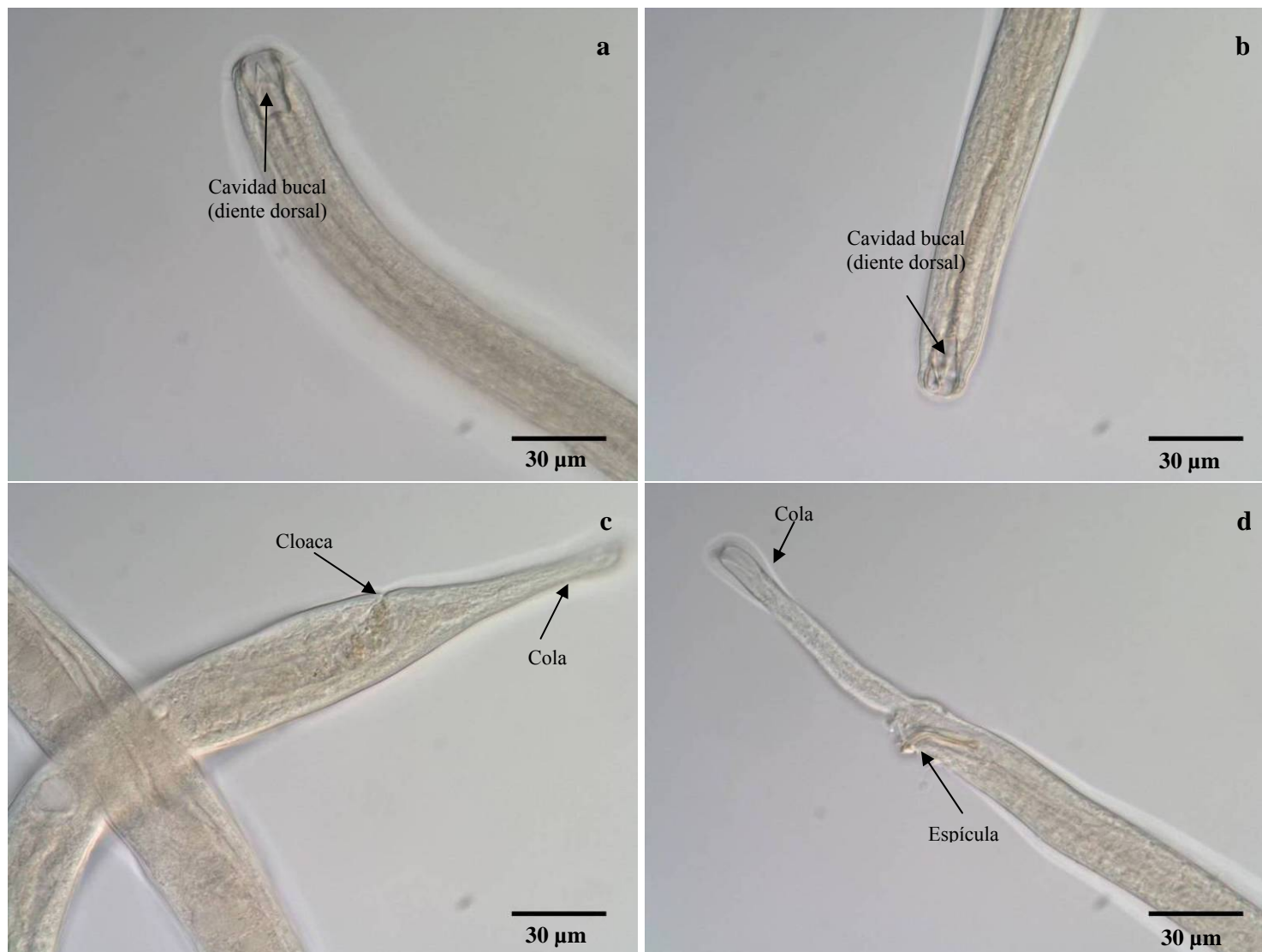


Figura 33. *Viscosia*, (izquierda) hembra y (derecha) macho (San Carlos).

V.1.3 Familia Enchilidiidae

Enchilidiidae estuvo representada únicamente por dos géneros distintos, *Pareurystomina* (2 inds.), registrado en Santa Clara (AGC), y otro no identificado (n.i.), encontrado en La Paz.

V.1.3.1 *Pareurystomina* Micoletzky, 1930

El género *Pareurystomina* ocurrió en la localidad de Santa Clara (AGC) y estuvo representado únicamente por dos individuos, un macho y un juvenil (Tabla XIX). Su cavidad bucal presenta un diente dorsal bien desarrollado y pequeños dentículos. Puede diferenciarse de los demás por poseer una cola muy fina puntiaguda (Figura 34). Para ese género, tanto Platt y Warwick (1983) como la base de datos Nemys reportan 14 especies.

Tabla XIX. Parámetros morfológicos para el género *Pareurystomina* de la localidad Santa Clara (AGC).

<i>Pareurystomina</i>		
	M	J
LT	3.946	2.578
LE	1.001	0.813
a	56.371	36.829
b	3.942	3.171
c	42.430	31.827
DC	0.040	0.038
LSFp	0.018	0.016
LSFa	-	-
LB	0.032	0.025
AB	0.019	0.024
DA	0.049	0.054
DM	0.070	0.070
DN	0.208	0.195
LER	0.060	-
LEA	0.077	-
LG	0.014	-
V %	-	-
LC	0.093	0.081

(?) Datos no medibles, (-) datos que no se aplican para este organismo.

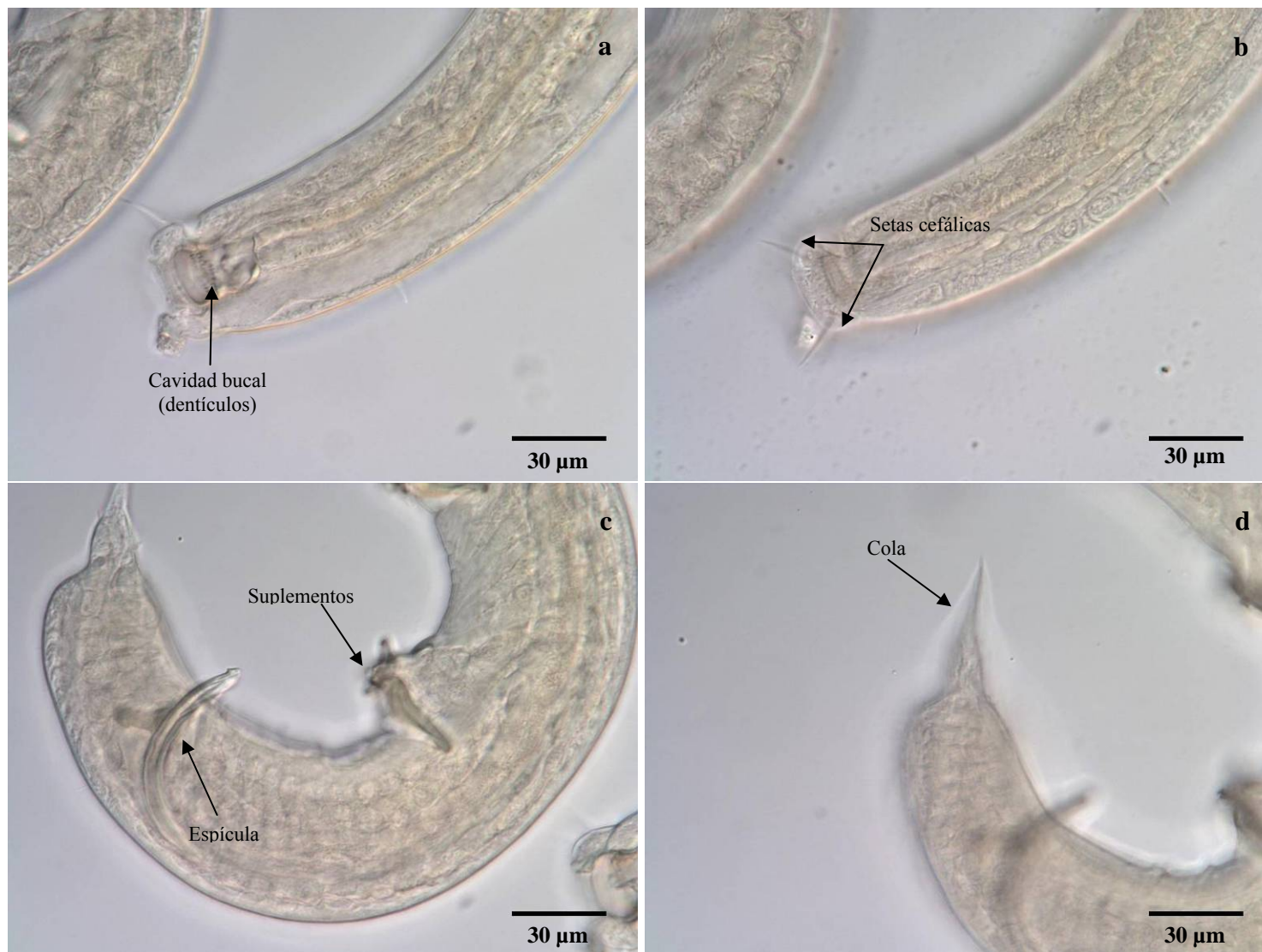


Figura 34. *Pareurystomina*, macho (Santa Clara).

V.1.3.2 Enchilidiidae *n.i.*

En la localidad de La Paz, también se registró un individuo de la familia Enchilidiidae, una hembra, la cual no se pudo identificar a nivel genérico. Dicho organismo presenta una cavidad bucal muy larga (profunda) similar a los géneros *Calyptronema* y *Symplocostoma*, otros dos representantes de esta familia (Figura 35). Posterior a la cavidad bucal, esta morfoespecie presenta un esófago bien desarrollado; la cola es delgada y larga (Tabla XX).

V.1.4 Familia Ironidae

Así como la familia Enchilidiidae, Ironidae estuvo representada únicamente por dos géneros: *Thalassironus* encontrado en Santa Clara (AGC) y *Trissonchulus* identificado en la localidad de Bahía de Los Ángeles (Figuras 36 y 37).

V.1.4.1 *Thalassironus* De Man, 1888

Thalassironus presenta un diente dorsal doble y puede ser diferenciado de *Trissonchulus* por las setas cefálicas en la región anterior. Existen cuatro especies descritas en la literatura para este género (Platt y Warwick, 1983) mientras que Nemys reporta ocho especies válidas. En la localidad de Santa Clara se identificó un organismo macho de ese género (Tabla XX). *Thalassironus* presenta dos grupos de setas cefálicas (anteriores y posteriores), un esófago bien desarrollado y una espícula corta (Figura 36).

V.1.4.2 *Trissonchulus* Cobb, 1920

Trissonchulus es caracterizado por cuatro dientes en la cavidad bucal. También presentan diez papilas cefálicas en la región anterior así como una cola relativamente corta y redondeada. La literatura reporta 10 especies (Platt y Warwick, 1983) mientras que en la base de datos Nemys se encuentran 14 especies.

En este estudio sólo se identificó un espécimen de este género en la localidad de Bahía de Los Ángeles. Dicho organismo presenta, además de las características ya mencionadas, un bulbo bien desarrollado al final del esófago (Figura 37). Para este género

no fue posible tomar datos morfométricos debido a la disposición de los organismos en las fotografías.

V.1.5 Enoplido *n.i.*

Además de los géneros ya mencionados, en este estudio también se identificó un organismo cuya la familia y cuyo el género no pudieron ser determinados por lo cual lo designamos únicamente como representante del orden Enoplida.

Este organismo presenta una cutícula lisa, una cavidad bucal relativamente pequeña con cuatro setas cefálicas en la región anterior (Tabla XX). Su cola en forma de balón, es totalmente distinta de las otras formas encontradas en otros géneros del orden (Figura 38).

Tabla XX. Parámetros morfológicos para Enchilidiidae *n. i.*, Enoplida *n.i.* y para el género *Thalassironus*.

	Localidades/Géneros		
	La Paz	Santa Clara	San Carlos
	Enchilidiidae <i>n.i</i>	<i>Thalassironus</i>	Enoplida
	F	M	J
LT	3.045	4.610	1.687
LE	0.554	0.470	0.205
<i>a</i>	42.292	82.321	36.674
<i>b</i>	5.496	9.809	8.229
<i>c</i>	15.859	37.480	16.067
DC	0.019	0.039	0.017
LSFp	0.007	0.029	0.015
LSFa	-	0.012	-
LB	0.026	0.036	0.009
AB	0.011	0.019	0.006
DA	0.037	0.044	0.022
DM	0.072	0.056	0.046
DN	0.235	?	?
LER	-	0.034	-
LEA	-	0.036	-
LG	-	0.009	-
V %	53.859	-	-
LC	0.192	0.123	0.105

(?) Datos no medibles, (-) datos que no se aplican para este organismo.

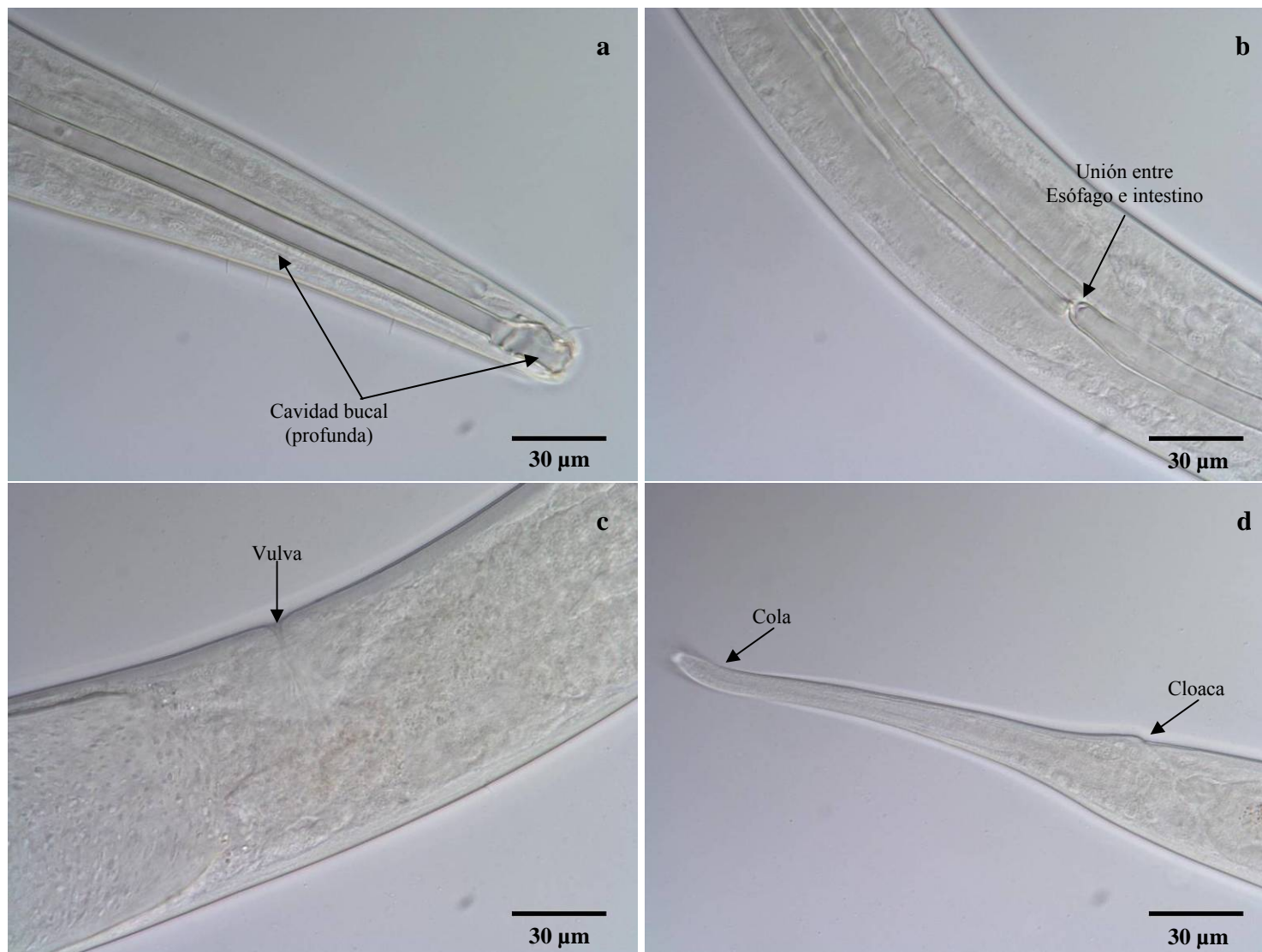


Figura 35. Enchilidiidae *n.i.*, hembra (La Paz).

