



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

RELACIÓN ENTRE LA DISTANCIA FILOGENÉTICA Y LA
SENSIBILIDAD A TÓXICOS DE CEPAS SELECTAS DEL GÉNERO
LECANE (ROTIFERA: MONOGONONTA) EN EL ESTADO DE
AGUASCALIENTES.

PRESENTA

M. C. SAUCEDO RÍOS SUSANA

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

DR. ROBERTO RICO MARTÍNEZ

DR. ELIZABETH J. WALSH

COMITÉ TUTORAL

DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ

AGUASCALIENTES, AGS. JUNIO DE 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio de la presente, como Comité Tutorial designado de la estudiante Susana Saucedo Ríos con ID 33063 quien realizó *la tesis* titulada: **RELACIÓN ENTRE LA DISTANCIA FILOGENÉTICA Y LA SENSIBILIDAD A TÓXICOS DE CEPAS SELECTAS DEL GÉNERO *Lecane* (ROTIFERA: MONOGONONTA) EN EL ESTADO DE AGUASCALIENTES**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 8 de junio del 2017

Dr. Roberto Rico Martínez
Co-Tutor de tesis

Dra. Elizabeth J. Walsh
Co-Tutora de tesis

Dr. José Francisco Morales Domínguez
Asesor de tesis

c.c.p. - M. en C. Susana Saucedo Ríos
c.c.p. - Dr. Rogelio Salinas Gutiérrez - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p. - Consejero Académico
c.c.p. - Dra. Alma Lillian Guerrero Barrera - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

SUSANA SAUCEDO RIOS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"RELACION ENTRE LA DISTANCIA FILOGENETICA Y LA SENSIBILIDAD A TOXICOS DE CEPAS SELECTAS DEL GENERO *Lecane* (ROTIFERA: MONOGONONTA) EN EL ESTADO DE AGUASCALIENTES"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 12 de junio de 2017

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



Asunto:Editorial Decision for your Article limn160079R2

Fecha:30 Mar 2017 08:11:25 -0400

De:Annales de Limnologie - Int. J. Limnology <em@editorialmanager.com>

Responder a:Annales de Limnologie - Int. J. Limnology <pascal.laffaille@ensat.fr>

Para:Roberto Rico-Martinez <rrico@correo.uaa.mx>

Ref.: Ms. No. limn160079R2

Life table analysis reveals variation in thermal tolerance among three species of the genus *Lecane* (Rotifera: Monogononta)

Annales de Limnologie - International Journal of Limnology

Dear Dr. Rico-Martínez,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Annales de Limnologie - International Journal of Limnology.

It was accepted on 30/03/2017.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below. You will be contacted in due course by our Production Department for proof corrections and copyright issues.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Pascal Laffaille

Editor-in-Chief

Annales de Limnologie - International Journal of Limnology



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AGRADECIMIENTOS

En especial quiero agradecer al Dr. Roberto Rico Martínez por mostrarme este mundo tan maravilloso, gracias por permitirme trabajar y aprender de usted durante varios años. Por sus consejos, paciencia, empatía y apoyo tanto laboral como personal.

A la Dra. Elizabeth J. Walsh por permitirme trabajar con usted, por todas las facilidades que me ofreció durante mi estancia en UTEP, a su familia por permitirme entrar en su hogar y recibirme tan afectuosamente, hicieron que me sintiera como en casa.

Al Dr. Francisco Morales por su asesoría y apoyo.

Al Dr. Gustavo E. Santos Medrano por asesoramiento en campo, en el laboratorio, por ayudarme a procesar los datos y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Marcelo Silva Briano y M. C. Araceli Adabache por las facilidades para tomar las fotografías de microscopia de barrido electrónico.

A la Dra. Ma. Elena Siqueiros por su orientación para obtener las matrices de distancias.

A las personas que me acompañaron a muestrear: Dr. Roberto Rico, Dr. Gustavo E. Santos, Biol. Ruth Saraí, Ing. Gustavo Navarro, M. C. Gerardo Guerrero, Tía Lupita y mi Mamá.

Al equipo de laboratorio de la Dra. Walsh; Elizabeth Preza, Enrique, Lina Hamdan, y en especial a Marcela Rivero, Javier Ordoñez y Sergio Samaniego.

A mis compañeros del laboratorio 60: Anai, Carlos, Nancy, Josafat, Mario, Daniel y Saraí.

En general quiero agradecer a todos los mencionados por el apoyo incondicional y brindarme su amistad, porque sin ustedes este proceso no habría sido tan divertido y productivo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado y la beca mixta para hacer mi estancia en UTEP.

DEDICATORIAS

A mis padres:

No existen palabras que puedan expresar el amor y agradecimiento que siento por ustedes.

Gracias por motivarme a ser una mejor persona, aceptarme y apoyarme.

¡Los amo!



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1. Phylum Rotifera.....	19
1.1.1. Clase Monogononta	20
1.1.1.1. Familia Lecanidae	21
1.2. Tablas de vida.....	22
1.3. Pruebas de toxicidad	22
1.4. Metales pesados	24
1.4.1. Arsénico.....	24
1.4.2. Cadmio:	25
1.4.3. Cinc:.....	25
1.4.4. Cobre:.....	26
1.4.5. Plomo:	26
1.5. Pesticidas:.....	27
1.5.1. Insecticidas	27
1.5.1.1. Organofosforados.....	27
1.5.1.1.1. Paratión metílico	28
1.5.1.1.2. Carbamatos	28
1.5.1.1.2.1. Carbarilo	29
1.5.1.1.3. Piretroides	29
1.5.1.1.3.1. Deltametrina	29
1.5.2. Fungicidas.....	30
1.5.2.1. Vinclozolin	30

1.5.3.	Herbicidas.....	30
1.5.3.1.	Glifosato	30
1.6.	Estudios moleculares.....	31
1.6.1.	Gen mitocondrial citocromo oxidasa I (cox1)	31
1.6.2.	Espaciador transcrito interno (ITS)	32
2.	JUSTIFICACIÓN.....	33
3.	OBJETIVOS.....	34
	Objetivo general.....	34
	Objetivos particulares	34
4.	METODOLOGÍA.....	35
4.1.	Descripción de la población y muestra:.....	35
4.2.	Muestreo y recolección de organismos.....	35
4.3.	Cultivo de rotíferos.....	36
4.4.	Análisis de imagen por microscopio de barrido electrónico.....	36
4.5.	Tablas de vida.....	37
4.6.	Pruebas Toxicológicas	38
4.7.	Biología molecular.....	40
4.7.1.	Limpieza de organismos vivos	40
4.7.2.	Extracción de ADN.....	40
4.7.3.	PCR	41
4.7.4.	Optimización del PCR	42
4.7.5.	Electroforesis en gel de agarosa	43
4.7.6.	Recuperación del ADN del gel de agarosa	43
4.7.7.	Cuantificación.....	43
4.8.	Proceso de secuencias.....	44
4.8.1.	Secuenciación.....	44
4.8.2.	Limpieza de secuencias	44
4.8.3.	Secuencia consenso.....	44
4.8.4.	Corte de los oligonucleótidos	44
4.8.5.	Alineación.....	45

4.8.6.	Búsqueda del modelo evolutivo	45
4.8.7.	Diversidad de haplotipos	45
4.9.	Construcción de hipótesis filogenéticas	45
4.9.1.	Matrices de distancias genéticas	46
4.10.	Análisis de componentes principales.....	46
5.	RESULTADOS	47
5.1.	Muestreo y recolección de organismos.....	47
5.2.	Análisis de morfología por SEM.....	47
5.3.	Tablas de vida.....	55
5.4.	Pruebas de toxicidad agudas	59
5.5.	Concentración Máxima de Toxicidad Aceptable.....	103
5.6.	Análisis filogenético.....	110
5.7.	Análisis de componentes principales.....	115
6.	DISCUSIONES	117
7.	CONCLUSIONES.....	129
8.	GLOSARIO	130
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	132
10.	ANEXO A.....	145
11.	ANEXO B.....	148
12.	ANEXO C.....	150
	Life table analysis reveals variation in thermal tolerance among three species of the Lecane genus (Rotifera: Monogononta).....	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones de la reacción de amplificación	41
Tabla 2: Condiciones de la reacción de amplificación optimizada.	42
Tabla 3: Muestra el nombre, clave de los cultivos y las coordenadas del sitio de recolección.	47
Tabla 4: Porcentaje de eclosión de huevos partenogénicos.	55
Tabla 5: Parámetros de la tabla de vida de los rotíferos <i>L. bulla</i> , <i>L. cornuta</i> y <i>L. papuana</i> . Las abreviaciones corresponden a media de la esperanza de vida (D), media del tiempo generacional (G), tasa reproductiva neta (Ro (h-1)), tasa intrínseca de crecimiento (r (h-1)) y límites de confianza al 95% (L. C. al 95%). Los valores son la media ± el error estándar. N = 24. Los valores de bootstrap se fijaron en 10,000 re-muestréos.....	56
Tabla 6: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R ² , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie <i>L. bulla</i> con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.	59
Tabla 7: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R ² , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie <i>L. cornuta</i> con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.	62
Tabla 8: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R ² , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie <i>L. luna</i> con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.	65
Tabla 9: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R ² , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie <i>L. papuana</i> con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.	68
Tabla 10: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R ² , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie <i>L. quadridentata</i> con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.	71
Tabla 11: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R ² , límites de confianza y coeficiente de variación para las seis cepas de <i>L. quadridentata</i> con plomo.	77
Tabla 12: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R ² , límites de confianza y coeficiente de variación para las ocho clonas de <i>L. quadridentata</i> con plomo.	81
Tabla 13: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R ² , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie <i>L. bulla</i> con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.	85

Tabla 14: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. cornuta* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.88

Tabla 15: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. luna* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.91

Tabla 16: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. papuana* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.94

Tabla 17: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. quadridentata* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.97

Tabla 18: Valores de MATC para los metales pesados con las cinco especies del género *Lecane*.103

Tabla 19: Valores de MATC para plomo con las clonas y cepas de la especie *L. quadridentata*.106

Tabla 20: Valores de MATC para las cinco especies del género *Lecane* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología general: constituida por la corona, el tronco, mástax, pie y dedos. Vista ventral de *Lecane quadridentata*.20

Figura 2: Ciclo de vida de un monogononto típico (modificado de Rico-Martínez *et al*, 2013). El ciclo partenogénico proporciona huevos amícticos que son diploides (2N) y eclosionan en hembras amícticas que producen varias generaciones partenogénicas sin el desarrollo de gametos meióticos. Un estímulo ambiental provoca para las hembras micticas que se desarrollan y comienzan un "ciclo sexual" que contiene huevos haploides micróticos (1N) que incuban machos si no se fertilizan, mientras que los óvulos fertilizados se vuelven latentes (quistes o huevos en reposo) (Dahms *et al*, 2010)21

Figura 3: Morfología externa de *L. bulla*. A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.48

Figura 4: Morfología externa de *L. cornuta*. A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.49

Figura 5: Morfología externa de *L. luna*. A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.50

Figura 6: Morfología externa de *L. papuana*. A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.51

Figura 7: Morfología externa de *L. quadridentata* (cepa 6). A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.52

Figura 8: Morfología externa de *L. quadridentata* (cepa CH). A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.53

Figura 9: Morfología externa de *L. quadridentata* (clona R8). A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.54

Figura 10: Expectativa de vida (ex) de *Lecane cornuta*, *L. bulla* y *L. papuana* a 20, 25 y 30°C.57

Figura 11: Valor reproductivo (Vx) de *Lecane cornuta*, *L. bulla* y *L. papuana* a 20, 25 y 30°C.58

Figura 12: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.60

Figura 13: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....60

Figura 14: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....61

Figura 15: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....61

Figura 16: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....62

Figura 17: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....63

Figura 18: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.63

Figura 19: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.64

Figura 20: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.64

Figura 21: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....65

Figura 22: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....66

Figura 23: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....66

Figura 24: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....67

Figura 25: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....67

Figura 26: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....68

Figura 27: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....69

Figura 28: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....69

Figura 29: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....70

Figura 30: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....70

Figura 31: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....71

Figura 32: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....72

Figura 33: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....72

Figura 34: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....73

Figura 35: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....73

Figura 36: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....74

Figura 37: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con arsénico.74

Figura 38: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con cadmio.....75

Figura 39: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con cobre.....75

Figura 40: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* plomo.76

Figura 41: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con cinc.....76

Figura 42: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq6 de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....77

Figura 43: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq-34 de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....78

Figura 44: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq 10-11 de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....78

Figura 45: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq 10-67 de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....79

Figura 46: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq-CV de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....79

Figura 47: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa LqCh de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....80

Figura 48: Comparación de los valores de CL50 para las cepas de *L. quadridentata* con plomo.80

Figura 49: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R1 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....81

Figura 50: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R5 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....82

Figura 51: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R6 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....82

Figura 52: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R8 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....83

Figura 53: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R9 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....83

Figura 54: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R10 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....84

Figura 55: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R16 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....84

Figura 56: Comparación de los valores de CL50 para las ocho clonas de *L. quadridentata* con plomo.85

Figura 57: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.86

Figura 58: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....86

Figura 59: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.87

Figura 60: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con metil paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....87

Figura 61: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....88

Figura 62: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....89

Figura 63: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....89

Figura 64: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....90

Figura 65: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con metil paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....90

Figura 66: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....91

Figura 67: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....92

Figura 68: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....92

Figura 69: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....93

Figura 70: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con metil paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....93

Figura 71: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....94

Figura 72: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....95

Figura 73: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....95

Figura 74: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....96

Figura 75: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* metil paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....96

Figura 76: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....97

Figura 77: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....98

Figura 78: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....98

Figura 79: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....99

Figura 80: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con metil-paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....99

Figura 81: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.....100

Figura 82: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con carbarilo.100

Figura 83: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con deltametrina. 101

Figura 84: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con glifosato. 101

Figura 85: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con metil paratión. 102

Figura 86: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con vinclozolin. 102

Figura 87: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con arsénico y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra). 104

Figura 88: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con cadmio y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra). 104

Figura 89: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con cobre y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde) y ANZ (Línea negra). 105

Figura 90: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con plomo y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra). 105

Figura 91: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con cinc y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra). 106

Figura 92: Comparación entre los valores MATC para seis cepas y siete clonas de *L. quadridentata* con plomo y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra). 107

Figura 93: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con carbarilo y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja) y EPA (Línea morada). 108

Figura 94: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con deltametrina y la norma de calidad del agua; CAN (Línea roja). 108

Figura 95: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con glifosato y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja) y ANZ (Línea negra).109

Figura 96: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con Metil paratión y las normas de calidad del agua; EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra). 109

Figura 97: Fotografías de PCR con marcadores moleculares COX (A) e ITS (B). 110

Figura 98: Análisis por Inferencia Bayesiana obtenida del análisis de organismos del género *Lecane* con marcadores moleculares COX. Adicional a las muestras del estudio el análisis se completó con secuencias obtenidas del GeneBank. 111

Figura 99: Análisis por Inferencia Bayesiana obtenida del análisis de organismos del género *Lecane* con marcadores moleculares ITS. 112

Figura 100: Análisis de Maximum Likelihood con organismos del género *Lecane* con marcadores moleculares COX. Adicional a las muestras del estudio el análisis se completó con secuencias obtenidas del GeneBank. 113

Figura 101: Análisis de Maximum Likelihood con organismos del género *Lecane* con marcadores moleculares ITS..... 114

Figura 102: Análisis de componentes principales entre la relación filogenética con *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* y su sensibilidad aguda con arsénico, cadmio, carbarilo, cinc, cobre, deltametrina, glifosato, paratión metílico, plomo y vinclozolin. 115

Figura 103: Análisis de componentes principales entre la relación filogenética con seis cepas y ocho clonas de la especie *L. quadridentata* y su sensibilidad aguda al plomo..... 116

RESUMEN

Se analizó la relación entre la distancia filogenética y la sensibilidad a tóxicos de cinco especies de rotíferos dulceacuícolas de líneas monoclonales: *Lecane bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata*. Se realizaron pruebas de toxicidad aguda evaluando su sensibilidad para cinco metales pesados (arsénico, cadmio, cinc, cobre y plomo) y cinco pesticidas (carbarilo, deltametrina, glifosato, metil paratión y vinclozolin). Al comparar los valores de CL50 de los metales para cada especie se observó el siguiente arreglo: *L. bulla* (Cd = Cu > Pb > Zn > As), *L. cornuta* (Cu > Pb > Cd > Zn > As), *L. luna* (Cd > Cu > Zn > Pb > As), *L. papuana* (Pb > Cu > Cd > Zn > As) y *L. quadridentata* (Cu > Pb > Cd > Zn > As). En el caso de los pesticidas: *L. bulla* (deltametrina > carbarilo > metil-paratión > vinclozolin > glifosato), *L. cornuta* (deltametrina > carbarilo > metil-paratión > glifosato > vinclozolin), *L. luna* (deltametrina > carbarilo > metil-paratión > vinclozolin > glifosato), *L. papuana* (deltametrina > carbarilo > metil-paratión > vinclozolin > glifosato) y *L. quadridentata* (carbarilo > metil-paratión > deltametrina > vinclozolin > glifosato). El orden de toxicidad de los metales pesados para el género fue: cobre > plomo > cadmio > cinc > arsénico, y para los pesticidas: deltametrina > carbarilo > metil-paratión > vinclozolin > glifosato. Además se realizaron pruebas agudas con plomo para seis cepas y ocho clonas de la especie *L. quadridentata*, esto con la finalidad de evaluar no solo la sensibilidad interespecifica, sino también la intraespecifica. Para analizar la relación entre la sensibilidad a tóxicos y la distancia genética se realizó un análisis filogenético con los marcadores moleculares COX e ITS. Los resultados muestran que existe relación entre la distancia genética y la sensibilidad a los tóxicos, esta relación se aprecia mejor en los ensayos entre especies, clonas y cepas intoxicadas con plomo. Sin embargo se sugiere realizar estudios con un mayor número de especies del género *Lecane* para comprender los rasgos demográficos y los usos potenciales de un género tan prolífico.

ABSTRACT

We analyze the relationship between the phylogenetic distance and the sensitivity to toxicants of five species of freshwater rotifers of monoclonal lines: *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* and *L. quadridentata*. Acute toxicity tests were performed evaluating their sensitivity to five metals (arsenic, cadmium, copper, lead and zinc) and five pesticides (carbaryl, deltamethrin, glyphosate, methyl parathion and vinclozolin). We compared the LC50 values of metals for each species, the following ranking was observed *L. bulla* (Cd = Cu > Pb > Zn > As), *L. cornuta* (Cu > Pb > Cd > Zn > As), *L. luna* (Cd > Cu > Zn > Pb > As), *L. papuana* (Pb > Cu > Cd > Zn > As) and *L. quadridentata* (Cu > Pb > Cd > Zn > As). In the case of pesticides: *L. bulla* (deltamethrin > carbaryl > methyl parathion > vinclozolin > glyphosate), *L. cornuta* (deltamethrin > carbaryl > methyl parathion > glyphosate > vinclozolin), *L. luna* (deltamethrin > carbaryl > methyl -parathion > vinclozolin > glyphosate), *L. papuana* (deltamethrin > carbaryl > methyl parathion > vinclozolin > glyphosate) and *L. quadridentata* (carbaryl > methyl parathion > deltamethrin > vinclozolin > glyphosate). The order of toxicity for the genus was: copper > lead > cadmium > zinc > arsenic, and for the pesticides: deltamethrin > carbaryl > methyl-parathion > vinclozolin > glyphosate. In addition, acute toxicity tests with Pb were performed for six strains and eight clones of *L. quadridentata* species, to evaluate not only interspecific but also intraspecific sensitivity. To analyze the relationship between sensitivity to toxic and genetic distance, a phylogenetic analysis was performed with the molecular markers COX and ITS. The results show that there is a relationship between genetic distance and sensitivity to toxicants, this relationship is best seen in the trials between species, clones and strains intoxicated with lead. However, further studies with a greater number of species of the genus *Lecane* are necessary to understand the demographic features and the potential uses of such a prolific genus.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento acelerado de la población mundial y las actividades generadas para cubrir sus necesidades, han traído consigo un incremento de contaminantes que representan una amenaza para la diversidad biológica; si bien algunos de estos contaminantes como metales pesados y pesticidas no se vierten directamente a cuerpos de agua, llegan a ellos de manera indirecta por acción del viento, escorrentía de agua o precipitación pluvial (Solano, 2005) Esto trae consigo problemas en la composición del zooplancton y la estructura de la comunidad acuática, ya que pueden alterarse como resultado de su alta susceptibilidad a dichos tóxicos (Hanazato, 2000). Esto puede tener repercusiones para los niveles tróficos superiores (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001).

Las pruebas de toxicidad son una herramienta importante para evaluar los riesgos potenciales por exposición a tóxicos, en estas pruebas el organismo es sometido al tóxico en su medio, generando una concentración de prueba. Donde la cantidad del xenobiótico que ingresa en el organismo no es cuantificable, y solo es posible cuantificar la concentración del medio expuesto (Rand y Petrocelli, 1985).

Los rotíferos han sido preferidos sobre otras especies acuáticas para desarrollar estas pruebas (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001). Debido a que estos organismos tienen características que favorecen su uso como modelos de prueba para estudios ecotoxicológicos como: facilidad de cultivo, crecimiento exponencial, tamaño pequeño, sensibilidad, y huevos partenogénéticos que nacen fácilmente (Rico-Martínez *et al.*, 2013).

Además de su uso como biomarcadores sus características los han convertido en un modelo útil para estudios en ecología acuática, especiación, evolución ecológica, evolución del sexo, estudios de poblaciones y ecotoxicología (Dahms *et al.*, 2010). México contiene aproximadamente 303 especies de rotíferos reconocidas para el país (Llorente-Bousquet y Ocegueda, 2008) con posibilidad de ser estudiados a nivel molecular. Al aumentar la información genética, junto con el desarrollo de la bioinformática y de las herramientas analíticas se puede profundizar en el estudio de la biología evolutiva de los organismos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cuanta más disposición de información genética exista, se podría mejorar en gran medida el conjunto de herramientas moleculares de los rotíferos (Montero-Pau y África-Gómez, 2011). Diversos análisis moleculares con rotíferos han demostrado que los taxones estudiados están compuestos de complejos de especies crípticas, lo cual destaca que la diversidad en rotíferos posiblemente esté subestimada (Fontaneto *et al.*, 2009; Gilbert y Walsh, 2005; Schröder y Walsh, 2007; Walsh *et al.*, 2009). Esto es de relevancia en toxicología debido a que pueden existir diferencias importantes en la sensibilidad a tóxicos incluso entre los individuos dentro de una población homogénea. Estas diferencias se deben a la variación biológica, la cual se supone es pequeña para los organismos de la misma especie, edad y salud (Rand y Petrocelli, 1985).

1.1. Phylum Rotifera

Los rotíferos son un grupo de invertebrados microscópicos, acuáticos o semi-acuáticos, no segmentados, con simetría bilateral, pseudocelomados (Wallace *et al.*, 2006), compuesto por 2030 especies (Segers, 2007). La mayoría libres nadadores o reptantes y algunos sésiles, coloniales o solitarios. La mayor parte de las especies son partenogenéticas, la presencia de los machos es ocasional, y son más pequeños que las hembras (Pagaza *et al.*, 2001).

La estructura morfológica de los rotíferos está constituida por la corona, el tronco y pie (Wallace y Snell, 2010) (Figura 1). En general los rotíferos poseen tres estructuras distintivas. En la parte apical se ubica una región ciliada llamada corona, esta es usada en la locomoción y para capturar el alimento. La segunda característica se encuentra en el tronco y es una faringe muscular llamada mastax, esta posee un complejo set de quijadas llamado trofos (Wallace *et al.*, 2006). En la parte posterior del animal se encuentra una estructura llamada pie, éste suele contener glándulas adhesivas y posee en la parte inferior unos dedos (Wallace y Snell, 2010). La tercera estructura es la lorica (pared corporal o tegumento), suele ser transparente y está conformado por una capa de proteínas filamentosas (Wallace *et al.*, 2006). El filo se divide en tres clases: Seisonidea, Bdelloidea y Monogononta (Wallace y Snell, 2010).

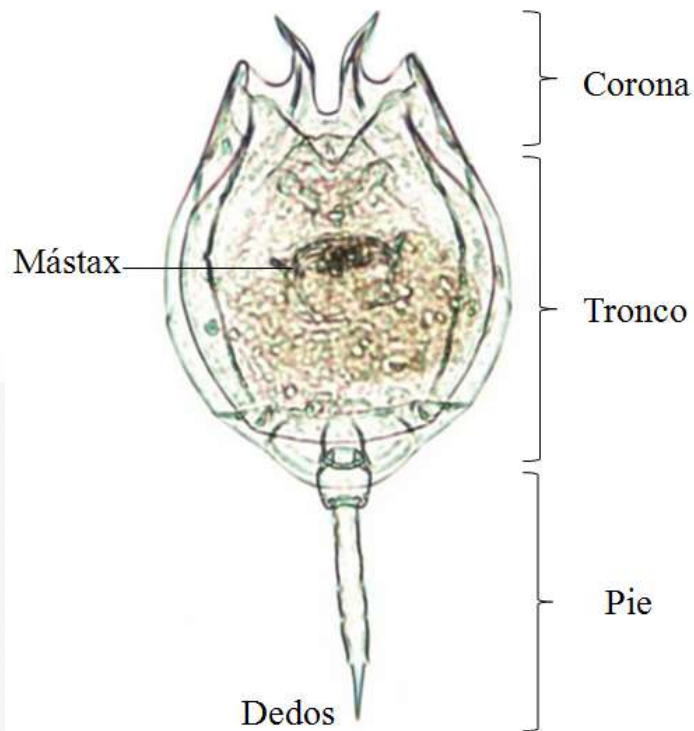


Figura 1: Morfología general: constituida por la corona, el tronco, mástax, pie y dedos. Vista ventral de *Lecane quadridentata*.

1.1.1. Clase Monogononta

La clase Monogononta es la más grande del Phylum Rotífera, compuesta por más de 1570 especies (Segers, 2007). Los monogonontos pueden ser bentónicos, de natación libre, y sésiles. Son micrófagos o depredadores, algunos son parásitos (Wallace y Snell, 2010). Partenogénéticos, la reproducción asexual es prevalente, bajo ciertas circunstancias ocurre la reproducción sexual, los machos son efímeros, con estructura reducida (Figura 2). La morfología puede variar a consecuencia de su plasticidad fenotípica, esto se puede relacionar con cambios en las características físicas, químicas o biológicas del medio ambiente (Segers, 2004).

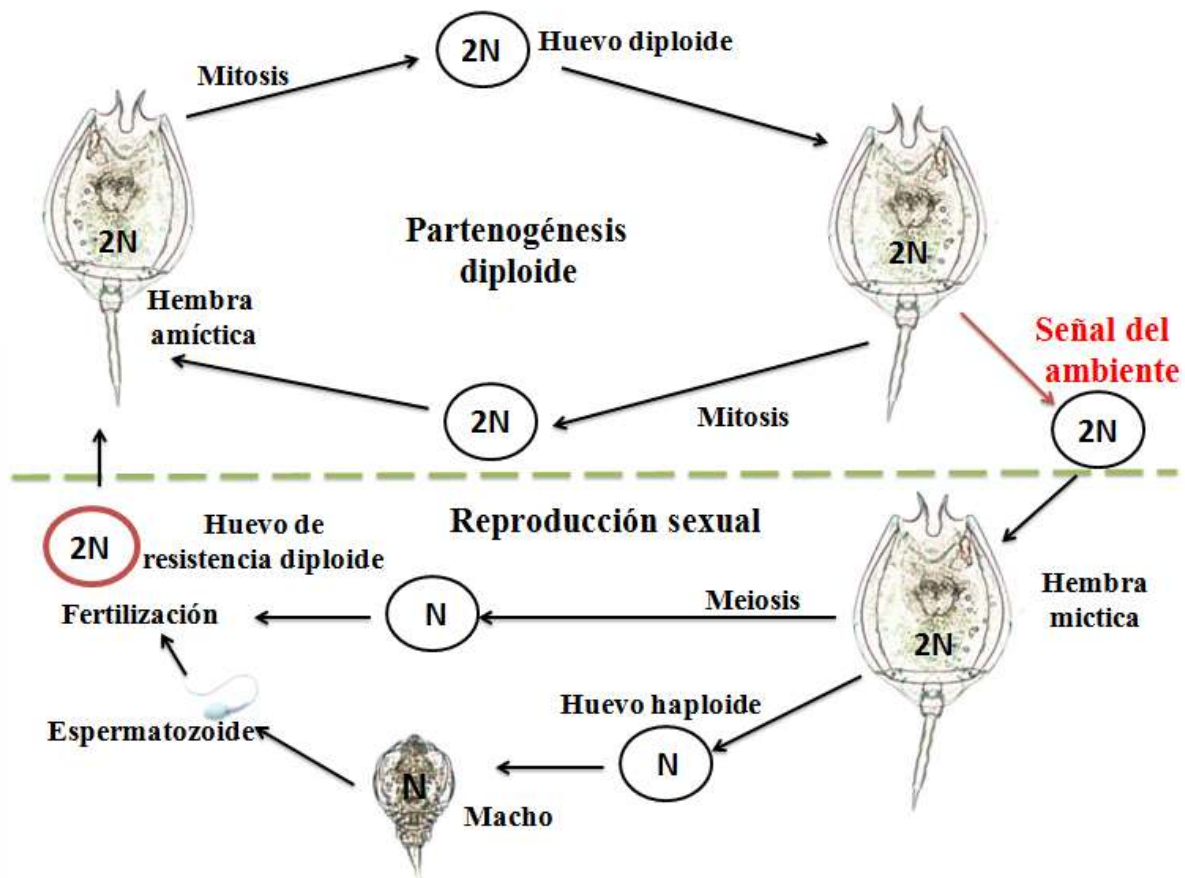


Figura 2: Ciclo de vida de un monogononto típico (modificado de Rico-Martínez *et al*, 2013). El ciclo partenogénico proporciona huevos amícticos que son diploides (2N) y eclosionan en hembras amícticas que producen varias generaciones partenogénicas sin el desarrollo de gametos meióticos. Un estímulo ambiental provoca para las hembras míticas que se desarrollan y comienzan un "ciclo sexual" que contiene huevos haploides micróticos (1N) que incuban machos si no se fertilizan, mientras que los óvulos fertilizados se vuelven latentes (quistes o huevos en reposo) (Dahms *et al*, 2010) .

1.1.1.1. Familia Lecanidae

Se compone por un solo género, *Lecane*, siendo este uno de los más ricos en especies del Phylum Rotífera. Son un grupo cosmopolita de rotíferos dulceacuícolas y marinos, de nado libre desplazándose a cortas distancias (Segers, 1995). El género abunda en aguas de las regiones subtropicales y tropicales, sobre todo en el litoral (Segers, 1994) y en la zona de bentos.

1.2. Tablas de vida

Las tablas de vida proporcionan información sobre las estrategias en la historia de vida basadas en observaciones de reproducción y mortalidad de individuos de una población dada (Krebs, 1985). A partir de estas observaciones, se pueden calcular las estadísticas vitales de la población, tales como la tasa intrínseca de crecimiento, la tasa reproductiva neta (R_0), la duración de vida, el tiempo de generación, el valor reproductivo y la distribución estable de edades (Wallace y Snell, 2010).

Los experimentos de tablas de vida y estudios ecológicos en rotíferos han demostrado que la mayoría de las especies investigadas hasta ahora son estrategias "r", es decir que tienen habilidades para ocupar nuevos nichos (Wallace *et al.*, 2006). Sin embargo el crecimiento de las poblaciones es dependiente de algunos factores externos, uno de los más importantes es la temperatura, esta controla la natalidad y la tasa de crecimiento en varias especies de rotíferos (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 1998). En este trabajo se analizó el efecto de la temperatura en tres especies del género *Lecane*.

El género *Lecane* ha sido poco estudiado, siendo uno de los géneros de rotíferos más ricos con respecto a la diversidad (Segers, 1995), sólo se han realizado estudios de tablas de vida en seis especies: *L. inermis* (Miller, 1931), *L. cornuta* (Pray, 1965), *L. tenuiseta* (Hummon y Bevelhimer, 1980), *L. luna* y *L. quadridentata* (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 1998) y *L. furcata* (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2000).

1.3. Pruebas de toxicidad

Este tipo de pruebas se utiliza para detectar y evaluar los efectos toxicológicos potenciales de los químicos sobre los organismos acuáticos. Estos efectos no siempre son perjudiciales, una función de las pruebas es identificar los químicos que pueden tener efectos adversos en los organismos, así se pueden evaluar los riesgos asociados con las situaciones donde el agente químico, el organismo y las condiciones de exposición están definidas (Rand y Petrocelli, 1985).

Un tipo de pruebas de toxicidad son las agudas, estas, evalúan la toxicidad de un químico para organismos acuáticos en un tiempo de exposición corto con diferentes concentraciones del toxico a evaluar. Estas pruebas evalúan la mortalidad, y son tiempo dependientes, se estima la CL50 (Concentración Letal Media) a 24, 48 o 96 horas (Rand y Petrocelli, 1985). La CL50 permite comparar la sensibilidad entre los organismo de prueba, sea de la misma especie o no, sin embargo este valor no debe de ser asumido como una constante, pues se sabe que cepas de la misma especie pueden presentar diferencias en sensibilidad a un mismo tóxico (Domínguez-Cortinas *et al.*, 2008), ya que las sustancias no reaccionan de igual manera en todos los organismos, por lo que cada especie tiene sus límites de tolerancia, dependiendo de su fisiología, condiciones ambientales y nicho ecológico que habitan (Mejía-Muñoz *et al.*, 2001). Cuando se implementan pruebas de toxicidad, se debe realizar la estandarización de las mismas, en la cual se establece la sensibilidad de las especies y su secuencia de efecto frente a un tóxico de referencia, según las repeticiones del experimento. Con esto se certifica que la respuesta de la población en estudio se debe al efecto del tóxico de referencia y no a variaciones de sensibilidad de los organismos o a fallas operacionales en la aplicación del método (Bustos *et al.*, 2004).

Las pruebas de toxicidad permiten la construcción de bases de datos para la comparación de la sensibilidad de las especies a los contaminantes o de la toxicidad de un grupo de compuestos en una especie en particular. Además pueden ser utilizadas para determinar índices de calidad ambiental, evaluar la biodisponibilidad de contaminantes, para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes en casos de litigio ambiental (Ramírez y Mendoza, 2008).

Los rotíferos han sido preferidos sobre otras especies acuáticas para desarrollar estas pruebas (Perez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001). La mayor parte de estas pruebas se han realizado en organismos del género *Brachionus* (Rico-Martínez *et al.*, 2013), sin embargo el género *Lecane* es un excelente candidato para las pruebas de toxicología debido a su capacidad para estar tanto en comunidades planctónicas como bentónicas (Perez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001).

1.4. Metales pesados

Los metales pesados son elementos de origen natural que tienen un peso atómico alto y una densidad de al menos 5 veces mayor que el agua. Dentro de esta clasificación también se incluyen metaloides, tales como arsénico, que son capaces de inducir toxicidad a un nivel bajo de exposición (Tchounwou *et al.*, 2012). Naturalmente los metales pesados se encuentran distribuidos en la corteza terrestre. Sin embargo, las actividades antropogénicas han aumentado su concentración en el ambiente, esto tiene relevancia toxicológica por la exposición de los seres vivos (Jaramillo *et al.*, 2009). La toxicidad de los metales pesados para los organismos acuáticos están influidos no sólo por su concentración; también son relevantes el tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente (Castañe *et al.*, 2003).

1.4.1. Arsénico

El arsénico es un metaloide que se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre (Melo, 2007), sin embargo las actividades antropogénicas son una fuente importante de su incremento en la atmosfera en formas más tóxicas (Rangel-Montoya *et al.*, 2015). Las principales fuentes artificiales de arsénico incluyen la combustión de carbón, metales no ferrosos, la fundición y la quema de desechos agrícolas, además los compuestos de arsénico han sido utilizados como herbicidas, fungicidas, conservantes de la madera, desecantes y colorantes (Graeme y Pollack, 1998).

Aun cuando es posible que cantidades muy pequeñas de algunos compuestos de arsénico tengan un efecto benéfico, en especial los compuestos inorgánicos, se consideran venenos muy potentes (Nordberg, 2012). Las principales formas inorgánicas de arsénico incluyen el arsenito trivalente y el arseniato pentavalente. El arsenito es de 2 a 10 veces más tóxico que el arseniato. Al unirse a grupos tiol o sulfhidrilo en proteínas, el As (III) puede inactivar más de 200 enzimas, este mecanismo probablemente es el responsable de los efectos generalizados de arsénico en diferentes órganos y sistemas (Tchounwou *et al.*, 2012).

1.4.2. Cadmio:

El cadmio se produce en la corteza terrestre en una concentración de 0.1 a 0.5 ppm y se asocia comúnmente con los minerales de cinc, plomo y cobre. También es un componente natural de agua oceánica; en el ambiente, existe en un solo estado de oxidación (+2), y no se somete a reacciones de oxidación-reducción; en las aguas superficiales y subterráneas, el cadmio puede existir como el ion hidratado o como complejos iónicos con otras sustancias inorgánicas u orgánicas; las formas solubles de cadmio pueden migrar en el agua; las formas insolubles de cadmio se asientan y se absorben en los sedimentos (ATSDR, 2012).

Las diversas aplicaciones del cadmio en la galvanoplastia, la galvanostegia y la galvanización, así como su uso en plásticos, pigmentos, baterías de níquel y cadmio, fertilizantes y a otras características químicas provechosas han aumentando su presencia en la atmosfera (Pérez-García y Azcona-Cruz 2012).

El principal efecto del metal en el metabolismo celular lo realiza actuando como antagónico del cobre, hierro, calcio y cinc (Melo, 2007), interfiriendo en los procesos dependientes de estos elementos. Además inhibe los procesos de reparación del ADN (Finol *et al*, 2008). La mayor parte del cadmio que entra al organismo se une a metalotioneínas, evitando que los iones del cadmio ejerzan su efecto toxico (Nordberg, 2012).

1.4.3. Cinc:

El cinc se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y constituye aproximadamente un 0.02 % de la corteza terrestre; este elemento es un nutriente esencial, es un componente de las metaloenzimas que participan en el metabolismo de los ácidos nucleicos, en la síntesis de las proteínas (ATSDR, 2005), así como el crecimiento, la división y la función de las células. Por otra parte produce efectos tóxicos cuando se encuentra en elevadas concentraciones, como problemas sistémicos del cinc y la regulación de muerte a nivel celular (Plum *et al*, 2010).

1.4.4. Cobre:

Es un metal rojizo que ocurre naturalmente en las rocas, el agua, los sedimentos y, en niveles bajos, el aire; en bajas concentraciones en la dieta es un elemento esencial para todos los organismos (ATSDR, 2004); ya que el Cobre es un cofactor esencial en una serie de enzimas críticas en el metabolismo, incluyendo Superóxido dismutasa 1, citocromo c oxidasa (COX), lisil oxidasa y ceruloplasmina (CP) (Arredondo y Núñez, 2005). Sin embargo a una concentración elevada pueden ocurrir efectos tóxicos (Nordberg, 2012).

1.4.5. Plomo:

Es metal pesado, de color gris azulado que se produce de forma natural en la corteza terrestre pero, rara vez se encuentra en forma natural como un metal; cada vez es más común encontrarlo en el medio ambiente ya que, los niveles han aumentado más de 1,000 veces en los últimos tres siglos, como resultado de la actividad humana (ATSDR, 2007).

Las principales dianas del plomo son una serie de sistemas enzimáticos con grupos tiol, sobre todo dependientes de cinc; otros sistemas enzimáticos afectados se relacionan con alteraciones en la integridad de las membranas celulares (Ferrer, 2003). Además la similitud química del plomo con el calcio, le permite interferir con diversas vías metabólicas en la mitocondria y en sistemas de segundos mensajeros que regulan el metabolismo energético, así como en los canales de Ca dependientes de voltaje, que intervienen en la neurotransmisión sináptica, a los que inhibe, y en las proteín-cinasas dependientes de calcio, que activa (Jaramillo *et al*, 2009).

El metabolismo del plomo inorgánico consiste en la formación de complejos con una variedad de ligandos proteicos y no-proteicos; los principales ligandos extracelulares incluyen albúmina y sulfhidrilos no proteicos. El plomo también forma complejos con las proteínas en el núcleo de la célula y el citosol (ATSDR, 2007).

1.5. Pesticidas:

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) los plaguicidas son compuestos químicos que se utilizan para matar plagas, incluyendo insectos, roedores, hongos y plantas no deseadas. Debido a esto los pesticidas se han convertido en una de las herramientas más poderosas para asegurar la provisión de alimentos y proteger contra el amplio mosaico de las plagas que atacan a los cultivos. (Rathore y Nollet, 2012). A pesar de los beneficios que ofrecen, su uso inadecuado ha generado serios problemas ambientales como: contaminación del suelo y agua (superficial y subterránea), muerte de fauna benéfica y proliferación de plagas resistentes, contaminación de los alimentos, además de daños a la salud a corto y largo plazo (Jaramillo et al., 2009). La exposición a pesticidas puede ocurrir directamente o indirectamente. La exposición directa es por aplicación deliberada para el control de las malas hierbas y plagas o vectores de los organismos patógenos. La exposición indirecta es el resultado de la escorrentía o por deposición por pulverización (Rathore y Nollet, 2012). Otro conflicto de la exposición a los plaguicidas que contaminan el ambiente es la bioacumulación debido a algunas de sus propiedades como: estabilidad, liposolubilidad y persistencia (Jaramillo *et al.*, 2009).

