

TESIS DEFENDIDA POR
ARELY MARTINEZ ARCE
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Director del Comité

Dr. Manuel Mundo Ocampo

Miembro del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Miembro del Comité

Dra. Silvia Emilia Ibarra Obando

Miembro del Comité

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera

Coordinador del Posgrado en Ecología

Marina

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ECOLOGIA MARINA**

**CONTRIBUCION AL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN PARA LA EVALUACIÓN DE
LA DIVERSIDAD DE NEMÁTODOS MARINOS DE VIDA LIBRE EN DOS
LOCALIDADES DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

TESIS

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

Presenta:

ARELY MARTÍNEZ-ARCE

Ensenada, Baja California, México, Septiembre 2008.

RESUMEN de la tesis de Arely Martínez Arce, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, México. Septiembre, 2008.

CONTRIBUCIÓN AL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN PARA LA EVALUACIÓN DE
LA DIVERSIDAD DE NEMÁTODOS MARINOS DE VIDA LIBRE EN DOS
LOCALIDADES DEL GOLFO DE CALIFORNIA

Resumen aprobado por:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Director de Tesis

A nivel global, en la actualidad se han descrito a nivel de especie al menos 1.5 millones de especies y poco se conoce del número total de especies existentes. Con base en estimaciones especulativas, se piensa que sólo se ha podido identificar aproximadamente el 10% de ellas. Más aun, el número de especies descritas podría ser una subestimación del número real de especies, debido a la existencia de especies crípticas. La utilización de herramientas como el “Código de Barras de ADN” (CB-ADN) mediante la secuenciación de genes estandarizados presenta ciertas ventajas sobre la identificación tradicional, ofreciendo un diagnóstico eficiente y rápido en la identificación de especies para el conocimiento de la biodiversidad. En este estudio se evaluó la diversidad de nemátodos marinos en dos localidades del Golfo de California, utilizando de forma complementaria análisis morfológicos y genéticos para su identificación. Se identificó morfológicamente a un total de 83 individuos pertenecientes a 55 morfoespecies. De éstas 47 pudieron determinarse taxonómicamente en 32 géneros y 15 familias. Se logró secuenciar a 27 individuos de 25 morfoespecies, encontrándose que la amplificación de un fragmento parcial de ~400 pares de bases tuvo un mayor éxito que la del fragmento total D2A-D3B, por lo que este fragmento podría ser utilizado en futuras investigaciones del “Código de barras de ADN”. Secuencias idénticas o muy similares corroboraron la identificación morfológica de organismos pertenecientes a la misma especie (*Oncholaimus* sp n = 4, *Viscosia* sp2 n = 2 y *Chromadora* sp1 n=2). Las topologías filogenéticas obtenidas mediante métodos distintos (parsimonia máxima y vecino más cercano) fueron concordantes y varios linajes presentaron altos (> 90%) valores de “bootstrap” no paramétrico. No obstante, la presencia de algunas incongruencias sugiere que es necesario incrementar el número de algunos taxa subrepresentados. La importancia de conocer la identidad de todos los organismos no sólo reside en cuantificar la diversidad existente, sino también en entender los patrones y procesos ecológicos y evolutivos que la producen y la mantienen. La aplicación del CB-ADN permitirá realizar investigaciones más eficientes en áreas como la ecología, la genética y la biología entre otras.

Palabras clave: Nemátodos marinos, Código de Barras de ADN, Golfo de California

ABSTRACT of the thesis presented by Arely Martínez Arce as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. September, 2008.

CONTRIBUTING TO THE DNA BARCODING OF FREE LIVING MARINE
NEMATODES FOR THE ASSESSMENT OF DIVERSITY IN TWO LOCALITIES OF THE
GULF OF CALIFORNIA

At global level, at least 1.5 million species have been described to date and little is known about the total number of existing species. Speculative estimations suggest that only about 10% of all the species have been described. This figure could be underestimated, due to the existence of cryptic species. The use of tools such as the DNA Barcoding (DNA-BC) by means of sequences of standardized genes presents certain advantages over traditional morphological identification, and offers an efficient and fast diagnosis in the identification of species for assessing biodiversity. In this study we evaluated the diversity of marine nematodes in two localities of the Gulf of California, using complementarily morphologic and genetic analyses for their identification. We identified 83 individuals in 55 morpho-species. From these, only 47 could be taxonomically determined in 37 genera and 15 families. It was possible to obtain DNA sequence data from 27 individuals in 21 morpho-species. We found that the success in amplification and sequencing of a partial ~400 bp fragment was greater than of the larger (~ 700bp) D2A-D3B fragment. We suggest that this smaller fragment could be used in future DNA-BC research. Identical or very similar sequences corroborated the morphologic identification of organisms from the same morpho-species (*Oncholaimus* sp n = 4, *Viscosia* sp n =2 and *Chromadora* sp1 n=2). Phylogenetic topologies obtained by different methods (Maximum Parsimony and Neighbor Joining) were concordant and several lineages presented high (> 90%) values of non-parametric “bootstrap” support. Nevertheless, the presence of some incongruent relationships suggests the need to increase the number of some under-represented taxa. The importance of knowing the identity of all organisms not only resides in the need to quantifying the existing diversity, but also in understanding the ecological and evolutionary patterns and processes responsible for producing and maintaining it. Application of the DNA-BC will improve the efficiency of research in areas such as ecology, genetics and biology among others.

Key words: Marine nematodes, DNA Barcoding, Gulf of California

Dedicatorias

A toda mi familia, en especial a mis padres Gloria y Ramiro por estar tan cerca de mí y dejarme cumplir mis sueños siempre. A mis hermanos Maurico y Poletth por todo su apoyo a pesar de la distancia, los quiero mucho gracias por todo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi estancia en el posgrado

Al proyecto SEMARNAT-CONACYT 2004-C01-300 por el apoyo para la realización de esta investigación

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

Al Dr. Paul De Ley y a la Dra. Irma T. De Ley por su ayuda, consejos y apoyo en el laboratorio molecular, durante nuestra estancia en la universidad de Riverside California.

A mi director de tesis Dr. Axayácatl Rocha, por todo su apoyo, orientación, sugerencias y comentarios para mejorar este trabajo. Por darme la oportunidad de aprender el área de la genética molecular, mil gracias por todo.

Al comité de tesis, Dra. Meritxell, Dra. Silvia y Dr. Manuel, por el apoyo y orientación durante esta investigación.

A mis compañeros del laboratorio de ecología molecular, Carina, Jimena, Yuma, Iris, Nancy e Ismael gracias por sus comentarios y observaciones. En especial a Nancy e Ismael por su ayuda en las pruebas de secuenciación en la última etapa del trabajo

A los queridísimos nematólogos Tiago y Ruth, por su ayuda, observaciones, consejos, reuniones de discusión, y sobre todo por su amistad, mil gracias chicos.

A Erick Gonzalez Medina por la realización del mapa del área de estudio.

A todos los amigos del posgrado, Sandrita (Gallito), Jimena, Jushiro, Omar, Mix, Hector, Amayali, por las pláticas y fiestas.

A los pájarólogos (Miguel, Ulises y Alfredo) gracias por su amistad y hacer mi estancia más amena durante estos 2 años.

A Erick por su apoyo, amistad y cariño durante esta caminata, por estar ahí en todo momento y darme ánimos para seguir adelante, te quiero mucho gracias por todo cosito.

CONTENIDO

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	xvi
I. Introducción	1
<i>I.1 La taxonomía</i>	1
<i>I.2 Las herramientas moleculares</i>	2
<i>I.3 Los Nemátodos</i>	3
II. Antecedentes	5
<i>II.1 El Código de Barras de ADN</i>	5
<i>II.3 El Código de Barras de ADN en Nemátodos</i>	7
<i>II.4 Retos y oportunidades en el conocimiento de la biodiversidad microscópica</i>	8
III. Justificación	9
IV. Objetivos	10
<i>IV.1 General</i>	10
<i>IV.2 Particulares</i>	10
V. Hipótesis	11
VI. Metodología	11
VI.1 Área de estudio	11
<i>VI.1.1 Golfo de California</i>	12
<i>VI.1.2 Golfo de Santa Clara</i>	12
<i>VI.1.3 La Paz Baja California</i>	13
VI.2 Trabajo de campo	15
VI.3 Trabajo de laboratorio de bentos	15
<i>VI.3.1 Separación de los nemátodos del sedimento</i>	15
<i>VI.3.2. Selección de taxa para extracción de ADN</i>	16
<i>VI.3.3. Video edición y captura de imágenes digitales para especímenes “voucher”</i>	16
<i>VI.3.4. Identificación taxonómica</i>	17
VI.4 Trabajo de laboratorio molecular	18
<i>VI.4.1 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN</i>	18
<i>VI.4.2 Diseño de oligonucleótidos</i>	20
VI. 5 Análisis de datos	22
<i>VI. 5.1 Edición de secuencias</i>	22
<i>VI. 5.2 Análisis moleculares</i>	22
<i>VI. 5.2.1 Alineamiento de las secuencias</i>	22

VI. 5.2.2 Árboles filogenéticos.....	22
VII. Resultados.....	24
VII.1 Diversidad morfológica.....	24
VII.1.1 Número de taxa identificados.....	24
VII.1.2 Recuento taxonómico.....	29
VII.2. ORDEN ENOPLIDA.....	29
VII.2.1 Familia Thoracostomopsidae, Lorenzen, 1981.....	29
VII.2.1.1 <i>Mesacanthion</i> Filipjev, 1927.....	29
VII. 2. 2. Familia Phanodermatidae Filipjev, 1927.....	31
VII. 2.2.1. <i>Phanoderma</i> Bastian, 1865.....	31
VII. 2.3. Familia Ironidae De Man, 1876.....	33
VII. 2.3.1 <i>Trissonchulus</i> Cobb, 1920.....	33
VII. 2.4. Familia Ocholaimidae, Filipjev, 1916.....	35
VII.2.4.1 <i>Meyersia</i> Hopper, 1967.....	35
VII.2.4.2. <i>Oncholaimus</i> , Dujardin, 1845.....	36
VII. 2.4.3. <i>Viscosia</i> De Man, 1980.....	36
VII. 2.5. Familia Rhabdodemaniidae Filipjev, 1934.....	45
VII. 2.5.1 <i>Rhabdodemia</i> Baylis & Daubney, 1926.....	45
VII. 3. ORDEN CHROMADORIDA.....	47
VII.3.1 Familia Chromadoridae Filipjev, 1917.....	47
VII.3.1.1 <i>Chromadora</i> Bastian, 1865.....	47
VII.3.1.2. <i>Dichromadora</i> Kreis, 1929.....	53
VII.3.1.3 <i>Rhips</i> Cobb, 1920 / <i>Actinonema</i> Cobb, 1920.....	58
VII.3.1.4 <i>Spilophorella</i> Filipjev, 1917.....	58
VII.3.2. Familia Comesomatidae Filipjev, 1918.....	63
VII.3.2.1. <i>Dorylaimopsis</i> Ditlevsen, 1918.....	63
VII.3.2.2. <i>Sabatieria</i> Rouville, 1903.....	63
VII.3.3. Familia Cyatholaimidae Filipjev, 1918.....	68
VII.3.3.1. <i>Acanthonchus</i> Cobb 1920.....	68
VII.3.3.2 <i>Pomponema</i> Cobb, 1917.....	68
VII.3.3.3 <i>Praeacanthonchus</i> Micoletzky, 1924.....	69
VII.3.4. Familia Selachinematidae Cobb, 1915.....	73
VII.3.4.1. <i>Gammanema</i> Cobb, 1920.....	73
VII.3.4.2 <i>Halichoanolaimus</i> De Man, 1886.....	73
VII.3.4.3. <i>Richtersia</i> Steiner, 1916.....	74
VII.3.5 Familia Desmodoridae Filipjev, 1922.....	78
VII.3.5.1 <i>Catanema</i> Cobb, 1920.....	78
VII.3.5.2 <i>Desmodora</i> (Filipjev, 1922).....	78
VII.3.5.3. <i>Metachromadora</i> Filipjev, 1918.....	79
VII.3.5.4. <i>Spirinia</i> Gerlach, 1963.....	79
VII.3.6. Familia Microlaimidae Micoletzky, 1922.....	87
VII.3.6.1. <i>Microlaimus</i> De Man, 1880.....	87
VII.3.7. Familia Ceramonematidae Cobb, 1933.....	89
VII.3.7.1. <i>Ceramonema</i> Cobb, 1920.....	89
VII.4. ORDEN MONHYSTERIDA.....	93
VII.4. 1. Familia Xyalidae Chitwood, 1951.....	93

VII.4. 1. 1. <i>Daptonema</i> Cobb, 1920	93
VII.4. 1. 2. <i>Omicronema</i> Cobb, 1920	94
VII.4. 1. 3. <i>Promonhystera</i> Wieser, 1956.....	94
VII.4. 1. 4. <i>Rhynchonema</i> Cobb, 1920	95
VII.4. 1. 5. <i>Xyala</i> Cobb, 1920.....	95
VII.4. 2.1. <i>Siphonolaimus</i> De Man, 1893	106
VII.5. Familia Axonolaimidae Filipjev, 1918	108
VII.5.1 <i>Odontophora</i> Butschli, 1874.....	108
VII. 5 Resultados moleculares.....	110
VII.5.1 Éxito en la extracción y amplificación del ADNr.....	110
VII.5.2 Análisis filogenéticos.....	113
VIII. Discusión	117
VIII.1 Variabilidad morfológica y diversidad de nemátodos marinos	117
VIII.2 Las herramientas moleculares.....	121
VIII.3. Congruencia entre la taxonomía tradicional y la genética molecular	123
VIII.2. El “Código de barras de ADN” para la identificación de nemátodos marinos	125
IX. Conclusiones.....	128
X. Referencias.....	130
XI. Apéndices	141
XI. 1. Técnica de Seinhorst para montajes permanentes.....	141
XI. 2Tecnica de flotacion con ludox.....	142

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. El Código de Barras de ADN permitirá realizar diversos estudios de taxonomía, filogenética molecular y genética de poblaciones, además de ser un método útil para el descubrimiento de especies crípticas (Modificado de Hajibabaei <i>et al.</i> , 2007).....	6
Figura 2. Mapa de las estaciones de muestreo en ambas localidades, Alto Golfo de California y La Paz B.C.S.....	14
Figura 3. Procedimiento simplificado para la extracción de los organismos del sedimento mediante la técnica de flotación.	17
Figura 5. <i>Mesacanthion</i> sp. (Estación “El Tornillal”). Individuo juvenil. a) Región cefálica; b) Parte anterior; c) Región lateral del cuerpo mostrando el patrón cuticular; d) Cuerpo total.	30
Figura 6. <i>Phanoderma</i> sp (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo hembra. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Región cloacal de un individuo hembra; d) Región vulvar.	32
Figura 7. <i>Trissonchulus</i> sp (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. a) Parte anterior; b) Parte posterior, región cloacal; c) Región anterior, cabeza; d) Región dorsal mostrando el patrón cuticular.....	34
Figura 8. Oncholaimidae sp1. (Estación “Santa Clara”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Parte posterior, región cloacal; d) Cuerpo total.	37
Figura 9. Oncholaimidae sp2. (Estación “El Esterito”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Cuerpo total.....	38

Figura 10. Oncholaimidae sp3. (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a) Parte anterior del cuerpo, evidenciando la cavidad bucal; b) Región cefálica; c) Parte posterior del cuerpo.	39
Figura 11. Oncholaimidae sp4. (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo, evidenciando la cavidad bucal; b) Región cefálica; c) Parte posterior del cuerpo.	40
Figura 12. Oncholaimidae sp5. (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a) Parte anterior del cuerpo, evidenciando la cavidad bucal; b) Región cefálica; c) Parte posterior del cuerpo, región cloacal; d) Cuerpo total.	41
Figura 13. <i>Meyersia</i> sp (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a, b) Región cefálica; c) Parte posterior, región cloacal; d) Parte anterior evidenciando la cavidad bucal.	42
Figura 14. <i>Oncholaimus</i> sp (Localidad La Paz B.C.S.) a y c Individuo juvenil; b y d Individuo hembra. a, b) Región cefálica; c) Parte posterior, región cloacal; d) Parte posterior, región cloacal.....	43
Figura 15. <i>Viscosia</i> sp (Estación “El Tornillal”). Individuo juvenil. a) Parte anterior de un individuo juvenil; b) Región cefálica; c) Parte dorsal mostrando la cutícula ligeramente estriada; d) Región anal, cola en forma cónica.	44
Figura 16. <i>Rhabdodemia</i> sp (Estación “El Tornillal”). Individuo macho a) Región anterior; b) Región cefálica; c) Región cloacal; d) Región posterior de un individuo macho.....	46
Figura 17. Chromadoridae sp1 (Estación “El Esterito”) Individuo macho. a) Parte anterior, patrón cuticular; b) Región cefálica; c); d) Región posterior; d) Región cloacal.	49

Figura 18. <i>Chromadoridae</i> sp2 (Estación “El Conchalito”) Individuo juvenil. a) Parte anterior mostrando un bulbo doble; b) Región cefálica; c) Cuerpo total.	50
Figura 19. <i>Chromadora</i> sp1 (Estación “El Conchalito”) Individuo macho. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región bucal; c) Parte posterior de un individuo macho; d) Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular.....	51
Figura 20. <i>Chromadora</i> sp 2 (Estación “El Esterito”). Individuo macho. a) Región cefálica de un individuo macho; b) Parte anterior; c) Región cloacal; d) Parte posterior.	52
Figura 21. <i>Dichromadora</i> sp1 (Estación “El Burro”). Individuo hembra. a) Parte anterior del cuerpo; b) Parte anterior mostrando del cuerpo; c) Parte posterior mostrando la cola de una hembra; d) Parte ventral del cuerpo mostrando el patrón cuticular.	54
Figura 22. <i>Dichromadora</i> sp2 (Estación “El Burro”). Individuo hembra. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Región media del cuerpo, mostrando la vulva; d) Parte posterior.....	55
Figura 23. <i>Dichromadora</i> sp3 (Estación “El Conchalito”). Individuo macho. a) Parte superior del cuerpo; b) Parte posterior de un individuo macho; c) Parte superior mostrando el patrón cuticular.	56
Figura 24. <i>Dichromadora</i> sp4. (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo, evidenciando el esófago; b) Parto dorsal del cuerpo, mostrando el patrón cuticular; c) Cuerpo total; d) Parte posterior del cuerpo, región cloacal.....	57
Figura 25. <i>Rhyps/ Actinonema</i> sp (Estación “Santa Clara”). Individuo juvenil. a, b) Parte anterior de un individuo juvenil; c) Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular; d) Región posterior mostrando la cola.....	60

- Figura 26. *Spilophorella* sp1 (Estación “El Burro”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica mostrando el patrón cuticular; c) Región cefálica; d) Parte posterior. 61
- Figura 27. *Spilophorella* sp2 (Estación “Ensenada de La Paz”) Individuo juvenil a) Parte anterior; b) Región cefálica; c) Región cloacal; d) Región anterior del cuerpo mostrando el patrón cuticular. 62
- Figura 28. *Dorylaimopsis* sp (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo hembra. a) Parte anterior, vista ventral; b) Región cefálica; c) Parte anterior mostrando el patrón cuticular con diferenciación lateral; d) Región vulvar, vista ventral..... 65
- Figura 29. *Sabatieria* sp 1 (Estación “El Tornillal”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo de un individuo juvenil; b) Región cefálica; c) Cola en forma cónica de un individuo juvenil, mostrando las setas terminales. 66
- Figura 30. *Sabatieria* sp2 (Estación “La Ensenada de La Paz”). Individuo juvenil a) Región cefálica; b) Parte anterior; c) Región dorsal mostrando el patrón cuticular; d) Región posterior de un individuo juvenil. 67
- Figura 31. *Acantonchus* sp (“Estación “Ensenada de La Paz”). Individuos macho y hembra. a) Parte dorsal mostrando el patrón cuticular; b, c y d) Región cefálica; e) Región vulvar; f) Región cloacal de un individuo macho. 70
- Figura 32. *Pomponema* sp (Estación “El Tornillal”). Individuo juvenil. a) Parte anterior; b) Región de la cavidad bucal; c) Región cefálica; d) Parte posterior mostrando la región cloacal de un individuo juvenil. 71
- Figura 33. *Praeacanthonchus* sp (Estación “Ensenada de la Paz”). Individuo macho. a, b) Región cefálica de un individuo macho; c) Región cloacal; d) Parte posterior. 72

- Figura 34. *Gammanema* sp (Estación “El Burro”) Individuo macho. a) Cabeza de un individuo macho; b) Región cloacal; c) Parte dorsal mostrando el patrón cuticular; d) Región cefálica mostrando la cavidad bucal. 75
- Figura 35. *Halichoanolaimus* sp (Estación “Ensenada de La Paz”) a,c,d,e, Individuo hembra; b, Individuo macho. a) Región cefálica de una hembra b) Parte cloacal de un macho; c) Región cefálica de un macho; d) Parte posterior de un individuo hembra; e) Región vulvar. 76
- Figura 36. *Richtersia* sp (Estación “El Burro”) Individuo macho. a, b) Región anterior; c) Región media del cuerpo, vista ventral mostrando el patrón cuticular; d) Cuerpo total; e) Región cloacal de un individuo macho..... 77
- Figura 37. *Catanema* sp (Estación “Santa Clara”). Individuo juvenil. a) Parte anterior; b) Región cefálica; c) Parte posterior de un individuo juvenil; d) Cuerpo total. 81
- Figura 38. *Desmodora* sp1 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. a) Parte anterior de un individuo macho; b) Parte anterior mostrando la cavidad bucal; c) Región cloacal de un macho mostrando la espícula; d) Parte posterior mostrando la cola..... 82
- Figura 39. *Desmodora (Desmodorella) tenuispiculum* (Estación “El Burro”) a y b Individuo macho; c y d Individuo hembra. a, b) Parte anterior de y Región cloacal de un individuo macho respectivamente; c, d) Parte anterior y parte posterior de una hembra. 83
- Figura 40. *Metachromadora* sp1 (Estación “El Burro”). Individuo macho. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Esófago mostrando el bulbo; d) Parte posterior de un macho, cola en forma de punta. 84

Figura 41. <i>Metachromadora</i> sp2 (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a, b) Parte anterior del cuerpo; c) Región cefálica; d) Región cloacal de un individuo macho.	85
Figura 42. <i>Spirinia</i> sp (Estación “Santa Clara”). Individuo juvenil. a) Parte anterior; b) Región cefálica; c) Región anterior, d) Cuerpo total de un individuo juvenil.	86
Figura 43. <i>Microlaimus</i> sp (Estación “El Esterito”). Individuo hembra. a,b) Parte anterior del cuerpo de un individuo hembra; c) Región cloacal y vulvar, d) Cuerpo total.	88
Figura 44. <i>Ceramonema</i> sp1 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. a) Parte superior de cuerpo; b) Parte superior mostrando un patrón cuticular; c) Parte posterior, cola de individuo en forma cónica.....	90
Figura 45. <i>Ceramonema</i> sp2 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. a) Región anterior del cuerpo; b) Patrón cuticular, parte dorsal del cuerpo; c) Parte posterior; d) Región cloacal de un individuo macho.	91
Figura 46. <i>Ceramonema</i> sp3 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. a) Región cefálica; b) Parte del cuerpo mostrando el patrón cuticular, vista lateral; c) Región cloacal, d) Región posterior, mostrando la cola.....	92
Figura 47. Xyalidae sp1. (Estación “EL Burro”). Individuo hembra. a) Región cefálica; b) Parte anterior del cuerpo; c) Región vulvar; d) Cuerpo total.....	96
Figura 48. <i>Daptonema</i> sp1 (Estación “El Esterito”). Individuo macho. a) Región cefálica de un individuo macho; b) Parte anterior; c) Región cloacal; d) Cuerpo total.	97
Figura 49. <i>Daptonema</i> sp2 (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a) Región cefálica; b) Cuerpo total; c) Región cloacal; d) Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular.	98

Figura 50. <i>Omicronema</i> sp (Estación “El Tornillal”) Individuo juvenil. a). Región cefálica; b) Región anterior; c) Región anterior mostrando la cutícula; d) Parte posterior mostrando la región posterior cloacal.....	99
Figura 51. <i>Promonhystera</i> sp (Estación “El Burro”). Individuo juvenil. a) Parte anterior; b) Cavidad bucal; c) Región cefálica; d) Región cloacal de un individuo macho, vista ventral; e) Región cloacal de un individuo juvenil; f) Cola.	100
Figura 52. <i>Rhynchonema</i> sp. (Estación “Santa Clara”). Individuo macho. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Parte lateral del cuerpo mostrando el patrón cuticular; d) Región cloacal.....	101
Figura 53. <i>Xyala</i> sp1 (Estación “El Burro”). Individuo juvenil. a) Región cefálica mostrando la cavidad bucal; b) Región anterior del cuerpo; c) Parte del cuerpo mostrando el patrón cuticular, vista dorsal; d) Región posterior del cuerpo.	102
Figura 54. <i>Xyala</i> sp2 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. a) Región cefálica mostrando la cavidad bucal; b) Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular; c) Región anterior; d) Parte posterior, región cloacal.....	103
Figura 55. <i>Xyala</i> sp3 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. a, b) Región anterior del cuerpo; c) Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular; d) Parte posterior, región cloacal.	104
Figura 56. <i>Xyala</i> sp4 (Estación Santa Clara). Individuo juvenil. a) Región cefálica mostrando la cavidad bucal; b) Parte anterior del cuerpo; c) Parte posterior, región cloacal; d) Cuerpo total.....	105
Figura 57. <i>Siphonolaimus</i> sp1 (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Parte ventral mostrando el patrón cuticular; d) Parte anterior.	107

Figura 58. *Odontophora* sp (Estación “El Burro”). Individuo macho. a) Parte anterior; b) Región cefálica; c) Región cefálica; d) Parte posterior, región cloacal. 109

Figura 59. Árbol filogenético del vecino más cercano (VC). Reconstruido con secuencias del gen 28S ADNr de nemátodos marinos de este estudio y de De Ley *et al.*, (2005); estos últimos identificables por su número de acceso de Genbank. Los órdenes se encuentran codificados en color: Enóplida (azul), Chromadorida (verde), Monhysterida (rojo), Rhabditida (negro). Las letras entre paréntesis (p.ej., a,b,c) se refieren a secuencias provenientes de una misma morfoespecie. 115

Figura 60. Árbol filogenético del parsimonia máxima (VM). Reconstruido con secuencias del gen 28S ADNr de nemátodos marinos de este estudio y de De Ley *et al.*, (2005); estos últimos identificables por su número de acceso de Genbank. Los órdenes se encuentran codificados en color: Enóplida (azul), Chromadorida (verde), Monhysterida (rojo), Rhabditida (negro). Las letras entre paréntesis (p.ej., a,b,c) se refieren a secuencias provenientes de una misma morfoespecie. 116

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Perfil de termociclado para la amplificación del gen 28S.....	19
Tabla II. Géneros de nemátodos marinos de vida libre identificados dentro de los tres grandes ordenes de nemátodos marinos.....	25
Tabla III. Géneros de nemátodos marinos de vida libre identificados en la localidad del Alto Golfo de California.....	27
Tabla IV. Géneros de nemátodos marinos de vida libre identificados en la localidad de La Paz Baja California Sur.....	28
Tabla V. Organismos de los tres grandes ordenes de nemátodos marinos amplificados y secuenciados con las diferentes combinaciones de cebadores diseñados. Las celdas grises representan reacciones fallidas.	111

I. Introducción

I.1 La taxonomía

Actualmente, el interés por conocer el número de especies ha aumentado considerablemente debido a que la tasa de extinción de especies amenazadas parece ser mayor que aquella a la que se descubren y describen (Blaxter, 2004). Por esta razón, es probable que la diversidad aún no catalogada quede ignorada, dado que los ecosistemas están sufriendo un deterioro acelerado por las actividades humanas, lo que ha provocado la desaparición total de algunas especies y una tasa de extinción que se estima sin precedentes (De Ley, 2000; Schander & Willassen, 2005; Crisci, 2006). El conocimiento de las especies también es relevante para la reconstrucción de su historia evolutiva, que es indispensable conocer para entender mejor los patrones y procesos que han producido y mantenido la diversidad de especies observadas en la actualidad (Coomans, 2002; Nadler, 2002).

Desafortunadamente, el interés por la taxonomía (Sistemática) ha disminuido por diversas razones, principalmente por la falta de apoyo a las colecciones y a los proyectos en taxonomía, sin embargo, la diversidad morfológica comparativa es una disciplina fundamental para entender aspectos sobre biología funcional y evolución fenotípica. Además, es una herramienta básica en estudios sobre diversidad, incluyendo la descripción de especies. A nivel global, en la actualidad se han descrito al menos 1.5 millones de especies (Blaxter, 2003; Blaxter, 2004); correspondientes a alrededor de más de un millón de géneros (Hebert *et al.*, 2003b). A pesar de la magnitud de esta diversidad, poco se conoce del número real de especies existentes (Blaxter, 2003). Se especula que de un número estimado de entre 10 y 15 millones de especies, sólo se ha podido describir aproximadamente el 10% de ellas (Hebert *et al.*, 2003b; Hammond, 1992).

En el campo de la taxonomía de nemátodos marinos existe una escasez de expertos, por lo que su avance es cada vez más lento (Comans, 2002). Se considera un área inmadura, debido a que los estudios realizados sobre la diversidad de nemátodos marinos se restringen a pocas áreas geográficas. En consecuencia, las claves de identificación

taxonómica disponibles incluyen tan solo aquellas especies de las regiones estudiadas (Platt & Warwick, 1983; Platt & Warwick, 1988; Warwick *et al.*, 1998); por lo que el conocimiento de su diversidad en el resto del mundo es limitado. Por otro lado, al igual que en otros organismos microscópicos, se ha revelado que gran parte de la clasificación histórica de estas especies ha sido realizada con instrumentos de resolución insuficiente (De Ley, *et al.*, 1999).

1.2 Las herramientas moleculares

Las herramientas tradicionales para la identificación de los organismos presentan ciertas limitantes para el conocimiento de la biodiversidad, particularmente cuando la infraestructura taxonómica es insuficiente, mientras que las herramientas moleculares son cada vez más utilizadas ya que ofrecen una alternativa rápida para la identificación específica. Estas herramientas son particularmente útiles en aquellos organismos de gran abundancia y difícil observación, como en los nemátodos o en aquellos organismos en los que la identificación morfológica es difícil debido a su estado de conservación (Cook, *et al.*, 2005).

Con la ayuda de estas herramientas moleculares, se ha logrado descubrir la existencia de especies crípticas, es decir, especies morfológicamente idénticas pero genéticamente diferentes (Rocha-Olivares *et al.*, 2001), lo cual sugiere que la cantidad de especies descritas hasta ahora se encuentra subestimada (Coomas, 2002; Hebert *et al.*, 2003a). Los datos moleculares también permiten la reconstrucción de la historia evolutiva de las especies, utilizando herramientas de la sistemática filogenética molecular, esto es particularmente valioso para las especies sin registro fósil como los nemátodos (Lamshead, 2004).

Actualmente, la secuenciación del ADN ha sido útil para la implementación de métodos como el “Código de Barras de ADN” (CB-ADN), el cual incluye secuencias de una región específica de un gen conservado dentro de las especies, por ende dicha región

presenta poca variabilidad intraespecífica pero diferencias significativas entre las especies (Ratnasingham & Hebert, 2007). En consecuencia, unos pocos individuos son suficientes para caracterizar la variabilidad genética diagnóstica de cada especie (Cook *et al.*, 2005). Este método que podría funcionar de manera análoga a la etiqueta que tienen los productos en el supermercado, permitiendo una rápida y eficiente identificación de los organismos, sin el esfuerzo de observación microscópica detallada de cada espécimen. Esta estrategia, agilizará el trabajo de identificación de numerosas investigaciones ecológicas (Hebert *et al.*, 2003b; Bhadury *et al.*, 2006).

El CB-ADN de organismos microscópicos como los nemátodos marinos, requiere del ensamblaje de distintas metodologías, por lo que se ha desarrollado la utilización de otras herramientas como la Edición y Video Captura de imágenes digitales (VCE siglas en inglés) para la descripción e identificación de las especies. Este método presenta ciertas ventajas sobre la metodología tradicional, ya que permite obtener un registro digital de los organismos. Este registro es valioso para aquellos organismos que son destruidos al efectuarse los análisis moleculares (De Ley & Bert, 2002; Blaxter *et al.*, 2005; De Ley *et al.*, 2005). Las imágenes obtenidas con este método (VCE) pueden ser utilizadas para capacitación en la identificación de organismos, manejo o acceso en línea de “especímenes virtuales” registrados en colecciones taxonómicas. La integración de ambas metodologías (CB-ADN y VCE) podrá no sólo facilitar la descripción e identificación de especies, sino también generar información genética y morfológica sobre ellas para estudios comparativos posteriores (De Ley *et al.*, 1999; Coomans, 2002).

1.3 Los Nemátodos

Los nemátodos son organismos abundantes que han podido colonizar prácticamente todos los hábitats. Son un grupo evolutivamente exitoso debido a su capacidad de adaptación y a características tales como: un tamaño pequeño (organismos ~ 1 mm o menos), una cutícula resistente y pequeñas variaciones en la estructura de su cuerpo (forma de la cola y cavidad bucal, el patrón cuticular, entre otras) (Heip *et al.*, 1985; Platt, 1989;

Lamshead, 1993; De Ley, 2000; Blaxter, *et al.*, 2005; Coghlan, 2005). Existen organismos de vida libre que son encontrados en ambientes marinos, dulceacuícolas y terrestres, mientras que otros han desarrollado un estilo de vida parásita, asociados a una diversidad de plantas de plantas y animales, incluyendo al mismo hombre (Tchesunov *et al.*, 2000), algunos de ellos con una distribución cosmopolita. En el ambiente marino, estos organismos son encontrados en los sedimentos marinos, tanto finos como gruesos, presentando una distribución vertical, lo cual refleja la influencia de variables ecológicas, físicas y químicas que se encuentran en el sedimento (Giere, 1993; Wetzel *et al.*, 1995).

A pesar de que los nemátodos son organismos numerosos y ubicuos, no han sido estudiados con detalle. Estos organismos son componentes principales de la meiofauna, que por definición incluye a los organismos que habitan el sedimento y que son retenidos en un tamiz con poro de malla entre 500 y 63 μm (Heip *et al.*, 1985; Medal *et al.*, 2007). Altas densidades poblacionales de nemátodos marinos pueden ocupar 1 m^2 de sedimento y se ha reportado que la máxima densidad es encontrada en la zona intermareal (Chandler & Fleeger, 1983). Presentan una alta diversidad, difícil de cuantificar cuando la mayoría de las especies no se encuentran descritas. Aunque, se ha especulado que existen entre 0.1 y 100 millones de especies de nemátodos marinos (Grassle & Maciolek, 1992; Lamshead, 1993), se sabe que esta diversidad es menor (Blaxter, 2003).

La falta de conocimiento de la diversidad de nemátodos marinos de vida libre es debido a la escasa descripción de faunas locales, ya que la mayoría de los estudios realizados en estos organismos han tenido un enfoque ecológico (Heip *et al.*, 1985; Tita & Desrosiers, 1999; Warwick *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2006; Warwick *et al.*, 2006). Más recientemente se ha iniciado el estudio de la genética poblacional de un número limitado de especies (Blaxter *et al.*, 1998; Bloiun, 2002; Esteves, *et al.*, 2003; Derycke *et al.*, 2005). Sin embargo, sólo unos pocos se han enfocado a la descripción detallada de los organismos de una región y la mayor parte de este esfuerzo se ha realizado en países del norte de Europa –p. ej., Inglaterra y Bélgica (Platt & Warwick, 1983; Platt & Warwick, 1988; Warwick *et al.*, 1998).

II. Antecedentes

II.1 El Código de Barras de ADN

El Código de Barras de ADN, propuesto por Hebert *et al.*, (2003), es un método rápido y eficiente de identificación de organismos hasta el nivel de especie, mediante la utilización de secuencias de ADN de genes estándares. La importancia del CB-ADN esencialmente radica en revelar las diferencias genéticas diagnósticas que puedan ser utilizadas para la distinción de especies (Hebert *et al.*, 2004). En áreas como la taxonomía, este método podrá contribuir a la identificación de especímenes. Mientras que en la filogenia, los datos moleculares que se producen para el CB-ADN pueden servir para evaluar la sistemática de los grupos estudiados. A un nivel intraespecífico, el CB-ADN proporcionará un panorama general del patrón de diversidad genética dentro y entre poblaciones, lo cual facilitará estudios comparativos de diversidad poblacional en numerosas especies (Hajibabaei *et al.*, 2007) (Fig. 1). Este método podrá contribuir al estudio de la diversidad de un mayor número de individuos y en un futuro permitir a los taxónomos acelerar el paso para descubrir nuevas especies, así como también realizar la correcta clasificación de especies ya catalogadas y completar un “bioinventario” global.

El uso de metodologías como el CB-ADN para la identificación de especies es resultado del retraso en el conocimiento de la diversidad biológica, debido principalmente a ciertas limitaciones impuestas tanto por la biología de las especies como por el sistema tradicional del descubrimiento y descripción de especies. Entre estas limitaciones se encuentran: 1) La presencia de plasticidad fenotípica, paralelismo y convergencias evolutivas de los caracteres empleados para reconocer a las especies; 2) el ignorar la presencia de especies crípticas, presentes frecuentemente en muchos de los taxa; 3) la dependencia de claves de identificación morfológica cuya utilidad se restringe sólo a ciertos estadios de vida o géneros, lo cual provoca que muchos organismos no puedan ser identificados; y 4) el alto grado de experiencia y dominio de la anatomía de los organismos requerido para la utilización de las claves de identificación que, cuando no se tiene, con frecuencia lleva a una determinación incorrecta de las especies (Hebert *et al.*, 2003).

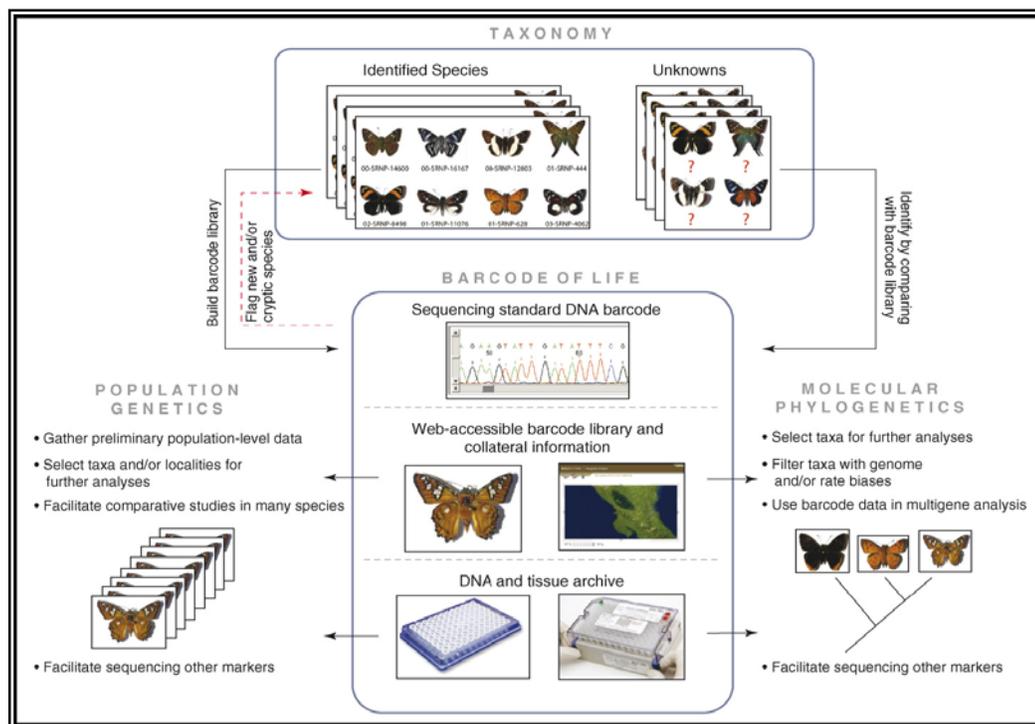


Figura 1. El Código de Barras de ADN permitirá realizar diversos estudios de taxonomía, filogenética molecular y genética de poblaciones, además de ser un método útil para el descubrimiento de especies crípticas (Modificado de Hajibabaei *et al.*, 2007).

II.2 Genes utilizados en el Código de Barras de ADN

Una consideración importante para la utilidad de un “buen” marcador, es su capacidad de discriminar entre especies cercanamente relacionadas (Sonnenberg, *et al.*, 2007). La propuesta original del consorcio del CB-ADN para la identificación hasta nivel de especie de numerosos taxa animales, consistió en proponer un código de barras “global estándar” consistente en un fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb), del gen mitocondrial que codifica la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (COI) (Hebert *et al.*, 2003 b). Diversos estudios han demostrado que el 95% de las especies poseen una secuencia única de dicho gen, por lo que se ha adoptado en diversos grupos taxonómicos (Hebert *et al.*, 2003 a,b; Armstrong & Ball, 2005; Janzen *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de que el gen COI ha sido de gran utilidad, su aplicación universal no ha

sido exitosa debido a que en algunos taxa no ha funcionado adecuadamente (p. ej. Nemátodos, Cnidarios, Crustáceos), por lo que ha sido necesario considerar la optimización de otros genes para ser utilizados como Código de Barras (Sonnenberg, *et al.*, 2007). En el caso de los Cnidarios y Crustáceos el gen COI no ha mostrado suficiente divergencia genética para separar a las especies, por lo que han sido propuestos los genes 18S 16S, 28S ITS del ADN ribosomal (ADNr) (Floyd *et al.*, 2002a; Hebert *et al.*, 2003b; Bhadury *et al.*, 2006).

II.3 El Código de Barras de ADN en Nemátodos

El desarrollo de un CB-ADN que incluya a toda la biota del planeta, se ha extendido a varios grupos de invertebrados marinos incluyendo los nemátodos (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert, *et al.*, 2003b; Blaxter, 2004; Hebert, *et al.*, 2004; Savolainen *et al.*, 2005). En este grupo taxonómico, se ha encontrado que el gen de la subunidad pequeña 18S del ADN ribosomal (SSU 18S ADNr) es un marcador efectivo y puede ser empleado para el “Código de Barras molecular” en grupos como los *Enoplidos*, *Araeolaimidos*, *Monhysteridos*, *Dorylaimidos* y *Chromodoridos*. Este gen también ha sido utilizado para la identificación de nemátodos terrestres, sobre todo en la especie *Plectus aquatilis*, observándose un 99.5% de similitud entre las secuencias de la misma especie (Floyd *et al.*, 2002b; Derycke *et al.*, 2005). Sin embargo, este no es el único gen que se ha utilizado para la identificación de nemátodos marinos, el gen de la subunidad grande 28S del ADNr (LSU 28S ADNr), específicamente de la región del gen denominada D2-D3 también ha sido utilizada para estos fines, y se ha observado que dos o más organismos identificados como una sola especie muestran un alto grado de divergencia entre ellos (Derycke *et al.*, 2005), lo cual sugiere que es necesaria la integración de diversos métodos para la identificación de especies.

II.4 Retos y oportunidades en el conocimiento de la biodiversidad microscópica

El conocimiento de la diversidad de los organismos pequeños (menores a 1 mm) es reducido, dado que presentan características que los hacen difíciles de identificar (Lamshead, 1993). Sin embargo, éstos representan el mayor porcentaje de la diversidad del planeta (De ley & Bert, 2002; Lamshead & Boucher, 2003), además de presentar especies crípticas mientras que la diversidad de organismos mayores, como la mayoría de los vertebrados, es mejor conocida.

La carencia de información del número real de especies y la presencia de especies crípticas representan un problema para el conocimiento de la biodiversidad. Por lo que el objetivo principal del código de barras de ADN es construir bibliotecas de referencia que contengan dichas secuencias para ayudar a la identificación y descubrimiento de las especies (Hebert *et al.*, 2003a, b; Blaxter, 2004; Blaxter *et al.*, 2005; De Ley *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2007).

En resumen, el CB-ADN representa una aproximación considerablemente prometedora para el diagnóstico de la diversidad biológica, sobre todo en aquellos taxa donde la morfología no es fácilmente observable. Este proyecto no pretende sustituir a las herramientas tradicionales, sino complementarlas, particularmente en los casos donde la identificación de los organismos se lleva a cabo por inexpertos en el área (Hebert *et al.*, 2003b; Ratnasingham & Hebert, 2007). Además, las secuencias de ADN que sirven como código de barras molecular pueden contribuir de forma importante en iniciativas como el proyecto “Árbol de la vida” o TOL (por sus siglas en inglés) el cual pretende reconstruir las relaciones filogenéticas de todos los individuos, así como, recavar información de la diversidad biológica que existe en el planeta (Maddison *et al.*, 2007).

III. Justificación

Existe un gran interés por conocer la diversidad biológica, sobretodo de aquellos organismos microscópicos que pueden pasar desapercibidos y extinguirse inadvertidamente como consecuencia de las actividades antropogénicas. Esto es particularmente crítico, en el caso de especies que tienen un papel fundamental en el ecosistema, como es el caso de los nemátodos marinos de vida libre que participan en el reciclamiento de la materia orgánica, y que son utilizados como fuente de alimento por niveles tróficos superiores.

Mas aún, los nemátodos marinos de vida libre pueden proporcionar información acerca del estado de “salud” de un ecosistema por la relación cercana que tienen con el sedimento, en donde generalmente se acumulan contaminantes. Dado que su cutícula es permeable y a que se encuentran en contacto directo con el ambiente, la estructura de sus comunidades frecuentemente refleja el grado de impacto del hábitat. Esta respuesta rápida a los disturbios ambientales los hace ser excelentes bioindicadores. Por lo anterior, se requiere conocer la identidad de las especies de nemátodos marinos de vida libre presentes en el ecosistema para entender las respuestas estructurales y funcionales de sus comunidades a cambios en el medio ambiente.

La poca información que existe acerca de los nemátodos marinos de vida libre es en parte reflejo de la carencia de herramientas que permitan su rápida y correcta identificación. Por ello el Código de Barras molecular, representa una forma rápida y eficiente para la identificación que podrá complementar las observaciones realizadas mediante microscopía tradicional. Además, tiene la ventaja de ser aplicado a cualquier estadio de vida, lo cual resulta una ventaja significativa ya que los caracteres de identificación morfológica de nemátodos marinos se basa en gran medida en caracteres sexuales secundarios que sólo poseen los organismos sexualmente maduros, imposibilitando la determinación taxonómica de juveniles. Finalmente, los datos moleculares generados para el Código de Barras, suelen ser de utilidad para estimar la filogenia de los organismos o para el estudio de la estructura genética de las poblaciones.

IV. Objetivos

IV.1 General

- Documentar la diversidad de nemátodos marinos intermareales de vida libre de dos localidades contrastantes del Golfo de California utilizando de forma complementaria “Código de barras de ADN” y registros morfológicos (fotos y VCE).

IV.2 Particulares

- Identificar los organismos morfológicamente hasta nivel genérico y separarlos en posibles morfoespecies.
- Amplificar y secuenciar el ADNr de los organismos representantes de cada morfoespecie.
- Determinar la posición filogenética y la monofilia de las secuencias provenientes de cada morfoespecie.
- Construir bases de datos moleculares y morfológicas de los organismos inventariados.

V. Hipótesis

Para este estudio se han planteado dos hipótesis de trabajo, la primera con referencia a la relación filética de los géneros identificados morfológicamente, y la segunda, respecto a la sistemática filogenética de las especies, basada en sus secuencias de ADN.

1) Las morfoespecies serán monofiléticas.

2) La posición filogenética de las nuevas secuencias con respecto a las secuencias de nemátodos disponibles en las bases de datos, concuerda con su identificación morfológica.

VI. Metodología

VI.1 Área de estudio

Las localidades seleccionadas para el muestreo fueron: el Golfo de Santa Clara ($31^{\circ} 37.170''$ N y $114^{\circ} 22.952''$ E), en donde se tomaron muestras en tres estaciones (“Santa Clara”, “El tornillal” y “El Burro”). El Golfo de Santa Clara, se encuentra dentro de la Reserva de la Biosfera del Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado en el estado de Sonora. La segunda localidad fue la Bahía de La Paz, Baja California Sur ($24^{\circ}10.367'$ N y $110^{\circ}18.401'$ E) de igual manera con tres estaciones de muestreo (“El Esterito”, “Ensenada de La Paz” y “El Conchalito”) (Fig. 2). Ambas localidades presentan características contrastantes, como son amplitud de marea, tipo de sedimento, oleaje, temperatura, salinidad entre otras que las hacen sitios ideales para evaluar la diversidad de nemátodos marinos del Golfo de California.