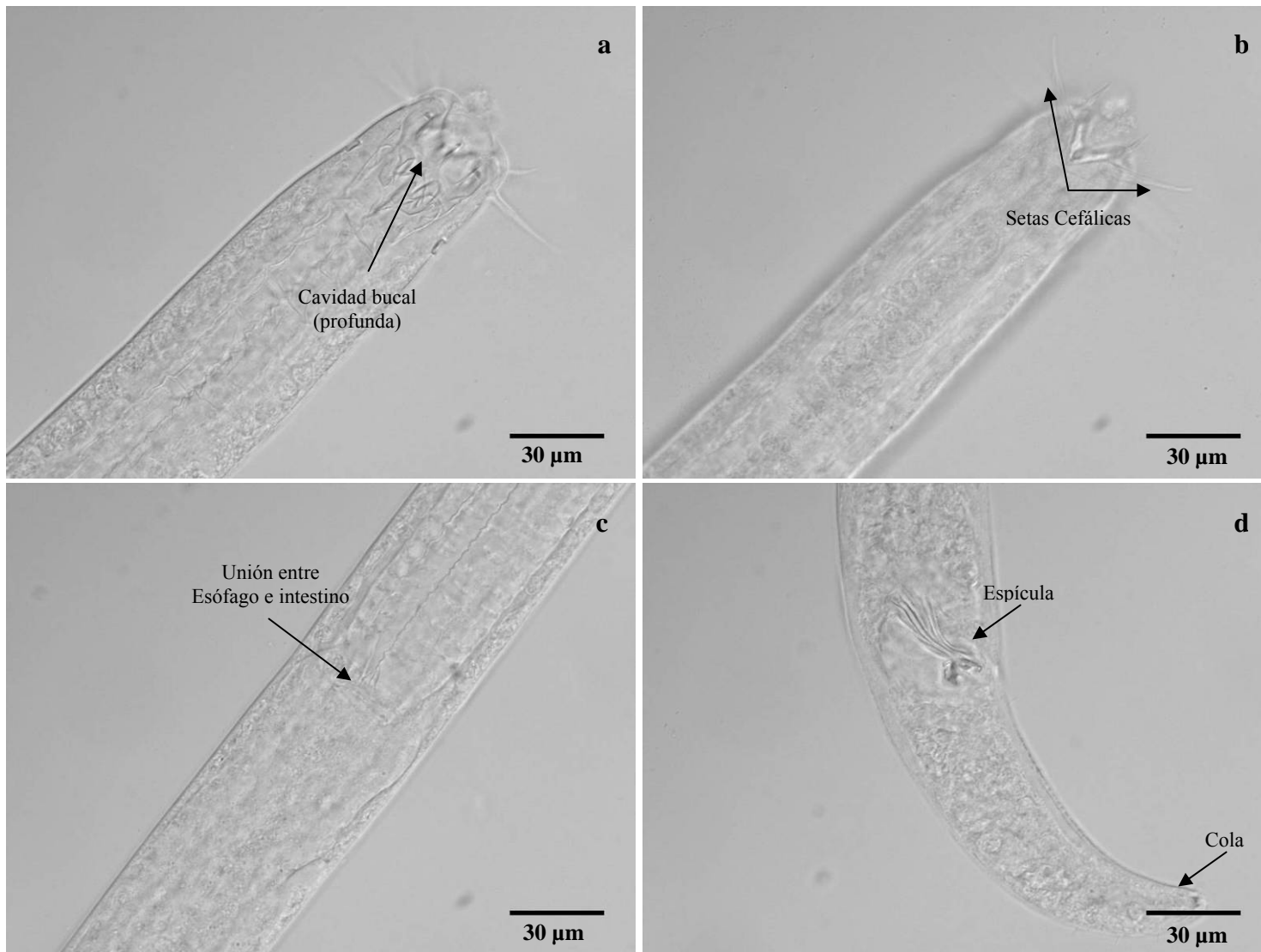


Figura 36. *Thalassironus*, macho (Santa Clara).

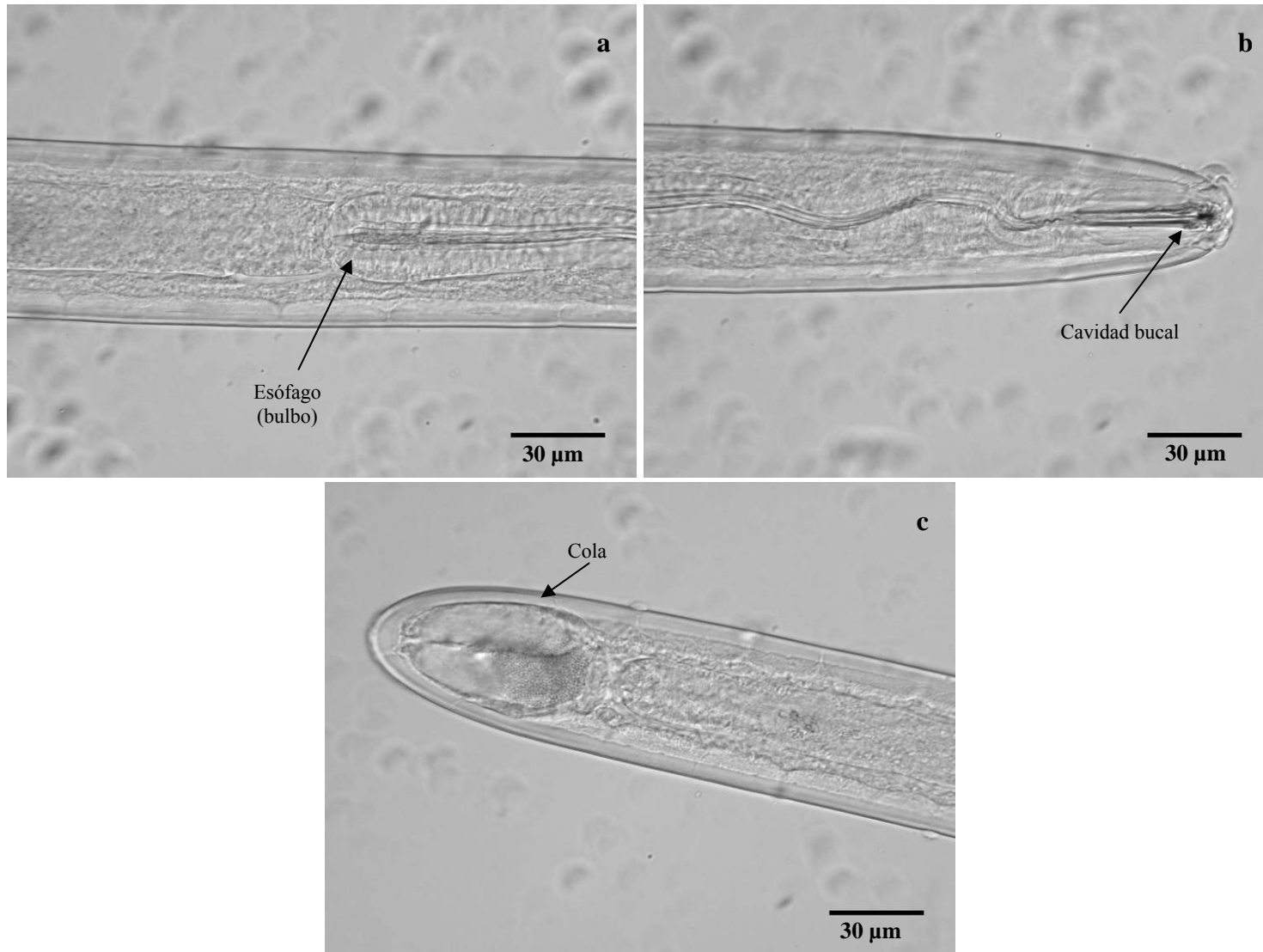


Figura 37. *Trissonchulus* (Bahía L.A.)

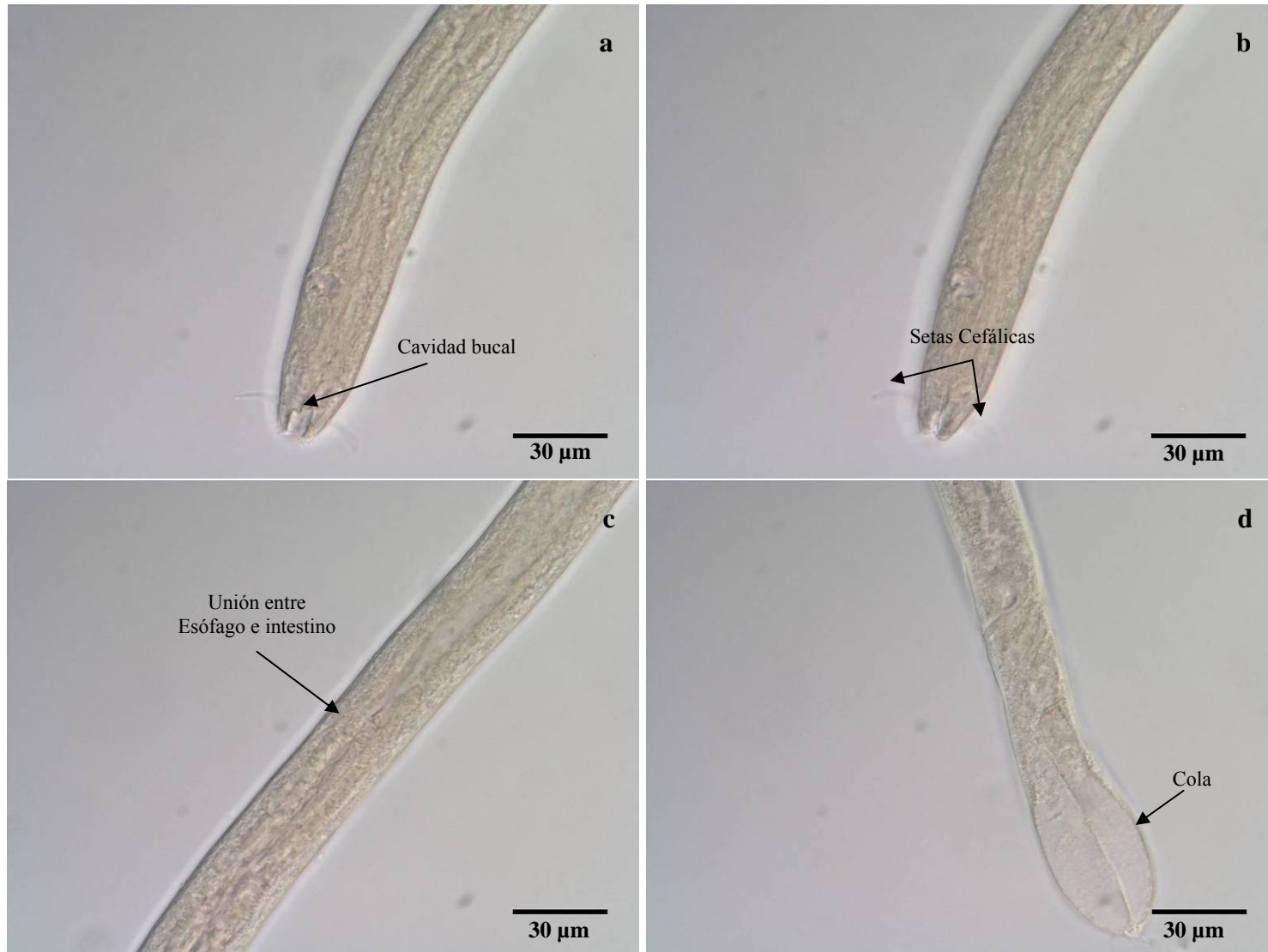


Figura 38. Enoplida *n.i.* (San Carlos)

V.1.6 Familia Rhabdonemaniidae

La familia Rhabdonemaniidae estuvo representada únicamente por un género, *Rhabdodemanía*. Dicho género fue relativamente común en la localidad de Santa Clara (AGC).

V.1.6.1 *Rhabdodemanía* Baylis y Daubney, 1926

Platt y Warwick (1983) reportan 20 especies para el género *Rhabdodemanía*, mientras que en la base de datos Nemys se encuentran 27 especies descritas. *Rhabdodemanía* en Santa Clara estuvo representado principalmente por organismos adultos, machos y hembras y por organismos relativamente grandes, tanto en largo total como en diámetro/ancho máximo (Tabla XXI). Como características particulares del género están los dos grupos de setas cefálicas (anteriores y posteriores), una cavidad bucal con dientes pequeños y una cola corta y redondeada. Los machos presentan una espícula corta junto con un gubernáculum, pero sin suplementos (Figura 39).

Tabla XXI. Parámetros morfológicos (media \pm desviación estándar e intervalo de valores) para el género *Rhabdodemanía* de la localidad Santa Clara (AGC).

Machos (4 inds.)				Hembras (5 inds.)			
LT	3.13 \pm 0.23 2.82-3.38	AB	0.01	LT	3.47 \pm 0.32 3.23-4.00	AB	0.01
LE	0.33 \pm 0.07 0.22-0.38	DA	0.04 0.04-0.05	LE	0.40 \pm 0.02 0.38-0.42	DA	0.04 \pm 0.01 0.03-0.05
a	64.86 \pm 5.42 58.77-71.83	DM	0.05	a	61.91 \pm 7.36 52.49-72.73	DM	0.06 \pm 0.01 0.05-0.07
b	9.72 \pm 2.02 8.24-12.71	DN	101.00	b	8.71 \pm 0.46 8.35-9.52	DN	?
c	24.42 \pm 0.34 23.91-24.64	LER	0.04	c	32.06 \pm 7.74 24.86-43.66	LER	-
DC	0.02	LEA	0.05 0.04-0.05	DC	0.02	LEA	-
LSFp	0.02 0.01-0.02	LG	0.03 0.02-0.03	LSFp	0.02	LG	-
LSFa		V %	-	LSFa	?	V %	58.18 \pm 10.07 40.32-64.00
LB	0.01 0.01-0.02	LC	0.13 \pm 0.01 0.12-0.14	LB	0.01	LC	0.11 \pm 0.02 0.07-0.14

(?) Datos no medibles, (-) datos que no se aplican para este organismo.