Los pesticidas se pueden clasificar de diferentes formas según sus características de acuerdo con la OMS (2010), entre ellas incluyen el tipo químico y uso principal, en la mayoría de los casos se da un solo uso. Esto es únicamente para fines de identificación y no excluye otros usos.

1.5.1. Insecticidas

1.5.1.1. Organofosforados

Este grupo de insecticidas tienen un amplio espectro de uso. Químicamente son ésteres del ácido fosfórico y sus homólogos (fosfónico, tiosfórico, ditiofosfórico). Estos ésteres fosforados, como cualquier éster se hidrolizan, biodegradándose y desapareciendo rápidamente del ecosistema (Córdoba, 2002), por lo que sus efectos sobre él se observan fundamentalmente a corto plazo (Badii, 2008).

Todos los organofosforados comparten un mecanismo común de inhibición de las enzimas colinesterasas. Tienen la capacidad de envenenar a un amplio grupo de animales no blanco, principalmente por la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas. La enzima es imprescindible para el control normal de la transmisión de los impulsos nerviosos que van desde las fibras nerviosas hasta las células musculares y glandulares (Routt y Roberts, 1999).

1.5.1.1.1. Paratión metílico

La Organización Mundial de la Salud clasifica a el paratión metílico en el grupo de los organofosforados como un grupo extremadamente peligroso, mientras que la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) lo coloca en la primera categoría toxicológica, como extremadamente tóxico (Torres-Guzman *et al.*, 2002).

La toxicidad primaria causada por la exposición al paratión metílico está relacionada con la capacidad del metabolito oxon de unirse a la acetilcolinesterasa (AChE) y prevenir la hidrólisis de la acetilcolina (ACh); Los niveles excesivos de ACh conducen, por consiguiente, a una sobreestimulación del sistema colinérgico inhibiendo la AChE (García, 2003).

1.5.1.2. Carbamatos

Están representados por una amplia variedad de estructuras químicas que tienen diferentes propiedades químicas y físicas. La toxicidad de estos materiales está determinada por una serie de factores que pueden afectar a medida que son absorbidos y trasladados al sitio de destino, llevando a un envenenamiento (Fukuto, 1990). Esto debido a que tienen la capacidad de inhibir las enzimas colinesterásicas, causando carbamilación reversible de la enzima acetilcolinesterasa, lo que permite la acumulación de acetilcolina, la substancia neuromediadora en las uniones neuromotoras parasimpáticas (Routt y Roberts, 1999).

1.5.1.2.1. Carbarilo

El carbarilo es un inhibidor de la colinesterasa, y suele causar síntomas agudos. También puede causar efectos mutagénicos en seres humanos. Al igual que otros insecticidas, el carbarilo impacta negativamente varios organismos no diana, representa una amenaza para las poblaciones de organismos acuáticos e insectos beneficiosos como las abejas. Inhibe la enzima colinesterasa, inhibiendo el sistema nervioso del huésped (Gilbert, 2010).

1.5.1.3. Piretroides

Los piretroides son es una mezcla de sustancias químicas que ocurre naturalmente en ciertas flores de crisantemos. En el extracto de piretro hay seis sustancias químicas individuales llamadas piretrinas que poseen propiedades de insecticida. Debido a que muchos de estos compuestos son extremadamente tóxicos para los peces, generalmente no se rocían directamente sobre el agua, sin embargo, pueden entrar a los lagos, lagunas, ríos y arroyos a través de la lluvia o de agua de escorrentía proveniente de terrenos agrícolas (ATSDR, 2003).

1.5.1.3.1. Deltametrina

La deltametrina es un pesticida piretroide sintético altamente tóxico, ampliamente utilizado en la agricultura (Viran *et al*, 2003). Se está utilizando como sustituto de organoclorados y organofosforados en los programas de control de plagas debido a su baja persistencia y toxicidad ambiental. Sin embargo las consecuencias ecotoxicológicas de la deltametrina, en particular sus efectos sobre organismos acuáticos, no se conocen bien (Sayeed *et al*, 2003).

Su principal modo de acción molecular es la modificación de la cinética del canal de sodio que conduce a la hiperexcitación del sistema nervioso (Decourtye, 2004).

1.5.2. Fungicidas

1.5.2.1. Vinclozolin

El vinclozolin es un Fungicida utilizado en infecciones en vegetales. Los principales efectos tóxicos inducidos por el vinclozolin y/ o sus metabolitos se relacionan a su actividad anti-androgénica. Los estudios demuestran que por lo menos dos metabolitos de este fungicida son responsables de esta actividad (EPA, 2000). Este disruptor endócrino durante la determinación del sexo gonadal promueve enfermedades trasgeneracionales que aparecen en la etapa adulta como la infertilidad masculina, alteraciones inmunes y el desarrollo de tumores (Guerrero y Bosagna, 2010). Aunque la producción de esteroides en el desarrollo de las gónadas fetales es insignificante, los receptores de andrógenos y estrógenos parecen estar expresados en células germinales, células de Sertoli y células peritubulares precursoras en el embrión, de manera que la gónada fetal puede responder a los disruptores endocrinos.

1.5.3. Herbicidas

1.5.3.1. Glifosato

El glifosato es un ácido orgánico débil cuya molécula está formada por una fracción de glicina y otra de fosfometil (N- fosfometilglicina), es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, utilizado para eliminar malezas indeseables (Monroy *et al*, 2005). La aplicación de este herbicida produce la inhibición de aminoácidos aromáticos en la planta por inactivación de la enzima 5-enolpiruvilchiquimato- 3-fosfato-sintasa, además inhibe la delta-aminolevulinato sintetasa. (ALAS), una de las enzimas de la vía biosintética del grupo hemo. Cabe destacar que las algas, plantas y animales comparten los primeros siete pasos de esta vía, relacionados con la síntesis de hemoproteínas y clorofilas (Vera *et al*, 2012).

Al ser herbicida no comparte los mismos mecanismos de toxicidad con los seres humanos y otros animales, por lo tanto es considerado como de bajo riesgo. Sin embargo, puede

alterar algunos procesos celulares en organismos no diana (Monroy *et al*, 2005). Una particularidad importante es que este herbicida es soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos y no tiene volatilización significativa (Burguer y Fernandez, 2004). Siendo esta una característica importante en cuanto a la toxicidad de los organismos acuáticos, su uso afecta la calidad del agua y a organismos no diana, modificando con esto la estructura y funcionalidad de ecosistemas acuáticos. Estas afecciones incluyen retardo en el crecimiento de organismos como algas y peces. Esto se debido a las alteraciones de parámetros enzimáticos como acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, carboxilesterasa y glutatión S-transferasa (Salazar y Aldana, 2012).

1.6. Estudios moleculares

Las filogenias moleculares comenzaron a convertirse en una herramienta útil para entender la evolución y la diversidad de la vida (Fontaneto, 2014). Gran parte de los análisis genéticos en rotíferos se han restringido a unos pocos genes y a algunos otros marcadores genéticos. Dentro del Phylum Rotífera se han llevado a cabo utilizando los genes mitocondriales citocromo oxidasa I (COX1), la subunidad ribosómica grande (16S) y el espaciador nuclear transcrito interno 1 (ITS1) (Montero-Pau y Gómez, 2011).

1.6.1. Gen mitocondrial citocromo oxidasa I (cox1)

Folmer y colaboradores (2009) le apodaron marcadores de ADN "universales" para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un fragmento de 710 pb del gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa mitocondrial. Este cebador es una molécula circular covalentemente cerrada, de tamaño pequeño, conformada por un total de 37 genes (13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia) (Vázquez, 2007).

La subunidad de citocromo oxidasa I, codifica al gen mitocondrial cox1, esta es la subunidad mayor del complejo citocromo oxidasa y es una parte integral del núcleo catalítico de la enzima (Manthey y McEwen, 1995). Esta secuencia se ha utilizado para

discriminar entre especies dentro de muchos taxones, incluso es una herramienta útil para identificar sin describir invertebrados, identificar especies crípticas y se puede utilizar para resolver controversias taxonómicas (García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013).

Para que una región sea práctica como código de barras de ADN debe cumplir con tres criterios: contener la variabilidad genética significativa a nivel de especies y divergencia, poseer sitios conservados para el desarrollo de oligonucleótidos universales, y tener una longitud de secuencia corta a fin de facilitar las capacidades de extracción de ADN y amplificación (Kress y Erickson, 2008).

En rotíferos se han utilizado estos códigos de barras para encontrar especies crípticas, Walsh y colaboradores (2009) sugieren que *L. bulla* es un complejo de especies crípticas, que se producen en simpatria en hábitats acuáticos en el desierto de Chihuahua. Por su parte García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013) reportan la presencia de posibles especies crípticas en *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. curvicornis*, *L. crepida*, *L. lunaris* y *L. hastata*.

1.6.2. Espaciador transcrito interno (ITS)

El ADN ribosómico se caracteriza por tener múltiples copias de regiones altamente conservadas repetidas en tándem que codifican ARN ribosómico, estas se ven interrumpidas por regiones "intergénicas" no transcritas variables y regiones espaciadoras transcritas externas e internas menos variables (Gandolfi *et al.*, 2001).

Los espaciadores transcrito interno 4 y 5 son oligonucleótidos que hacen uso de las regiones conservadas de los genes 18S, 5.8S y 28S del rRNA para amplificar las regiones no codificantes entre ellos (White *et al.*, 1990). Otra característica común de la región ITS es la mutación por inserciones y deleciones, dando lugar a secuencias de longitud desigual entre taxones relacionados (Liston *et al.*, 1999), incluso variando entre las diferentes especies dentro de un género (Ahmed *et al.*, 1999).

2. JUSTIFICACIÓN

Las pruebas de toxicidad acuática son necesarias para evaluar los riesgos potenciales producidos por el estrés en ecosistemas acuáticos. El uso de rotíferos en las pruebas de toxicidad ha tenido auge debido a su relevancia ecológica, características biológicas y facilidad de manejo (Janssen *et al*, 1993). Estas pruebas son necesarias para evaluar los riesgos potenciales producidos por el estrés en ecosistemas acuáticos. (Snell y Janssen, 1998).

A pesar de los trabajos realizados analizando la susceptibilidad de estos organismos a diferentes tóxicos, Rico-Martínez y colaboradores (2016) proponen realizar nuevos estudios con rotíferos pertenecientes a diferentes hábitats, climas y nichos. Así como la obtención de cultivos clonales, identificación de rotíferos y clasificación a través de caracteres morfológicos y genéticos.

En el presente trabajo se plantea el uso de dos marcadores moleculares uno mitocondrial (COX1) y otro nuclear (ITS) como una herramienta para establecer las relaciones filogenéticas intra e interespecíficas del género *Lecane*, relacionándolas con la sensibilidad de este género a diez tóxicos (cinco metales y cinco pesticidas). Se proponen como modelos biológicos las especies *L. bulla* (Gosse, 1851), *L. cornuta* (Müller, 1786), *L. luna* (Müller, 1776), *L. papuana* (Murray, 1913) y *L. quadridentata* (Ehrenbenrg, 1832).

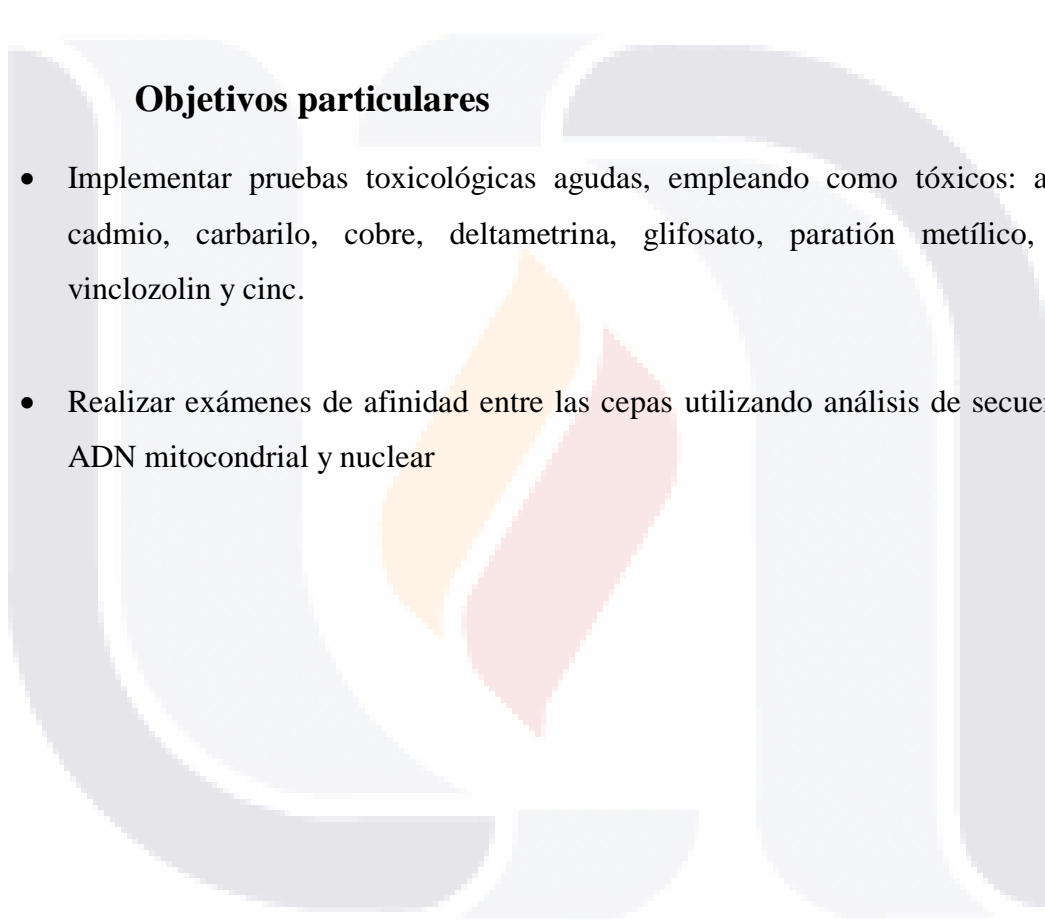
3. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la relación entre la distancia filogenética y la sensibilidad a 10 tóxicos en cepas selectas del género *Lecane*.

Objetivos particulares

- Implementar pruebas toxicológicas agudas, empleando como tóxicos: arsénico, cadmio, carbarilo, cobre, deltametrina, glifosato, paratión metílico, plomo, vinclozolin y cinc.
- Realizar exámenes de afinidad entre las cepas utilizando análisis de secuencias de ADN mitocondrial y nuclear



4. METODOLOGÍA

4.1. Descripción de la población y muestra:

Se realizaron cultivos monoclonales de cinco especies del género *Lecane* (*L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata*), seis cepas de la especie *L. quadridentata* y ocho clonas de la cepa Lq-10/67 de dicha especie. Todos los organismos se obtuvieron de colectas realizadas en diferentes cuerpos de aguas del estado de Aguascalientes, además de la cepa de *L. quadridentata* del Lago de Chapala que ha estado bajo cultivo por más de quince años.

Las cepas de *L. quadridentata* se obtuvieron cada una de lugares diferentes. Para realizar los cultivos clónales se trató de eclosionar huevos de resistencia, sin tener éxito. Por esta razón se optó por tomar organismos de *L. quadridentata* del mismo lugar y realizar cultivos monoclonales de cada animal.

4.2. Muestreo y recolección de organismos.

Las colectas se llevaron a cabo en cuerpos de agua del estado de Aguascalientes en distintas épocas del año. Para la toma de la muestra se utilizó una red de plancton de 53 micrómetros de apertura de malla, la cual fue lanzada varias veces para filtrar el cuerpo de agua. Posteriormente las muestras se colocan en un recipiente térmico, para ser trasladadas al laboratorio. Las coordenadas fueron tomadas con el GPS 4000XL Q1 109 Navegador Satelital Magellan (Magellan Inc., 1997).

Las muestras se observaron en un microscopio estereoscópico Leica. Los organismos de interés encontrados se trasladaron a placas de poliestireno con 24 pozas cada una (Costar Co, USA) con agua proveniente de la muestra, gradualmente se sustituyó esta agua hasta establecer el cultivo en medio EPA (Anexo A) (U.S EPA, 1985). Una vez establecidos se cambiaron a cajas de Petri para su cultivo.

4.3. Cultivo de rotíferos

Los rotíferos del género *Lecane* se cultivaron acorde al protocolo de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001). Empleando una cámara bioclimática con un foto-período de 16:8 h (luz/oscuridad), a una temperatura de 25°C. Los rotíferos se colocaron en cajas Petri con medio EPA (U.S EPA, 1985), y se alimentan con el alga *Nannochloropsis oculata* (Cepa LB2194 de la colección de la UTEX) cultivada en medio Bold's (Anexo A) (Nichols, 1973). Los huevos asexuales de las cepas se colocan en cajas de petri con el medio EPA 24 horas antes de comenzar el experimento.

4.4. Análisis de imagen por microscopio de barrido electrónico

Se colectaron de 500 a 1000 rotíferos de cada cultivo y se colocaron en un tubo Eppendorf en un volumen final de 1 ml y se adicionaron 100 µl de formol al 3%, se dejaron reposar 48 horas previas a la deshidratación. Las muestras se deshidrataron con alcoholes graduales de 60, 70, 80, 90, 96, y 100%, dejando a los organismos durante 10 minutos en cada alcohol.

Para remover la humedad interna y externa, las muestras se colocaron en una secadora de punto crítico (SAMDRI®, Tousimis) con CO₂ líquido. Una vez que los organismos fueron procesados en la cámara de punto crítico se colocaron con cuidado sobre un cilindro con un disco de grafito adherible de 1 cm x 1 cm.

La muestra montada en el cilindro se colocó en el porta-muestras del recubridor de oro (Denton Vacuum). La introducción de flujo de corriente a un tiempo estimado (80 segundos) hace que se desprendan partículas de oro del disco y se depositen en la muestra proporcionando un espesor de 100 Å. Este recubrimiento es necesario para eliminar o reducir la carga eléctrica en la superficie de la muestra no conductora para obtener una buena imagen. Para la toma de imágenes la muestra se introdujo a la cámara del microscopio electrónico de barrido (JEOL LV 5000).

4.5. Tablas de vida

Los organismos aclimataron en el laboratorio por lo menos por seis meses antes de comenzar con el experimento. Una vez aclimatados se estudió el efecto de tres temperaturas (20, 25 y 30°C) utilizando neonatos de las especies *L. bulla*, *L. cornuta* y *L. papuana*. Los organismos se cultivaron en medio EPA y se alimentaron con el alga *N. oculata* a una concentración de 1×10^6 células/ml. Los animales se aclimataron por lo menos 48 horas antes del experimento a la temperatura correspondiente antes de comenzar las tablas de vida.

Se colocaron 100 huevos asexuales de cada especie. Una vez eclosionados se transfirió un neonato a un pocillo individual en una placa de poliestireno de 24 pocillos incubados con la comida y a la temperatura correspondiente. El volumen total de cada poza fue de 750 μ l. Los individuos se observaron cada veinticuatro horas, los neonatos se contaron y se retiraron del pozo. En lugar de cambiar los individuos originales a nuevos pocillos con comida fresca, la mitad del medio se reemplazó cada 24 horas con medio fresco (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 1998). Las algas se contaron por medio de un hemocitómetro.

La tasa intrínseca de crecimiento (r) se inicia colocando 5 individuos en una poza con un volumen final de 2 ml formado de medio EPA y una concentración de 1×10^6 cels/ml del alga *N. oculata*. El alimento se agrega al inicio de la prueba y al tercer día. Se incuban durante 5 días a 25°C y un fotoperiodo de 16:8 (l:o). Al final de la prueba se contabiliza en número total de organismos en la poza, con un total de cinco replicas.

Para el porcentaje de eclosión se colocaron 10 huevos asexuales en una poza y se realizaron 10 réplicas, estas se contabilizaron a las 24, 48, 72 horas. El volumen total de la poza fue de 1 ml y no se aplicó alimento en los tratamientos.

Se analizaron los siguientes parámetros: intervalo de tiempo de 24 horas (x), esperanza de vida media (D), media del tiempo generacional (G), tasa de reproducción neta (R_0), y esperanza de vida (ex). Todos estos parámetros se determinaron según Krebs (1985). El

valor reproductivo (V_x), la media del tiempo generacional (G), la tasa de reproducción neta (R_o), y la tasa intrínseca de crecimiento (r) se calcularon según Krebs (1985) y Begon y colaboradores (1996), utilizando las siguientes fórmulas:

- Media del tiempo generacional (G) = $\sum \frac{(x_l x_{m_x})}{R_o}$
- Tasa neta reproductiva (R_o) = $\sum (m_x l_x)$
- Tasa intrínseca de crecimiento (r) = $\ln \frac{[N(t_2) - N(t_1)]}{(t_2 - t_1)}$
- Valor reproductivo (V_x) = $l_x * m_x$

En donde:

- sobrevivientes (l_x) = $n_x / 24$
- Fecundidad media (m_x) = f_x / n_x
- \ln = logaritmo natural
- N = número de individuos
- t_1 = tiempo 1.
- t_2 = tiempo 2.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistica 10.0 (Statsoft Inc., 2011). Para estimar la variabilidad de los parámetros de la tabla de vida, se utilizaron 10,000 repeticiones con la técnica de bootstrap (software XLSTAT 5,03). Estas repeticiones representan una buena medida de la variabilidad que se encuentra en las réplicas reales ($N = 24$). Un ANOVA y pruebas de Scheffe post hoc se utilizaron para comparar los valores medios ($p < 0,05$). El test de Mann-Whitney U con corrección de Bonferroni se aplicó a los datos para satisfacer la demanda de la distribución normal.

4.6. Pruebas Toxicológicas

Las pruebas se realizaron en placas de poliestireno con 24 pozas cada una (Costar Co, USA). En cada una de las pozas se colocaron 10 neonatos (menores de 24h) eclosionados

de huevos asexuales, el volumen de la prueba fue de 1000 μ l. Se realizó una prueba estática sin alimentación ni renovación del medio (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001).

Se efectuaron pruebas para encontrar el rango de toxicidad para las cepas del género *Lecane* usando cinco concentraciones para cada tóxico. Las concentraciones de la prueba son series logarítmicas de cinco concentraciones y un control. La mortalidad se registró transcurridas 48 horas. La concentración más alta sin mortalidad y la concentración más baja con la mortalidad 100% se eligieron como los límites bajos y superiores para la prueba definitiva. Tres de las concentraciones intermedias también se incluyeron en la prueba definitiva. La prueba definitiva de 48 horas se realizó usando cinco concentraciones que cubren el rango de 0 a 100% de la concentración de la mortalidad obtenida en las pruebas del rango de toxicidad. Cincuenta animales de la prueba (10 por réplica, cinco réplicas) serán utilizados para el control y cada concentración del tóxico. Se utilizaron hembras neonatas de menos de 24 horas de edad tomadas de los huevos asexuales. La mortalidad fue anotada después de 48 horas para analizar los datos.

Los tóxicos empleados fueron: arsénico, cadmio, cinc, cobre, plomo (estándares de absorción atómica), carbarilo, deltametrina, glifosato, paratión metílico y vinclozolin (Sigma-Aldrich®). Los metales pesados y el glifosato fueron diluidos en EPA, los pesticidas se disolvieron en cetona grado analítico (Sigma-Aldrich®). Para los tóxicos disueltos en cetona se realizó un control con la concentración máxima empleada del solvente, de esta manera se asegura que la mortalidad es por efecto del tóxico y no del medio de dilución.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar los datos de mortalidad para cada concentración del tóxico con el control. El CL10 (concentración donde el 10% de los organismos muere) y CL50 se calcularon utilizando una regresión lineal con unidades PROBIT y el logaritmo de la concentración del tóxico usando el software Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2011). Se realizó una prueba de Duncan para analizar la comparación entre las medias de los valores de CL50. Además se obtuvieron los

valores de NOEC (concentración donde no se observa un efecto en significativo con respecto al control) y LOEC (concentración mínima donde se observa un efecto en significativo con respecto al control) y el coeficiente de correlación (R^2).

Se calculó la media geométrica para observar el orden de toxicidad por género. También se generaron los valores MATC utilizando la siguiente fórmula utilizada por Santos-Medrano y Rico-Martínez (2015):

$$MATC = \sqrt{(LOEC)(NOEC)}$$

4.7. Biología molecular

4.7.1. Limpieza de organismos vivos

Con ayuda de una pipeta Pasteur nueva se colocaron 25 organismos en una placa de cristal con nueve pozas, en cada poza se colocó EPA y se realizó la limpieza de los organismos cambiándolos de poza en poza. En el caso de los organismos fijados con alcohol se colocaron en buffer TE (Anexo A), realizando un lavado diario durante 9 días, los organismos se mantuvieron durante ese tiempo a 4°C.

4.7.2. Extracción de ADN

Se lavaron 30 animales con medio MBL (Anexo A) y con la menor cantidad de agua posible se colocaron en un tubo eppendorf se adicionaron 13 μ l de chelex® (100 RESIN, BIO-RAD) y 1 μ l de proteinasa K (INVITROGEN™), la mezcla se centrifugo por 30 segundos y se colocó en el termociclador con programa de un ciclo, que consiste en 60 minutos a 56°C, 10 minutos a 99°C y finaliza con tiempo indefinido a 8°C. El producto se almacenó en un ultracongelador a -80°C. (Walsh et al, 2009).

4.7.3. PCR

La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 25 µl en las condiciones que se muestran en el Tabla 1. Los oligonucleótidos utilizados son los siguientes:

- LCO1490 (Folmer et al, 1994): 5´-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3´
- HCO2198 (Folmer et al, 1994): 5´-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3´
- ITS4 (White et al, 1990): 5´ - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´
- ITS5 (White et al, 1990): 5´-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3´

Tabla 1: Condiciones de la reacción de amplificación

Componente	Concentración	Volumen
ADN	≥ 20 ng/ul	5 µl
Oligonucleótido 1		1 µl
Oligonucleótido 2		1 µl
HotStarTaq® Master Mix (QIAGEN)		12.5 µl
MgCl ₂	50 mM	1 µl
H ₂ O		4.5 µl
Total		25 µl

*A cada vial se le adicionaron 20 µl de aceite mineral para proteger la reacción y evitar que la evaporación.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador TECHNE TC-412 con un precalentamiento de 10 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos consistentes en 30 segundos a 95 ° C, 30 segundos a 55°C, y 1 minuto a 72° C. Una extensión final de 1 minuto a 72 ° C, (Walsh *et al.*, 2009).

Para tener mayor certeza al momento de la secuenciación se realizó por lo menos un PCR duplicado para cada especie, cepa y clona con ambos marcadores moleculares. Las

condiciones para realizar los duplicados fueron que los viales fueran diferentes al del PCR original y que el procedimiento no se llevara a cabo el mismo día.

4.7.4. Optimización del PCR

La optimización de la PCR se realizó en un volumen de 43.6 μ l en las condiciones que se muestran en el Tabla 2. Se utilizaron los Buffer's de, Invitrogene™ 5X (Anexo A), obteniendo mejores resultados con los Buffer's G y H (Anexo A). Solo se utilizaron los oligonucleótidos para COI.

Tabla 2: Condiciones de la reacción de amplificación optimizada.

Componente	Concentración	Volumen
ADN	≥ 20 ng/ μ l	5 μ l
Buffer G y H, Invitrogene™ 5X		10 μ l
LCO1490		1.2 μ l
HCO2198		1.2 μ l
HotStarTaq® Master Mix		1.2 μ l
dNTP mix, Invitrogene™	2.5 mM	5 μ l
H ₂ O		20 μ l
Total		43.6 μ l

Al final se adicionaron los dNTP's, es importante que antes de añadirlos, se coloquen los viales en el HotPlate a 80°C e inmediatamente se adicionan los dNTP's, y 50 μ l de aceite mineral para proteger la reacción y evitar que la evaporación.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador TECHNE TC-412 con un precalentamiento de la tapa a 105°C. Posterior se da un ciclo a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos consistentes en 60 segundos a 94° C, 2 minutos a 47°C, y 3 minutos a

72° C. Una extensión final de 7 minutos a 72 ° C, al finalizar el termociclador queda a 10°C (Walsh *et al.*, 2009).

4.7.5. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos amplificados se analizaron en gel de agarosa (1x TAE: 100ml, agarosa 3:1: 1.5g, Bromuro de etidio: 55µl) en buffer TAE al 1X a 100 V durante 40 minutos aproximadamente.

4.7.6. Recuperación del ADN del gel de agarosa

Se colocaron 500 µl de NaI al gel y se colocó en baño (55°C) de 2 a 3 minutos. Se agitó en el vortex el EZ-GlassMilk™ por 2 minutos y se colocaron 15 µl a la muestra. Por 45 minutos se agitó la muestra cada 5 minutos. Posteriormente se centrifugo 2 minutos a 14000 RPM, se tiró el sobrenadante y se pusieron 500 µl de NEW Wash (Anexo A) y se rompió el pellet, esto se repitió tres veces. Se tira el sobrenadante y se saca el exceso de agua con una pipeta. Se procedió al proceso de secado de 2 a 3 minutos HotPlate (> 80°C) y 5-7 minutos dejando secar al aire, después se ponen 10 ml de H₂O y se rompió la pastilla, se coloca en baño a 55°C por 2 minutos y se trasfiere el líquido a un tubo, esto se repite dos veces. Se almaceno a -20° para posteriormente contabilizarlo en NanoDrop™.

4.7.7. Cuantificación

Se coloca 1ml de muestra en el aparato NanoDrop™ y con ayuda del programa NanoDrop 1000 3.6.0 se obtuvo la concentración del producto de amplificación, si este excedía los 20 ng/µl se procedía a diluir la muestra. Una vez que la muestra tenía dicha concentración (o menos) se mandaba a secuenciar.

4.8. Proceso de secuencias

4.8.1. Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo en el departamento de Ciencias Biológicas DNA Analysis Core Facility de la Universidad de Texas en El Paso (BBRC DNA Analysis Core y NIMHD Grant G12MD007592).

4.8.2. Limpieza de secuencias

Previo a la limpieza las secuencias se corrieron en el programa BLAST (NCBI) para asegurar que fueran de rotífero. Se descargó el programa Finch TV 14.2 para visualizar las secuencias., se abren dos ventanas en la parte superior se abre la secuencia en reversa (reverse) y en la inferior la secuencia complementaria. Se compara una por una, cada base. Si es necesario se arregla a mano con ayuda de la tabla de degeneraciones de la IUPAC (Anexo B), en caso de no estar muy seguro se coloca una N. Una vez limpias las secuencias se exportan la secuencia en formato FASTA.

4.8.3. Secuencia consenso

En línea se abrió el programa CAP3 Sequence Assembly Program (Huang y Madan, 1999), se colocaron las secuencias en formato FASTA. Es importante colocar la secuencia complementaria en reversa. La finalidad de este programa es obtener la secuencia definitiva, producto de la secuencia en reversa y la complementaria. El resultado se copió en block de notas o en un documento Word y se le puso un nombre para diferenciarlo.

4.8.4. Corte de los oligonucleótidos

En el software Word se buscan los fragmentos de los oligonucleótidos en las secuencias, estos se cortan, para el caso de COX1 las secuencias deben de quedar de la misma longitud, en el caso de ITS no. En algunas ocasiones la secuencia del primer se ve afectada por la resolución del espectrofotómetro, en este caso se van cortando pedazos de la secuencia del primer para poder localizarlo.

4.8.5. Alineación

Se colocan todas las secuencias juntas y se visualizan en el programa en línea Mafft versión 7 (Kato y Standley, 2013). Para COI se utilizó el algoritmo automático, pero en el caso de ITS se utilizó el algoritmo Q-INS-i (Mills *et al.*, 2016). La alineación se descargó en formato FASTA.

4.8.6. Búsqueda del modelo evolutivo

Con ayuda del programa Model Generator (McMann y Cohen, 1991) se generó el mejor modelo para realizar la inferencia Bayeciana.

4.8.7. Diversidad de haplotipos

Para cuantificar la diversidad de haplotipos se utilizó el programa dnap5.exe, se utilizó el alineamiento en formato NEXUS. En la pestaña de datos, se seleccionó el formato: DNA, haplotipo y mitocondrial. Después se generó un archivo con los datos de haplotipos y se le asigna un nombre (Rozas, 2009).

4.9. Construcción de hipótesis filogenéticas

Se utilizó el programa ALTER (Aligment Transformation EnviRoment) (Glez-Peña *et al.*, 2010) para cambiar los archivos de formato FASTA al formato NEXUS para el caso de inferencia Bayesiana o al formato PHYLIP para el análisis por Maximum Likelihood.

Para ambas inferencias se utilizó el programa en línea de CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010), se subieron los archivos a la plataforma para su uso posterior. Para Inferencia Bayeciana se utilizó el modelo TIM1+I+G y para Maximum Likelihood GTRCAT.

En ambas inferencias con los marcadores COI e ITS se utilizó como grupo externo la secuencia de *Floscularia conifera*, obtenida del banco de datos del laboratorio de

Sistemática molecular de la Universidad de El Paso Texas a cargo de la Dra. Elizabeth J. Walsh.

4.9.1. Matrices de distancias genéticas

Para obtener la matriz de distancias se utilizó el programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002), se utilizó el alineamiento en formato NEXUS, se realizó una búsqueda heurística, en la pestaña adición de secuencias se realizó una búsqueda aleatoria con 1000 repeticiones. Finalmente se obtiene la matriz de distancias.

4.10. Análisis de componentes principales

Se elaboró el análisis de componentes principales con el programa XLSTAT 5,03, los análisis de los datos se realizaron mediante una matriz de correlación de Pearson, el nivel de significación está dado por el modelo Kaiser-Meyer-Olkin, con la prueba de esfericidad de Barlett.

5. RESULTADOS

5.1. Muestreo y recolección de organismos

Se realizaron muestreos en el estado de Aguascalientes, las coordenadas de los muestreos realizados se manifiestan en el cuadro 3. Se lograron cultivar 5 especies del género *Lecane*: *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata*. Además de trabajar con estas especies se suman seis cepas y siete clonas de *L. quadridentata* cultivadas durante algún tiempo en el laboratorio. La identificación de los rotíferos se llevó a cabo utilizando las claves taxonómicas de Segers (1995) y Stemberger (1979).

Tabla 3: Muestra el nombre, clave de los cultivos y las coordenadas del sitio de recolección.

Organismo	Clave del cultivo	Coordenadas	
<i>L. bulla</i>	Lb-PH	N 21.85183	H 102.28912
<i>L. cornuta</i>	Lc	N 21.54545	H 102.19155
<i>L. luna</i>	Ll-72	N 21.85953	H 102.39613
<i>L. papuana</i>	Lp	N 21.46412	H 102.31306
<i>L. quadridentata</i>	Lq-6	N 21.946	H 102.579
<i>L. quadridentata</i>	Lq-10-67 (7 clonas)	N 21.9226	H 102.5519
<i>L. quadridentata</i>	Lq-34	N 21.946	H 102.563
<i>L. quadridentata</i>	Lq-CV	N 21. 81124	H 102.25222
<i>L. quadridentata</i>	Lq-10-11	N 21.880	H 102.491
<i>L. quadridentata</i>	Lq-Ch	N 20.289414	H 103.181547

5.2. Análisis de morfología por SEM

Se realizó un análisis de imagen para las 5 especies del género *Lecane*, en el análisis se incluyeron a la cepa LqCh proveniente del lago de Chápala y cultivada aproximadamente durante 20 años en condiciones controladas de laboratorio (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 1998), también se analizó la clona R8 (de la cepa Lq 10-67), esta clona presento una gran cantidad de mutaciones en ambas secuencias (COI e ITS).

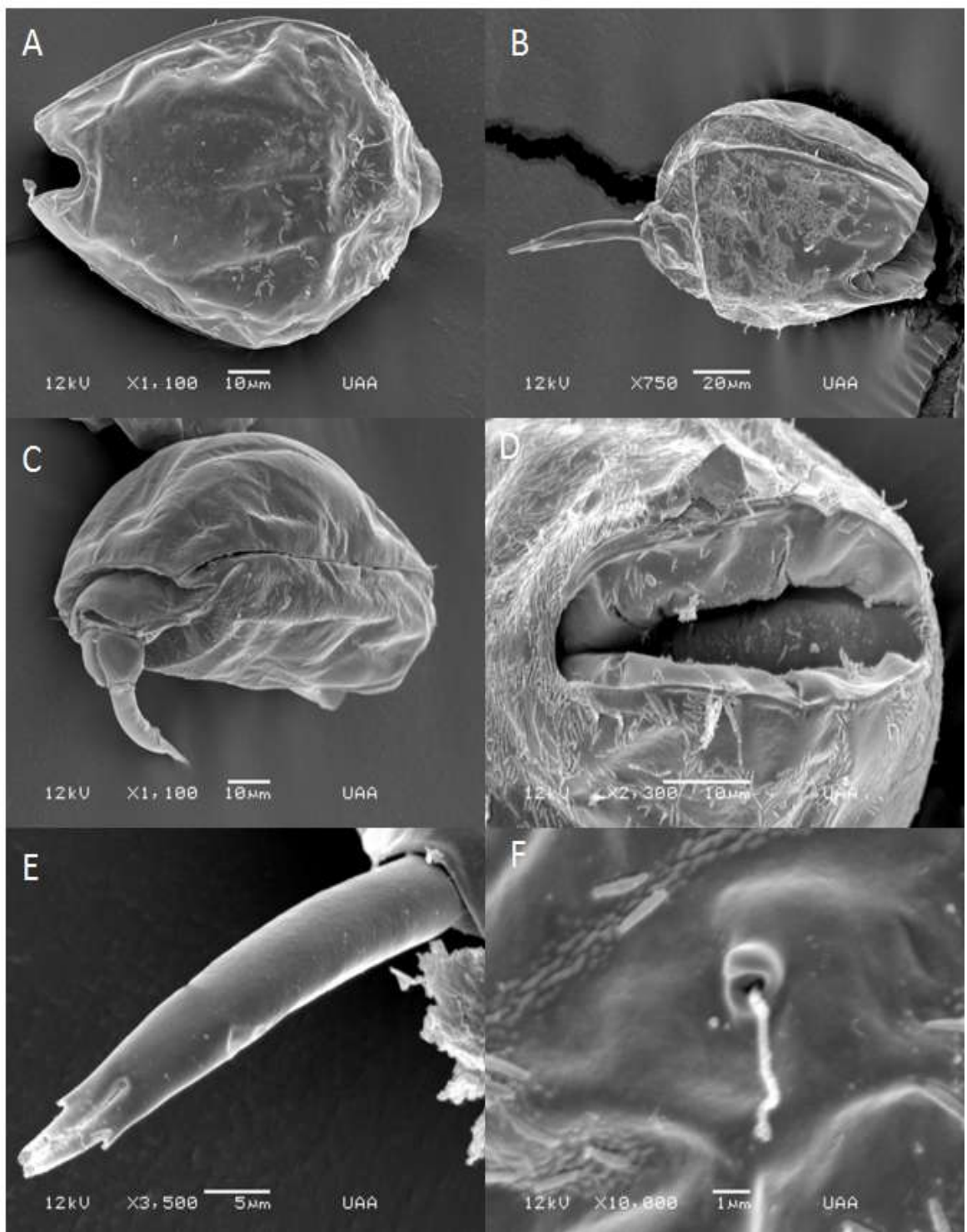


Figura 3: Morfología externa de *L. bulla*. A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.

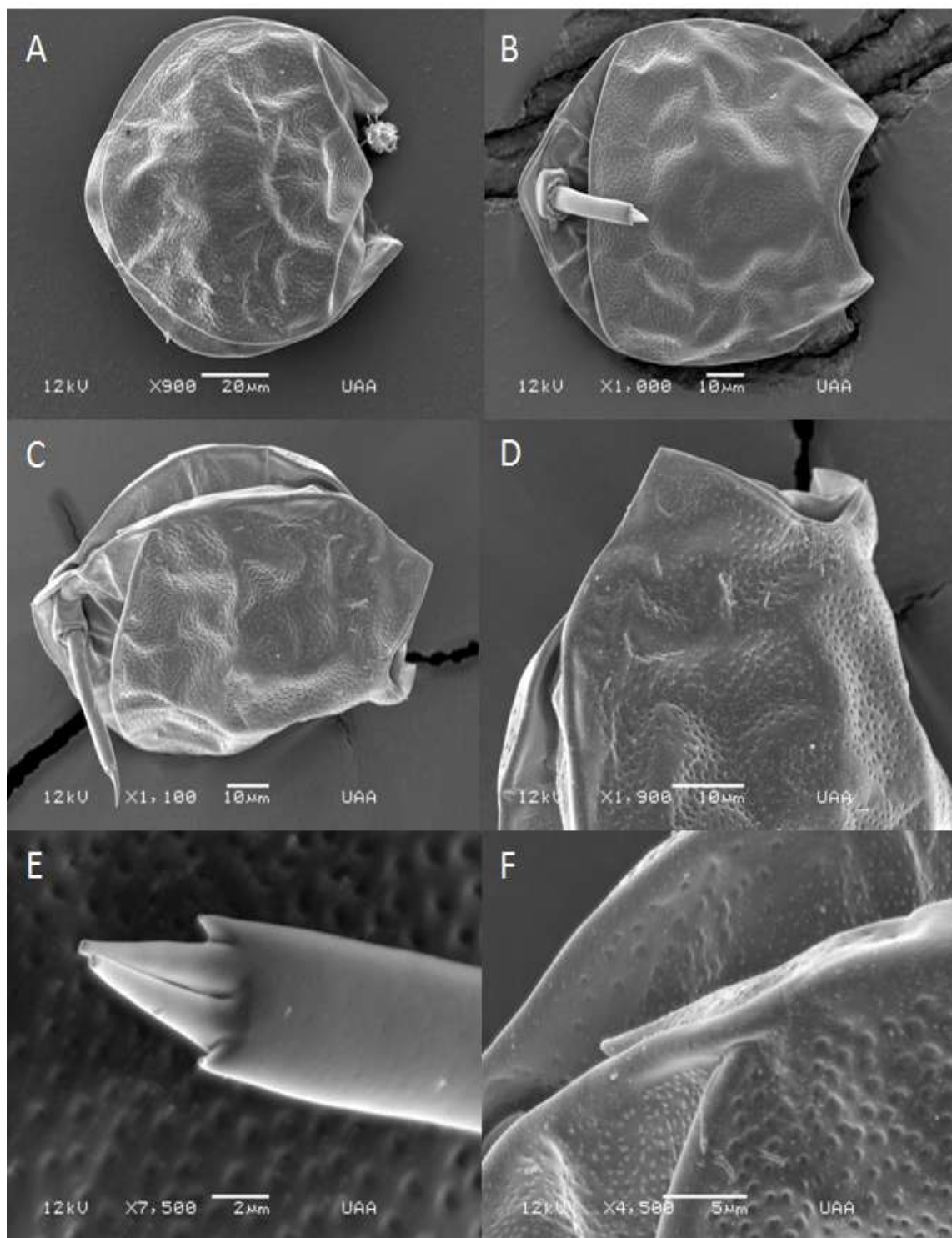


Figura 4: Morfología externa de *L. cornuta*. A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.