VI.1.1 Golfo de California

El Golfo de California, también conocido como Mar de Cortés, es un cuerpo de agua que separa la Península de Baja California del continente (22-32° N y 105-107° W). Tiene una longitud de 1130 km y una anchura entre 80-209 km. En la región norte, hacia fuera de la costa, la profundidad promedio es aproximadamente 200 m, y una gran cantidad de sedimentos son mantenidos en suspensión por las fuertes corrientes resultado del extremo rango de mareas (p.ej., más de 6.95 m en San Felipe,) (Gutiérrez & González, 1989).

Al Sur de las grandes islas, hacia la boca, el Golfo de California incrementa su profundidad en cuencas que alcanzan hasta 3000 m. La zona costera Peninsular, está formada mayormente por roca, pero con zonas arenosas dispersas; además carece casi totalmente de drenaje de ríos, debido a las condiciones de clima sub- desértico. La costa continental, se caracteriza por grandes playas de arena, lagunas costeras y bahías abiertas; grandes suministros de agua dulce que alcanzan la línea de costa directamente o a través de lagunas. El Golfo de California alberga un conjunto único de hábitats, desde bosques de manglar tropical y arrecifes de coral en la parte sur, incluyendo una amplia variedad de hábitats intermareales encontrados a lo largo de todo el golfo (Lluch-Cota *et al.*, 2007).

VI.1.2 Golfo de Santa Clara

El Golfo de Santa Clara se encuentra localizado al este del Delta del Río Colorado en la costa noroeste del estado de Sonora (31° 41' N; 114° 30' W). El rango de acción de la marea es de aproximadamente 10 m. En la marea baja presenta una amplia zona intermareal casi plana que se extiende horizontalmente más de 500 m, con sedimentos de arena fina (cerca de la línea de agua) y limo (lejos de la línea de agua), presentando además algunos afloramientos rocosos (Mundo-Ocampo *et al.*, 2007). El Golfo de Santa Clara se encuentra probablemente influenciado por un pantano salobre al norte; que proporciona el hábitat para especies en peligro de extinción como peces y aves, sin embargo, es afectado

por descargas de agua agrícola de drenajes de los Estados Unidos y México (Brusca *et al.*, 2005).

VI.1.3 La Paz Baja California

La Bahía de La Paz está ubicada en la costa sureste de la Península de Baja California (24.1°-24.8° N y 110.2°-110.8° W). En el extremo sur de la Bahía se encuentra la Ensenada de la Paz, zona poco profunda protegida del oleaje por *El Mogote*, una barrera de arena. Al norte de la Bahía de La Paz, se encuentra el Canal de San Lorenzo, ubicado entre la isla Espíritu Santo y Tecolote. Este canal conecta el sur de la Bahía con el Golfo de California (García & Álvarez, 2006). La región tiene clima seco desértico cálido con lluvias en verano, con una temperatura media anual mayor a 22° C y una oscilación térmica diurna entre 7° C y 14° C. La precipitación media anual es de 184.8 mm. En esta zona se presenta una temperatura media anual de las aguas de la boca del estero de 25.9° C, y salinidad media de 39‰ y el oxígeno disuelto de 4.12 mg L⁻¹. La marea es semidiurna con una amplitud media de 1.94 m y la velocidad de corriente tiene un promedio anual de 21 cm s⁻¹ (Félix *et al.*, 2006).



Figura 2. Mapa de las estaciones de muestreo en ambas localidades, Alto Golfo de California y La Paz B.C.S.

VI.2 Trabajo de campo

En la localidad del Alto Golfo de California las muestras fueron tomadas en el mes de Julio del 2007, mientras que las muestras de la localidad de La Paz, fueron tomadas en el mes de Noviembre del mismo año. En cada estación, las muestras fueron extraídas de manera aleatoria en la zona intermareal. Estas fueron tomadas, con un cilindro (nucleador) plástico de 2 cm de diámetro por 10 cm de altura. Las muestras de sedimento fueron fijadas con solución DESS (Dimetil sulfóxido al 20%, EDTA Disódico 0.25 M y NaCl saturado), esta solución permite la fijación de los especímenes, para los subsiguientes análisis moleculares (Yoder *et al.*, 2006). Los organismos destinados para la identificación taxonómica detallada fueron fijados en formol al 4% y se prepararon en montajes permanentes de acuerdo con el método de Seinhorst (1959) (ver sección XI.1).

VI.3 Trabajo de laboratorio de bentos

VI.3.1 Separación de los nemátodos del sedimento

Una vez en el laboratorio los sedimentos fueron lavados con agua dulce para eliminar la solución utilizada durante su fijación, posteriormente los nemátodos se extrajeron mediante la técnica de flotación (Platt & Warwick, 1983; Platt & Warwick, 1988). Esta consiste en poner el sedimento en vasos de precipitados y agregar Ludox-TM, con una densidad específica de 1.15, mezclar el sedimento para poner en suspensión la mayor cantidad de organismos (Fig. 3). El objetivo de la extracción por flotación es suspender la fauna en un fluido que tenga un peso específico cercano al de la fauna, de tal modo que la fauna que es neutralmente flotante permanecerá flotando mientras que los sedimentos con flotabilidad negativa se hundirán (ver sección XI.2).

Después de dejar reposar la muestra durante 50 minutos el sobrenadante con la meiofauna en suspensión es decantado y tamizado a través de un tamiz de luz de malla de 65 μm . Este proceso fue repetido cuatro veces para lograr extraer la mayor cantidad de organismos, tanto para los individuos fijados con la solución DESS como aquellos fijados

con formol. Para llevar a cabo las preparaciones permanentes de referencia, los organismos fijados con formol al 4% fueron deshidratados en glicerol (Seinhorst, 1959).

VI.3.2. Selección de taxa para extracción de ADN

Los taxa utilizados para realizar la extracción de ADN fueron seleccionados aleatoriamente, de una alícuota de 3 ml de la muestra original. Con la ayuda de un pincel se selecciono uno a uno a los individuos, posterior a su selección éstos fueron lavados en agua destilada esterilizada, por lo menos tres veces, para remover los residuos de la solución fijadora (DESS o Formol). El objetivo de la selección de individuos fue obtener el mayor número de representantes de los tres grandes órdenes de nemátodos marinos (Enoplida, Chromadorida y Monhysterida) pretendiendo así, reflejar la mayor diversidad posible en cada localidad muestreada, además de poder construir una base de datos morfológica y molecular de los organismos reportados. La selección de los individuos se llevo a cabo primeramente con la ayuda de un microscopio de disección (OLYMPUS Modelo SZX7, con magnificación maxima 56x) posteriormente se llevo a cabo la identificación morfológica.

VI.3.3. Video edición y captura de imágenes digitales para especímenes “voucher”

Debido a que los nemátodos utilizados para la extracción de DNA son destruidos, con el fin de contar con un registro morfológico, éstos fueron filmados con el sistema de video captura y edición (VCE siglas en inglés). Esta nueva técnica permite capturar series de imágenes multifocales para ser almacenadas en una computadora en formato de un video clip digital (De Ley *et. al.*, 2005). Los registros digitales de la anatomía de los organismos servirán como “vouchers” taxonómicos que formarán parte de la colección científica que podrá ser depositada en la base de datos de “Barcoding of life” (De Ley & Bert, 2002; De Ley *et al.*, 2005)

VI.3.4. Identificación taxonómica

Los especímenes fueron montados en un porta objetos que contenía una gota de agua y fueron cubiertos por un porta objetos, para ser observados bajo el microscopio. Los individuos fueron identificados con base en sus características morfológicas hasta el nivel de género y especie (cuando fue posible), con la ayuda de un microscopio compuesto (OLYMPUS Modelo BX51) con contraste de fases (óptica Nomarski), con objetivos de diferentes magnificaciones (4x2x, 10x2x, 40x2x, y 60x2x). Para la toma de fotos y videos, se utilizó una cámara digital (OLYMPUS U TVO.5C-3) y el programa Picture Frame TM, además, se utilizaron claves para la identificación de nemátodos marinos de Noroeste de Europa (Platt & Warwick, 1983; Platt & Warwick, 1988) así como de la base de datos electrónica especializada en invertebrados (NEMYS - <http://nemys.ugent.be/>). Se trabajó en colaboración con expertos en taxonomía de nemátodos de la Universidad de California en Riverside.

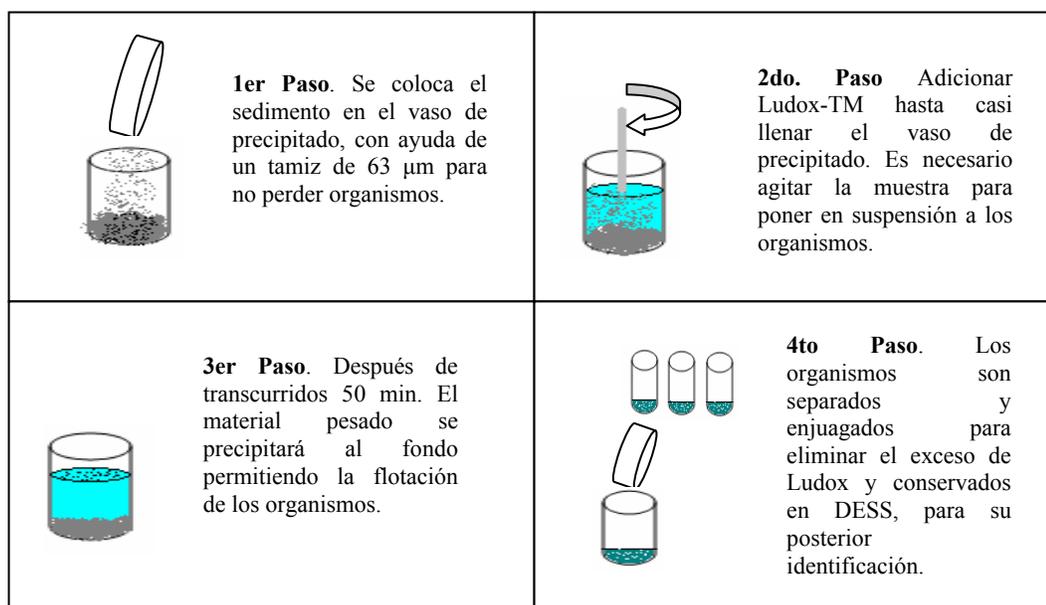


Figura 3. Procedimiento simplificado para la extracción de los organismos del sedimento mediante la técnica de flotación.

VI.4 Trabajo de laboratorio molecular

VI.4.1 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Posterior a la identificación taxonómica y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, los nemátodos fueron cortados en 2-4 pedazos, dependiendo del tamaño del organismo y transferidos a tubos de microcentrífuga, para ser almacenados en 20 μ l de solución amortiguadora de extracción (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.3, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20). Durante este procedimiento los organismos fueron mantenidos en hielo para evitar la degradación del ADN. Posteriormente, los organismos fueron congelados a $-20^{\circ}C$ durante 30 min para después ser incubados durante 1 hr a $65^{\circ}C$ y 10 min a $95^{\circ}C$ en un termociclador MJ RESEARCH PTC-200 y ser digeridos con 2 μ l de Proteinasa K (60 μ g ml^{-1} de stock) (De Ley *et al.*, 2005). A continuación se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar el segmento D2-D3 del gen 28S de la subunidad grande (LSU) del ADNr.

La amplificación del segmento D2-D3 se llevó a cabo de acuerdo a De Ley *et al.*, (2005). Las reacciones de 25 μ l de volumen final de PCR, constaron de 2.5 μ l de ADN molde, 2.5 μ l de solución amortiguadora 10X (1.5 mM $MgCl_2$), 15 μ l de dNTP (0.5 mM cada uno), 1 μ l de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) a una concentración de 10 mM (D2A 5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3' y D3B 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') y finalmente 1 unidad (U) de ADN Taq polimerasa Finenzyme[®]. Las condiciones de termociclado utilizadas se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Condiciones de termociclado para la amplificación del gen 28S

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	
♦Anillamiento (Tm)	46*	1.0 min	
	54**		30
	55***		
Polimerización	72	2.0 min	
Polimerización final	72	7.0 min	1

♦La temperatura de anillamiento cambió para cada par de oligonucleótidos (ver diseño de oligonucleótidos).

*28S744	}	Ver Figura 4
** 28S486 y 28S666		
***28S461		

Para llevar a cabo la secuenciación de ambas hebras de ADN, primero se purificó el ADN con 1 µl de la mezcla enzimática EXOSAP' IT[®] por cada 2.5 µl de producto de PCR. Posterior a la purificación se realizaron las reacciones de secuenciación en un volumen final de 12 µl para cada reacción, en 3.0 µl primer (1.0 mM) y 2.0 µl BigDye (v. 3.1). Una vez realizadas las reacciones de secuenciación estas se corrieron en un secuenciador automático (ABI 377 y 3100 Gene Analyzer).

VI.4.2 Diseño de oligonucleótidos

El éxito en la amplificación del ADN en diferentes taxa de nemátodos marinos de ambas localidades (Golfo de Santa Clara y La Paz, B. C.), no fue consistente al utilizar los oligonucleótidos propuestos por De Ley y colaboradores (2005). Por lo que se decidió diseñar cuatro oligonucleótidos adicionales diferentes con la finalidad de amplificar fragmentos de menor tamaño.

El diseño de los oligonucleótidos o cebadores consistió primeramente en utilizar secuencias disponibles de nemátodos marinos, depositadas en el GenBank, así como, las obtenidas de la amplificación de individuos del Orden Enoplida (Pereira, 2008), con la finalidad de reconocer los sitios conservados en la mayoría de las secuencias. Posteriormente, se procedió a encontrar regiones conservadas de aproximadamente 20 pb como sitios de hibridación de los cebadores (para posición de los cebadores ver Fig. 4). Posteriormente, se realizaron pruebas *in silico* para verificar el diseño de los cebadores. Dichas pruebas consistieron en revisar la temperatura de anillamiento (T_m), la formación de estructuras secundarias, así como, la formación de homodímeros y heterodímeros. Estas pruebas fueron realizadas en la página de Internet:

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

La estrategia consistió en tratar de amplificar el ADN siguiendo un orden de prioridad. El orden de prioridad decreciente de pares de cebadores fue D2A-D3B, D2A-28S744, D2A-666, 28S486-D3B y D2A-28S461. Si un par de cebadores no funcionó después de varios intentos, se trató de amplificar a ese organismo con el siguiente par de cebadores y así sucesivamente.

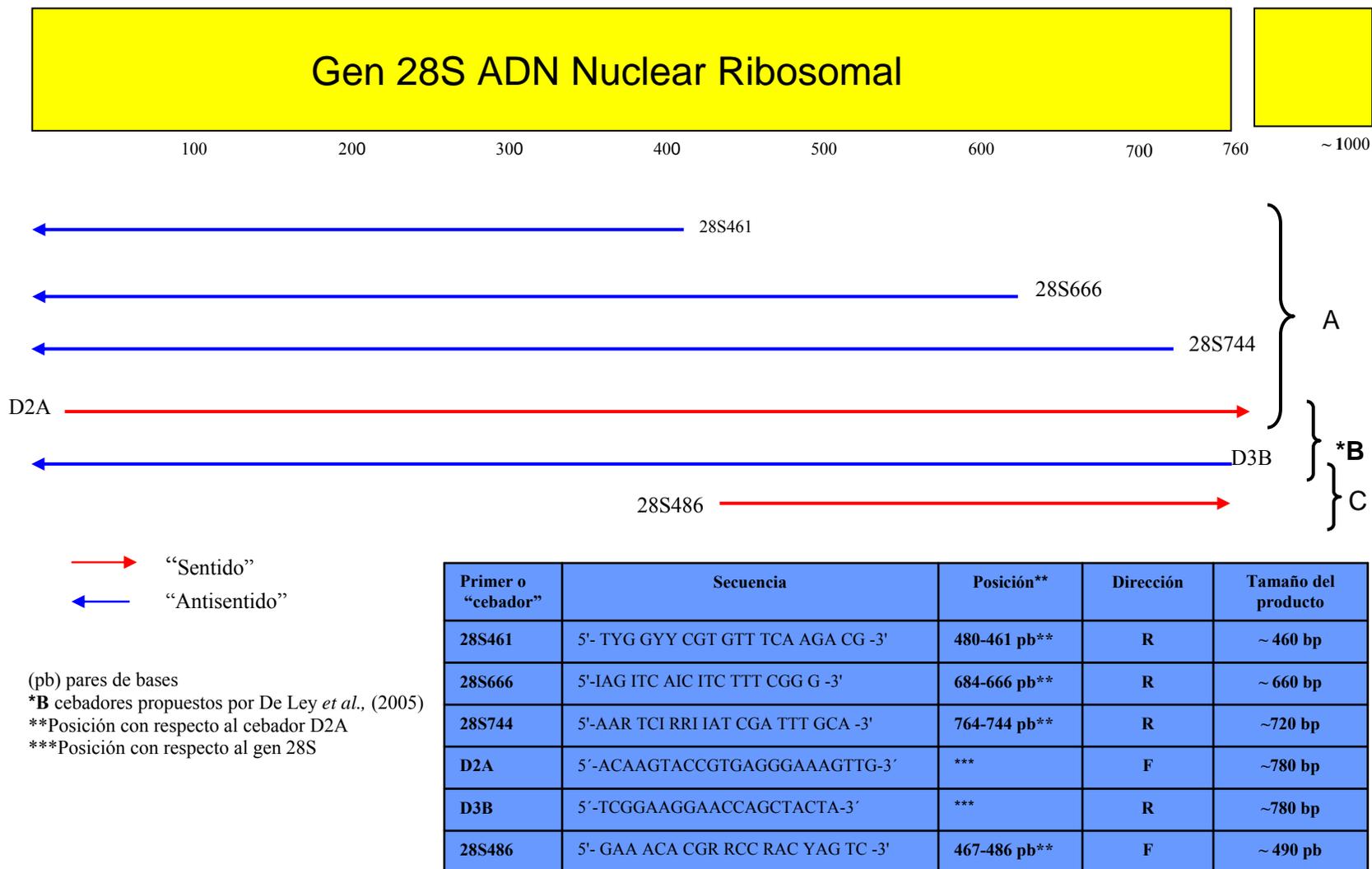


Figura 4. Diagrama que muestra las posiciones de los cebadores diseñados, con respecto a los cebadores propuestos por De Ley *et al.*, 2005.

VI. 5 Análisis de datos

VI. 5.1 Edición de secuencias

Se realizó la edición de los cromatogramas para identificar y corregir cualquier artefacto producido durante la secuenciación de ADN. Esto se llevó a cabo utilizando del programa CODON CODE ALIGNER v 2.0.1. Primeramente, se verificó la calidad de las secuencias examinando ambas hebras (“Sentido” y “Antisentido”) de un mismo individuo con la finalidad de detectar posibles incongruencias. Una vez revisadas ambas hebras, se procedió a verificar la existencia de borrados o inserciones de bases llamados “indels”; esto se realiza comparando las secuencias entre los diferentes individuos.

VI. 5.2 Análisis moleculares

VI. 5.2.1 Alineamiento de las secuencias

Una vez que se editaron las secuencias, se llevó a cabo su alineamiento múltiple junto con secuencias ortólogas de referencia obtenidas de Genbank publicadas por De Ley *et al.*, (2005). Se utilizó en línea el programa MAFFT 6.0 (Kato *et al.*, 2005), cuyo algoritmo se basa en transformadas de Fourier rápidas y es más exacto que otros cuando hay un gran número de secuencias involucradas. MAFFT se implementó con la opción “E-INS-i”. Para obtener las características descriptivas del gen, tales como, composición nucleotídica, sitios conservados, sitios variables, sitios parsimonia-informativos y sitios con mutaciones únicas se utilizó el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

VI. 5.2.2 Árboles filogenéticos

Se procedió a realizar los análisis de reconstrucción filogenética utilizando dos métodos distintos, Máxima parsimonia (MP) y Vecino más cercano (VC). El primero fue realizado mediante búsquedas heurísticas con el programa PAUP* 4.0b 10 (Swofford, 1998); mientras que el árbol VC se estimó con el programa Mega 4 a partir de una matriz

de distancias genéticas p . Para conocer la robustez de las ramas se realizaron análisis de “bootstrap no paramétrico” con 500 (MP) y 1000 (VC) replicas.

VII. Resultados

VII.1 Diversidad morfológica

VII.1.1 Número de taxa identificados

En ambas localidades, Alto Golfo de California y La Paz B.C.S, se identificaron morfológicamente 32 géneros pertenecientes a 15 familias, en un total de 83 individuos dentro de los tres grandes órdenes de nemátodos marinos (Enoplida, Chromadorida y Monhysterida) (Tabla II). Para el orden Enoplida se identificaron cinco familias y siete géneros, mientras que otros cinco géneros de Oncholaimidae no pudieron ser determinados. En el orden Chromadorida se identificaron un total de siete familias y 19 géneros, mientras que dos géneros no pudieron ser determinados. Finalmente, en el orden Monhysterida se identificaron tres familias y siete géneros, mientras que uno no pudo ser determinado. En las siguientes tablas, se contabiliza el número de individuos en cada morfoespecie. Aquellas que no pudieron ser determinadas taxonómicamente hasta un nivel específico se les asignó el nombre genérico seguido por “sp”.

Las familias que presentaron un mayor número de géneros identificados (6) fueron Xyalidae y Chromadoridae. Los géneros que presentaron un mayor número de individuos identificados fueron: *Oncholaimus*, *Dichromadora*, *Acanthonchus*, *Halichoanolaimus*, *Desmodora*, *Ceramonema* y *Xyala* (Tabla II).

Tabla II. Géneros de nemátodos marinos de vida libre identificados dentro de los tres grandes ordenes de nemátodos marinos

Orden	Familia	Morfoespecie	Individuos
	Microlaimidae	<i>Microlaimus</i> sp1	2
			#
E N O P I L D A	Thoracostomopsidae	<i>Mesacanthion</i> sp	2
	Phanodermatidae	<i>Phanoderma</i> sp	1
	Ironidae	<i>Trissonchulus</i> sp	1
	Oncholaimidae	Sp1	1
		Sp2	1
		Sp3	1
		Sp4	1
		Sp5	1
		<i>Meyersia</i> sp	1
		<i>Oncholaimus</i> sp	4
<i>Viscosia</i> sp	3		
Rhabdodemaniidae	<i>Rhabdodemania</i> sp	1	
	Total	18	
C H R O M A D O R I D A	Chromadoridae	Sp1	1
		Sp2	1
		<i>Chromadora</i> sp1	2
		<i>Chromadora</i> sp2	1
		<i>Dichromadora</i> sp1	1
		<i>Dichromadora</i> sp2	1
		<i>Dichromadora</i> sp3	4
		<i>Dichromadora</i> sp4	1
		<i>Rhyps/Actinonema</i> sp	1
		<i>Spilophorella</i> sp 1	1
		<i>Spilophorella</i> sp 2	1
		Comesomatidae	<i>Dorilaymopsis</i> sp
	<i>Sabatieria</i> sp1		1
	<i>Sabatieria</i> sp2		1
	Cyatolaimidae	<i>Acanthonchus</i> sp	4
		<i>Pomponema</i> sp	1
		<i>Praeacanthonchus</i> sp	1
	Selachinematidae	<i>Gammanema</i> sp	1
		<i>Halichoanolaimus</i> sp	4
<i>Richtersia</i> sp		1	
<i>Catanema</i> sp		1	
Desmodoridae	<i>Desmodora</i> sp1	1	
	<i>Desmodora tenuispiculum</i>	4	
	<i>Metachromadora</i> sp1	3	
	<i>Metachormadora</i> sp2	1	
	<i>Spirinia</i> sp	1	

Tabla II (continuación)

	Ceramonematidae	<i>Ceramonema</i> sp1	3
		<i>Ceramonema</i> sp2	1
		<i>Ceramonema</i> sp3	1
		Total	48
M O N H Y S T E R I D A	Xyalidae	Sp1	1
		<i>Daptonema</i> sp1	1
		<i>Daptonema</i> sp2	1
		<i>Omicronema</i> sp	3
		<i>Promonhystera</i> sp	2
		<i>Rhynchonema</i> sp	1
		<i>Xyala</i> sp1	1
		<i>Xyala</i> sp2	2
		<i>Xyala</i> sp3	1
		<i>Xyala</i> sp4	1
		<i>Xyala</i> sp5	1
	Siphonolaimidae	<i>Siphonolaimus</i> sp	1
	Axonolaimidae	<i>Odontophora</i> sp	1
		Total	17

En cuanto a las localidades muestreadas, la localidad del Alto Golfo de California fue la localidad que presentó una mayor diversidad genérica con 26 géneros identificados y solo dos no pudieron ser determinados (Tabla III); mientras que en la localidad de La Paz B. C. S sólo se identificaron 19 géneros y de los cuales seis no pudieron ser determinados (Tabla IV). A escala local, la estación con el mayor número de géneros identificados fue la estación de “La Ensenada de La Paz”, seguido de la estación “El Burro” y “El Tornillal”. Los géneros *Dichromadora*, *Spilophorella* y *Sabatiera*, pertenecientes a la familia Chormadoridae y Comesomatidae, respectivamente, fueron los únicos presentes en ambas localidades (Alto Golfo de California y La Paz, B. C. S).

Tabla III. Géneros de nemátodos marinos de vida libre identificados en la localidad del Alto Golfo de California

Localidad	Estación	Familia	Morfoespecie	# individuos	
A L T O G O L F O	E L	Chromadoridae	<i>Dichromadora</i> sp1	1	
			<i>Dichromadora</i> sp2	1	
			<i>Spilophorella</i> sp1	1	
	B U R O	Selachinematidae	<i>Gammanema</i> sp	1	
			<i>Richtersia</i> sp	1	
	G O L F O	R O	Desmodoridae	<i>Desmodora tenuispiculum</i>	4
				<i>Metachromadora</i> sp1	3
Xyalidae			<i>Ceramonema</i> sp1	2	
			sp1	1	
P R O V I N C I A	R O	Xyalidae	<i>Promonhystera</i> sp	2	
			<i>Xyala</i> sp1	1	
F O R M O S O	R O	Axonolaimidae	<i>Odontophora</i> sp	1	
		Total	6	12	19
D E C A L I F O R N I A	E L T O R I L A L	Thoracostomopsidae	<i>Mesacanthion</i> sp	2	
		Ironidae	<i>Trissonchulus</i> sp	1	
		Oncholaimidae	<i>Viscosia</i> sp	3	
		Rhabdodemaniidae	<i>Rhabdodemania</i> sp	1	
		Comesomatidae	<i>Sabatieria</i> sp1	1	
		Cyatolaimidae	<i>Pomponema</i> sp	1	
		Desmodoridae	<i>Desmodora</i> sp1	1	
		Xyalidae	<i>Ceramonema</i> sp1	1	
			<i>Ceramonema</i> sp2	1	
	<i>Ceramonema</i> sp3		1		
Xyalidae	<i>Omicronema</i> sp	3			
	<i>Xyala</i> sp2	2			
	<i>Xyala</i> sp3	1			
Total	9	13	19		
S C A L I F O R M O S O	S C A L I F O R M O S O	Oncholaimidae	sp1	1	
		Chromadoridae	<i>Rhips/Actinonema</i> sp	1	
		Selachinematidae	<i>Catanema</i> sp	1	
		Desmodoridae	<i>Spirinia</i> sp	1	
		Xyalidae	<i>Rhynchonema</i> sp	1	
			<i>Xyala</i> sp4	1	
<i>Xyala</i> sp5	1				
Total	5	7	7		

Tabla IV. Géneros de nemátodos marinos de vida libre identificados en la localidad de La Paz Baja California Sur

Localidad	Estación	Familia	Morfoespecie	# Individuos
	C O N C H E L A L I T O	Chromadoridae	sp2	1
			<i>Chromadora</i> sp1	2
			<i>Dichromadora</i> sp3	4
	Total	1	3	7
L A P A Z	E S T E R T O	Oncholaimidae	sp2	1
			sp5	1
		<i>Oncholaimus</i> sp	2	
		Chromadoridae	sp1	1
		Microlaimidae	<i>Microlaimus</i> sp1	2
	Xyalidae	<i>Daptonema</i> sp1	1	
	Total	4	6	8
B C S A D D E L A P A Z	E N S E N A D D E L A P A Z	Phanodermatidae	<i>Phanoderma</i> sp	1
		Oncholaimidae	<i>Sp3</i>	1
			<i>Sp4</i>	1
			<i>Meyersia</i> sp	1
			<i>Oncholaimus</i> sp	2
		Chromadoridae	<i>Chromadora</i> sp2	1
			<i>Dichromadora</i> sp 4	1
			<i>Spilophorella</i> sp2	1
		Comesomatidae	<i>Dorilaymopsis</i> sp	1
			<i>Sabatieria</i> sp2	1
		Cyatolaimidae	<i>Praeacanthochus</i> sp	1
		Selachinematidae	<i>Halichoanolaimus</i> sp	4
Desmodoridae	<i>Metachromadora</i> sp2	1		
Ceramonematidae	<i>Acanthanchus</i> sp	4		
Xyalidae	<i>Daptonema</i> sp2	1		
Siphonolaimidae	<i>Siphonolaimus</i> sp	1		
	Total	9	16	23

VII.1.2 Recuento taxonómico

VII.2. ORDEN ENOPLIDA

VII.2.1 Familia Thoracostomopsidae, Lorenzen, 1981

Esta familia está integrada por nueve géneros (*Enoploides*, *Enoplolaimus*, *Epacanthion*, *Mesacanthion*, *Mesacanthoides*, *Oxyonchus*, *Paramesacanthion*, *Thoracostomopsis* y *Trileptium*), sin embargo, en este estudio solo fue representada por el género *Mesacanthion*. Además, ha sido dividida en tres subfamilias: Thoracostominae, Enoplolaiminae y Trileptiinae. Los Enoplidos que pertenecen a esta familia presentan características como: una cavidad bucal amplia, generalmente encerrada por tres labios grandes, uno dorsal y tres subventrales; así también presentan dientes prominentes y mandíbulas (Nichols, 2002; Nichols, 2007). Estos nemátodos son considerados predadores y han sido reportados en hábitats como la zona litoral y sublitoral.

VII.2.1.1 *Mesacanthion* Filipjev, 1927

El género *Mesacanthion* presenta una estructura mandibular muy similar a *Enoplolaimus*, sin embargo, éste presenta unas setas cefálicas en la parte media o anterior de la capsula cefálica; además, otra diferencia entre *Enoplolaimus* y *Mesacanthion*, es que muchas especies de este último género, presentan espículas alargadas.

En la estación “El Tornilla” fueron identificados dos individuos juveniles representativos de la morfoespecie *Mesacanthion* sp. ambos individuos son similares, presentan una cutícula con finas estriaciones, una cavidad bucal provista de mandíbulas bien definidas, un esófago bien desarrollado además de presentar setas cefálicas y una cola en forma cónica (Fig. 5)

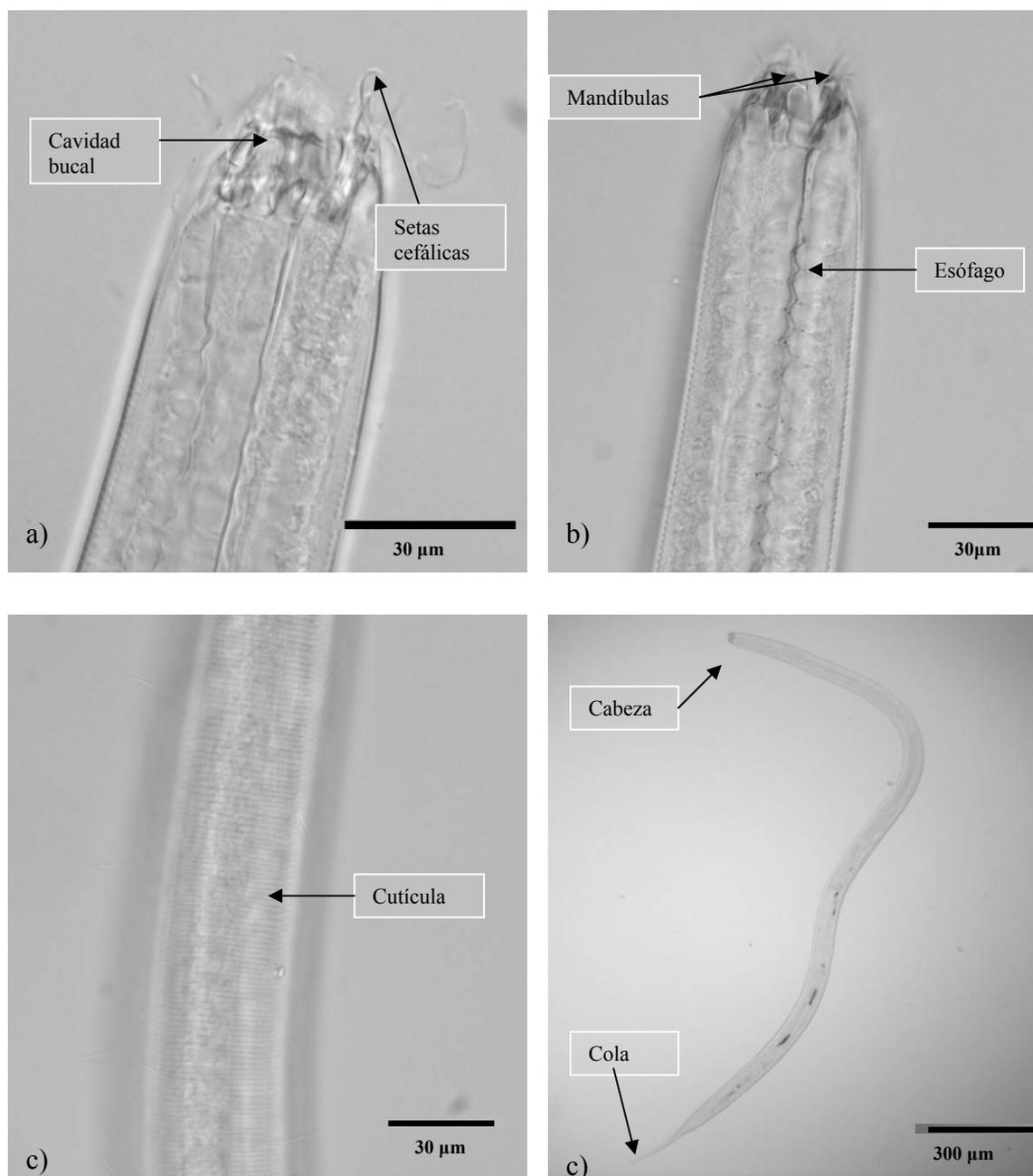


Figura 5. *Mesacanthion* sp. (Estación “El Tornillal”). Individuo juvenil. **a)** Región cefálica; **b)** Parte anterior; **c)** Región lateral del cuerpo mostrando el patrón cuticular; **d)** Cuerpo total.

VII. 2. 2. Familia Phanodermatidae Filipjev, 1927

La familia Phanodermatidae es representada por cinco géneros, *Crenopharyx*, *Micoletzkyia*, *Phanoderma*, *Phanodermella* y *Phanodermopsis*; para este estudio la familia Phanodermatidae solo estuvo representada por el género *Phanoderma*.

VII. 2.2.1. *Phanoderma* Bastian, 1865

El género *Phanoderma* se distingue de otros Phanodermatidos por presentar una cápsula cefálica fuerte y trilobulada. Los machos presentan una espícula corta y generalmente se observa la presencia de suplementos precloacales. Se puede o no observar la presencia de un ocelo, en base a esta característica Wieser (1953) subdividió a las especies de *Phanoderma* dentro de dos subgéneros. Las especies son diferenciadas principalmente por la forma de la cola, el tamaño de la espícula y la estructura de la capsula cefálica. Platt & Warwick (1983) reportan para este género 31 especies mientras que la base de datos de Nemys se reporta 45 especies, de las cuales 12 son reportadas como sinónimas a otros géneros.

Un individuo hembra fue identificado como representativo de la morfoespecie *Phanoderma* sp, en la localidad de La Paz B.C.S., con las siguientes características: la presencia de un “ocelo” con una coloración roja, un anillo nervioso en la parte anterior del cuerpo, setas cefálicas cortas, una cavidad bucal pequeña y una cola corta con forma cónico cilíndrica, donde se logran observar glándulas caudales (Fig. 6)

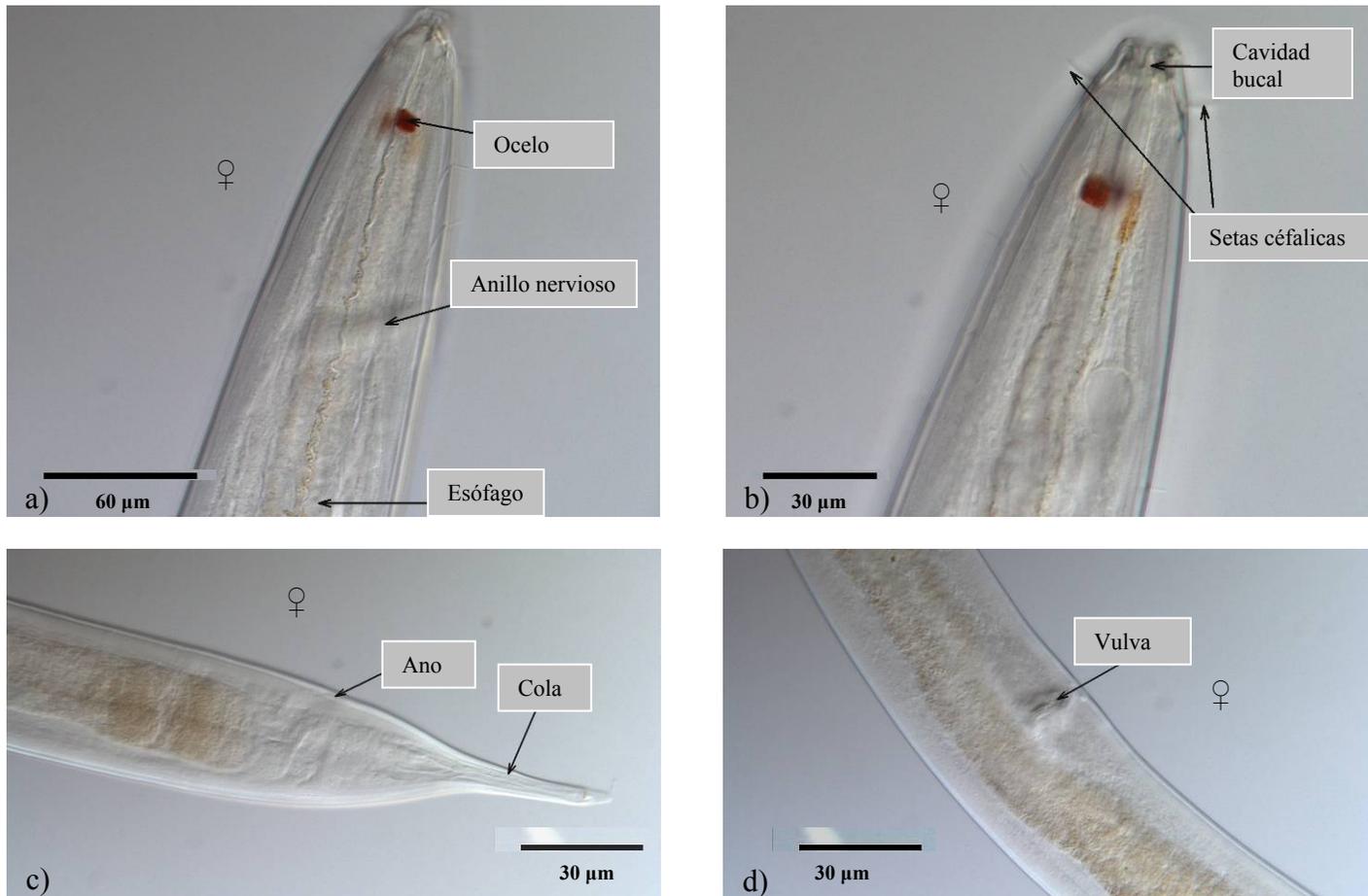


Figura 6. *Phanoderma* sp (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo hembra. **a)** Parte anterior del cuerpo; **b)** Región cefálica; **c)** Región cloacal de un individuo hembra; **d)** Región vulvar.

VII. 2.3. Familia Ironidae De Man, 1876

La familia Ironidae, de acuerdo con Platt & Warwick (1983), está integrada por seis géneros, (*Dolicholaimus*, *Pariromus*, *Pheronus*, *Syringolaimus*, *Thalassironus* y *Trissonchulus*) y 15 especies. Para este estudio la familia Ironidae estuvo representada por una morfoespecie del género *Trissonchulus*.

VII. 2.3.1 *Trissonchulus* Cobb, 1920

Las morfoespecies que pertenecen a este género presentan una cavidad bucal con cuatro dientes, además presentan papilas cefálicas y una cola relativamente corta, sin una parte cilíndrica y una cutícula lisa. Los machos presentan una espícula larga y ancha y se observa la presencia de un gubernaculum.

En la localidad del AGC se identificó un individuo macho perteneciente a la morfoespecie *Trissonchulus* sp. Las características que presenta son las siguientes: una cavidad bucal provista de un diente, en la parte anterior se observa la presencia de papilas cefálicas; aunque se reporta que los individuos pertenecientes a este género presentan una cutícula lisa, este individuo presenta una cutícula ligeramente estriada. En la región cloacal se observa una espícula larga y ancha con presencia de gubernaculum, finalmente una cola es en forma cónica (Fig. 7).

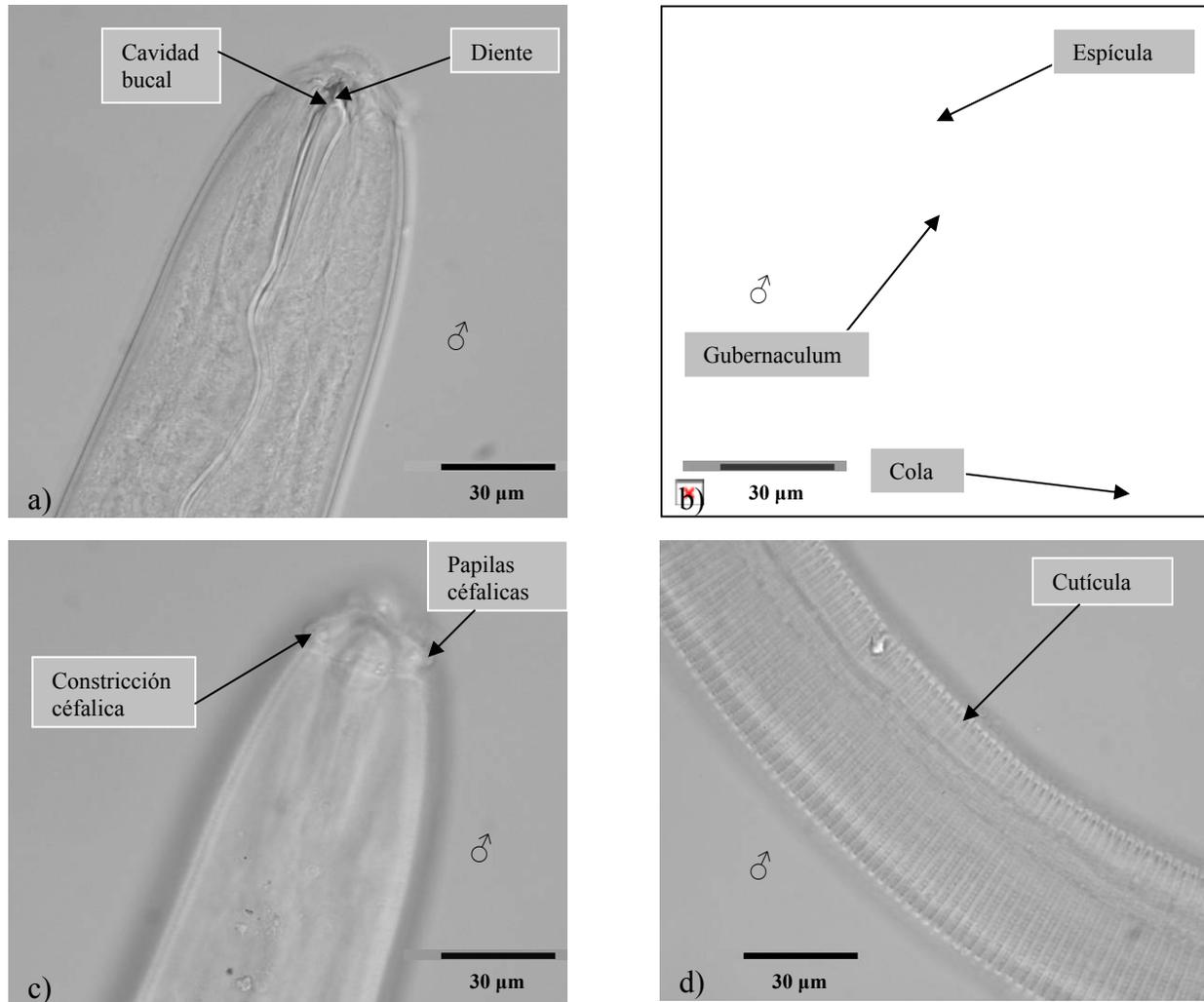


Figura 7. *Trissonchulus* sp (Estación "El Tornillal"). Individuo macho. a) Parte anterior; b) Parte posterior, región cloacal; c) Región anterior, cabeza; d) Región dorsal mostrando el patrón cuticular.

VII. 2.4. Familia Oncholaimidae, Filipjev, 1916

La familia Oncholaimidae, fue la segunda familia con más individuos identificados, 13 en total; de los cuales ocho pudieron ser identificados a nivel genérico y los cinco restantes solo a nivel de familia (ver Tabla 3). La localidad que presentó más individuos identificados fue la localidad de La Paz B.C.S, con 10 individuos (Tabla IV). Los individuos de esta familia presentan características como: una cutícula lisa, una cavidad bucal provista por dientes y algunos individuos presentan una cola en forma cónico-cilíndrica. Esta familia estuvo representada por los géneros, *Meyersia*, *Oncholaimus* y *Viscosia*.

Se identificaron cuatro individuos en la localidad de La Paz B.C.S y uno en la localidad del AGC pertenecientes a la familia Oncholaimidae. Dichos individuos no pudieron ser identificados a nivel de género ya que tres de ellos son juveniles y en el resto, no pudieron ser observados caracteres morfológicos suficientes para poder diferenciarlo. Estos cinco individuos presentan características en común como son: una cavidad bucal provista por dientes y una cutícula lisa (Fig. 8, 9, 10, 11 y 12). Así también, se observa una característica que los hace diferentes entre si, esto es la forma de la cola, aunque el carácter morfológico utilizado para separar a los individuos de esta familia es la posición de los dientes y la forma de la espícula en los machos.

VII.2.4.1 *Meyersia* Hopper, 1967

El género *Meyersia* presenta caracteres muy similares a *Viscosia* como son: una cavidad bucal grande provista con tres dientes, una cola cónico-cilíndrica y a excepción de *Viscosia*, el género *Meyersia* si presenta una espícula con gubernaculum.

Un individuo macho de la morfoespecie *Meyersia* sp. fue identificado en la estación “Ensenada de La Paz” éste presenta una cavidad bucal grande provista por tres dientes, un anfideo circular, una cutícula lisa, una cola alargada en forma cilíndrica y una espícula corta con presencia de gubernaculum (Fig. 13).

VII.2.4.2. *Oncholaimus*, Dujardin, 1845

Para este género existen caracteres morfológicos que los diferencian del resto de los Oncholaimidos; estos son: una cavidad bucal con una combinación de dientes largos y ventrolaterales, las hembras presentan un solo ovario y los machos presentan una espícula corta sin gubernaculum. Además, se pueden observar papilas accesorias y setas circum cloacales asociadas al aparato reproductor masculino, siendo estos caracteres utilizados para distinguir especies dentro de este grupo. Platt & Warwick (1983), reportan 75 especies para este género.