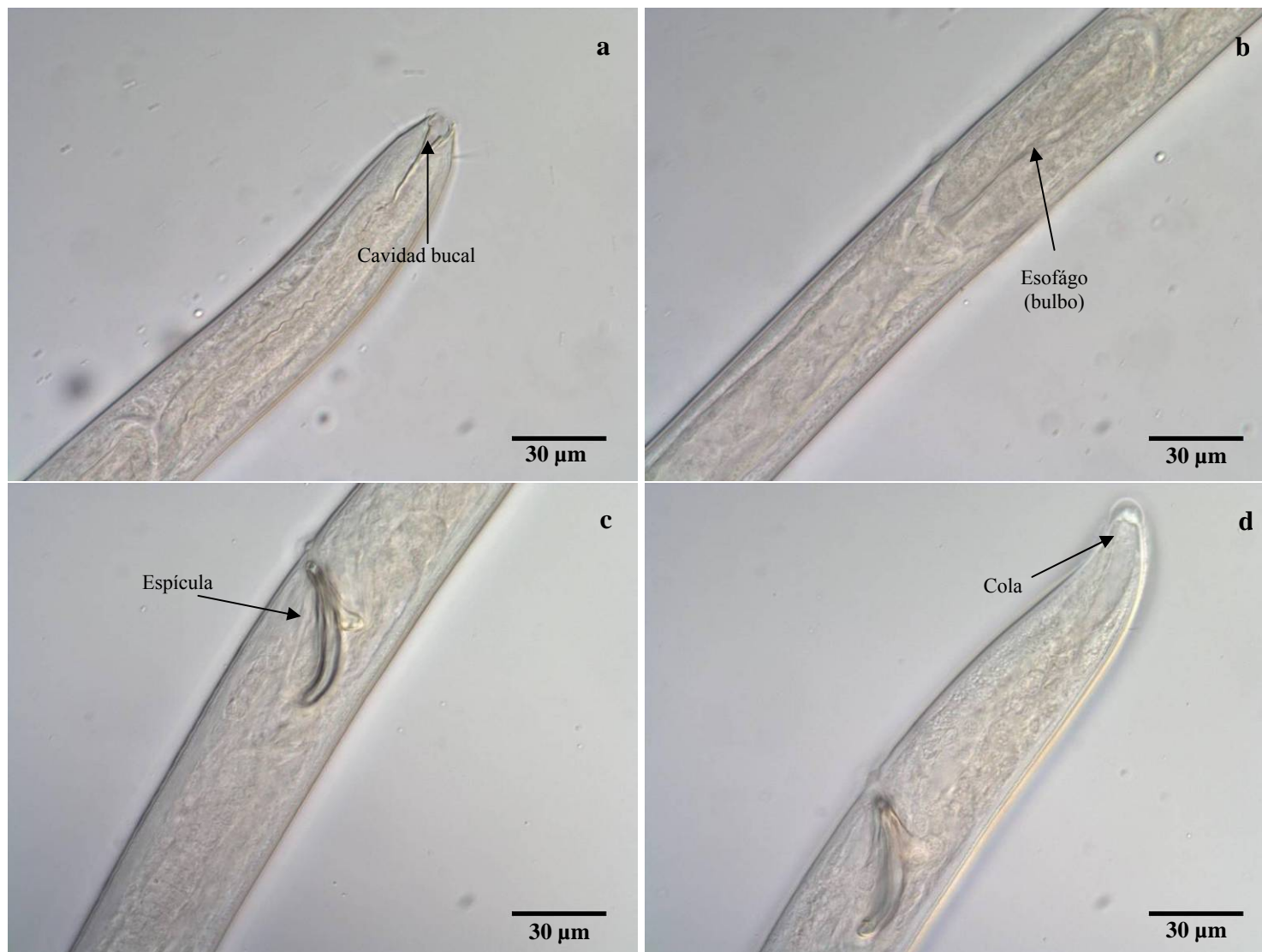


Figura 39. *Rhabdodemia*, macho (Santa Clara).

V.2 Caracterización molecular

V.2.1 Amplificaciones

Se logró amplificar los dos genes propuestos, el 18S y 28S, en los mismos organismos presentados en la sección anterior. El gen 18S, un fragmento de aproximadamente 350 pb presentó un mayor éxito en las amplificaciones vía PCR, alrededor de 99%, casi siempre con bandas de buena calidad (Figura 40). En total se amplificaron productos de 137 organismos para ese gen en donde pocos de ellos tuvieron que ser reamplificados por una segunda vez. Por otro lado, el gen 28S, más específicamente la región D2D3 de aproximadamente 800 pb, presentó un éxito menor en las amplificaciones, alrededor de 67%. En total se amplificaron productos de 93 muestras para el gen 28S y en muchos casos los productos tuvieron que ser reamplificados de dos a tres veces. Sin embargo, hubo situaciones en que solamente se pudo amplificar el gen 18S para un determinado organismo.

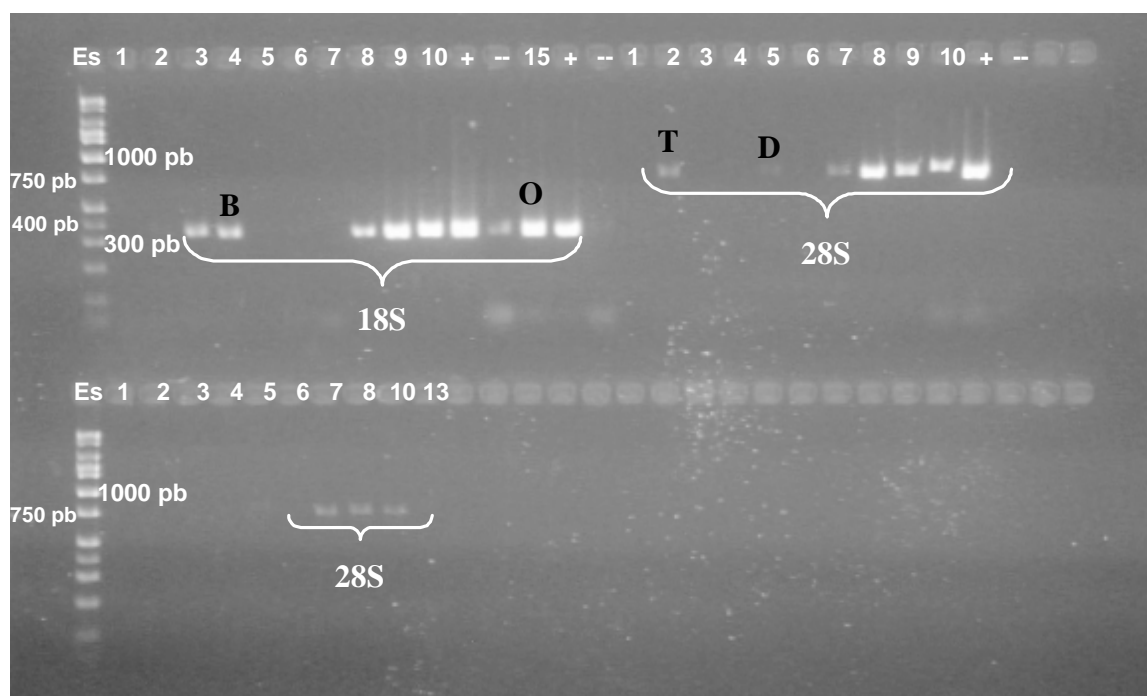


Figura 40. Gel de agarosa evidenciando la amplificación de muestras para el gen 28S y 18S (Es., escalera; pb, pares de bases. Calidad de las bandas: B: buena, O: óptima, T: tenue y D: débil).

V.2.2 Secuencias

Adoptando el criterio de selección de los organismos para la secuenciación (ver sección IV.3.5), se secuenciaron un total de 133 muestras, 66 para el gen 18S y 67 para el gen 28S. Por lo general, para ambos genes se obtuvieron secuencias de buena calidad lo que facilitó el proceso de edición. El gen 28S, aún presentando un fragmento más largo, exhibió secuencias de alta calidad, es decir, con los picos de cada base muy claros, pocos sitios ambiguos y con poco ruido. Las secuencias del gen 18S fueron un poco más ruidosas provocando algunas ambigüedades (parte verde de la secuencia, Figura 41). No se obtuvieron secuencias del género *Trissonchulus* ni del Enchilidiidae no identificado, por lo no se incluyeron en los análisis filogenéticos. Para el género *Pareurystomina*, se obtuvo únicamente la secuencia del gen 28S.

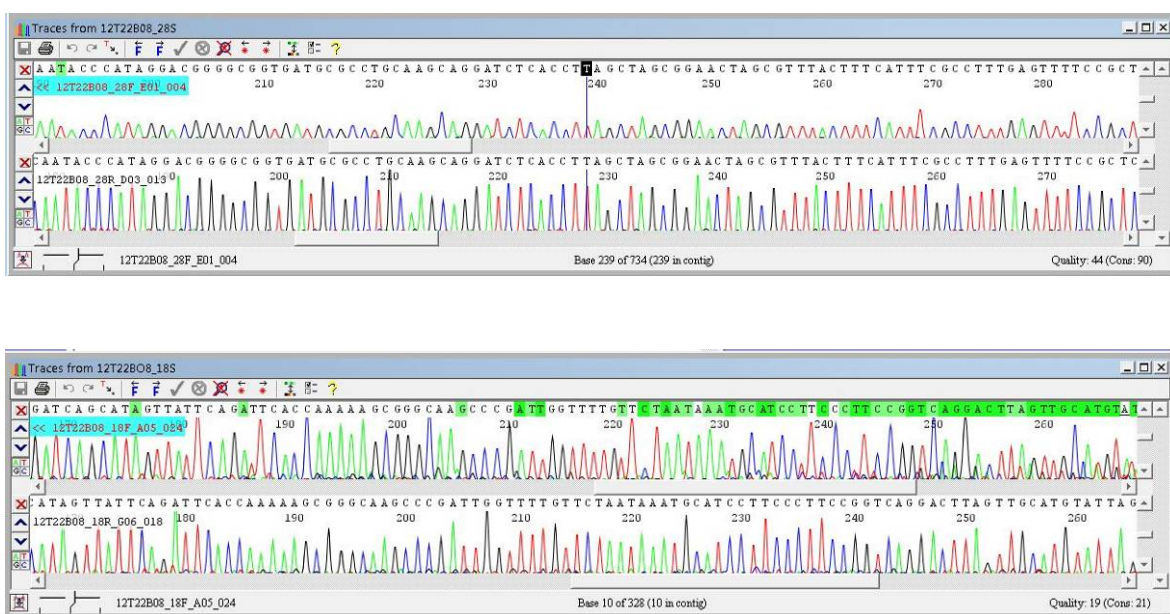


Figura 41. Cromatograma mostrando la calidad de las secuencias para ambos los genes, 28S (superior) y 18S (inferior) para la misma muestra.

La comparación entre las secuencias de este trabajo con secuencias de otros géneros de nemátodos depositadas en la base de datos de GenBank mostró altos porcentajes de similitud para ambos genes. Todos los valores de similitud estuvieron arriba del 90% para el gen 18S, mientras que el gen 28S presentó algunos casos con porcentajes un poco

menores. Las secuencias correspondientes a los géneros previamente identificados en este trabajo, en la mayoría de los casos, presentaron la mayor similitud con otra secuencia proveniente del mismo género o de la misma familia (Tablas XXII y XXIII).

Tabla XXII. Origen y número de organismos secuenciados para los diferentes géneros con su(s) respectiva(s) secuencia(s) de identidad máxima para el gen 18S.

Género	Localidad*	GenBank Num. Acceso/Género	Max. Ident.
<i>Metoncholaimus</i> (6)	PF	AY854196, <i>Oncholaimus</i>	98%
<i>Trileptium</i> sp6 (1)	PF	AY763147, Nematodo	92%
		AM261954, Nemátodo	90%
<i>Trileptium</i> sp6 (1)	PF	AY763147, Nematodo	90%
		AM261954, Nemátodo	90%
<i>Viscosia</i> (3)	SCA	DQ394740, <i>Viscosia viscosa</i>	96%
<i>Enoploides</i> (9)	SF	DQ394731, <i>Enoploides brunettii</i>	97%
		AM234621, <i>Enoploides</i>	97%
<i>Trileptium</i> sp5 (5)	SF	AY763147, Nematodo	91%
<i>Oxyonchus</i> (2)	SC	AM261954, Nematodo	92%
		AM234630, <i>Paradontophora</i>	92%
<i>Mesacanthion</i> (9)	SC	AJ867495, Nematodo	94%
		AM234630, <i>Paradontophora</i>	94%
<i>Mesacanthoides</i> (2)	SC	AM261954, Nematodo	95%
		AM234630, <i>Paradontophora</i>	94%
Thoracostomopsidae n.i. (2)	SC	AM234046, <i>Preacanthionchus</i>	97%
<i>Rhabdodemia</i> (5)	SC	EF659825, <i>Rhabdolaimus</i>	98%
<i>Thalassironus</i> (1)	SC	AY854201, <i>Bathylaimus</i>	91%
<i>Trileptium</i> sp1 (2)	SC	AM261954, Nematodo	92%
		AM234630, <i>Paradontophora</i>	92%
<i>Trileptium</i> sp2 (3)	SC	AM2619541, Nemátodo	94%
		AM2346301, <i>Paradontophora</i>	94%
<i>Trileptium</i> sp3 (2)	BLA	AY7631471, Nemátodo	91%
<i>Trileptium</i> sp 4 (4)	CE	AY763147, Nematodo	95%
<i>Oncholaimus</i> (2)	LP	AY854196, <i>Oncholaimus</i>	95%
Enoplido n.i. (1)	SCA	DQ394804, <i>Tripyloides</i>	94%
<i>Epacanthion</i> (1)	SCA	AY763147, Nematodo	93%
		AM234630, <i>Paradontophora</i>	91%

* Las abreviaciones de las localidades de estudio son iguales a aquellas presentadas en la Tabla II.

Tabla XXIII. Origen y número de organismos secuenciados para los diferentes géneros con su(s) respectiva(s) secuencia(s) de identidad máxima para gen 28S.