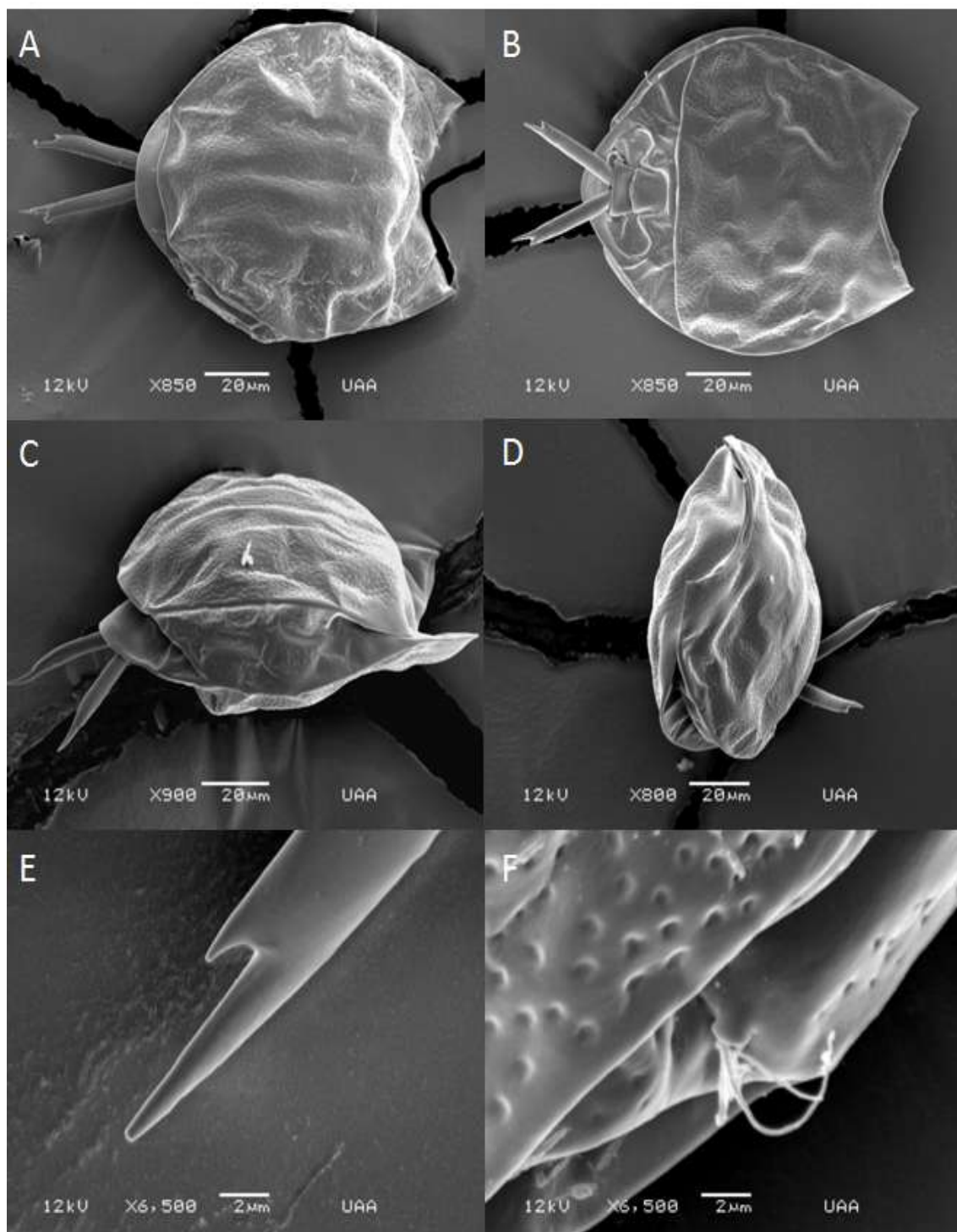


Figura 5: Morfología externa de *L. luna*. A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.

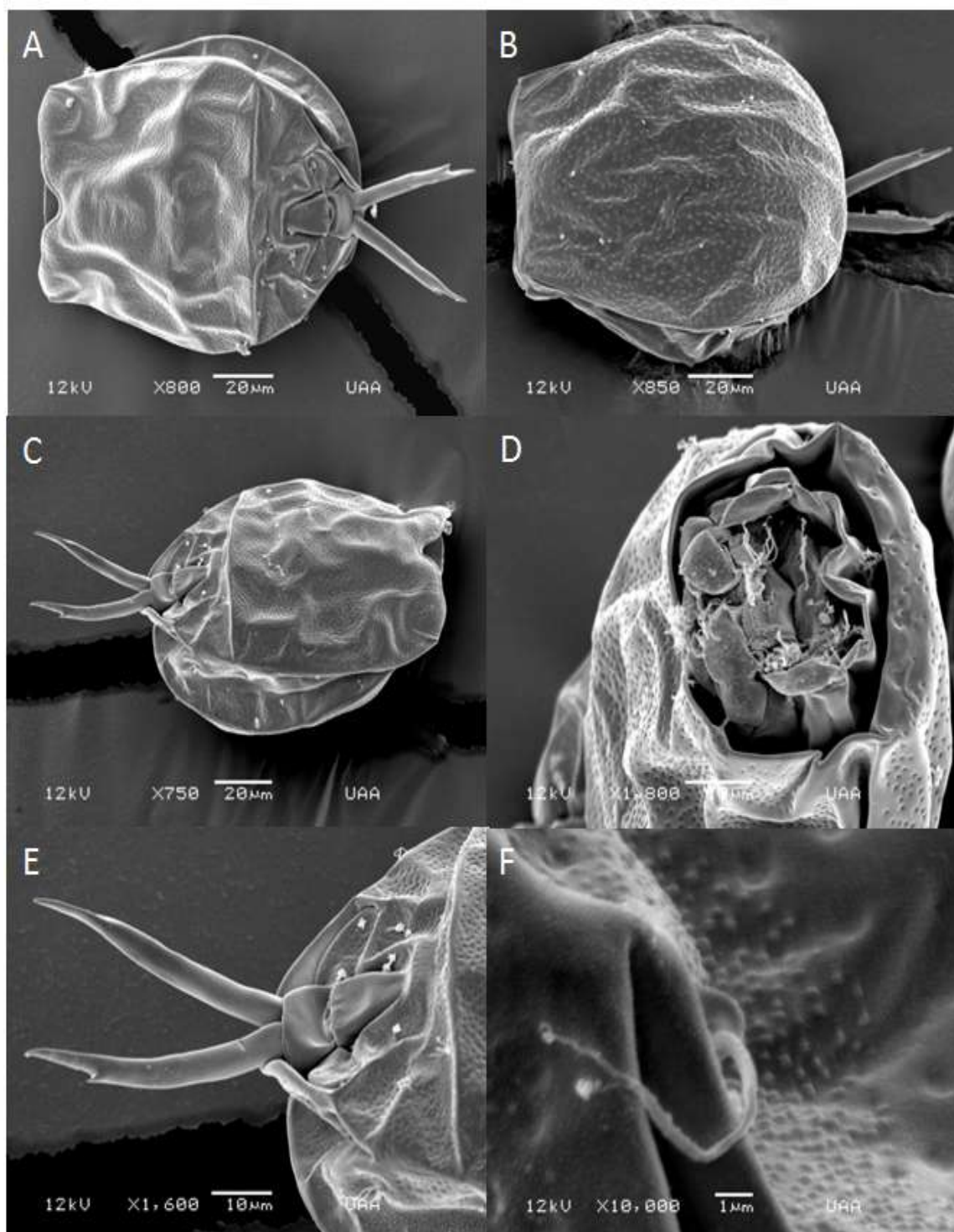


Figura 6: Morfología externa de *L. papuana*. A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.

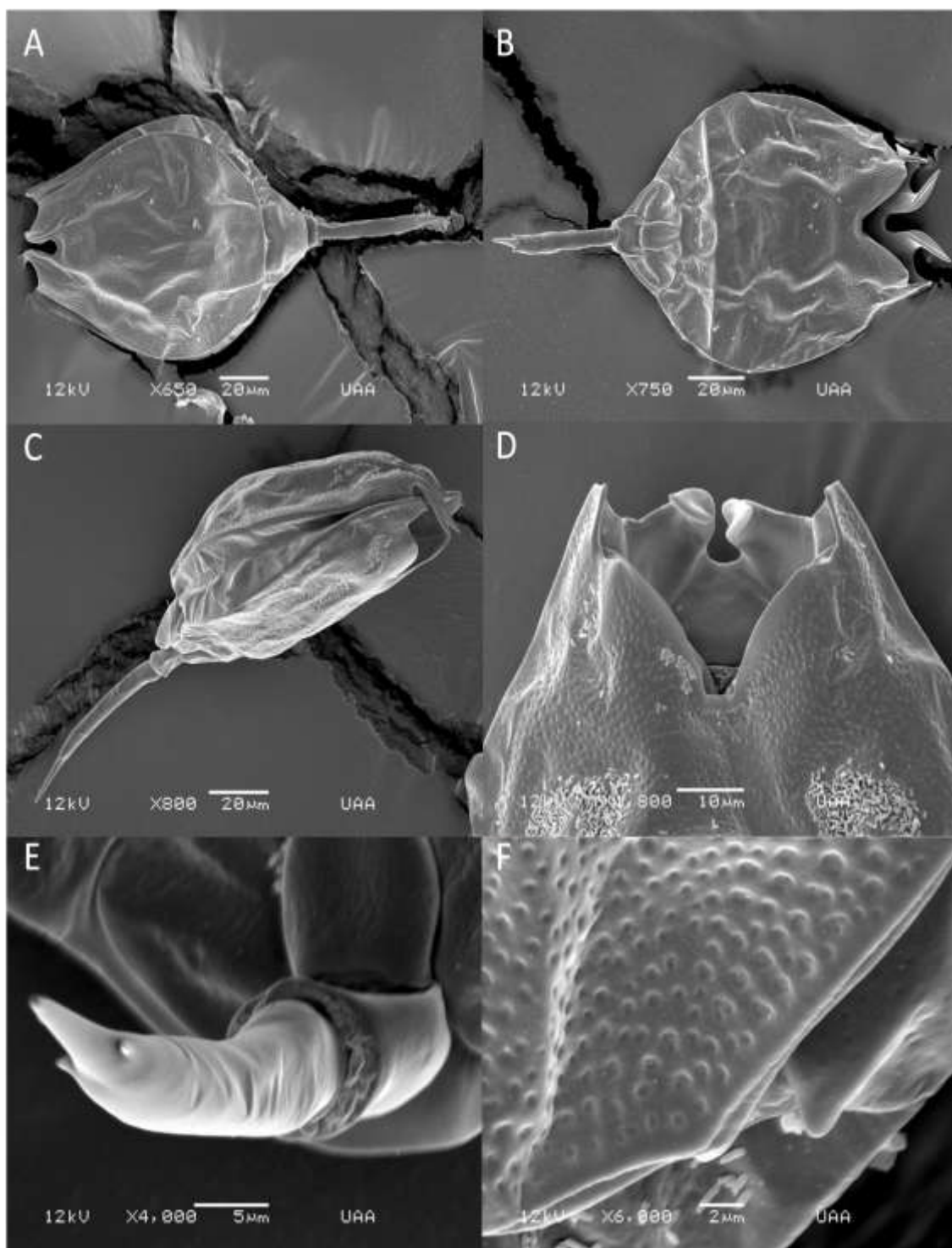


Figura 7: Morfología externa de *L. quadridentata* (cepa 6). A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.

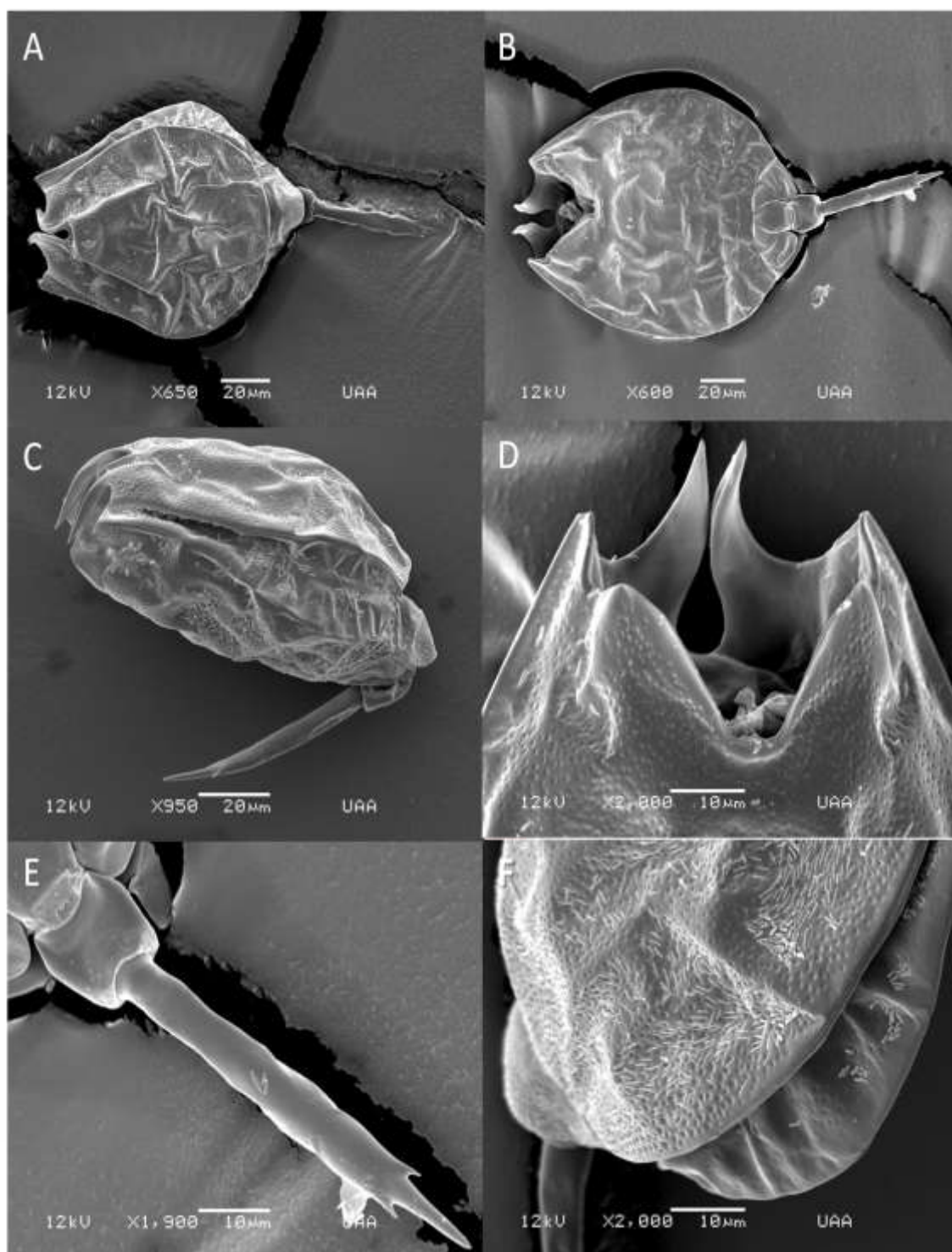


Figura 8: Morfología externa de *L. quadridentata* (cepa CH). A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.

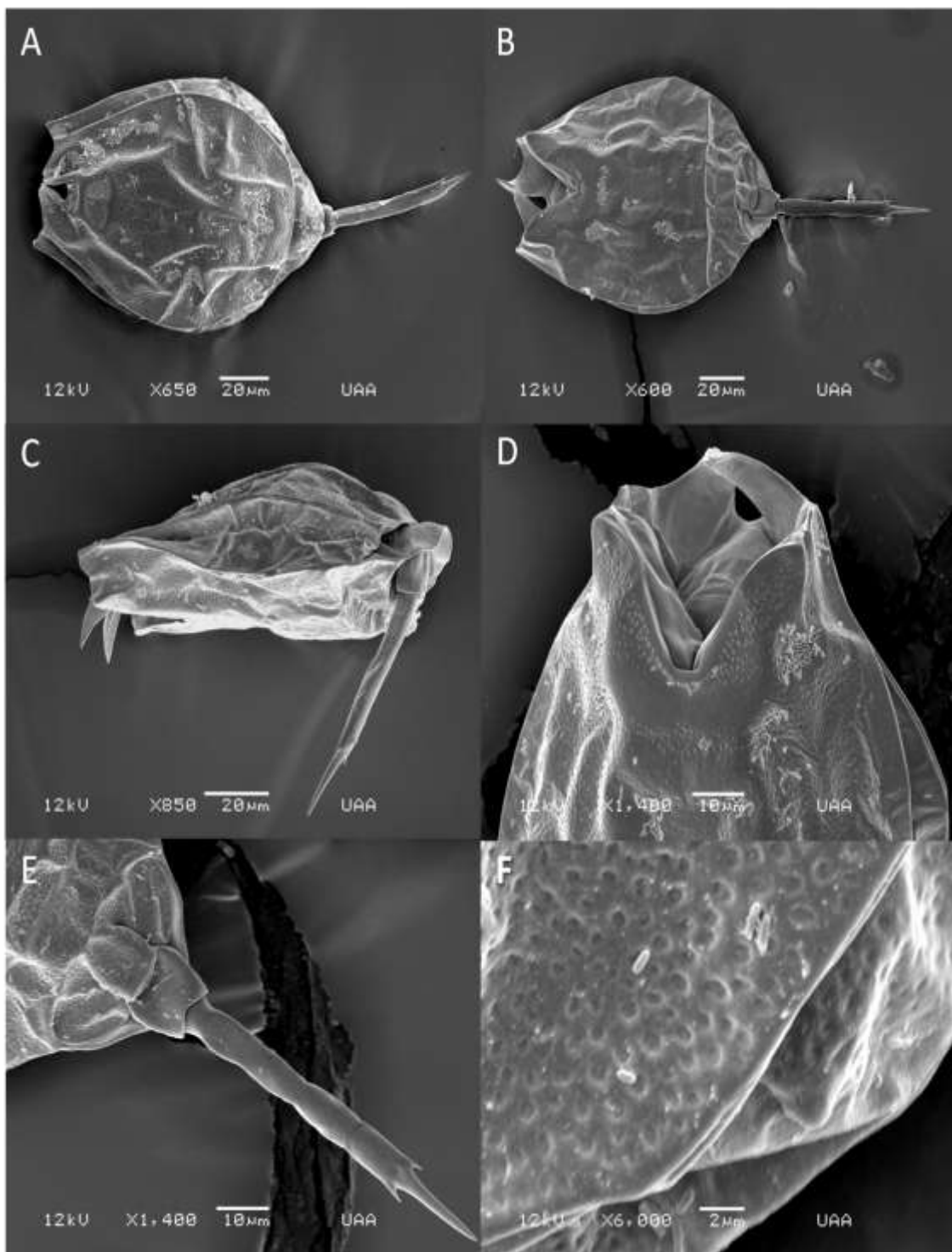


Figura 9: Morfología externa de *L. quadridentata* (clona R8). A: Vista dorsal. B: Vista ventral. C: Vista lateral. D: Corona. E: Pie y dedos. F: Antena lateral.

5.3.Tablas de vida

Se realizaron las tablas de vida para *L. bulla*, *L. cornuta* y *L. papuana* a 20, 25 y 30 °C. Obteniendo el valor del porcentaje de eclosión (tabla 4), la media de la esperanza de vida (D), media del tiempo generacional (G), tasa reproductiva neta (Ro (h-1)), tasa intrínseca de crecimiento [r (h-1)] y límites de confianza al 95% (L. C. al 95%) (Tabla 5). A estos valores se les realizó un análisis de bootstrap (10,000 re-muestras) para darle mayor soporte estadístico. Además se graficó la expectativa de vida (Figura 10) y el valor reproductivo (Figura 11). Se determinó que la temperatura óptima para estos tres organismos del género *Lecane* es a 25°C, la especie que mejores resultados obtuvo en general fue *L. papuana*, siendo la que mejor reacciono a 30°C, por lo que se concluyó es una especie de estenotérmica. En contraste, en *L. bulla* no se pudo realizar la aclimatación a 30°C ya que los huevos producidos a 25°C no eclosionaron con el cambio de temperatura.

Tabla 4: Porcentaje de eclosión de huevos partenogenéticos.

Temperatura	20°C			25°C			30°C		
	24-h	48-h	72-h	24-h	48-h	72-h	24-h	48-h	72-h
<i>Lecane bulla</i> *	57%	89%	95%	78%	91%	91%	-	-	-
<i>Lecane cornuta</i>	78%	100%	100%	92%	100%	100%	56%	60%	60%
<i>Lecane papuana</i>	98%	98%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

**Lecane bulla* no se pudo cultivar a 30 °C, los huevos de esta especie producidos a 25 °C no eclosionaban a 30 °C.

Tabla 5: Parámetros de la tabla de vida de los rotíferos *L. bulla*, *L. cornuta* y *L. papuana*. Las abreviaciones corresponden a media de la esperanza de vida (D), media del tiempo generacional (G), tasa reproductiva neta (Ro (h-1)), tasa intrínseca de crecimiento (r (h-1)) y límites de confianza al 95% (L. C. al 95%). Los valores son la media \pm el error estándar. N = 24. Los valores de bootstrap se fijaron en 10,000 re-muestras.

Parámetros	<i>L. bulla</i> *		<i>L. cornuta</i>			<i>L. papuana</i>		
	20° C	25° C	20° C	25° C	30° C	20° C	25° C	30° C
D (h)	281 \pm 19.08	177 \pm 9.67	386 \pm 32.59	304 \pm 27.88	70 \pm 10.89	195 \pm 15.91	154 \pm 10.80	101 \pm 6.77
Bootstrap D	281.2 \pm 18.57	177.15 \pm 9.35	385.41 \pm 31.60	304.44 \pm 26.94	70.14 \pm 10.54	195.24 \pm 15.42	154 \pm 10.52	101.11 \pm 6.57
L. C. al 95%	242.18 – 319.81	157.49 - 196.51	329.70 – 452.29	247.58 – 360.41	47.61 – 92.38	162.91 – 227.09	132.05– 175.94	87.38– 114.61
G (h)	248.36 \pm 2.47	160.37 \pm 3.07	266.57 \pm 2.08	176.28 \pm 1.62	113.79 \pm 1.65	104.09 \pm 4.11	86.68 \pm 3.13	80.62 \pm 4.40
Bootstrap G	249.83 \pm 2.36	160.34 \pm 2.93	266.36 \pm 1.99	174.94 \pm 1.58	113.91 \pm 4.62	103.57 \pm 3.72	86.50 \pm 2.89	81.12 \pm 3.95
L. C. al 95%	142.3 – 354.42	76.35 – 244.38	162.67 – 370.46	109.76 – 242.79	16.39 – 211.19	-15.02 – 223.20	13.76 – 159.60	2.62 - 158.62
Ro (h ⁻¹)	2.75 \pm 0.02	11.33 \pm 0.20	3.50 \pm 0.02	7.12 \pm 0.08	1.16 \pm 0.05	3.58 \pm 0.13	6.33 \pm 0.24	14.35 \pm 0.48
Bootstrap Ro	2.75 \pm 0.02	11.26 \pm 0.20	3.50 \pm 0.02	7.12 \pm 0.08	1.17 \pm 0.05	3.58 \pm 0.12	6.33 \pm 0.22	14.41 \pm 0.74
L. C. al 95%	1.51 – 3.90	5.64 – 17.02	1.98 – 5.01	3.75 – 10.49	0.10 – 2.22	-0.47 – 7.63	0.69 – 11.97	-.063 – 29.38
r (h ⁻¹)	0.09 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	-0.008 \pm 0.009	0.11 \pm 0.02	-0.18 \pm 0.06	0.15 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02	0.65 \pm 0.01
Bootstrap r	0.09 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	-0.009 \pm 0.007	0.12 \pm 0.02	-0.18 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.53 \pm 0.01	0.65 \pm 0.01
L. C. al 95%	0.05 – 0.12	0.22 – 0.28	-0.03 – 0.01	0.29 – 0.90	-0.34 – (-0.03)	0.08 – 0.21	0.48 – 0.58	0.62 – 0.68
Huevos/ind.	3.17 \pm 0.62	11.67 \pm 3.59	3.88 \pm 0.72	7.5 \pm 1.77	0.79 \pm 2.02	3.66 \pm 2.58	6.58 \pm 3.58	7.16 \pm 4.74
Fecundidad	11.26 \pm 0.15	20.86 \pm 0.32	5.17 \pm 0.03	10.45 \pm 0.09	6.2 \pm 0.62	4.08 \pm 0.15	7.23 \pm 0.26	23.54 \pm 1.14

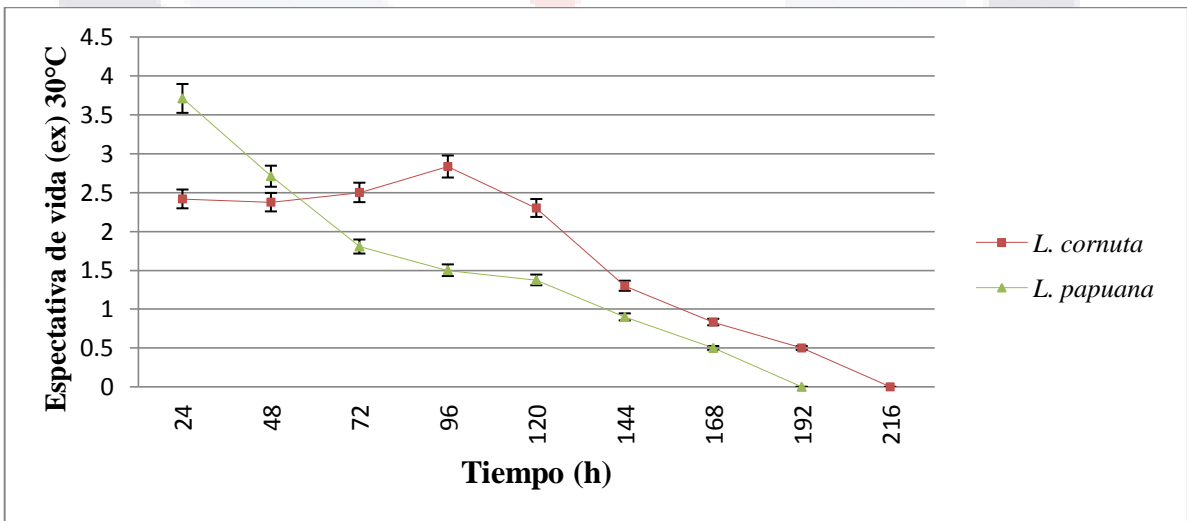
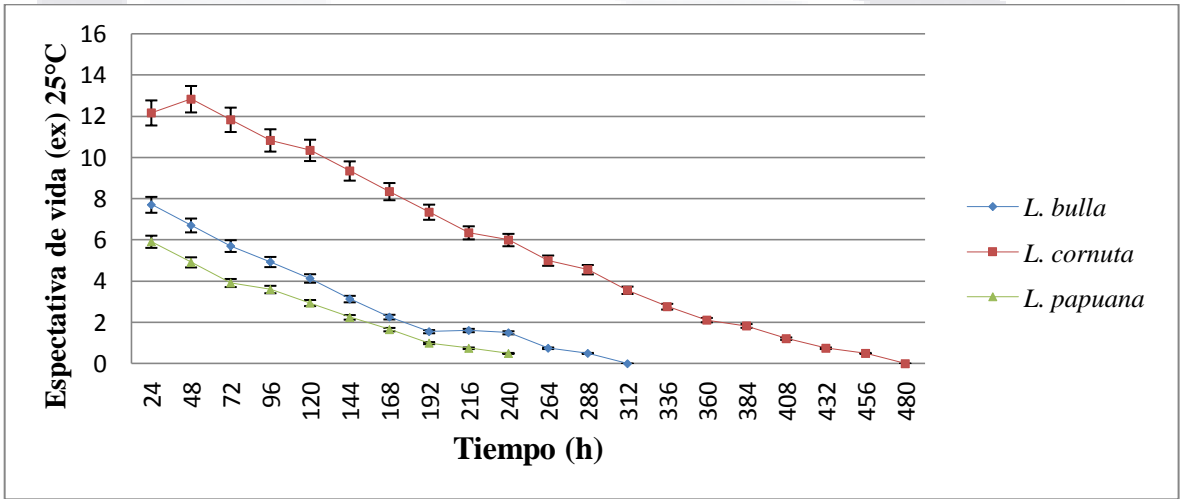
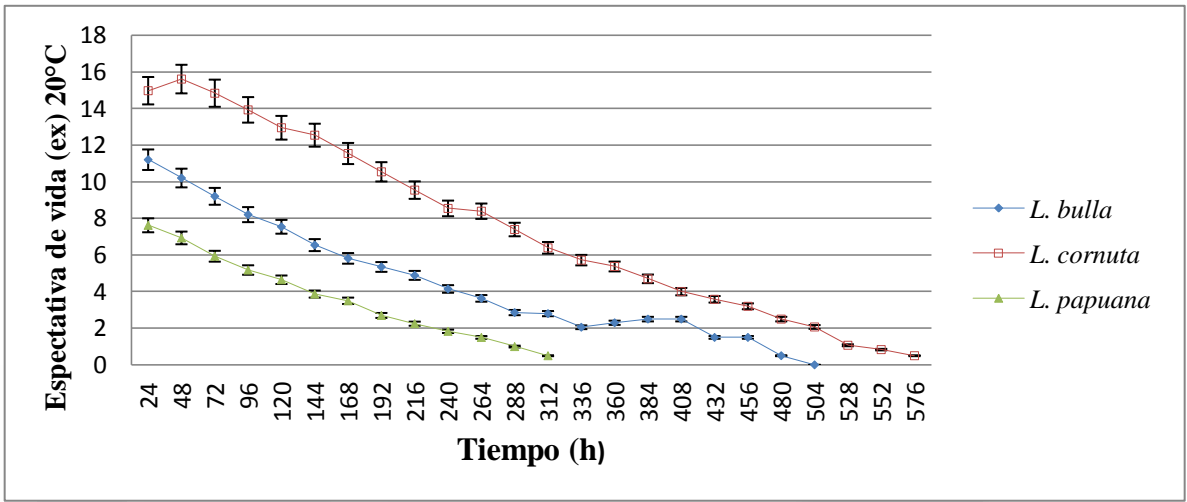


Figura 10: Expectativa de vida (ex) de *Lecane cornuta*, *L. bulla* y *L. papuana* a 20, 25 y 30°C.

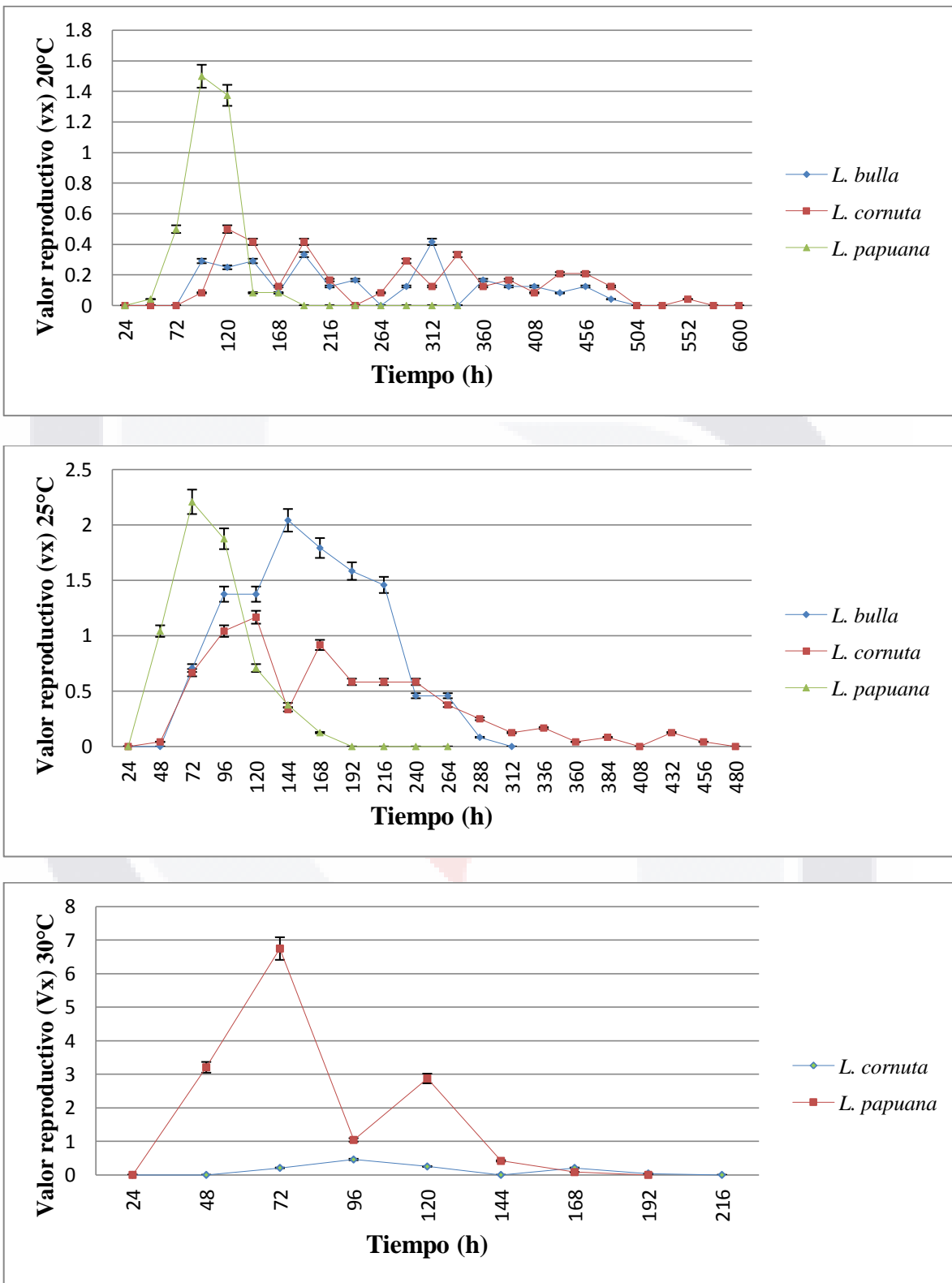


Figura 11: Valor reproductivo (Vx) de *Lecane cornuta*, *L. bulla* y *L. papuana* a 20, 25 y 30°C.

5.4. Pruebas de toxicidad agudas

Se obtuvieron los rangos de toxicidad máximos y mínimos para las especies de los rotíferos dulceacuícolas: los cuales fueron utilizados para las pruebas agudas definitivas. En la Tabla 6 y figuras 12 a 16 se presentan los valores de *L. bulla* presentan los valores del CL10 (Concentración donde se muere el 10% de los organismos), CL50, NOEC (Concentración donde no se observa un efecto), LOEC (concentración mínima donde se observa un efecto), R^2 (Coeficiente de correlación), LC (Límites de confianza al 95%), CV (Coeficiente variación en porcentaje) y MATC (Concentración toxica máxima aceptable)(Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015). Después de cada tabla se muestra la regresión lineal simple de cada cultivo (PROBIT contra el logaritmo de la concentración del toxico)

En la Tabla 6 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. bulla*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 12 a la 16 que muestran la ecuación de la recta y la regresión lineal simple de cada cultivo.

Tabla 6: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. bulla* con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.