Se identificaron cuatro individuos, una hembra y tres juveniles pertenecientes a la morfoespecie *Oncholaimus* sp (Tabla II), todos ellos de la localidad de La Paz B. C. S. Los cuatro individuos presentaron características como: cavidad bucal provista por dientes, cutícula lisa y una cola en forma cilíndrica en su mayor parte (Fig. 14).

VII .2.4.3. *Viscosia* De Man, 1980

El género *Viscosia* es diferenciado de otros Oncholaimidos por la posición de los tres dientes en la cavidad bucal, esto es, presenta un diente subventral derecho más largo que los otros dos. Los individuos machos presentan una espícula corta sin gubernaculum mientras que la hembra presenta ovarios pareados.

Se identificaron dos individuos juveniles de la morfoespecie *Viscosia* sp. en la estación “El Tornillal” (Tabla III). Ambos individuos presentaron setas cefálicas pequeñas, una cavidad bucal grande con dientes subventrales, se observa un anfidio en forma de “ranura” en la parte de la cabeza, además presentan una cola en forma cilíndrica en su mayoría y un patrón cuticular de finas estriaciones (Fig. 15).

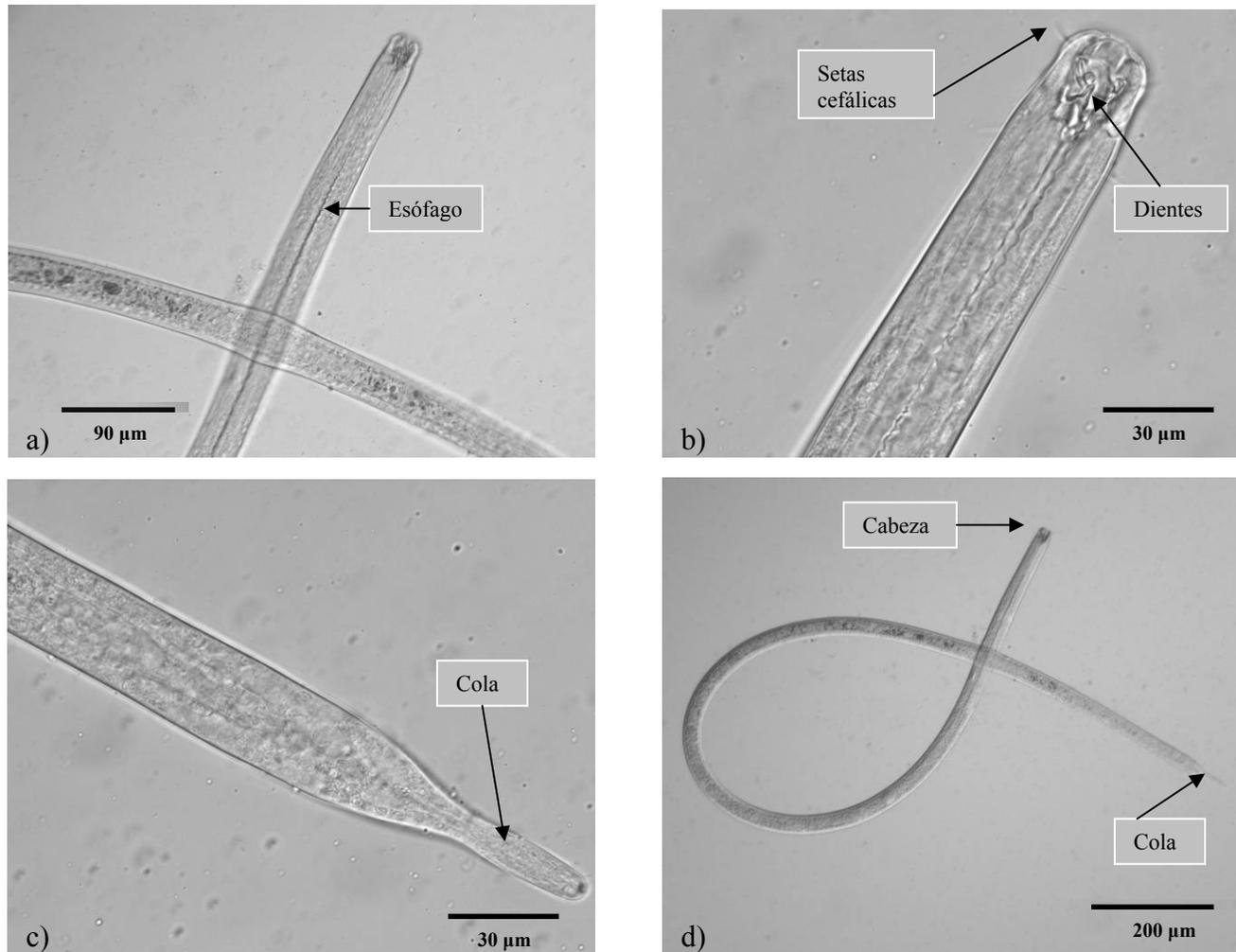


Figura 8. Oncholaimidae sp1. (Estación “Santa Clara”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Parte posterior, región cloacal; d) Cuerpo total.

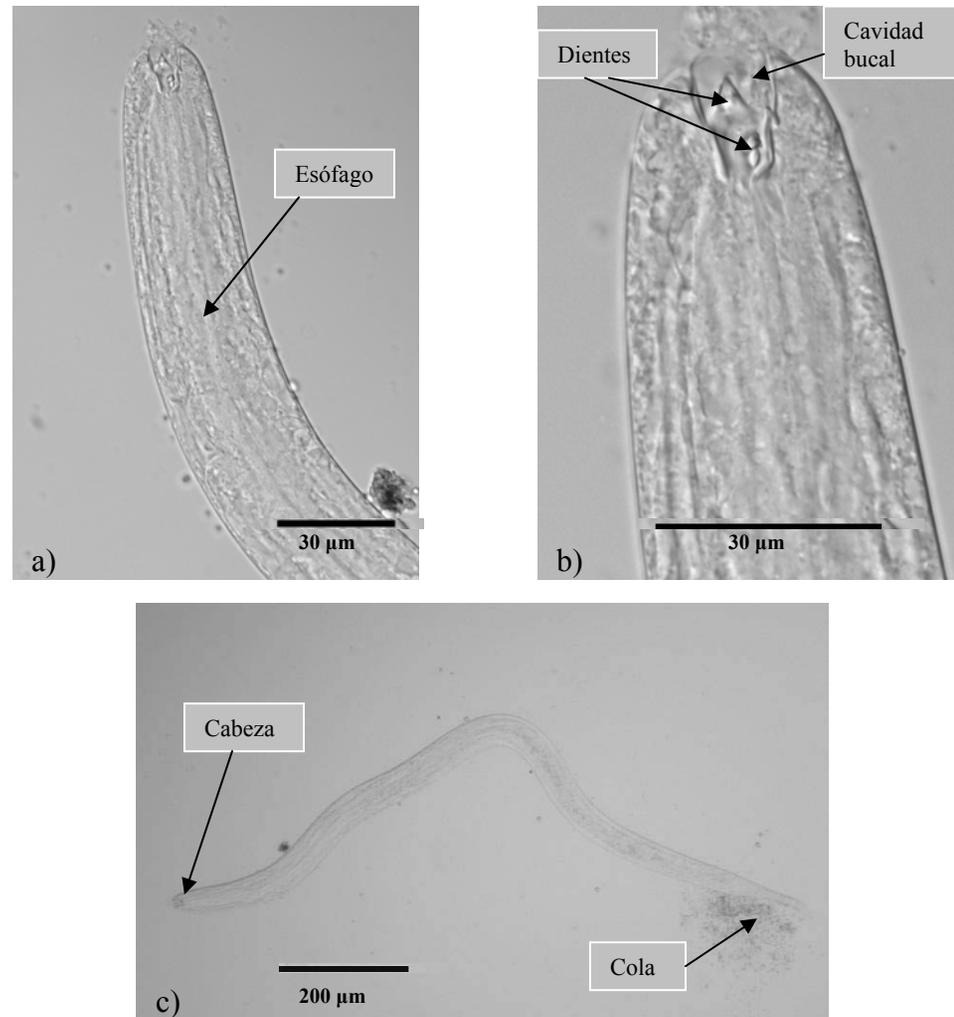


Figura 9. *Oncholaimidae* sp2. (Estación “El Esterito”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Cuerpo total.

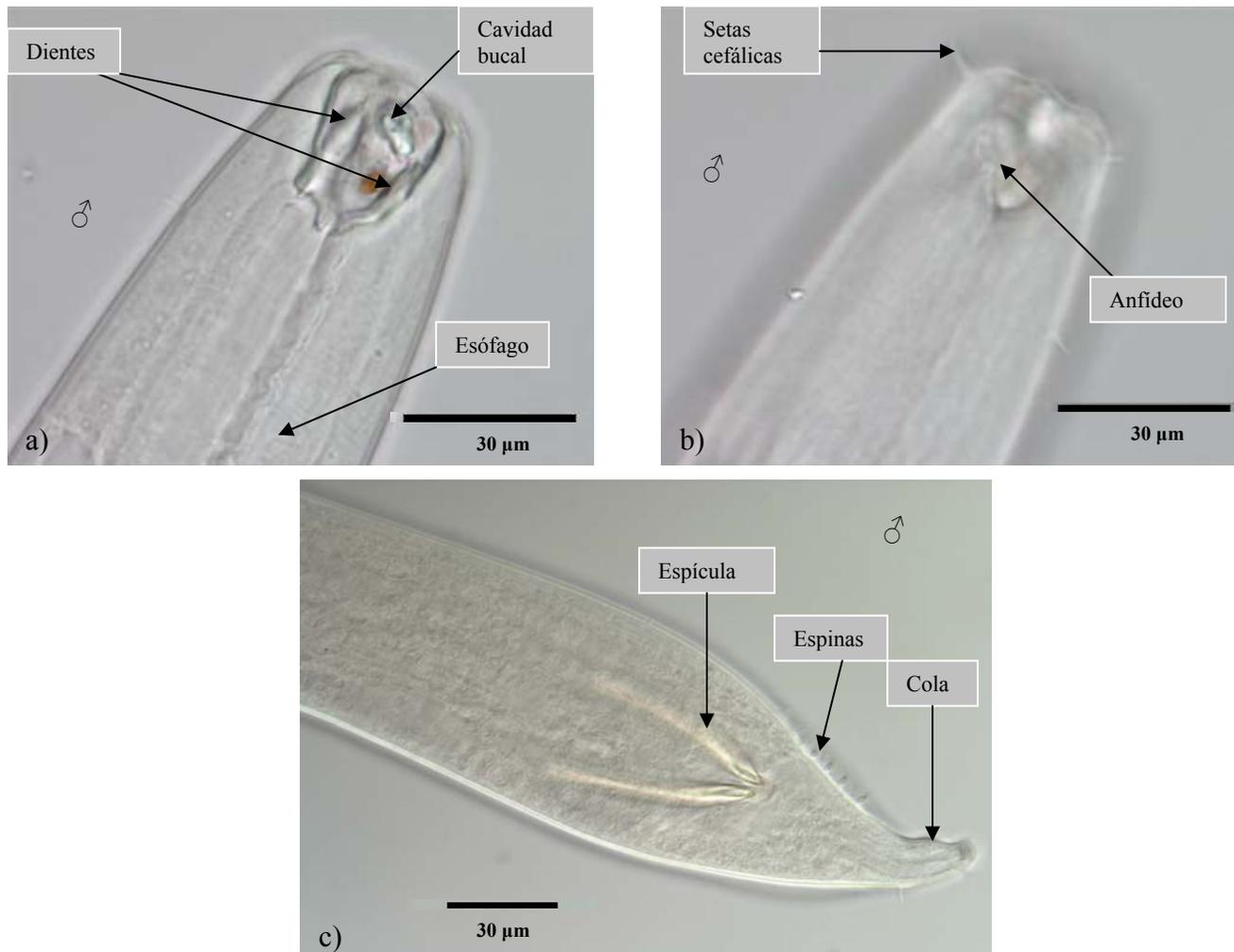


Figura 10. *Oncholaimidae* sp3. (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a) Parte anterior del cuerpo, evidenciando la cavidad bucal; **b)** Región cefálica; **c)** Parte posterior del cuerpo.

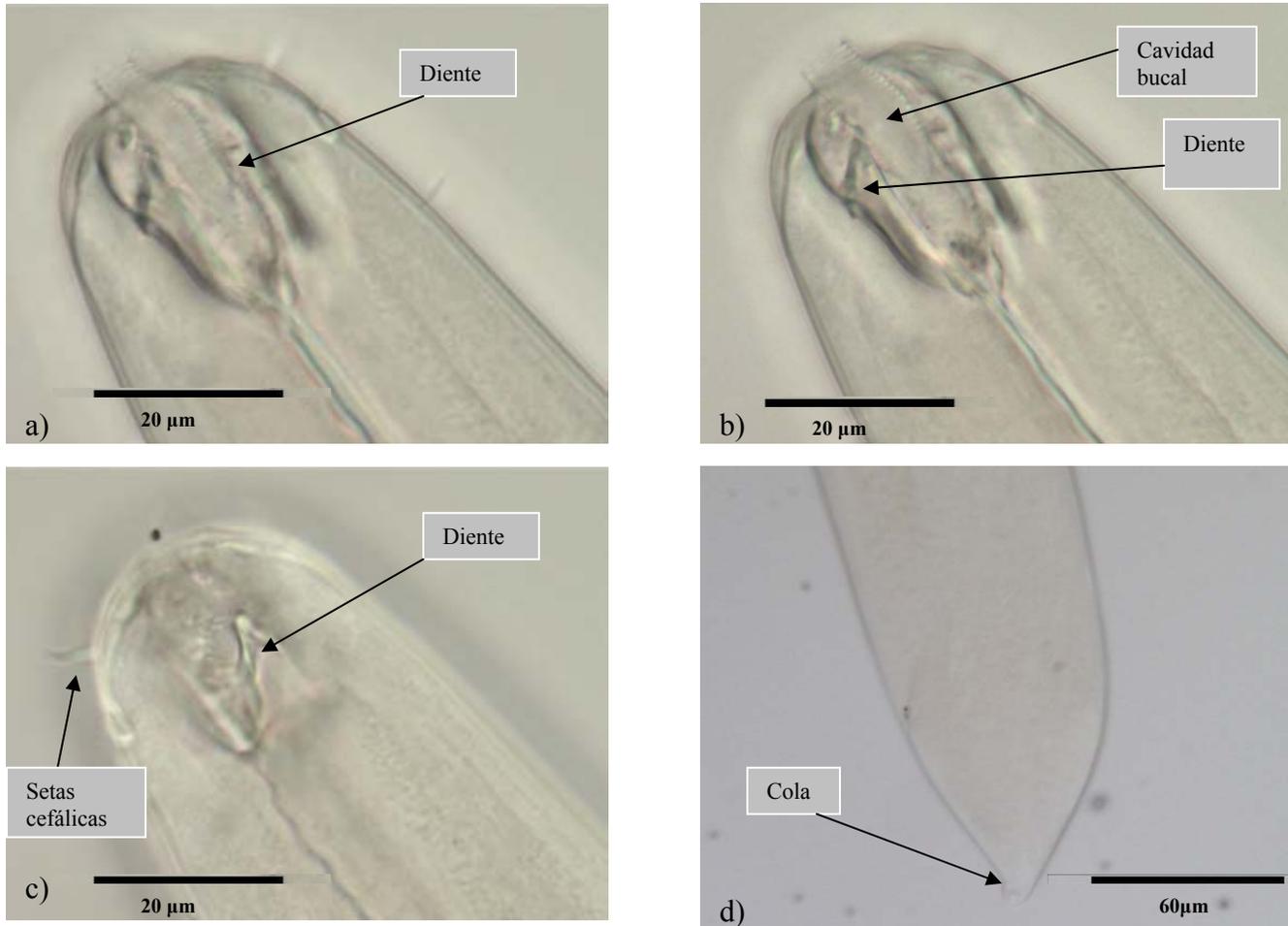


Figura 11. Oncholaimidae sp4. (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo, evidenciando la cavidad bucal; **b)** Región cefálica; **c)** Parte posterior del cuerpo.

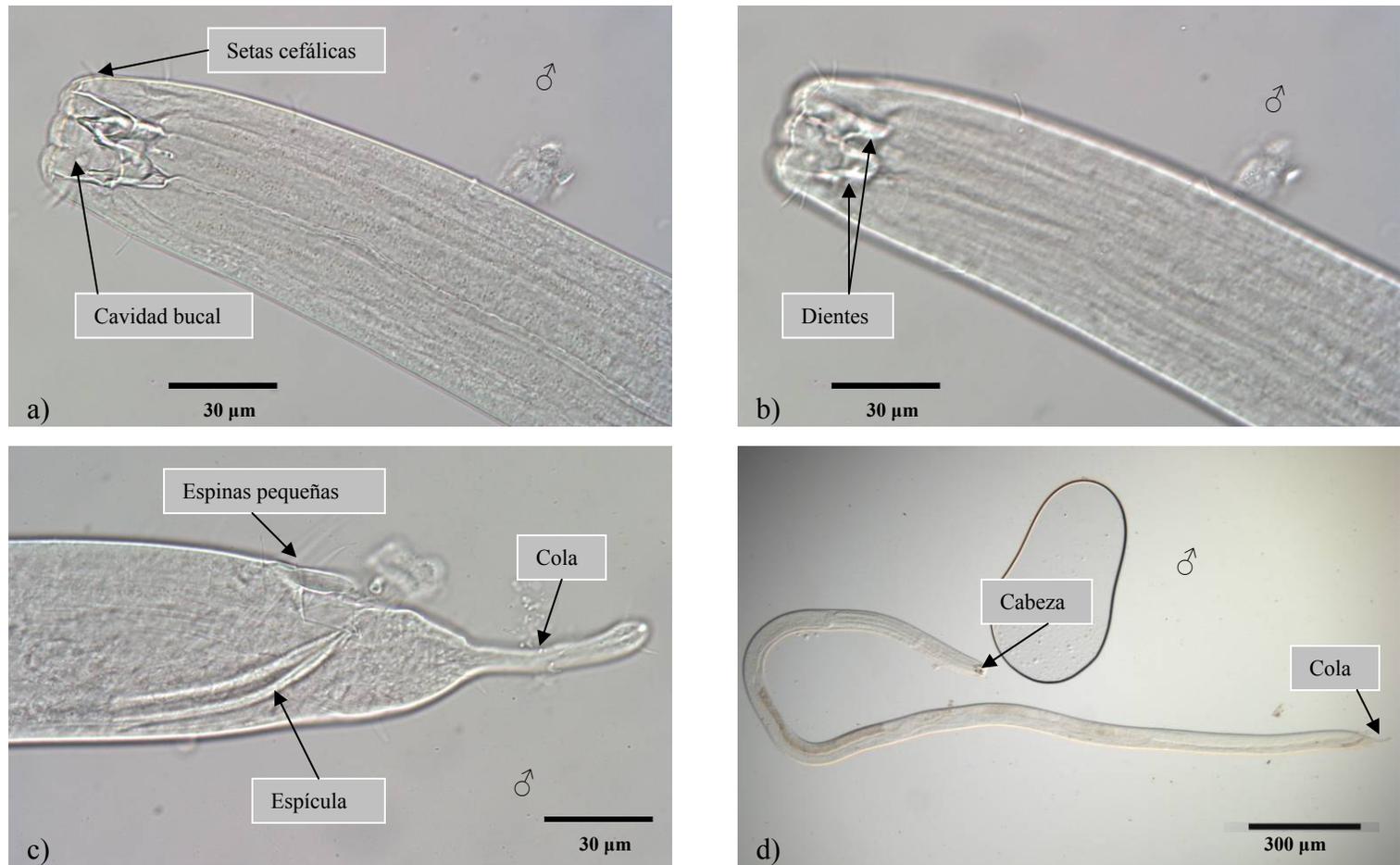


Figura 12. *Oncholaimidae* sp5. (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a) Parte anterior del cuerpo, evidenciando la cavidad bucal; b) Región cefálica; c) Parte posterior del cuerpo, región cloacal; d) Cuerpo total.

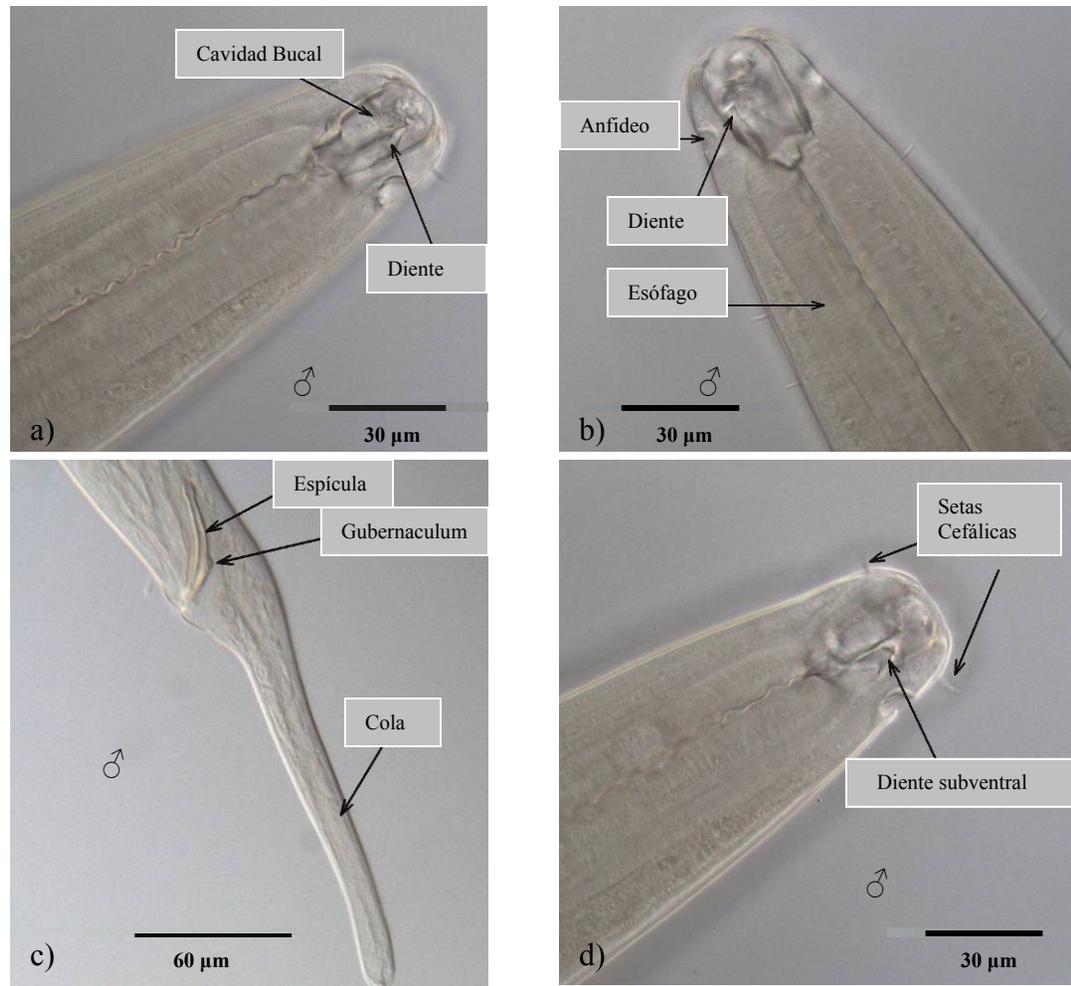


Figura 13. *Meyersia* sp (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a, b) Región cefálica; c) Parte posterior, región cloacal; d) Parte anterior evidenciando la cavidad bucal.

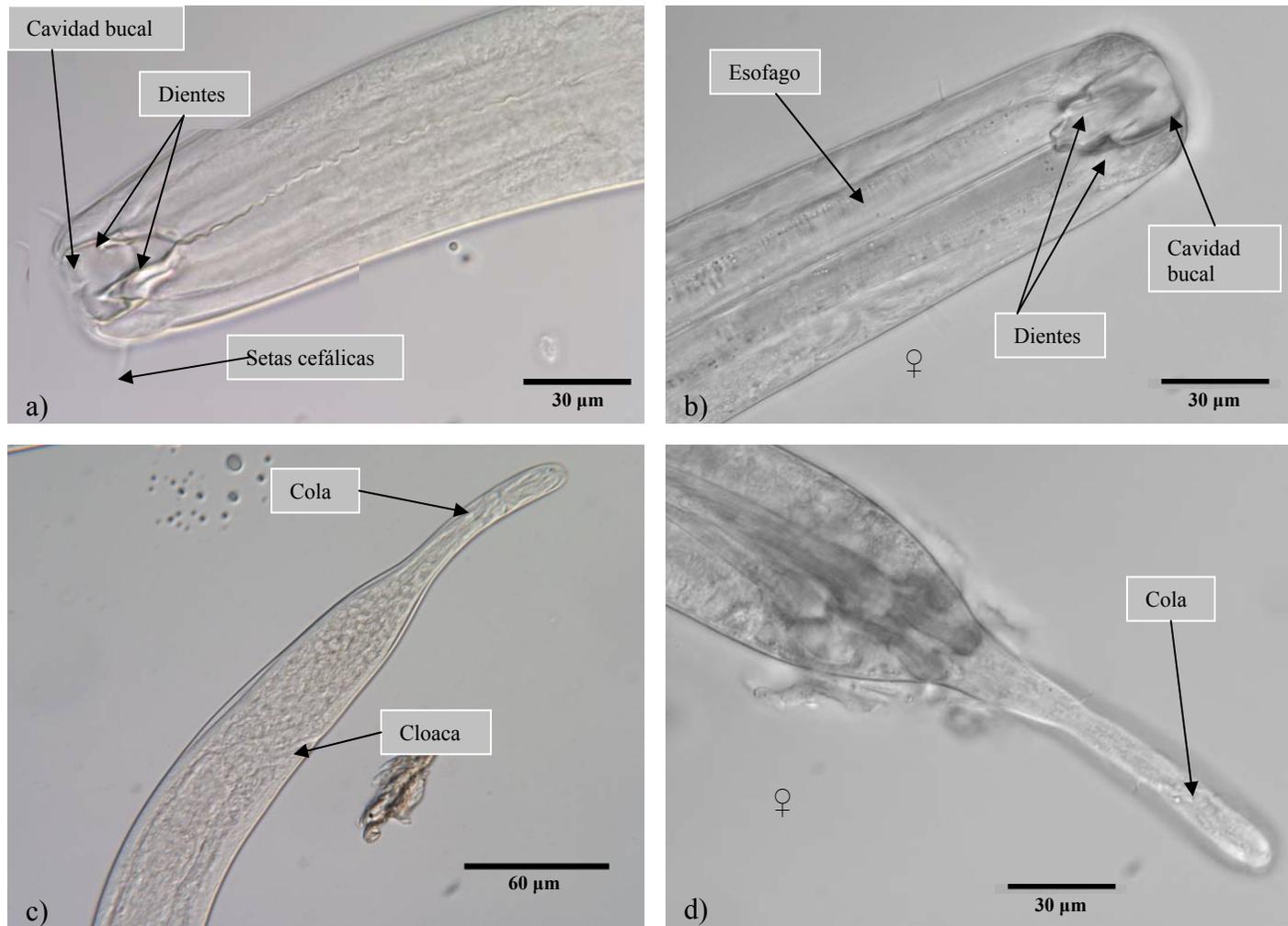


Figura 14. *Oncholaimus* sp (Localidad La Paz B.C.S.) a y c Individuo juvenil; b y d Individuo hembra. **a, b)** Región cefálica; **c)** Parte posterior, región cloacal; **d)** Parte posterior, región cloacal.

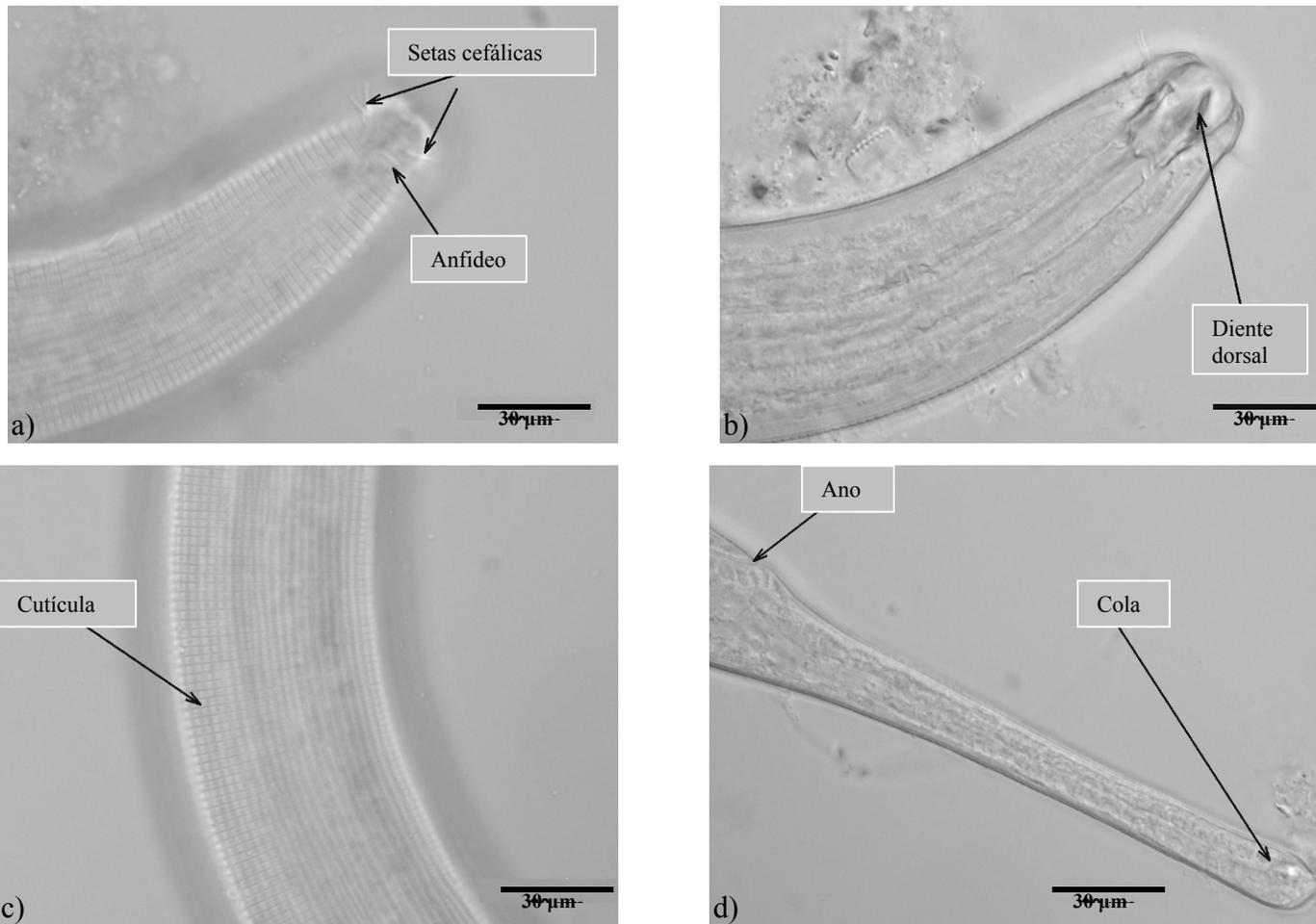


Figura 15. *Viscosia* sp (Estación “El Tornillal”). Individuo juvenil. **a)** Parte anterior de un individuo juvenil; **b)** Región cefálica; **c)** Parte dorsal mostrando la cutícula ligeramente estriada; **d)** Región anal, cola en forma cónica.

VII. 2.5. Familia Rhabdodemaniidae Filipjev, 1934

Esta familia pertenece al suborden Tripyloidina, junto con las familias Tripyloididea y Pandolaimidae. La familia Rhabdodemaniidae es representada por un único género, el género *Rhabdodemia*.

VII. 2.5.1 *Rhabdodemia* Baylis & Daubney, 1926

El género *Rhabdodemia* presenta una cavidad bucal que puede estar o no, provista dientes, usualmente tres en la parte basal. Las especies de este género se distinguen regularmente, por la posición y longitud de las setas cefálicas arregladas en dos círculos; además de la longitud de la cola y la espícula. La base de datos Nemys reporta 27 especies de las cuales dos son sinónimas, mientras que Platt & Warwick (1983) reportan 20 especies.

Para este estudio, en la localidad del Alto Golfo de California, se identificó un individuo macho de la morfoespecie *Rhabdodemia* sp. el cual presenta una cavidad bucal pequeña, con dientes aparentes, setas cefálicas arregladas en dos círculos evidentes; además de una cola cilíndrica y una espícula con gubernaculum, se observa la presencia de suplementos precloacales pequeños y poco evidentes (Fig. 16).

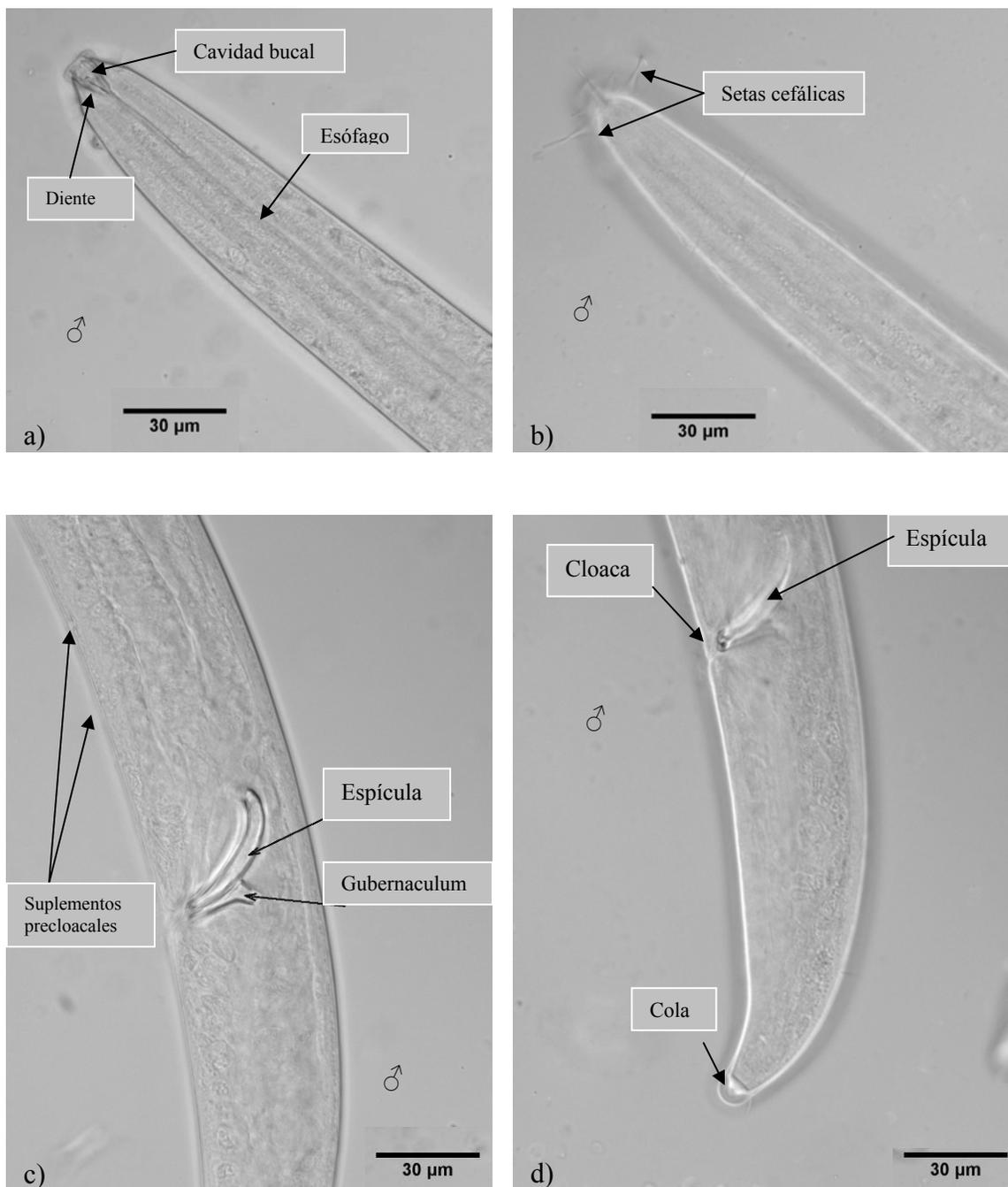


Figura 16. *Rhabdodemanía* sp (Estación “El Tornillal”). Individuo macho **a)** Región anterior; **b)** Región cefálica; **c)** Región cloacal; **d)** Región posterior de un individuo macho.

VII. 3. ORDEN CHROMADORIDA

VII.3.1 Familia Chromadoridae Filipjev, 1917

Los individuos de la familia Chromadoridae presentan caracteres como: cutícula con puntuaciones, así como, diferentes formas de ornamentaciones, la forma del anfideo es regularmente en “orquilla” u ovalo, una cavidad bucal pequeña que presenta al menos un diente dorsal (Platt & Warwick, 1988).

Para este estudio, dentro de la familia Chromadoridae se registraron un total de 15 individuos, siete juveniles, seis machos y tres hembras, en cuatro géneros distintos (Tabla II). Sólo dos de los 15 individuos no pudieron ser identificados a nivel de género debido a que el registro morfológico no permitió la observación de caracteres morfológicos adecuadamente (Figs. 17 y 18, respectivamente). Del total de individuos identificados, 11 pertenecen a la localidad de La Paz B.C.S y el resto a la localidad del Alto Golfo de California (Tablas III y IV).

Los individuos identificados como Chromadoridae sp1 y sp2 presentan caracteres como: cutícula punteada, esófago desarrollado, una cavidad bucal provista de dientes y una cola cónica. El individuo identificado como Chromadoridae sp2, por presentar un esófago con bulbo doble es muy similar a la morfoespecie *Spilophorella* sp2, sin embargo, debido a que está dañado por el proceso de fijación, no se pudo observar la cavidad bucal con claridad (Fig.18).

VII.3.1.1 *Chromadora* Bastian, 1865

Los individuos de este género presentan características muy similares al género *Atrochromadora*, ya que ambos presentan una cavidad bucal con dientes, un patrón cuticular con hileras de puntos en la parte lateral del cuerpo y se ha observado que ambos géneros presentan un anfideo en forma de “orquilla”. Platt y Warwick (1988), reportan 16

especies, sin embargo Nemys reporta 21 especies del género *Atrachormadora* y tres especies para *Chromadora*.

En la localidad de La Paz B.C.S, se identificaron dos morfoespecies dentro de este género, *Chromadora* sp1 y *Chromadora* sp2 (Figs. 19 y 20, respectivamente), cada una con 2 individuos (Tabla IV). Los individuos de la morfoespecie *C. sp1* (Fig. 19) presentaron una cavidad bucal con un diente dorsal pequeño, un esófago y un bulbo bien desarrollado, además de una cutícula caracterizada por hileras de puntos en la parte lateral.

En el caso de la morfoespecie *C. sp2* (Fig. 20), los individuos mostraron un bulbo y un esófago bien desarrollado, así como pigmentos en la parte anterior del cuerpo, un patrón cuticular similar a la morfoespecie *C. sp1*, suplementos precloacales en la parte posterior y una cola en forma cónico-cilíndrica

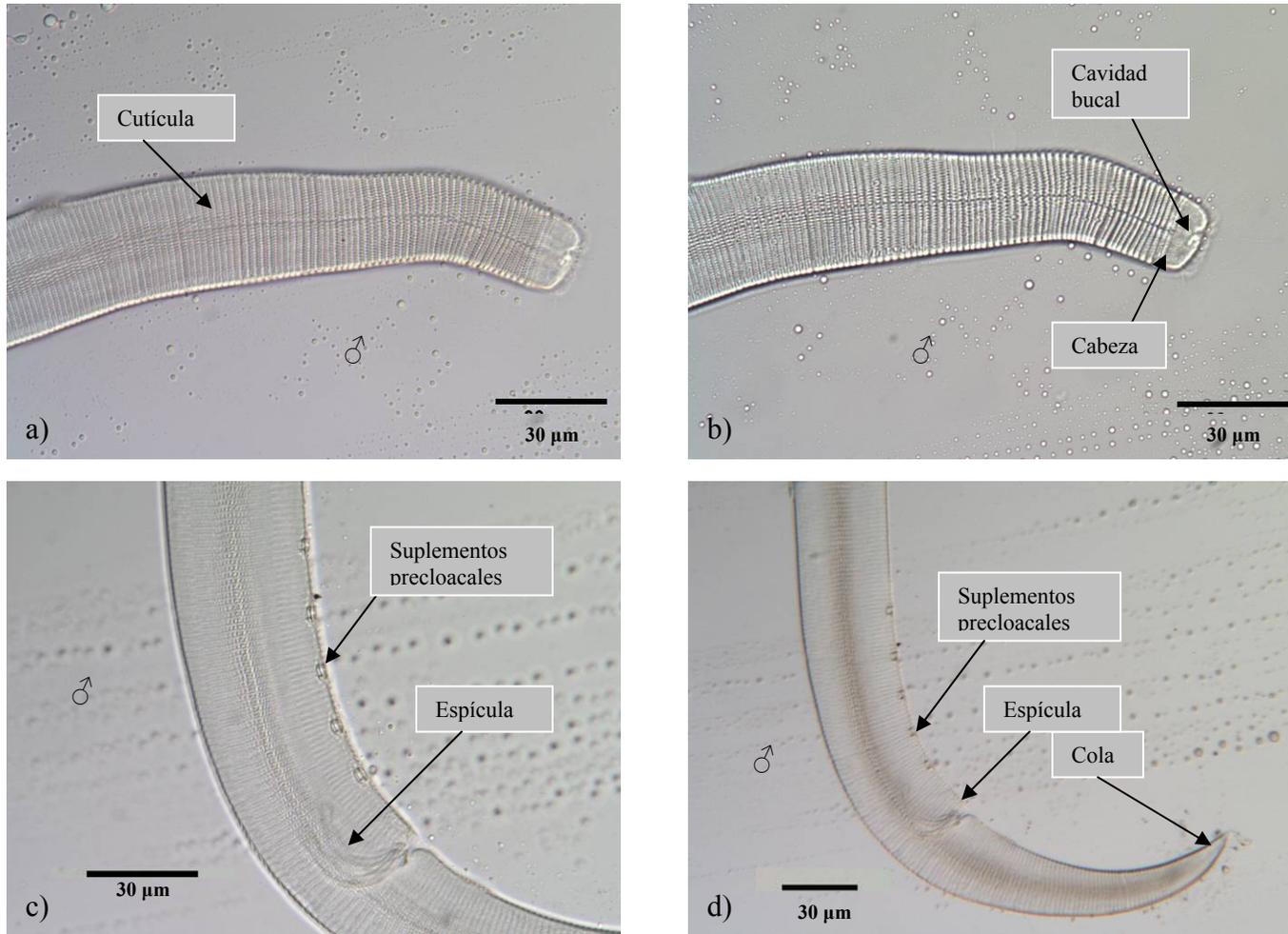


Figura 17. *Chromadoridae* sp1 (Estación “El Esterito”) Individuo macho. a) Parte anterior, patrón cuticular; b) Región cefálica; c); d) Región posterior; d) Región cloacal.

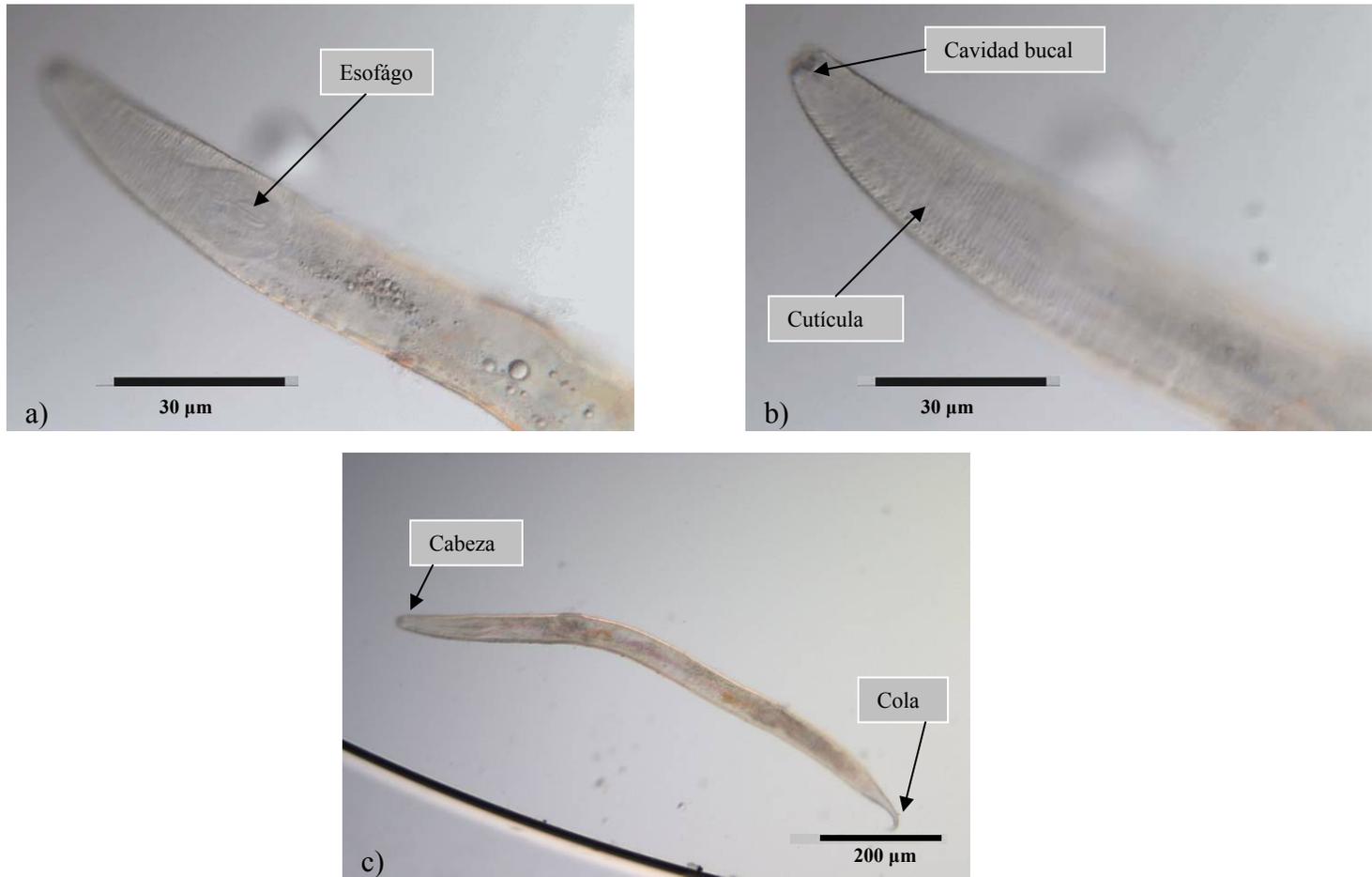


Figura 18. Chromadoridae sp2 (Estación “El Conchalito”) Individuo juvenil. **a)** Parte anterior mostrando un bulbo doble; **b)** Región cefálica; **c)** Cuerpo total.