Genero	Localidad*	GenBank Num. Acceso/Género	Max. Ident.
<i>Metoncholaimus</i> (2)	PF	AF210427.1, <i>Viscosia</i> ; AF210413.1, <i>Oncholaimus</i>	94%, 93%
<i>Trileptium</i> sp6 (1)	PF	AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i>	92%
8T04A08		AF210409.1, <i>Mesacanthion</i>	92%
<i>Trileptium</i> sp6 (1)	PF	AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i>	96%
5T04A08		DQ077760.1, <i>Enploides</i>	93%
<i>Viscosia</i> (1)	SCA	AF210413.1, <i>Oncholaimus</i>	95%
<i>Enoplida</i> n.i. (1)	SCA	DQ086695.1, Nemátodo NEMATD36	90%
<i>Enploides</i> (10)	SF	AF210405.1, <i>Enploides</i> ; AF210404.1, <i>E. longispiculosus</i>	95%
<i>Trileptium</i> sp5 (6)	SF	AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i> sp. MKL1	87%
<i>Oxyonchus</i> (1)	SC	AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i> ; AF210409.1, <i>Mesacanthion</i>	94%, 93%
<i>Mesacanthion</i> (4)	SC	DQ077781.1, <i>Phanoderma</i>	95%
		AF210404.1, <i>Enploides longispiculosus</i>	94%
		AF210409.1, <i>Mesacanthion</i>	93%
<i>Mesacanthoides</i> (1)	SC	DQ077781.1, <i>Phanoderma</i> ; AF210409.1, <i>Mesacanthion</i>	100%, 93%
<i>Rhabdodemia</i> (2)	SC	AF210418.1, <i>Rhabdodemia</i>	97%
<i>Thalassironus</i> (1)	SC	DQ077760.1, <i>Enploides</i>	80%
<i>Trileptium</i> sp 1 (1)	SC	DQ077781.1, <i>Phanoderma</i> ; AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i>	95%, 92%
<i>Trileptium</i> sp 2 (3)	SC	DQ077781.1, <i>Phanoderma</i> ; AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i>	92%
<i>Trileptium</i> sp 3 (2)	BLA	AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i> ; DQ077760.1, <i>Enploides</i>	87%, 86%
<i>Trileptium</i> sp 4 (4)	CE	DQ077781.1, <i>Phanoderma</i>	98%
		DQ077753.1, <i>Oncholaimidae</i>	97%
		DQ077760.1, <i>Enploides</i>	94%
<i>Oncholaimus</i> (2)	LA	AF210427.1, <i>Viscosia</i> ; AF210413.1, <i>Oncholaimus</i>	91%, 90%
<i>Epacanthion</i> (1)	SCA	AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i> ; AF210407.1, <i>Epacanthion</i>	97%, 93%
Thoracostomopsidae n.i. (2)	SC	DQ077781.1, <i>Phanoderma</i> sp. 3I23B4	94%
		DQ077749.1, <i>Ascolaimus</i> sp. 1P6K2	93%
		AF210409.1, <i>Mesacanthion</i> sp. MKL1	92%
		DQ077753.1, <i>Oncholaimidae</i> sp. 2I6K2	92%
		AF210407.1, <i>Epacanthion</i> sp. MKL1	92%
		DQ077764.1, <i>Enploides</i> sp. 2P9K2	92%
		AF210406.1, <i>Enoplolaimus</i> sp. MKL1	92%
<i>Pareurystomina</i> (2)	SC	AF210399.1, <i>Calyptonema maxweberi</i>	92%

* Las abreviaciones de las localidades de estudio son iguales a aquellas presentadas en la Tabla II.

V.2.3 Gen 28S

El alineamiento final del gen 28S presentó 798 sitios (incluyendo bases e indels) de los cuales 241 fueron sitios conservados, 549 fueron sitios variables, 464 fueron sitios parsimonia-informativos y 78 fueron sitios con mutaciones únicas. La composición nucleotídica del gen fue de 24.2% de timina (T), 21.3% de citosina (C), 25.4% de adenina (A) y 29% de guanina (G) para un fragmento de tamaño promedio de 704.4 pb.

V.2.3.1 Filogenia del gen 28S

Las reconstrucciones filogenéticas realizadas con Parsimonia Máxima (PM) y Verosimilitud Máxima (VM) mostraron árboles muy similares. Los valores para los índices de consistencia (IC) y homoplasia (IH) para el árbol de PM con el gen 28S fueron de IC = 0.5047 y IH = 0.4953. Una búsqueda heurística realizada con ambos métodos identificó un único árbol con tres clados principales (Figura 42a-b). El primer clado estuvo formado por todos los representantes de la familia Thoracostomopsidae (clado mayor en ambos árboles), el segundo por los representantes de la familia Oncholaimidae junto con el género *Pareurystomina* (Enchilidiidae) y el tercero por los géneros *Rhabdodemia*, *Thalassironus* y el organismo no identificado del orden Enoplida. Algunas de las ramas de los árboles se encuentran fuertemente apoyadas por los datos, como aquellas de los tres clados principales, con valores altos de bootstrap no paramétrico (Figura 42a). También se encontraron algunos valores altos dentro del clado de Thoracostomopsidae (entre *Trileptium* sp1 y *T.* sp2 y entre *T.* sp3 y *T.* sp5). Las secuencias de la familia Thoracostomopsidae resultaron monofiléticas en ambos árboles, mientras que la familia Oncholaimidae sólo lo fue en el de PM. El clado formado por Thoracostomopsidae obtuvo valores altos de bootstrap con PM pero no con VM (Figura 42b). La super familia Oncholamoidea (Oncholaimidae y Enchilidiidae) también se mostró monofilética con respecto a los demás grupos en ambos árboles con el valor máximo de bootstrap (100%). Los árboles de PM y VM difirieron en la posición del género *Pareurystomina*. Mientras que en el árbol basado en PM *Pareurystomina* se ubicó en una rama hermana a la familia Oncholaimidae, en el árbol con VM estuvo agrupado como un taxón hermano de *Viscosia* volviendo a la familia Oncholaimidae parafilética con respecto a Enchilidiidae.

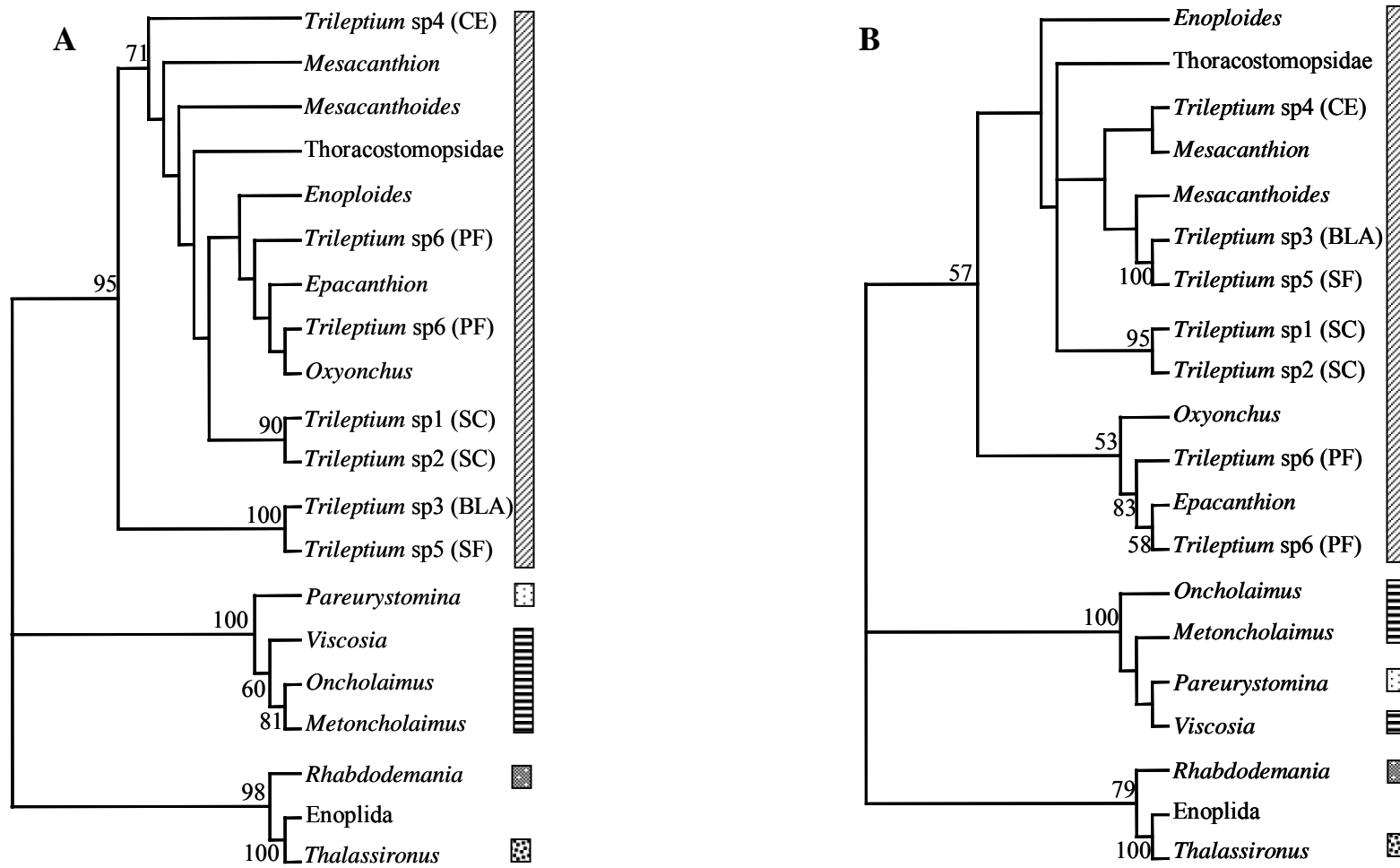


Figura 42. Cladogramas obtenidos con Parsimonia Máxima (A) y con Verosimilitud Máxima (B) para el gen 28S con sus respectivos valores de bootstrap en las ramas (1000 replicaciones para PM y 100 replicaciones para VM). Los diferentes rectángulos indican las familias de los respectivos géneros (▨Thoracostomopsidae ▨Oncholaimidae ▨Enchilidiidae ▨Rhabdonemaniidae ▨Ironidae).

El árbol obtenido con el método del Vecino más Cercano (VC) presentó una topología más congruente con la del árbol de VM (Figura 43). También se encontraron tres clados principales, (1) el mayor clado formado por todos los representantes de la familia Thoracostomopsidae, (2) formado por *Rhabdodemia*, *Thalassironus* y Enoplida no identificado y (3) formado por Oncholaimidae y Enchilidiidae.

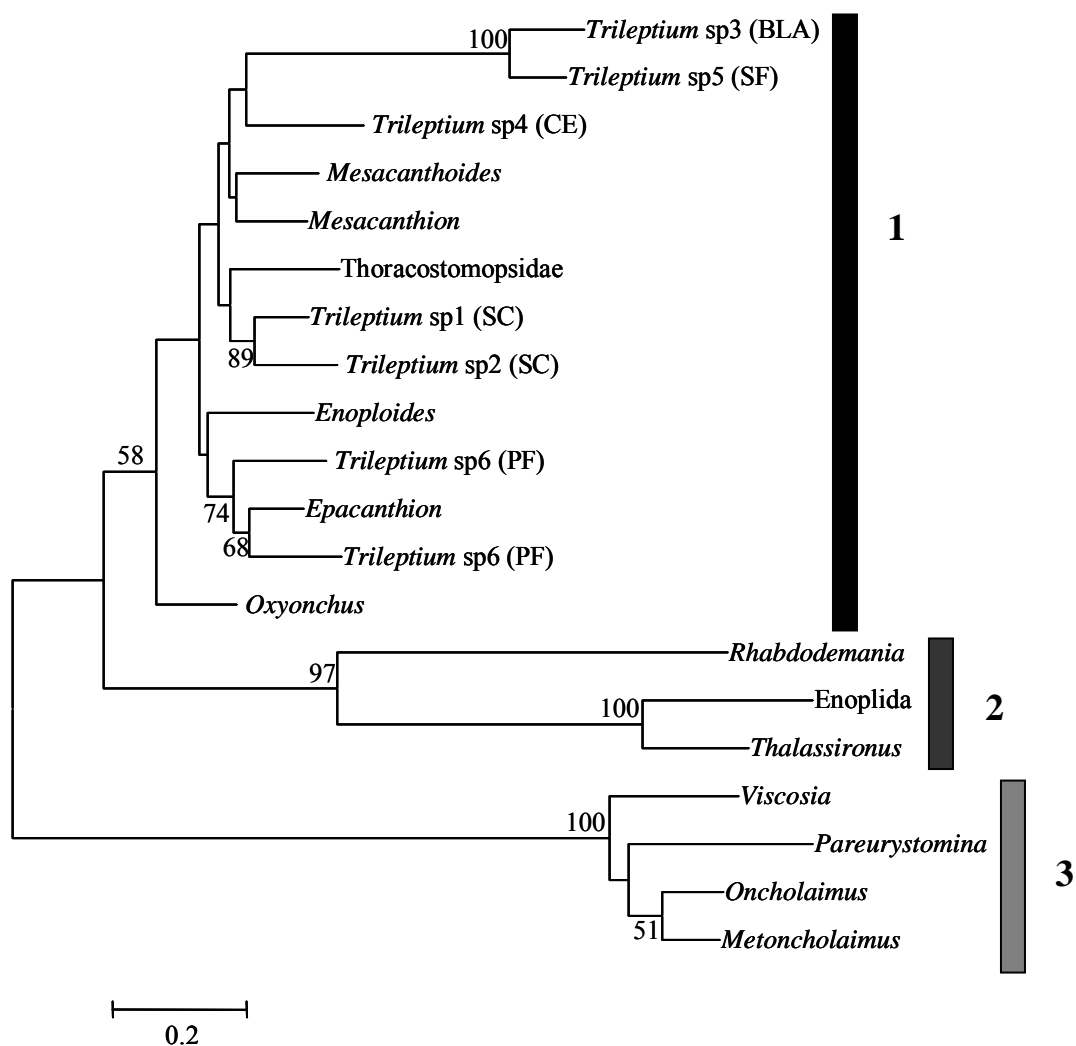


Figura 43. Filograma obtenido con el método algorítmico del Vecino más Cercano (VC) para el gen 28S con sus respectivos valores de bootstrap en las ramas (1000 replicaciones). La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

V.2.4 Gen 18S

El alineamiento final del gen 18S presentó 324 sitios (incluyendo bases e indels) de los cuales 181 fueron sitios conservados, 140 fueron sitios variables, 117 fueron sitios parsimonia-informativos y 20 fueron sitios con mutaciones únicas. La composición nucleotídica del gen fue de 27.1% (T), 21.5% (C), 27.8% (A) y 23.6% (G) para un fragmento de tamaño promedio de 302.5 pb.

V.2.4.1 Filogenia del gen 18S

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas a partir del gen 18S fueron un poco distintas de las del gen 28S. Los valores para los índices de consistencia (IC) y homoplasia (IH) para el árbol de PM con el gen 18S fueron $IC = 0.6502$ y $IH = 0.3498$. Una búsqueda heurística realizada bajo el criterio de PM y VM encontró un solo árbol para cada criterio con topologías muy similares. Ambos árboles evidenciaron la existencia de tres clados principales (Figura 44a-b). A la diferencia del gen 28S, el género *Rhabdodemia* se agrupó con los representantes de la familia Oncholaimidae y no con *Thalassironus* y Enoplida no identificado. Los principales clados estuvieron apoyados por valores altos de bootstrap bajo el criterio de PM, sin embargo la relación del género *Rhabdodemia* con Oncholaimidae presentó un valor relativamente bajo (68%) en VM. Al igual que en los árboles del gen 28S, las secuencias 18S de las familias Thoracostomopsidae y Oncholaimidae fueron monofiléticas. Una vez más, las relaciones dentro de la familia Thoracostomopsidae no fueron totalmente resueltas con la señal filogenética de este gen mientras que las relaciones de Oncholaimidae estuvieron bien resueltas con los géneros *Oncholaimus* y *Metoncholaimus* como taxa hermanos.