Metal	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C.V. %
As	0.06	0.19	0.005	0.1	0.80	0.13 - 0.28	34.31
Cd	0.009	0.028	0.001	0.005	0.80	0.018 - 0.042	4.69
Cu	0.017	0.028	0.005	0.01	0.87	0.024 - 0.033	1.60
Pb	0.028	0.06	0.005	0.01	0.82	0.045- 0.083	6.61
Zn	0.064	0.15	0.005	0.1	0.85	0.11 - 0.19	23.5

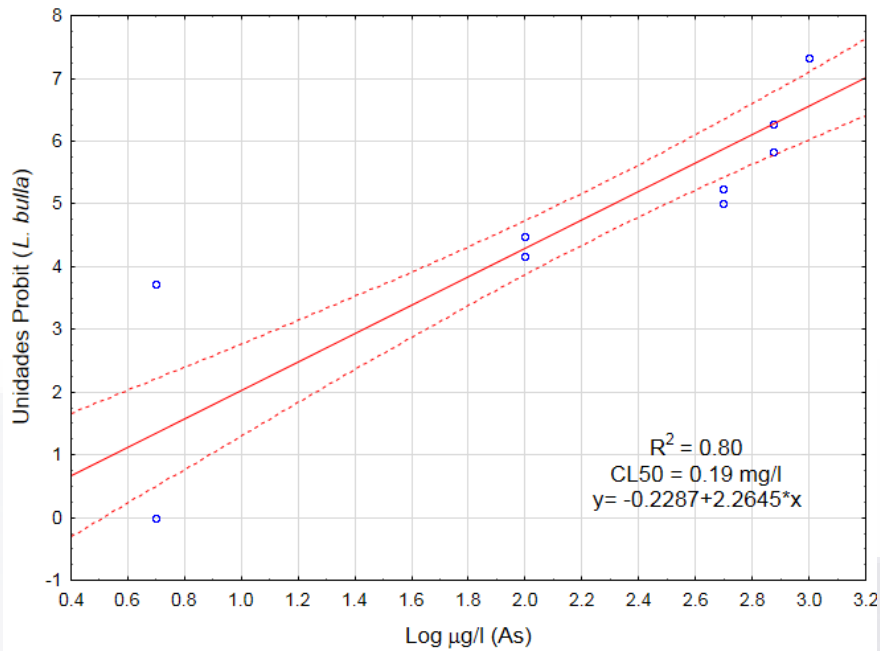


Figura 12: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

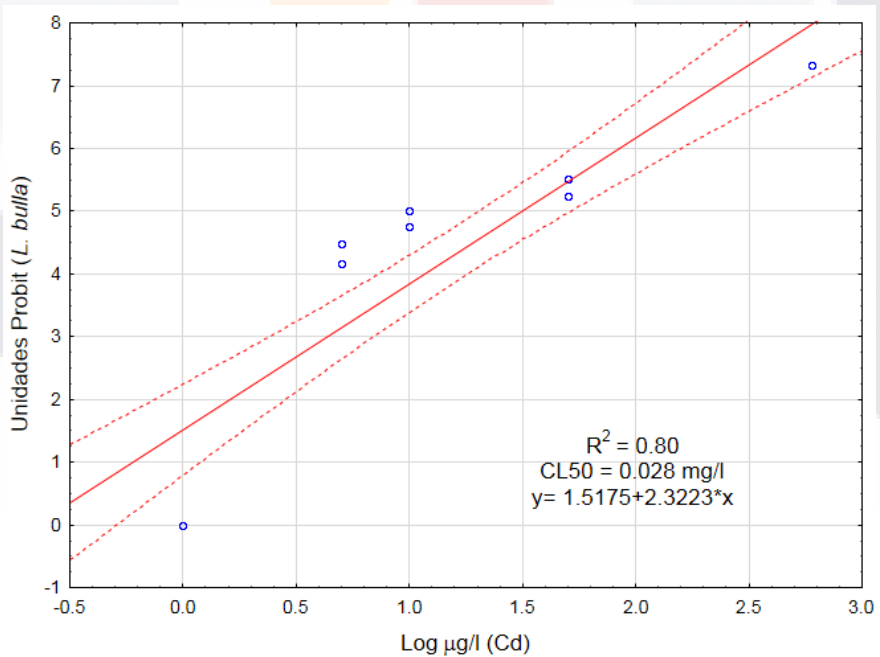


Figura 13: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

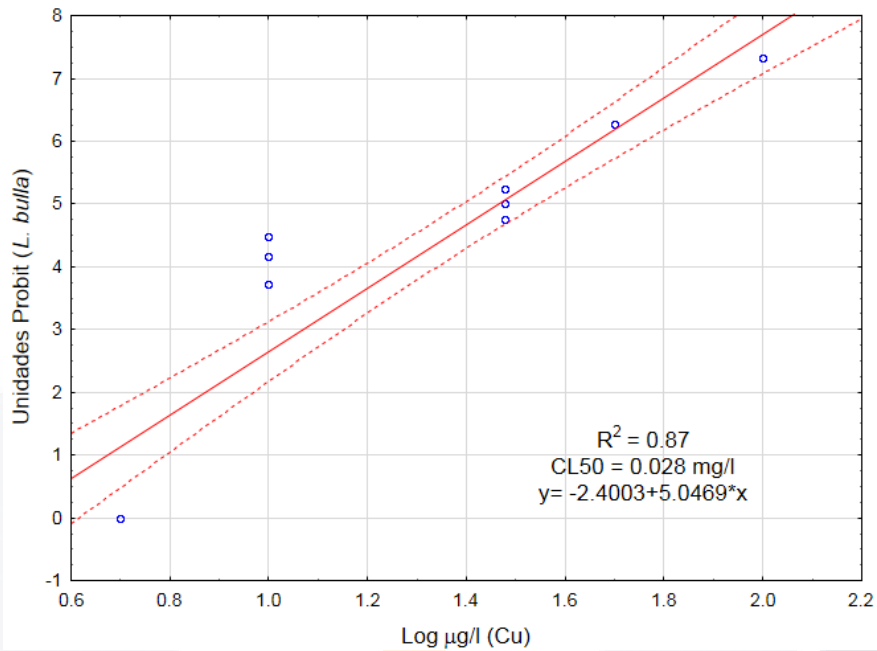


Figura 14: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

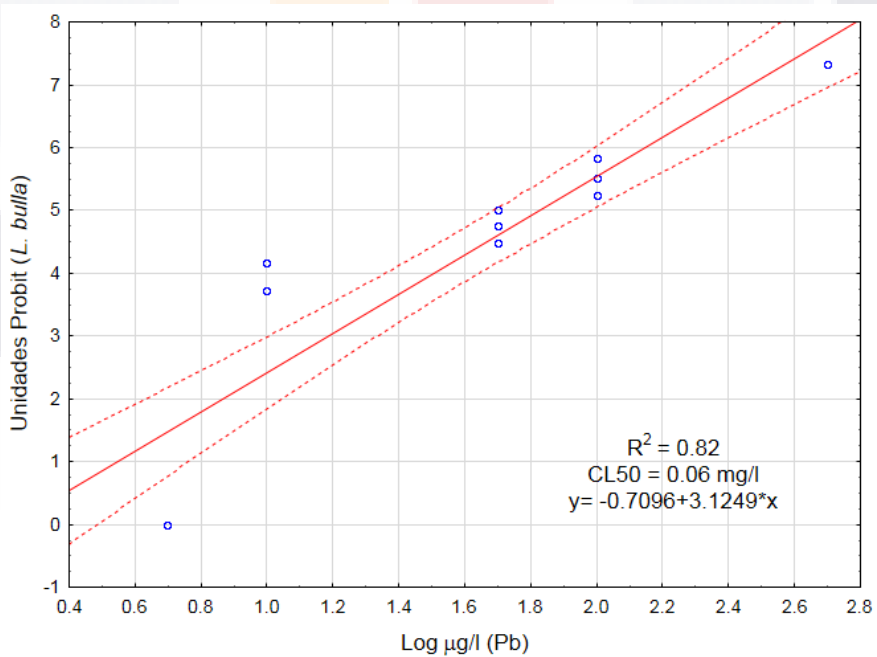


Figura 15: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

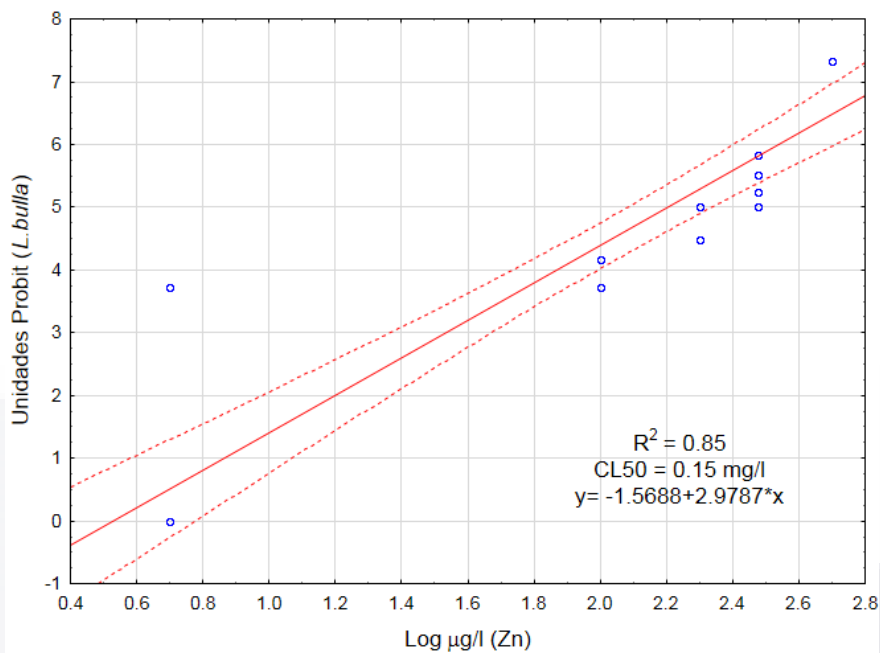


Figura 16: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

En la Tabla 7 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. cornuta*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 17 a la 21 que muestran la ecuación de la recta y la regresión lineal simple de cada cultivo.

Tabla 7: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. cornuta* con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.

Metal	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
As	2.38	3.61	0.7	2	0.71	2.93 – 4.44	22.38
Cd	0.17	0.35	0.05	0.1	0.73	0.26 - 0.46	22.90
Cu	0.025	0.040	0.01	0.3	0.78	0.034 - 0.047	19.54
Pb	0.046	0.11	0.005	0.05	0.90	0.089 - 0.142	17.11
Zn	0.19	0.36	0.05	0.1	0.77	0.28 - 0.48	17.15

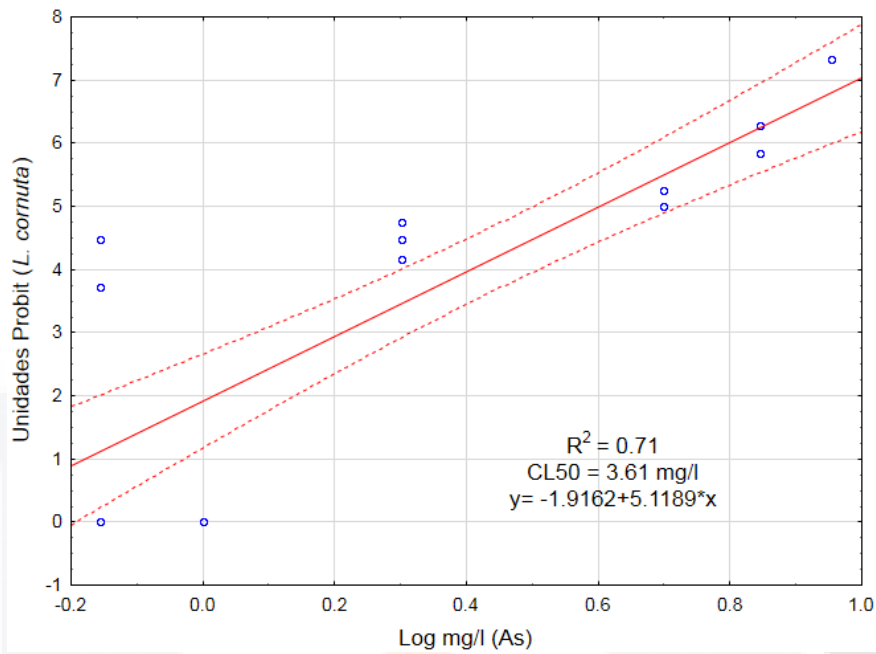


Figura 17: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

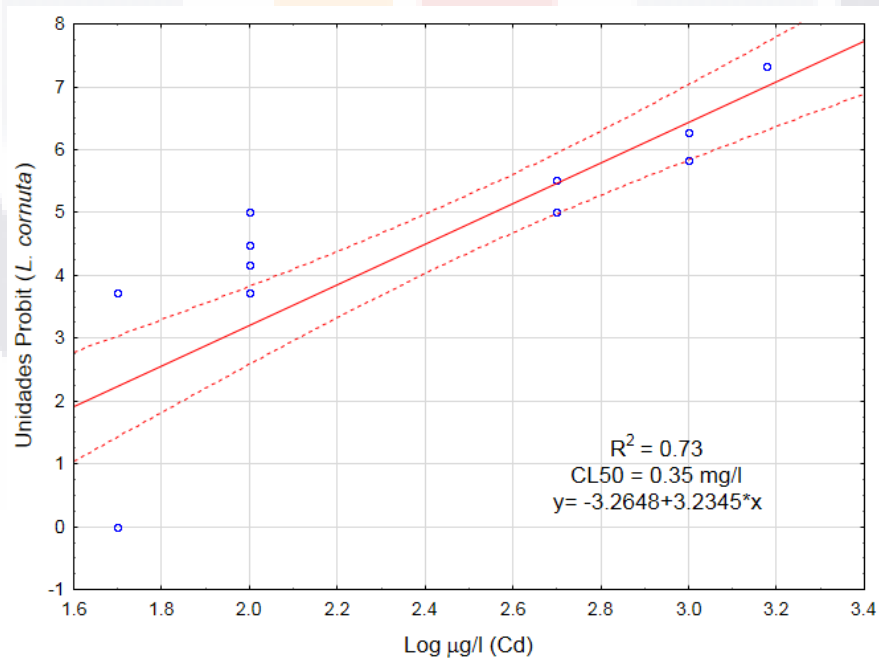


Figura 18: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

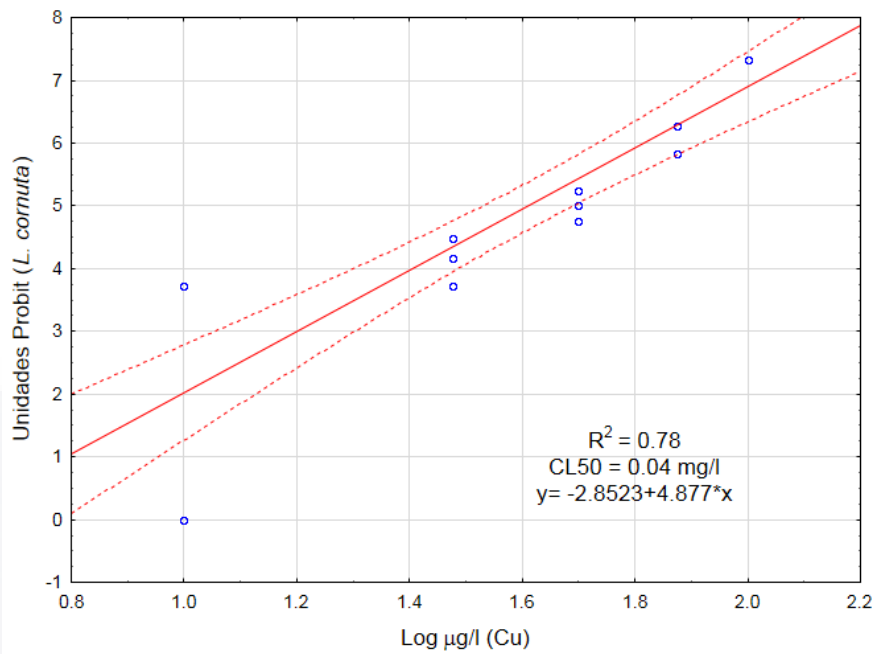


Figura 19: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

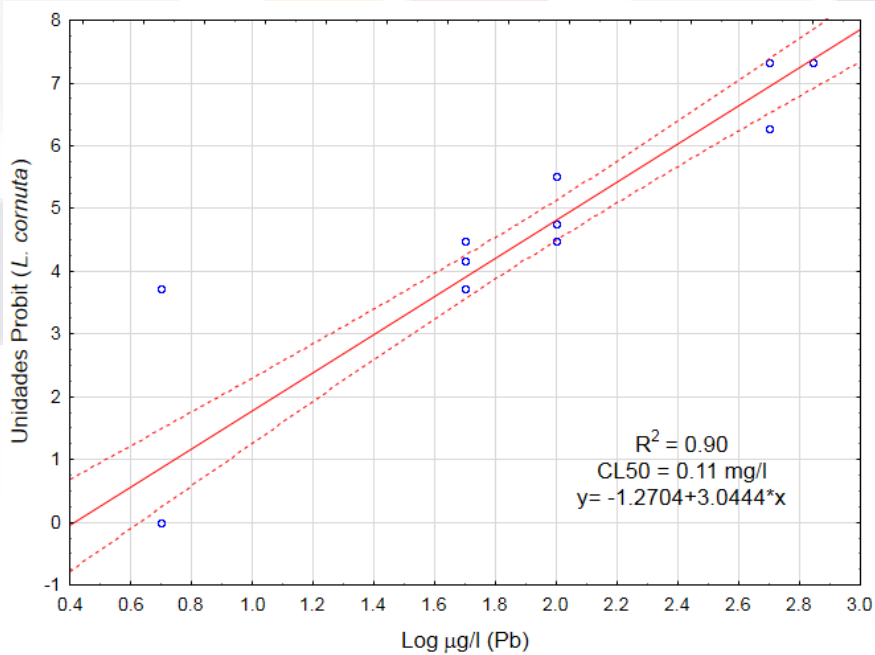


Figura 20: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

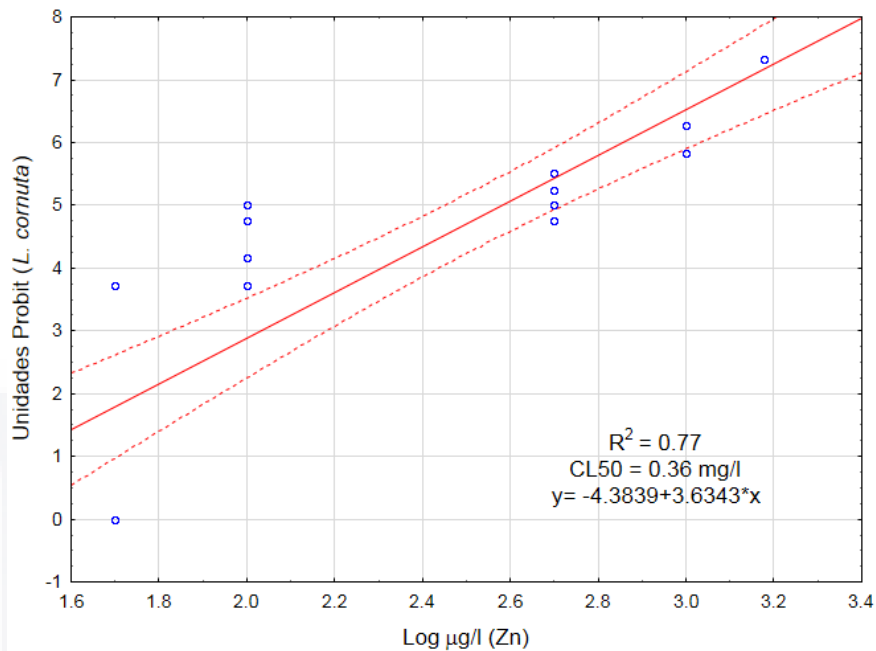


Figura 21: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

En la Tabla 8 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. luna*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 22 a la 26 que muestran la ecuación de la recta y la regresión lineal simple de cada cultivo.

Tabla 8: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. luna* con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.

Metal	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
As	1.92	2.52	1	2	0.79	2.28 – 2.77	9.78
Cd	0.007	0.024	0.0005	0.001	0.77	0.014 - 0.042	6.28
Cu	0.071	0.094	0.05	0.07	0.76	0.085 - 0.10	10.75
Pb	0.06	0.13	0.01	0.05	0.87	0.10 - 0.16	18.65
Zn	0.047	0.096	0.005	0.01	0.95	0.084 - 0.11	4.17

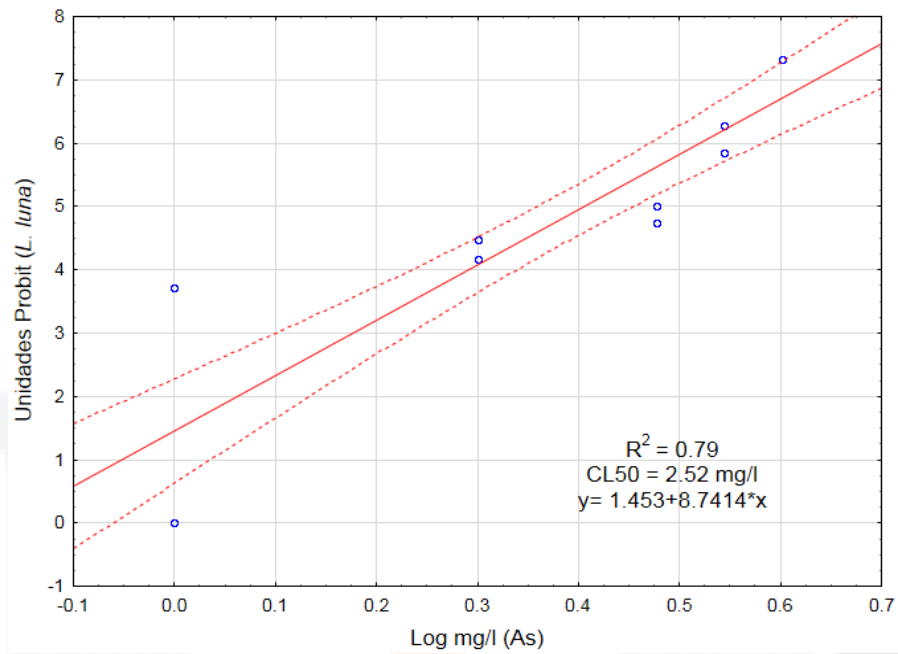


Figura 22: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

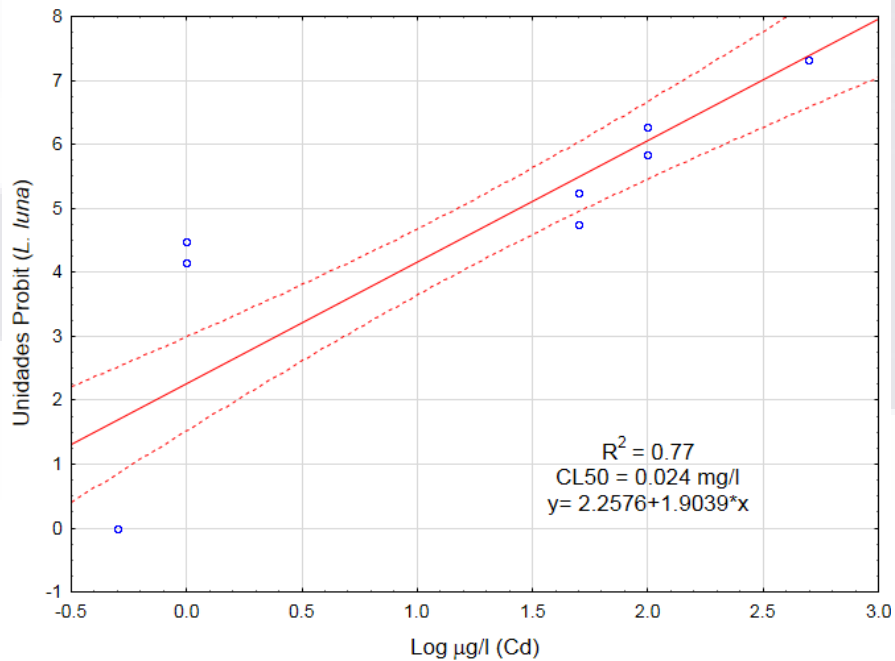


Figura 23: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

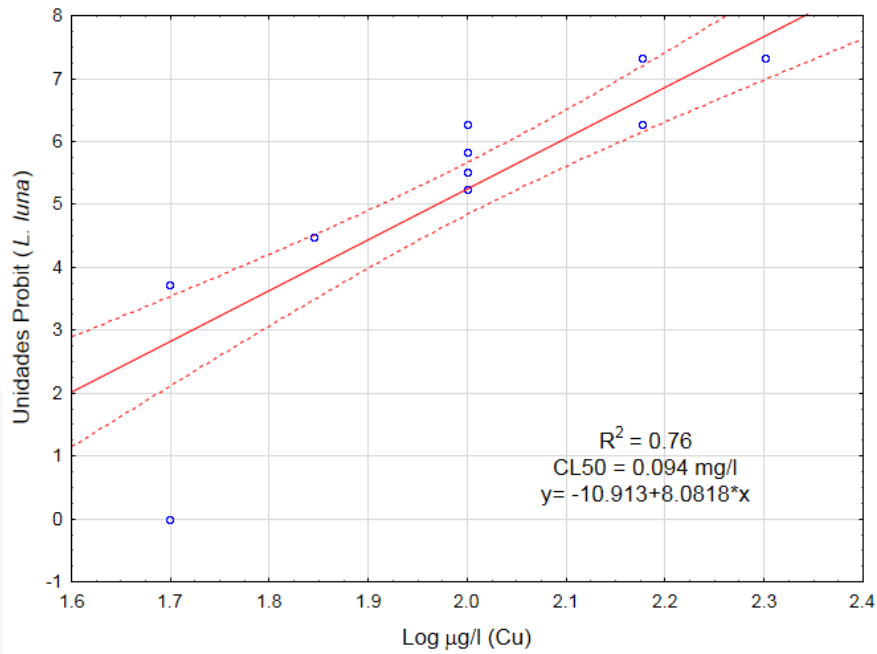


Figura 24: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

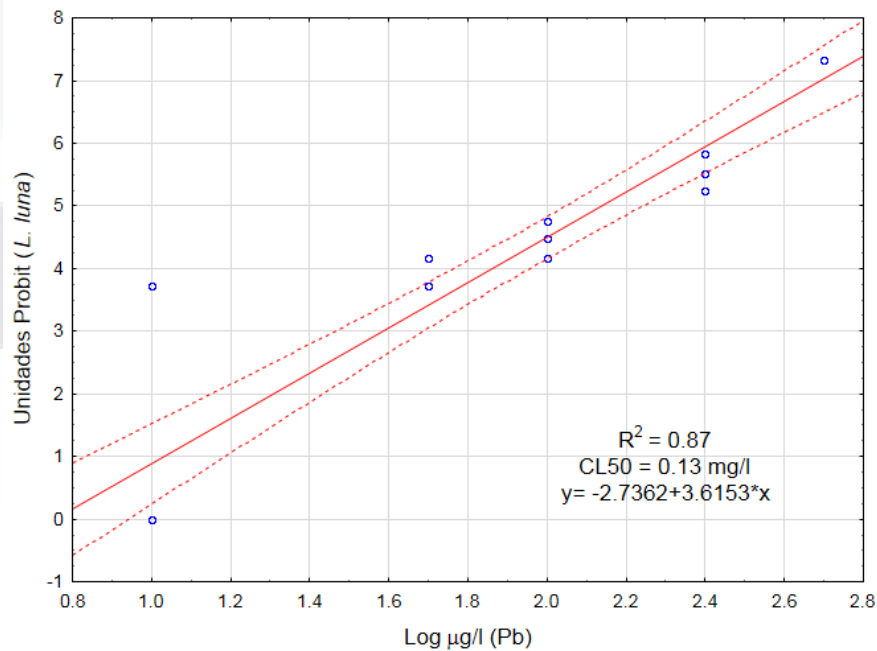


Figura 25: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

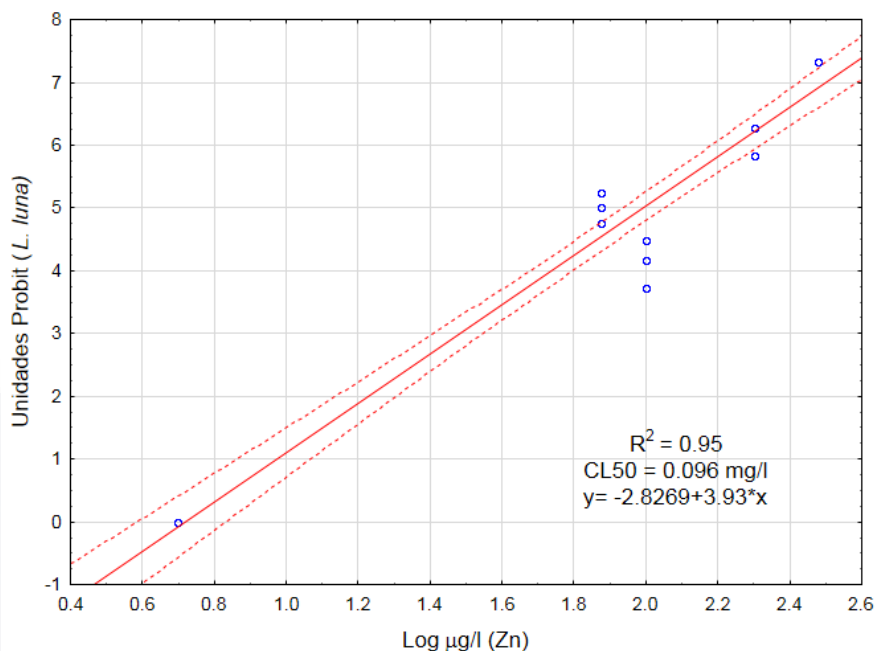


Figura 26: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

En la Tabla 9 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. papuana*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 27 a la 31 que muestran la ecuación de la recta y la regresión lineal simple de cada cultivo.

Tabla 9: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. papuana* con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.

Metal	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
As	1.24	1.93	0.5	1.5	0.74	1.63 - 2.28	16.54
Cd	0.12	0.22	0.05	0.15	0.80	0.19 - 0.27	20.26
Cu	0.023	0.045	0.005	0.01	0.82	0.034 - 0.058	19.30
Pb	0.008	0.023	0.001	0.005	0.86	0.017 - 0.03	23.95
Zn	0.48	0.89	0.1	0.75	0.81	0.72 - 1.10	26.26

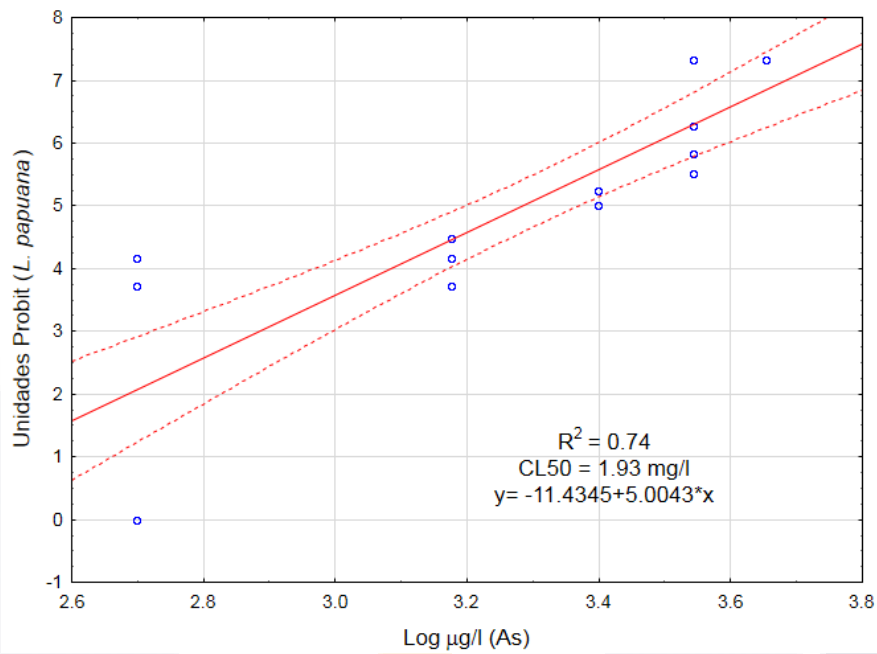


Figura 27: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

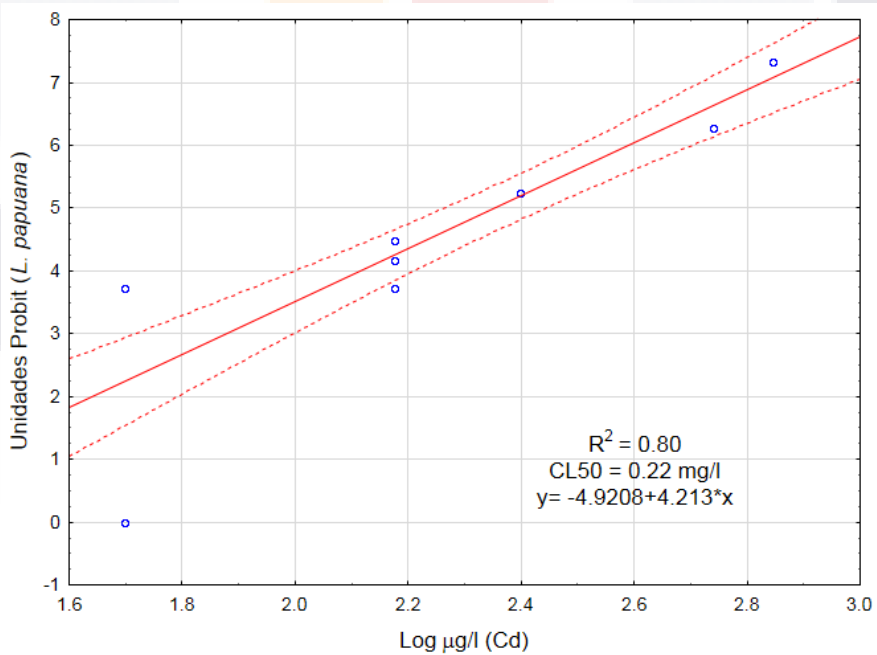


Figura 28: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

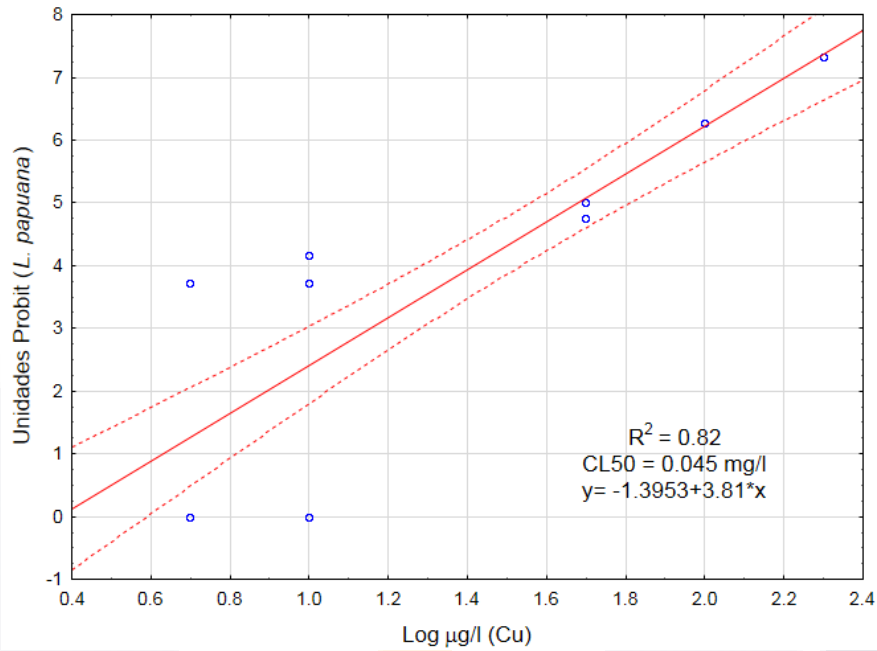


Figura 29: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

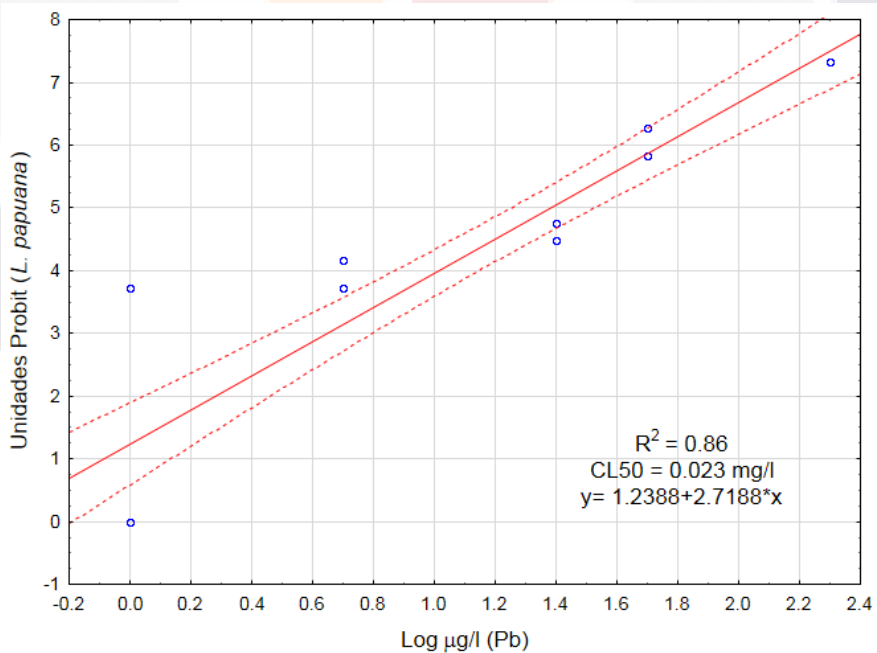


Figura 30: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

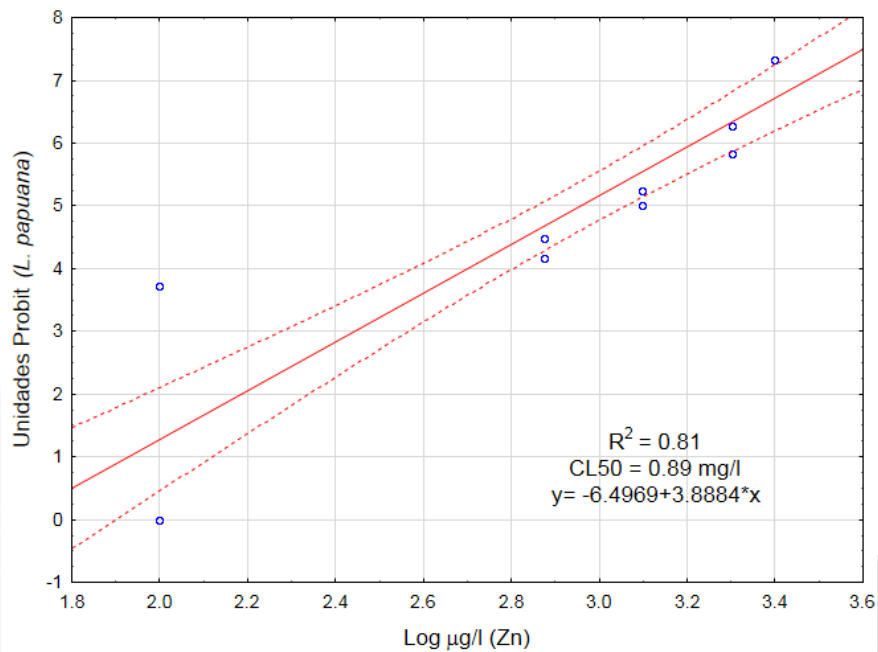


Figura 31: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

En la Tabla 10 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. quadridentata*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 32 a la 36 que muestran la ecuación de la recta y la regresión lineal simple de cada cultivo.

Tabla 10: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. quadridentata* con arsénico, cadmio, cobre, plomo y cinc.

Metal	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
As	3.12	3.84	2	2.75	0.84	3.58 – 4.11	8.82
Cd	0.21	0.32	0.1	0.3	0.79	0.28 - 0.36	20
Cu	0.043	0.072	0.01	0.05	0.99	0.070 - 0.075	3.73
Pb	0.22	0.29	0.1	0.2	0.88	0.26 - 0.31	6.67
Zn	0.24	0.35	0.1	0.25	0.90	0.32 - 0.38	12.43

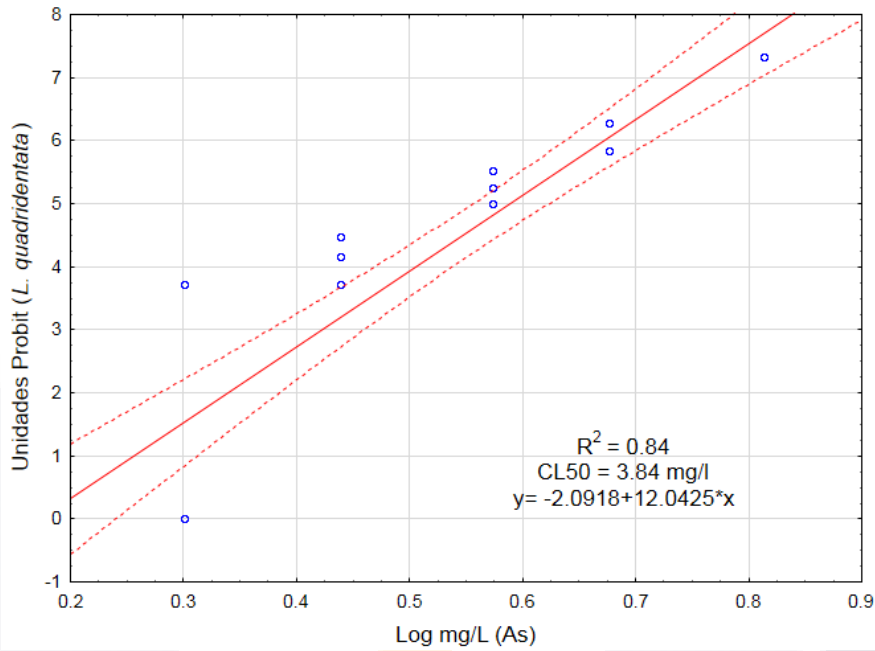


Figura 32: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con arsénico. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

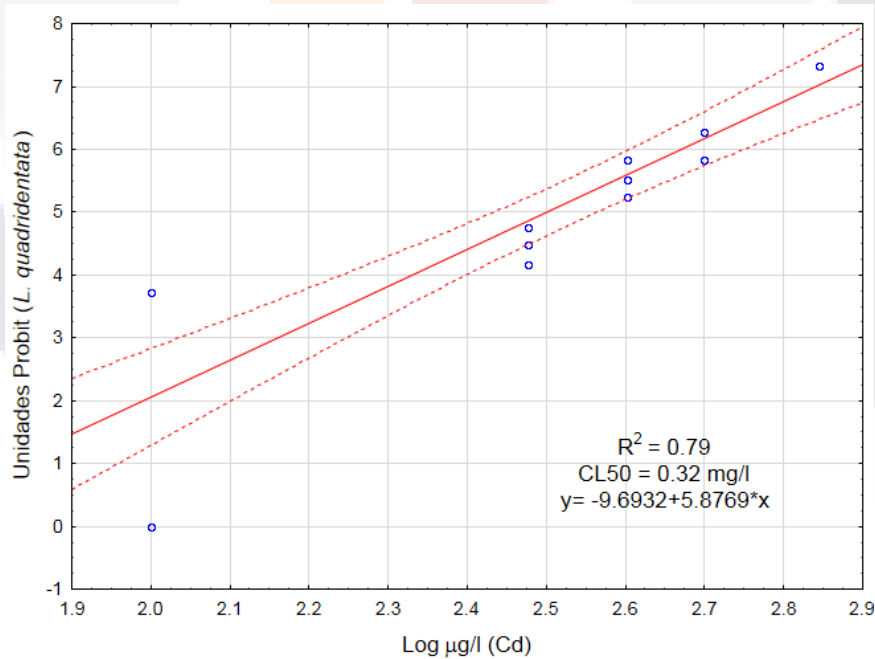


Figura 33: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con cadmio. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

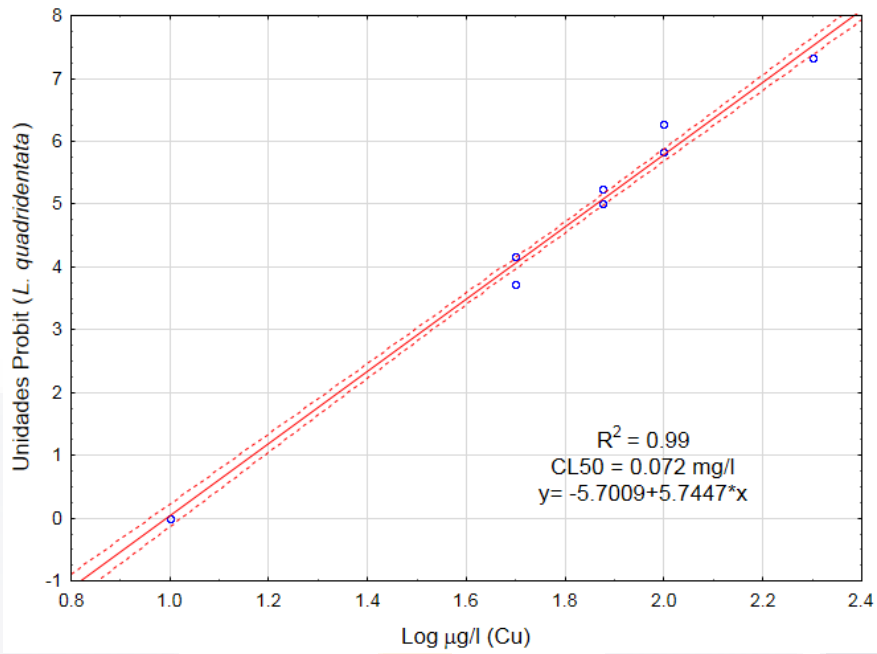


Figura 34: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con cobre. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

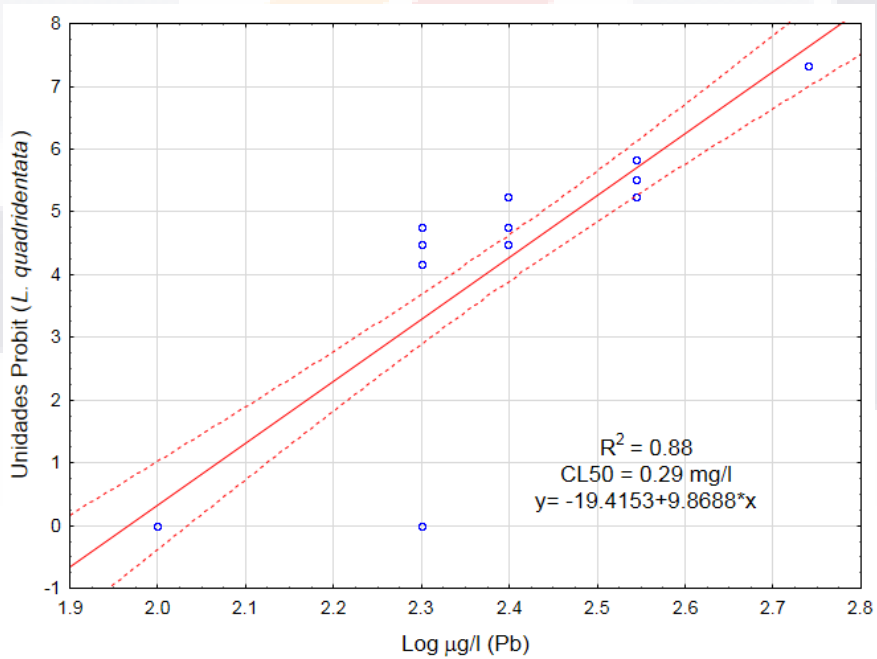


Figura 35: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

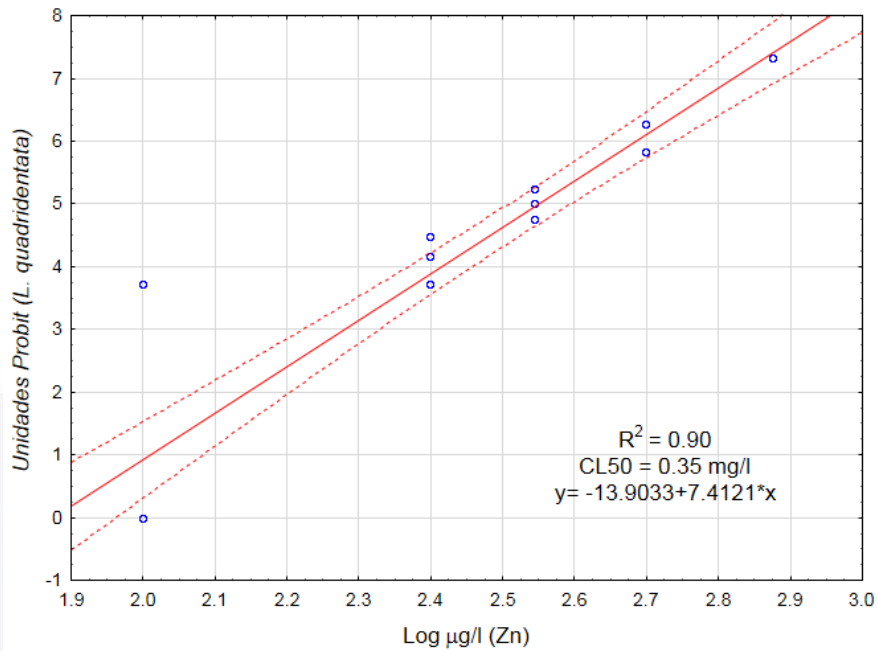


Figura 36: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con cinc. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

Las Figuras 37 a 41 muestran la comparación entre los valores del CL50 para los metales pesados en las cinco especies del género *Lecane*.