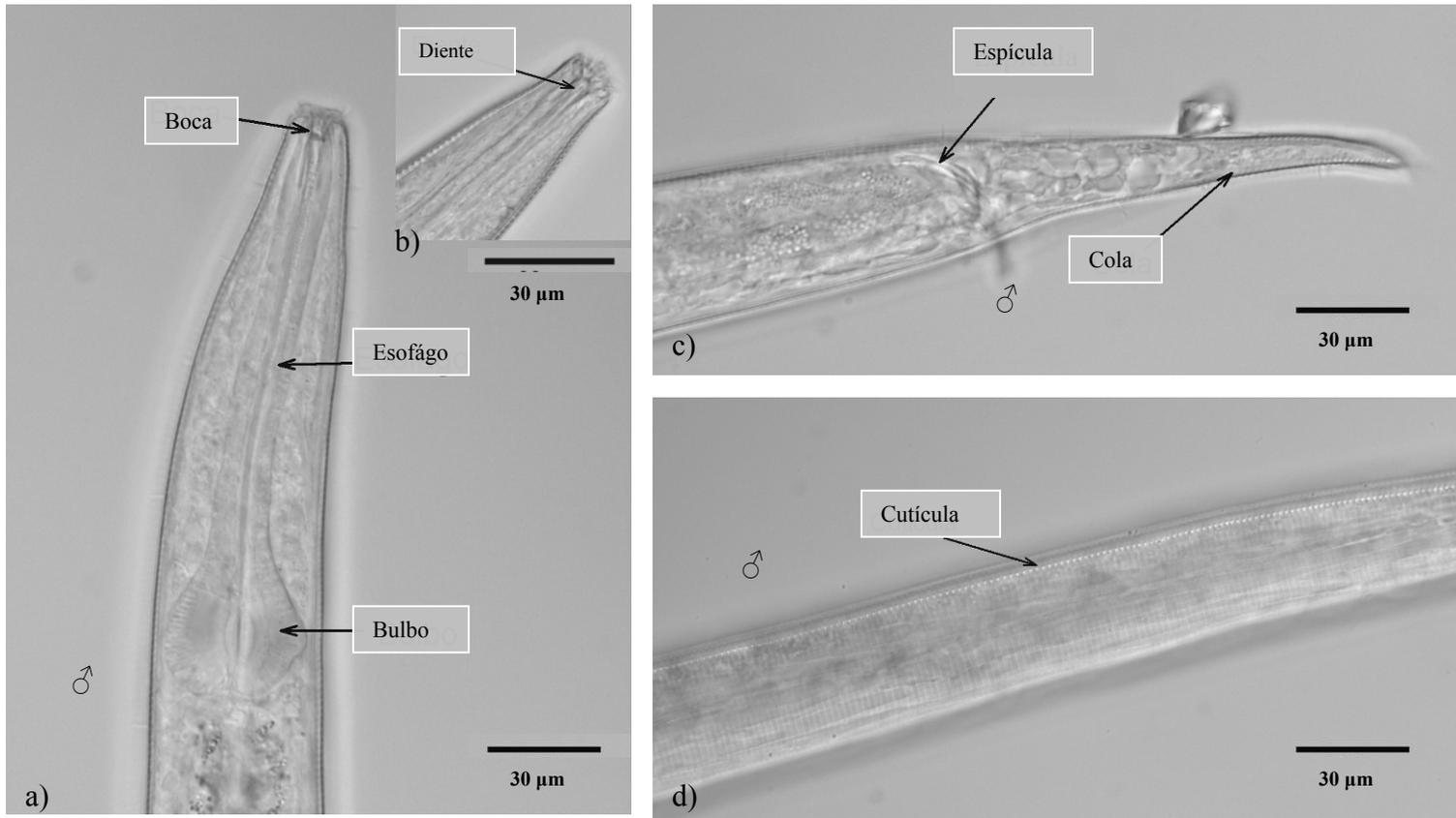


Figura 19. *Chromadora sp1* (Estación “El Conchalito”) Individuo macho. **a)** Parte anterior del cuerpo; **b)** Región bucal; **c)** Parte posterior de un individuo macho; **d)** Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular.

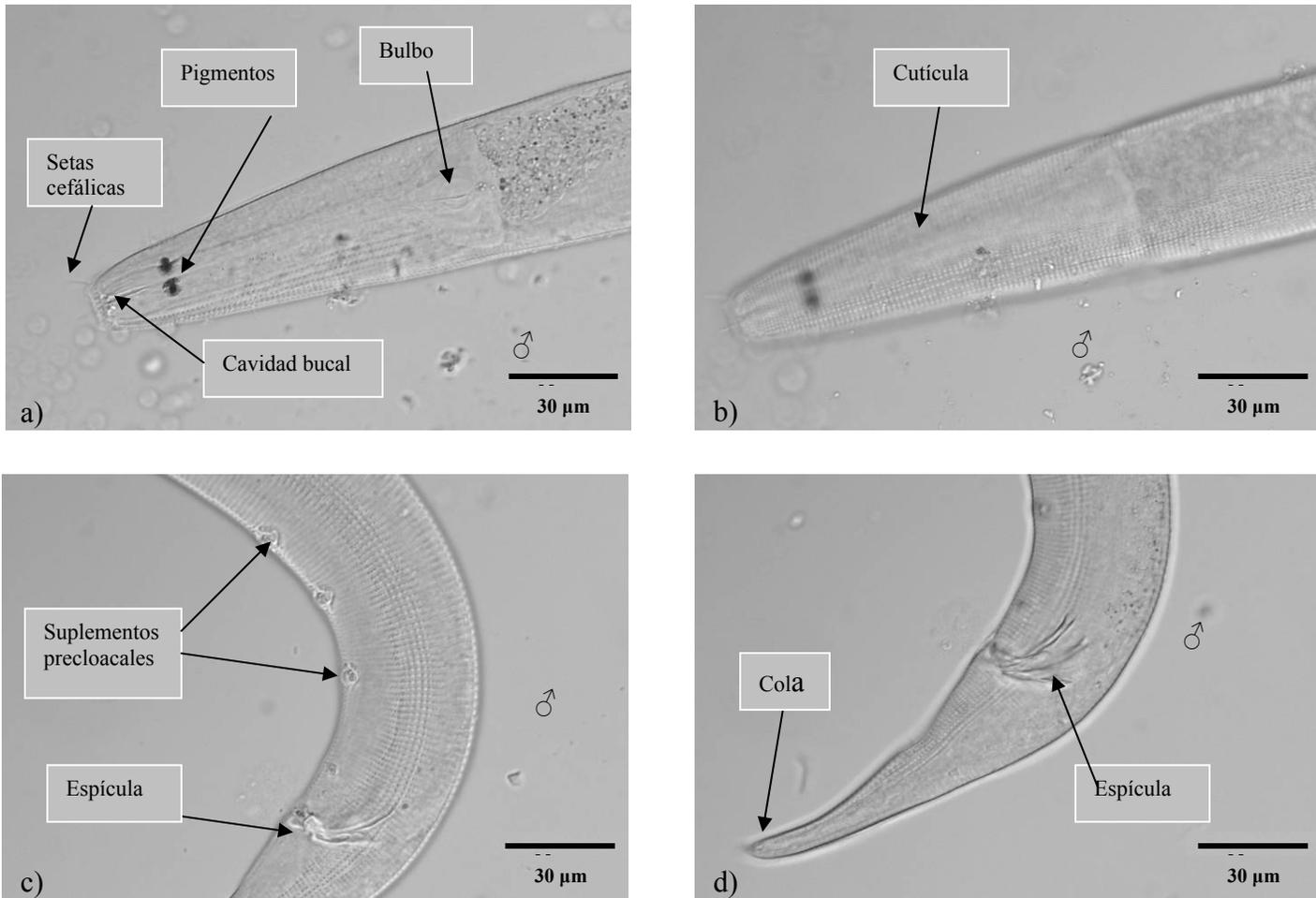


Figura 20. *Chromadora* sp 2 (Estación “El Esterito”). Individuo macho. **a)** Región cefálica de un individuo macho; **b)** Parte anterior; **c)** Región cloacal; **d)** Parte posterior.

VII.3.1.2. *Dichromadora* Kreis, 1929

Este género presenta características muy similares al género *Chromadorita* por lo que es muy fácil confundirlos. Las características que presentan los individuos de este género son: una cavidad bucal con dientes triangulares, una ornamentación cuticular homogénea, aunque se puede observar en la parte lateral del cuerpo dos hileras longitudinales de puntos, el anfideo es en forma oval o en forma de “orquilla” (Platt & Warwick, 1988; Muthumbi & Vincx, 1998b). Individuos de estos géneros han sido reportados en la zona intermareal, así como en estuarios. Platt y Warwick (1988) han reportado tan solo 17 especies mientras que la base de datos Nemys reporta 24 especies.

Para este género, se identificaron tres morfoespecies *Dichromadora* sp1, *Dichromadora* sp2, *Dichromadora* sp3 y *Dichromadora* sp4 (Figs. 21, 22, 23 y 24), (1, 1, 4 y 1 individuos, respectivamente). Las morfoespecies *D.* sp1 y *D.* sp2 fueron encontradas en la localidad del Alto Golfo de California (Tabla III), mientras que *D.* sp3 en la localidad de La Paz B.C.S (Tabla IV).

La morfoespecie *D.* sp1 presenta características como: pequeñas setas cefálicas, cavidad bucal pequeña provista de un diente, un esófago y un bulbo bien desarrollados (Fig. 21). Además de las características mencionadas anteriormente, la morfoespecie *D.* sp2 presenta una cutícula homogénea punteada, y una cola en forma de “espinete” (Fig. 22). Para la morfoespecie *D.* sp3 las características fueron las siguientes: una cutícula con dos hileras de puntos en la parte lateral del cuerpo, un esófago en forma redondeada sin aparentes interrupciones plasmáticas, una espícula en forma curveada, ausencia de suplementos precloacales y una cola en forma de punta (Fig. 23). La morfoespecie *D.* sp4 presenta un esófago bien desarrollado, una cavidad bucal provista por un diente, cola en forma conico-cilindrica y a diferencia de la morfoespecie *D.* sp1 no presenta un bulbo bien desarrollado (Fig. 24)

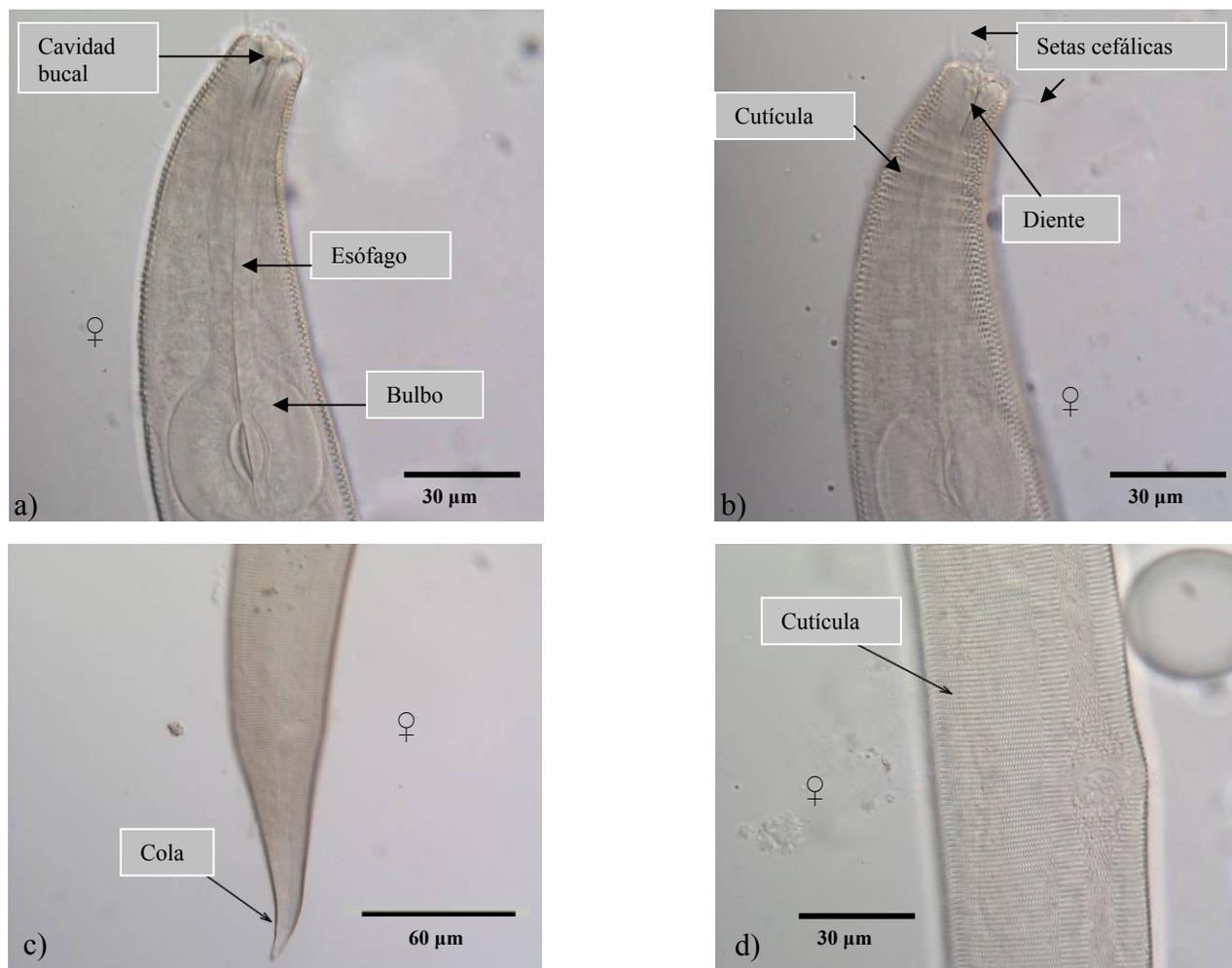


Figura 21. *Dichromadora* sp1 (Estación “El Burro”). Individuo hembra. **a)** Parte anterior del cuerpo; **b)** Parte anterior mostrando del cuerpo; **c)** Parte posterior mostrando la cola de una hembra; **d)** Parte ventral del cuerpo mostrando el patrón cuticular.

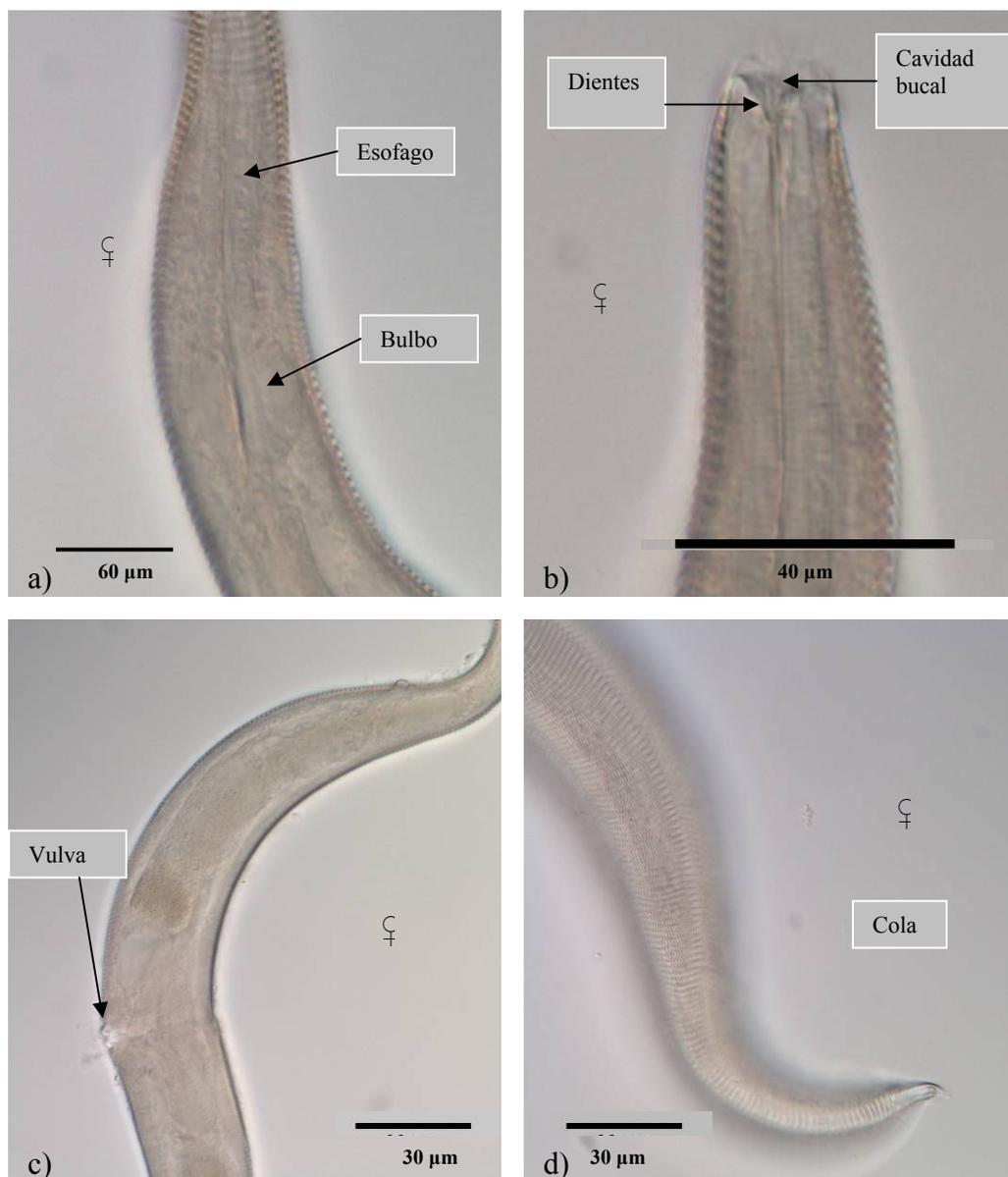


Figura 22. *Dichromadora* sp2 (Estación “El Burro”). Individuo hembra. **a)** Parte anterior del cuerpo; **b)** Región cefálica; **c)** Región media del cuerpo, mostrando la vulva; **d)** Parte posterior.

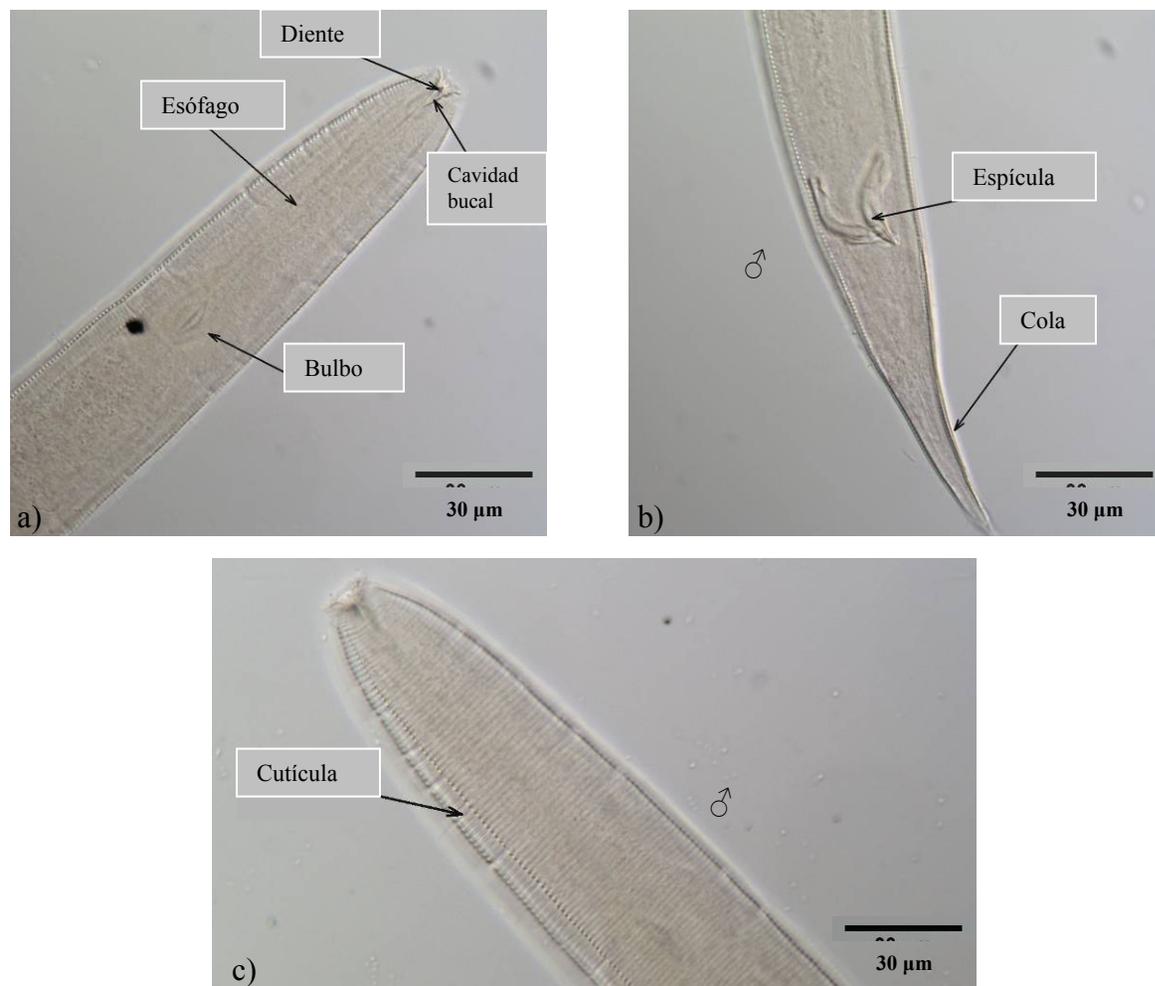


Figura 23. *Dichromadora* sp3 (Estación “El Conchalito”). Individuo macho. **a)** Parte superior del cuerpo; **b)** Parte posterior de un individuo macho; **c)** Parte superior mostrando el patrón cuticular.

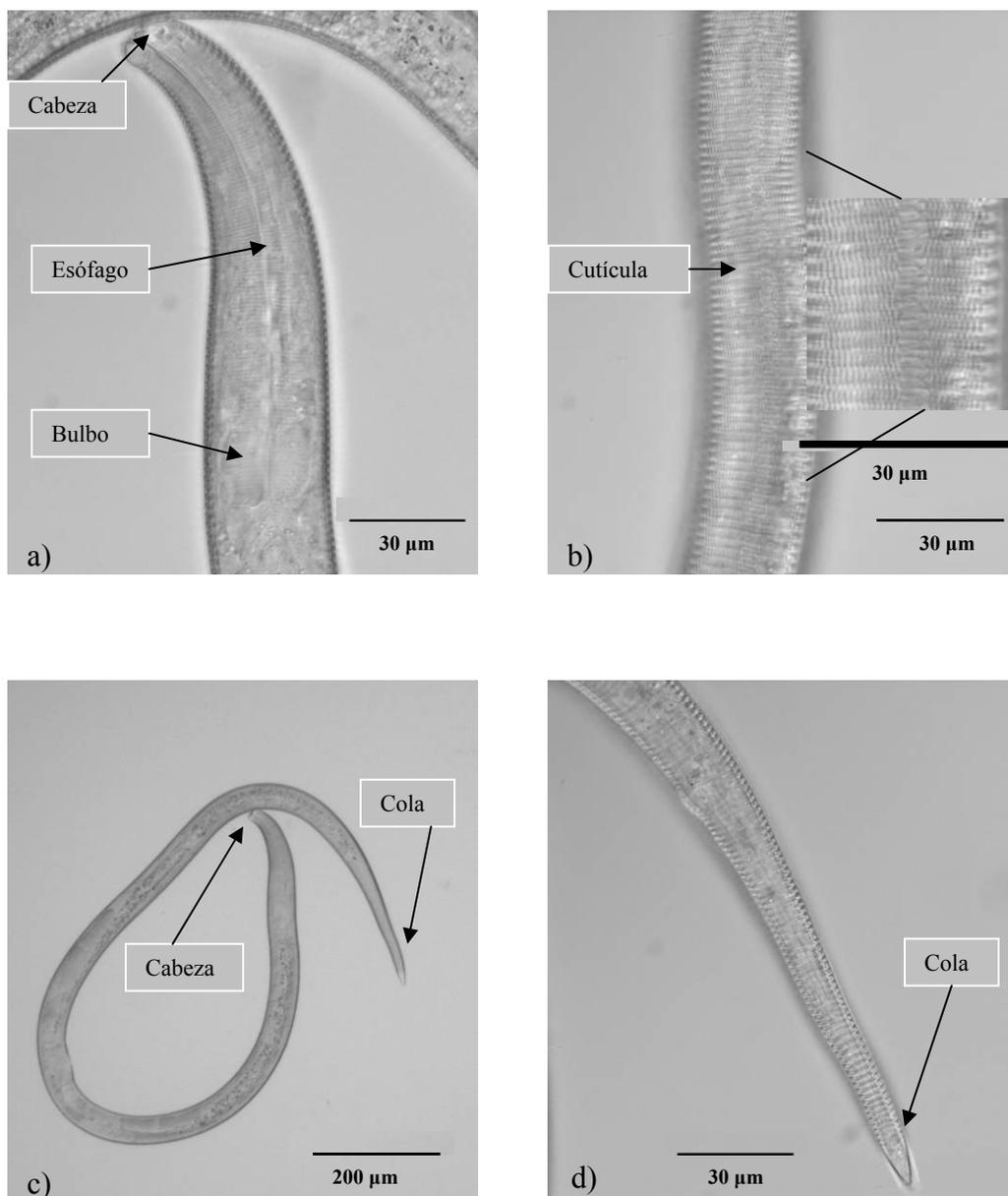


Figura 24. *Dichromadora* sp4. (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo, evidenciando el esófago; **b)** Parto dorsal del cuerpo, mostrando el patrón cuticular; **c)** Cuerpo total; **d)** Parte posterior del cuerpo, región cloacal

VII.3.1.3 *Rhips* Cobb, 1920 / *Actinonema* Cobb, 1920

El género *Rhips* es muy similar al género *Actinonema*, ambos géneros están cercanamente relacionados y las características para diferenciarlos no son muy claras (Muthumbi & Vincx, 1998a). Es difícil distinguir entre ambos si no se tiene un individuo adulto Platt y Warwick (1988) mencionan que la única característica para diferenciarlos es la presencia de una espícula doble presente en *Rhips*. Ambos géneros presentan un anfideo similar, con forma oval y doble contorno, una cutícula con ornamentación y diferenciación lateral. Se han reportado 5 especies para *Actinonema* (Platt y Warwick 1988), y dos para *Rhips*, aunque la base de datos Nemys reporta 12 y 8 especies, respectivamente.

Sólo se identificó un individuo juvenil, perteneciente al género *Rhips* o *Actinonema*, en la localidad de Alto Golfo de California (Tabla III). No se pudo discernir entre ambos géneros debido al estadio del individuo identificado, ya que la diferencia más evidente entre uno y otro, es la presencia de una doble espícula que presentan los machos del género *Rhips*. Las características morfológicas que presentó, fueron las siguientes: una cavidad bucal pequeña provista por dientes, presenta una cutícula con diferenciación lateral y heterogéneamente armada, un anfideo oval con doble contorno y una cola en forma cónica sin estrías en la parte final (Fig. 25).

VII.3.1.4 *Spilophorella* Filipjev, 1917

El género *Spilophorella* presenta una cutícula heterogénea con diferenciación lateral, una cavidad bucal pequeña provista de un diente, un anfideo elongado ubicado entre las setas cefálicas y una cola en forma cónica. La característica más distintiva de este género es la presencia de un esófago con bulbo doble. La base de datos Nemys reporta 23 especies de *Spilophorella* mientras que Platt y Warwick (1988) reportan tan solo 13.

Se identificaron dos morfoespecies, *Spilophorella* sp1 y *Spilophorella* sp2, la primera en la localidad del Alto Golfo de California y la segunda en La Paz B.C.S (Tablas

III y IV, respectivamente). La morfoespecie *S. sp1* presentó una cutícula con diferenciación lateral, un par de setas cefálicas, un bulbo doble con la parte anterior mas corta que la posterior, una cavidad bucal con un diente y una cola en forma cónica (Fig. 26). La morfoespecie *S. sp2*, es similar a *S. sp1*, excepto por que *S. sp2* presenta hileras de puntos en la parte posterior del cuerpo y la parte anterior del esófago es muy similar a la posterior (Fig. 27).

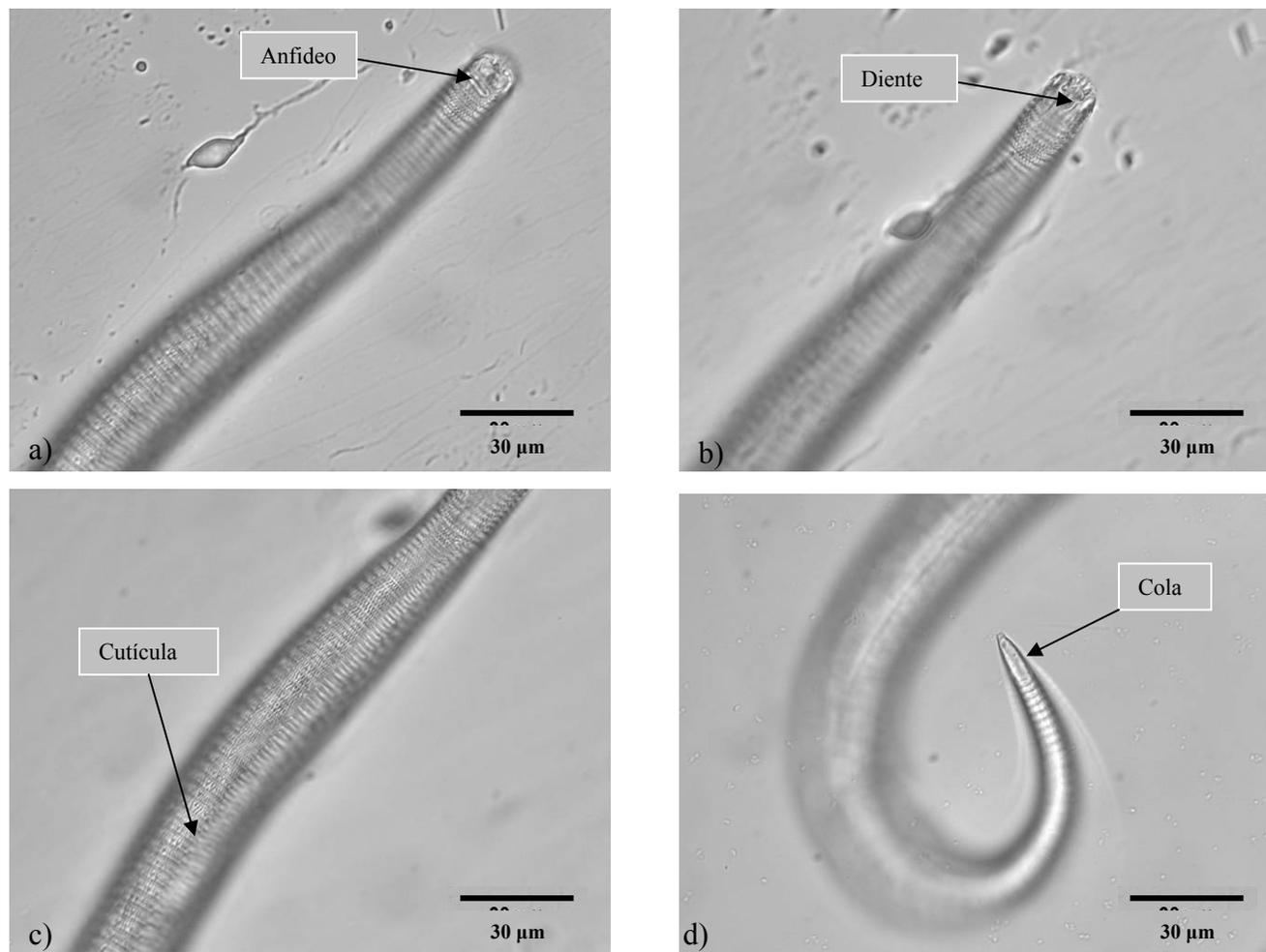


Figura 25. *Rhipis/ Actinonema* sp (Estación “Santa Clara”). Individuo juvenil. **a, b)** Parte anterior de un individuo juvenil; **c)** Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular; **d)** Región posterior mostrando la cola.

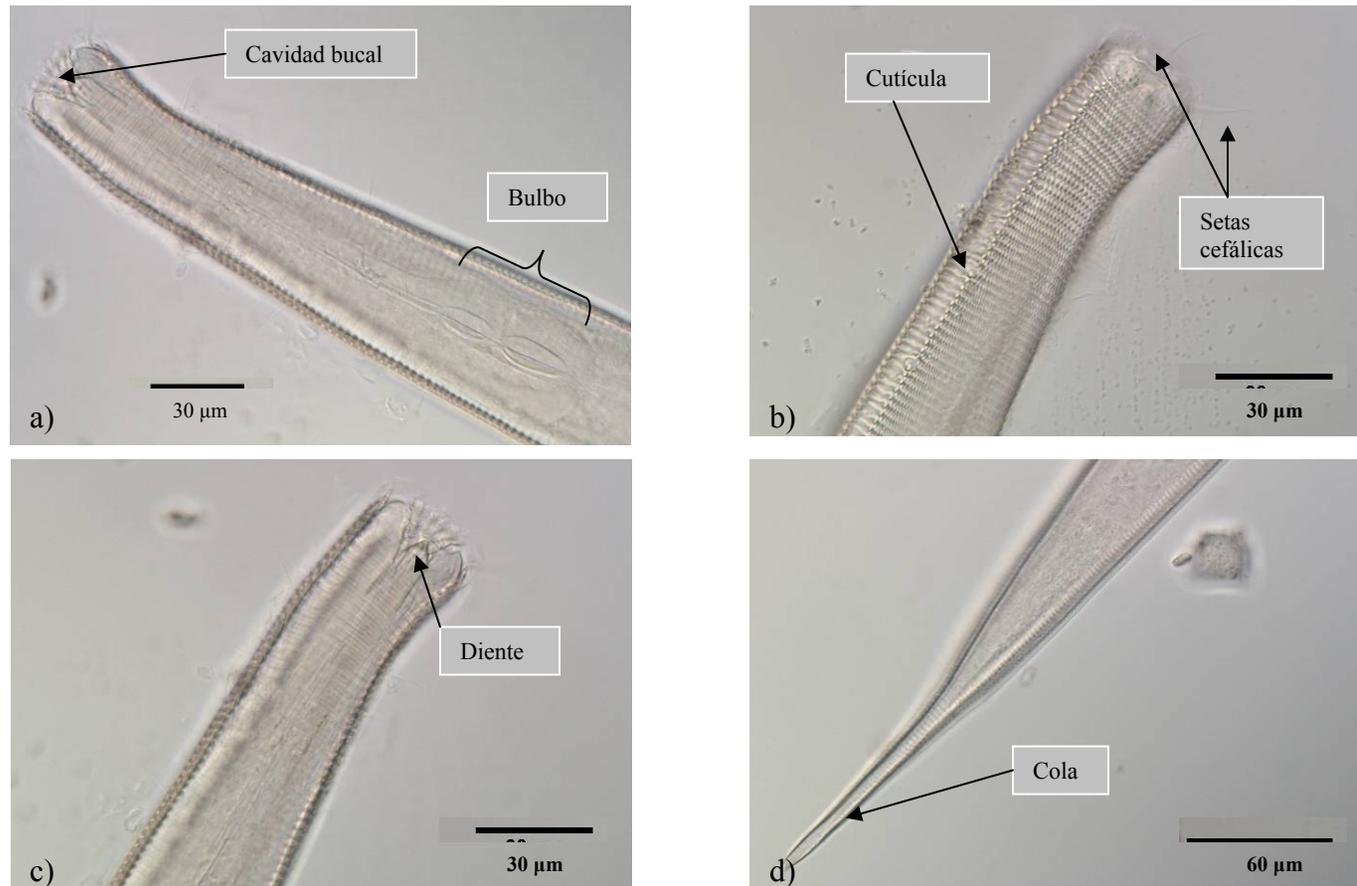


Figura 26. *Spilophorella* sp1 (Estación “El Burro”). Individuo juvenil. **a)** Parte anterior del cuerpo; **b)** Región cefálica mostrando el patrón cuticular; **c)** Región cefálica; **d)** Parte posterior.

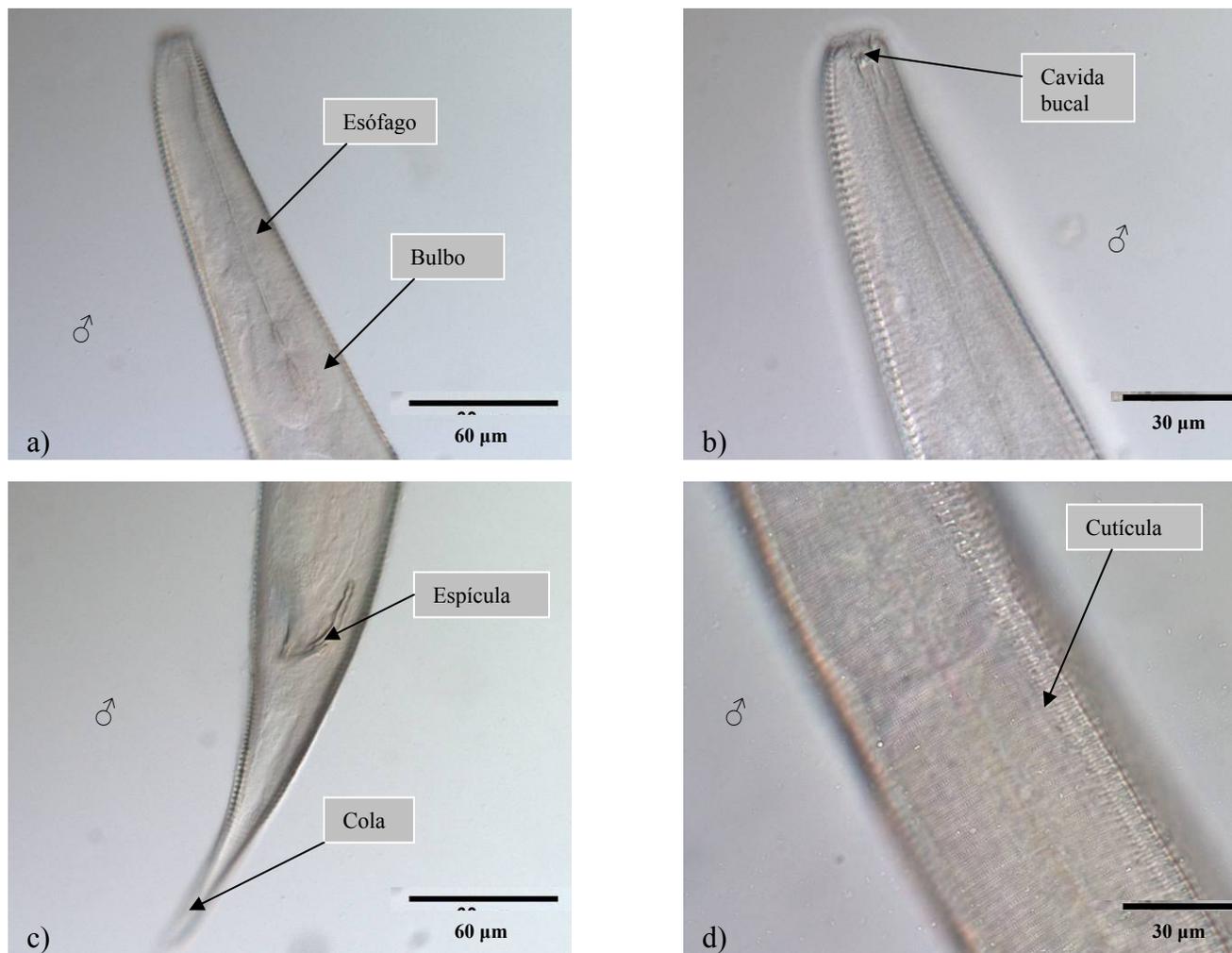


Figura 27. *Spilophorella* sp2 (Estación “Ensenada de La Paz”) Individuo juvenil a) Parte anterior; b) Región cefálica; c) Región cloacal; d) Región anterior del cuerpo mostrando el patrón cuticular.

VII.3.2. Familia Comesomatidae Filipjev, 1918

La familia Comesomatidae presenta características tales como cutícula anillada con hileras de puntuaciones, un anfideo con forma multiespiral, un esófago ensanchado hacia la parte posterior, y raramente presenta un bulbo. Los machos exhiben suplementos precloacales, la cola es en forma cónico cilíndrica que termina en punta, posee un gubernaculum pareado con apófisis dorsal (Platt & Warwick, 1988; Riera *et al.*, 2006).

VII.3.2.1. *Dorylaimopsis* Ditlevsen, 1918

Dorylaimopsis tiene una cavidad bucal cilíndrica con tres dientes en forma punteada, además presenta setas cefálicas en círculos separados, una cutícula con diferenciación lateral con filas longitudinales de puntos alargados. Aunque Platt y Warwick, (1988) sólo reportan 11 especies en la base de datos Nemys se reportan 23.

Se registró un individuo juvenil perteneciente a este género en la localidad de La Paz B.C.S (Tabla IV). Presenta un anfideo en forma espiral, una cutícula con diferenciación lateral, una cavidad bucal provista por dientes y una cola en forma cónica (Fig. 28)

VII.3.2.2. *Sabatieria* Rouville, 1903

El género *Sabatieria* es uno de los géneros de nemátodos marinos más comunes en hábitats béntónicos (Chen & Vincx, 1999). Presenta una cutícula punteada sin diferenciación lateral, setas cefálicas, un anfideo ubicado inmediatamente después de las setas cefálicas y una cavidad bucal en forma de “copa” sin dientes. Debido a que es un género muy grande, Platt (1985) lo ha dividido en cinco grupos de acuerdo a sus características: *Praedatix*, *Armata*, *Pulchra*, *Celtica* y *Ornata*. Hasta ahora han sido registradas más de 80 especies (Chen & Vincx, 1999), aunque Platt y Warwick (1988) sólo reportan 36.

Se identificaron dos morfoespecies del género *Sabatieria*, *S. sp1* y *S. sp2*; la primera en la estación de “El Tornillal” del Alto Golfo de California (Tabla III) y la segunda la estación de “La Ensenada de La Paz”. Ambas morfoespecies presentan una cutícula con hileras de puntos transversales, setas cefálicas, un anfideo espiral, presentan una cavidad bucal en forma de “copa” y no presentan dientes. A diferencia de *S. sp1*, *Sabatieria sp2* presenta una cola en su mayor parte cilíndrica y un anfideo con 2.5 vueltas (Figs. 29 y 30)

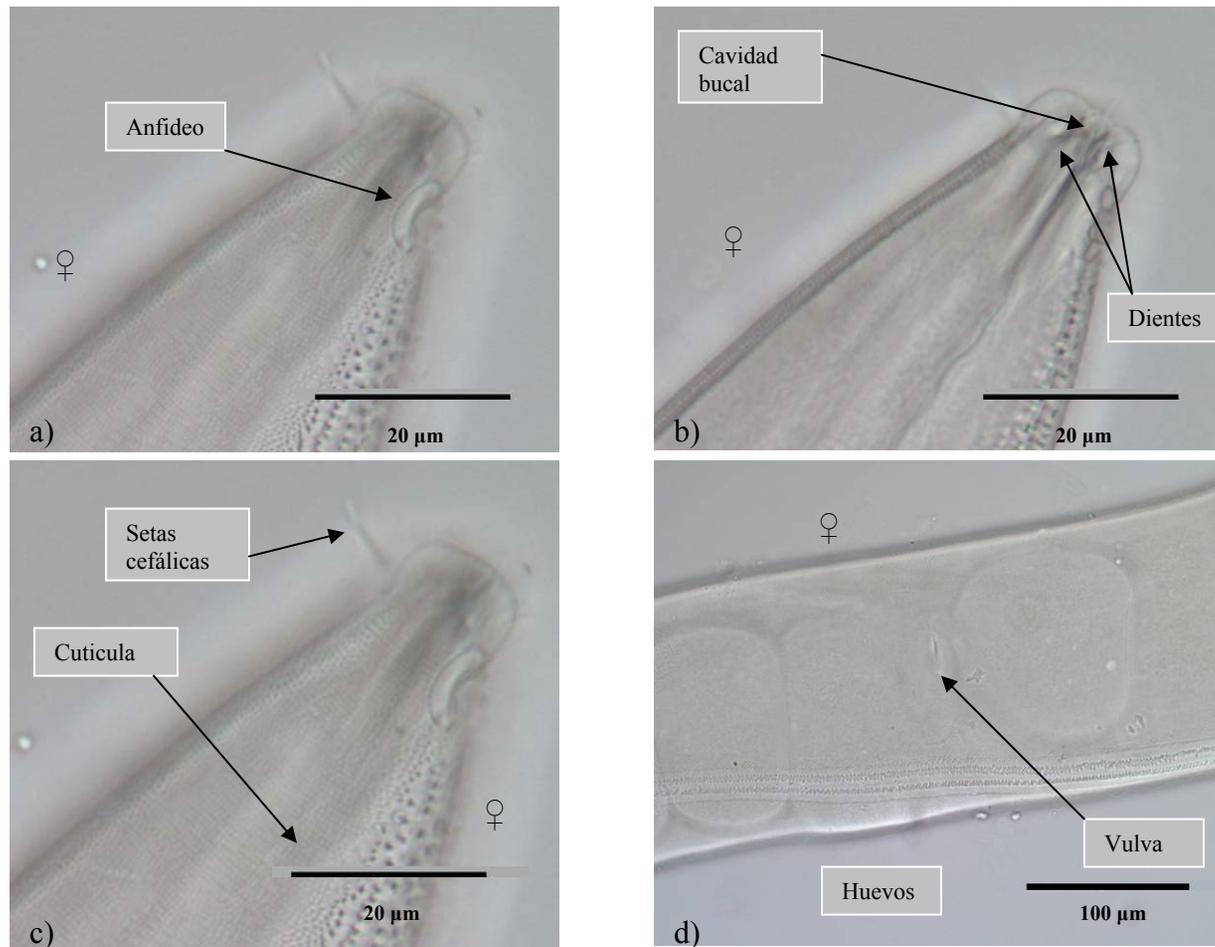


Figura 28. *Dorylaimopsis* sp (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo hembra. **a)** Parte anterior, vista ventral; **b)** Región cefálica; **c)** Parte anterior mostrando el patrón cuticular con diferenciación lateral; **d)** Región vulvar, vista ventral.

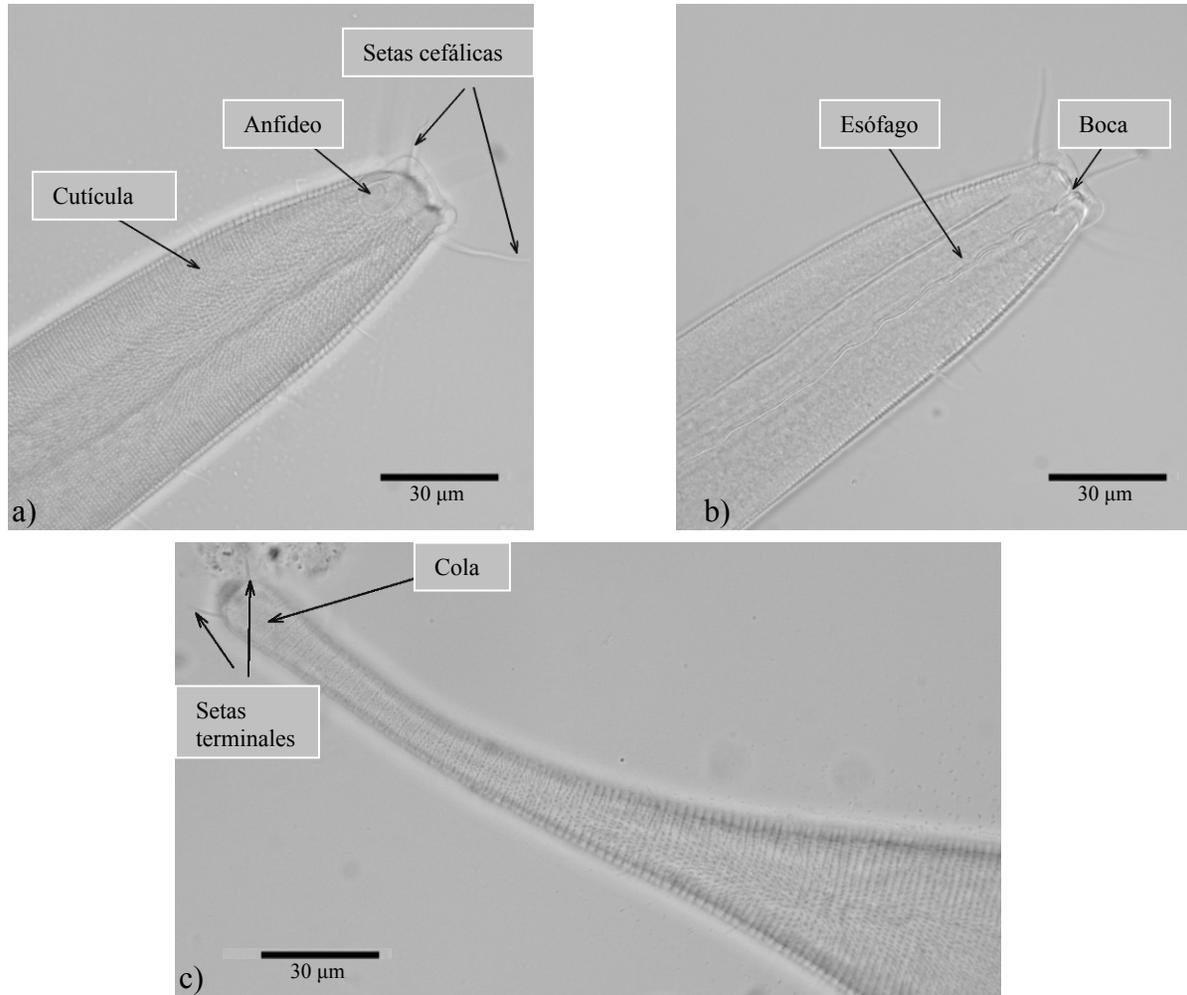


Figura 29. *Sabatieria* sp 1 (Estación “El Tornillal”). Individuo juvenil. **a)** Parte anterior del cuerpo de un individuo juvenil; **b)** Región cefálica; **c)** Cola en forma cónica de un individuo juvenil, mostrando las setas terminales.