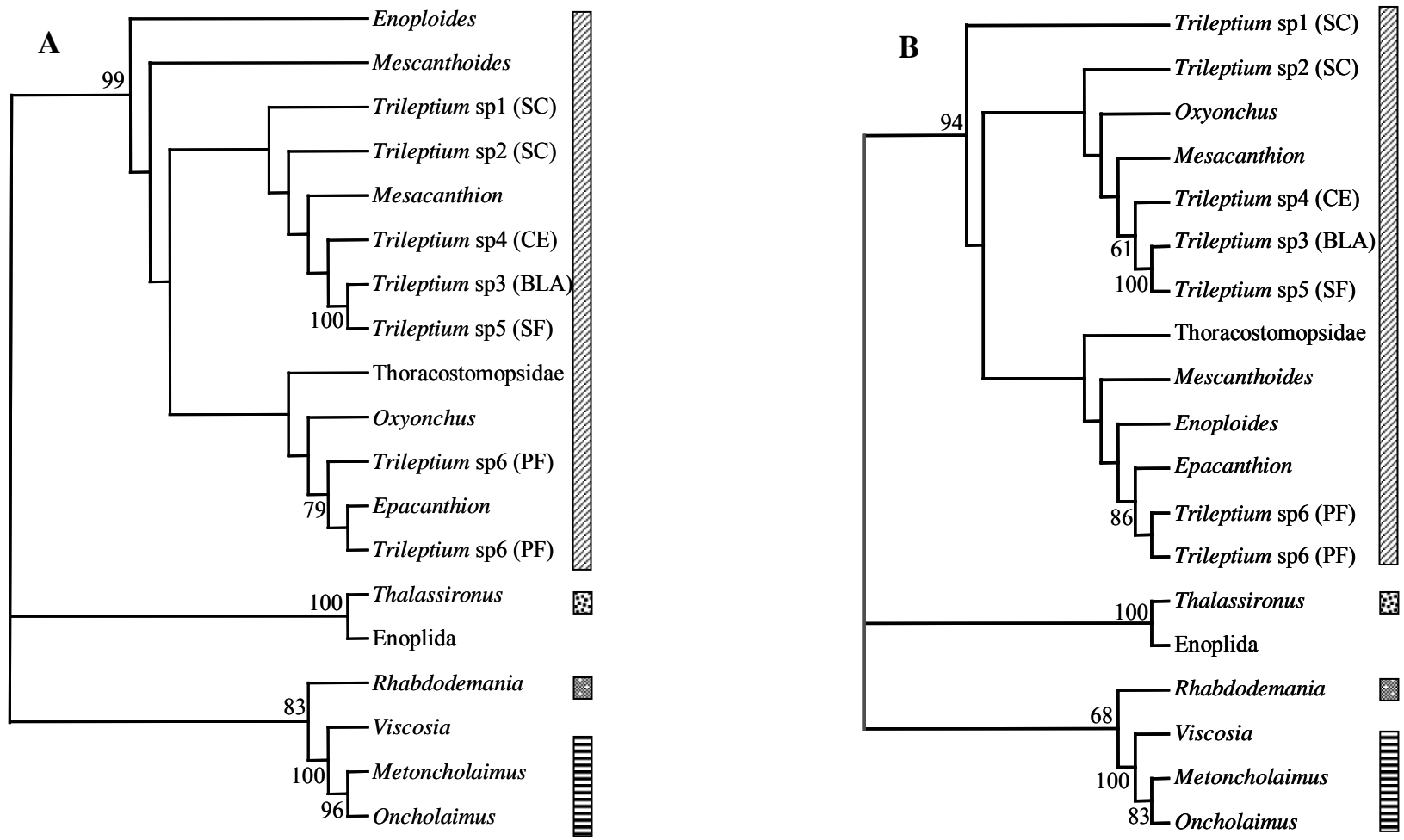


Figura 44. Cladogramas obtenidos con Parsimonia Máxima (A) y con Verosimilitud Máxima (B) para el gen 18S con sus respectivos valores de bootstrap en las ramas (1000 replicaciones para PM y 100 replicaciones para VM). Los diferentes rectángulos indican las familias de los respectivos géneros (▨Thoracostomopsidae ▤Oncholaimidae ▥Rhabdonemaniidae ▦Ironidae).

El árbol 18S basado en el criterio del VC también presentó una topología congruente con aquellas de los métodos anteriores. Una vez más, se evidenció la formación de los tres clados principales: (1) el mayor clado formado por todos los representantes de la familia Thoracostomopsidae, (2) el formado por *Thalassironus* y Enoplida no identificado y (3) el clado basal del árbol formado por *Rhabdodemanina*, y los representantes de la familia Oncholaimidae (Figura 45).

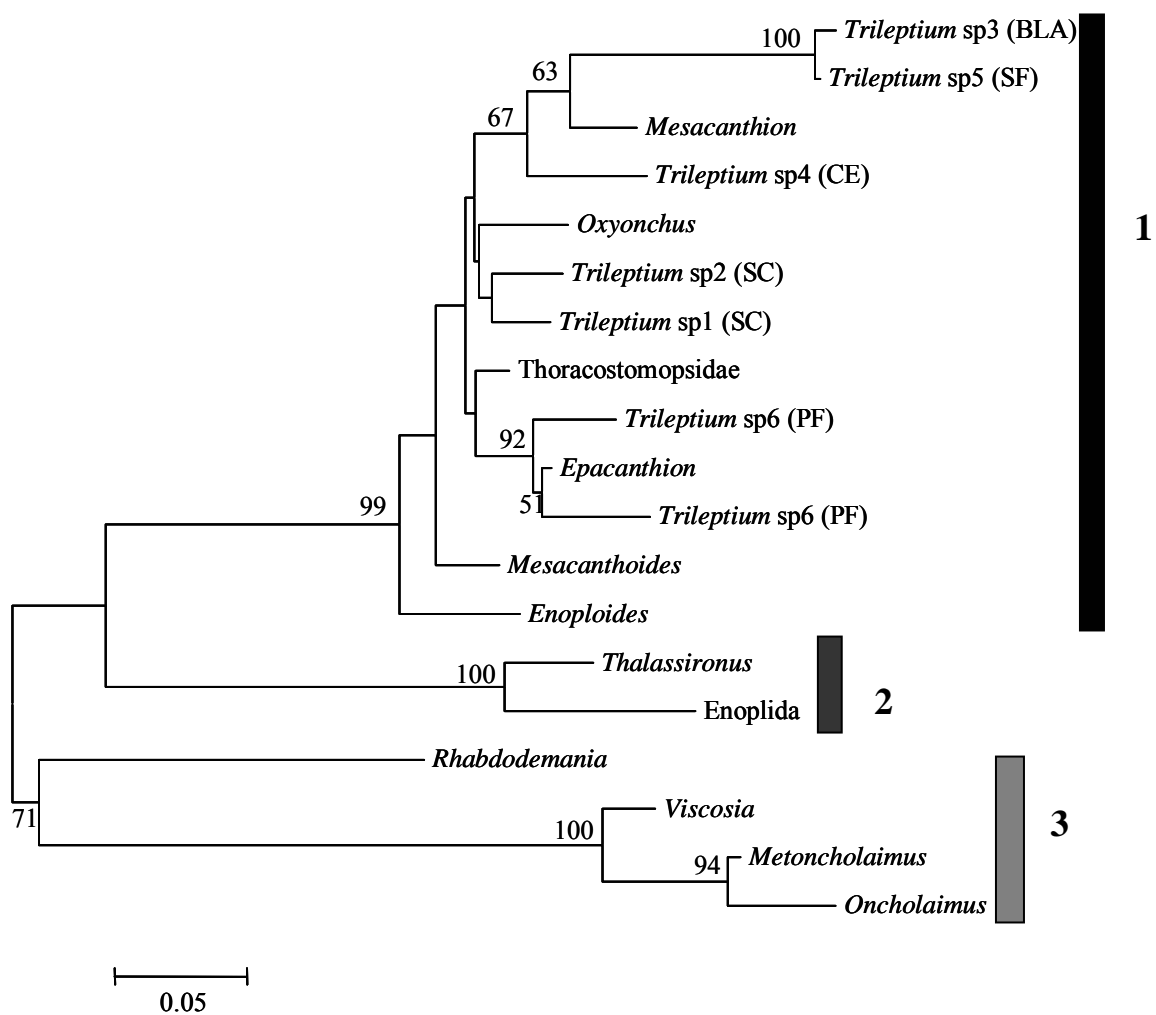


Figura 45. Filograma obtenido con el método algorítmico del Vecino más Cercano (VC) para el gen 18S con sus respectivos valores de bootstrap en las ramas (1000 replicaciones). La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

V.2.5 Congruencia entre 18S y 28S

La prueba de incongruencia por diferencia de tamaño (ILD) realizada para comparar los genes 18S y 28S mostró que las topologías de los árboles fueron congruentes ($p = 0.28$) por lo cual se pudo realizar una reconstrucción filogenética más robusta a partir de ambos (total de 1123 caracteres). Una búsqueda heurística bajo el criterio de PM encontró cinco árboles, los más parsimoniosos. El árbol consenso presentó un IC = 0.5354 y un IH = 0.4655 (Figura 46a).

El árbol consenso generado a partir de los dos genes fue muy similar al obtenido con el gen 28S a través del método de PM. Se identificaron tres clados principales apoyados por valores altos de bootstrap. El mayor clado estuvo formado por todos los representantes de familia Thoracostomopsidae. Valores altos de bootstrap también se encontraron dentro de esa familia, aunque algunas relaciones filogenéticas no fueron totalmente resueltas. Los representantes de la familia Oncholaimidae también formaron un clado que, al igual que Thoracostomopsidae fue apoyado por el valor máximo de bootstrap. El grupo externo del árbol estuvo formado por los géneros *Thalassironus*, *Rhabdodemia* y el representante del orden Enoplida no identificado. Una vez más, las secuencias de las familias Thoracostomopsidae y Oncholaimidae se mostraron monofiléticas.

Para el árbol obtenido con el método de VM, ahora con el modelo evolutivo ajustado a todos los caracteres (genes 18S y 28S), también se identificaron tres clados principales. A diferencia de PM, el árbol de VM pudo resolver casi todas las relaciones entre los taxa de la familia Thoracostomopsidae que una vez más se mostró monofilética con respecto a los demás clados (Figura 46b). Ya el valor de bootstrap apoyando la relación de *Rhabdodemia* con Enoplida no identificado y *Thalassironus* fue menor que en PM.

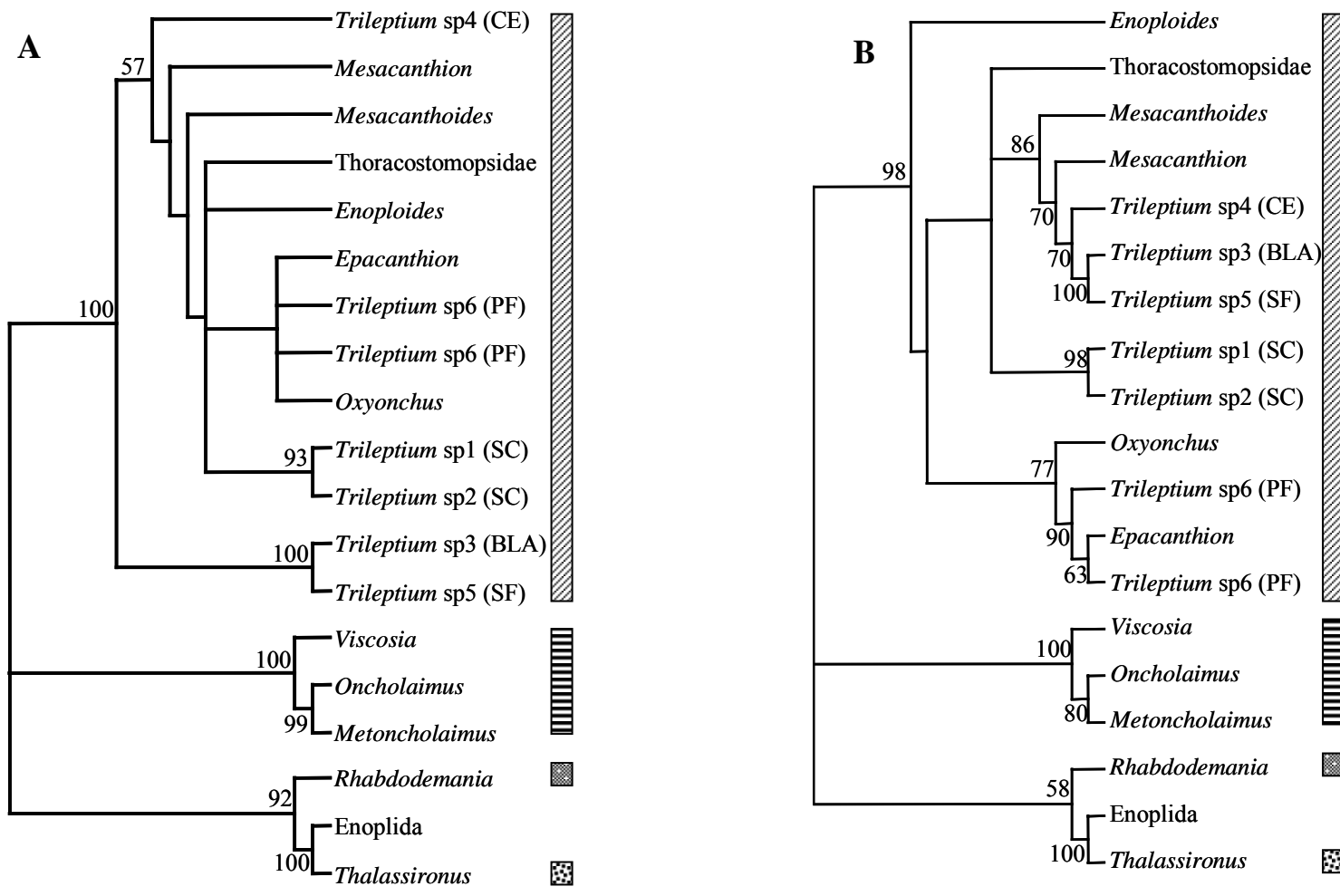


Figura 46. Cladogramas obtenidos con PM (A) y con VM (B) a partir de los genes 28S y 18S con sus respectivos valores de bootstrap en las ramas. (PM, árbol consenso de 5 árboles, 1000 replications; VM, un solo árbol, 100 replications). Los diferentes rectángulos indican las familias de los respectivos géneros como en la figura 44.

VI. DISCUSIÓN

VI.1 Diversidad del orden Enoplida

Enoplida, Chromadorida y Monhysterida son los tres principales órdenes de nemátodos marinos de vida libre. Dentro de la subclase Enoplia, el orden Enoplida es el más importante en términos de número de especies y de géneros. Dicho orden presenta 13 familias, siendo Oncholaimidae y Thoracostomopsidae las más diversas (Platt y Warwick, 1983). En este trabajo gran parte de los organismos identificados pertenecieron a estas familias; en particular, la familia Thoracostomopsidae presentó siete géneros, uno de ellos no identificado. Otros trabajos han mencionado que los representantes de las familias Thoracostomopsidae y Oncholaimidae son comunes en ambientes intermareales arenosos como los muestreados en este estudio (Greenslade y Nicholas, 1991; Moens *et al.*, 1999; Moens *et al.*, 2000; Nicholas, 2002; Gheskiere *et al.*, 2004).