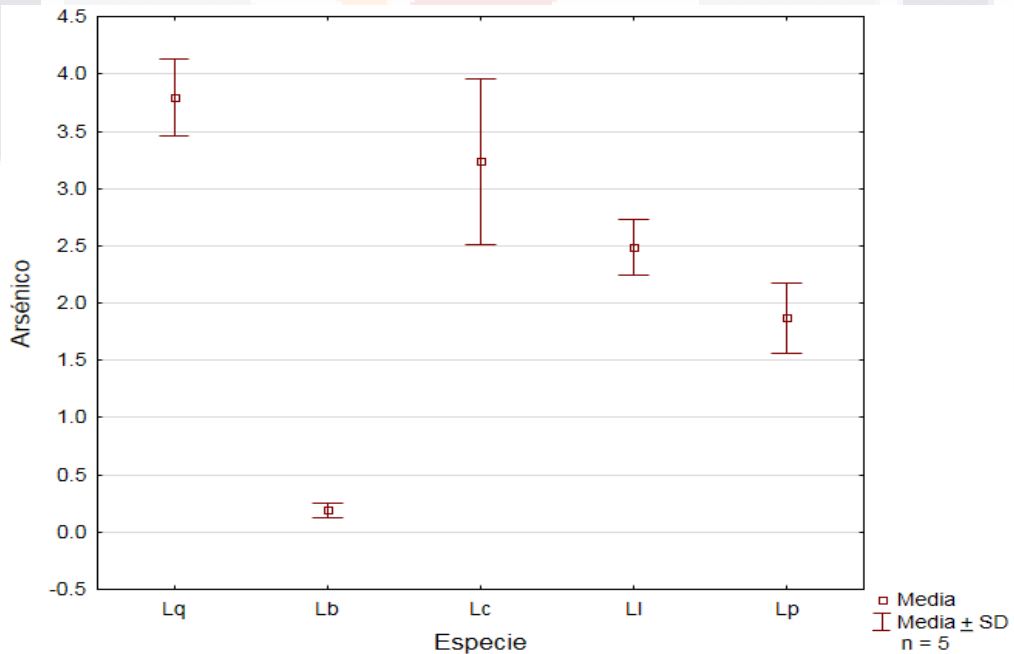


Figura 37: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con arsénico.

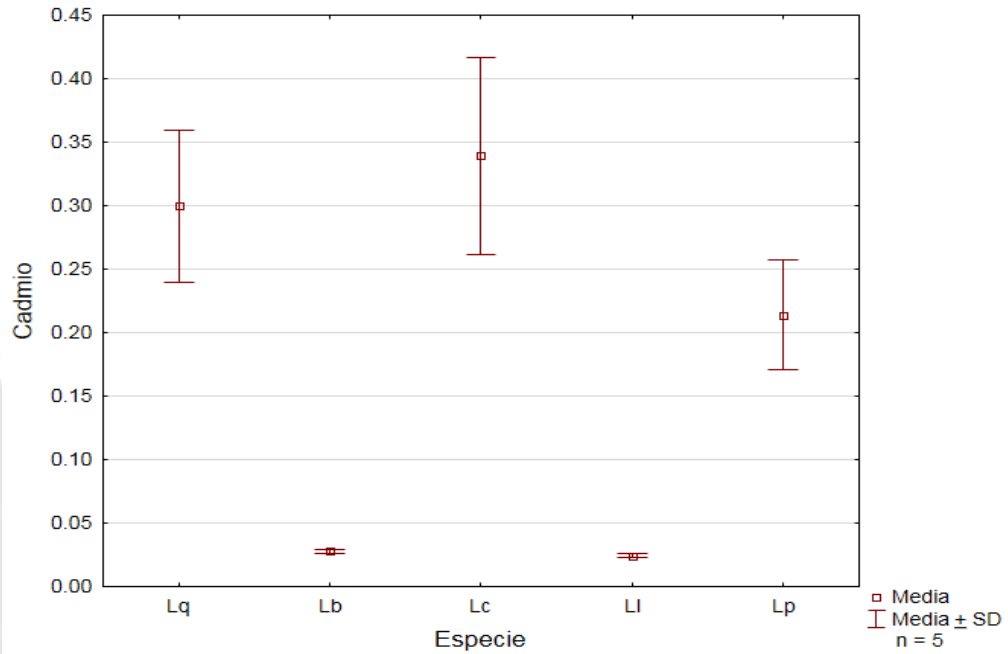


Figura 38: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con cadmio.

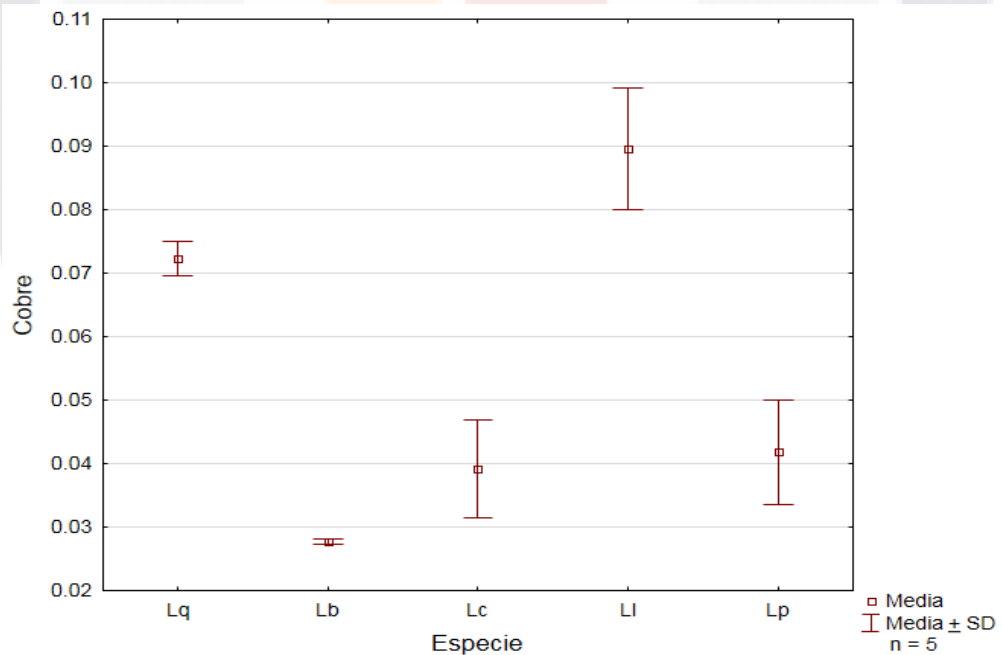


Figura 39: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con cobre.

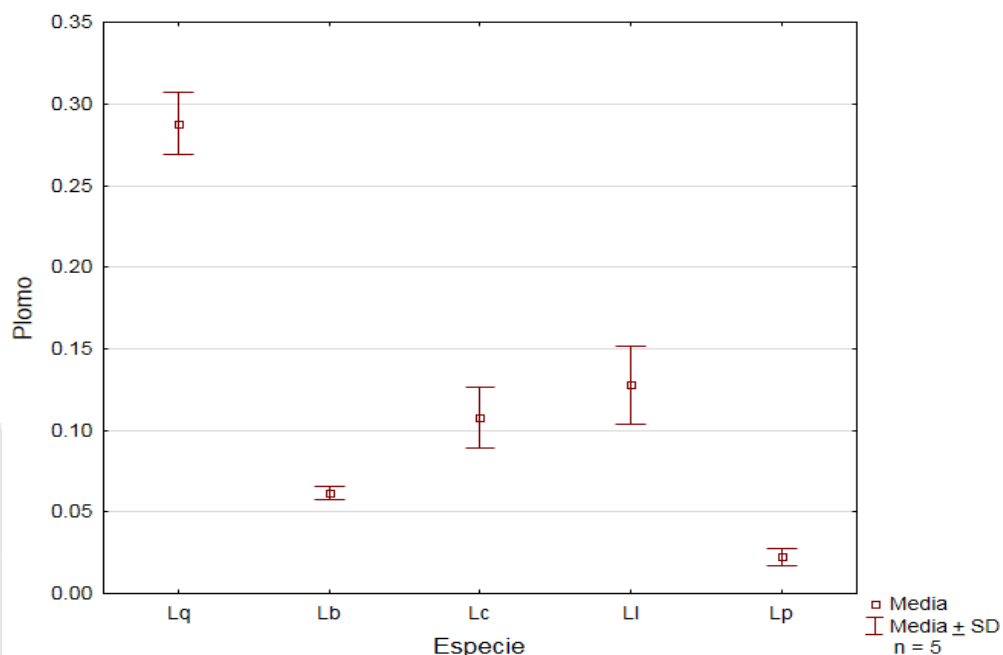


Figura 40: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* plomo.

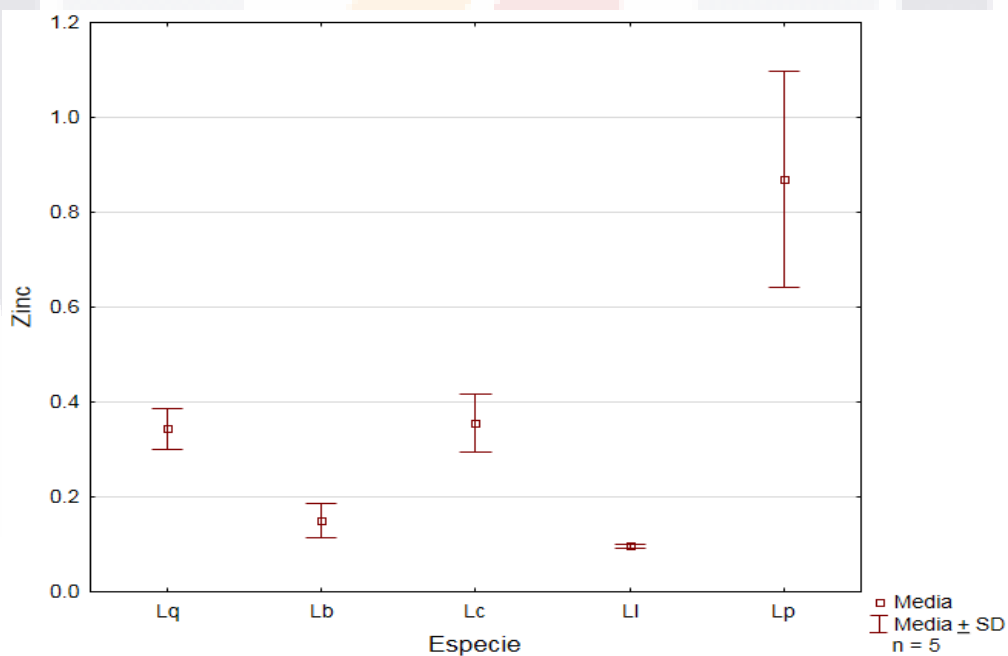


Figura 41: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con cinc.

En la Tabla 11 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R², LC y CV para las seis cepas de *L. quadridentata* (Lq-6, Lq-10-67, Lq-34, Lq-CV, Lq-10/11, y Lq-Ch) con plomo. Después de la tabla se presentan las figuras de la 42 a la 47 que muestran la ecuación de la recta y la regresión lineal simple de cada cultivo.

Tabla 11: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R², límites de confianza y coeficiente de variación para las seis cepas de *L. quadridentata* con plomo.

Cepa	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
Lq-6	0.22	0.29	0.1	0.2	0.88	0.26 - 0.31	6.67
Lq-10-67	0.20	0.28	0.1	0.2	0.86	0.25 - 0.31	9.86
Lq-34	0.20	0.26	0.1	0.2	0.94	0.24 - 0.27	3.52
Lq-CV	0.22	0.31	0.1	0.2	0.94	0.29 - 0.33	4.82
Lq-10/11	0.22	0.32	0.1	0.25	0.84	0.28 - 0.36	12.28
Lq-Ch	0.27	0.38	0.1	0.3	0.96	0.36 - 0.41	1.48

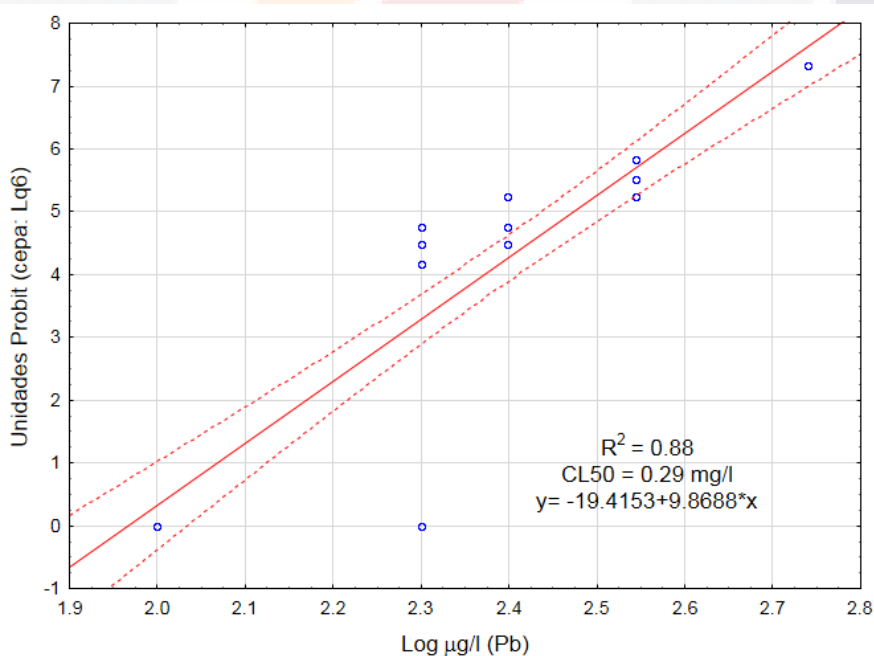


Figura 42: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq6 de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R², CL50 y la ecuación de la recta.

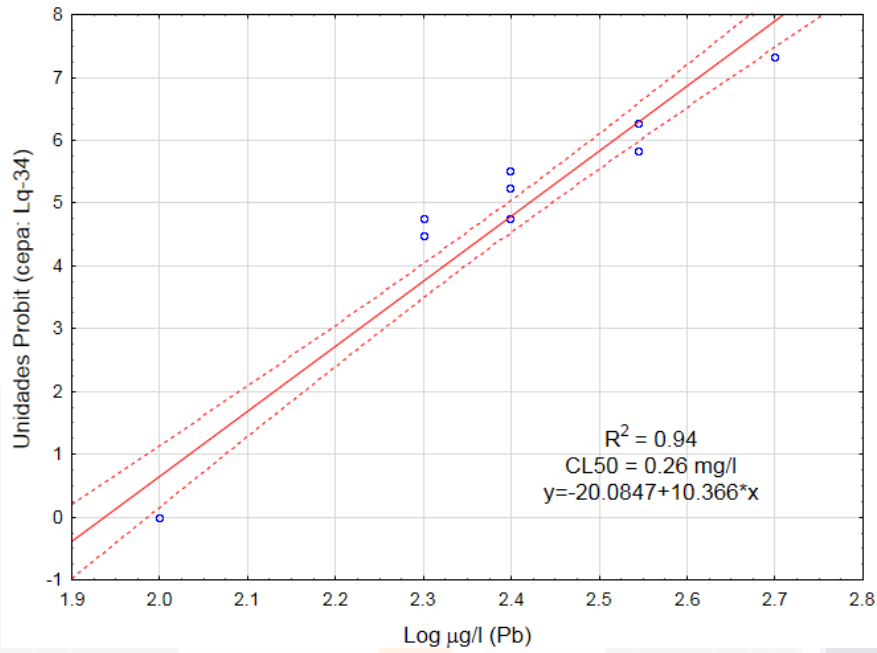


Figura 43: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq-34 de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

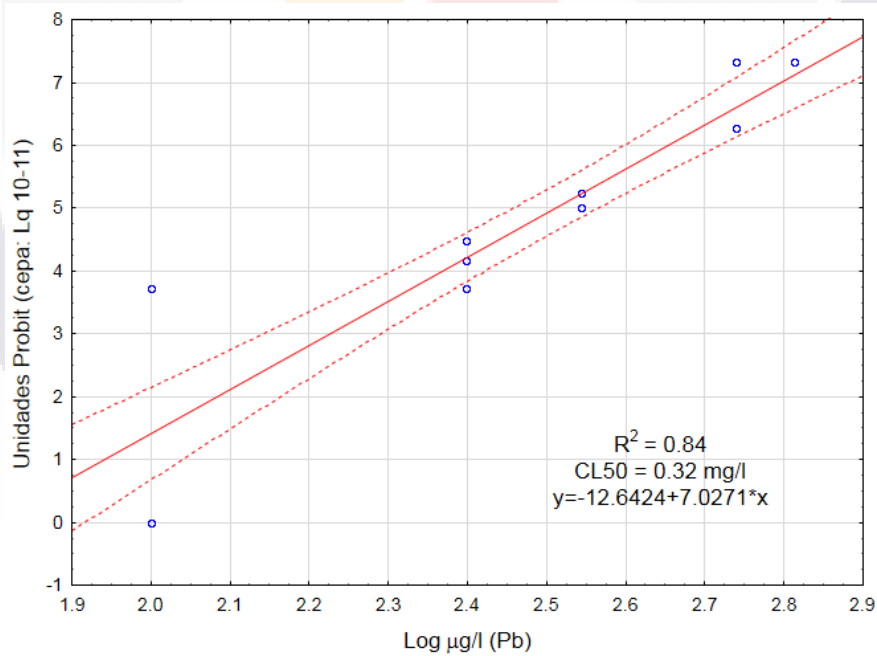


Figura 44: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq 10-11 de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

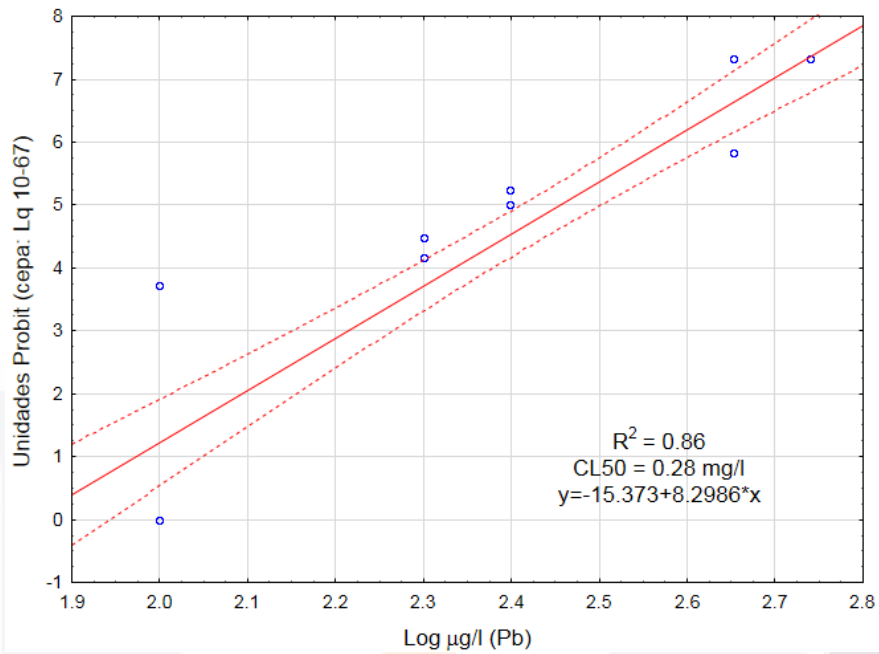


Figura 45: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq 10-67 de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

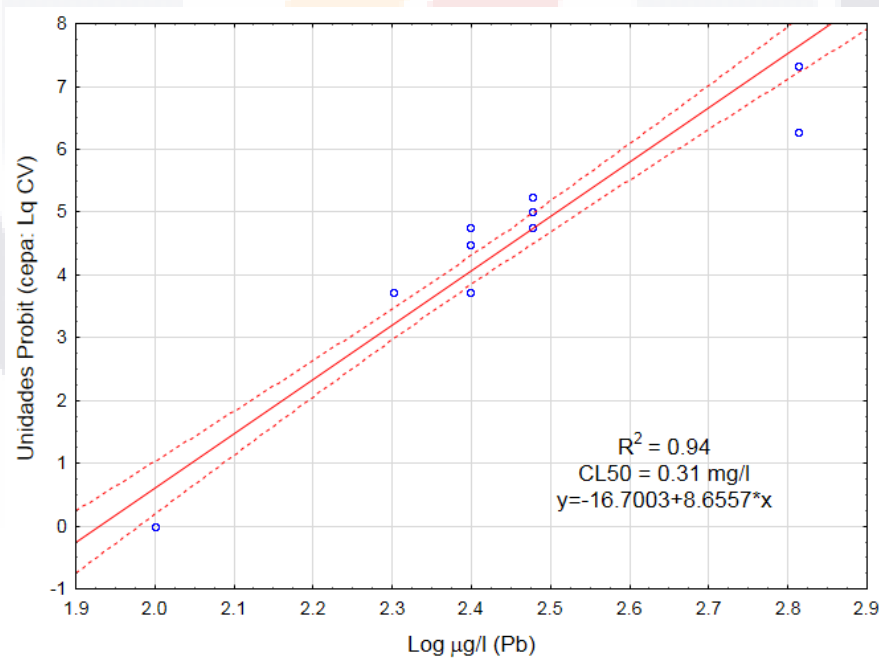


Figura 46: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa Lq-CV de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

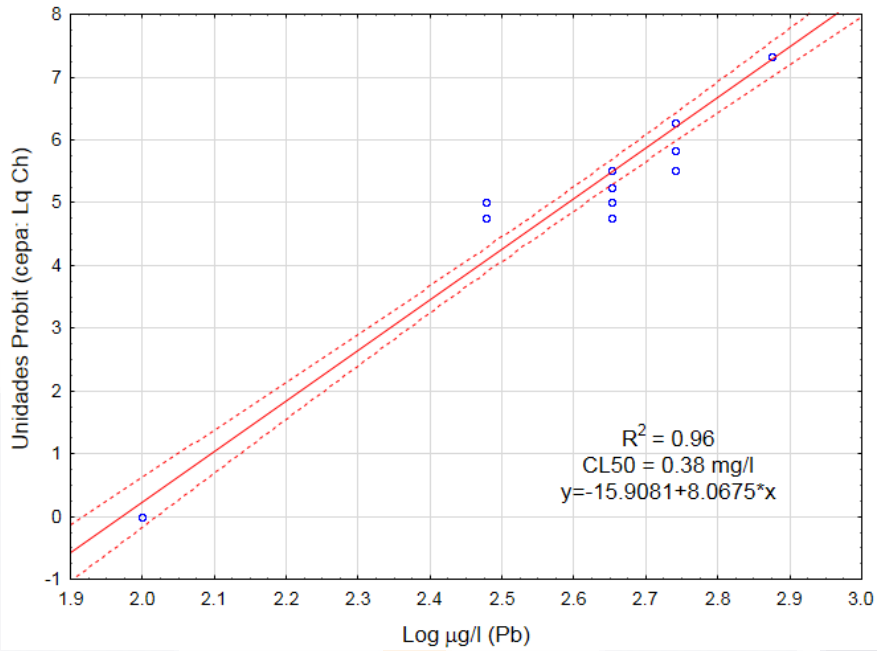


Figura 47: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la cepa LqCh de *L. quadridentata* con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

La Figura 48 muestra la comparación entre los valores del CL50 para plomos de las seis cepas de *L. quadridentata*.

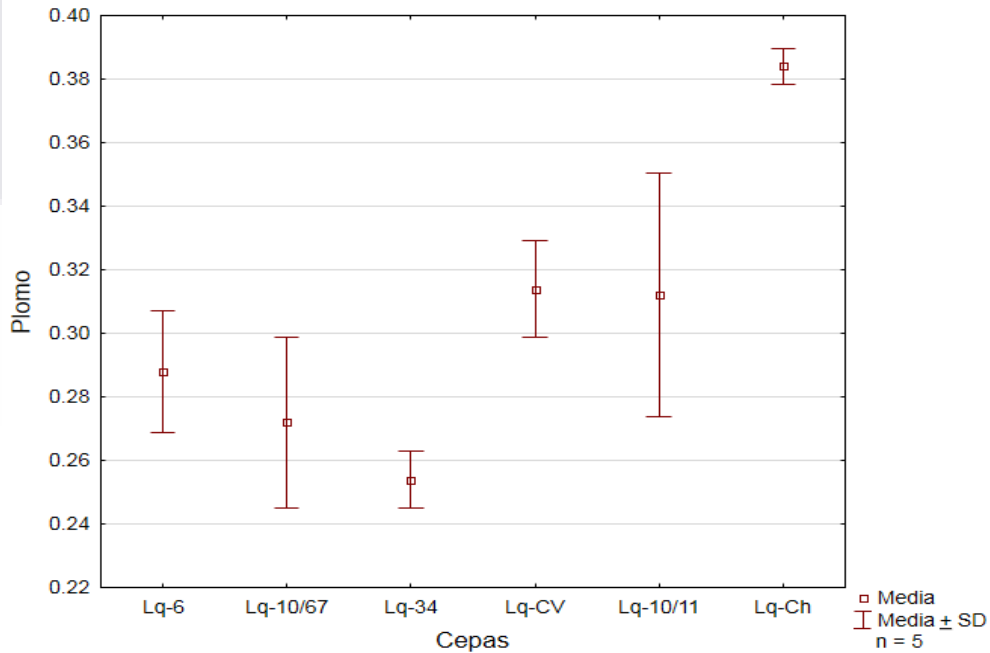


Figura 48: Comparación de los valores de CL50 para las cepas de *L. quadridentata* con plomo.

En la Tabla 12 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para las ocho clonas de la especie *L. quadridentata* (Lq 10-67, R1, R5, R6, R8, R9, R10 y R16). Después de la tabla se presentan las figuras de la 49 a la 55 que muestran la regresión lineal simple de cada cultivo con la ecuación de la recta.

Tabla 12: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para las ocho clonas de *L. quadridentata* con plomo.

Clona	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
Lq-10-67	0.20	0.28	0.1	0.2	0.86	0.25 - 0.31	9.86
Lq - R1	0.47	0.69	0.2	0.3	0.83	0.60 - 0.80	1.77
Lq - R5	0.24	0.36	0.1	0.2	0.81	0.31 - 0.41	14.4
Lq - R6	0.22	0.31	0.1	0.2	0.96	0.29 - 0.32	2.9
Lq - R8	0.16	0.26	0.05	0.1	0.91	0.23 - 0.30	2.07
Lq - R9	0.22	0.33	0.1	0.2	0.83	0.29 - 0.38	11.67
Lq - R10	0.22	0.31	0.1	0.2	0.86	0.28 - 0.35	10.93
Lq - R16	0.34	0.45	0.2	0.3	0.80	0.40 - 0.49	8.9

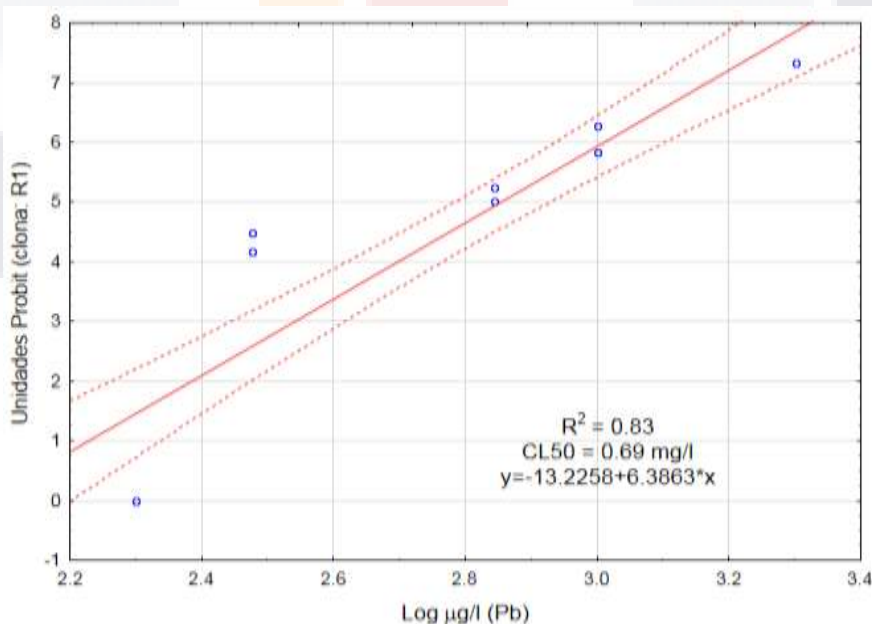


Figura 49: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R1 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

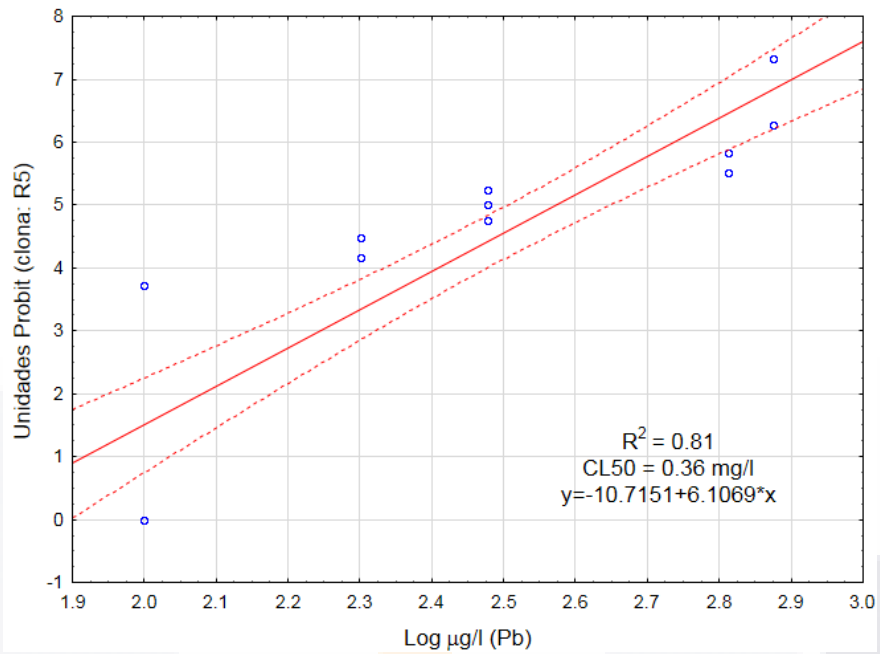


Figura 50: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R5 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

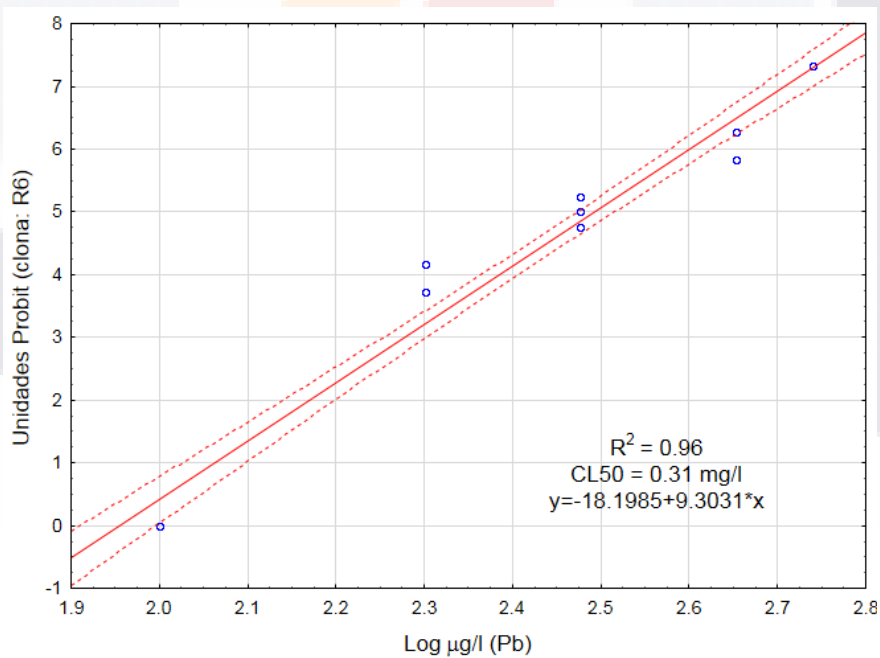


Figura 51: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R6 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

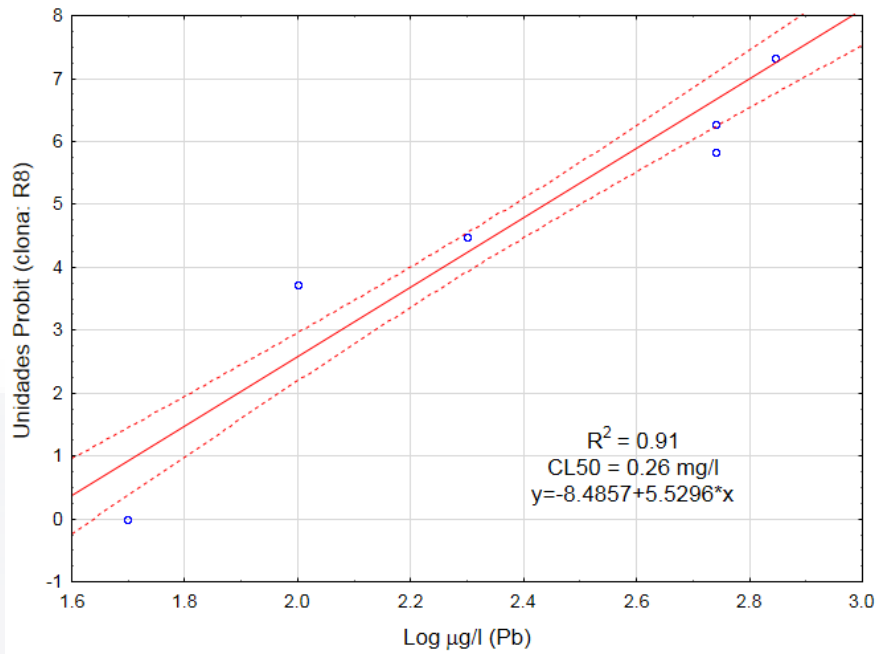


Figura 52: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R8 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

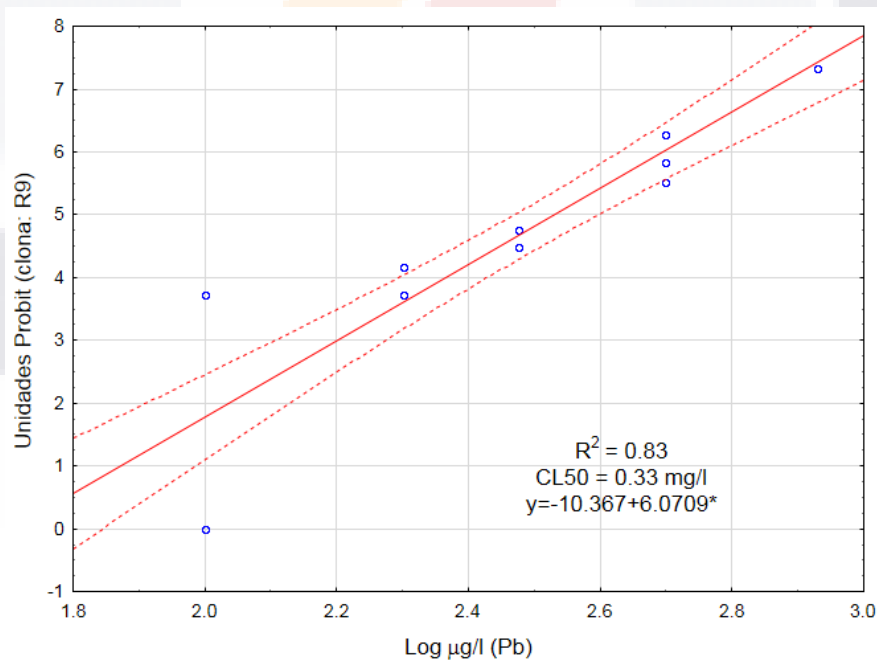


Figura 53: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R9 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

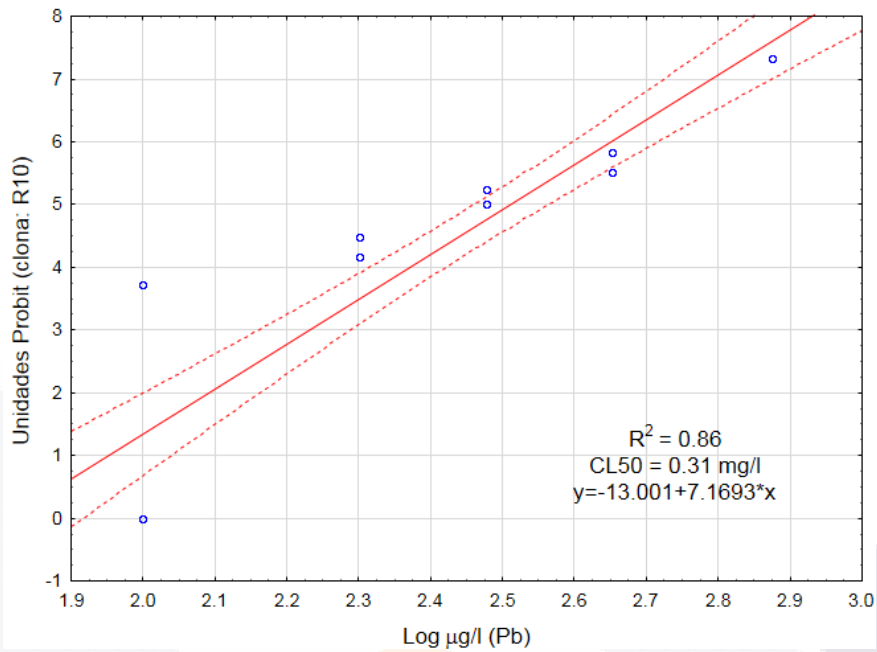


Figura 54: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R10 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

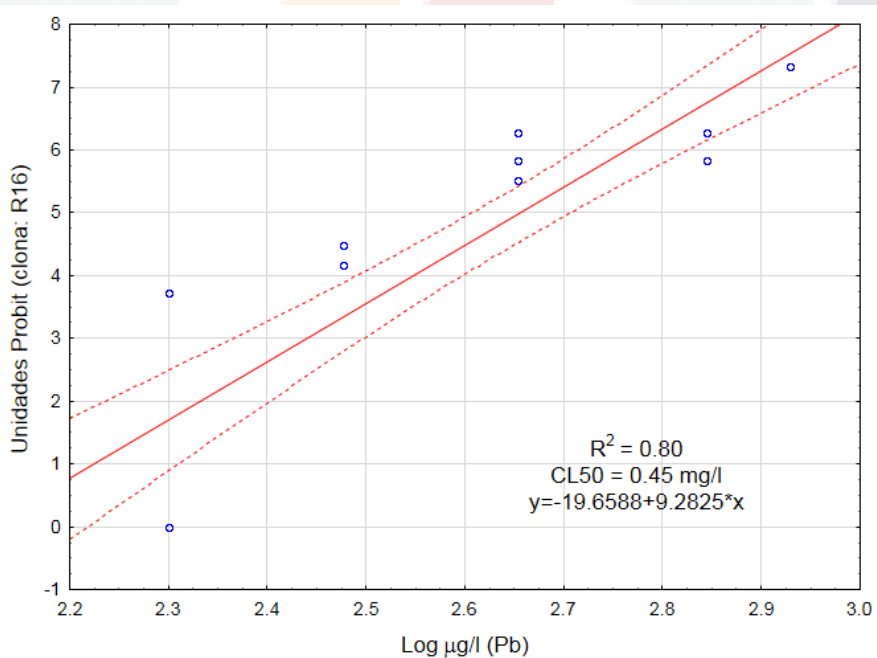


Figura 55: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración la clona de *L. quadridentata* R16 con plomo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

La Figura 56 muestra la comparación entre los valores del CL50 para plomo en las ocho cepas de *L. quadridentata*.