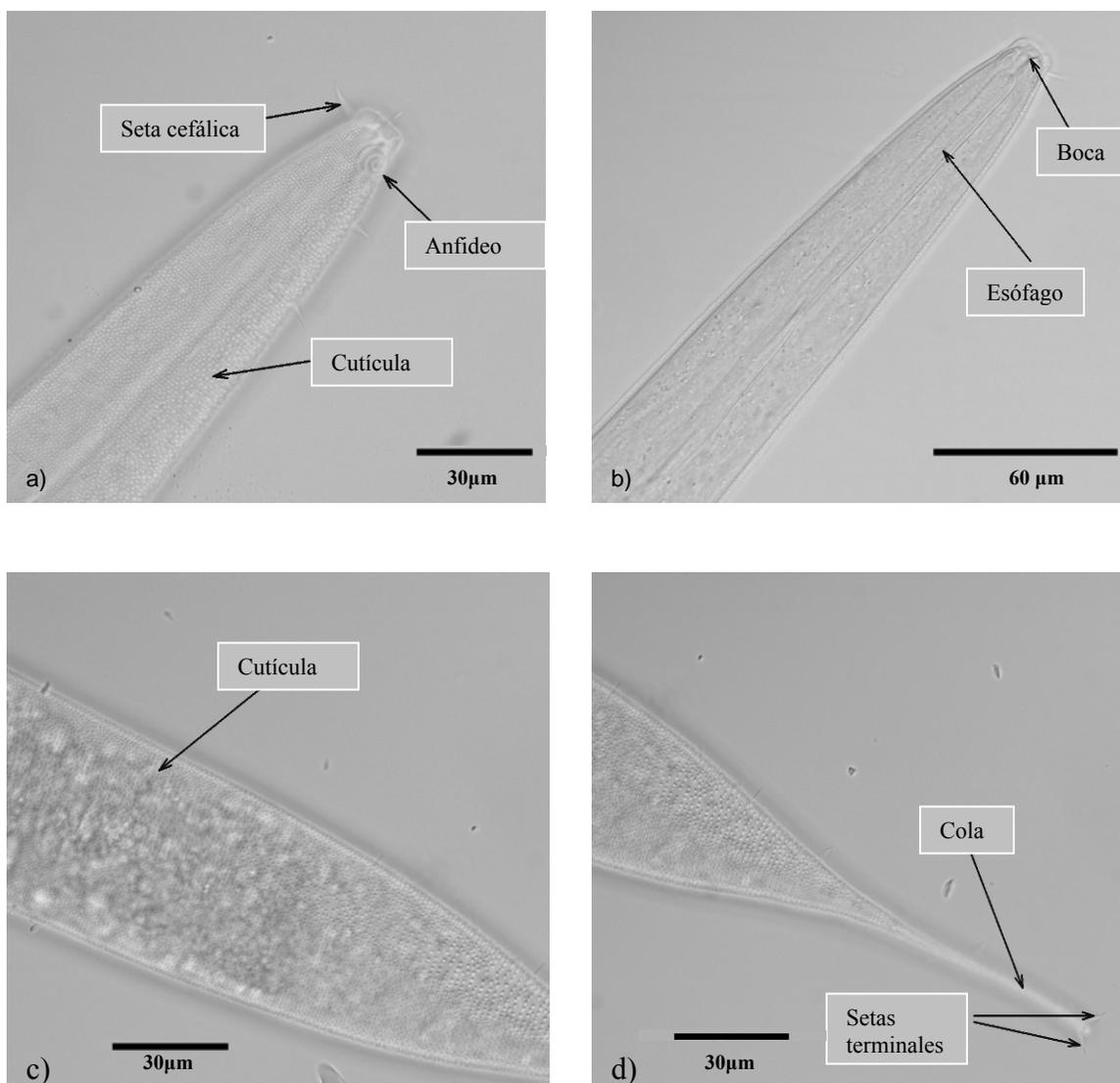


Figura 30. *Sabatieria* sp2 (Estación “La Ensenada de La Paz”). Individuo juvenil **a)** Región cefálica; **b)** Parte anterior; **c)** Región dorsal mostrando el patrón cuticular; **d)** Región posterior de un individuo juvenil.

VII.3.3.Familia Cyatholaimidae Filipjev, 1918

Los individuos de la familia Cyatholaimidae presentan generalmente una cutícula con hileras transversales de puntos, anfidio multiespiral, además presentan setas cefálicas. La cavidad bucal frecuentemente presenta dientes dorsales y en ocasiones algunos individuos pueden presentar un diente pequeño subcentral. El esófago carece de un bulbo posterior, aunque se ha observado la presencia de bulbo en el género *Paralongicyatholaimus* (Platt & Warwick, 1988).

VII.3.3.1. *Acanthonchus* Cobb 1920

Este género presenta además características distintivas de la familia Cyatholaimidae. La diferencia que presenta el género *Acanthonchus* con respecto a otros Cyatholaimidos es la presencia de suplementos prelocales tubulares y generalmente el suplemento anterior es más largo que el resto de los suplementos, presenta también un gubernaculum simple.

En la localidad de La Ensenada de La Paz, se identificaron cuatro individuos del género *Acanthonchus*, dos hembras y dos machos. Estos individuos presentan una cutícula con hileras de puntos transversales, un anfidio multiespiral, una cavidad bucal provista de dientes, y una cola cónico cilíndrica, presenta suplementos prelocales, el anterior más grande que los posteriores (Fig. 31)

VII.3.3.2 *Pomponema* Cobb, 1917

Pomponema presenta una cutícula con finas puntuaciones y una diferenciación lateral de cuatro filas longitudinales de puntos, la cutícula de la región cefálica presenta puntuaciones que vistas lateralmente, parecen barras alargadas con forma de “Y” al final. En Nemys han sido registradas 34 especies de *Pomponema* mientras que Platt y Warwick (1988) reportan 28 especies.

Se identificó a un individuo del género *Pomponema* en la estación “El Tornillal”, este presentó una cutícula con finas puntuaciones a lo largo del cuerpo y diferenciación lateral que presenta filas longitudinales de puntos más grandes, setas cefálicas y labiales; una cavidad bucal armada con grandes dientes y una cola en cónico-cilíndrica (Fig. 32).

VII.3.3.3 *Praeacanthonchus* Micoletzky, 1924

Praeacanthonchus se ha descrito con una cavidad bucal provista de un diente dorsal, la cutícula no presenta diferenciación lateral, los machos presentan suplementos precloacales en forma tubular y un gubernaculum, la cola regularmente es cónica y corta. La característica más distintiva entre *Praeacanthonchus* y *Paracanthonchus* es un gubernaculum en un solo par, mientras que este género es distintivo de *Cyatolaimus* por la presencia de suplementos precloacales. En Nemys se reportan 11 especies para este género.

En la estación “Ensenada de La Paz” (Tabla II) se identificó a un individuo del género *Praeacanthonchus*. Este presenta una cavidad bucal desprovista de dientes, setas cefálicas, una cutícula con hileras transversales de puntos y puntos más grandes en la parte lateral, así como dos filas de poros (Fig. 33).

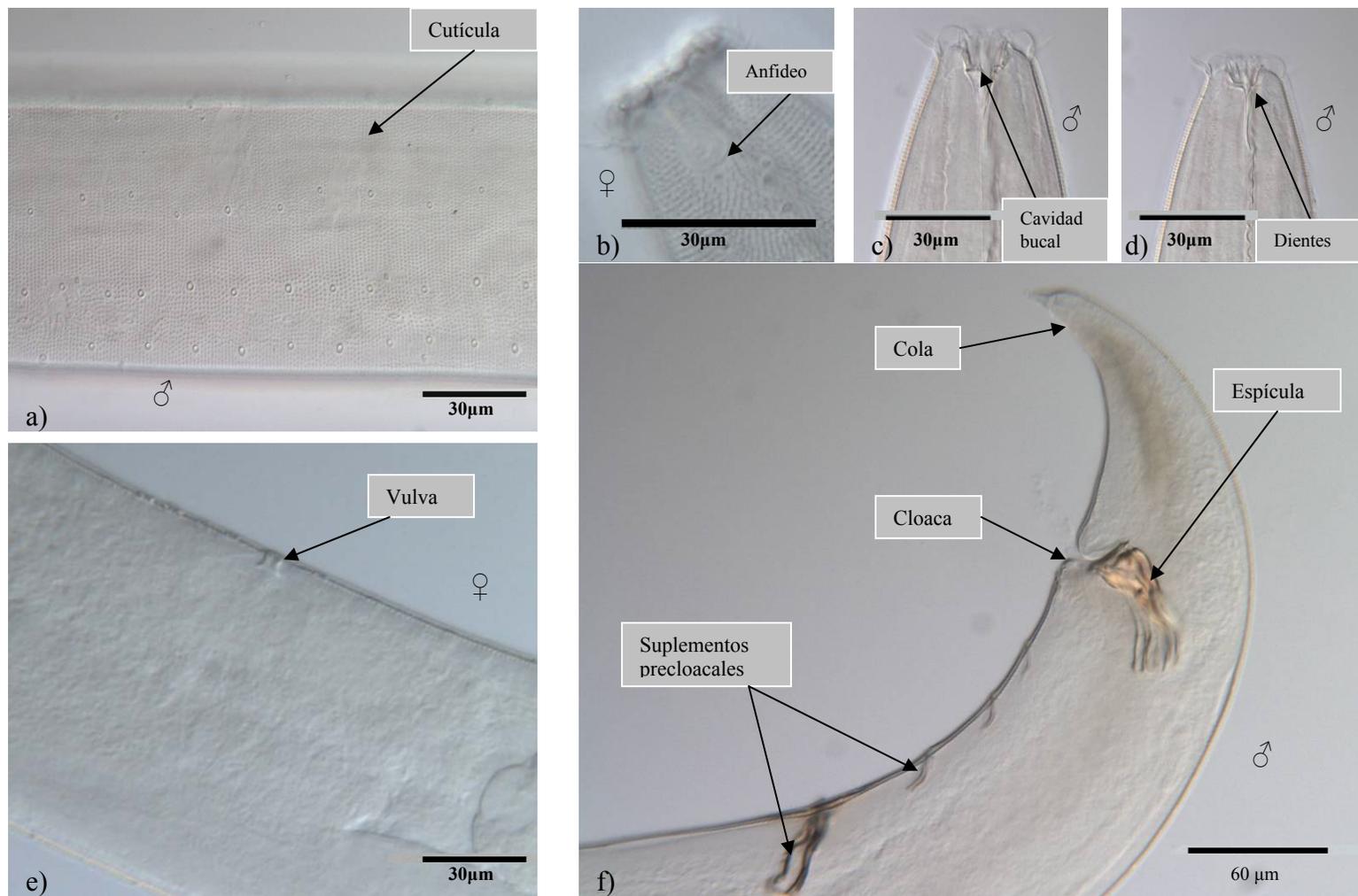


Figura 31. *Acantonchus* sp (“Estación “Ensenada de La Paz”). Individuos macho y hembra. **a)** Parte dorsal mostrando el patrón cuticular; **b, c y d)** Región cefálica; **e)** Región vulvar; **f)** Región cloacal de un individuo macho.

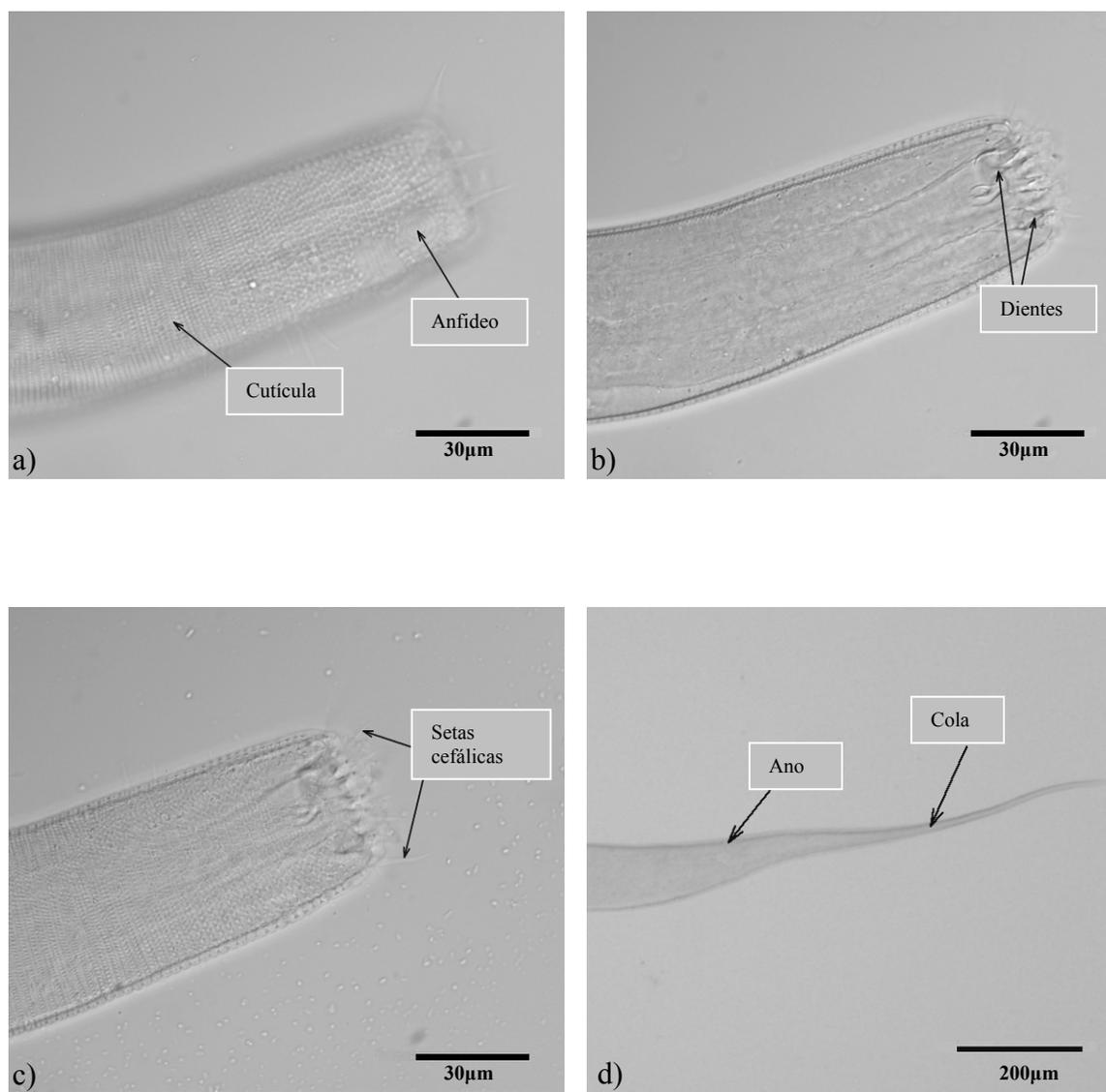


Figura 32. *Pomponema* sp (Estación “El Tornillal”). Individuo juvenil. **a)** Parte anterior; **b)** Región de la cavidad bucal; **c)** Región cefálica; **d)** Parte posterior mostrando la región cloacal de un individuo juvenil.

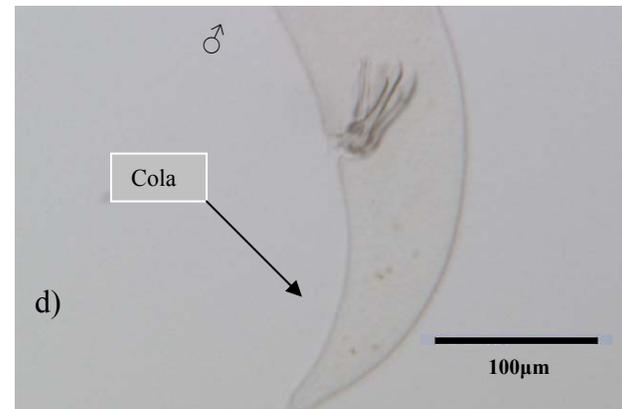
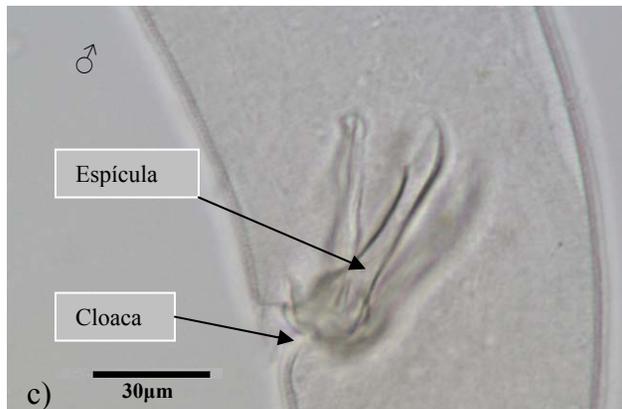
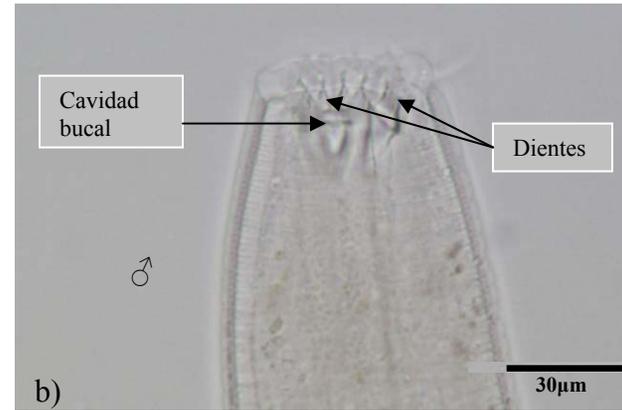
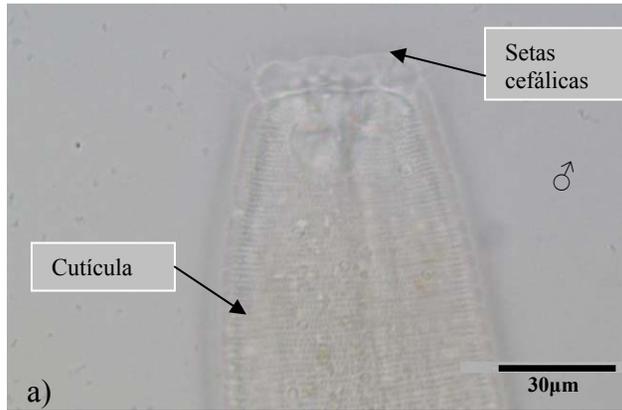


Figura 33. *Praeacanthonus* sp (Estación “Ensenada de la Paz”). Individuo macho. a, b) Región cefálica de un individuo macho; c) Región cloacal; d) Parte posterior.

VII.3.4.Familia Selachinematidae Cobb, 1915

Los selachinematidos regularmente presentan una cutícula anillada con hileras transversales de puntos, un anfideo multiespiral regularmente; en ocasiones presentan una cavidad bucal armada con mandíbulas pero no sin dientes dorsales y subcentrales como en otras familias de chromadoridos. Los machos pueden o no presentar suplementos precloacales en forma de “copa” y no se han reportado suplementos en forma tubular (Platt & Warwick, 1988).

VII.3.4.1.*Gammanema* Cobb, 1920

El género *Gammanema* presenta una cavidad bucal dividida en dos secciones, una sección en forma de “copa” con estriaciones longitudinales, apoyada por una “rugae” bien desarrollada y una sección tubular estrecha apoyada por barras cuticulares longitudinales. Además, se han observado diferentes tipos de dientes entre estas dos secciones de la cavidad bucal. La cutícula no presenta diferenciación lateral y existe ausencia de un bulbo. Platt y Warwick (1988) reportan siete especies mientras que Nemys reporta 12.

En la estación “El Burro” se identificó un individuo macho, perteneciente a este género, presenta una cutícula anillada, setas cefálicas, un anfideo que muestra 2.5 vueltas, una cola corta y con forma cónica (Fig. 34).

VII.3.4.2 *Halichoanolaimus* De Man, 1886

El género *Halichoanolaimus* comparte características muy similares con *Gammanema* y *Choniolaimus*, sin embargo este género presenta dientes entre las dos secciones de la cavidad bucal que se observan como bloques cuadrados de filas, presentan suplementos precloacales y una cola alargada y cilíndrica hacia la parte final. En Nemys han sido reportadas 31 especies y 18 en Platt y Warwick (1988).

En la localidad de La Paz B.C.S, se identificaron cuatro individuos pertenecientes al género *Halichoanolaimus* (Tabla II). Estos presentan caracteres morfológicos típicos de los Selachinematidos, una anfideo multiespiral, cavidad bucal armada con mandíbulas, una cutícula con hileras de finas puntuaciones y una cola cilíndrica en la parte final (Fig. 35).

VII.3.4.3. *Richtersia* Steiner, 1916

Richtersia es un género distintivo de la familia Selachinematidae, exhibe un cuerpo corto y fusiforme, una cutícula con numerosas filas longitudinales de pequeñas espinas, no presenta puntuaciones, presenta 12 setas cefálicas, seis cefálicas y seis subcefálicas; tiene una cavidad bucal cuticularizada y cilíndrica, desprovista de armamento. Los machos no presentan suplementos precloacales pero pueden presentar espinas cuticularizadas hacia la región precloacal, la forma del anfideo varía en hembras y machos (Platt & Warwick, 1988). Representantes de este género pueden ser principalmente encontrados en sedimentos con tamaño mediano (100 a 200 μm) aunque también han sido encontrados en sedimentos fangosos (Pastor de Ward & Lo Russo, 2007). Existen 23 especies de *Richtersia* reportadas en la base de datos de Nemys.

En la estación “El Burro” se identificó un individuo perteneciente al género *Richtersia* (Tabla II) el cual muestra un anfideo en forma espiral, pequeños dientes a lo largo del cuerpo, y una cola cónica que no presenta estriaciones en la parte final (Fig. 36).

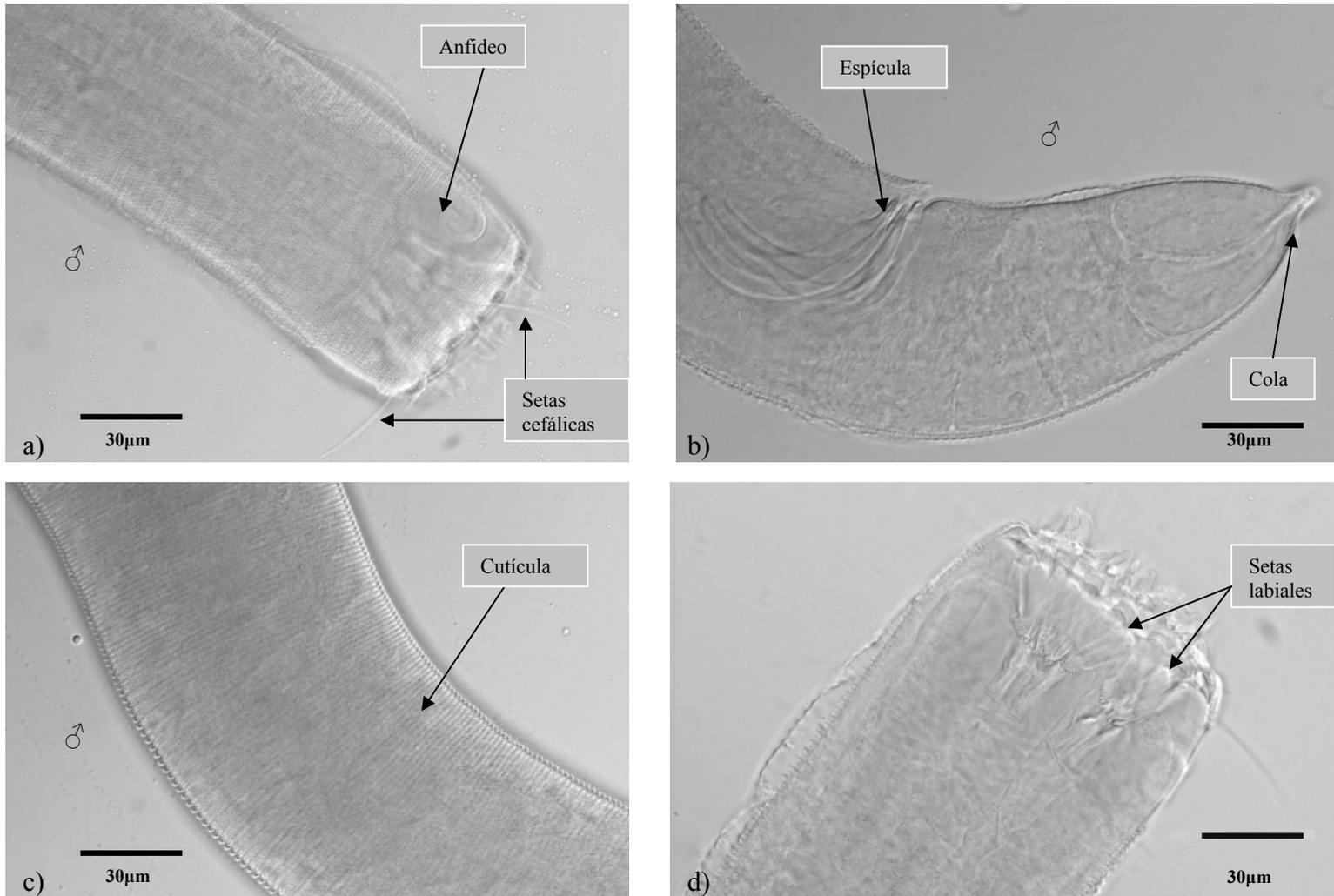


Figura 34. *Gammanema* sp (Estación “El Burro”) Individuo macho. **a)** Cabeza de un individuo macho; **b)** Región cloacal; **c)** Parte dorsal mostrando el patrón cuticular; **d)** Región cefálica mostrando la cavidad bucal.

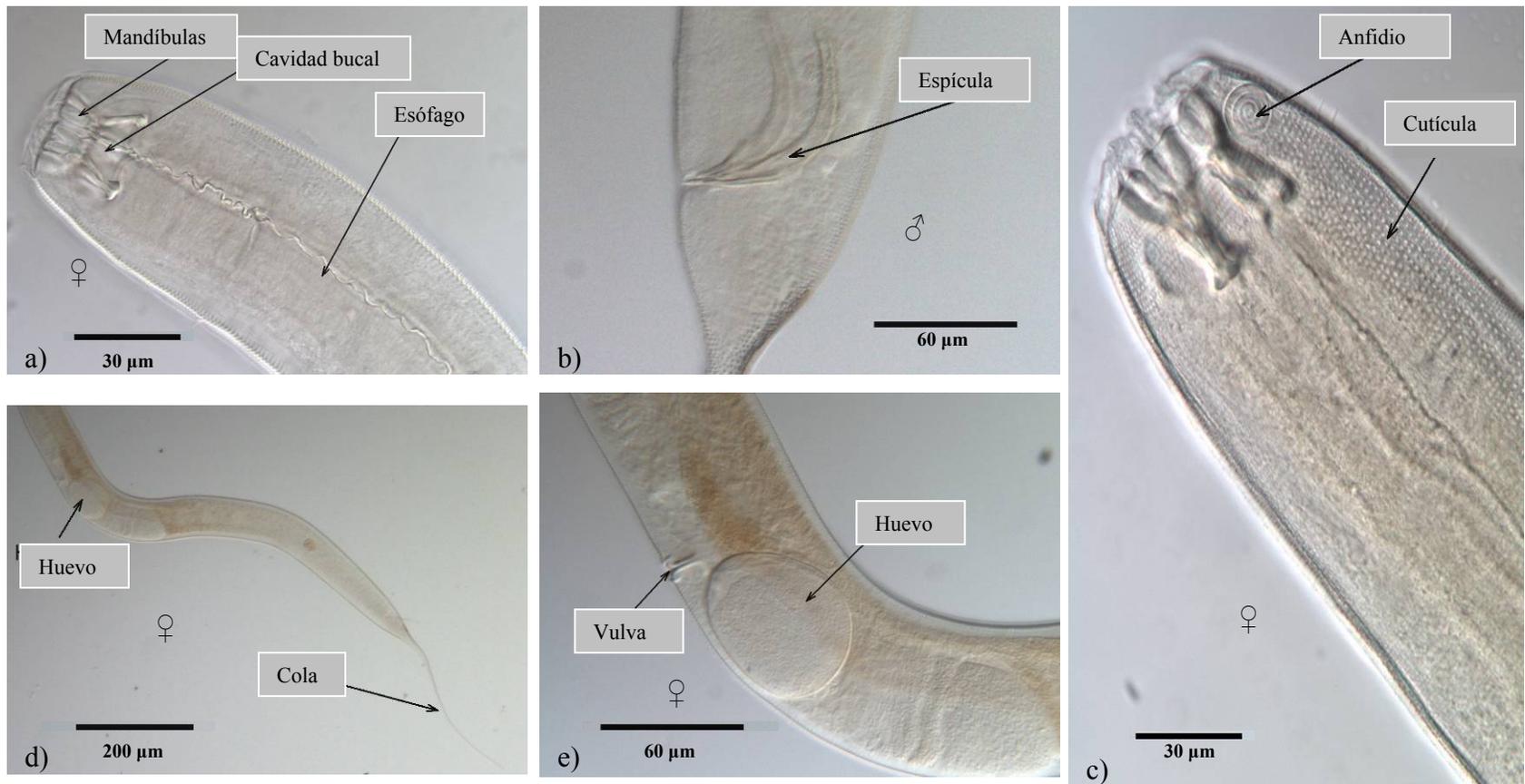


Figura 35. *Halichoanolaimus* sp (Estación “Ensenada de La Paz”) a,c,d,e, Individuo hembra; b, Individuo macho. **a)** Región cefálica de una hembra **b)** Parte cloacal de un macho; **c)** Región cefálica de un macho; **d)** Parte posterior de un individuo hembra; **e)** Región vulvar.

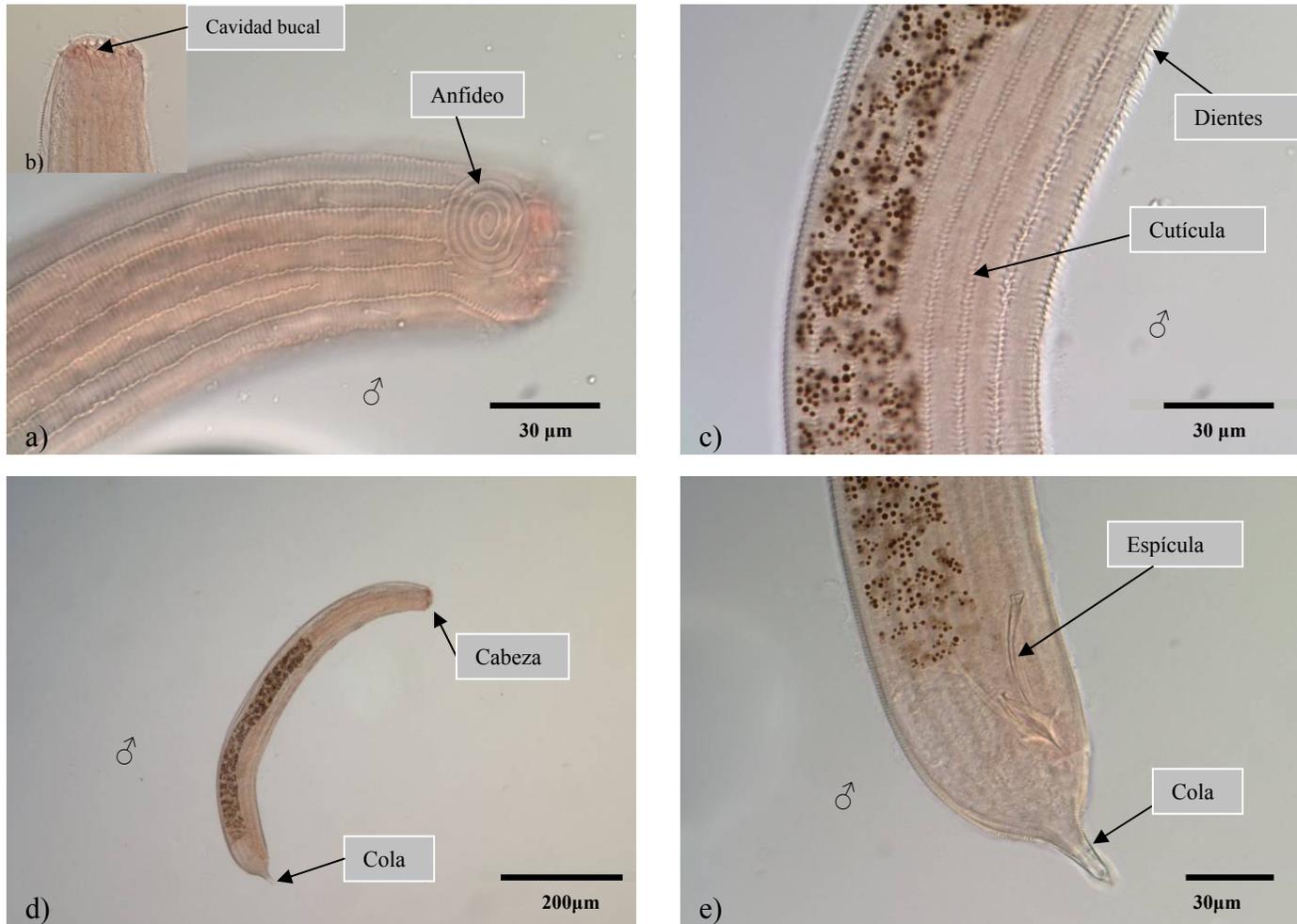


Figura 36. *Richtersia* sp (Estación “El Burro”) Individuo macho. a, b) Región anterior; c) Región media del cuerpo, vista ventral mostrando el patrón cuticular; d) Cuerpo total; e) Región cloacal de un individuo macho.

VII.3.5 Familia Desmodoridae Filipjev, 1922

Los individuos de la familia Desmodoridae presentan una cutícula con estriaciones transversales, a excepción de la región cefálica, a diferencia de los Chromadóridos, Comesomátidos, Cyatholáimidos y Selachinemátidos, estos individuos no presentan puntuaciones. Presentan setas cefálicas y un anfideo en forma espiral, regularmente con una o dos vueltas. El esófago presenta un bulbo posterior y una cola en forma cónica (Platt & Warwick, 1988).

VII.3.5.1 *Catanema* Cobb, 1920

Catanema presenta una cutícula finamente estriada, a excepción de la cabeza; presenta cuatro setas subcefálicas, una cavidad bucal pequeña que presenta un bulbo muscular y una cola en forma cónica. Se ha observado que la cutícula de estos individuos es cubierta por cianobacterias mientras están vivos. En Nemys se reportan cuatro especies del género *Catanema* mientras que Platt y Warwick (1988) reportan nueve especies.

En la localidad del Alto Golfo de California, se identificó a un individuo perteneciente al género *Catanema* (Tabla II), con una cutícula finamente anillada, una cavidad bucal pequeña, setas cefálicas, un anfideo espiral y una cola en forma cónica desprovista de estriaciones (Fig. 37).

VII.3.5.2 *Desmodora* (Filipjev, 1922)

Los individuos pertenecientes al género *Desmodora* presentan una cutícula estriada a lo largo del cuerpo, con excepción de la cabeza, un anfideo en la cápsula cefálica; los machos presentan suplementos precloacales en forma tubular.

En la localidad del Alto Golfo de California se identificaron dos morfoespecies, *Desmodora* sp1 y *Desmodora tenuispiculum*, la primera con un solo individuo macho y la

segunda con cinco individuos (cuatro individuos macho y una hembra) (Tabla III). *Desmodora* sp1, presenta un anfideo en forma de “orquilla”, una cutícula finamente estriada, una cavidad bucal con un diente (Fig. 38). *Desmodora tenuispiculum* presenta características similares a *D.* sp1 sin embargo *D. tenuispiculum* presenta un anfideo espiral, una espícula delgada y alargada, característica de esta morfoespecie, un gubernaculum “libre” en la parte final de la espícula, no presenta suplementos precloacales (Fig. 39).

VII.3.5.3. *Metachromadora* Filipjev, 1918

Metachromadora presenta una cutícula finamente estriada, un anfideo rodeado por estriaciones cuticularizadas, una cavidad bucal con un diente dorsal grande, un bulbo esofágico posterior, bien desarrollado con delgadas líneas cuticularizadas que lo dividen en dos o tres secciones. Los machos presentan suplementos precloacales de diferentes formas. En la base de datos de Nemys han sido repotadas 36 especies hasta ahora.

Se identificaron dos morfoespecies, *Metachromadora* sp1 y *M.* sp2, en ambas localidades (Alto Golfo de California y La Paz B.C.S., respectivamente). Ambas morfoespecies presentan un bulbo bien desarrollado, una cavidad bucal con un diente grande, un anfideo en forma de “orquilla”, una cutícula finamente estriada (Fig. 40); *M.* sp2 a diferencia de *M.* sp1, presenta suplementos precloacales (Fig. 41).

VII.3.5.4. *Spirinia* Gerlach, 1963

El género *Spirinia* presenta una cabeza desprovista de capsula cefálica, una cutícula finamente estriada, un anfideo rodeado por estriaciones cuticulares, se distingue del resto de los Desmodoridos por carecer de diente en la cavidad bucal y tampoco presenta suplementos precloacales. Se reportan 21 especies en la base de datos de Nemys y 13 en Platt y Warwick (1988).

Se identificó un individuo del género *Spirinia* en la localidad del Alto Golfo de California, presenta una cavidad bucal pequeña, un anfideo espiral, una cutícula finamente estriada y una cola cónica (Fig. 42)

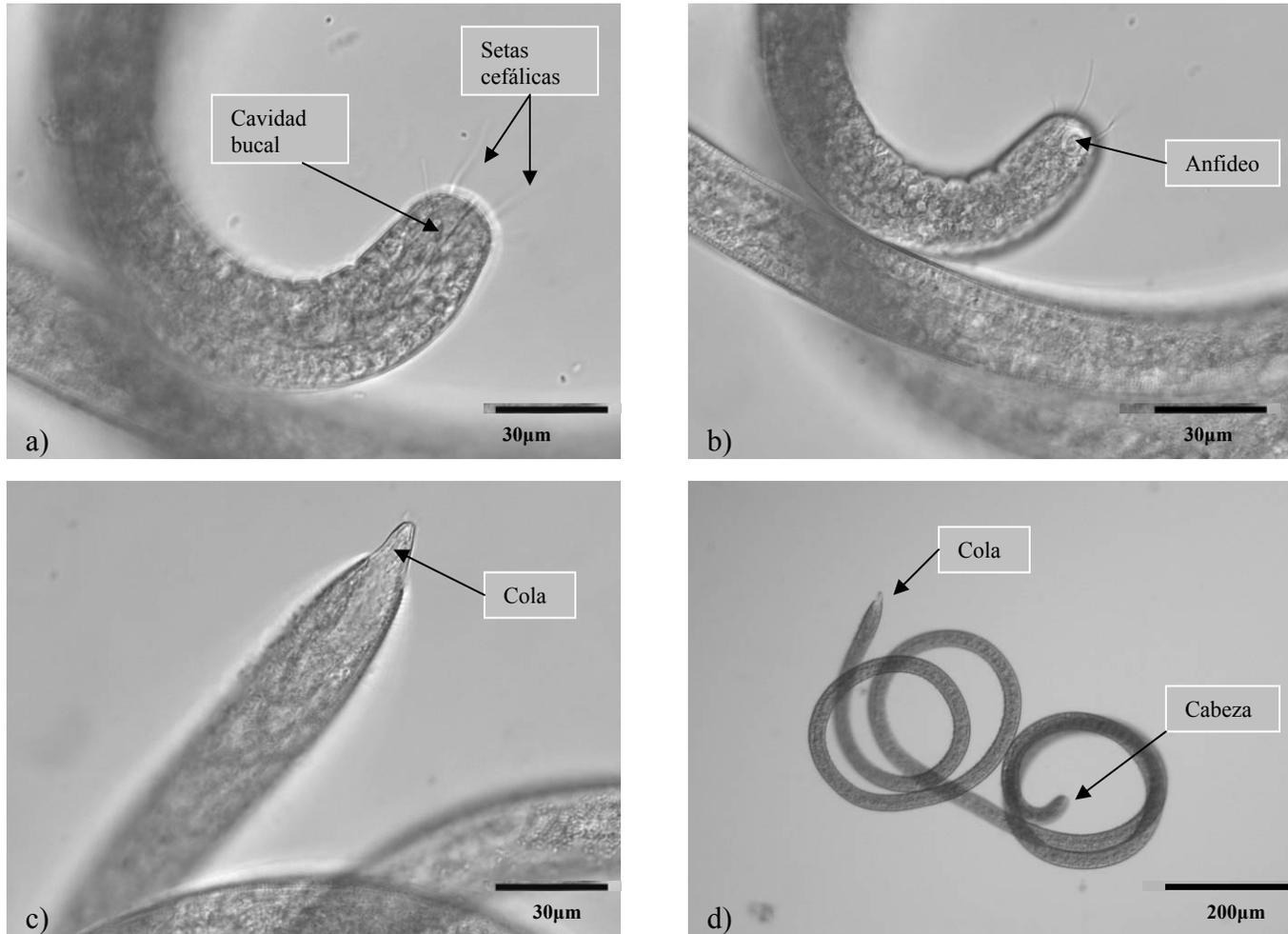


Figura 37. *Catanema* sp (Estación “Santa Clara”). Individuo juvenil. **a)** Parte anterior; **b)** Región cefálica; **c)** Parte posterior de un individuo juvenil; **d)** Cuerpo total.

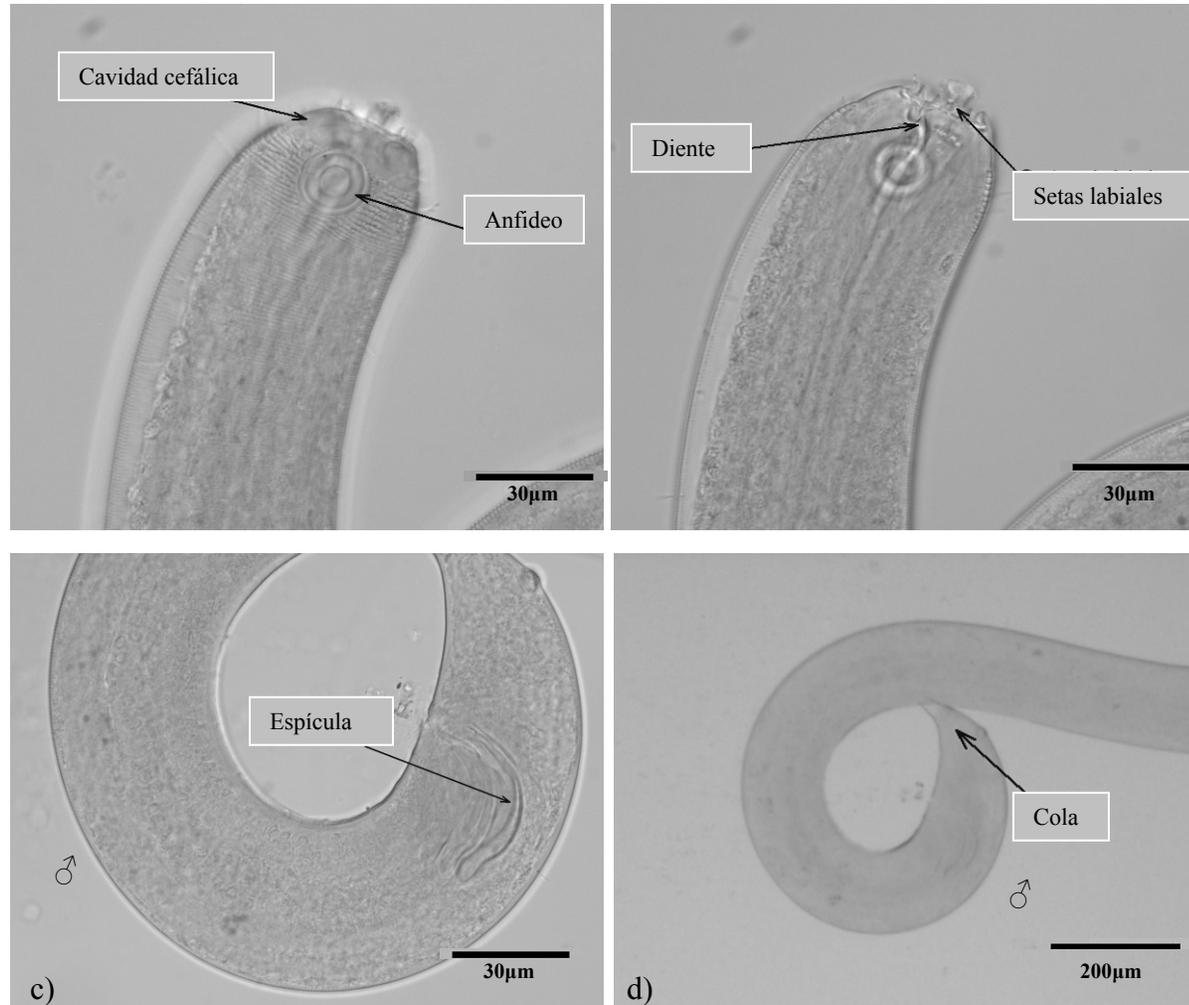


Figura 38. *Desmodora* sp1 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. a) Parte anterior de un individuo macho; b) Parte anterior mostrando la cavidad bucal; c) Región cloacal de un macho mostrando la espícula; d) Parte posterior mostrando la cola.