Debido a su tamaño, los nemátodos marinos del orden Enoplida son más comunes en ambientes arenosos en comparación con representantes de los órdenes Chromadorida y Monhysterida (Platt y Warwick, 1983; Greenslade y Nicholas, 1991). De hecho, varios trabajos ecológicos han demostrado que el tamaño del grano en ambientes arenosos es un factor importante en la distribución de los nemátodos marinos (biomasa, número de especies, densidad, tamaño corporal) así como de otros representantes de la meiofauna (Wieser, 1959; Swedmark, 1964; Heip y Vincx, 1985; Steyaert *et al.*, 1999; Tita *et al.*, 1999).

Nicholas ha realizado descripciones de algunas especies de la familia Thoracostomopsidae en playas en el sur de Australia: *Oxyonchus longisetosus* y *O. evelynae* (Nicholas, 2004), *Trileptium australis* (Nicholas, 2007), *Mesacanthion alexandrinus* y *Enoploides stewarti* (Nicholas, 1993), las dos últimas provenientes de ambientes dulceacuícolas. Se sugiere que los ancestros del orden Enoplida se caracterizaban por ser eurihalinos con una gran tolerancia osmótica debido a que las especies actuales ocupan tanto ambientes marinos como dulceacuícolas (De Ley, 2006). Si bien los Enoplidos pueden encontrarse en aguas de diferente salinidad, siempre se encuentran asociados a sedimentos arenosos. Jensen (1986) también describió nemátodos

marinos en una región del Golfo de México caracterizada por fondos arenosos con rocas. Entre las cuatro especies descritas, dos son representantes de la familia Thoracostomopsidae (*Enoploides polysetosus* y *Mesacanthoides fibulatus*). En un trabajo más reciente, De Jesús-Navarrete (2007b) describió la nematofauna de Banco Chinchorro (BCH) e Isla Mujeres (IM), México en el cual encontró un gran número de géneros, 49 en BCH y 34 en IM. Las familias Thoracostomopsidae y Tripyloidiidae con cuatro y tres géneros respectivamente, fueron las principales representantes del orden Enoplida. Thoracostomopsidae fue más abundante en arenas gruesas mientras que Tripyloidiidae ocurrió principalmente en arenas finas y medianas. Mundo-Ocampo y colaboradores (2007) evaluaron la diversidad de la nematofauna en dos playas arenosas del AGC, Punta Estrella y Santa Clara. En dicho trabajo las familias Oncholaimidae, Thoracostomopsidae y también Enchilidiidae (menos frecuente) fueron justamente los principales representantes del orden Enoplida. Por lo tanto, el orden Enoplida puede ser considerado como un grupo importante en sitios arenosos debido tanto por su omnipresencia como por su elevada biomasa. A la vez, estos organismos poseen un papel ecológico importante ya que la mayoría de los representantes de ese orden (p. ej. Thoracostomopsidae y Oncholaimidae) son nemátodos depredadores que controlan las poblaciones de sus presas (Moens *et al.*, 1999; Moens *et al.*, 2000; Traunspurger, 2000; Gallucci *et al.*, 2005).

Con respecto a la diversidad del orden Enoplida, solamente pudimos encontrar cinco de las 13 familias existentes para ese grupo. Sin embargo, las familias más importantes en este estudio fueron justamente las que más se han reportado en otros trabajos, lo que nos sugiere que el resto de las familias son menos frecuentes o podrían estar ausentes en el área de estudio de este trabajo. Un esfuerzo más exhaustivo tanto en el número de muestras como en el número de localidades analizadas ayudaría a encontrar un mayor número de familias y géneros del orden. Dicho esfuerzo podría ser concentrado en playas arenosas con alto potencial para poseer más especies de enoplos, como fue la localidad de Santa Clara que presentó el mayor número de familias. Finalmente, hay que recordar que este trabajo fue diseñado para realizar una evaluación cualitativa de dicha diversidad por lo que su cuantificación requerirá de una metodología *ex profeso*.

La distribución geográfica de los polimorfismos se encuentra asociada a la interpretación taxonómica y sistemática de éstos. Esto fue muy claro en el género *Trileptium*, el cual presentó la mayor distribución geográfica. En ese caso las diferencias morfológicas entre muestras alopátricas dieron lugar a análisis detallados que revelaron la existencia de diferencias significativas. Parte de estas diferencias fueron consistentes con una diferenciación genética y ambas sugieren la existencia de varias especies en la región. Cuando la diferenciación geográfica es incipiente o inexistente, la amplia distribución de una especie puede llevar a que se considere cosmopolita. De hecho, muchas de las especies de nemátodos marinos son consideradas cosmopolitas (Heip y Vincx, 1985; Derycke *et al.*, 2005; Fonseca *et al.*, 2006). Sin embargo, el cosmopolitanismo vía dispersión es difícil de concebir en los nemátodos marinos de vida libre ya que, a diferencia de otros invertebrados marinos, carecen de una fase larvaria planctónica dispersiva (Ullberg y Ólafsson, 2003). Además, la gran mayoría son endobénticos, viviendo en los espacios intersticiales del sedimento, lo que limita su capacidad de dispersión (Wetzel *et al.*, 2002). Es por ello que la interpretación del polimorfismo morfológico, particularmente en alopatria, requiere de un análisis más detenido aunado a una evaluación genética pues las características biológicas de los nemátodos de vida libre sugieren la existencia de diversidad críptica sustancial dentro del grupo, la cual también se ha observado en otros organismos de la meiofauna (Todaro *et al.*, 1996; Rocha-Olivares *et al.*, 2001; Derycke *et al.*, 2007).

Recientemente, Bhadury y colaboradores (2008) utilizando el gen 28S además de la taxonomía tradicional, encontraron que *Terschellingia longicaudata*, puede ser realmente considerada una especie cosmopolita de amplia distribución (Islas Británicas a Malasia), debido a que no presentan diferencias morfológicas y comparten una secuencia idéntica. Sin embargo, estos autores también apuntan la existencia de especies crípticas dentro del complejo *Terschellingia* spp. y la importancia del enfoque molecular en estudios de biodiversidad. Por lo tanto, gran parte de estos taxa considerados cosmopolitas pueden ser en realidad grupos de especies crípticas con un nivel elevado de diferenciación genética.

VI.2 Morfología vs. genética molecular

En los últimos años, mucho se ha discutido sobre la resolución proporcionada por la genética molecular y la taxonomía tradicional en la identificación de las especies. La identificación o determinación taxonómica basada en la morfología siempre ha sustentado las investigaciones ecológicas y hoy en día esto no es distinto. Sin embargo, esto requiere de un esfuerzo excesivo en algunos grupos taxonómicos lo que ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas, como es el código de barras de ADN (De Ley, 2000; Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Cook *et al.*, 2005; De Ley *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2007). Tal iniciativa ha tenido mucho éxito, principalmente en grupos taxonómicos que presentan una morfología conservada con caracteres morfológicos diagnosticables difíciles de observar como es el caso de los nemátodos, incluyendo a los marinos (Blouin *et al.*, 1998; Hebert *et al.*, 2004; Ekrem *et al.*, 2007). Por consiguiente, el uso del código de barras de ADN puede representar un primero paso hacia una delimitación más eficiente de las especies (De Ley *et al.*, 2005; Derycke *et al.*, 2007; Derycke *et al.*, 2008).

Las diferencias morfológicas durante las etapas del desarrollo ontogénico, el dimorfismo sexual y la existencia de especies crípticas nos pueden llevar a identificaciones erróneas (Platt y Warwick, 1983; Knowlton, 1993; Genaro, 1998; Fialho *et al.*, 2000; Knowlton, 2000; Powers, 2004; Bickford *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2007). Dichas diferencias son aún más problemáticas en organismos pequeños como los nemátodos marinos y pueden hacer más difícil el proceso de identificación (Rocha-Olivares *et al.*, 2001; Bhadury *et al.*, 2006a). Para poder evitar esos problemas es necesario mucha experiencia por parte de los taxónomos así como herramientas analíticas que permitan una mejor resolución en la identificación, como es la microscopía electrónica de barrido y la óptica de contraste de fases en diferentes planos focales (De Ley, 2000; De Ley *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006a; Derycke *et al.*, 2006; 2007; Bhadury *et al.*, 2008; Derycke *et al.*, 2008; Holovachov *et al.*, 2008).

En el presente estudio, encontramos algunas discordancias entre las identificaciones morfológicas y genéticas. En el caso de *Trileptium* sp4 (en Cerritos), *Enoploides* (en San Felipe) y *Mesacanthion* (en Santa Clara), se hipotetizó la existencia de dos posibles morfoespecies basado en diferencias morfológicas en cada uno de ellos. Sin embargo, estas

posibles morfoespecies fueron idénticas genéticamente en ambos genes (18S y 28S). Las incongruencias pudieron deberse a varias causas. Una de ellas pudo ser que los caracteres morfológicos que elegimos para diferenciar los organismos en dos posibles morfoespecies (ancho del cuerpo, presencias de setas somáticas por el cuerpo) no son realmente caracteres determinantes en la separación específica, como en el caso del género *Trileptium*. Otra es que los caracteres que si son importantes en la delimitación de las especies (espícula, posición de la vulva, número y forma de las mandíbulas) hayan mostrado plasticidad fenotípica, fenómeno común dentro del grupo Nematoda, como ocurrió en *Enoploides* y *Mesacanthion* (Kammenga *et al.*, 1997; Coomans, 2002; Nadler, 2002; Powers, 2004; Derycke *et al.*, 2008). Finalmente, es posible que las posibles morfoespecies sean realmente linajes independientes pero que los genes utilizados no presentaron la resolución taxonómica adecuada, es decir, que no han divergido lo suficiente para diferenciarlas. Estos aspectos se profundizan a continuación.

La metodología para la identificación de los nemátodos marinos está basada principalmente en caracteres morfológicos de organismos machos, ya que ellos presentan algunas características que permiten una mejor diferenciación entre las especies (De Ley *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006a; Bhadury *et al.*, 2008). La ausencia de machos en una muestra impide realizar las comparaciones apropiadas entre los organismos lo que limita el poder de identificación. Esto podría aplicarse en el caso del género *Trileptium* sp4 en la localidad de Cerritos, en cual identificamos sólo hembras y dos juveniles. Diferencias en la forma del cuerpo, en las setas cefálicas y largos y anchos nos llevó a pensar que los juveniles podrían ser otra posible morfoespecie diferente a la de las hembras. El caso anterior ilustra el problema de la ausencia de organismos de ambos sexos en las muestras, algo común en la identificación de la nematofauna marina.

Mesacanthion y *Enoploides* presentaron diferencias morfológicas entre organismos adultos, diferencias que podrían ser consideradas importantes en la separación de las especies. Para el género *Mesacanthion*, una de las posibles especies presentó mandíbulas bien desarrolladas y un mayor ancho en la parte anterior del cuerpo, sin embargo las secuencias fueron idénticas entre todos los organismos secuenciados. Una situación semejante presentó el género *Enoploides* en el cual se encontraron diferencias morfológicas

entre los dos machos identificados pero ambos organismos junto con las demás hembras compartieron una sola secuencia para cada gen.

Los genes 18S y 28S son considerados genes relativamente conservados comparados a otras regiones del genoma, como son el COX I mitocondrial y los ITS nucleares, por lo que no es impensable que puedan tener una resolución limitada para resolver las relaciones entre especies que hayan divergido muy recientemente. En contraparte, especies muy similares morfológicamente, como fue el caso de *Trileptium* sp1 con *T. sp2* y de *T. sp3* con *T. sp5*, presentaron diferencias genéticas principalmente para el gen 28S (entre *T. sp3* y *T. sp5* fue de 1.06% para el gen 18S y 12.09% para el 28S). Floyd y colaboradores consideraron que divergencias mayores al 0.5 % entre las secuencias podrían representar MOTUs distintas en su trabajo evaluando la diversidad de nemátodos a través del código de barras de ADN (450 pb del gen 18S). De Ley y colaboradores (2005) también reportan diferencias del 1.0% al 5.0% entre las secuencias del 28S para separar a las especies. No obstante, estudios de códigos de barras con genes más variables, como es el caso del COX I, han demostrado que la gran mayoría de las especies (> 95%) presentaron secuencias únicas para dicha región (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b; Hebert *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005). En este estudio, las divergencias para ambos genes siempre fueron superiores al 1% y fueron suficientes para diferenciar organismos cercanamente relacionados como las posibles morfoespecies de *Trileptium* y representantes de la familia Oncholaimidae (p. ej. *Oncholaimus*, *Metoncholaimus* y *Viscosia*). Por lo tanto, creemos que la explicación más plausible y parsimonia para la discordancia entre la taxonomía tradicional basada en la morfología y la genética molecular reside en la interpretación de la variabilidad morfológica a la luz de los cambios ontogenéticos (juveniles, adultos, machos y hembras) y de la plasticidad fenotípica de los caracteres taxonómicos. Evidentemente, la evaluación rigurosa de la influencia de los genes en la discordancia morfológica-genética requiere de un análisis evolutivo molecular más profundo que cuantifique la heterogeneidad en las tasas de evolución molecular de estos genes en los diversos linajes estudiados.

VI.3 Resolución taxonómica y congruencia de los genes

Por lo general, las filogenias construidas a partir de los genes 18S y 28S utilizando los diferentes métodos (PM, VM y VC) fueron congruentes, lo que nos indica cierta robustez de los datos moleculares. Los árboles filogenéticos siempre presentaron tres clados principales consistentes con el arreglo taxonómico de los organismos. Uno de ellos estuvo formado por los representantes de la familia Thoracostomopsidae que se mostró monofilética en todas las reconstrucciones apoyadas por altos valores de bootstrap, excepto en aquellas realizadas con VM y VC a partir del gen 28S. También se observaron algunas pequeñas diferencias entre los métodos de reconstrucción para el gen 28S. Mientras el árbol con PM mostró a la familia Oncholaimidae monofilética, en los árboles con VM y VC resultó parafilética con respecto a la familia Enchilidiidae ya que incorporó *Pareurystomina* como un taxón hermano de *Viscosia*. Esa relación filogenética es contradictoria a la morfología y taxonomía de estos organismos, ya que pertenecen a familias distintas, aunque forman parte de la misma superfamilia (Oncholaimoidea) (Platt y Warwick, 1983).

Se ha manifestado que la filogenia de Nematoda a partir de datos moleculares ha diferido fuertemente con la clasificación morfológica del Filum. Nadler (1992), al comparar los genes 18S y 28S, mostró que la filogenia de la superfamilia Ascaridoidea (nemátodos parásitos) no es totalmente consistente con la clasificación morfológica más aceptada. No obstante, Blaxter y colaboradores (1998) identificaron la existencia de 5 clados principales para el grupo utilizando el gen 18S, todos incluyendo especies de nemátodos parásitos, lo que es totalmente contradictorio con la clasificación morfológica que separa nemátodos marinos, terrestre y parásitos en diferentes clados. Para estos autores, la evolución morfológica convergente dentro del grupo puede ser más compleja por lo que ellos sugieren una revisión de los grandes órdenes dentro del Filum Nematoda. En un trabajo más reciente, en el cual se incorporaron 46 especies de nemátodos marinos, Meldal y colaboradores (2007) reconociendo lo artificial de la clase Secernentea (clase que actualmente incluye a los nemátodos parásitos y terrestres) la reclasificaron y la hundieron dentro del orden Rhabditida. Por ende, las reinterpretaciones de la evolución de los

nemátodos a la luz de la evidencia genética abarca desde los grandes grupos taxonómicos hasta los géneros y especies.