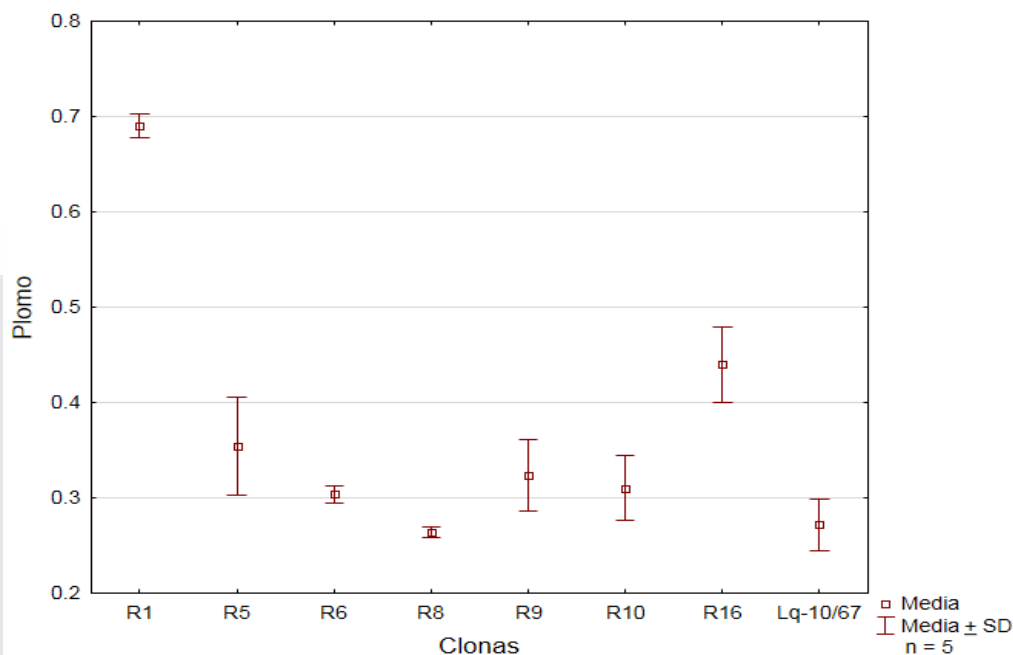


Figura 56: Comparación de los valores de CL50 para las ocho clonas de *L. quadridentata* con plomo.

En la Tabla 13 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R², LC y CV para la especie *L. bulla*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 57 a la 61 que muestran la regresión lineal simple de cada cultivo con la ecuación de la recta.

Tabla 13: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R², límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. bulla* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.

Toxico	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R2	L.C. al 95% de la CL50	C. V. %
Carbarilo	0.53	1.01	0.1	0.5	0.95	0.91 – 1.14	2.16
Deltametrina	0.33	0.90	0.05	0.1	0.77	0.59 – 1.3	27.33
Glifosato	177.82	190.54	160	170	0.62	181.9–199.5	0.46
Metil paratión	1.41	2.32	0.5	1	0.81	1.94 – 2.78	14.34
Vinclozolin	18.50	30.82	5	10	0.83	25.45 – 37.3	4.31

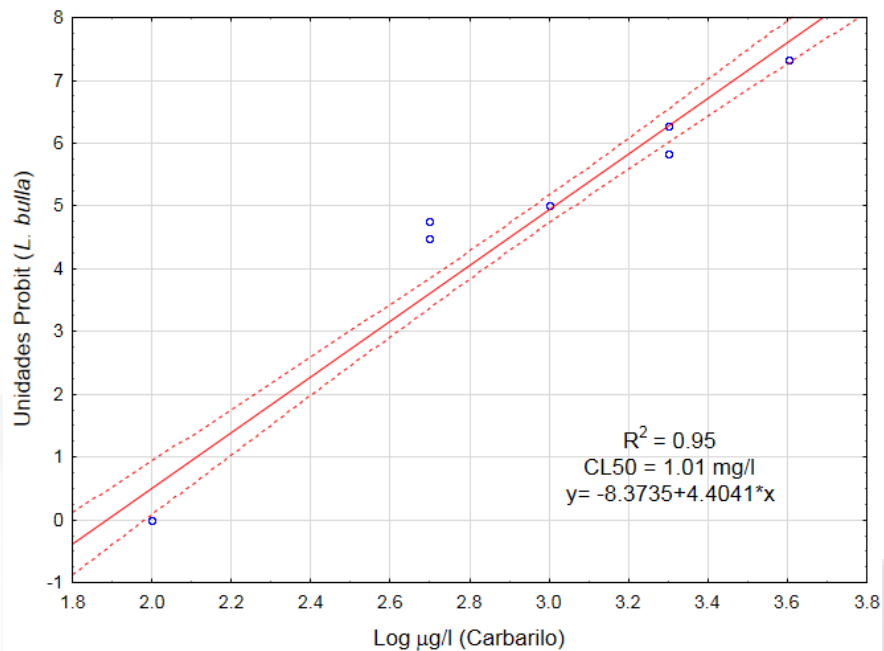


Figura 57: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

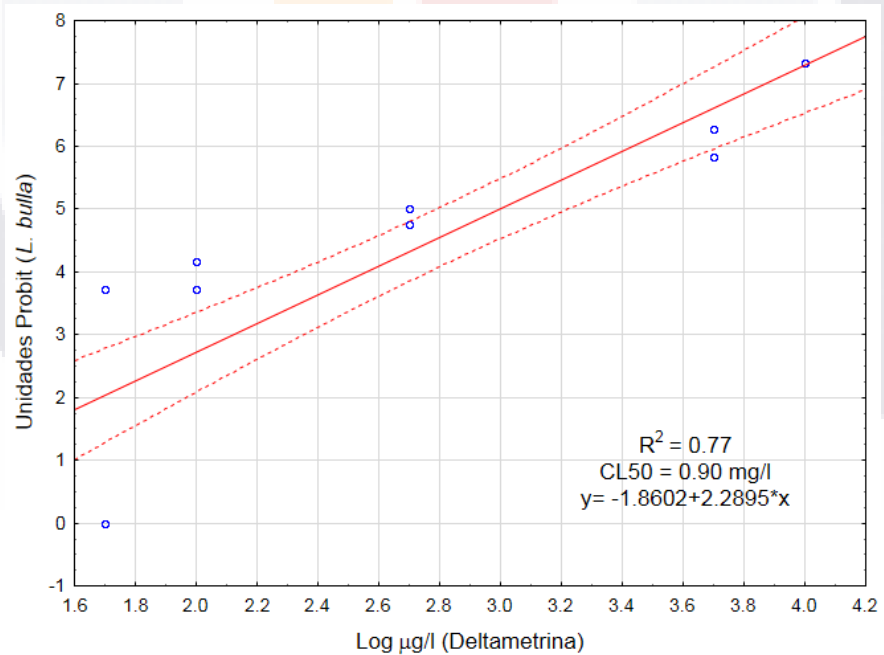


Figura 58: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

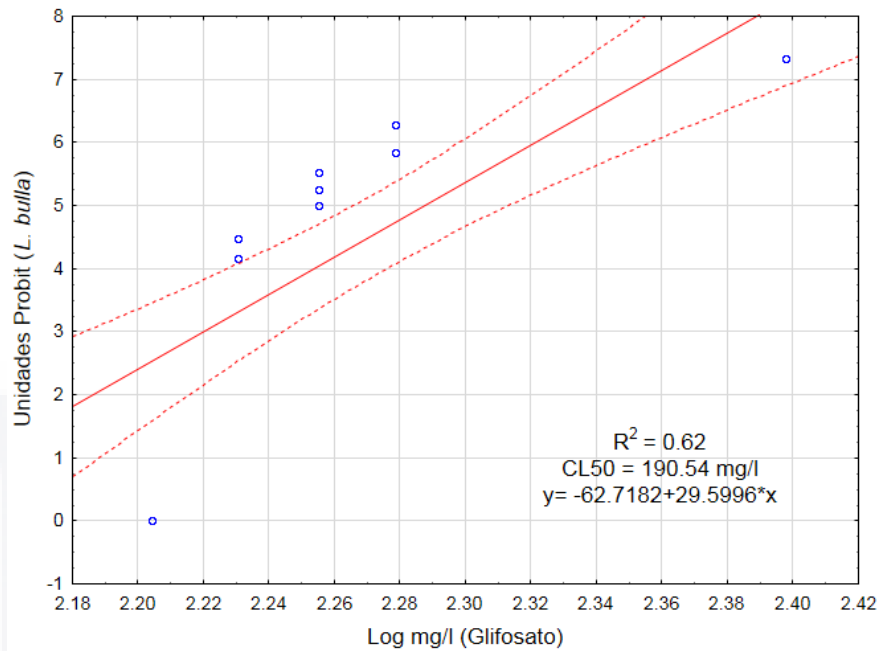


Figura 59: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

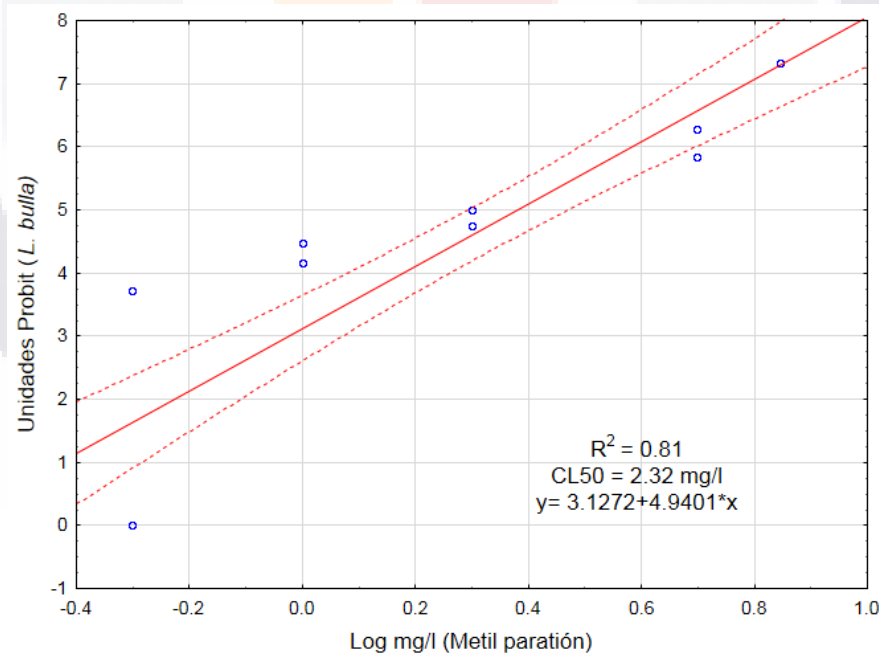


Figura 60: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con metil paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

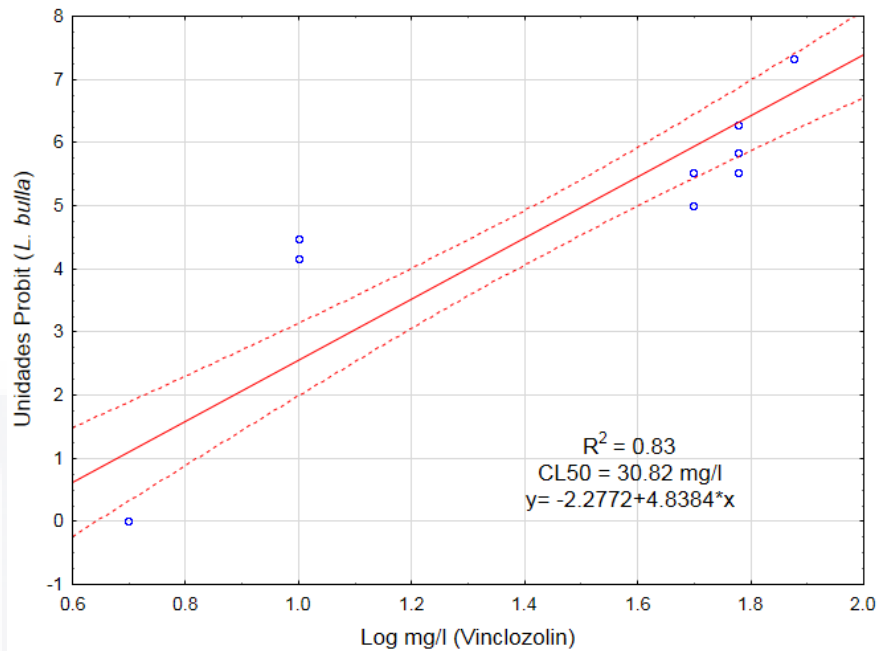


Figura 61: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. bulla* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

En la Tabla 14 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. cornuta*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 62 a la 66 que muestran la regresión lineal simple de cada cultivo con la ecuación de la recta.

Tabla 14: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. cornuta* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.

Toxico	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
Carbarilo	0.68	1.37	0.1	0.5	0.93	1.18 – 1.59	8.18
Deltametrina	0.059	0.18	0.005	0.01	0.81	0.11 – 0.30	8.15
Glifosato	41.99	67.87	10	50	0.99	65.89 – 69.90	2.85
Metil-paratión	5.25	9.10	1	5	0.95	8.24 – 10.05	2.34
Vinclozolin	127.6	151.2	80	110	0.92	144.61–157.72	1.10

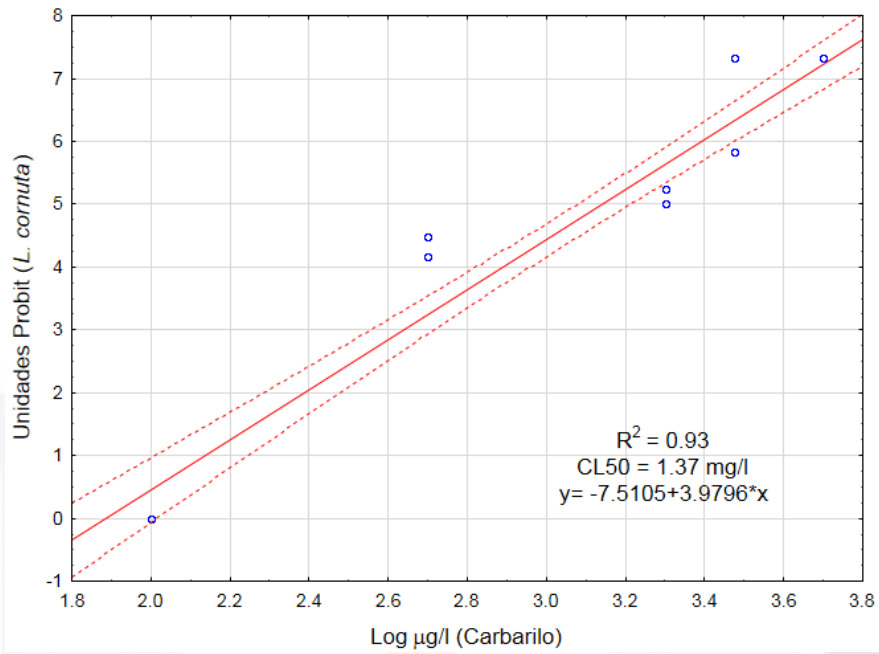


Figura 62: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

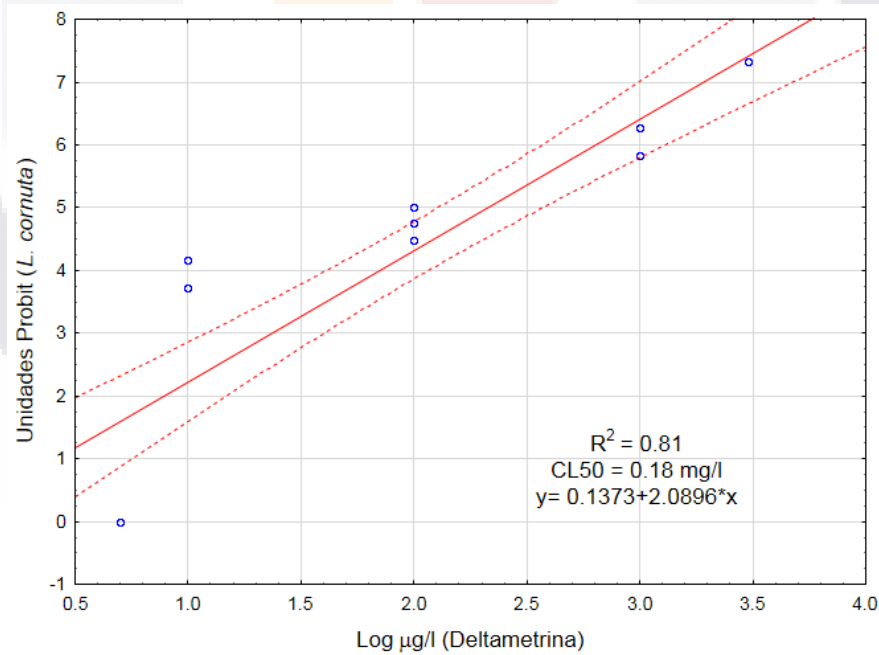


Figura 63: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

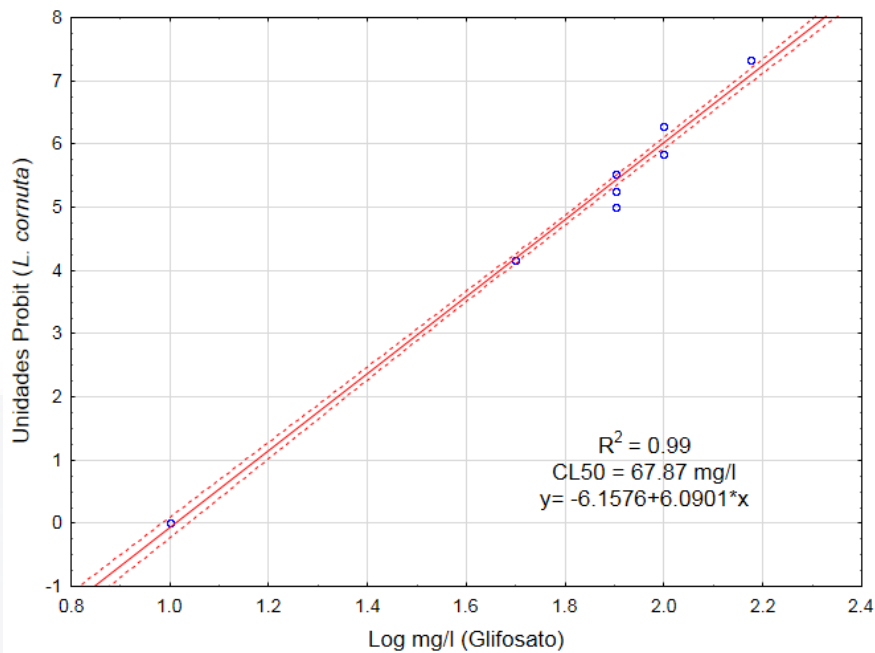


Figura 64: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

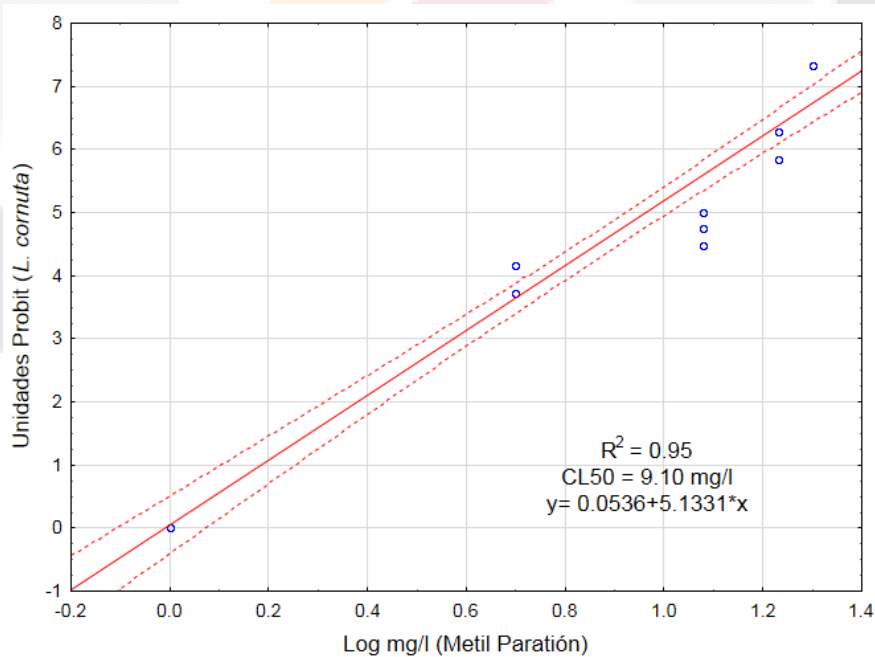


Figura 65: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con metil paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

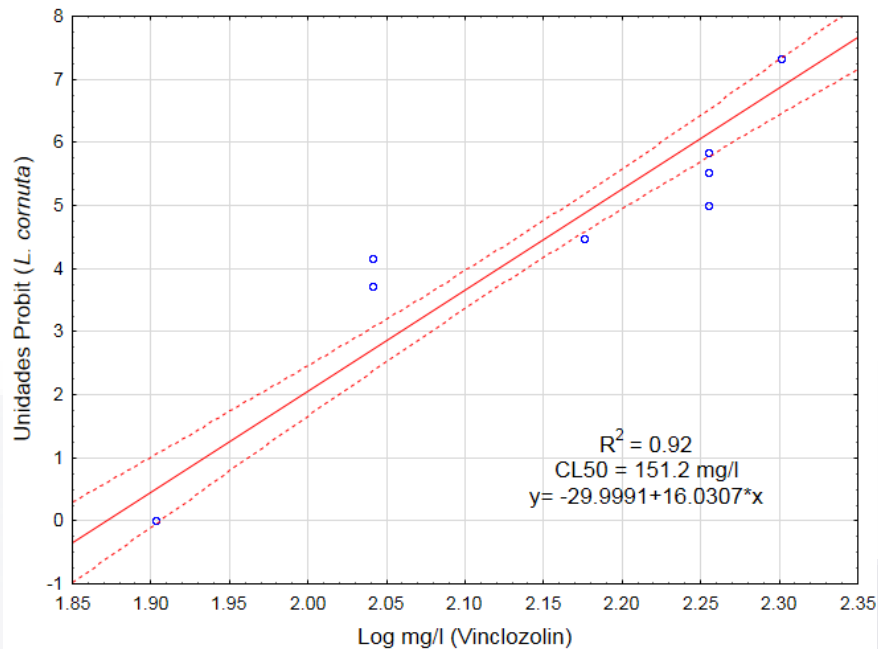


Figura 66: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. cornuta* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

En la Tabla 15 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. luna*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 67 a la 71 que muestran la regresión lineal simple de cada cultivo con la ecuación de la recta.

Tabla 15: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. luna* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.

Toxico	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
Carbarilo	0.58	1.27	0.05	0.1	0.79	0.96 – 1.68	27.37
Deltametrina	0.004	0.007	0.003	0.0035	0.50	0.005–0.01	13.68
Glifosato	163.81	173.93	140	160	0.96	172.1– 175.7	0.37
Metil-paratión	2.39	3.61	1	3	0.83	3.15 – 4.15	24.63
Vinclozolin	88.33	111.69	50	80	0.90	104.4–119.1	2.6

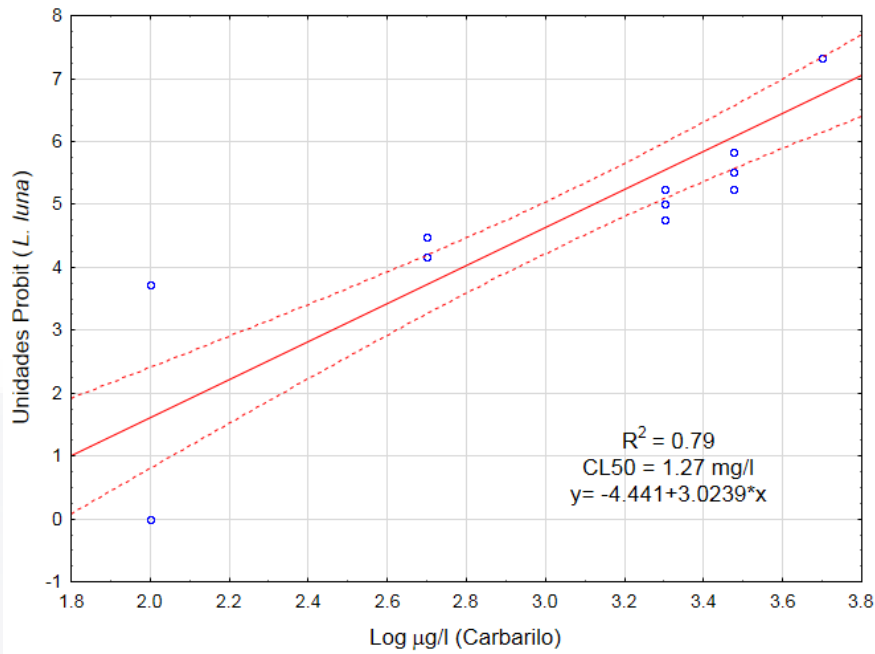


Figura 67: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

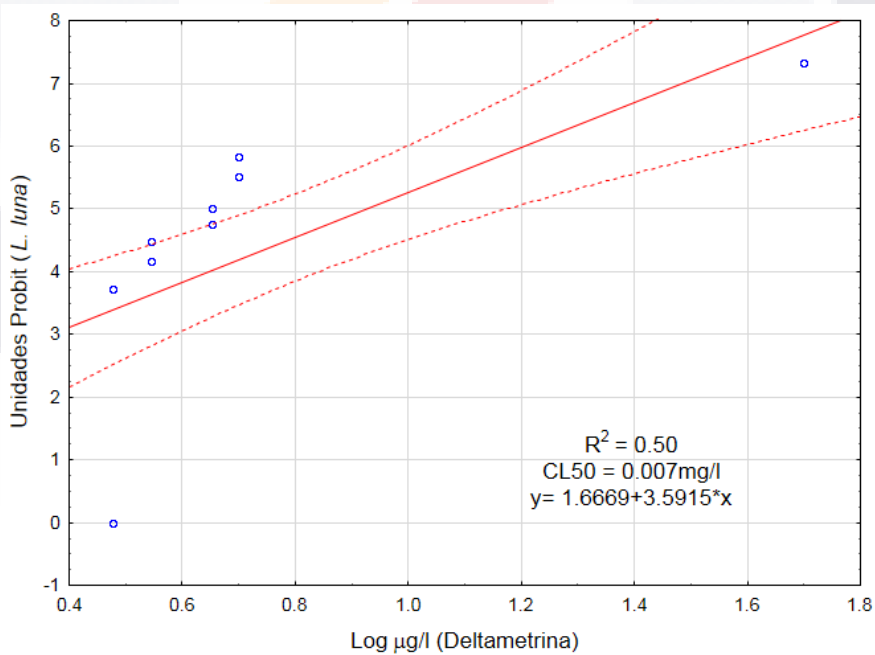


Figura 68: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

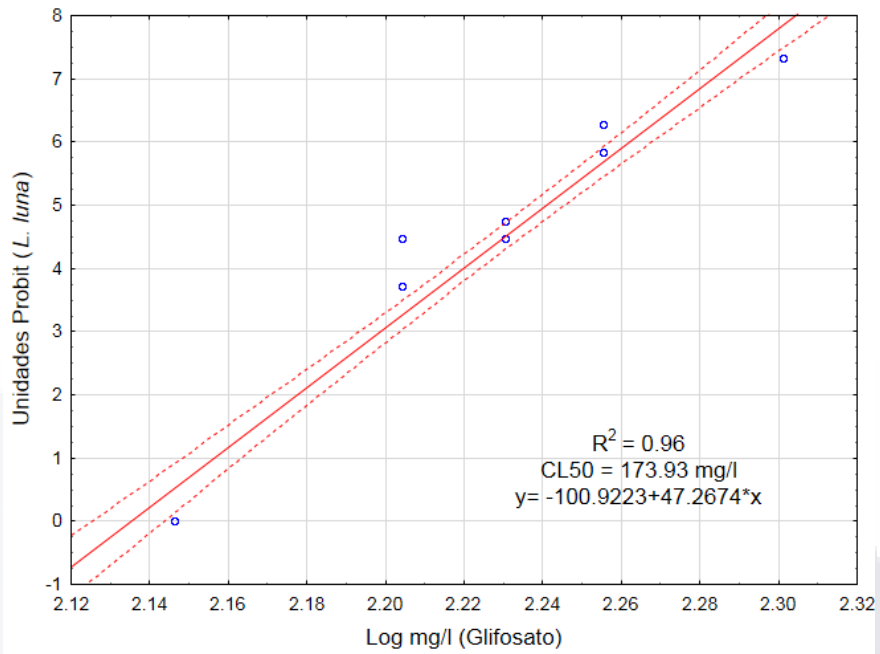


Figura 69: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

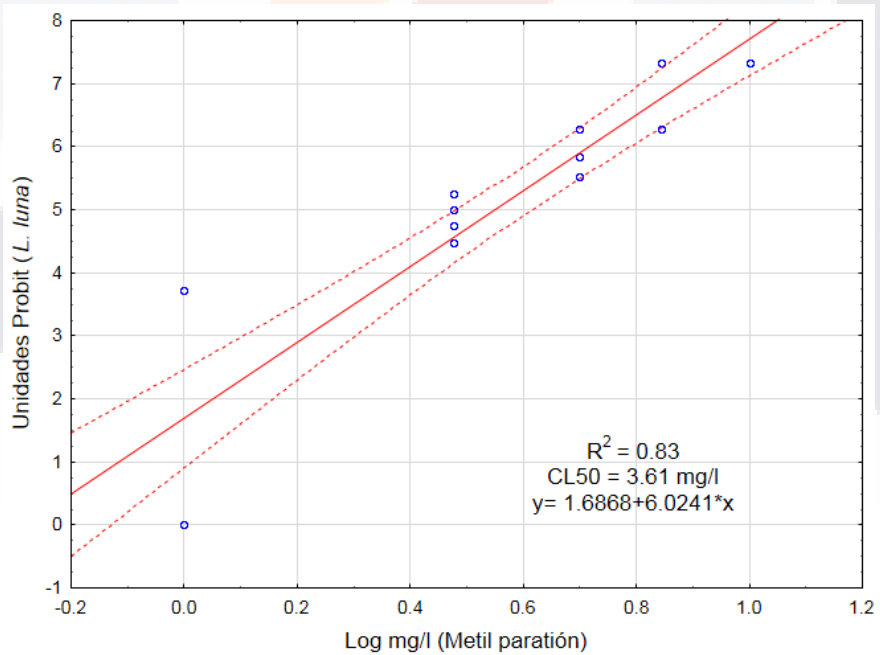


Figura 70: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con metil paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

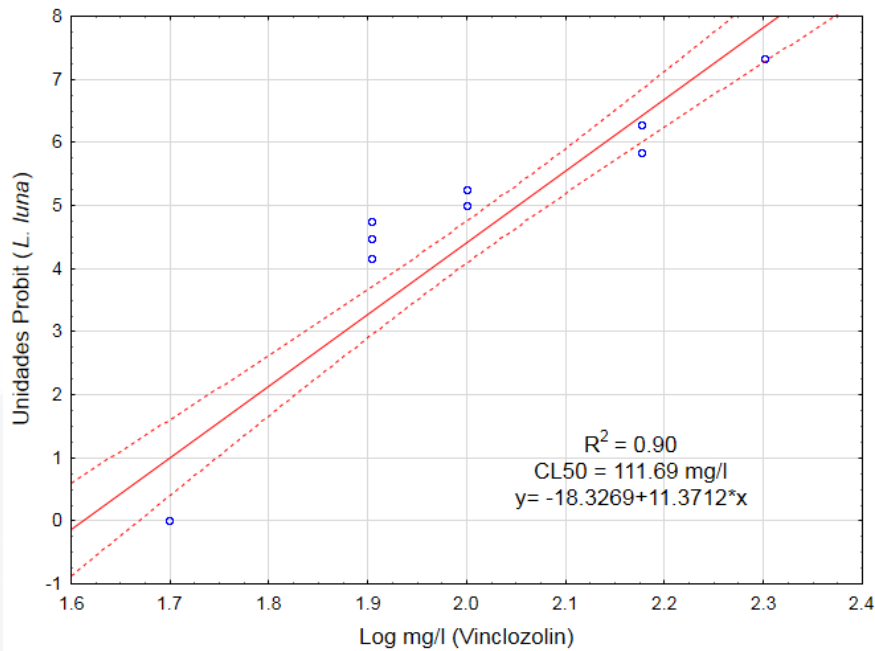


Figura 71: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. luna* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

En la Tabla 16 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. papuana*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 72 a la 76 que muestran la regresión lineal simple de cada cultivo con la ecuación de la recta.

Tabla 16: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. papuana* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.

Toxico	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C.V. %
Carbarilo	0.25	0.59	0.05	0.1	0.78	0.41 - 0.84	24.38
Deltametrina	0.010	0.038	0.0005	0.005	0.76	0.020 – 0.073	2.52
Glifosato	96.08	121.99	50	100	0.88	113.91-130.65	9.82
Metil-paratión	0.46	3.95	0.5	3	0.82	3.25 – 4.7	17.63
Vinclozolin	38.25	67.01	10	30	0.83	55.43 – 81.01	16.07

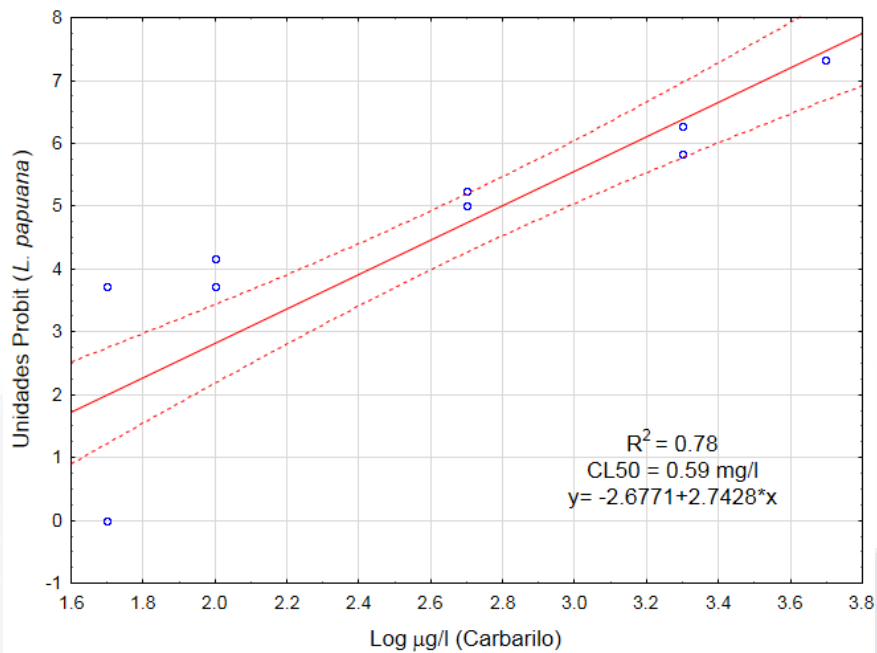


Figura 72: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

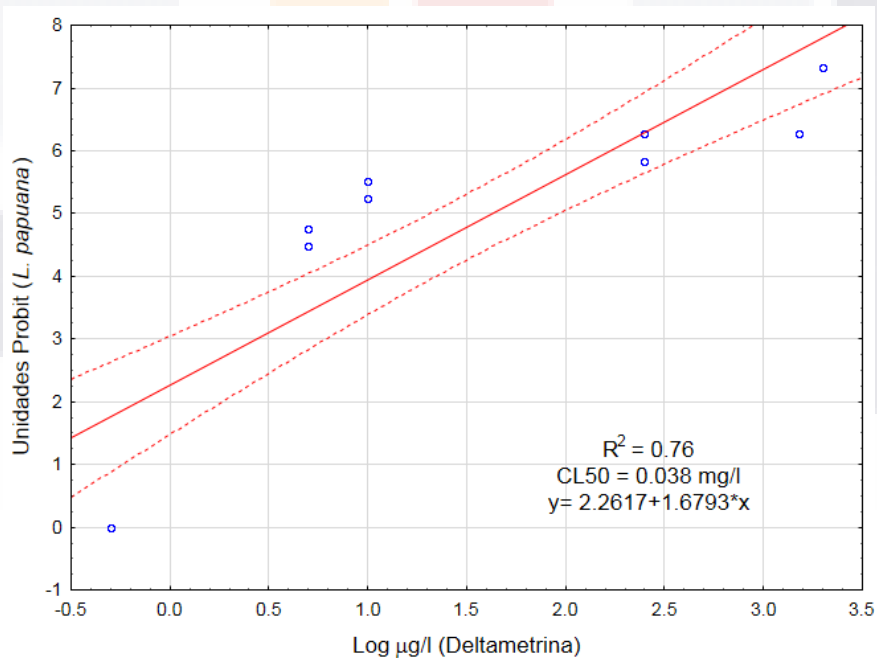


Figura 73: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

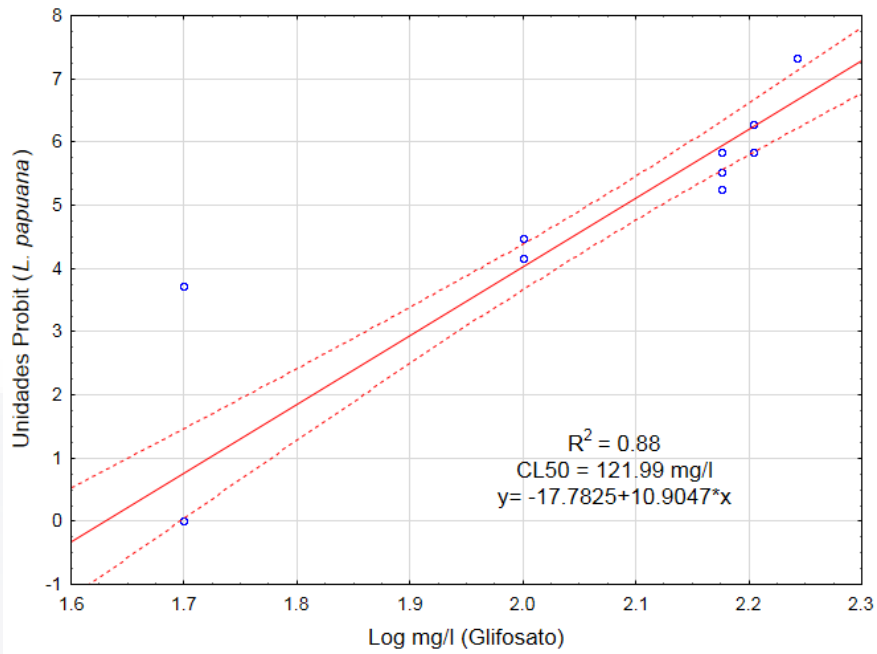


Figura 74: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

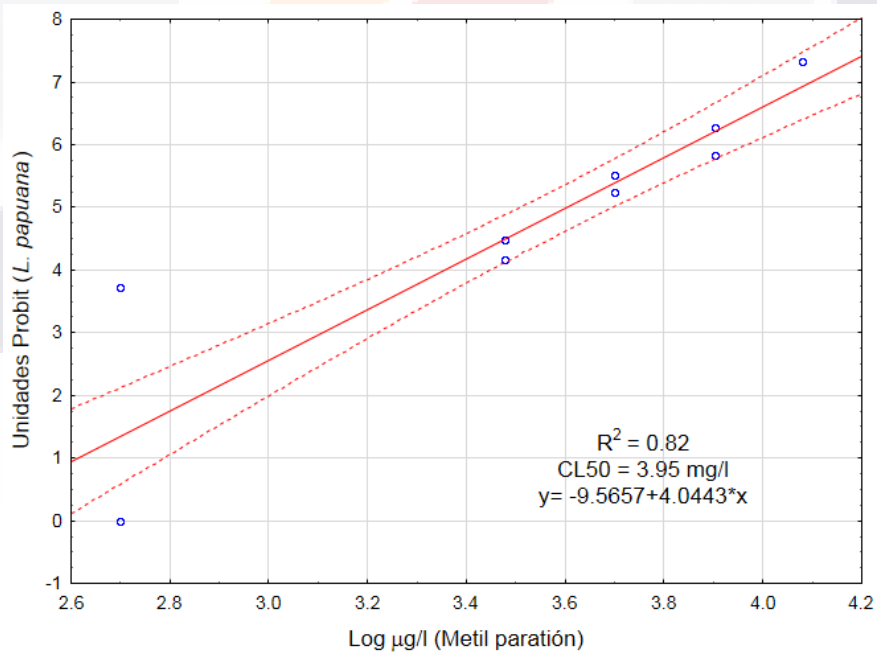


Figura 75: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* metil paratió. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

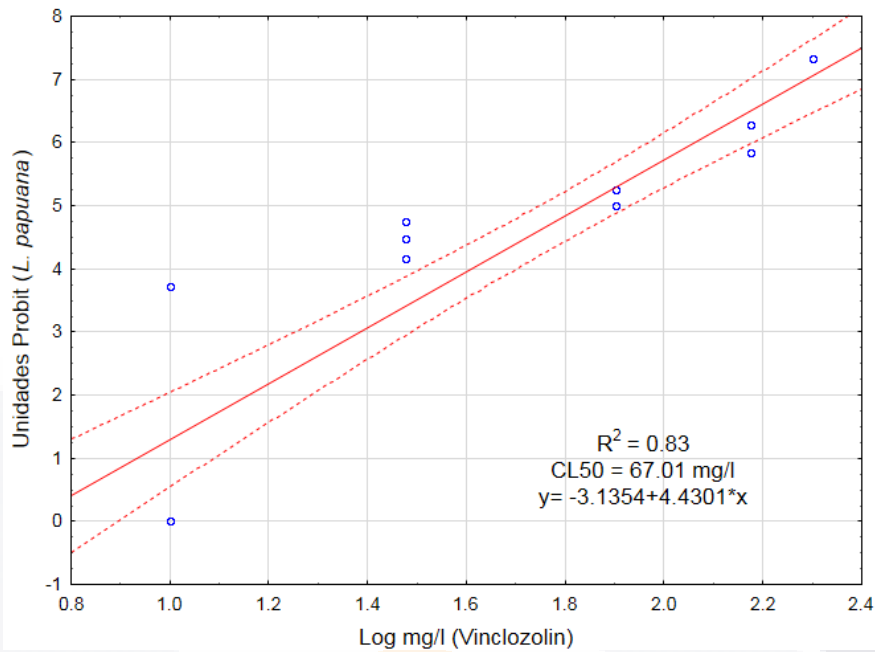


Figura 76: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. papuana* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

En la Tabla 17 se presentan los valores de CL10, CL50, NOEC, LOEC, R^2 , LC y CV para la especie *L. quadridentata*. Después de la tabla se presentan las figuras de la 77 a la 81 que muestran la regresión lineal simple de cada cultivo con la ecuación de la recta.