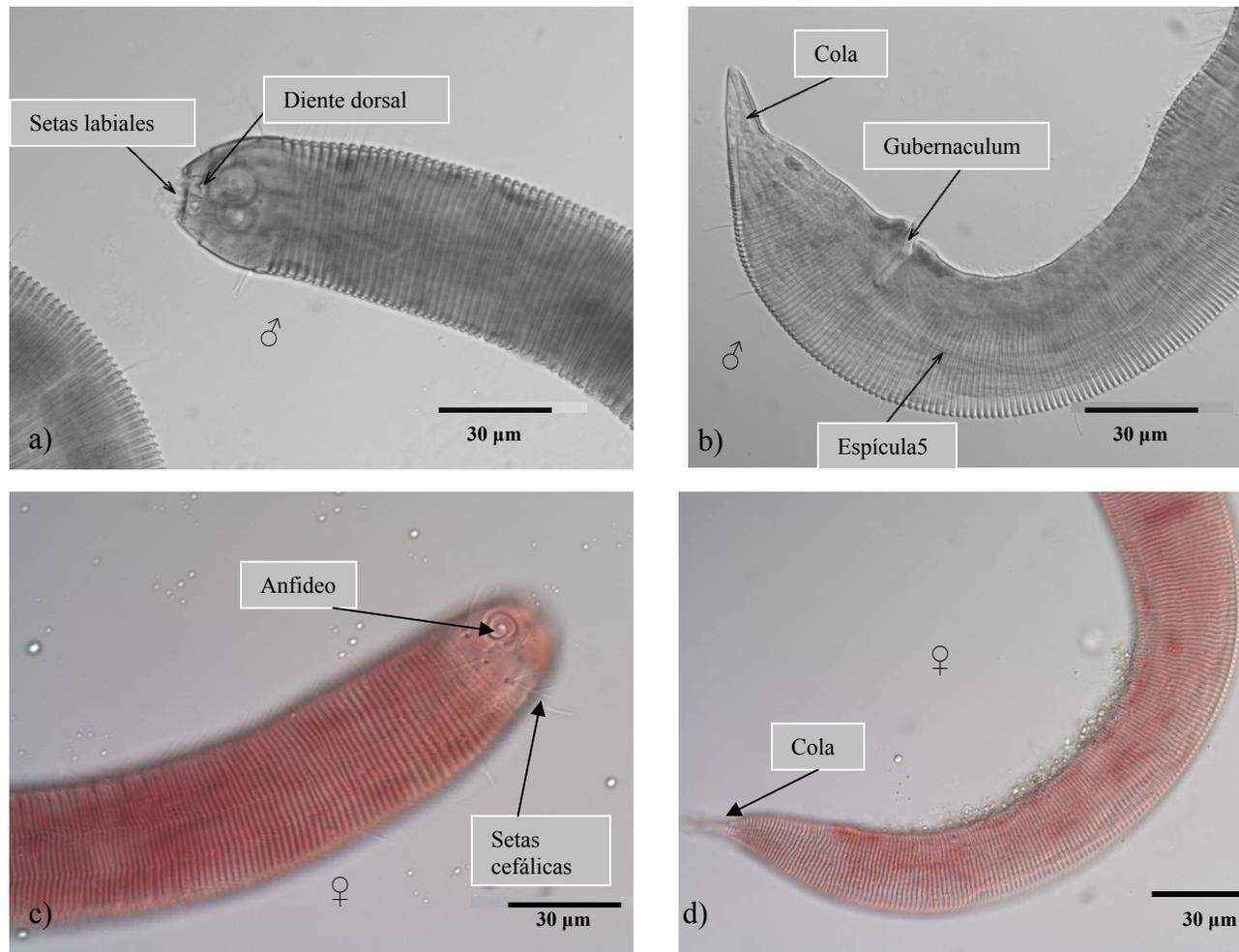


Figura 39. *Desmodora (Desmodorella) tenuispiculum* (Estación “El Burro”) a y b Individuo macho; c y d Individuo hembra. **a, b)** Parte anterior de y Región cloacal de un individuo macho respectivamente; **c, d)** Parte anterior y parte posterior de una hembra.

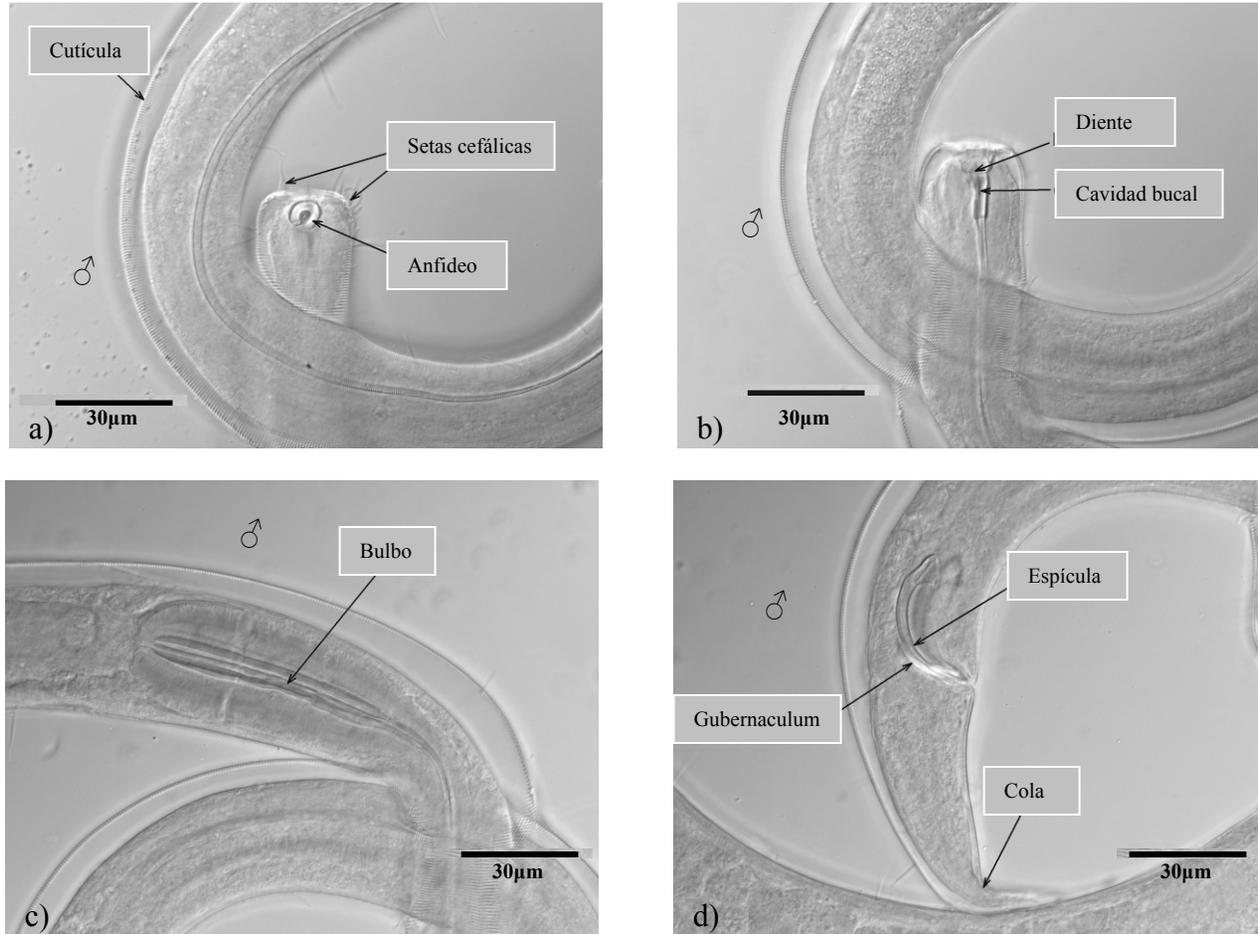


Figura 40. *Metachromadora* sp1 (Estación “El Burro”). Individuo macho. a) Parte anterior del cuerpo; **b)** Región cefálica; **c)** Esófago mostrando el bulbo; **d)** Parte posterior de un macho, cola en forma de punta.

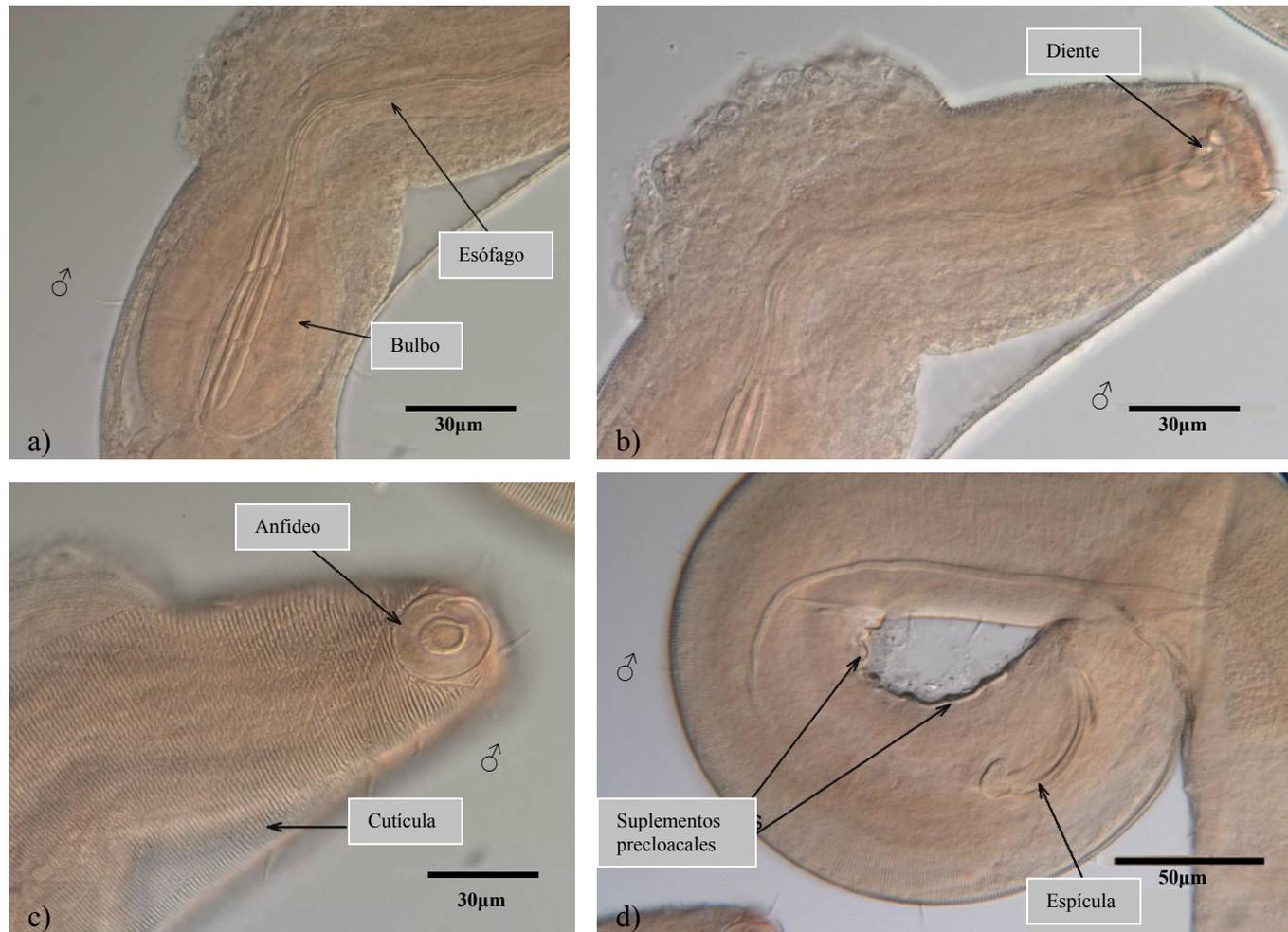


Figura 41. *Metachromadora* sp2 (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. a, b) Parte anterior del cuerpo; c) Región cefálica; d) Región cloacal de un individuo macho.

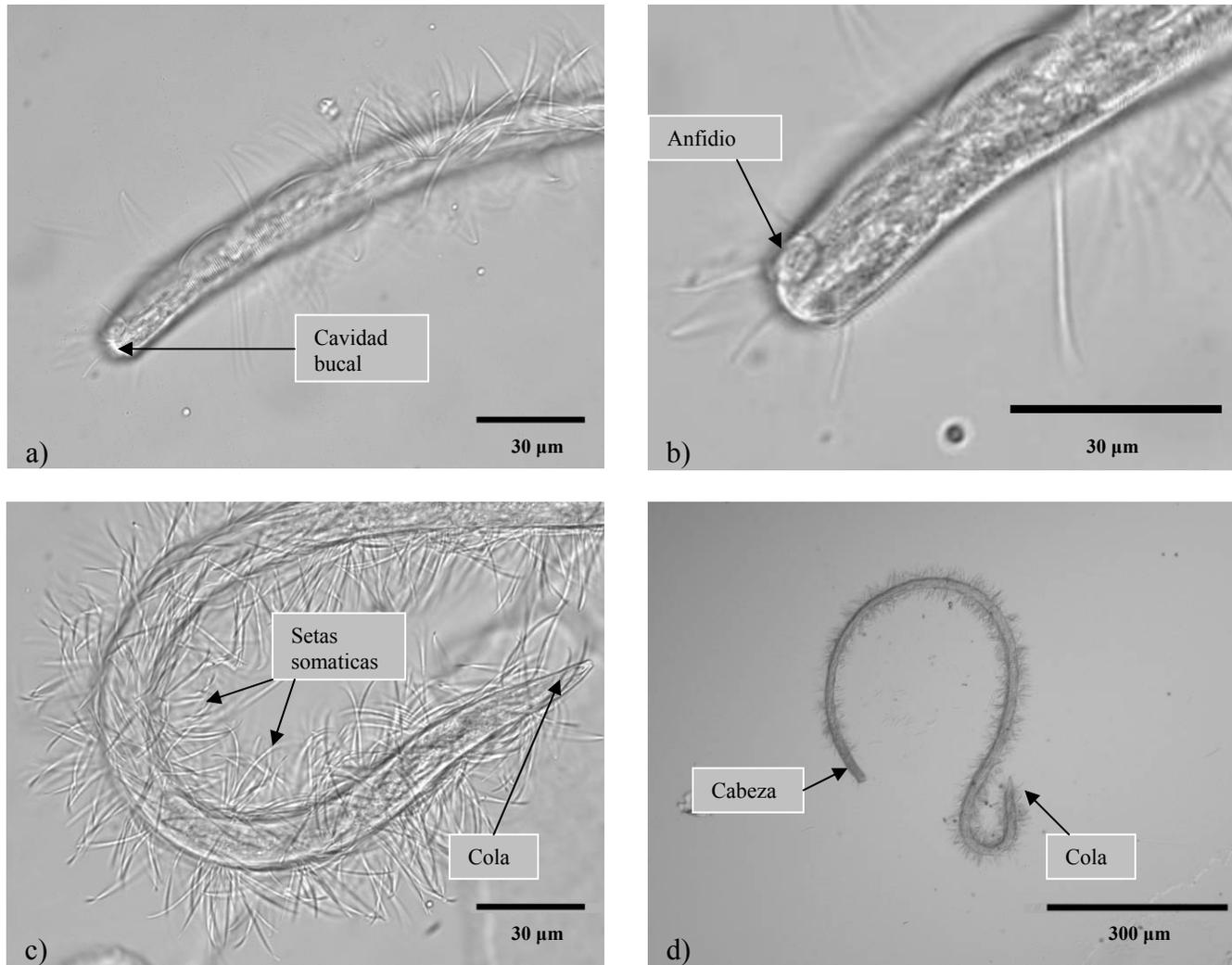


Figura 42. *Spirinia* sp (Estación “Santa Clara”). Individuo juvenil. **a)** Parte anterior; **b)** Región cefálica; **c)** Región anterior, **d)** Cuerpo total de un individuo juvenil.

VII.3.6. Familia Microlaimidae Micoletzky, 1922

Los Microlaimidos presentan una cutícula con estriaciones transversales en todo el cuerpo, a excepción de la región cefálica, y no presentan diferenciación lateral. Presentan un anfideo circular que usualmente presenta un “corte” posterior y rodeado por estriaciones circulares. La cavidad bucal presenta un diente grande y dos pequeños dientes subcentrales, el esófago presenta un bulbo posterior (Platt & Warwick, 1988).

VII.3.6.1. *Microlaimus* De Man, 1880

El género *Microlaimus* presenta una cutícula anulada finamente, un anfideo circular, una cavidad bucal provista de un diente grande y dos pequeños subventrales, setas cefálicas, al igual que *Bolbolaimus*, este género presenta un bulbo peribucal y una cavidad bucal fuertemente cuticularizada, una cola en forma cónica. Los machos pueden o no presentar suplementos precloacales. En la base de datos de Nemys han sido registradas 93 especies.

Se identificaron dos individuos del género *Microlaimus* en la localidad de La Paz B. C. S. (Tabla II), ambos individuos presentan un anfidio circular, una cavidad bucal provista de dientes, una cola en forma cónica y una cutícula finamente estriada (Fig. 43).

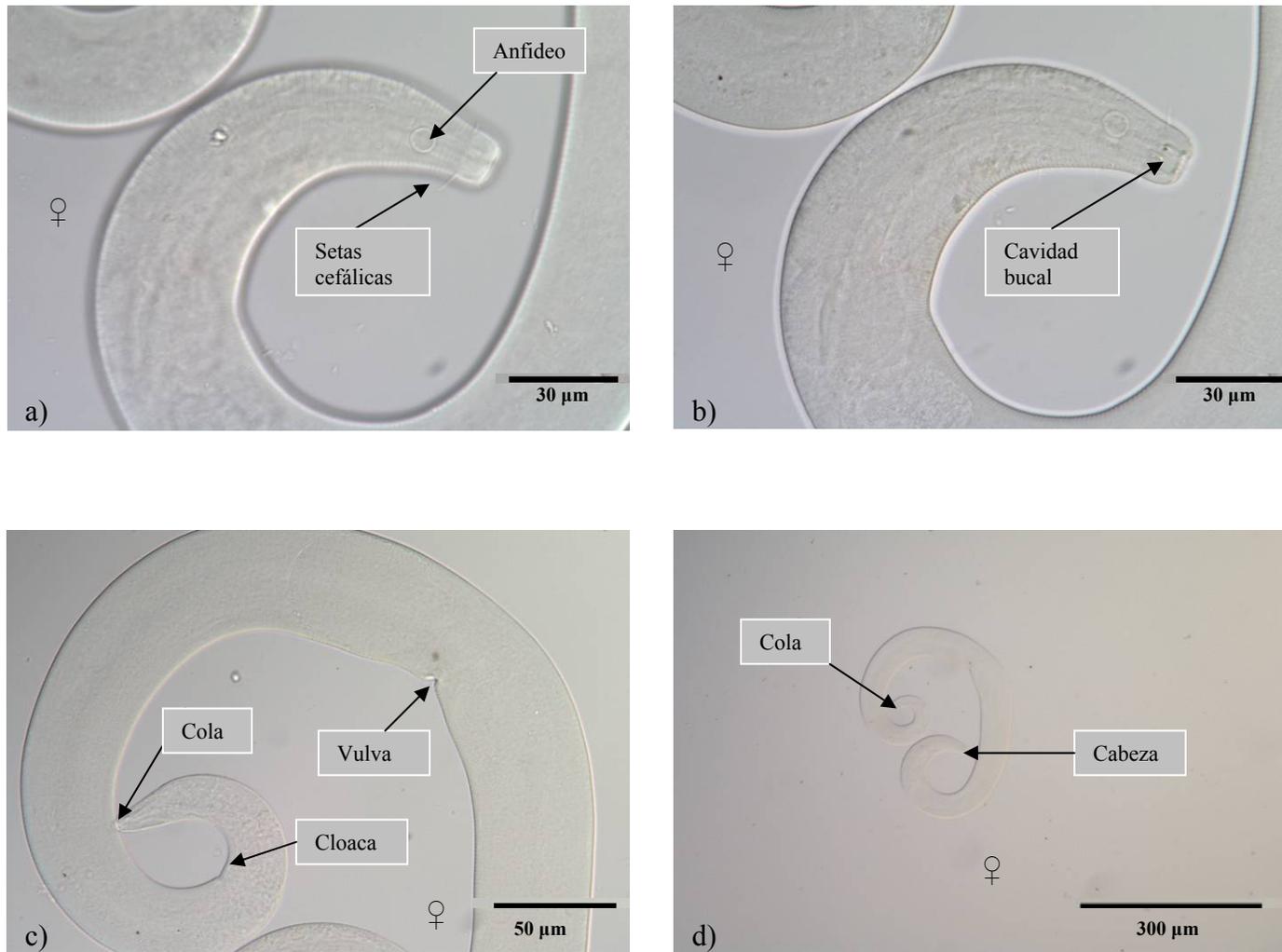


Figura 43. *Microlaimus* sp (Estación "El Esterito"). Individuo hembra. **a,b)** Parte anterior del cuerpo de un individuo hembra; **c)** Región cloacal y vulvar, **d)** Cuerpo total.

VII.3.7. Familia Ceramonematidae Cobb, 1933

Esta familia es relativamente pequeña pero ampliamente distribuida, presenta 57 especies válidas, sin embargo, las relaciones filogenéticas entre especies y géneros de la familia Ceramonematidae son poco claras y son sujeto de controversia (Holovachov, 2008). Las características principales de esta familia son: una cutícula finamente anillada con cadenas longitudinales en forma de “placas ensambladas”, una cápsula cefálica sin estribaciones, donde se encuentra localizado el anfideo, que tiene forma de Ω . Presentan una cavidad bucal pequeña y una cola en forma cónica que no presenta estriaciones en la parte final (Platt & Warwick, 1988).

VII.3.7.1. *Ceramonema* Cobb, 1920

El género *Ceramonema* presenta una cutícula con ondulaciones transversales a lo largo del cuerpo, cada ondulación es dividida en ocho placas que forman ocho crestas longitudinales; presenta setas cefálicas, una cola en forma cónica y ausencia de cavidad bucal. En la localidad del Alto Golfo de California fueron identificadas tres morfoespecies *C. sp1*, *C. sp2* y *C. sp3*, (Tabla III). Las tres morfoespecies presentan características muy similares, a excepción del patrón cuticular y de los anfideos que distinguen a cada una de ellas (Fig. 44, 45 y 46).

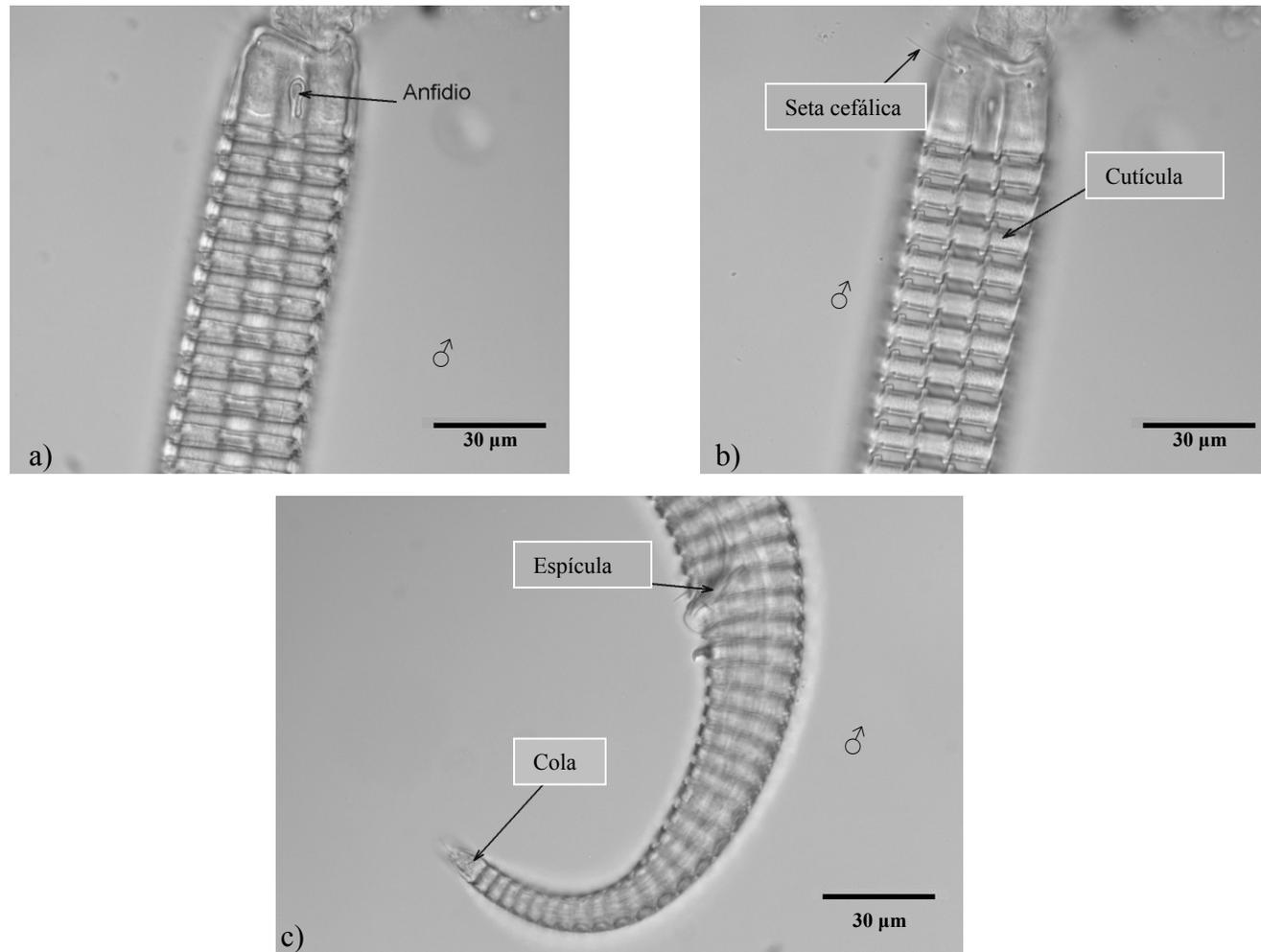


Figura 44. *Ceramonema sp1* (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. **a)** Parte superior de cuerpo; **b)** Parte superior mostrando un patrón cuticular; **c)** Parte posterior, cola de individuo en forma cónica.

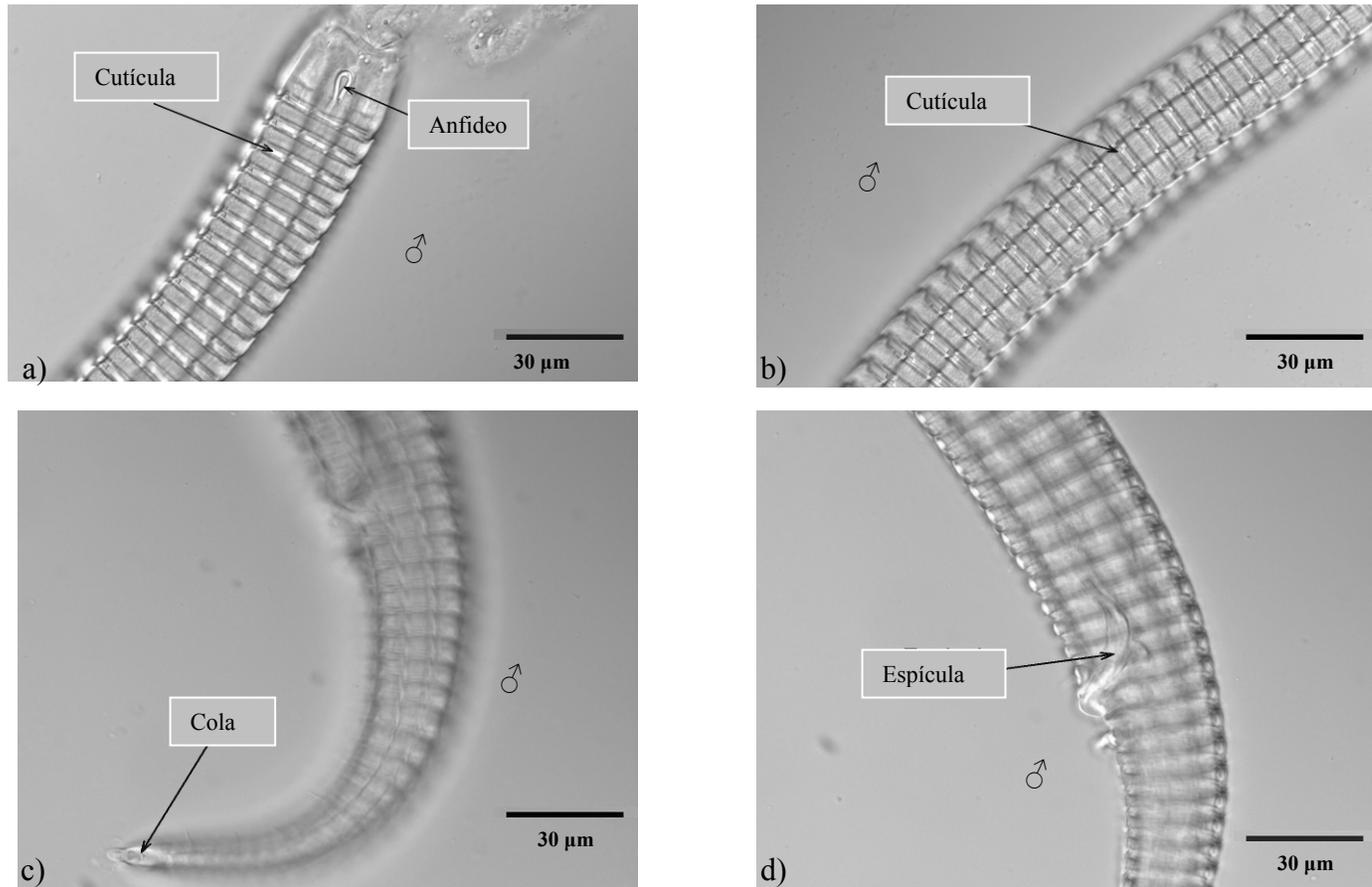


Figura 45. *Ceramonema sp2* (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. **a)** Región anterior del cuerpo; **b)** Patrón cuticular, parte dorsal del cuerpo; **c)** Parte posterior; **d)** Región cloacal de un individuo macho.

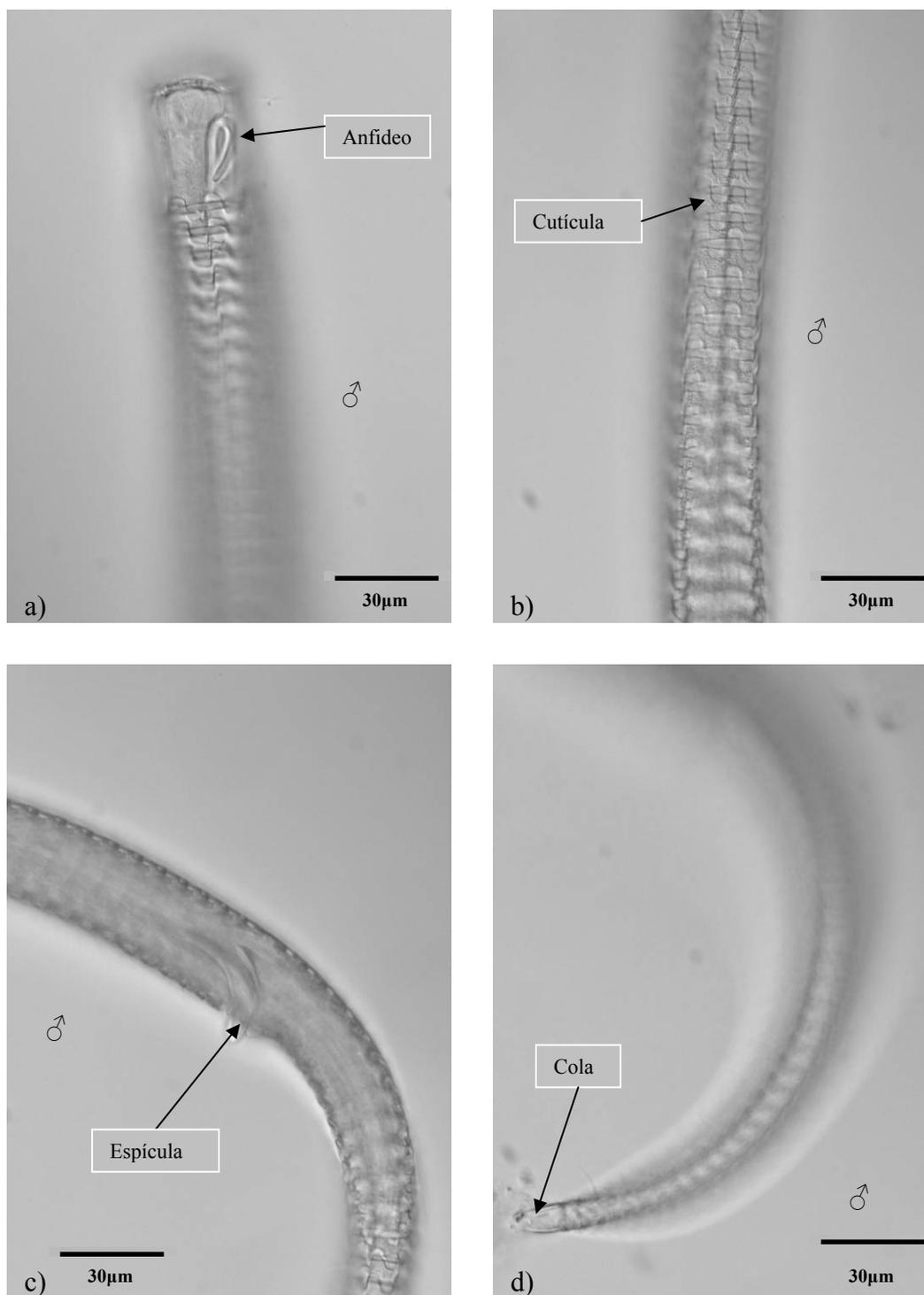


Figura 46. *Ceramonema sp3* (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. **a)** Región cefálica; **b)** Parte del cuerpo mostrando el patrón cuticular, vista lateral; **c)** Región cloacal, **d)** Región posterior, mostrando la cola.

VII.4. ORDEN MONHYSTERIDA

VII.4. 1. Familia Xyalidae Chitwood, 1951

La familia Xyalidae ha sido descrita con las siguientes características: presenta una cutícula finamente estriada, diez setas cefálicas arregladas en un solo círculo, una cavidad bucal cónica, generalmente sin presencia de dientes. Se han registrado algunas especies dulceacuícolas y terrestres (Warwick, Platt & Somerfield, 1998). Dentro de esta familia se pudieron identificar 17 individuos, de los cuales 16 pudieron ser identificados a nivel genérico.

Debido a que con el registro morfológico no se pudieron observar características claras en un individuo hembra, de los 17 individuos identificados para esta familia, su identificación solo fue hecha a nivel de familia. Las características que se pueden observar son las siguientes: presenta una cutícula estriada, un esófago desarrollado, setas cefálicas y una cola cilíndrica (Fig. 47)

VII.4. 1. 1. *Daptonema* Cobb, 1920

Daptonema presenta seis grupos de setas cefálicas, una cavidad bucal sin ornamentaciones, una cola en forma cónico-cilíndrica, con setas terminales; además presenta setas somáticas cortas a lo largo del cuerpo. Los machos presentan una espícula corta. El género *Daptonema* fue clasificado como un subgénero de *Theristus*, sin embargo, las características utilizadas para separarlos son muy pocas, por lo que en algunas clasificaciones actuales ambos géneros son considerados como sinónimos. El género *Daptonema* difiere del género *Theristus* únicamente por la forma de la cola y la presencia de dos setas terminales, esta pequeña distinción debe ser considerada sobre todo en casos ambiguos, donde la separación de ambos géneros es difícil. Warwick *et al.*, (1998) reporta 68 especies mientras que en la base de datos de Nemys se reportan 157 especies.

Se identificaron dos morfoespecies en la localidad de La Paz B.C.S *Daptonema* sp1 y *Daptonema* sp2 (Tabla III). La morfoespecie *D. sp1* es un individuo macho que presenta

un anfideo en forma circular, una cavidad bucal pequeña, setas cefálicas cortas, una cola en forma cónica, no se observaron setas terminales y una espícula corta (Fig. 48). Para el caso de la morfoespecie *D. sp2* presenta características muy similares en cuanto a la cavidad bucal, setas cefálicas, estriación de la cutícula, sin embargo, la forma de la espícula y cola son diferentes con respecto a *D. sp2* (Fig. 49)

VII.4. 1. 2. *Omicronema* Cobb, 1920

Los individuos de este género presentan una cutícula con hileras longitudinales en forma de estriaciones finas, una cavidad bucal larga y cilíndrica, un anfideo que no presenta un contorno bien definido. En Nemys se reportan siete especies para este género.

Se identificaron tres individuos juveniles de la morfoespecie *Omicronema sp1*, en la estación “El Tornillal”; los cuales presentaron una cavidad bucal larga y cilíndrica, un anfideo circular, setas cefálicas largas, una cutícula que presenta estriaciones longitudinales y una cola cónico-cilíndrica (Fig. 50)

VII.4. 1. 3. *Promonhystera* Wieser, 1956

Promonhystera es similar al género *Paramonhystera*, excepto por la presencia de una “sencilla” labial setiforme y una cola cónica o cónica cilíndrica; además presenta características como: anfideo circular, una cutícula finamente estriada, setas cefálicas, una espícula larga y delgada. Han sido descritos pocos individuos, por lo que la información para este género es escasa. En Nemys solo se reportan dos especies.

En la localidad de “El Burro” se identificaron dos individuos de la morfoespecie *Promonhystera sp1* (un juvenil y un macho), ambos individuos presentan setas cefálicas, una cutícula finamente estriada, un anfideo circular, una cola cónico- cilíndrica, además el individuo macho presenta una espícula larga y delgada (Fig. 51).

VII.4. 1. 4. *Rhynchonema* Cobb, 1920

El género *Rhynchonema* presenta una cutícula anillada, una cavidad bucal alargada, la tercera parte del esófago presenta una región atenuada, el anfidio es circular y está presente en la parte posterior a la región atenuada. Para este género se han reportado 28 especies en Nemys.

Un individuo macho perteneciente a la morfoespecie *Rhynchonema* sp fue identificado en la estación de Santa Clara (Tabla III), este individuo presentó las siguientes características: una cavidad bucal alargada, un anfidio circular posterior a la cavidad bucal, una cutícula anillada, en la región cloacal se observa la presencia de suplementos precloacales y una espícula con gubernaculum (Fig. 52)

VII.4. 1. 5. *Xyala* Cobb, 1920

Las morfoespecies del género *Xyala* presentan setas cefálicas, una cavidad bucal cónica y a diferencia de otros géneros que pertenecen a la familia, *Xyala* presenta una cutícula con “crestas” longitudinales y la presencia de una “sensilla” labial setiforme. Warwick *et al.*, 1998 solo reportan dos especies, sin embargo, Nemys reporta 13 especies.

Para la localidad del Alto Golfo de California fueron identificados cuatro morfoespecies (*X*, sp1, *X*, sp2, *X*, sp3 y *X*, sp4) para el género *Xyala* siendo este el género que presenta un mayor número de morfoespecies identificadas. Todos los géneros comparten características propias de la familia como son una cavidad bucal cónica, setas cefálicas, una cola con forma cónica, sin embargo, las diferencias aparentes que presentaron las cinco diferentes morfoespecies, fue el patrón cuticular que presentan (Figs. 53, 54, 55 y 56).

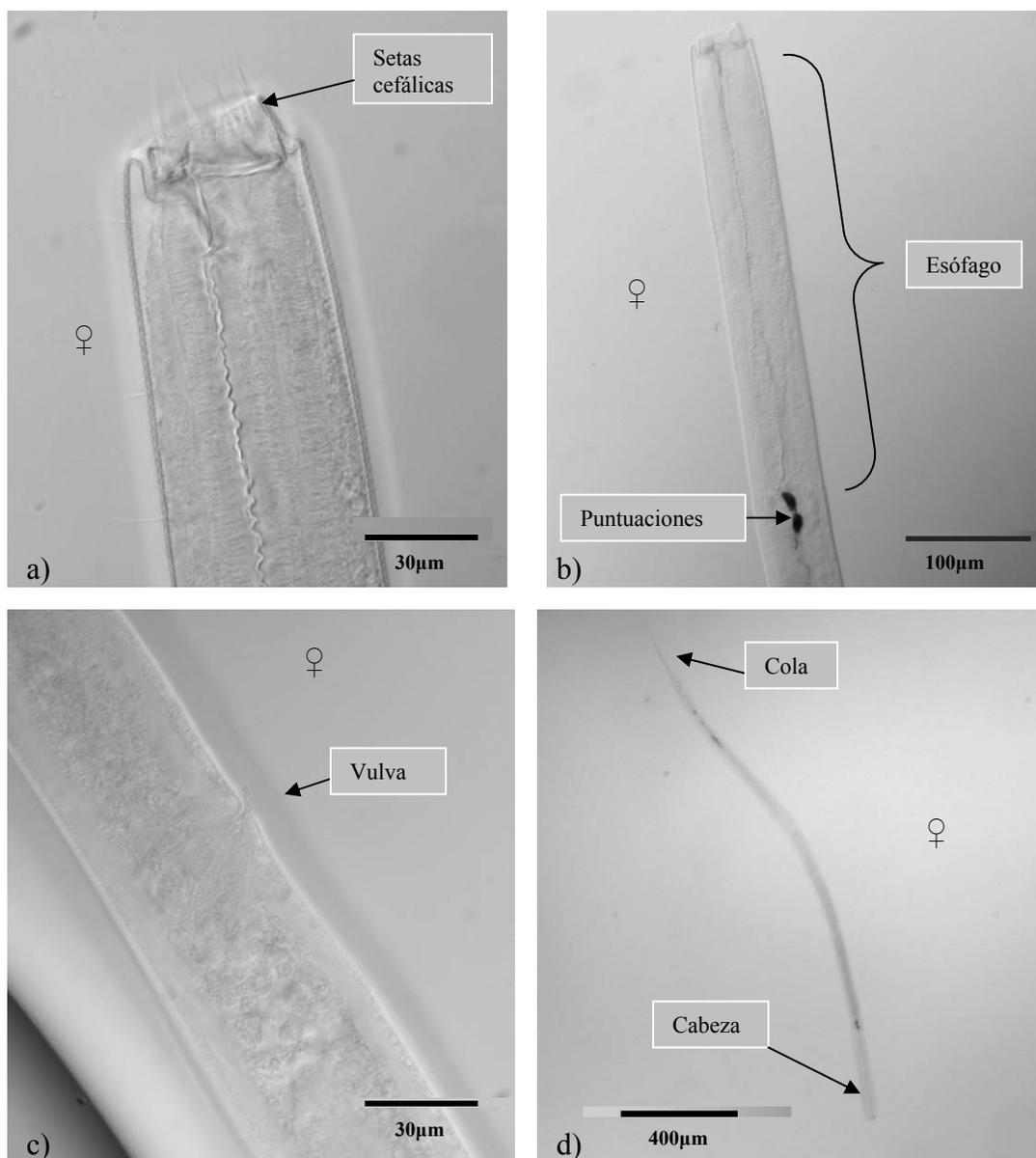


Figura 47. Xyalidae sp1. (Estación “EL Burro”). Individuo hembra. a) Región cefálica; b) Parte anterior del cuerpo; c) Región vulvar; d) Cuerpo total.

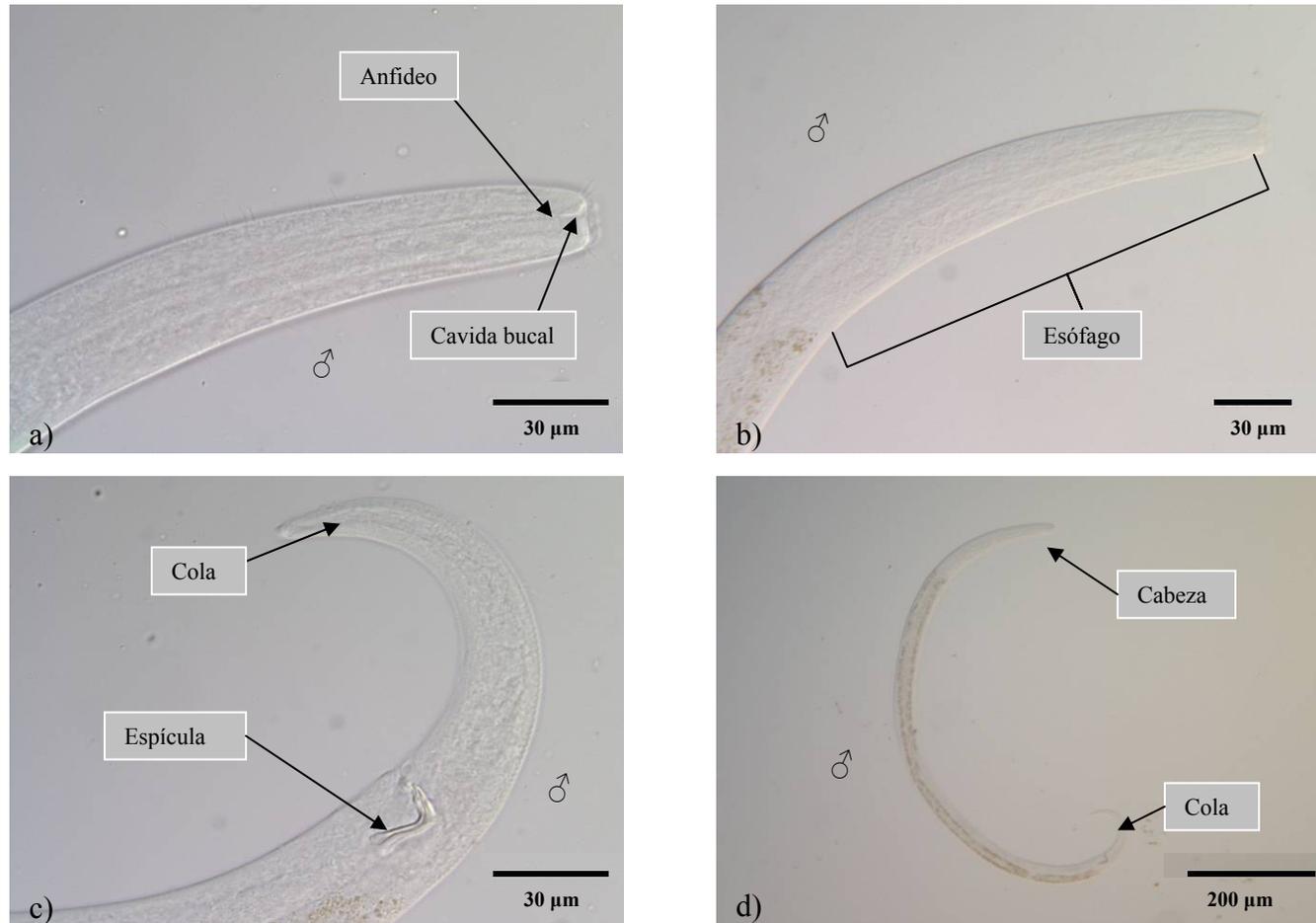


Figura 48. *Daptonema sp1* (Estación “El Esterito”). Individuo macho. **a)** Región cefálica de un individuo macho; **b)** Parte anterior; **c)** Región cloacal; **d)** Cuerpo total.

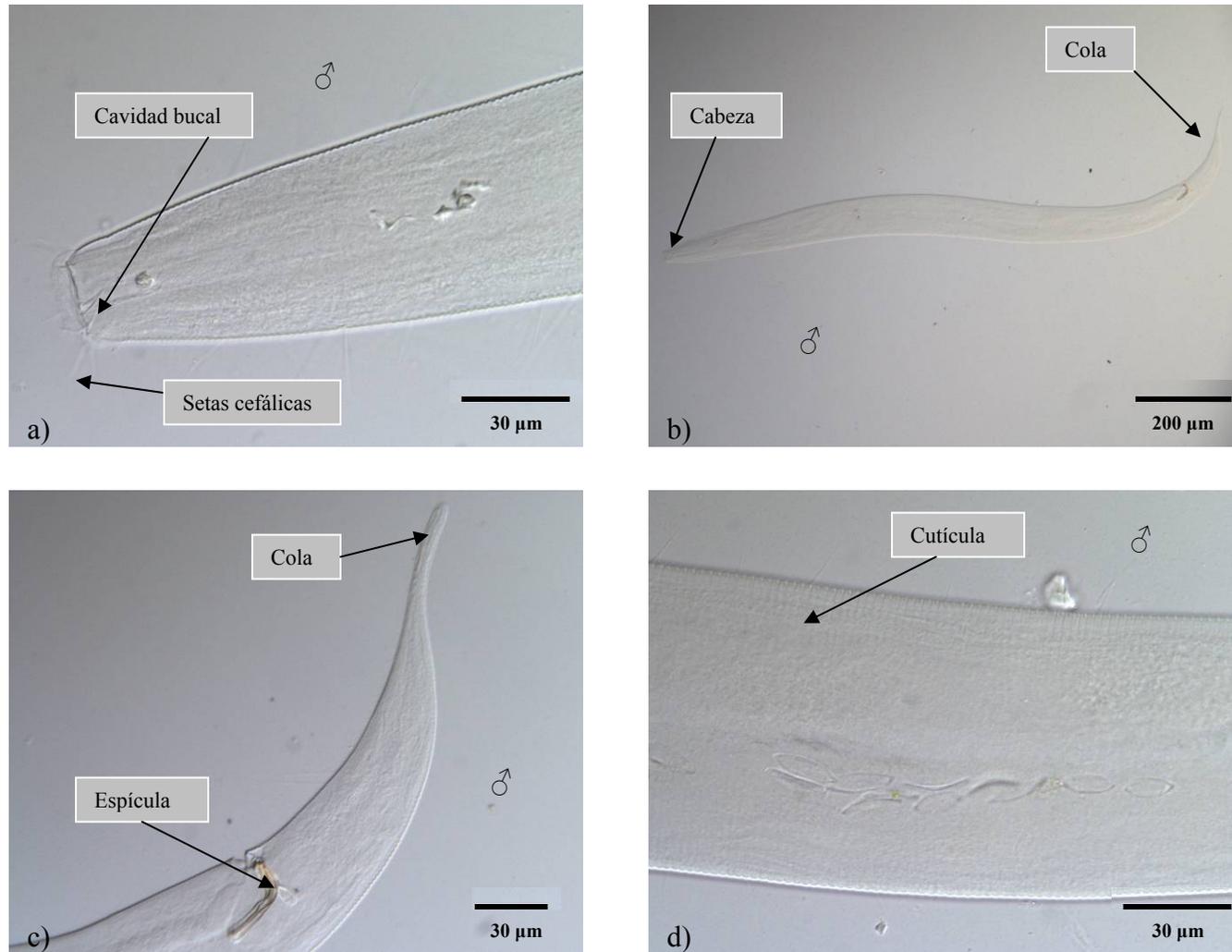


Figura 49. *Daptonema* sp2 (Estación “Ensenada de La Paz”). Individuo macho. **a)** Región cefálica; **b)** Cuerpo total; **c)** Región cloacal; **d)** Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular.