Aunque los estudios anteriores han demostrado que mucho de la clasificación taxonómica clásica dentro del grupo Nematoda basada en la interpretación de los caracteres morfológicos puede ser incongruente con los resultados de la sistemática molecular, en nuestro caso las contradicciones se limitaron al clado Oncholaimoidea (entre los árboles PM vs. VM y VC del gen 28S). Estas diferencias pueden ser debidas a: (1) los diferentes supuestos involucrados en los diferentes métodos de reconstrucción. PM es un método más simple y con menos suposiciones, por lo que considera que el árbol con el menor número de pasos representará la filogenia más cercana a la verdadera, VM implica el uso de un modelo evolutivo que toma en cuenta otros supuestos más cercanos a la realidad (p. ej. diferentes tasas de sustitución y proporción de nucleótidos). Para el árbol de VC, las distancias utilizadas también se obtuvieron a través de VM, lo que puede explicar la total concordancia con el árbol de VM (Nei y Kumar, 2000); (2) una representación taxonómica insuficiente de la familia Enchilidiidae (representada solamente por *Pareurystomina*). Es posible que las relaciones alrededor del ancestro común de Oncholaimidae y Enchilidiidae requieran de una mayor representación taxonómica que permita definir los caracteres sinapomórficos de Enchilidiidae ya que con un sólo organismo es imposible establecer cuales son los estados derivados compartidos dentro de la familia (Hajibabaei *et al.*, 2007). Un número mayor de géneros de la familia Enchilidiidae podría mejorar la resolución filogenética del nodo en cuestión y ayudar a corroborar o refutar con mayor confiabilidad la monofilia recíproca de las dos familias, Oncholaimidae y Enchilidiidae.

Al comparar los genes 18S y 28S, la única diferencia topológica consistió en la posición del género *Rhabdodemia*. Mientras que el gen 28S lo ubicó en el clado con Enoplida y *Thalassironus* (en todos los árboles), en el árbol del gen 18S *Rhabdodemia* aparece como un taxón hermano de la familia Oncholaimidae. La filogenia del orden Enoplida basada en la morfología (Lorenzen, 1981) ubica la familia Rhabdonemaniidae en una posición más cercana a la familia Tripyloidae. Según la búsqueda de similitud en GenBank, nuestro Enoplido no identificado (n.i.) a nivel de familia ni de género (Tabla VI) presentó una gran similitud (94%) con el género *Tripyloides* (Tripyloidae), lo que

posiblemente explicaría la relación con el género *Rhabdodemia*, ya que ambos pertenecen al suborden Tripyloidina. Además, los valores de bootstrap fueron mayores para la monofilia del clado (*Rhabdodemia*, Enoplida no identificado y *Thalassironus*) que los asociados a la relación con Oncholaimidae.

No fue posible rechazar la hipótesis nula de congruencia al comparar las topologías de los árboles proporcionadas por ambos genes, lo que nos permitió agrupar los datos para estimar una nueva filogenia basada en todos los caracteres. Otros estudios han mencionado que cuando los genes muestran congruencia en sus topologías, estos podrían ser utilizados conjuntamente en un análisis filogenético para obtener una mejor resolución de las relaciones existentes entre los taxa (Hipp *et al.*, 2004).

En nuestro caso, el árbol obtenido con ambos genes bajo el criterio de PM no fue muy distinto de aquellos árboles PM estimados con los genes 18S y 28S separadamente. Sin embargo, *Rhabdodemia* volvió a relacionarse con Enoplida y *Thalassironus*, lo que nos indica que el fragmento amplificado del gen 18S (aproximadamente 350 pb) no presenta la señal filogenética suficiente para resolver las relaciones filogenéticas más basales (p. ej. Subórdenes y superfamilias). La variabilidad del gen 18S fue menor que la del 28S, 43% y 69% de sitios variables, respectivamente. Sin embargo, los valores del IC mostraron que el gen 18S es más informativo que el 28S, a pesar de su menor tamaño. Los estudios de filogenia enfocados a las relaciones filogenéticas como entre clases y órdenes, han utilizado fragmentos de ADN mayores que los utilizados en este trabajo con el fin de buscar una mejor resolución (Blaxter *et al.*, 1998; Baldwin *et al.*, 2004; De Ley *et al.*, 2005; Meldal *et al.*, 2007). Quizás, se podría obtener una mejor filogenia a partir de ambos genes reajustando el modelo evolutivo o aplicando otros métodos algorítmicos (Hipp *et al.*, 2004; Zelwera y Daubina, 2004; Planet, 2006). En nuestro caso, el árbol de VM con el modelo evolutivo ajustado a ambos genes pudo resolver casi todas las relaciones dentro de la familia Thoracostomopsidae (muchos con valores altos de bootstrap), lo que nos indica que el mayor fragmento resultante de los dos genes asociado a un modelo evolutivo adecuado resultó en una filogenia más clara, al menos para dicha familia.

VII. CONCLUSIÓN

Aunque la resolución de estos genes no fue suficiente para resolver totalmente la filogenia de los taxa identificados, ambas regiones fueron igualmente útiles como códigos de barras de ADN debido a que: (1) sus topologías (posición de las secuencias en los árboles) fueron congruentes; (2) la resolución molecular en la identificación fue la misma (presentaron el mismo número de entidades moleculares en las diferentes morfoespecies); (3) ambos fueron reproducibles vía PCR en laboratorio.

La caracterización taxonómica de la nematofauna marina hasta un nivel específico, implica la medición y análisis de varios parámetros morfológicos, adicionales a los realizados en el presente estudio. Esto, además de requerir experiencia, nos indica la importancia de infraestructura adecuada para la identificación. La alternativa para superar en parte esta limitante, la ofrece la aplicación del código de barras de ADN, esta herramienta minimizar el esfuerzo involucrado en todo el proceso de identificación de las especies (Blaxter, 2003; Blaxter, 2004; Janzen *et al.*, 2005). Además, el código de barras de ADN tiene la ventaja de que puede ser aplicado a los organismos en los diferentes estadios de su desarrollo, ya sean machos o hembras. Indudablemente que una vez superados los aspectos técnicos para la aplicación práctica del código de barras de ADN, esta herramienta contribuirá en gran parte a disminuir la incertidumbre en la identificación de la nematofauna marina (Floyd *et al.*, 2002; Bhadury *et al.*, 2006a; Bhadury *et al.*, 2008; Derycke *et al.*, 2008).

Es importante resaltar que los dos enfoques, morfológico y molecular, no son excluyentes, por lo contrario, deben de ser utilizados en conjunto para conocer mejor la diversidad así como comprender las relaciones existentes entre las especies (De Ley *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2008). Por consiguiente, se considera necesario fortalecer la infraestructura taxonómica de la nematofauna marina, es decir, consolidar una red de trabajo, para que el código de barras de ADN funcione con éxito. Finalmente, la aplicación de un enfoque holístico nos podría ayudar a evaluar mejor la diversidad dentro del grupo Nematoda, principalmente en lugares en donde estudios como estos son incipientes.

VIII. Referencias

- Austen, M.C. 2004. Natural nematode communities are useful tools to address ecological and applied questions. *Nematology Monographs and Perspectives*. 2:1-17.
- Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, London. 511 pp.
- Baldwin, J.G., Nadler, S.A., Adams, B.J. 2004. Evolution of plant parasitism among nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 42:83-105.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. 2008. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 36:25-30.
- Bermingham, E., Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*. 7:367-369.
- Bernardi, G., Findley, L., Rocha-Olivares, A. 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution*. 57:1599-1609.
- Bhadury, P., Austen, M., Bilton, D., Lamshead, P., Rogers, A., Smerdon, G. 2006a. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series*. 320:1-9.
- Bhadury, P., Austen, M., Bilton, D., Lamshead, P., Rogers, A., Smerdon, G. 2008. Evaluation of combined morphological and molecular techniques for marine nematode (*Terschellingia* spp.) identification. *Marine Biology*. 154:509-518.
- Bhadury, P., Austen, M.C., Bilton, D.T., Lamshead, P.J.D., Rogers, A.D., Smerdon, G.R. 2005. Combined morphological and molecular analysis of individual nematodes through short-term preservation in formalin. *Molecular Ecology Notes*. 5:965-968.
- Bhadury, P., Melanie, C.A., Bilton, D.T., Lamshead, P.J.D., Alex, D.R., Gary, R.S. 2006b. Molecular detection of marine nematodes from environmental samples: overcoming eukaryotic interference. *Aquatic Microbial Ecology*. 44:97-103.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 22:148-155.
- Blaxter, M. 1998. *Caenorhabditis elegans* is a Nematode. *Science*. 282:2041-2046.
- Blaxter, M. 2003. Counting angels with DNA. *Nature*. 421:122-124.

- Blaxter, M., Elsworth, B., Daub, J. 2004. DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 271:189-192.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., Abebe, E. 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 360:1935-1943.
- Blaxter, M.L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 359:669-679.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. 392:71-75.
- Blouin, M.S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology*. 32:527-531.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B. 1998. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Molecular Biology and Evolution*. 15:1719-1727.
- Bongers, T., Ferris, H. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*. 14:224-228.
- Boucher, G., Lamshead, P.J.D. 1995. Ecological Biodiversity of Marine Nematodes in Samples from Temperate, Tropical, and Deep-Sea Regions. *Conservation Biology*. 9:1594-1604.
- Brusca, R.C., Hendrickx, M.E. 2004. Invertebrate biodiversity in the Gulf of California in Gulf of California Conference, Tucson, Arizona.
- Castillo-Fernández, D., Decramer, W. 1993. *Cheironchus paravorax* n. sp. and *Cheironchus vorax* Cobb, 1917 from the Campeche Sound, an oil producing zone in the Gulf of Mexico (Nemata: Selachinematidae). *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Biologie*. 63:55-64.
- Castillo-Fernandez, D., Lamshead, P.J.D. 1990. Revision of the genus *Elzalia* Gerlach, 1957 (Nematoda: Xyalidae) including three new species from an oil producing zone in the Gulf of Mexico, with a discussion of the sibling species problem. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*. 56:63-71.

- Chandler, G.T., Fleeger, J.W. 1983. Meiofaunal colonization of azoic estuarine sediment in Louisiana: Mechanisms of dispersal. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 69:175-188.
- Chen, P., Roberts, P.A., Metcalf, A.E., Hyman, B.C. 2003. Nucleotide substitution patterning within the *Meloidogyne* rDNA D3 region and its evolutionary implications. *Journal of Nematology*. 35:404-410.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31:3497-3500.
- Chilton, N.B., Huby-Chilton, F., Gasser, R.B. 2003. First complete large subunit ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: phylogenetic and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*. 17:33-39.
- Chilton, N.B., Huby-Chilton, F., Gasser, R.B., Beveridge, I. 2006. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:118-128.
- Clarke, K.R., Gorley, R.N. 2001. PRIMER v5: User manual/tutorial, PRIMER-E. Plymouth. 91 pp.
- Cook, A.A., Bhadury, P., Debenham, N.J., Meldal, B.H.M., Blaxter, M.L., Smerdon, G.R., Austen, M.C., Lamshead, P.J.D., Rogers, A.D. 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) as a tool for identification of marine nematodes. *Marine Ecology Progress Series*. 291:103-113.
- Coomans, A. 2002. Present status and future of nematode systematics. *Nematology*. 4:573-582.
- Dawson, M.N., Raskoff, K.A., Jacobs, D.K. 1998. Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 7:145-152.
- De Jesús-Navarrete, A. 1993. Distribucion, abundancia y diversidad de los nemátodos (Phylum Nematoda) benticos de la Sonda de Campeche, Mexico. Enero 1987. *Revista de Biología Tropical*. 41:57-63.
- De Jesús-Navarrete, A. 2003. Diversity of Nematoda in a caribbean atoll: Banco Chincorro, Mexico. *Bulletin of Marine Science*. 73:47-56.
- De Jesús-Navarrete, A. 2007a. Littoral free living nematode fauna of Socorro Island, Colima, Mexico. *Hidrobiológica*. 17:61-66.

- De Jesús-Navarrete, A. 2007b. Nemátodos de los arrecifes de Isla Mujeres y Banco Chinchorro, Quintana Roo, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 42:193-200.
- De Jesús-Navarrete, A., Gómez, J.H. 1999. Nematofauna asociada a la zona urbana de la bahía de Chetumal, Quintana Roo, México. *Revista de Biología Tropical*. 47:867-875.
- De Jesús-Navarrete, A., Herrera-Gómez, J. 2002. Vertical distribution and feeding types of nematodes from Chetumal Bay, Quintana Roo, Mexico. *Estuaries and Coasts*. 25:1131-1137.
- De Ley, P. 2000. Lost in worm space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity. *Nematology*. 2:9-16.
- De Ley, P. 2006. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. In: Fitch, D.H.A. (ed) WormBook. The *C. elegans* Research Community, WormBook.
- De Ley, P., Bert, W. 2002. Video capture and editing as a tool for the storage, distribution and illustration of morphological characters of nematodes. *Journal of Nematology*. 34:296-302.
- De Ley, P., De Ley, I.T., Morris, K., Abebe, E., Mundo-Ocampo, M., Yoder, M., Heras, J., Waumann, D., Rocha-Olivares, A., Jay Burr, A.H., Baldwin, J.G., Thomas, W.K. 2005. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 360:1945-1958.
- Derycke, S., Backeljau, T., Vlaeminck, C., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Vincx, M., Moens, T. 2006. Seasonal dynamics of population genetic structure in cryptic taxa of the *Pellioiditis marina* complex (Nematoda: Rhabditida). *Genetica*. 128:307-321.
- Derycke, S., Backeljau, T., Vlaeminck, C., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Vincx, M., Moens, T. 2007. Spatiotemporal analysis of population genetic structure in *Geomonhystera disjuncta* (Nematoda, Monhysteridae) reveals high levels of molecular diversity. *Marine Biology*. 151:1799-1812.
- Derycke, S., Fonseca, G., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Vincx, M., Moens, T. 2008. Disentangling taxonomy within the *Rhabditis (Pellioiditis) marina* (Nematoda, Rhabditidae) species complex using molecular and morphological tools. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 152:1-15.
- Derycke, S., Remerie, T., Vierstraete, A., Backeljau, T., Vanfleteren, J., Vincx, M., Moens, T. 2005. Mitochondrial DNA variation and cryptic speciation within the free-living marine nematode *Pellioiditis marina*. *Marine Ecology Progress Series*. 300:91-103.

- Dorris, M., De Ley, P., Blaxter, M.L. 1999. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology Today*. 15:188-193.
- Ekrem, T., Willassen, E., Stur, E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43:530-542.
- Farris, J.S., Kallersjo, M., Kluge, A.G., Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics*. 10:315-319.
- Farris, J.S., Kallersjo, M., Kluge, A.G., Bult, C. 1995. Constructing a Significance Test for Incongruence. *Systematic Biology*. 44:570-572.
- Fenton, B., Malloch, G., Germa, F. 1998. A study of variation in rDNA ITS regions shows that two haplotypes coexist within a single aphid genome. *Genome*. 41:337-345.
- Fialho, R.F., Rocha, C.F.D., Vrcibradic, D. 2000. Feeding ecology of *Tropidurus torquatus*: ontogenetic shift in plant consumption and seasonal trends in diet. *Journal of Herpetology*. 34:325-330.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., Blaxter, M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*. 11:839-850.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek., R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3:294-299.
- Fonseca, G., Vanreusel, A., Decraemer, W. 2006. Taxonomy and biogeography of *Molgolaimus* Ditlevsen, 1921 (Nematoda: Chromadoria) with reference to the origins of deep sea nematodes. *Antarctic Science*. 18:23-50.
- Gallucci, F., Steyaert, M., Moens, T. 2005. Can field distributions of marine predacious nematodes be explained by sediment constraints on their foraging success? *Marine Ecology Progress Series*. 304:167-178.
- Genaro, J.A. 1998. Distribution and synonymy of some caribbean bees of the genera *Megachile* and *Coelioxys* (Hymenoptera: Megachilidae). *Caribbean Journal of Science*. 34:151-152.
- Gheskiere, T., Hoste, E., Vanaverbeke, J., Vincx, M., Degraer, S. 2004. Horizontal zonation patterns and feeding structure of marine nematode assemblages on a macrotidal, ultra-dissipative sandy beach (De Panne, Belgium). *Journal of Sea Research*. 52:211-226.