Tabla 17: Valores de CL 10, CL 50, NOEC, LOEC, R^2 , límites de confianza y coeficiente de variación para la especie *L. quadridentata* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.

Toxico	CL10	CL50	NOEC	LOEC	R^2	L. C. al 95% de la CL50	C. V. %
Carbarilo	2.25	3.20	1	2	0.87	2.88 - 3.55	15.61
Deltametrina	8.24	10.38	5	8	0.81	9.60 - 11.23	10.11
Glifosato	132.15	150.97	100	130	0.85	144.95-157.3	4.09
Metil-paratión	3.97	6.25	1	5	0.87	5.43 – 7.20	11.15
Vinclozolin	48.60	60.75	30	50	0.83	56.71 - 65.09	7.3

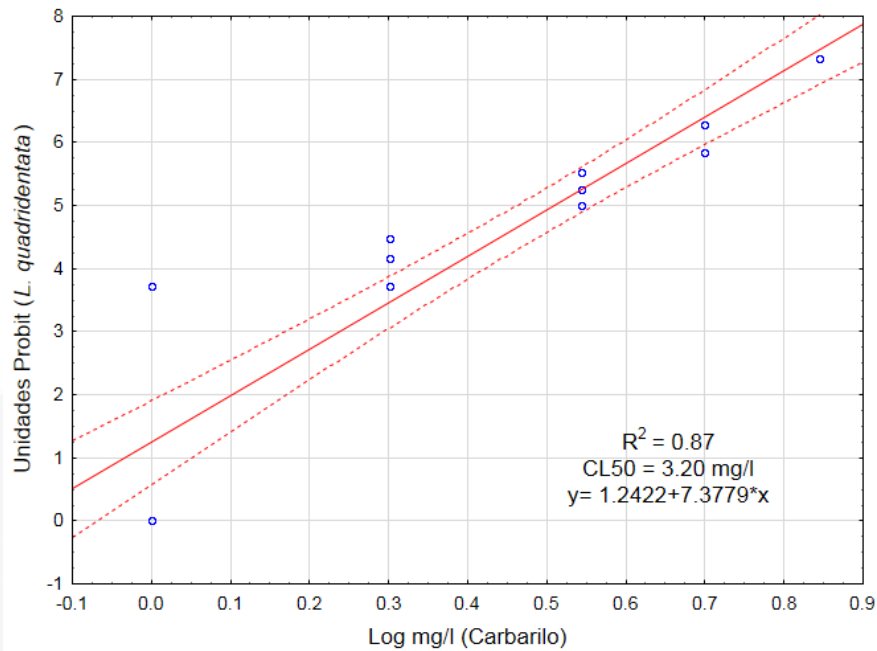


Figura 77: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con carbarilo. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

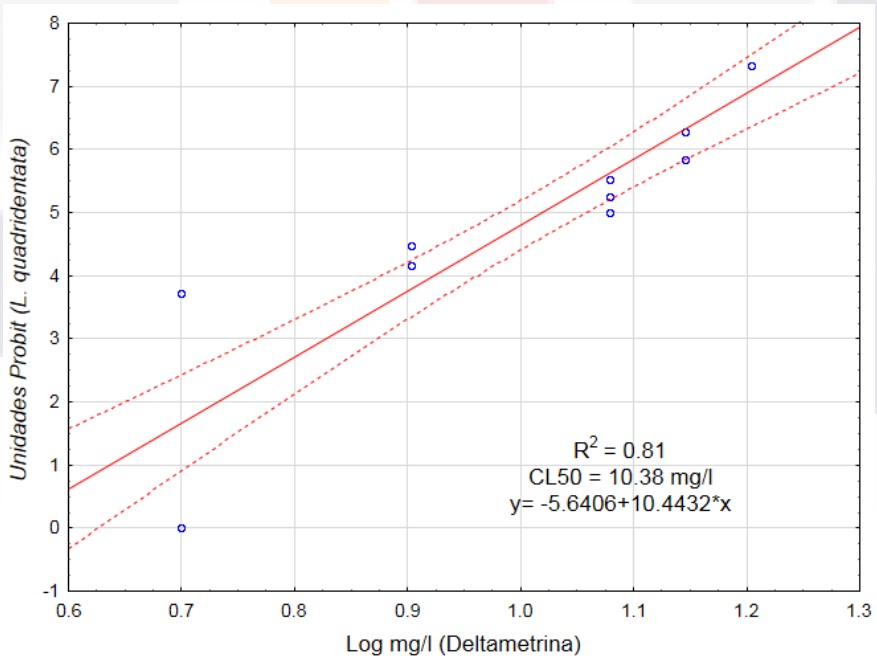


Figura 78: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con deltametrina. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

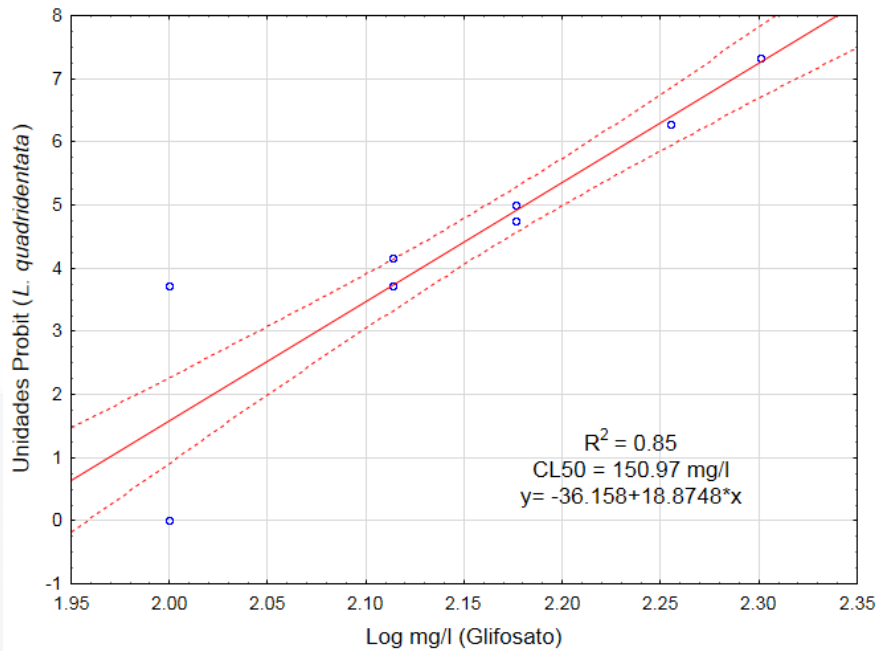


Figura 79: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con glifosato. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

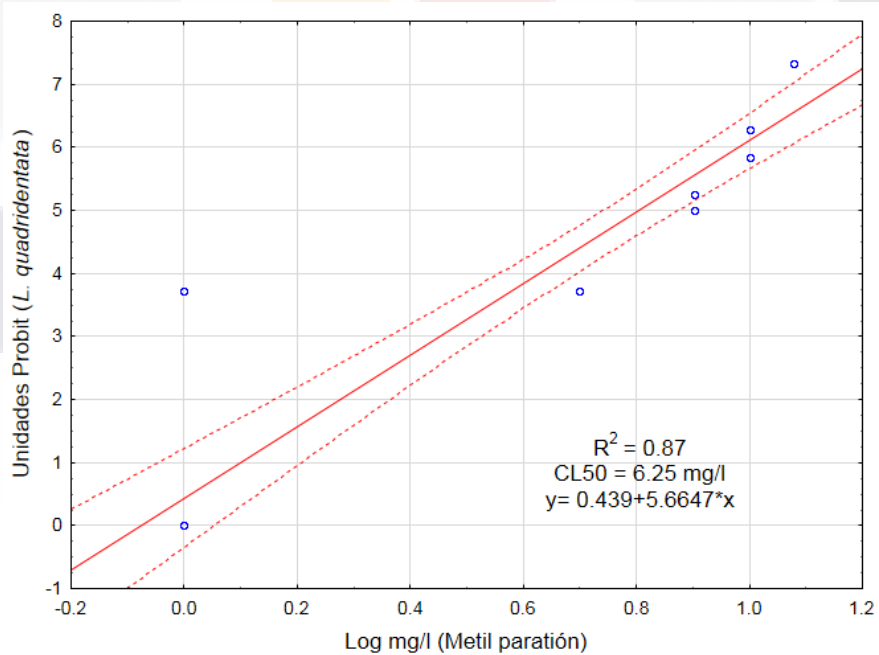


Figura 80: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con metil-paratión. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

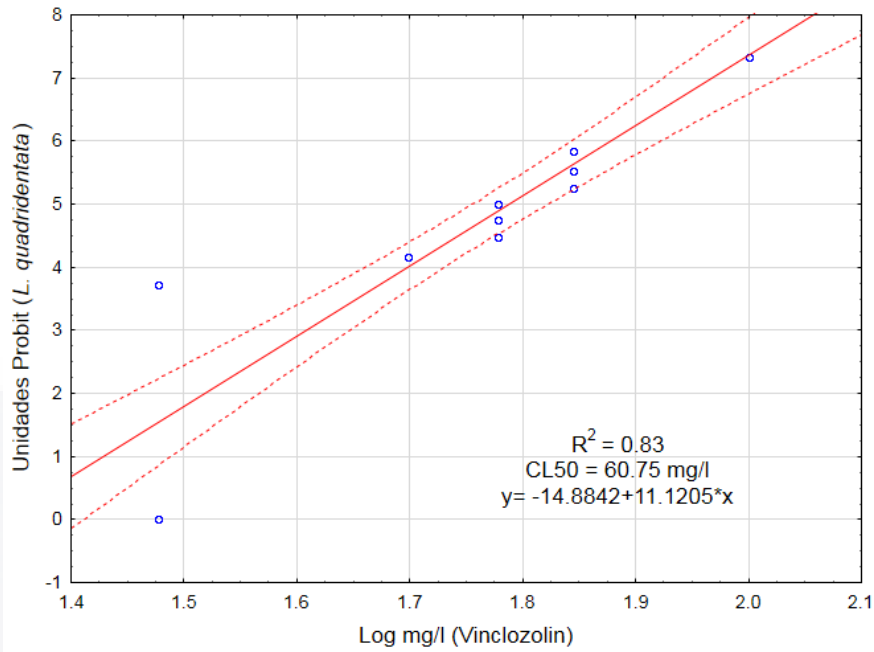


Figura 81: Regresión lineal simple entre los datos PROBIT y el logaritmo de la concentración para la especie *L. quadridentata* con vinclozolin. Se muestra la R^2 , CL50 y la ecuación de la recta.

Las Figuras 82 a 86 muestran la comparación entre los valores del CL50 para los metales pesados en las cinco especies del género *Lecane*.

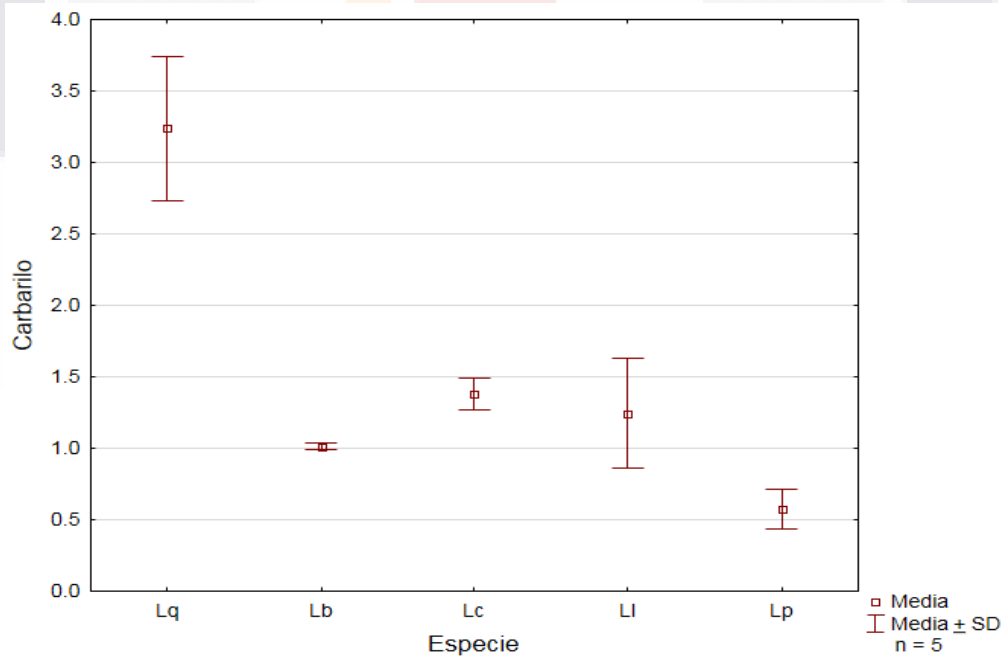


Figura 82: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con carbarilo.

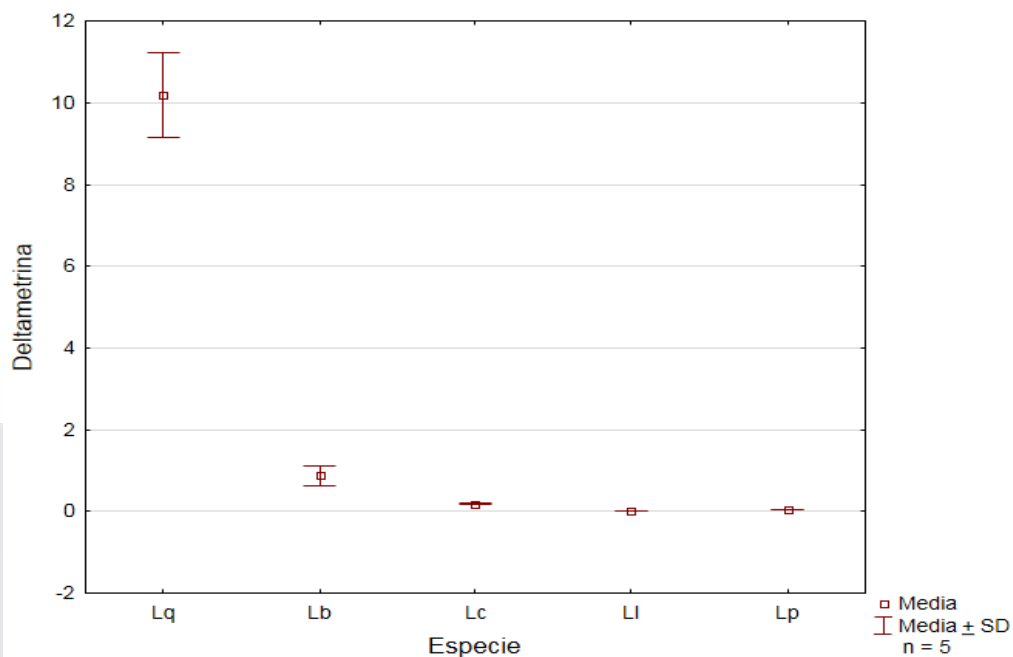


Figura 83: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con deltametrina.

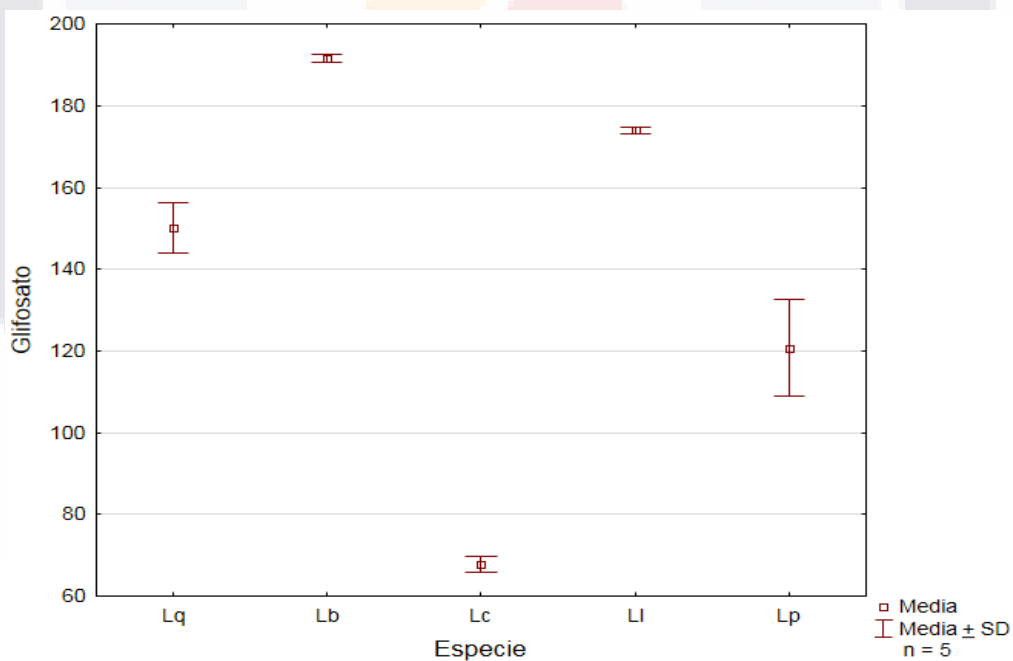


Figura 84: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con glifosato.

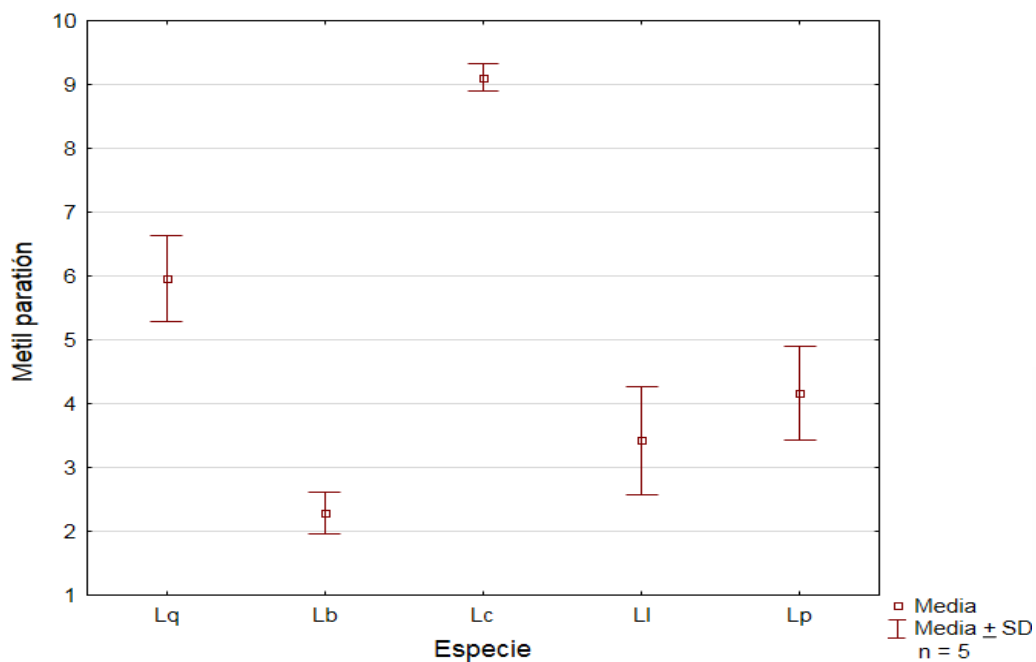


Figura 85: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con metil paratión.

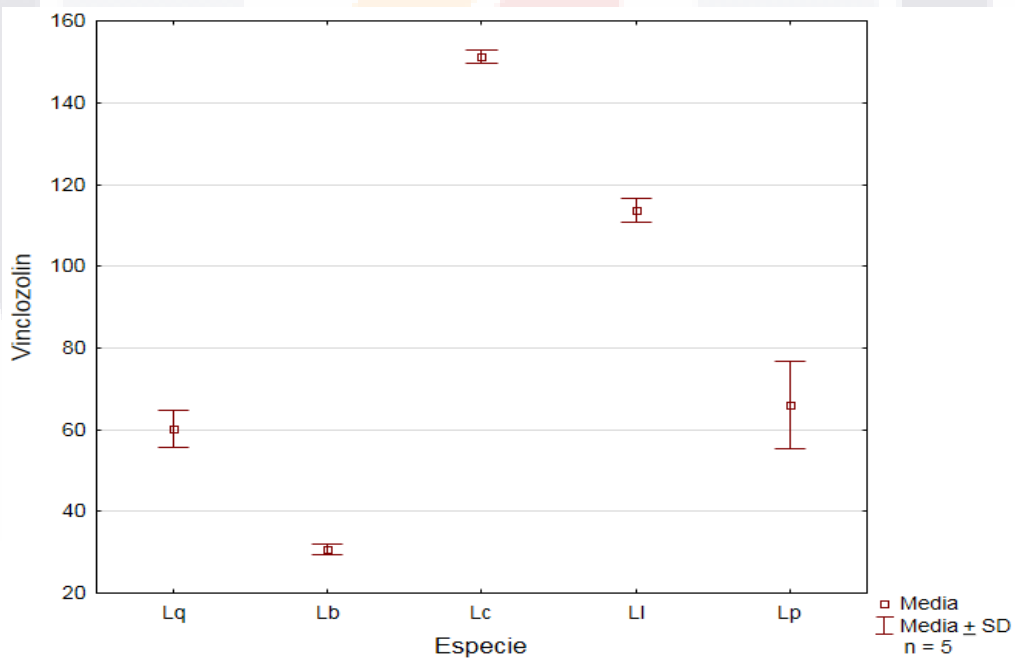


Figura 86: Comparación de los valores de CL50 para las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* con vinclozolin.

5.5. Concentración Máxima de Toxicidad Aceptable

Se obtuvieron los valores de la concentración máxima de toxicidad aceptable (MATC) para las cinco especies del género *Lecane* y se compararon contra las normas de calidad del agua nacionales e internacionales; CAN (Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life, 2007), NOM (NOM-001-ECOL-1996), EPA (US EPA, 2017) y ANZ (Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality, 2000).

En la Tabla 18 se presentan los valores de MATC para las cinco especies del género *Lecane* estudiadas. Después de la tabla se presentan las figuras de la 87 a la 91 que muestran la comparación entre los valores de MATC para los metales pesados en las cinco especies del género *Lecane*, así como los valores de las normas de calidad del agua.

Tabla 18: Valores de MATC para los metales pesados con las cinco especies del género *Lecane*.

Metal	Especie				
	<i>L. bulla</i>	<i>L. cornuta</i>	<i>L. luna</i>	<i>L. papuana</i>	<i>L. quadridentata</i>
As	0.022	1.183	1.414	0.866	2.345
Cd	0.002	0.071	0.001	0.087	0.173
Cu	0.007	0.055	0.059	0.007	0.022
Pb	0.007	0.016	0.022	0.002	0.141
Zn	0.022	0.071	0.007	0.274	0.158

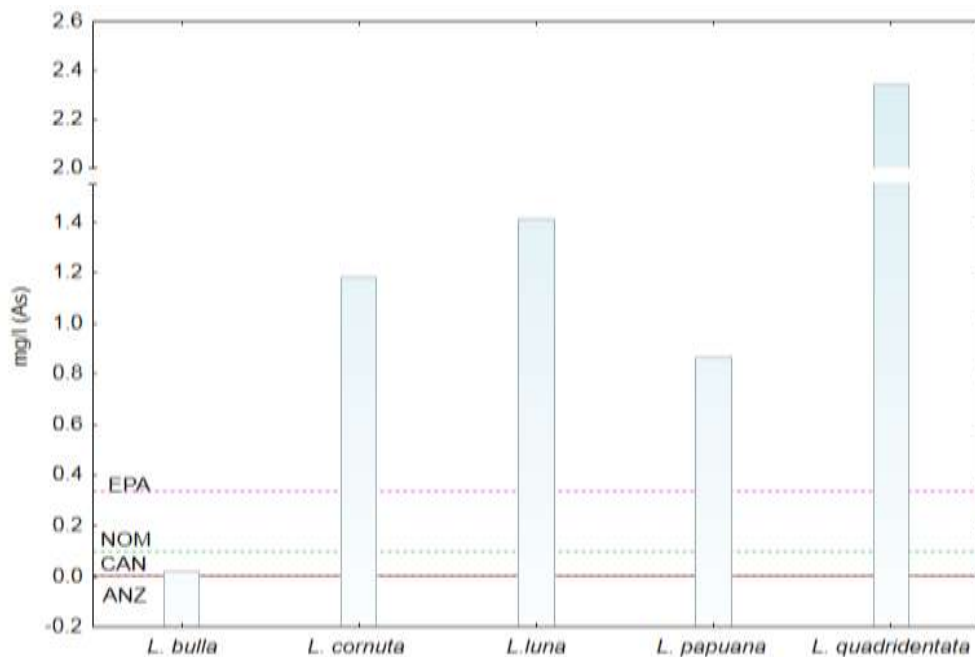


Figura 87: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con arsénico y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra).

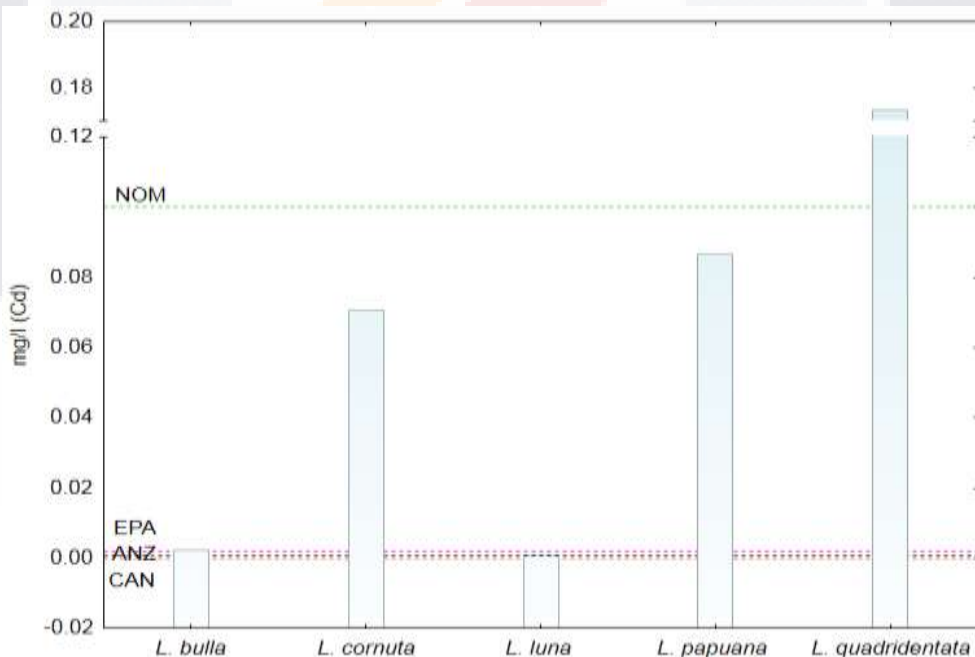


Figura 88: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con cadmio y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra).

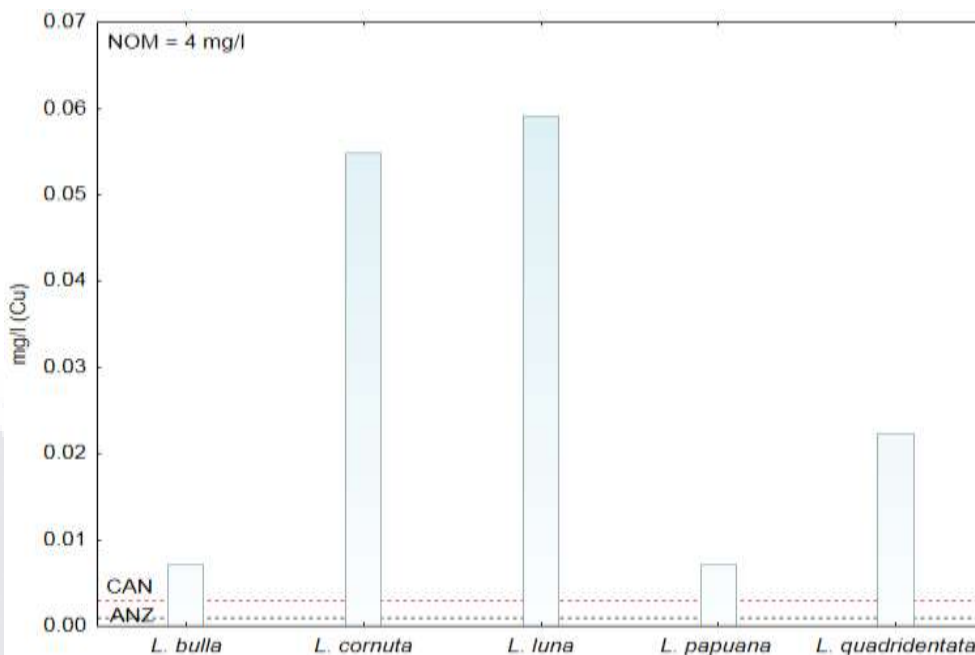


Figura 89: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con cobre y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde) y ANZ (Línea negra).

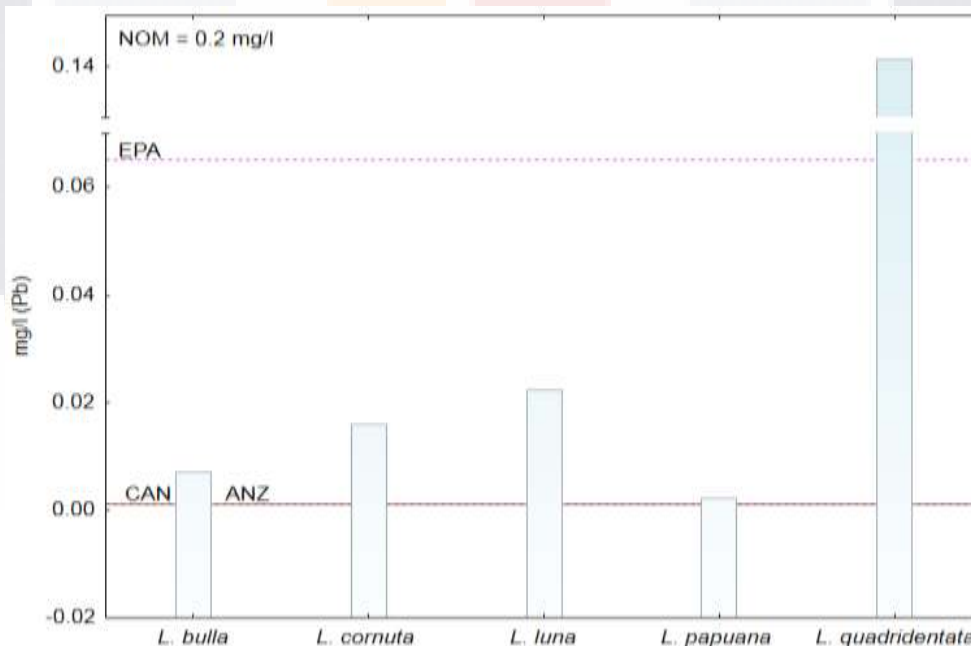


Figura 90: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con plomo y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra).

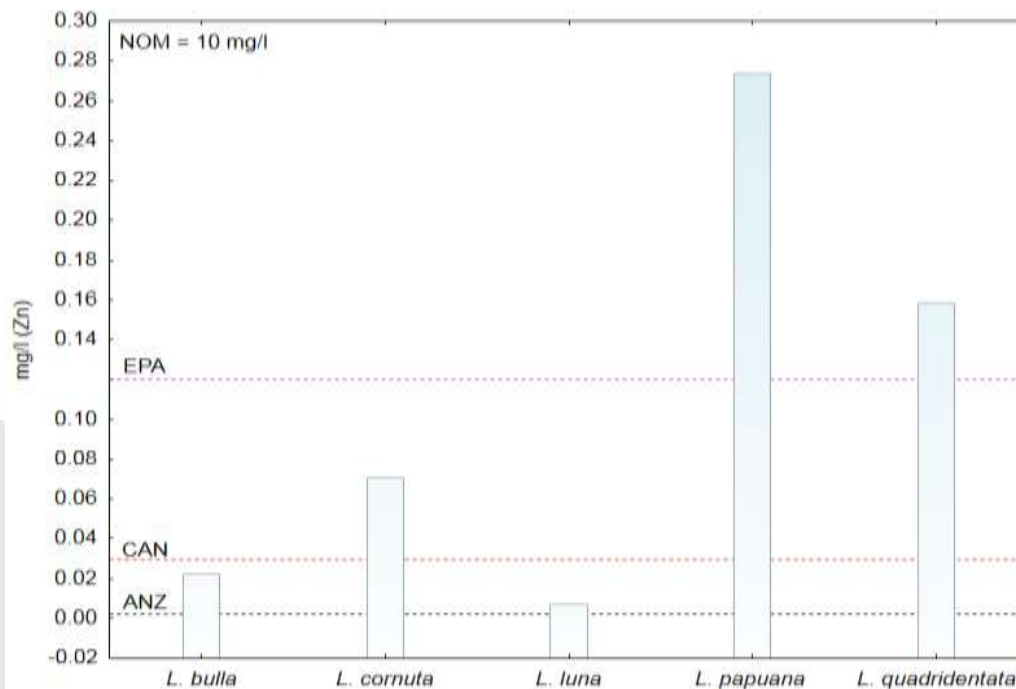


Figura 91: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con cinc y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra).

En la Tabla 19 se presentan los valores de MATC para plomo con las seis cepas y ocho clonas de la especie *L. quadridentata*. Después de la tabla se presenta la figura 92 que muestra la comparación entre los valores de MATC, así como los valores de las normas de calidad del agua.

Tabla 19: Valores de MATC para plomo con las clonas y cepas de la especie *L. quadridentata*.

Clonas							
Lq-6	Lq 10-67	Lq 34	Lq Cv	Lq 10/11	Lq Ch		
0.141	0.141	0.141	0.141	0.158	0.173		
Cepas							
Lq 10-67	R1	R5	R6	R8	R9	R10	R16
0.141	0.245	0.141	0.141	0.071	0.141	0.141	0.245

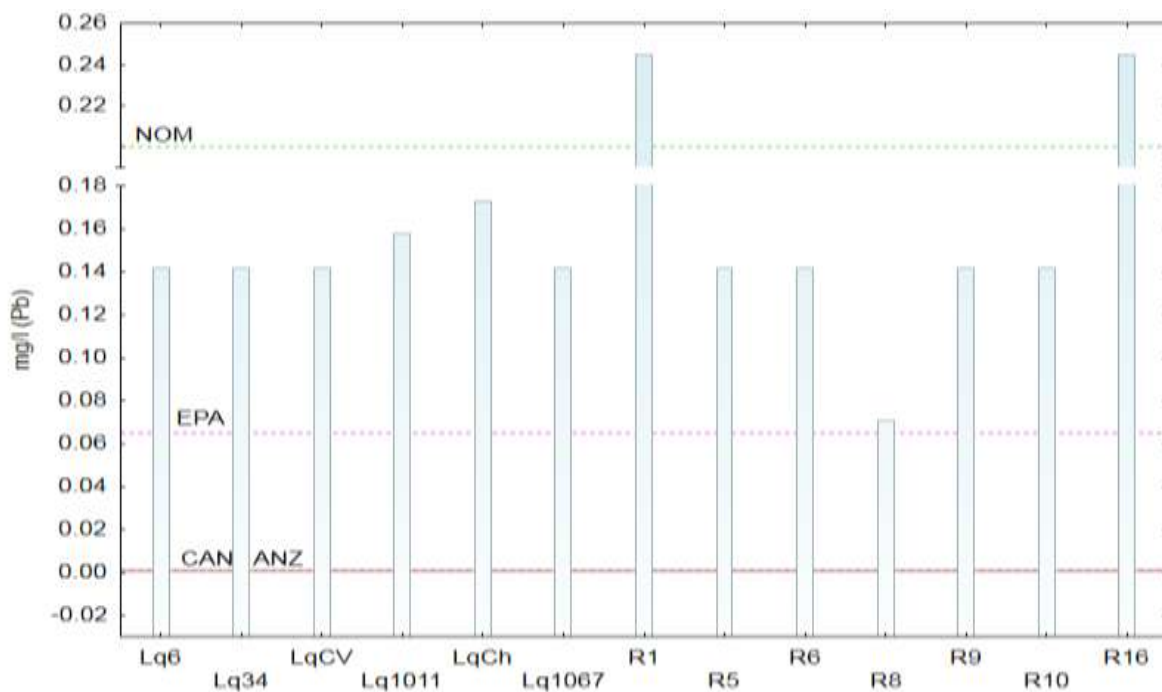


Figura 92: Comparación entre los valores MATC para seis cepas y siete clonas de *L. quadridentata* con plomo y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja), NOM (Línea verde), EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra).

En la Tabla 20 se presentan los valores de MATC para las cinco especies del género *Lecane* estudiadas. Después de la tabla se presentan las figuras de la 93 a la 96 que muestran la comparación entre los valores de MATC para los pesticidas en las cinco especies del género *Lecane*, así como los valores de las normas de calidad del agua.

Tabla 20: Valores de MATC para las cinco especies del género *Lecane* con carbarilo, deltametrina, glifosato, metil-paratión y vinclozolin.