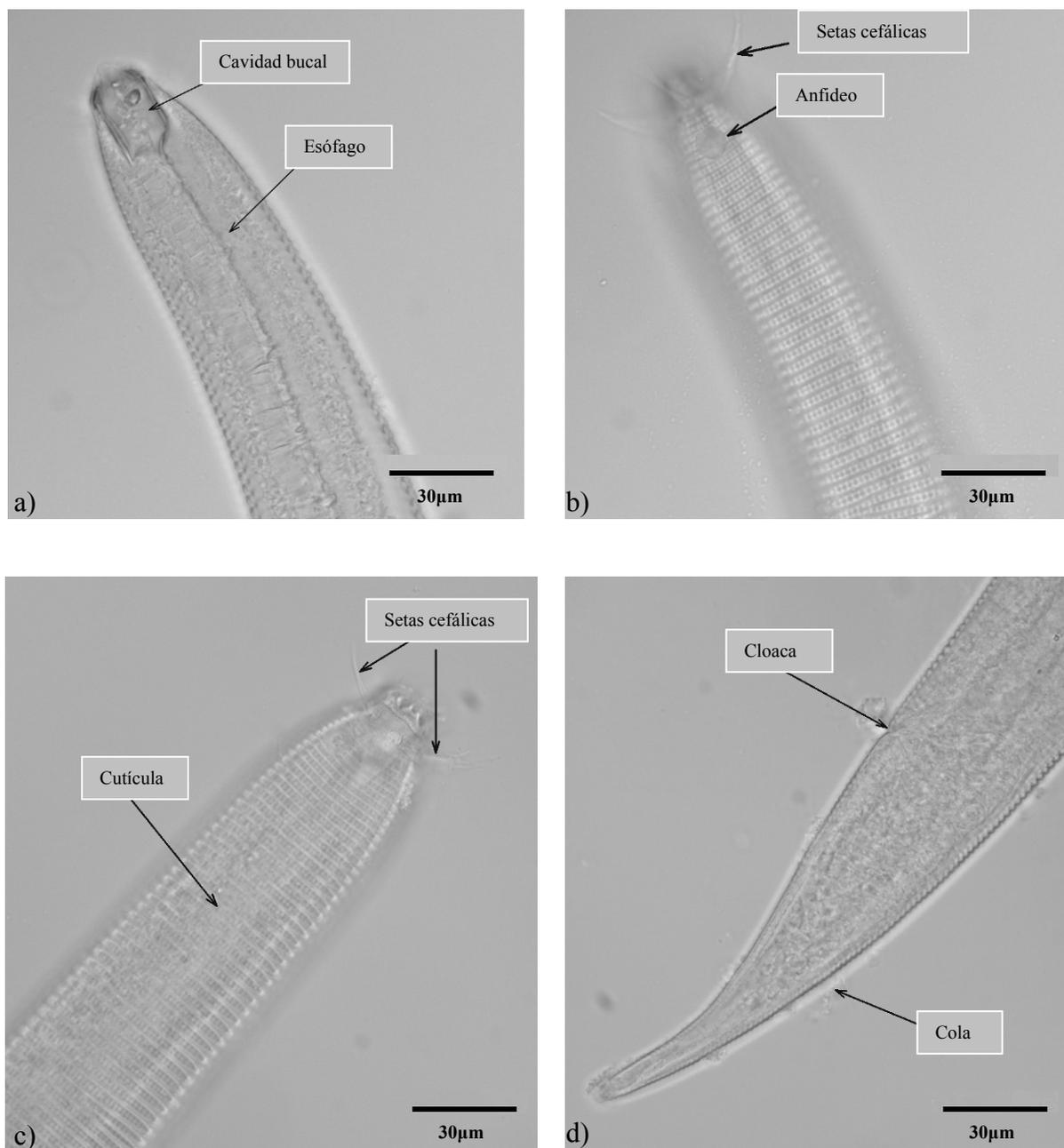


Figura 50. *Omicronema* sp (Estación “El Tornillal”) Individuo juvenil. **a).** Región cefálica; **b)** Región anterior; **c)** Región anterior mostrando la cutícula; **d)** Parte posterior mostrando la región posterior cloacal.

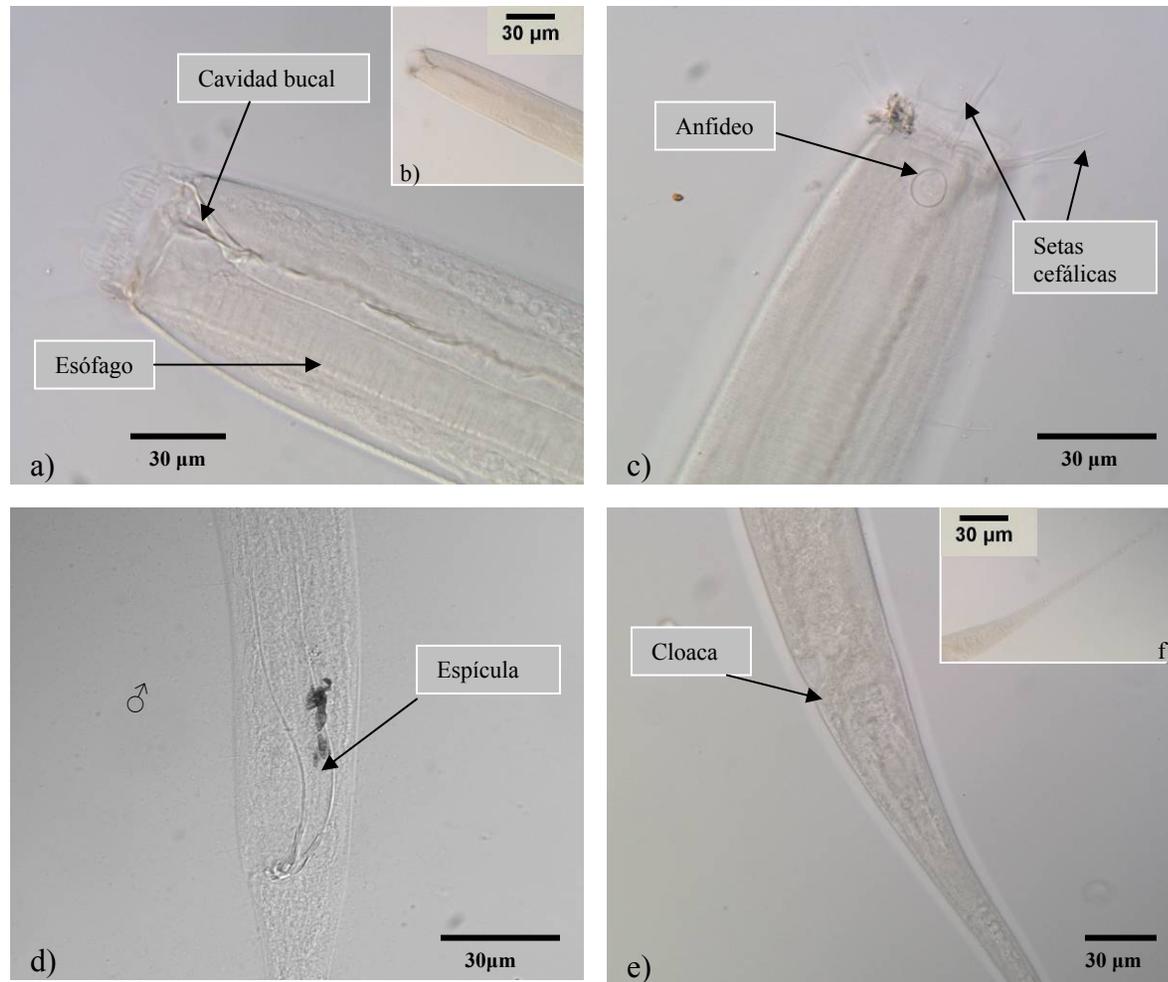


Figura 51. *Promonhystera* sp (Estación “El Burro”). Individuo juvenil. **a)** Parte anterior; **b)** Cavidad bucal; **c)** Región cefálica; **d)** Región cloacal de un individuo macho, vista ventral; **e)** Región cloacal de un individuo juvenil; **f)** Cola.

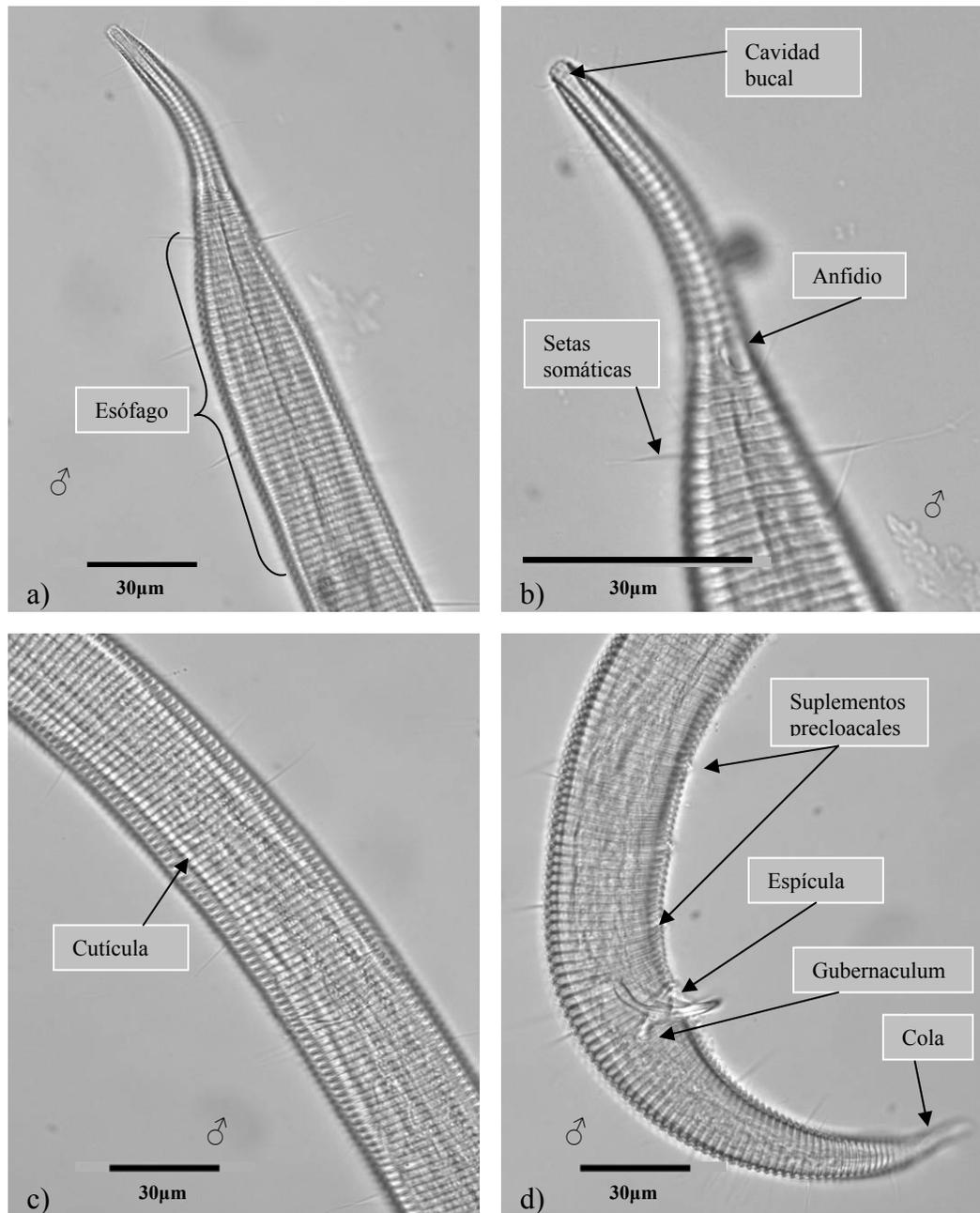


Figura 52. *Rhynchonema* sp. (Estación "Santa Clara"). Individuo macho. **a)** Parte anterior del cuerpo; **b)** Región cefálica; **c)** Parte lateral del cuerpo mostrando el patrón cuticular; **d)** Región cloacal.

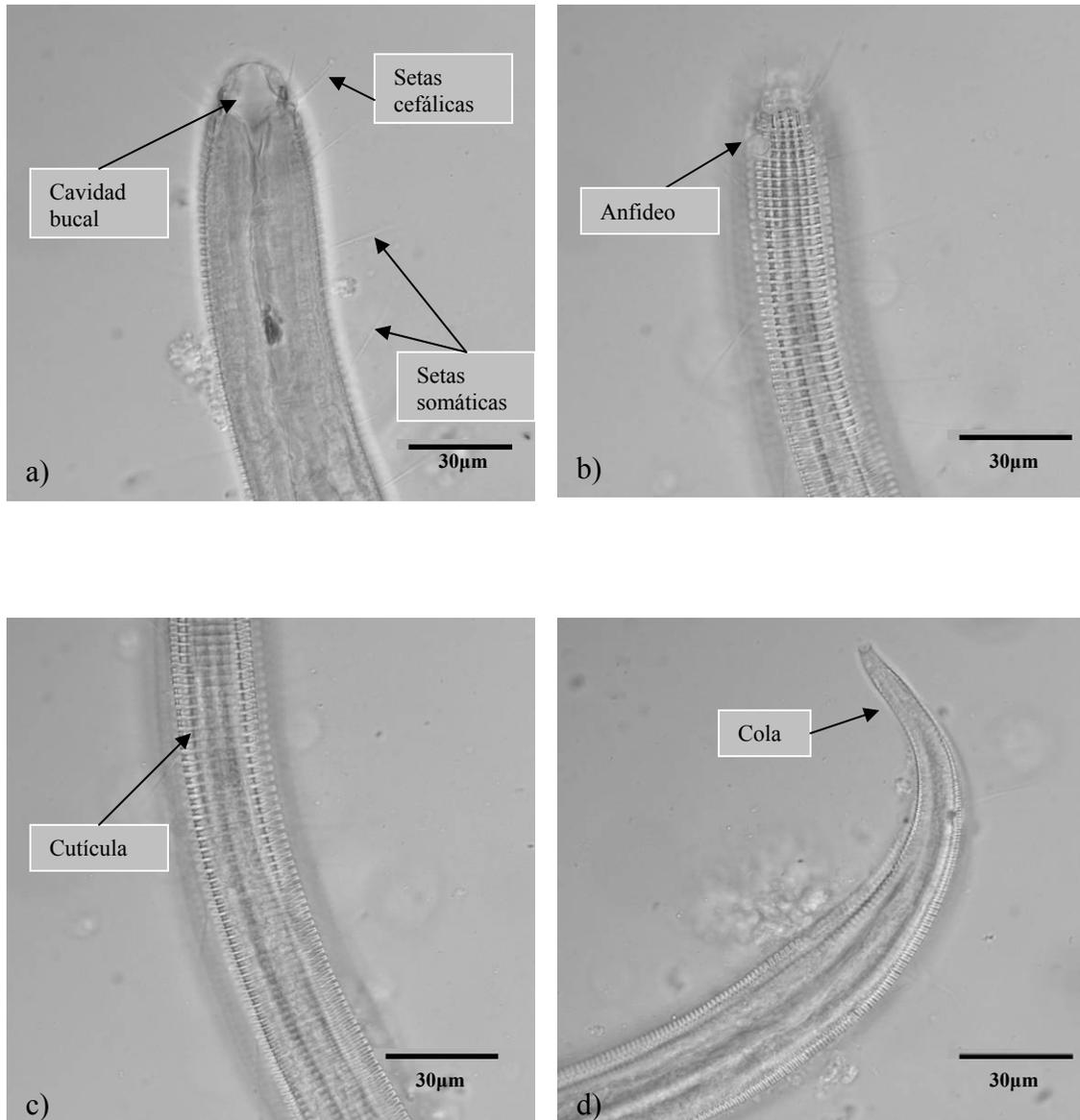


Figura 53. *Xyala* sp1 (Estación “El Burro”). Individuo juvenil. **a)** Región cefálica mostrando la cavidad bucal; **b)** Región anterior del cuerpo; **c)** Parte del cuerpo mostrando el patrón cuticular, vista dorsal; **d)** Región posterior del cuerpo.

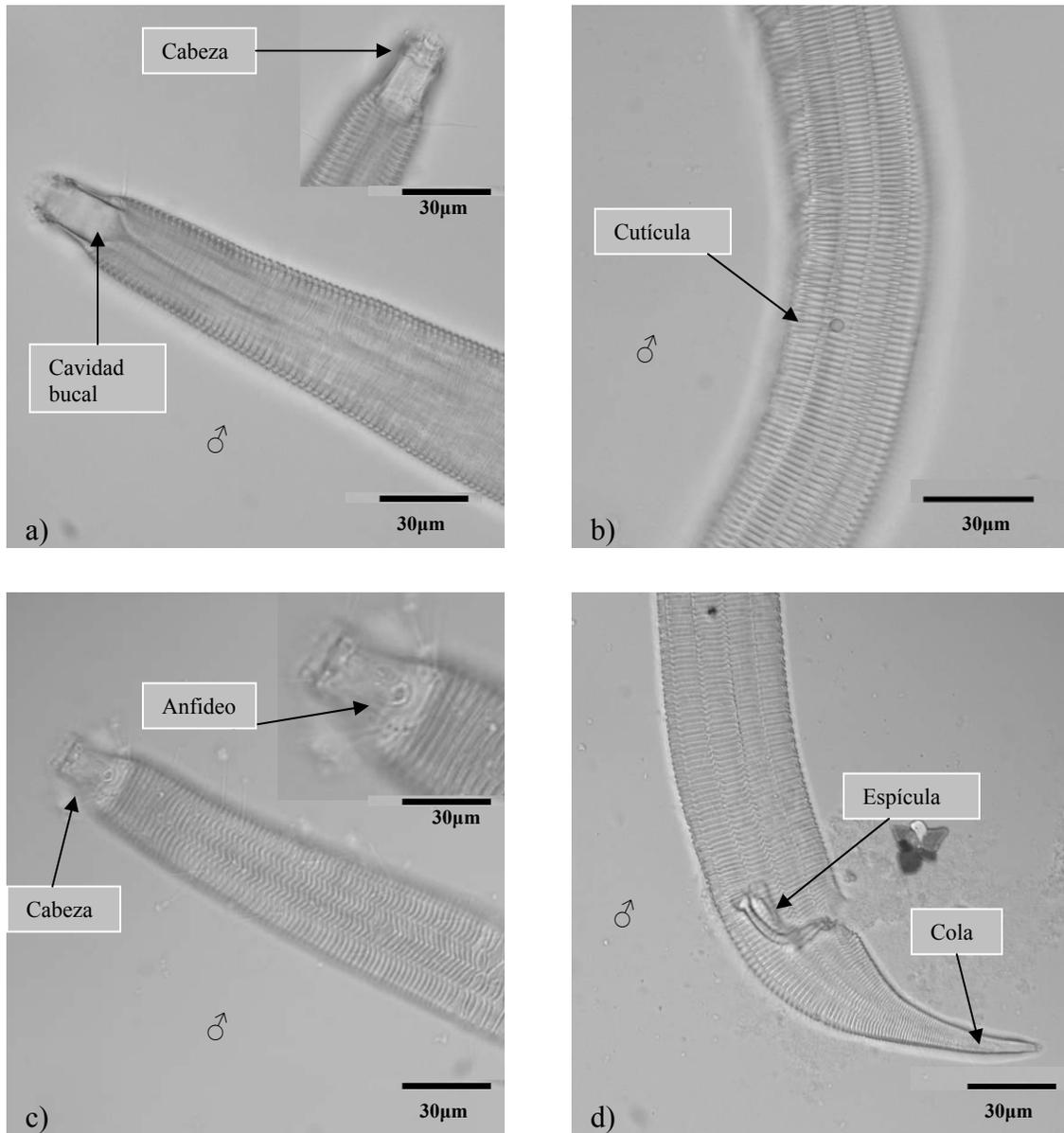


Figura 54. *Xyala* sp2 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. **a)** Región cefálica mostrando la cavidad bucal; **b)** Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular; **c)** Región anterior; **d)** Parte posterior, región cloacal.

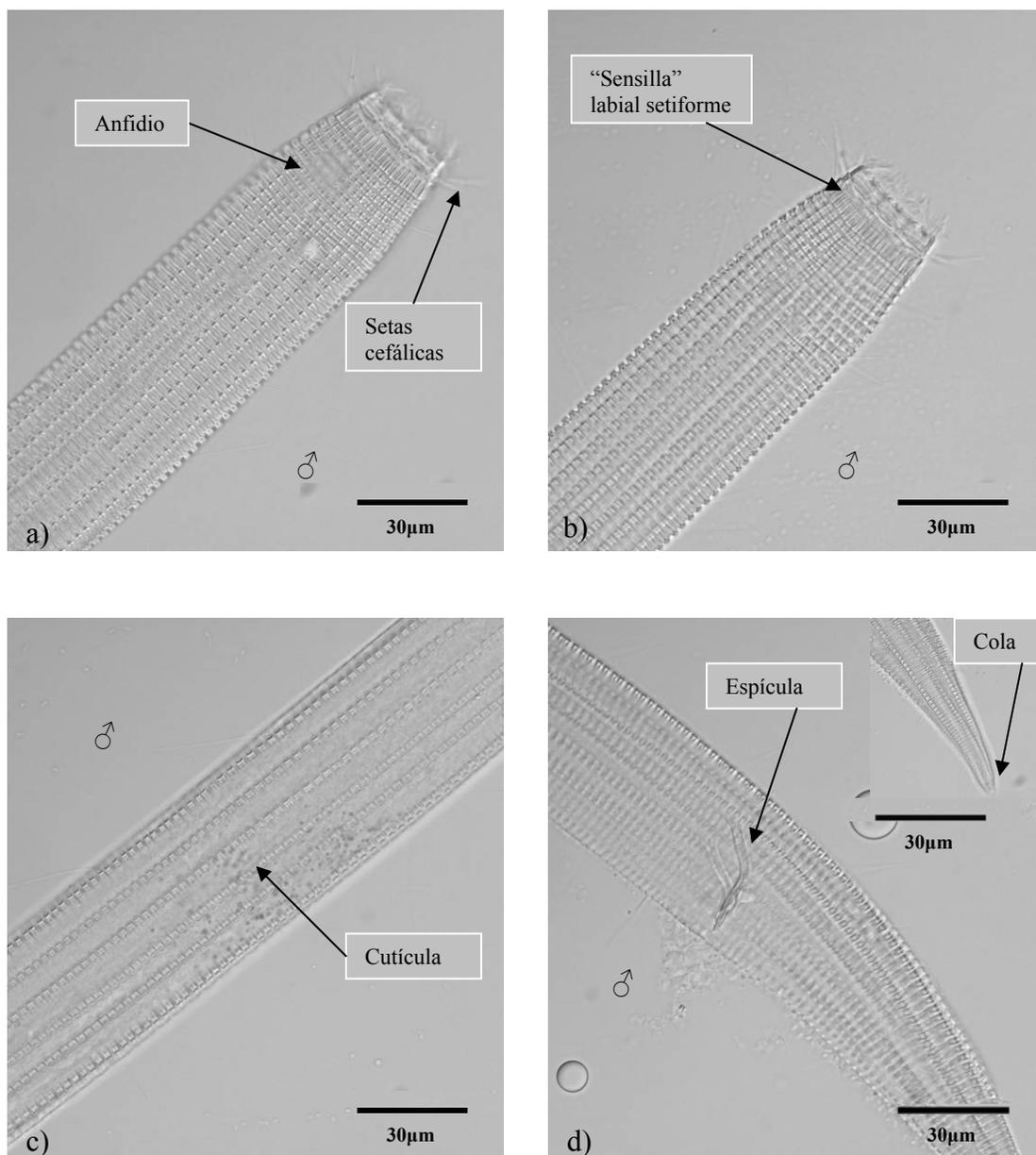


Figura 55. *Xyala* sp3 (Estación “El Tornillal”). Individuo macho. **a, b)** Región anterior del cuerpo; **c)** Parte dorsal del cuerpo mostrando el patrón cuticular; **d)** Parte posterior, región cloacal.

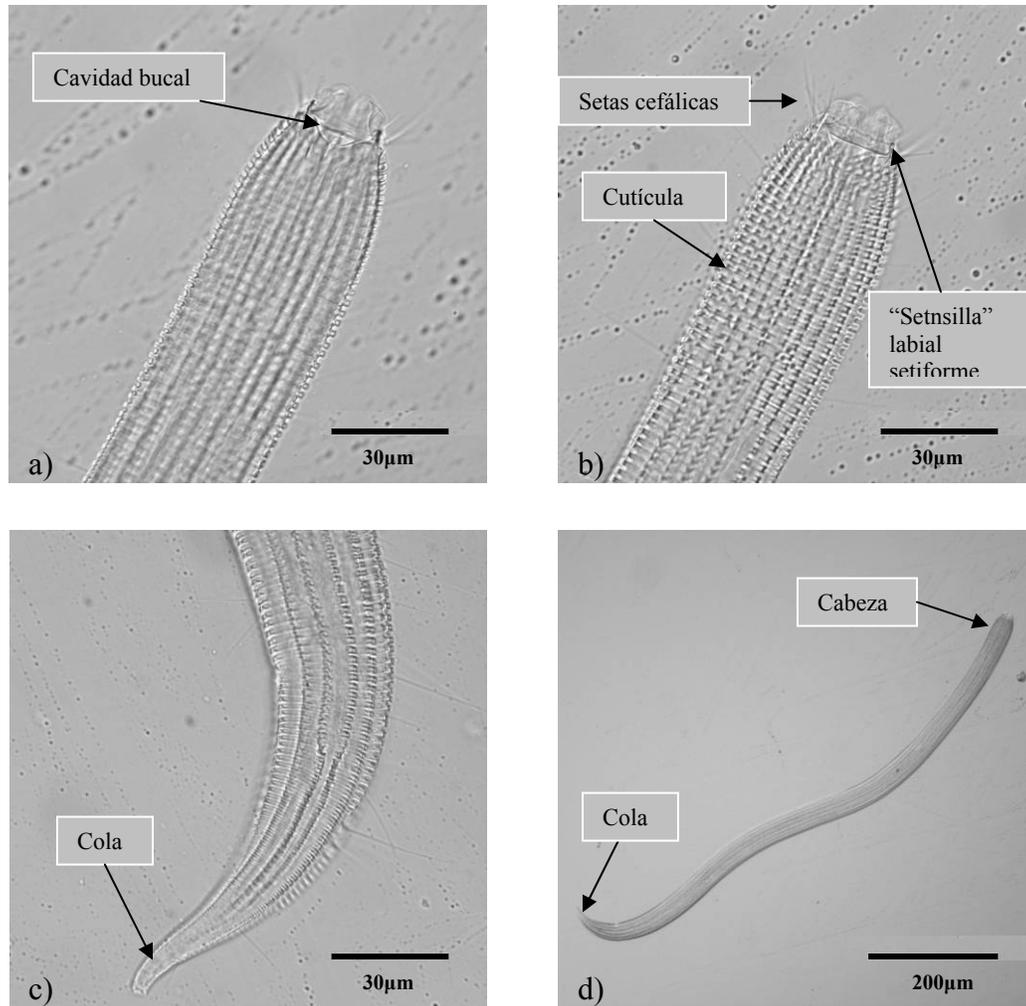


Figura 56. *Xyala* sp4 (Estación Santa Clara). Individuo juvenil. **a)** Región cefálica mostrando la cavidad bucal; **b)** Parte anterior del cuerpo; **c)** Parte posterior, región cloacal; **d)** Cuerpo total.

VII.4. 2. Familia Siphonolaimidae Filipjev, 1918

La familia Siphonolaimidae presenta características como son: una cavidad bucal que presenta en la parte central una estructura cuticularizada en forma de “lanza”, el patrón cuticular que presentan son líneas delgadas alrededor del cuerpo, además presentan setas cefálicas y un anfidio circular. Las hembras presentan un ovario y los machos presentan un solo testículo, en ambos géneros las gónadas están situadas en la parte anterior del cuerpo.

VII.4. 2.1. *Siphonolaimus* De Man, 1893

Siphonolaimus es el único género que puede ser caracterizado por presentar los caracteres de la familia, mencionados anteriormente. La mayoría de las especies presenta una apariencia de color negro, esto es debido a la presencia de gránulos de tono opaco en el intestino o a lo largo del cuerpo. Para este género en la base de datos de Nemys se reportan 27 especies mientras que Warwick *et al.*, (1998) reportan solamente 18 especies.

En la estación Ensenada de la Paz, fue identificada una morfoespecie perteneciente al género *Siphonolaimus*. Este individuo presenta las siguientes características: un bulbo doble, setas cefálicas, la cavidad bucal que en la parte central presenta una estructura cuticularizada en forma de “lanza”; presenta un anfidio redondo, una cutícula finamente estriada y una cola corta y redonda; además a lo largo del cuerpo se observa la presencia de gránulos opacos (Fig. 57).

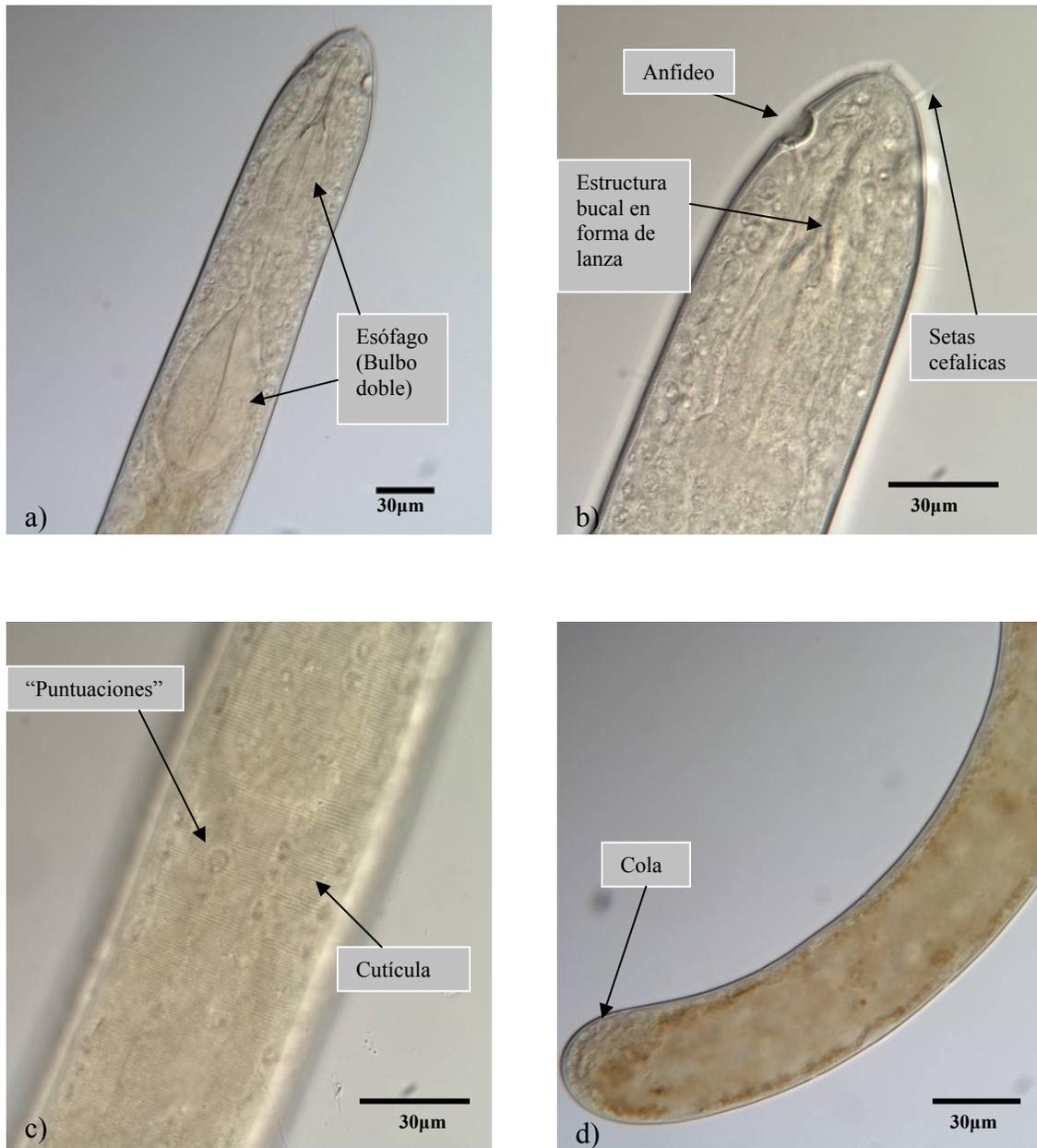


Figura 57. *Siphonolaimus* sp1 (Estación "Ensenada de La Paz"). Individuo juvenil. a) Parte anterior del cuerpo; b) Región cefálica; c) Parte ventral mostrando el patrón cuticular; d) Parte anterior.

VII.5. Familia Axonolaimidae Filipjev, 1918

Los individuos pertenecientes a la familia Axonolaimidae presentan las siguientes características: una cavidad bucal con forma de “diamante” con una estructura en la parte anterior formada por seis dientes, llamada “odonthia”; presentan una cutícula finamente estriada, setas cefálicas en círculos separados, aunque las seis setas anteriores normalmente son reducidas a papilas; presentan un anfideo en forma de “orquilla” o ‘bastón’ longitudinalmente alargado. Las hembras presentan dos ovarios y los machos dos testículos.

VII.5.1 *Odontophora* Butschli, 1874

Las especies del género *Odontophora* presentan una “odonthia” (ver caracteres de la familia) en la parte anterior de la cavidad bucal, un esófago sin bulbo posterior; una cola en forma cónica; en algunas especies el anfideo puede ser en forma de “orquilla” redondeada más que alargada. Warwick *et al.*, (1998) reportan para este género un total de 36 especies mientras que la base de datos de Nemys reporta 46.

En la estación “El Burro” fue identificada una morfoespecie del género *Odontophora*. Las características que presenta son las siguientes: una cutícula finamente estriada, una cavidad bucal con presencia de una “odonthia”, un anfideo en forma de bastón, setas cefálicas, una cola en forma cónica; además este individuo presentó una espícula con forma curvada con presencia de un gubernaculum con apófisis (Fig. 58).

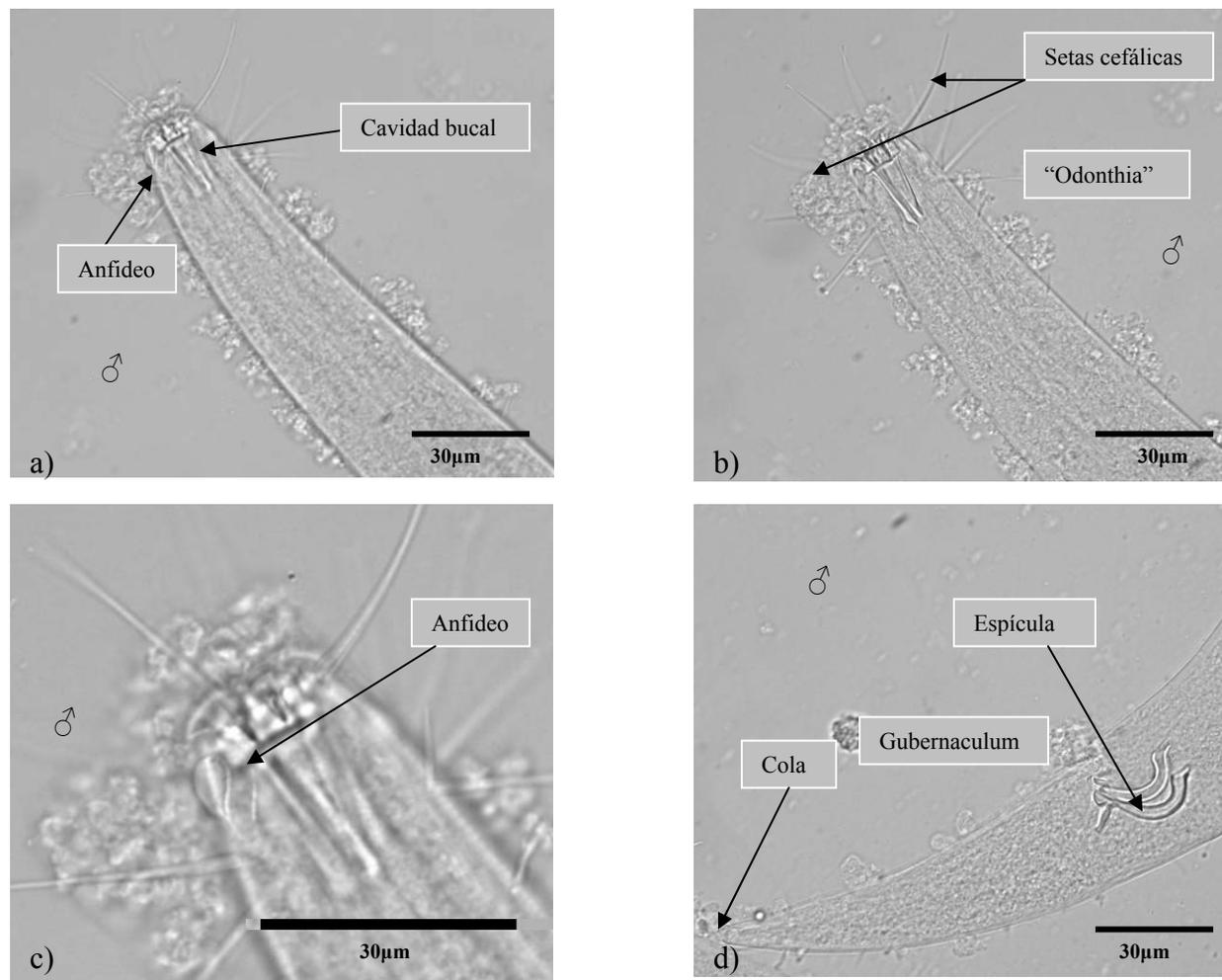


Figura 58. *Odontophora* sp (Estación "El Burro"). Individuo macho. a) Parte anterior; b) Región cefálica; c) Región cefálica; d) Parte posterior, región cloacal.

VII. 5 Resultados moleculares

VII.5.1 Éxito en la extracción y amplificación del ADNr

Posterior a la identificación morfológica, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de la región D2D3 del gen 28S del ADNr. Se logró amplificar producto de un total de 33 de los 83 individuos identificados, lo cual representó un 40% de éxito de amplificación global. Es importante mencionar que en estos organismos amplificados nunca se obtuvo suficiente producto de PCR en la primera reacción, por lo que fue necesario volver a amplificar haciendo una segunda PCR utilizando el producto de la primera como ADN patrón.

Debido al éxito limitado de los cebadores D2A y D3B, se probaron diferentes combinaciones de los cebadores diseñados en este estudio (ver sección VI.4.2 y Fig. 4). El par de cebadores que presentó mayor éxito de amplificación fue el D2A-D3B con 13 individuos en 10 morfoespecies, mientras que la combinación D2A-28S666 no funcionó en ningún individuo (Tabla V).

Se logró secuenciar 27 de los 33 productos amplificados, por lo que el éxito de secuenciación fue del 82 %. En 6 productos las reacciones de secuenciación fallaron o las secuencias obtenidas resultaron sumamente ruidosas debido a la pobre señal de fluorescencia. Finalmente, la comparación del éxito entre los taxa estudiados reveló que el orden Enoplida fue el más exitoso tanto en amplificación como en secuenciación y dentro de este orden, la familia Oncholaimidae (Tabla II) fue la que presentó un 92% de éxito en la amplificación y secuenciación. Sólo un individuo de la morfoespecie *Meyersia* sp. no pudo ser amplificado. En contraste, los nemátodos del orden Monhysterida, de los que se identificó a un total de 17 individuos dentro de 9 géneros (Tabla II), tuvieron un éxito muy bajo ya que sólo se pudo amplificar y secuenciar a cuatro individuos (Tabla V).

Tabla V. Organismos de los tres grandes órdenes de nemátodos marinos amplificados y secuenciados con los diferentes pares de oligonucleótidos.

Orden	Morfoespecie	Individuos identificados	Número de individuos amplificados con cada combinación de cebadores					Individuos secuenciados
			D2A-D3B	**D2A-28S744	**D2A-28S666	**28S486-D3B	**D2A-28S461	
ENOPLIDA	<i>Mesacanthion</i> sp	2					1	1
	<i>Trissonchulus</i> sp	1		1				1
	<i>Oncholaimidae</i> sp1	1	1					1
	<i>Oncholaimidae</i> sp2	1	1					1
	<i>Oncholaimidae</i> sp3	1					1	1
	<i>Oncholaimidae</i> sp4	1					1	1
	<i>Oncholaimidae</i> sp5	1					1	1
	<i>Oncholaimus</i> sp	4	1			3		4
	<i>Viscosia</i> sp	3	2					2
	<i>Rhabdodemia</i> sp	1		1				1
CHROMADORIDA	<i>Chromadoridae</i> sp1	1					1	*
	<i>Chromadoridae</i> sp2	1					1	*
	<i>Chromadora</i> sp1	2	2					2
	<i>Chromadora</i> sp2	1	1					1
	<i>Dichromadora</i> sp1	1		1				1
	<i>Dichromadora</i> sp2	1		1				1

Tabla V. Continuación

Orden	Morfoespecie	Individuos identificados	Número de individuos amplificados con cada combinación de cebadores					Individuos secuenciados
			D2A-D3B	**D2A-28S744	**D2A-28S666	**28S486-D3B	**D2A-28S461	
CHROMADORIDA	<i>Sabatieria</i> sp1	1	1					1
	<i>Acanthonchus</i> sp1	4					2	*
	<i>Pomponema</i> sp	1					1	1
	<i>Desmodora</i> sp1	1		1				1
	<i>Metachromadora</i> sp1	3	1					1
	<i>Microlaimus</i> sp1	2					2	*
MONHYSTERIDA	<i>Xyalidae</i> sp1	1	1					1
	<i>Omicronema</i> sp	3	2					2
	<i>Promonhystera</i> sp	2		1				1
TOTAL		41	13	6		3	11	27

*Individuos con secuencias fallidas o ruidosas

**Combinaciones de cebadores diseñados. Las celdas grises representan reacciones fallidas.

VII.5.2 Análisis filogenéticos

El alineamiento múltiple del ADNr de las 27 secuencias experimentales y de las 37 secuencias de referencia obtenidas de Genbank publicadas por De Ley *et al.*, (2005), tuvo una longitud de 1150 pb. El alineamiento presenta 235 residuos nucleotídicos conservados (invariables) y 790 sitios variables. Entre los sitios variables 644 fueron informativos para parsimonia. La composición nucleotídica promedio para la región D2-D3 del gen 28S fue la siguiente: 24.3% (T), 21.9% (C), 23.3% (A) y 30.5% (G) y el tamaño promedio de las secuencias propias analizadas fue de 668 pb.

Las reconstrucciones filogenéticas realizadas con ambos métodos MP y VC se enraizaron por grupo externo (“outgroup”) con una secuencia del género *Acrobeloides* de la Familia Cephalobidae del Orden Rhabditida. Los árboles presentaron congruencias topológicas importantes; en ambos se pueden observar clados internos que ostentan altos valores de “bootstrap”, lo que indica una fuerte señal filogenética (Fig. 59 y 60). Cuatro de ellos son congruentes con la taxonomía de los organismos secuenciados y se encuentran en ambas reconstrucciones. Estos cuatro clados principales agrupan a secuencias obtenidas en este estudio con otras de referencia: dos formados por representantes del orden Enoplida (CLADO A: *Mesacanthion*, *Trissonchulus*, *Enoploides*, *Ascolaimus*, *Viscosia* (Genbank), Oncholaimidae, y *Phanoderma* y CLADO B: *Pontonema*, *Viscosia*, *Oncholaimus* y Oncholaimidae) y otros dos por representantes del orden Chromadorida (CLADO C: *Choanolaimus*, *Latronema*, *Metachromadora* y *Richtersia* y CLADO D: *Sabatiera*, *Paracanthonchus*, *Pomponema*, *Dichromadora*, Chromadoridae, *Spilophorella* y *Chromadora*) (Fig. 59 y 60). Sin embargo los clados principales no forman los grupos monofiléticos esperados, es decir (A, B) y (C, D), sino que resultaron parafiléticos. En estas reconstrucciones filogenéticas se encuentra que los representantes de algunos géneros como *Viscosia* no son todos monofiléticos (p.ej., la secuencia de Genbank DQ077779x1|*Viscosia* no se agrupa con otras secuencias congénicas). Por otro lado, las secuencias de la mayoría de los individuos identificados morfológicamente en este estudio sí se agruparon con otras secuencias congénicas de referencia obtenidas de GenBank. Fue

notable la ausencia de resolución filogenética de la región profunda de ambos árboles que se reflejan en la presencia de muchas ramas de longitud casi cero en el árbol VC y en la falta de valores de “bootstrap” no paramétrico superiores al 50% en el de MP.

Los comparación entre los árboles filogenéticos no sólo revela congruencias como la presencia de los clados principales descritos anteriormente, si no que también muestran que comparten incongruencias taxonómicas con altos valores de bootstrap. Entre estas agrupaciones se encuentra un clado formado por un individuo del género *Chromadora* sp2 con un individuo de la familia Oncholaimidae; otro conformado por un individuo del orden Chromadorida (*Dichromadora* sp2) y dos individuos del orden Monhysterida (*Xyalidae* sp y *Promonhystera* sp); y finalmente una agrupación del género *Desmodora* sp1. con un individuo del genero *Omicronema* sp (b), en ambos árboles las relaciones son altamente soportadas. Finalmente, a pesar de que se presentaron algunas incongruencias entre las relaciones de algunos taxa, en ambos árboles las relaciones entre los individuos pertenecientes al orden Chromadorida y Enoplida fueron resueltas en su mayoría.

Finalmente, cabe resaltar que en tres morfoespecies de las que se secuenciaron productos de varios individuos (*Viscosia* sp(a, b), *Oncholaimus* sp(a, b, c, d) y *Chromadora* sp1(a,b)) las secuencias resultaron idénticas (*Viscosia*, *Oncholaimus*) o muy similares (*Chromadora* ambas secuencias difieren en tres pares de bases). Sólo en el Monhysterido *Omicronema* sp las dos secuencias resultaron radicalmente distintas y ninguna de ellas se agrupó con otras secuencias de Monhysteridos (Fig. 59).