- Gilligan, M. 1980. Beta diversity of a Gulf of California rocky-shore fish community. *Environmental Biology of Fishes*. 5:109-116.
- Gomez, A., Snell, T.W. 1996. Sibling species and cryptic speciation in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Journal of Evolutionary Biology*. 9:953-964.
- Gómez, A., Wright, P.J., Lunt, D.H., Cancino, J.M., Carvalho, G.R., Hughes, R.N. 2007. Mating trials validate the use of DNA barcoding to reveal cryptic speciation of a marine bryozoan taxon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 274:199-207.
- Greenslade, P., Nicholas, W. 1991. Some Thoracostomopsidae (Nematoda: Enoplida) from Australia, including descriptions of two new genera and diagnostic keys. *Invertebrate Taxonomy*. 4:1031-1052.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D.A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*. 23:167-172.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., Dewaard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270:313-321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:14812-14817.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., Dewaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270:96-99.
- Heip, C., Vincx, M.V., G. 1985. The ecology of marine nematodes. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 23:399-489.
- Hendrickx, M.E. 1996. Habitats and biodiversity of decapod crustaceans in the SE Gulf of California, Mexico. *Revista de Biología Tropical*. 44:603-617.
- Hipp, A.L., Hall, J.C., Sytsma, K.J. 2004. Congruence versus phylogenetic accuracy: revisiting the incongruence length difference test. *Systematic Biology*. 53:81-89.
- Holovachov, O., Tandingan De Ley, I., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J.G., Rocha-Olivares, A., De Ley, P. 2008. Nematodes from the Gulf of California. Part 1. The genera *Ceramonema* Cobb, 1920, *Pselionema* Cobb in Cobb, 1933 and *Pterygonema* Gerlach, 1954 (Nematoda: Ceramonematidae). *Nematology*. 10:347-373.

- Holterman, M., Van Der Wurff, A., Van Den Elsen, S., Van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution*. 23:1792-1800.
- Janzen, D.H., Hajibabaei, M., Burns, J.M., Hallwachs, W., Remigio, E., Hebert, P.D.N. 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 360:1835-1845.
- Jensen, P. 1986. The nematode fauna in the sulphide-rich brine seep and adjacent bottoms of the East Flower Garden, NW Gulf of Mexico. III. Enoplida. *Zoologica Scripta*. 15:93-99.
- Jonge, V.N., Bouwman, L.A. 1977. A simple density separation technique for quantitative isolation of meiobenthos using the colloidal silica Ludox-TM. *Marine Biology*. 42:143-148.
- Kammenga, J.E., Koert, P.H.G.V., Koeman, J.H., Bakker, J. 1997. Fitness consequences of toxic stress evaluated within the context of phenotypic plasticity. *Ecological Applications*. 7:726-734.
- Kampfer, S., Sturmbauer, C., Ott, J. 1998. Phylogenetic analysis of rDNA sequences from adenophorean nematodes and implications for the Adenophorea-Secernentea controversy. *Invertebrate Biology*. 117:29-36.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 24:189-216.
- Knowlton, N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia*. 420:73-90.
- Lamshead, P.J.D. 1993. Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis*. 19:5-24.
- Lamshead, P.J.D., Boucher, G. 2003. Marine nematode deep-sea biodiversity - hyperdiverse or hype? *Journal of Biogeography*. 30:475-485.
- Lewis, O.T. 2006. Review. Climate change, species-area curves and the extinction crisis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 361:163-171.
- Litvaitis, M.K., Bates, J.W., Hope, W.D., Moens, T. 2000. Inferring a classification of the Adenophorea (Nematoda) from nucleotide sequences of the D3 expansion segment (26/28S rDNA). *Canadian Journal of Zoology*. 78:911-922.

- Long, E.O., David, I.B. 1980. Repeated Genes in Eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*. 49:727-764.
- Lorenzen, S. 1981. Entwurf eines phylogenetischen systems der freilebenden nematoden. 7. Veröffentlichungen des Institut für Meeresforschungen Bremerhaven, 472 pp.
- Maddison, D.R., Schulz, K.-S., Maddison, W.P. 2007. The tree of life web project. *Zootaxa*. 1668:19-40.
- Martín-Sánchez, J., Díaz, M., Artacho, E., Valero, A. 2003. Molecular arguments for considering *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) a complex of sibling species. *Parasitology Research*. 89:214-220.
- May, R.M. 1988. How many species are there on Earth? *Science*. 241:1441-1449.
- Meldal, B.H.M., Debenham, N.J., De Ley, P., De Ley, I.T., Vanfleteren, J.R., Vierstraete, A.R., Bert, W., Borgonie, G., Moens, T., Tyler, P.A., Austen, M.C., Blaxter, M.L., Rogers, A.D., Lamshead, P.J.D. 2007. An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42:622-636.
- Moens, T., Herman, P., Verbeeck, L., Steyaert, M., Vincx, M. 2000. Predation rates and prey selectivity in two predacious estuarine nematode species. *Marine Ecology Progress Series*. 205:185-193.
- Moens, T., Verbeeck, L., Vincx, M. 1999. Feeding biology of a predatory and a facultatively predatory nematode (*Enoploides longispiculosus* and *Adoncholaimus fuscus*). *Marine Biology*. 134:585-593.
- Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J.G. 1996. A preliminary inventory of marine nematodes from the Sea of Cortez, Mexico. *Nematropica*. 26:293-294.
- Mundo-Ocampo, M., Lamshead, P., Debenham, N., King, I., De Ley, P., Baldwin, J., De Ley, I., Rocha-Olivares, A., Waumann, D., Thomas, W., Packer, M., Boucher, G. 2007. Biodiversity of littoral nematodes from two sites in the Gulf of California. *Hydrobiologia*. 586:179-189.
- Nadler, S.A. 1992. Phylogeny of some ascaridoid nematodes, inferred from comparison of 18S and 28S rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 9:932-944.
- Nadler, S.A. 2002. Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. *Nematology*. 4:615-625.

- Nadler, S.A., Carreno, R.A., Mejía-Madrid, H., Ullberg, J., Pagan, C., Houston, R., Hugot, J.P. 2007. Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology*. 134:1421-1442.
- Nadler, S.A., De Ley, P., Mundo-Ocampo, M., Smythe, A.B., Patricia Stock, S., Bumbarger, D., Adams, B.J., De Ley, I.T., Holovachov, O., Baldwin, J.G. 2006. Phylogeny of Cephalobina (Nematoda): Molecular evidence for recurrent evolution of probolae and incongruence with traditional classifications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40:696-711.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York. 333 pp.
- Nicholas, W.L. 1993. Two new species of nematode (Nematoda: Enoplida: Thoracostomopsidae) from Lake Alexandrina, South Australia. *Transactions of the Royal Society of South Australia*. 117:163-170.
- Nicholas, W.L. 2002. Ultrastructure of the head of *Okranema eileenae* Greenslade and Nicholas, 1991 (Thoracostomopsidae: Nematoda). *Journal of Nematology*. 34:50-61.
- Nicholas, W.L. 2004. *Oxyonchus longisetosus* n. sp. *Oxyonchus evelynae* n. sp. and *Oxyonchus culcitatus* Wieser, 1959 (Thoracostomopsidae: Enoplida: Nematoda) from Australian ocean beaches, together with observations on the variability of taxonomic characters and a key to species of the genus *Oxyonchus*. *Hydrobiologia*. 511:47-64.
- Nicholas, W.L. 2007. A new species of *Trileptium* (Nematoda, Thoracostomopsidae) from a sandy beach in southeastern Australia, with a key to species and observations on geographical distribution. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 41:335-344.
- Nicholas, W.L., Marples, T.G. 1995. Observations on the geographical distribution and morphometrics of *Enoploides stewarti* Nicholas, 1993 (Nematoda; Thoracostomopsidae). *Biologie*. 65:41-51.
- Nieberding, C., Libois, R., Douady, C.J., Morand, S., Michaux, J.R. 2005. Phylogeography of a nematode (*Heligmosomoides polygyrus*) in the western Palearctic region: persistence of northern cryptic populations during ice ages? *Molecular Ecology*. 14:765-779.
- Nieberding, C.M., Durette-Desset, M.C., Vanderpoorten, A., Casanova, J.C., Ribas, A., Defontaine, V., Feliu, C., Morand, S., Libois, R., Michaux, J.R. 2008. Geography and host biogeography matter for understanding the phylogeography of a parasite. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 47:538-554.

- Oliveira, C.M.G., Hubschen, J., Brown, D.J.F., Ferraz, L.C.C.B., Wright, F., Neilson, R. 2004. Phylogenetic relationships among *Xiphinema* and *Xiphidorus* nematode species from Brazil inferred from 18S rDNA sequences. *Journal of Nematology*. 36:153-159.
- Parker, P.G., Allison, A.S., Schug, M.D., Booton, G.C., Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79:361-382.
- Paterson, H.E.H. 1991. The recognition of cryptic species among economically important insects. In: Zalucki, M.P. (ed) In Heliopsis: Research Methods and Prospects. Springer-Verlag, p 1-10
- Perlman, S.J., Spicer, G.S., Shoemaker, D.D., Jaenike, J. 2003. Associations between mycophagous *Drosophila* and their *Howardula* nematode parasites: a worldwide phylogenetic shuffle. *Molecular Ecology*. 12:237-249.
- Pfenninger, M., Staubach, S., Albrecht, C., Streit, B., Schwenk, K. 2003. Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O.F. Müller, 1774). *Molecular Ecology*. 12:2731-2745.
- Planet, P.J. 2006. Tree disagreement: Measuring and testing incongruence in phylogenies. *Journal of Biomedical Informatics (Methodological Review)*. 39:86-102.
- Platt, H.M., Warwick, R.M. 1983. Freelifving Marine Nematodes: Part 1. British Enoplids. 28. Cambridge. Univ. Press., 307 pp.
- Platt, H.M., Warwick, R.M. 1988. Freelifving Marine Nematodes: Part II. British Chromadorida. 38. Brill., 502 pp.
- Posada, D., Buckley, T. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*. 53:793-808.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14:817-818.
- Powers, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*. 42:367-383.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N. 2007. Bold: the barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*. 7:355-364.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43:223-225.

- Rocha-Olivares, A., Fleeger, J.W., Foltz, D.W. 2001. Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod. *Molecular Biology and Evolution*. 18:1088-1102.
- Rocha-Olivares, A., Fleeger, J.W., Foltz, D.W. 2004. Differential tolerance among cryptic species: a potential cause of pollutant-related reductions in genetic diversity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23:2132-2137.
- Rocha-Olivares, A., Vetter, R.D. 1999. Effects of oceanographic circulation on the gene flow, genetic structure, and phylogeography of the rosethorn rockfish (*Sebastes helvomaculatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 56:803-813.
- Rusin, L.Y., Aleshin, V.V., Vladychenskaya, N.S., Milyutina, I.A., Kedrova, O.S., Petrov, N.B. 2001. Trefusiidae are a subtaxon of marine Enoplida (Nematoda): evidence from primary structure of Hairpin 35 and 48 Loops of SSU rRNA gene. *Molecular Biology*. 35:778-784.
- Sáez, A.G., Lozano, E. 2005. Body doubles.cryptic species: as we discover more examples of species that are morphologically indistinguishable, we need to ask why and how they exist. *Nature*. 433:111.
- Seutin, G., Boag, B.N.W.P.T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*. 69:82-90.
- Smythe, A.B., Sanderson, M.J., Nadler, S.A. 2006. Nematode small subunit phylogeny correlates with alignment parameters. *Systematic Biology*. 55:972-992.
- Somerfield, P., Warwick, R. 1996. Meiofauna in marine pollution monitoring programmes. A laboratory manual. Directorate of Fisheries Research (MAFF), Lowestoft (UK). 71 pp.
- Sonnenberg, R., Nolte, A., Tautz, D. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology*. 4:1-12.
- Steyaert, M., Garner, N., Gansbeke, D.V., Vincx, M. 1999. Nematode communities from the North Sea: environmental controls on species diversity and vertical distribution within the sediment. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 79:253-264.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*. 53:796-797.
- Swedmark, B. 1964. The interstitial fauna of marine sand. *Biological Reviews*. 39:1-42.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599.
- Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., De Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., Jannasch, H.W. 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:1994-2007.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25:4876-4882.
- Tita, G., M.Vincx, Desrosiers, G. 1999. Size spectra, body width and morphotypes of intertidal nematodes: an ecological interpretation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 79:1007-1015.
- Todaro, M.A., Fleeger, J.W., Hu, Y.P., Hrinkevich, A.W., Foltz, D.W. 1996. Are meiofaunal species cosmopolitan? Morphological and molecular analysis of *Xenotrichula intermedia* (Gastrotricha: Chaetonotida). *Marine Biology*. 125:735-742.
- Traunspurger, W. 2000. The biology and ecology of lotic nematodes. *Freshwater Biology*. 44:29-45.
- Ullberg, J., Ólafsson, E. 2003. Free-living marine nematodes actively choose habitat when descending from the water column. *Marine Ecology Progress Series*. 260:141-149.
- Vranken, G., Herman, P.M.J., Vincx, M., Heip, C. 1986. A re-evaluation of marine nematode productivity. *Hydrobiologia*. 135:193-196.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 360:1847-1857.
- Warwick, R.M., Platt, H.M., Agard, K.R.C.J., Gobind, J. 1990. Analysis of macrobenthic and meiobenthic community structure in relation to pollution and disturbance in Hamilton Harbour, Bermuda. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 138:119-142.
- Warwick, R.M., Platt, H.M., Somerfield, P.J. 1998. Freelifving marine nematodes: Part III. British Monhysterida. 53. Field Studies Council, Shrewsbury, UK. 296 pp.
- Waugh, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*. 29:188-197.

- Wetzel, M., Weber, A., Giere, O. 2002. Re-colonization of anoxic/sulfidic sediments by marine nematodes after experimental removal of macroalgal cover. *Marine Biology*. 141:679-689.
- Wieser, W. 1959. The effect of grain size on the distribution of small invertebrates inhabiting the beaches of Puget Sound. *Limnology and Oceanography*. 4:181-194.
- Yoder, M., Ley, I.T.D., King, I.W., Mundo-Ocampo, M., Mann, J., Blaxter, M., Poiras, L., Ley, P.D. 2006. DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology*. 8:367-376.
- Zelwera, M., Daubina, V. 2004. Detecting phylogenetic incongruence using BIONJ: an improvement of the ILD test. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33:687-693.