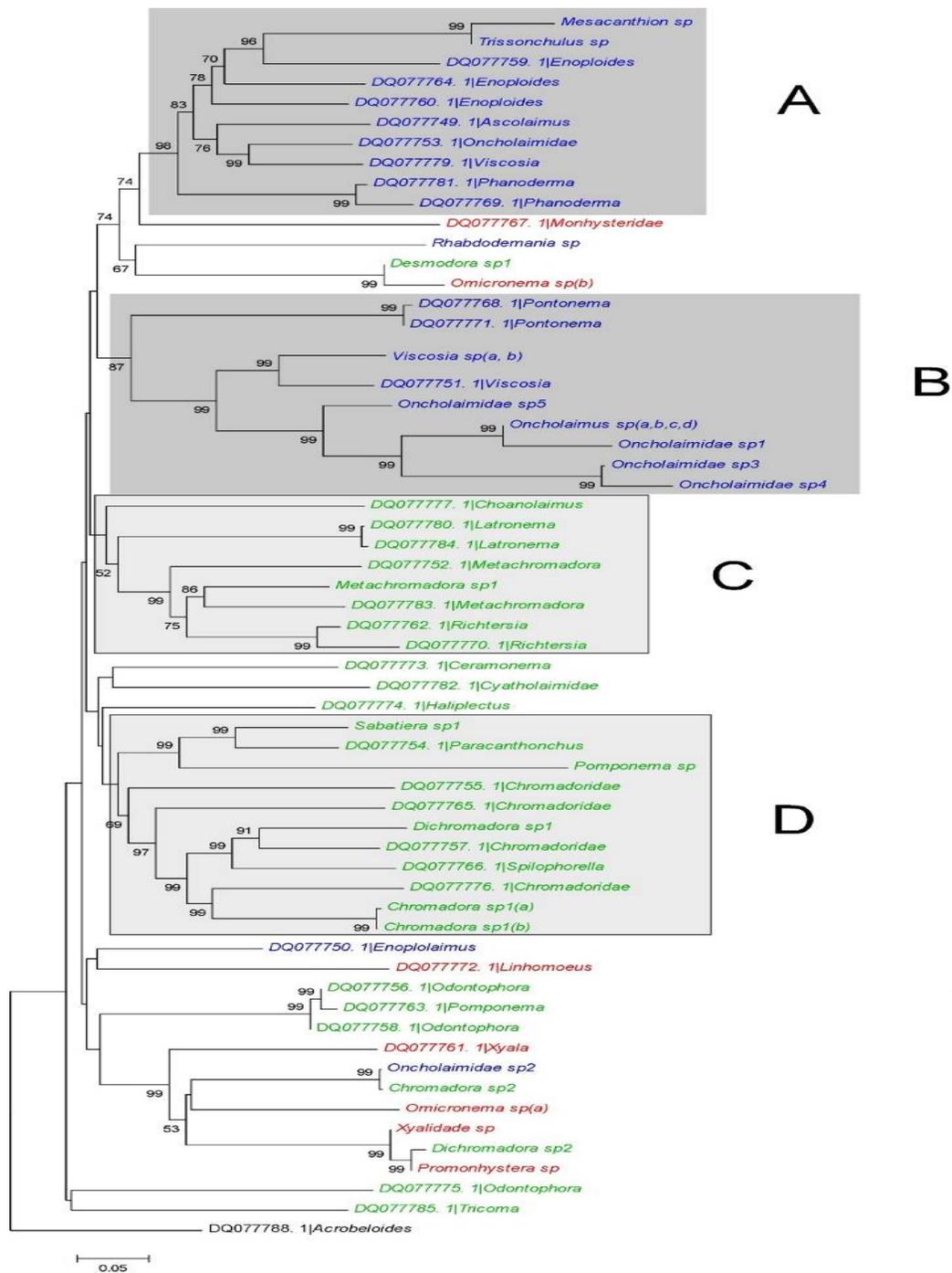


Figura 59. Árbol filogenético del vecino más cercano (VC). Reconstruido con secuencias del gen 28S ADN_r de nemátodos marinos de este estudio y de De Ley *et al.*, (2005); estos últimos identificables por su número de acceso de Genbank. Los órdenes se encuentran codificados en color: Enóplida (azul), Chromadorida (verde), Monhysterida (rojo), Rhabditida (negro). Las letras entre paréntesis (p.ej., a,b,c) se refieren a secuencias provenientes de una misma morfoespecie.

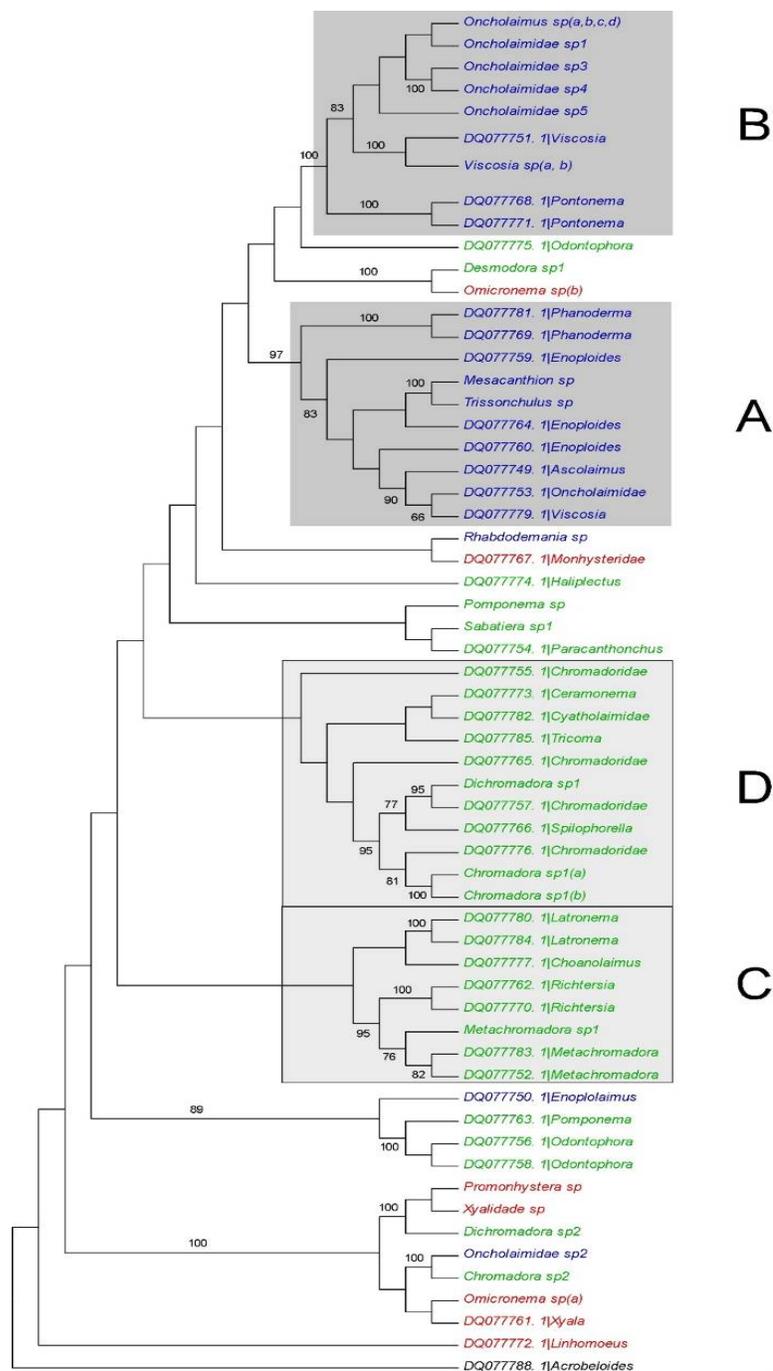


Figura 60. Árbol filogenético del parsimonia máxima (VM). Reconstruido con secuencias del gen 28S ADN_r de nemátodos marinos de este estudio y de De Ley *et al.*, (2005); estos últimos identificables por su número de acceso de Genbank. Los órdenes se encuentran codificados en color: Enóplida (azul), Chromadorida (verde), Monhysterida (rojo), Rhabditida (negro). Las letras entre paréntesis (p.ej., a,b,c) se refieren a secuencias provenientes de una misma morfoespecie.

VIII. Discusión

VIII.1 Variabilidad morfológica y diversidad de nemátodos marinos

En este estudio se reportan un total de 55 morfoespecies de las cuales 47 se identificaron a nivel de género y 8 sólo a nivel de familia; algunas de ellas fueron similares a las reportadas por Mundo-Ocampo y colaboradores (2007) en dos localidades del Alto Golfo de California (Punta Estrella y Santa Clara) en donde se encontraron 80 géneros, de los cuales 67 ocurrieron en Punta Estrella, Baja California, y 25 en el Golfo de Santa Clara, Sonora. Ocho géneros se encontraron en ambos trabajos: *Daptonema*, *Catanema*, *Sabatiera*, *Paramonhystera*, *Dichromadora*, *Spirinia*, *Rhynchonema* y *Microlaimus*. Mundo *et al.*, (2007) mencionan que la gran abundancia de nemátodos en Punta Estrella y Santa Clara es reflejo de la granulometría del sitio, ya que en diversos estudios ecológicos de nemátodos marinos, se ha observado que la presencia de un incremento de la densidad de individuos, cuando los sedimentos son finos. Otro estudios también han mencionado que se puede encontrar una alta diversidad de especies cuando la complejidad del sedimento es mayor (Heip, *et al.*, 1985), una amplia variedad de tamaños de partículas sedimentarias puede favorecer una mayor disponibilidad de espacios e incluso proveer una mayor variedad de recursos alimentarios (Tietjen, 1991).

En otro estudio reciente realizado en varias localidades de las costas de la península de Baja California, se reportan un total de 16 géneros en cinco familias representantes del orden Enoplida (Pereira, 2008). La localidad donde se encontró el mayor número tanto de individuos como de géneros identificados fue la localidad de Santa Clara, con 58 individuos y 9 géneros. En este trabajo, se reportan 12 taxa de Enoplida, de los cuales cinco Oncholaimidae no pudieron determinarse a nivel genérico (Tabla II). Entre estos, *Mesacanthion*, *Viscosia*, *Oncholaimus*, *Rhabdodemia*, *Trisonchulus* y *Oncholaimidae* sp1, sp2, sp3, sp4 y sp5 son los más ampliamente distribuidos pues se han encontrado en las estaciones de “El Tornillal” y “Santa Clara” en el Alto Golfo de California y en “Ensenada de la Paz”, en La Paz B.C.S, en este trabajo, así como en San Carlos, Santa Clara, Bahía de los Ángeles y La Paz, en el trabajo de Pereira (2008). Se ha mencionado

que los individuos del orden Enoplida son más comunes en ambientes arenosos ya que, al igual que los nemátodos de los otros órdenes marinos (Chromadoridos y Monhysteridos), su distribución se encuentra determinada por el tamaño de grano de los sedimentos (Heip *et al.*, 1985).

En una localidad de la Bahía Chetumal, Quintana Roo, se encontró que la comunidad de nemátodos estuvo dominada por el orden Chromadorida en un ambiente con arena fina y de tamaño medio con un máximo de 15% de materia orgánica. Las familias dominantes fueron: Desmodoridae, Chromadoridae, Cyatholaimidae, Comesomatidae, Selachinematidae y Microlaimidae (De Jesús-Navarrete & Gómez, 1999). Si bien este trabajo no es cuantitativo, el orden Chromadorida, también resultó ser dominante. Se encontraron también representantes de las otras familias del Caribe, con la adición de Ceramonematidae. Boucher y Gourbault (1990) mencionan que este tipo de familias pueden ser encontradas en sedimentos carbonatados así como en zonas de manglar. Estaciones como “El esterito” y “Ensenada de la Paz” fueron las localidades donde se registró un mayor número de géneros pertenecientes a diferentes familias del orden Chromadorida (Tabla IV). Estas estaciones están influenciadas por manglares y por efluentes terrígenos por lo que son enriquecidas con una gran cantidad de nutrientes, lo que podría influenciar en la presencia de Chromadoridos.

Se ha propuesto que la diversidad de nemátodos marinos se encuentra influenciada por la latitud *per se*, con altos valores entre los 30° y 60° de latitud Norte (Warwick & Trueman, 2005; Mokievsky & Azovsky, 2002). Asimismo, su abundancia y distribución, puede ser variable de un sitio a otro, como ocurre en ambas localidades de nuestro estudio (Alto Golfo de California y La Paz, B.C.S), ya que además del tamaño del grano, la diversidad de nemátodos puede estar influenciada por otros factores como la estacionalidad, así como por una combinación de gradientes bióticos y abióticos específicos de cada sitio (Heip *et al.*, 1985; Gheskiere *et al.*, 2005). En estudios recientes del Atlántico (Lamshead *et al.*, 2000) y del Pacífico (Lamshead *et al.*, 2002) se ha confirmado que la diversidad local de nemátodos marinos es alta cuando las regiones son

enriquecidas con altas cantidades de fitodetritus. Si bien el flujo de agua dulce del Río Colorado hacia el Alto Golfo de California ha disminuido drásticamente, así como, el aporte de nutrientes por esta vía (Avila-Serrano *et al.*, 2006), la productividad del Golfo sigue siendo alta por aportes de nutrientes terrígenos (Hernandez-Ayón *et al.*, 1993; Millán-Núñez *et al.*, 1999), por lo que podríamos considerar que la diversidad de nemátodos marinos en las localidades de “El Tornillal, “Santa Clara” y “El Burro” ubicadas en el Alto Golfo, pueden ser influenciadas por factores como el enriquecimiento de nutrientes.

Se estima que los nemátodos marinos de vida libre son un grupo taxonómico altamente diverso o quizás hiperdiverso, aunque esta afirmación se basa en extrapolaciones derivadas de estudios locales y no del análisis de bases de datos a gran escala (Lamshead & Boucher, 2003). A pesar de que las especulaciones sobrepasan el número real de especies existentes, es un hecho que la diversidad de estos individuos es mayor que la de otros taxa (Heip, *et al.*, 1985) y que aún existe un gran número de especies sin describir. En el presente estudio no se pretende dar una estimación del número real de especies existentes en los sitios muestreados, puesto que los objetivos del estudio son de carácter cualitativo y no cuantitativo. Consecuentemente, los organismos analizados fueron seleccionados como los mejor conservados y de mayor tamaño y fácil observación; esto, facilitó su identificación morfológica y los análisis genéticos. Aunque la fauna reportada no representa una muestra aleatoria de la diversidad existente, si refleja los niveles de diversidad relativa encontrados en ambos sitios, dado que se siguieron los mismos criterios para todas las estaciones.

Se ha observado que un alto número de especies de nemátodos han mostrado tener una extensa diversidad genética, sin embargo, esta variabilidad es enmascarada por sus formas morfológicamente similares (Traunspurger, 2000). La poca variabilidad morfológica que se ha reportado en muchas especies de nemátodos marinos, es relativa, pues puede ser resultado de estudios descriptivos deficientes, por la carencia de expertos en el área, y al

uso de metodología y equipo inadecuado (De Ley *et al.*, 2005; Bhadury *et al.*, 2006; Bhadury *et al.*, 2008).

En nuestro estudio sólo un individuo de la familia Desmodoridae pudo ser identificado a nivel de especie, *Desmodora tenuispiculum* en la estación “El Burro”. La identificación de los organismos restantes, fue lograda solo a nivel de género. Esto en parte se justifica por la existencia de factores fuera de nuestro alcance entre estos, caracteres morfológicos que no coincidieron con lo reportado en la literatura, carencia de literatura específica, y la posible existencia de diversidad interespecífica. Esto fue particularmente crítico en las familias Chromadoridae y Desmodoridae. Por otra parte, la determinación taxonómica a nivel de especie amerita mucho más esfuerzo y experiencia, y es muy probable que muchas de las morfoespecies representen especies nuevas para la ciencia, puesto que muchas especies de nemátodos tanto marinos como terrestres, aun no han sido formalmente reportadas (Platt 1994). Lo anterior indica que es necesaria una base de datos robusta que pueda contener el mayor número de taxa posibles; que sea accesible a científicos interesados en la identificación y clasificación de nemátodos marinos y que se cuente con un sistema de identificación transferible, es decir que pueda ser consultada por aquellos científicos interesados en la identificación y clasificación de los individuos y que sea actualizada constantemente (Floyd, et al 2002, Hebert *et al.*, 2003 a,b).

Los caracteres taxonómicos diagnósticos de los nemátodos son generalmente los caracteres sexuales secundarios únicamente observables en individuos adultos. En el caso de los nemátodos marinos en los machos y en pocas ocasiones en las hembras. Por consiguiente, la determinación taxonómica morfológica de larvas, juveniles o individuos dañados por el proceso de fijación es casi imposible (Floyd *et al.*, 2002, De Ley *et al.*, 2005). En este trabajo no se pudo determinar a nivel genérico a cuatro de los cinco individuos de la familia Oncholaimidae, precisamente debido a que no se pudo observar la anatomía de sus órganos sexuales por encontrarse inmaduros. Sin embargo, el objetivo planteado en nuestro estudio de identificar los organismos morfológicamente hasta nivel

genérico y separarlos en posibles morfoespecies se pudo realizar en aquellos individuos adultos y que estuvieron bien conservados.

Son varios los problemas que han propiciado la proliferación de nuevas y variadas técnicas para complementar la identificación de los organismos microscópicos, por ejemplo, el deterioro de las preparaciones permanentes con el paso del tiempo, la destrucción de especímenes utilizados en algunas técnicas de microscopía (p. e.j. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM, SEM), así como de aquellos organismos que son utilizados para realizar análisis moleculares. Una de estas nuevas estrategias es la Edición y Video Captura de imágenes (VCE) propuesta por De Ley & Bert (2002). La identificación de los diferentes taxa registrados en este estudio se llevó a cabo utilizando VCE. Esta técnica permitió contar con un registro morfológico en formato digital después de la destrucción de los especímenes. La utilización de organismos de referencia o “vouchers” multifocales digitales resulta ser apropiada para la identificación de organismos utilizados en análisis moleculares destructivos. Su ventaja principal, es que permite observar e interpretar la anatomía de los organismos en diferentes planos focales facilitando la localización y orientación de los diferentes órganos y estructuras. Además, los archivos de imágenes multifocales digitales constituyen especímenes virtuales susceptibles de ser almacenados y mantenidos sin el deterioro que típicamente ocurre con los especímenes físicos depositados en colecciones científicas. No obstante, el objetivo de estas estrategias no es reemplazar a las colecciones científicas sino complementarlas y hacer el mejor uso de la tecnología digital para salvaguardar y difundir el conocimiento científico sobre la biodiversidad del planeta.

VIII.2 Las herramientas moleculares

El éxito de amplificación, en el presente estudio fue del 40% del número total de individuos identificados, mientras que el éxito de secuenciación fue mayor (82%). Por lo que, el objetivo de amplificar y secuenciar el ADN_r de los organismos representantes de cada morfoespecie fue realizado en casi en la mitad de los individuos identificados.

Autores como Floyd y colaboradores (2002), reportan un éxito de amplificación de 80-85% utilizando digestión con NaOH seguida por la neutralización y amplificación de la subunidad pequeña del ADNr (18S o SSU por sus siglas en inglés) en nemátodos terrestres. Ellos encontraron que este método fue el más exitoso comparado con otras metodologías que involucran la digestión con Proteinasa K o lisis celular y no encontraron una clara correlación entre el tamaño de los individuos o el estadio ontogénico y su éxito en la amplificación de ADN. Por su parte, De Ley *et al.*, (2005) reportan un 80% de éxito en la amplificación de la región D2D3 de la subunidad grande del ADNr (28S o LSU por sus siglas en inglés) después de la digestión celular con proteinasa K. En este último trabajo se reporta que otros loci fueron menos consistentes. Los estudios mencionados anteriormente, sugieren que en nuestro estudio es necesario realizar una mayor optimización de los protocolos moleculares para incrementar el éxito durante la amplificación.

Entre los loci utilizados para el proyecto “Código de Barras de ADN” se encuentra el SSU del ADNr. Este locus tiene un alto porcentaje de éxito en la amplificación, sin embargo, requiere de su optimización para cada taxón ya que trabaja mejor en algunos grupos que en otros. Las secuencias de este gen han sido utilizadas para estudios filogenéticos como para análisis moleculares (Blaxter *et al.*, 1998). Otras regiones del ADNr que también han sido utilizadas, son los espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2 por sus siglas en inglés). A pesar de que han sido utilizados como marcadores taxonómicos (Powers, 1997), estudios recientes han revelado que los niveles de polimorfismo son altos entre individuos, lo que regularmente podría confundir la separación de las especies (Hugall *et al.*, 1999), siendo mejor empleado para estudios de genética poblacional. Finalmente, otro gen utilizado para estudios moleculares en nemátodos marinos, ha sido el gen 28S del ADNr (De Ley *et al.*, 2005; Pereira, 2008), específicamente la región D2/D3, ya que esta región presenta altos valores de divergencia entre especies relacionadas.

La región D2/D3 del LSU presenta subregiones conservadas que pueden ser sitios potenciales para el asentamiento de cebadores. En este estudio se diseñaron cuatro

diferentes cebadores (ver sección VI.4.2) utilizando secuencias ortólogas, con el fin de incrementar el éxito de amplificación. La lógica de esta estrategia fue que en el fragmento de ~700 pb (D2A-D3B) podrían estar formando estructuras secundarias (p.ej., orquillas o corridas de GCs) en los productos de PCR que inhibieran la amplificación. Mediante la amplificación de fragmentos de menor tamaño se puede reducir la probabilidad de que esto pueda ocurrir. Como antecedente podemos mencionar que en nemátodos marinos del orden Enoplida, la amplificación de fragmentos más pequeños, aproximadamente 350 pb, tienen un mayor éxito de amplificación con el gen 18S (Pereira, 2008). La estrategia fue muy exitosa ya que permitió la amplificación y secuenciación de 20 organismos adicionales a los 13 que se pudieron secuenciar con los cebadores propuestos por De Ley *et al.* (2005).

En términos del número de reacciones exitosas, la pareja de cebadores D2A-D3B fue la de mayor éxito absoluto en la amplificación, (13 taxa), seguida por la combinación D2A-28S461 (11 taxa). Este último par de cebadores amplifica las primeras 460 pb del fragmento D2A/D3B que permiten diferenciar a los individuos a nivel de género, con un éxito de amplificación potencialmente mayor al del fragmento de ~700 pb. Esto sugiere que este fragmento menor podría ser considerado como un candidato para estudios posteriores de CB-ADN de nemátodos marinos, aunque sería necesario realizar pruebas adicionales en una mayor diversidad de taxa para cuantificar mejor su “universalidad” dentro del grupo.

VIII.3. Congruencia entre la taxonomía tradicional y la genética molecular

Tradicionalmente, la identificación de organismos se ha basado en su morfología. Sin embargo, frecuentemente los caracteres morfológicos no presentan suficiente resolución taxonómica y su interpretación requiere de un conocimiento experto que poseen sólo pocos científicos altamente especializados. Por tal motivo, recientemente se ha propuesto la utilización de métodos moleculares en la identificación de los individuos. Los datos moleculares son universales, objetivos, y no están sujetos a interpretación. Estas herramientas pueden proveer una demarcación más eficiente en la clasificación de los

individuos (Coomans, 2001; De Ley, 1999; Blaxter 2004; Nadler, 2002). En este estudio, se evaluó conjuntamente la determinación morfológica y la utilización del CB-ADN para la identificación de nemátodos marinos y los resultados obtenidos fueron los siguientes: en su mayoría, las morfoespecies identificadas mediante la taxonomía tradicional utilizando los caracteres morfológicos fueron consistentes con las secuencias obtenidas, y dichas secuencias a su vez, fueron correctamente agrupadas en su mayoría, a nivel de género y familia, con aquellas secuencias obtenidas de la base de datos de “GenBank”. Esto nos permitió determinar la posición filogenética y la existencia o no de monofilia de las secuencias provenientes de cada morfoespecie.

Se ha observado en diferentes estudios que la filogenia del grupo Nematoda debe ser reevaluada, ya que el análisis de datos moleculares ha revelado relaciones filogenéticas contradictorias a las obtenidas a partir de caracteres morfológicos (Blaxter *et al.*, 1998; De Ley & Blaxter, 2002; Nadler, 2002; Medal *et al.*, 2007). En nuestro estudio, la parafilia de los grandes clados que agrupan en monofilia a nemátodos de los órdenes Enoplida y Chromadorida (A-D, Figs. 59 y 60), sugiere que estas secuencias no poseen la señal filogenética suficiente para resolver las ramas más profundas de la filogenia, lo cual ha sido previamente señalado por De Ley *et al.*, (2005). No obstante, la existencia de relaciones filogenéticas “aberrantes” con altos valores de “bootstrap”, como en las que se agrupan representantes de distintos ordenes, deben de ser resultado de otras causas. Estas agrupaciones incluyen parejas entre Enoplida y Chromadorida (*Enoplolaimus* y *Pomponema/Odontophora*), así como entre Monhysterida y Chromadorida (*Promonhystera* y *Chromadora*, por un lado, y *Omicronema* y *Desmodora*, por otro). Se puede pensar en diferentes causas para explicar la existencia estas incongruencias: 1) por ejemplo, podría existir una incorrecta identificación morfológica (Badhury *et al.*, 2006), aunque en estos casos, los individuos son morfológicamente diferentes y pertenecen a distintos órdenes, por lo que su identificación incorrecta a nivel de orden es altamente improbable; 2) Por otro lado, dichas agrupaciones pueden ser explicadas por procesos reales en la historia evolutiva de los individuos y verdaderamente ser linajes cercanamente relacionados; 3) Existe también la posibilidad de una posible contaminación durante el proceso de amplificación

por PCR con ADN de otro organismo, lo cual produce una agrupación incorrecta (Bhadury *et al.*, 2006). 4) Tampoco se puede descartar que estas asociaciones atípicas se deban al efecto del muestreo de taxa (“taxón sampling”), ya que cuando algunos linajes se encuentran subrepresentados en una filogenia pueden generar relaciones erróneas (Hillis *et al.*, 2003). Esto ha sido sugerido por Pereira (2008) con individuos de la familia Enchiliidae y Oncholaimidae.

Finalmente, es importante mencionar que ambas reconstrucciones filogenéticas (VC y MP) fueron altamente congruentes. Las pocas diferencias entre las topologías de los árboles pueden atribuirse a los diferentes supuestos involucrados en cada método de reconstrucción y a la forma en que manejan los datos. Por ejemplo, MP es un método que considera como más cercano al árbol con el menor número de pasos (mutaciones) e incluye todos los nucleótidos del alineamiento. En contraste, el método VC es un método algorítmico en el que son utilizadas las distancias genéticas entre los taxa. Esta matriz de distancias pareadas entre cada secuencia, a diferencia de MP, ignora todas las posiciones en las que aparecen borrados o inserciones de bases (indels), ya que sólo las sustituciones nucleotídicas contribuyen a la distancia genética.

VIII.2. El “Código de barras de ADN” para la identificación de nemátodos marinos

Cuando dos organismos son marcadamente diferentes a nivel morfológico lo son también a nivel molecular, la congruencia entre los acercamientos morfológico y genético puede parecer trivial. Sin embargo, no es nada trivial cuando los organismos son muy similares morfológicamente y resultan muy divergentes a nivel molecular (p. e.j. especies crípticas); o cuando ocurre el caso contrario, es decir que dos organismos cercanamente relacionados a nivel molecular que resulten ser drásticamente distintos morfológicamente (p. ej. plasticidad fenotípica). Si sólo se utilizara a la evidencia morfológica en estos casos, la probabilidad de realizar clasificaciones incorrectas sería muy alta (Hebert, 2003 a,b; Blaxter, De Ley *et al.*, 2005). Por consiguiente, la utilización del código de barras de

ADN como una herramienta potencial para una determinación rápida y simplificada de taxa haría obsoleta la evaluación morfológica e impide que se cometan posibles errores en su interpretación.

En nuestro estudio la utilización de dicha herramienta permitió la identificación de los nemátodos marinos en ambas localidades del Golfo de California, encontrándose diversas concordancias entre morfología y secuencias de ADN. Se identificaron cuatro individuos morfológicamente iguales como *Oncholaimus* sp (a, b, c y d), los cuales presentaron secuencias idénticas, al igual que los individuos del género *Viscosia* sp (a y b). Los organismos a y b de *Chromadora* no presentaron secuencias idénticas pero sí altamente similares. A nivel de familia, los individuos de las familias Chromadoridae y Oncholaimidae fueron agrupados en clados monofiléticos con otros miembros de dichas familias esto sugiere que en la mayoría de los casos, existe una completa correspondencia entre la taxonomía tradicional y las técnicas moleculares.

El gen analizado parece carecer de suficiente señal filogenética para resolver las relaciones evolutivas a niveles ancestrales, es posible aumentar la exactitud de su utilización en el CB-ADN mediante la incorporación de más taxa de referencia. Entre más completa se encuentre la base de datos moleculares de referencia con organismos validados morfológicamente y molecularmente, será menor la probabilidad de que ocurran agrupaciones (identificaciones) erróneas producto de la carencia de información en la base de referencia. Una mejor representatividad taxonómica servirá también para identificar a aquellos taxa “problema” (con relaciones contradictorias) que necesitan estudios filogenéticos y morfológicos más precisos, sobre todo en aquellas ramas del árbol de la vida donde las relaciones filogenéticas aún no son claras. Finalmente, las especies son la base fundamental de cualquier estudio, por lo que su correcta identificación y clasificación permitirá un mejor entendimiento de los patrones y procesos que ocurren en la naturaleza. Por otro lado, es necesario un gran número de secuencias de diferentes taxa de nemátodos marinos para que esta técnica pueda ser consistentemente utilizada, ya que un mayor número de secuencias depositadas en las bases de datos moleculares, permitirán realizar

mayores identificaciones combinando ambas herramientas (morfología y genética molecular).

IX. Conclusiones

Para este estudio, la identificación morfológica de la mayoría de los nemátodos marinos de vida libre fue posible hasta nivel genérico y sólo un individuo del orden Chromadorida pudo ser identificado a nivel de especie (*Desmodora tenuispiculum*).

La amplificación y secuenciación de nemátodos marinos fue satisfactoria en un 40%, sin embargo, en familias como Oncholaimidae y Chromadoridae se pudieron amplificar y secuenciar el mayor número de individuos representantes (12 y 5 respectivamente). Con base a nuestros resultados podemos sugerir que en el resto de los grupos taxonómicos es necesaria una mayor optimización para tener un mayor éxito en las técnicas moleculares.

La posición filogenética de los individuos de una misma morfoespecie fue congruente en casi en todos los casos, ya que la mayoría de los individuos se agruparon en un mismo clado.

Las nuevas secuencias generadas en este estudio fueron agrupadas en su mayoría de manera concordante, con aquellas secuencias provenientes de la base de datos del “GenBank”.

Si bien las secuencias obtenidas en este estudio no fueron idénticas a ninguna de las disponibles en la base de datos de “Genbank”, su posición filogenética fue congruente con la identificación morfológica tanto de estas secuencias como de las secuencias de referencia (Genbank) en la mayoría de los casos.

La hipótesis nula de monofilia para las morfoespecies reportadas en nuestro estudio, no se pudo aceptar para todos los organismos de una misma morfoespecie, ni para todos los géneros de una misma familia. Es importante mencionar que es necesaria la integración de un mayor número de taxa, sobre todo de aquellos subrepresentados (p ej. Monhysteridos)

para poder resolver mejor las relaciones filogenéticas de los individuos reportados en este estudio.

Finalmente, las bases de datos morfológicos y moleculares de este estudio servirán como referencia para estudios posteriores en la identificación de nemátodos marinos, y contribuirán al proyecto internacional de “Código de Barras de ADN”.

X. Referencias

- Armstrong, K. F. y S. L. Ball (2005) "DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification." *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1813-1823
- Avila-Serrano, G. E., Flessa, K. M., Téllez-Duarte, M. A. y Cintra-Buenrostro, C. E. (2006) "Distribución de la macrofauna intermareal del delta del Rio Colorado, Norte del Golfo de California, México". *Ciencias Marinas*. 32: 649-661.
- Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D.T., Lamshead, P. J. D., Rogers, A. D. y Smerdon, G. R. (2006). "Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes" *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 320: 1-9.
- Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D.T., Lamshead, P. J. D., Rogers, A. D. y Smerdon, G. R. (2008) "Evaluation of combined morphological and molecular techniques for marine nematode (*Terschellingia* spp.) identification" *Mar. Biol.* 154: 509-518.
- Blaxter, M. (2003) "Molecular systematics: counting angels with DNA " *Nature* 421: 122–124
- Blaxter, M. (2004) "The promise of DNA taxonomy" *Philos. Trans. R. Soc. Lond B* 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., y Thomas, W. K (1998) "A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda" *Nature* 392: 71-75.

Blaxter, M., Man, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C, Floyd, R. y Abebe, E. (2005). "Defining operational taxonomic units using DNA barcode data" *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1935-1943.

Blouin, M. S. (2002). "Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer." *Inter. Jour. Para.* 32: 527-531.

Boucher, G. y Gourbault, N. (1990) "Sublittoral meiofauna and diversity of nematode assemblage off Guadeloupe Islands" *Bull. Mar. Sci.* 47: 448-463.

Brusca, R. C., Findley, L. T., Hastings, P. A., Hendrickx, M. E., Cosio, J. T. y Van Der Heiden, A. M. (2005). "Macrofaunal diversity in the Gulf of California". En Cartron, J.-L. E., G. Ceballos & R. S. Felger (eds), *Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico*". Oxford University Press, New York, 179– 202.

Chandler, G. T. y 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, G.T.; Herman, R.L.; y Vincx, M. (1999) "Meiofauna communities from the Straits of Magellan and the Beagle Channel". *Sci. Mar.* 63: 123-132

Coghlan, A. (2005). "The *C. elegans* Research Community" *Nematode genome evolution:* 1-15.

Cook, A. A., Bhadury, P., Debenham, N. J., Medal, B. H. M., Blaxter, M. L, Smerdon, G. R., Austen, M. C., Lamshead, P. J. D. y Rogers, A. D. (2005). "Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) as a tool for identification of marine nematode" *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 291: 103-113.

Coomans, A. (2002) "Present status and future of nematodes systematics." *Nematology* 4: 573-582

Crisci, J. V. (2006). "Signs of the times: Biodiversity, systematics and education." *Gayana Bot.* 63: 106-114.

De Jesús-Navarrete, A. y 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 Ley, P. (2000). "Lost in worm space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity." *Nematology* 2: 9-16.

De Ley, P. y W. Bert (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., y Thomas, W.K. (2005) "An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding". *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1945-1958

De Ley, P., Felix, M. A., Frisse, L. M., Nadler, S. A., Sternberg, P. W. y Thomas, W. K. (1999). "Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae)" *Nematology* 1: 591-612.

Derycke, S., Remerie, T., Vierstraete, A., Backeljau, T., Vanfleteren, J., Vincx, M., y Moens, T. (2005) "Mitochondrial DNA variation and cryptic speciation within the free-living marine nematode *Pellioiditis marina*" *Marine Ecology Progress Series.* 300: 91-103.

Esteves, A. M., Maria, T. F. y Wandeness, A. P. (2003) "Population structure of *Oncholaimus cobbi* (Nematoda: Oncholaimidae) in a tropical tidal flat" *Mar. Biol. Ass.U.K.* 83: 903-904.

Félix, P. E. F., Holguín-Quiñones O. E. Hernández-Herrera, A. y Flores-Verdugo, F. (2006). "Producción primaria de los mangles del Estero El Conchalito en Bahía de La Paz (Baja California Sur, México)." *Ciencias Marinas* 32: 53-63.

Floyd, R., Abebe, E., Papert, A. y Blaxter, M. (2002). "Molecular barcodes for soil nematode identification." *Molecular Ecology* 11: 839–850.

García, R. C. y Álvarez, R. M. (2006) "Comunidades de quitones (Mollusca: Polyplacophora) de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México" *Rev. Biol. Trop* 55: 177-182

Gheskiere, T.; Vincx, M.; Urban-Malinga, B.; Rossano, C.; Scapini, F. y Degraer, S. (2005). "Nematodes from wave-dominated sandy beaches: diversity, zonation patterns and testing of the isocommunities concept". *Est. coast. and shelf sci.* 62: 365-375

Giere, O. (1993). "Meiobenthology. The microscopic fauna in Aquatic sediments." Springer-Verlag, Berlín 328pp.

Grassle, J. F. y Maciolek, N. J. (1992). "Deep-sea species richness: regional and local diversity estimates from quantitative bottom samples" *Am. Nat.* 139: 313-341.

Gray, J. S., Bjorgesaeter, A., Bjorgesaster, A., Uglund, K. y Frank, K. (2006) "Are there differences in structure between marine and terrestrial assemblages?" *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 330: 19–26.

Gutiérrez, G. y González, J. I. (1989) Predicciones de mareas de 1990: Estaciones mareográficas del CICESE. Disponible en CICESE, Ensenada, México. 517. Informe Técnico OC-89-01.

Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. y Hickey, D. A. (2007). "DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics". *Trends in Genetics*. 23:167-172.

Hammond, P.M. (1992). Species inventory En G. Groombridge (ed) *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources*. Chapman and Hall, Londres. 17-39.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A. Ball, S. L. y deWaard, J. R. (2003a.) "Biological identifications through DNA barcodes" *Proc. R. Soc. Lond. B*. 270: 313-321.

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. y Hallwachs, W. (2004). "Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*." *PNAS* 101: 14812-14817.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. y deWaar, J. R. (2003b). "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species." *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*. 270: S96-S99.

Heip, C., Vincx, M. y Vranken, G. (1985). "The ecology of the marine nematodes" *Oceanography Marine Biology Annual Review* 23: 399-489.

Hernández-Ayón, J. M., Galindo-Bect, M. S., Flores-Báez, B. P., y Álvarez-Borrego, S. (1993). "Nutrient concentrations are high in the turbid waters of the Colorado River Delta" *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 37: 593-602.

Hillis D. M., Pollock, D. D., McGuire, J. A. y Zwickl, D. J. (2003) "Is sparse taxon sampling a problem for phylogenetic inference?" *Systematic Biology* 52: 124-126

Holovachov, O., Tnadingan De Ley I., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J. G., Rocha-Olivares, A. y De Ley, P. (2008). "Nematode from the Gulf of California. Part I. The genera *Ceramonema* Cobb, 1920, *Pselionema* Cobb in Cobb, 1933 and *Pterygonema* Gerlach, 1954.(Nematoda:Ceramonematidae)" *Nematology*. 10: 347-373.

Janzen, D. H., Hajibabaei, M., Burns, J. M., Hallwachs, W., Remigio, E. y Hebert, P. N. D. (2005) "Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding" *Phil. Trans. R. Soc. B*. 360: 1835-1845.

Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. y Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 33: 511–518

Lamshead, P. J. D. (1993). "Recent development in marine benthic biodiversity research." *Oceanis*. 19: 5-24.

Lamshead, P. J. D. Tietjen, J., Ferrero, T., y Jensen, P. (2000) "Latitudinal Diversity gradients in the deep-sea with special reference to North Atlantic nematodes". *Marine Ecology Progress Series*. 194: 159-167.

Lamshead, P. J. D., Brown, C. J., Ferrero, T. J., Mitchell, N. J., Smith, C. R., Hawkins, L. E. y Tietjen, J. (2002) "Latitudinal diversity patterns of deep-sea marine nematodes and organic fluxes – a test from the central equatorial Pacific". *Marine Ecology Progress Series*. 236: 129–135.

Lamshead, P. J. D. y Boucher, G. (2003) "Marine nematode deep-sea biodiversity – hyperdiverse or hype?". *Journal of Biogeography*. 30: 475-485

Lambshhead, P. J. D. (2004). "Marine nematode biodiversity" *Nematology: Advances and Perspectives. Nematode Morphology, Physiology and Ecology*. Ed. Chen ZX, Chen WY, Chen SY, Dickson DW. CABI Publishing, Oxfordshire, UK. 1: 436-467

Lambshhead, P. J. D. y G. Boucher (2003). "Marine nematode deep-sea biodiversity hyperdiverse or hype?" *Journal de Biogeography* 30: 475-485.

Lluch-Cota, S. E., Aragón-Noriega, E. A., Arreguín-Sánchez, F. Aurióles-Gamboa, D., Bautista-Romero, J. J., Brusca, R. C., Cervantes-Duarte, R., Cortés-Altamirano, R., Del-Monte-Luna, P., Esquivel-Herrera, A., Fernández, G., Hendrickx, M. E., Hernández-Vázquez, S., Herrera-Cervantes, H., Kahru, M., Lavín, M., Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, D. B., López-Martínez, J., Marinone, S. G., Nevárez-Martínez, M. O., Ortega-García, S., Palacios-Castro, E., Parés-Sierra, A., Ponce-Díaz, G., Ramírez-Rodríguez, M., Salinas-Zavala, C. A., Schwartzlose, R. A. y Sierra-Beltrán, A. P. (2007) "The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges". *Progress in Oceanography*.73: 1-26.

Madisson, D. R., Schulz, K. S. y Madisson, W. P. (2007). "The tree of life web project" *Zootaxa*. 1668:19-40.

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. y Lambshhead, P. J. D. (2007) "An improved molecular phylogeny of the nematode with special emphasis on marine taxa" *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 622-636.

Millán-Núñez, R., Santamaría-del-Angel, E., Cajal-Medrano, R. y Barocio-León O. A. (1999). El delta del Río Colorado: Un ecosistema con alta productividad. *Cienc. Mar.* 25: 509-524

Mundo-Ocampo, M., Lamshead, P. J. D., Debenham, N., King, I. W. De Ley, P., Baldwin, J. G., De Ley, I. T. Rocha-Olivares, A., Waumann, D., W. Thomas K, Packer, M y Boucher, G. (2007). "Biodiversity of littoral nematodes from two sites in the Gulf of California" *Hydrobiologia*. 586:179-189

Muthumbi, A. W. y Vincx, M. (1998a). "Chromadoridae (Chromadorida: Nematoda) from the Indian Ocean: Difficulties in morphological identification of *Actinonema* Cobb, 1920 and *Rhyps* Cobb, 1920". *Hydrobiologia* 364: 155–167.

Muthumbi, A. W. y Vincx, M. (1998b). "Chromadoridae (Chromadorida: Nematoda) from the Indian Ocean: Description of new and known species". *Hydrobiologia* 364: 119–153.

Nadler, S. A. (2002). "Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule." *Nematology* 4: 615-625.

Nichols, W. L. (2002). "Ultrastructure of the head of *Okranema eileenae* Greenslade and Nichols, 1991 (Thoracostomopsidae: Nematoda)" *Journal of Nematology*. 34: 50-61.

Nichols, W. L. y Trueman, W. H. (2005). Biodiversity of marine nematodes in Australia sandy beaches from tropical and temperate regions. *Biodiversity and Conservation*. 14: 823-839.

Nichols, W. L. (2007). "A new species of *Trileptium* (Nematoda: Thoracostomopsidae) from a sandy beach in southeastern Australia, with a key of species and observations on geographical distribution". *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 41: 335-344.

Pastor de Ward, C. T. y Lo Russo, V. (2007). "A review of the genus *Richtersia* (Nematoda: Selachinematidae): new species from Golfo San José and Golfo San Matias, Chubut (Argentina)". *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 87: 1153–1160.

Pereira, T. J. (2008). "Evaluación morfológica y molecular de la diversidad de nematodos marinos de vida libre (Enoplida) en las costas de Baja California". Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 118 pp.

Platt, H. M. (1985). "The freeliving marine nematode genus *Sabatiera* (Nematoda: Comesomatidae). Taxonomic revision and pictorial keys". *Zool. J. Linn. Soc.* 83:27-78

Platt, H. M. (1989). "The significance of free-living marine nematodes in the ecosystems" *Zool. J. Linn. Soc.* 96: 261-279.

Platt, H. M. y Warwick, R. M. (1983) "Free-living marine nematodes. Part I. British Enoplids" 28. Cambridge University Press. 307.

Platt, H. M. y Warwick, R. M. (1988). "Free-living Marine Nematodes. Part II. British Chromadorids." 38. Brill: 502.

Ratnasingham, S. y Hebert, P. N. D. (2007) "BOLD: Barcoding of life Data System" *Mol. Ecol. Notes.* 1-10.

Riera, R., Núñez, J. y Brito, M. C. (2006). "Two new species of Comesomatidae Filipjev, 1922 (Nematoda: Chromadorida) from sandy bottoms of Tenerife, Canary Islands". *Zootaxa.* 1126: 53-61.

Rocha-Olivares A, Fleeger, J. W. y Foltz, D. W. (2001). "Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod." *Molecular Biology Evolution* 18: 1088-1102.

Savolainen, V., Cowan, R. S. Vogler, A. P. Roderick, G. K. y Lane, R. (2005). "Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding." *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1805-1811.

Schander, C. y Willassen, E. (2005). "What can biological barcoding do for marine biology?" *Mar. Biol. Res.* 1: 79-83.

Seinhorst, J. W. (1959). "A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin". *Nematologica* 4: 67-69.

Sonnenberg, R., Nolte, A. y Tautz, D. (2007). "An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification". *Frontiers in Zoology.* 4:1-12.

Swofford, D. L. (1998). "PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)." Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24: 1596-1599.

Tchesunov, A. V., Miljutin, D.M. y Evseev A. V. (2000) "Multicellular parasites of protozoans". *Priroda* 3: 6-12.

Tita, G., Vincx, M. y Desrosiers, G. (1999). "Size spectra, body width and morphotypes of intertidal nematodes: an ecological interpretation." *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 6: 1007-1015.

Traunspurger, W. (2000) "The biology and ecology of lotic nematodos" *Freshwater Biology.* 44: 29-45.

Warwick, R. M., Platt, H. M. y Somerfield, P. J. (1998). "Free-living marine nematodes. Part III Monhysterids". The Linnean Society of London and The Estuarine and Coastal Science Association. 296 pp.

Warwick, R. M., Ashman, C. M., Brown, A. R., Clarke, K. R., Hart, B. D., Lewis, R. E., Shillabeer, N., Somerfield, P. J. y Tapp, J. F. (2002). "Inter-annual changes in the biodiversity and community structure of the macrobenthos in Tees Bay and the Tees estuary, UK, associated with local and regional environmental events". *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 234:1-13.

Warwick, R. M., Dashfield, S. L. y Somerfield, P. J. (2006) "The integral structure of a benthic infaunal assemblage" *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 330: 12-18.

Wetzel, M. A, Jensen P. y Giere, O. (1995) "Oxygen/sulfide regime and nematode fauna associated with *Arenicola marina* burrows: new insights in the thiobios case." *Mar. Biol.* 124: 301-312.

Yoder, M., De Ley, I. T., King, I. W., Mundo-Ocampo, M., Mann, J., Blaxter, M., Poiras, L. y De Ley, P. (2006). "Dess: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes." *Nematology* 3: 367-376.

XI. Apéndices

XI. 1. Técnica de Seinhorst para montajes permanentes

1. Los organismos son fijados en formaldehído caliente al 4%.
2. Posteriormente, son fijados durante 48 horas en formaldehído al 4%.
3. Los especímenes son enjuagados en agua destilada para quitar el formaldehído.
4. Poner en la solución I de Seinhorst (etanol + glicerina) en un recipiente cóncavo.
5. Se puede agregar 1 o 2 gotas de picrato de amonio saturado para darle un color amarillo a los especímenes y prevenir la aclaración de los estiletes.
6. Poner los recipientes cóncavos en un desecador e incubar a 35 y 40 C por 12 horas para evaporar el alcohol.
7. Agregar la solución II de Seinhorst II (etanol + glicerina) y mantener en un contenedor parcialmente cerrado (p. ej. una caja petrí) a 40 C.
8. Finalmente transferir a glicerina pura.

Formaldehído al 4%

10 partes de formalina (40% formaldehído)

1 parte ácido glacial acético

89 partes de agua destilada

Solución I Seinhorst

20 partes de etanol al 95%

1 parte de glicerina

79 partes de agua

Solución II Seinhorst

95 partes de etanol al 95%

5 partes glicerina

XI. 2 Técnica de flotación con ludox

1. Se extraen los organismos del sedimento, lavando las muestras en tamices con luz de malla de en un juego de tamices de 1000 y 63 μm . El material retenido en la malla de 1000 μm , en su mayoría detritos, es descartado.
- 2.- Una vez lavadas las muestras (sin detritos ni material fino como arcilla y limo) se procede a 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 en saturar el sedimento residual y la fauna con Ludox TM-50. Con una densidad específica del Ludox TM 1.15 g cm^{-3} , pudiéndose obtener la mayoría de los organismos.
- 3.-Utilizando una piseta con Ludox TM-50 (1.15 g cm^{-3}) se transfiere cada muestra del tamiz de 63 μm a un vaso de precipitados de 300 mL. El vaso es aforado hasta 250 mL con Ludox TM-50, con un agitador de vidrio se resuspende el material.
- 4.- Se deja reposar la suspensión por 50 minutos, posteriormente, se filtra el material resuspendido con un tamiz de 63 μm y se almacena cada muestra en un frasco en solución fijadora (DESS). El proceso de resuspensión es repetido 3 o 4 veces para obtener el mayor número de individuos.