Pesticida	Especie				
	<i>L. bulla</i>	<i>L. cornuta</i>	<i>L. luna</i>	<i>L. papuana</i>	<i>L. quadridentata</i>
Carbarilo	0.224	0.224	0.071	0.071	1.41
Deltametrina	0.071	0.007	0.003	0.002	6.32
Glifosato	164.924	22.36	149.66	70.71	114.01
Metil paratión	0.707	2.23	1.732	1.22	2.23
Vinclozolin	7.071	93.80	63.24	17.32	38.73

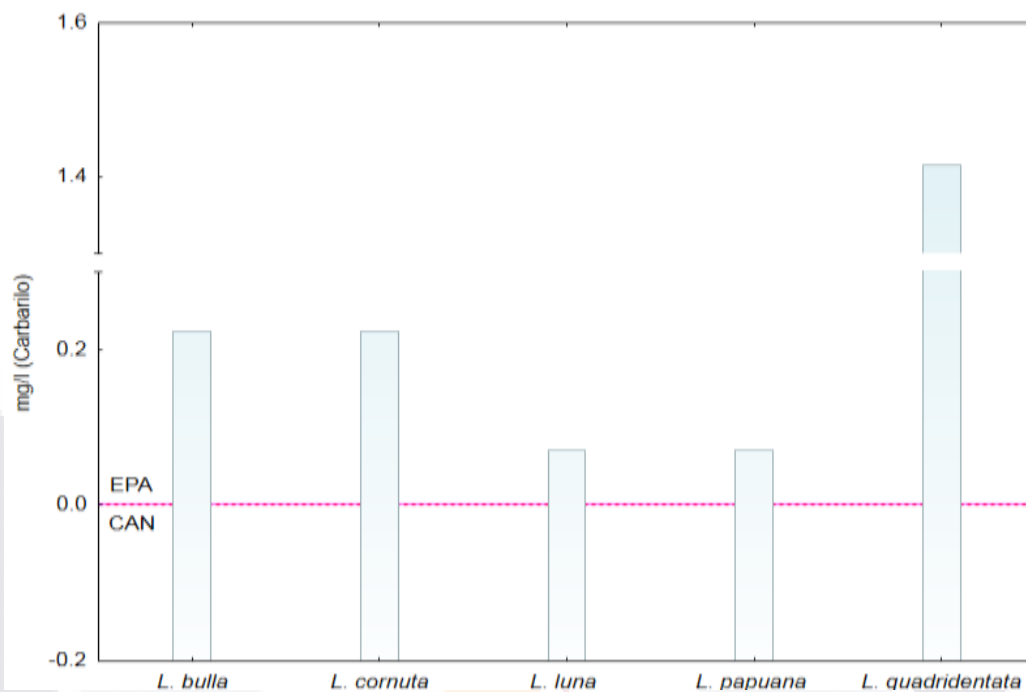


Figura 93: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con carbarilo y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja) y EPA (Línea morada).

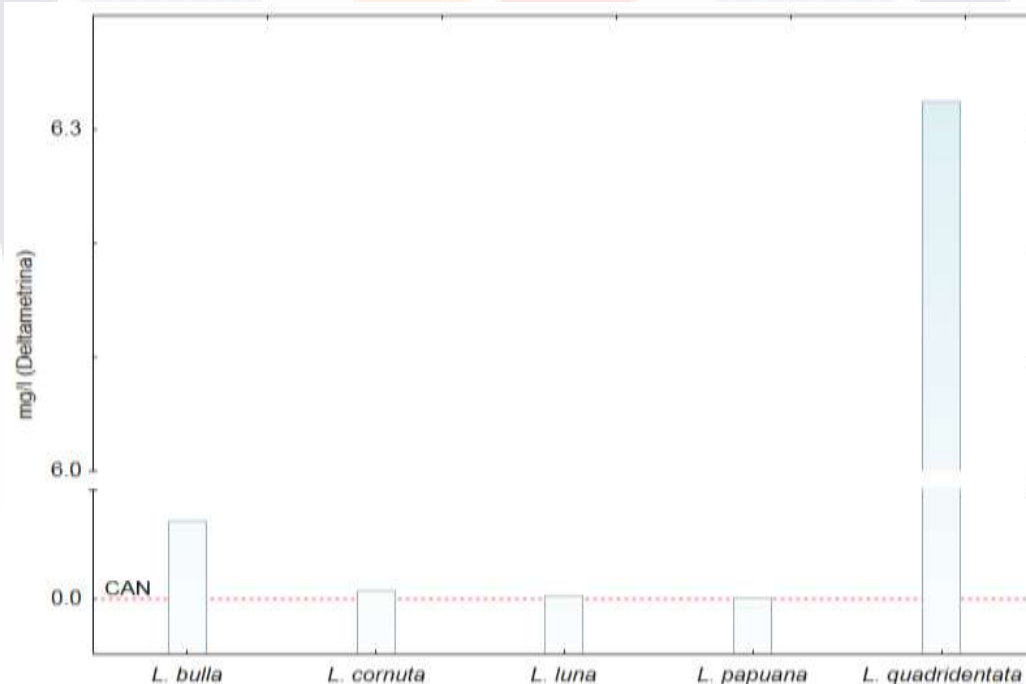


Figura 94: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con deltametrina y la norma de calidad del agua; CAN (Línea roja).

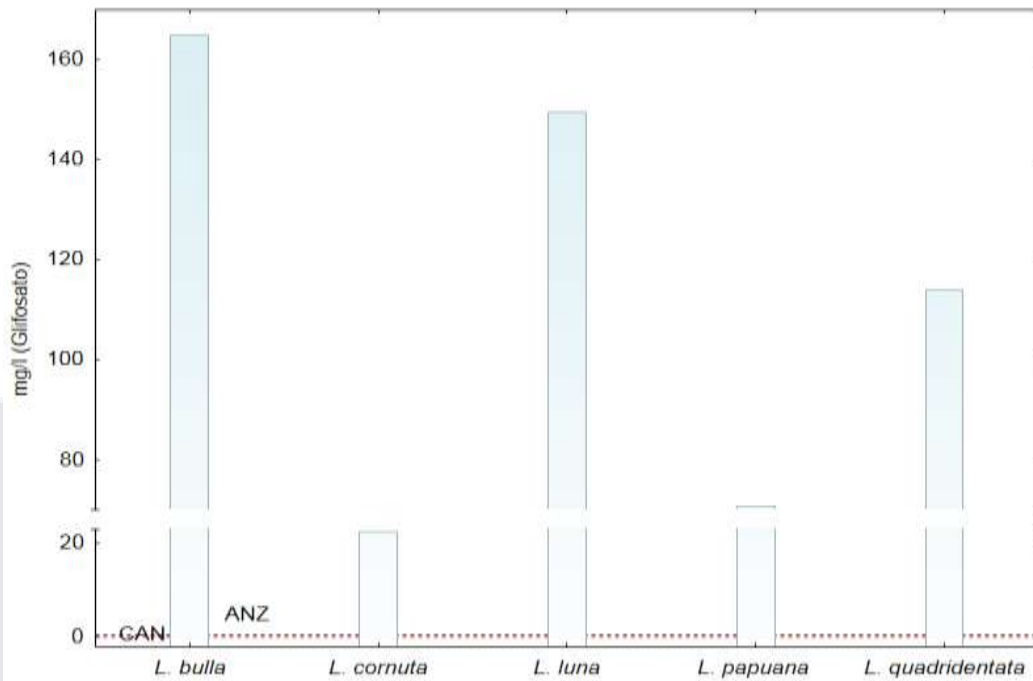


Figura 95: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con glifosato y las normas de calidad del agua; CAN (Línea roja) y ANZ (Línea negra).

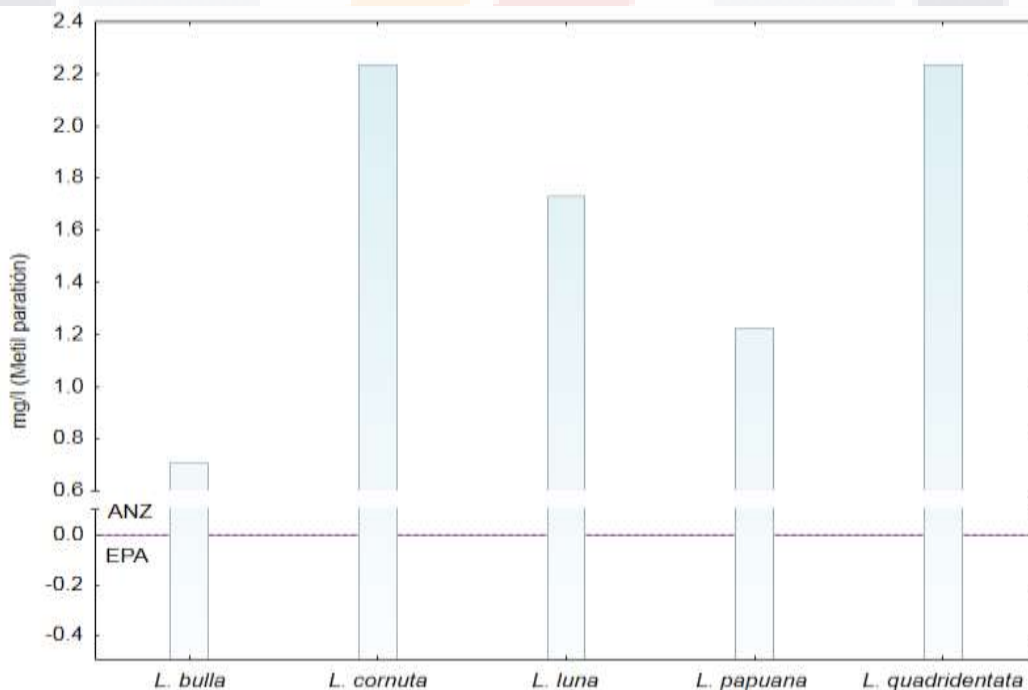


Figura 96: Comparación entre los valores MATC para cinco especies del género *Lecane* con Metil paratión y las normas de calidad del agua; EPA (Línea morada) y ANZ (Línea negra).

5.6. Análisis filogenético

Se realizó la técnica de PCR descrita por Walsh y colaboradores (2009) para la mayoría de los organismos sin mayores complicaciones (Grafica 22), la excepción fue la clona R8, la cual presenta un gran cambio en sus bases comparada con los organismos de su misma especie, para este caso se realizó la optimización del PCR el cual dio resultados positivos para los buffers G y H.

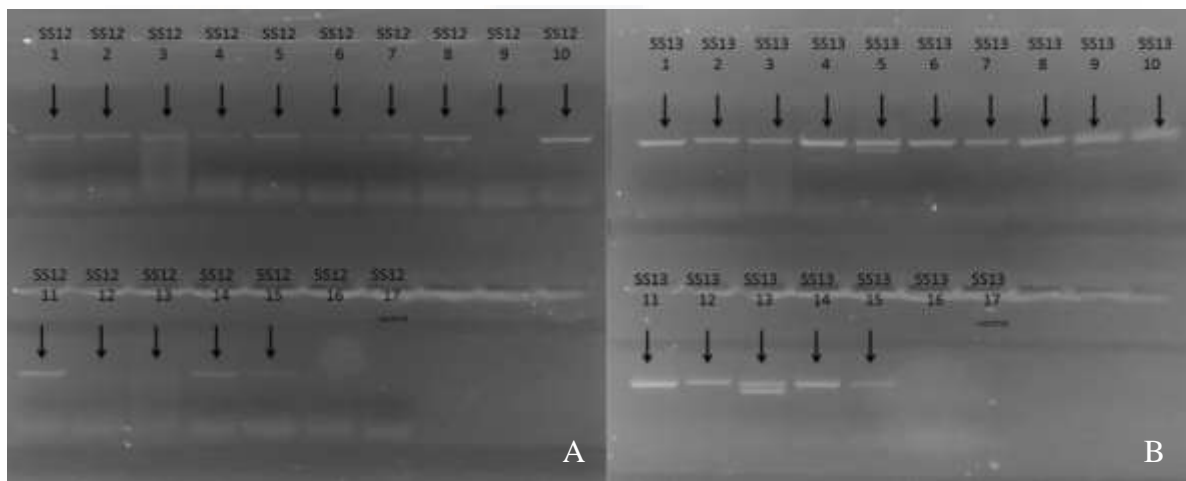


Figura 97: Fotografías de PCR con marcadores moleculares COX (A) e ITS (B).

Se realizó el análisis filogenético por inferencia Bayesiana y Maximum Likelihood para las especies de los rotíferos dulceacuícolas, *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* (6 cepas y 8 clonas) con los marcadores moleculares COX e ITS. Para las hipótesis realizadas con COX se incluyeron secuencias del Genebank (Anexo C).

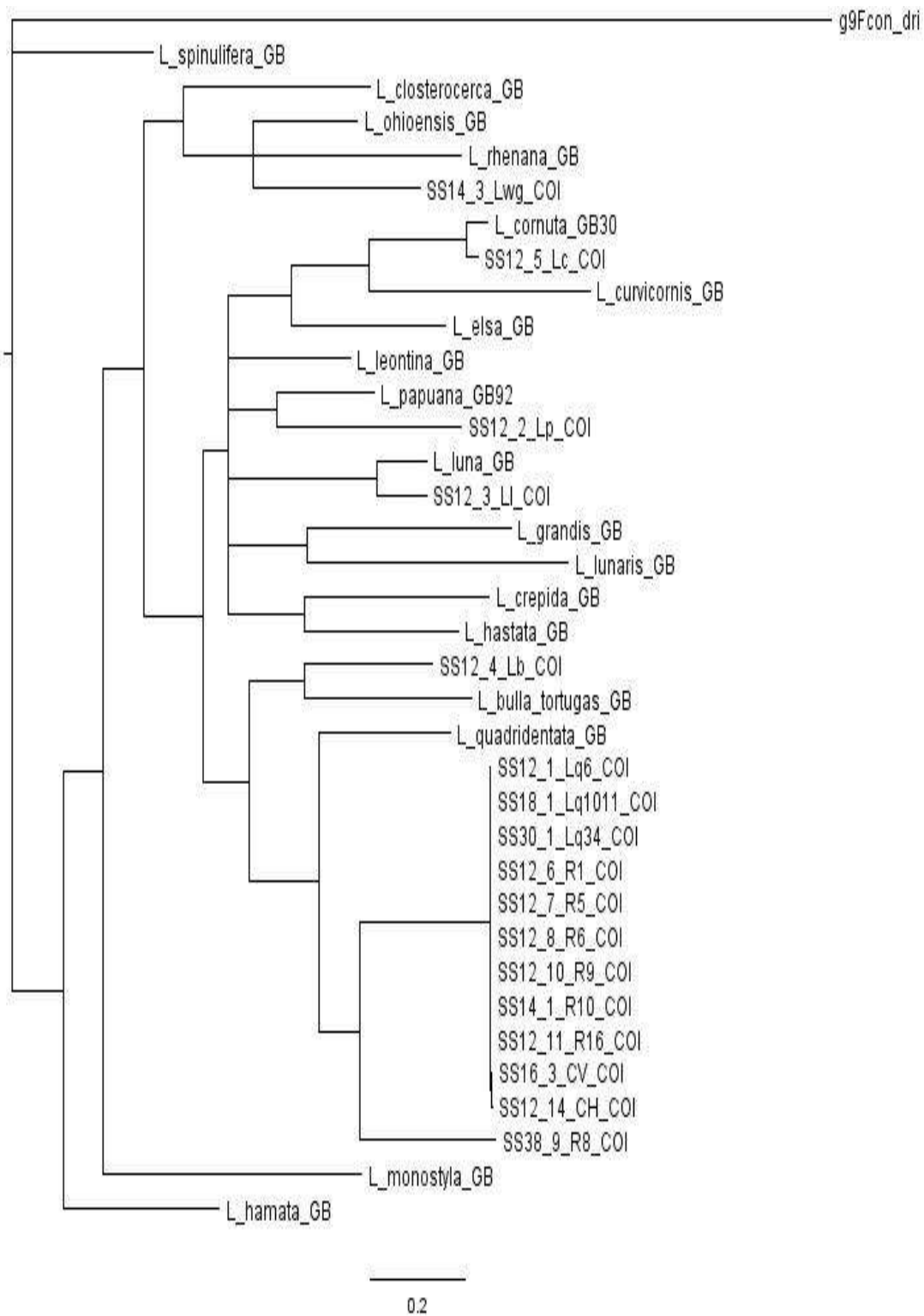


Figura 98: Análisis por Inferencia Bayesiana obtenida del análisis de organismos del género Lecane con marcadores moleculares COX. Adicional a las muestras del estudio el análisis se completó con secuencias obtenidas del GeneBank.

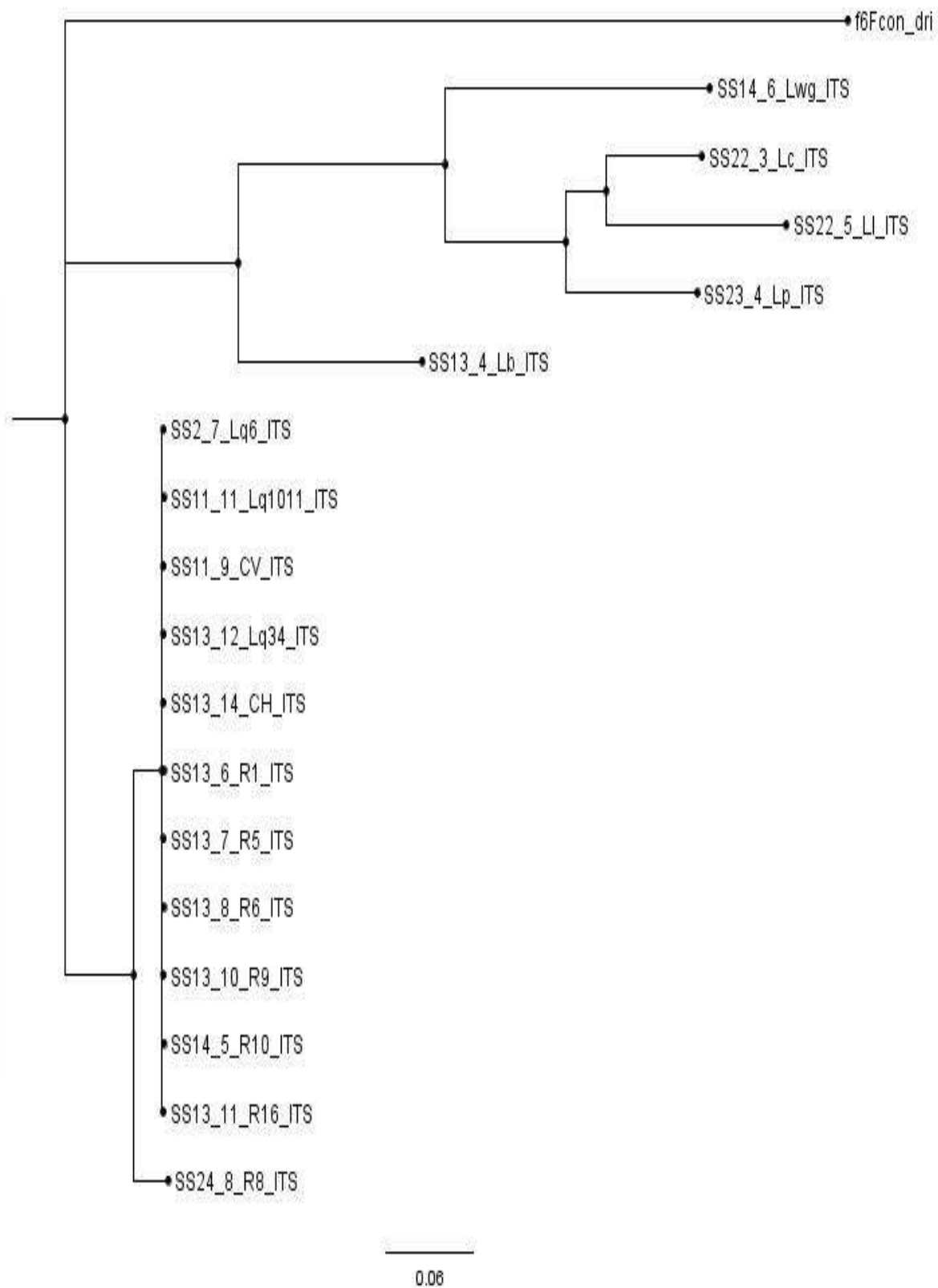


Figura 99: Análisis por Inferencia Bayesiana obtenida del análisis de organismos del género *Lecane* con marcadores moleculares ITS.

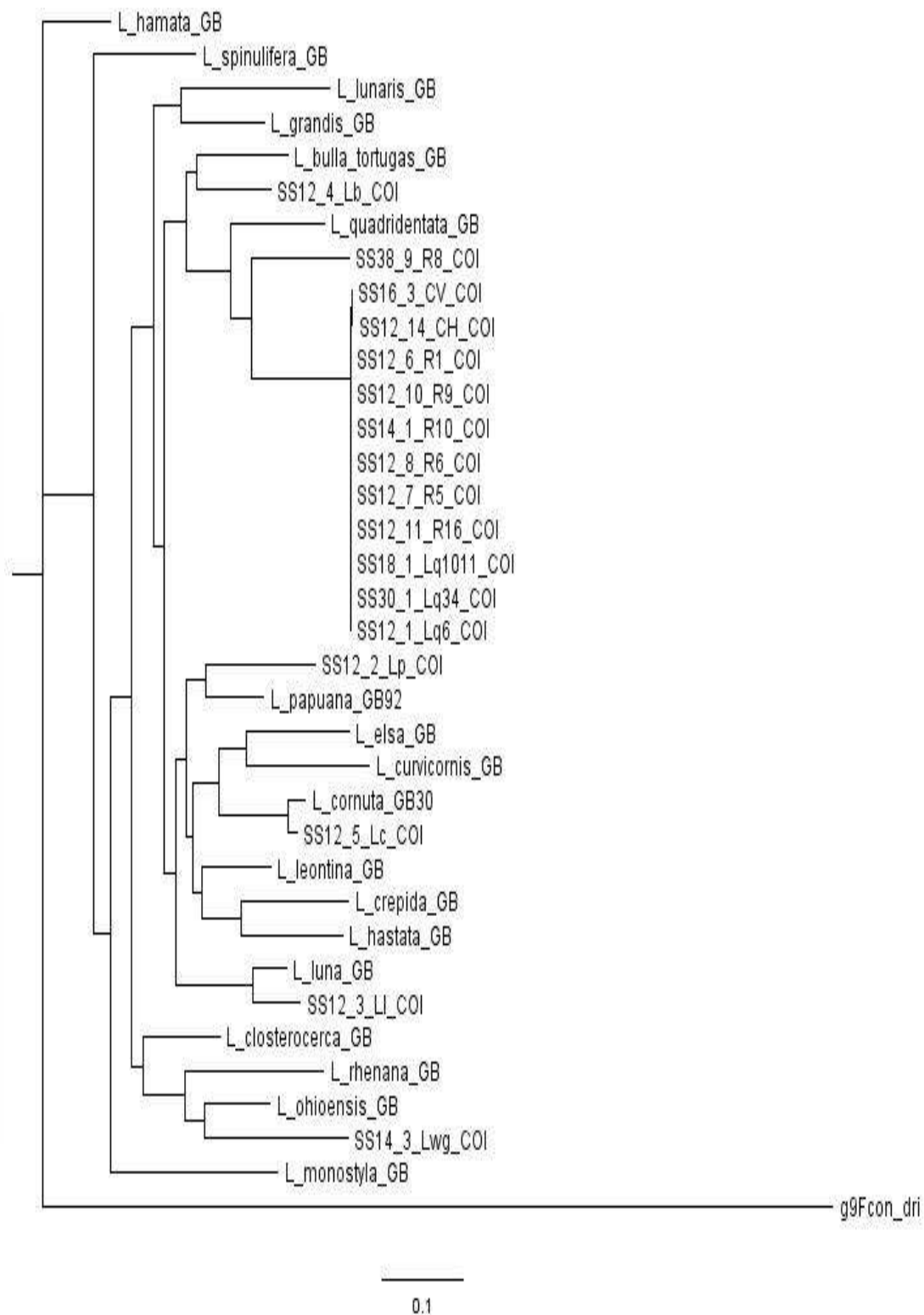


Figura 100: Análisis de Maximum Likelihood con organismos del género Lecane con marcadores moleculares COX. Adicional a las muestras del estudio el análisis se completó con secuencias obtenidas del GeneBank.

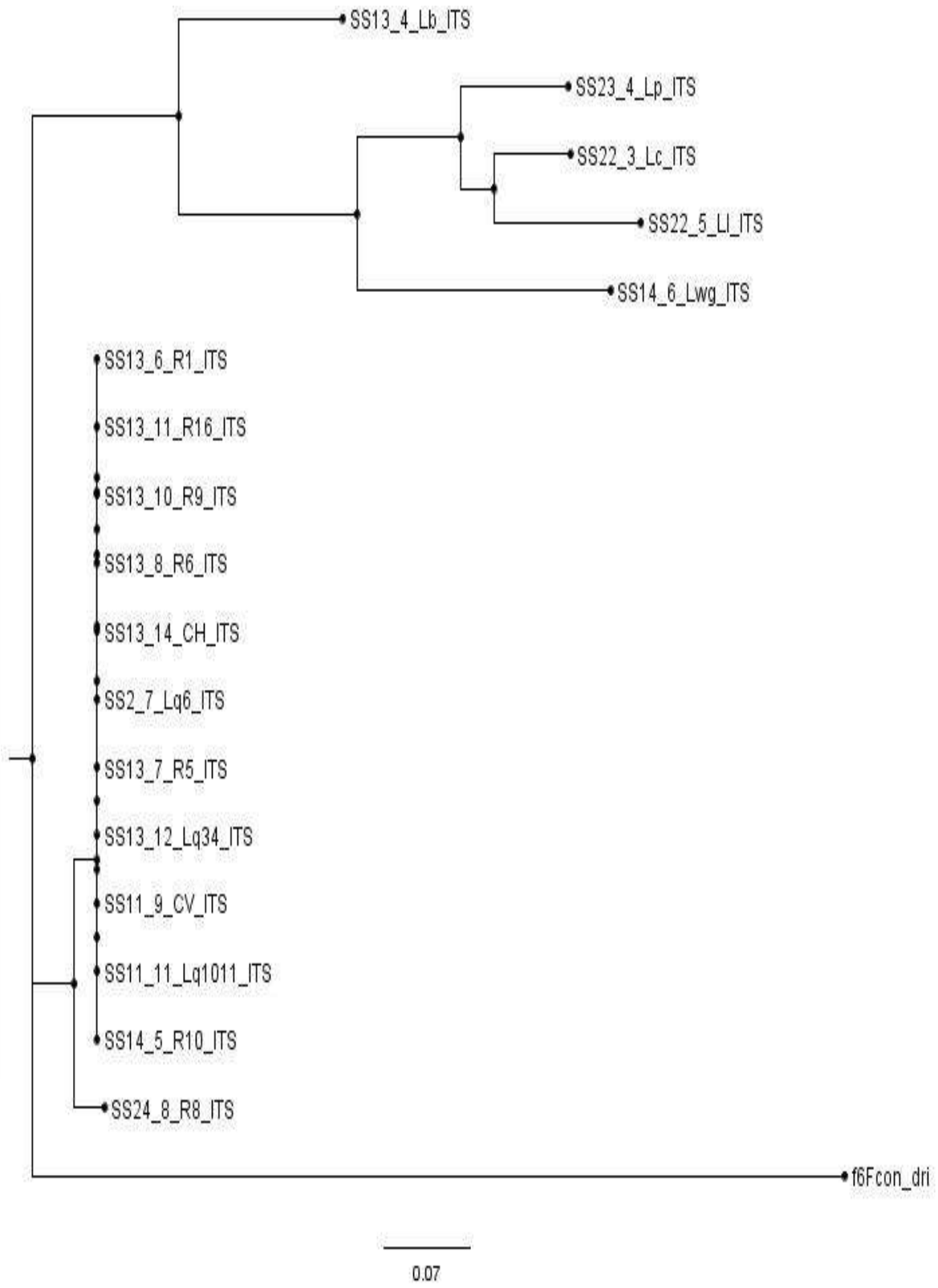


Figura 101: Análisis de Maximum Likelihood con organismos del género *Lecane* con marcadores moleculares ITS.

5.7. Análisis de componentes principales

Después de las hipótesis se realizó la correlación entre la sensibilidad a los metales pesados y pesticidas con la distancia genética (COX e ITS) mediante un análisis de componentes principales.

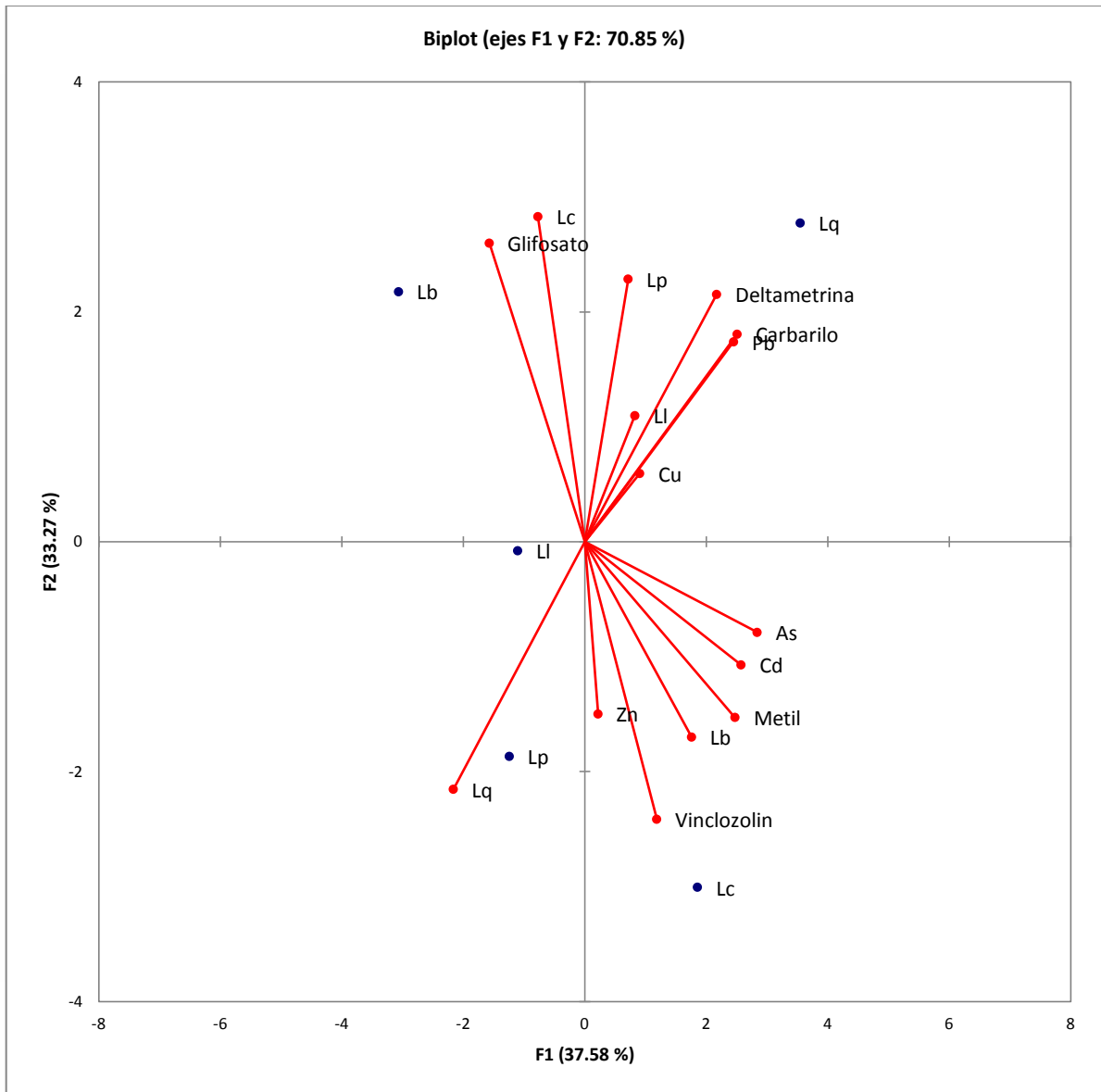


Figura 102: Análisis de componentes principales entre la relación filogenética con *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* y su sensibilidad aguda con arsénico, cadmio, carbarilo, cinc, cobre, deltametrina, glifosato, paratión metílico, plomo y vinclozolin.

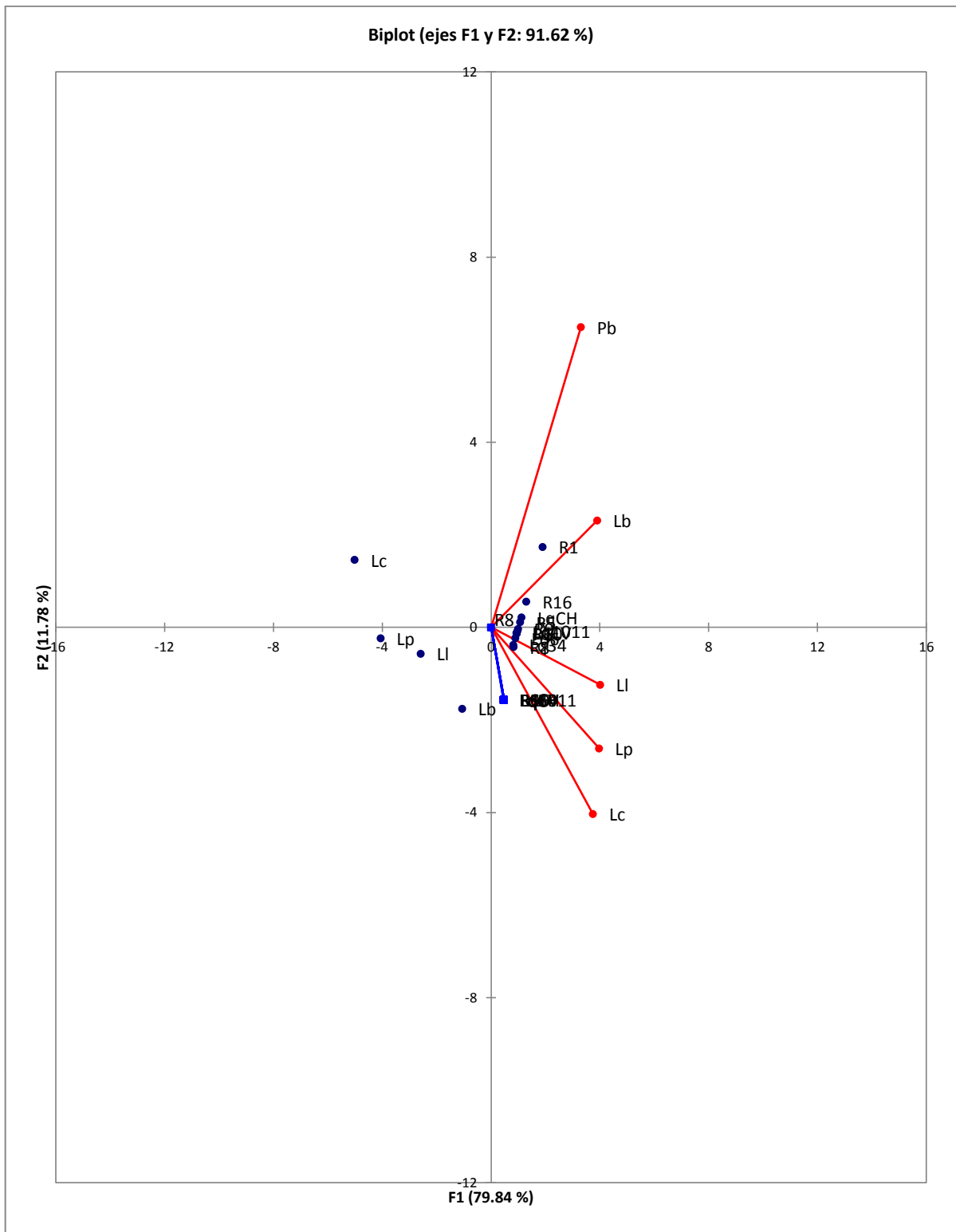


Figura 103: Análisis de componentes principales entre la relación filogenética con seis cepas y ocho clonas de la especie *L. quadridentata* y su sensibilidad aguda al plomo.

6. DISCUSIONES

El desarrollo de pruebas ecotoxicológicas con diferentes especies nativas de rotíferos representa una valiosa herramienta para proteger los ecosistemas acuáticos en todo el mundo. Un primer paso en el desarrollo de pruebas ecotoxicológicas es el estudio y análisis de las características de la tabla de vida de las especies que potencialmente podrían ser utilizadas para las pruebas. Entre los rotíferos, el género *Lecane* ha sido poco estudiado, siendo uno de los géneros de rotíferos más ricos con respecto a su diversidad (Segers, 1995). Como parte de este estudio se analizaron los parámetros de la tabla de vida de tres especies de *Lecane* para determinar su viabilidad como organismos modelo para las pruebas tradicionales de toxicidad o de ecotoxicología. Los resultados sugieren que las tres especies probadas tienen un alto potencial para ser usadas tanto para la toxicología tradicional como para las pruebas ecotoxicológicas. La facilidad para obtener huevos partenogénicos y el alto porcentaje de eclosión después de 24h (Tabla 4), aseguraría un abasto de neonatos para las pruebas tradicionales de toxicidad para las tres especies.

El análisis de los datos obtenidos de las tablas del porcentaje de eclosión de huevos partenogénicos incubados a tres temperaturas (Tabla 4) muestra que en general *L. papuana* tiene los mejores niveles de eclosión, seguido de *L. cornuta* y *L. bulla*, siendo esta última especie quien obtuvo el menor porcentaje en las tres temperaturas empleadas. A 20°C se observó una disminución en los valores de brote para las tres especies, en el caso de *L. cornuta* a 30°C el porcentaje disminuyó 36% comparado a 25°C, en contraste los huevos de *L. bulla* no soportaron la aclimatación a esta temperatura, ya que los huevos partenogénicos obtenidos a 25°C no eclosionaron con el cambio de temperatura. Los huevos de *L. papuana* obtuvieron el 100% de eclosión a 25 y 30°C. Estos resultados coinciden con varios autores (Galkovskaja, 1987; Katsanevakis y Verriopoulos; 2006; Minkoff *et al.*, 1983; Moraga *et al.*, 2015; Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 1998), que afirman que la temperatura juega un papel crucial en el desarrollo embrionario y por lo tanto en la eclosión. Los datos obtenidos son de relevancia para las pruebas toxicológicas ya que, es importante mantener la homogeneidad en las condiciones de los organismos a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

utilizar, debido a que uno de los parámetros para realizar dichas pruebas es, que los organismos deben ser neonatos menores de 24h (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001).

Los resultados obtenidos de las tablas de vida indican que existe una relación entre las diferencias en los parámetros de la tabla de vida con respecto a la influencia de la temperatura en los organismos del género *Lecane*. Las tres especies tienen una expectativa de vida (ex) más larga a 20°C que a 25 y 30°C (Figura 10). De las tres especies empleadas *L. cornuta* tuvo la expectativa y esperanza de vida (D) más larga en las tres temperaturas, seguida de *L. bulla* (excepto a 30°C) y finalmente por *L. papuana*. Como resultado de sus bajos valores de ex, D, y los valores medios de vida, *L. papuana* tiene el tiempo de generación más corto (G) (Tabla 5), sin embargo, esta tendencia no es seguida por *L. cornuta* cuyos valores para G son los mayores. La tasa reproductiva neta (Ro) de *L. cornuta* y *L. papuana* a 20°C no muestra diferencia significativa entre ellos, pero es significativamente mayor que la de *L. bulla*. A 25°C, *L. bulla* tuvo los valores más altos para Ro, seguido por *L. cornuta* y por último *L. papuana*, al comparar los datos de Ro con el número de huevos por individuo y de fecundidad se observa el mismo patrón. En contraste los valores de la tasa intrínseca de crecimiento (r) fueron mejores para *L. papuana*, le sigue *L. bulla* y después *L. cornuta*. El contraste entre los valores de Ro y r, se debe a que las pruebas de r son en los primeros 5 días de vida de los organismos y la Ro toma en cuenta toda la línea de vida, esto se ve reflejado en el valor reproductivo (Vx) (Figura 11), en el caso de *L. papuana* se muestra una fuerte inversión temprana (24h) en la reproducción de esta especie como consecuencia de su ciclo de vida más corto, este comportamiento se aprecia en las tres temperaturas (Figura 5). En *L. bulla* una fuerte inversión en reproducción se muestra a 25°C, siendo más evidente entre las 72 y 240h antes de disminuir. Esta fuerte inversión en reproducción explica el mayor más alto de G para esta especie (tabla 2). *L. cornuta* por otra parte, hace una inversión regular en la reproducción durante toda su vida.

Al cotejar los resultados obtenidos con las tres especies de *Lecane* en este trabajo, se observó que coinciden parcialmente con los resultados de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (1998), ellos encontraron que para *L. luna* y *L. quadridentata* la temperatura óptima de

crecimiento es 25°C. Sin embargo, los valores de Ro para estas dos especies de *Lecane*, son 10-20 veces superiores a los valores de Ro encontrados en nuestro trabajo. Nuestros valores de Ro son 10 veces mayores que los de *Lecane furcata* (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2000) ambos trabajos a la misma temperatura y concentración de alimento. El valor reproductivo más alto (Vx) para *L. luna* se encontró a las 48 h bajo las mismas condiciones. El valor correspondiente para *L. quadridentata* se encontró a las 60h, Hummon y Bevelhimer (1980), obtuvo el valor más alto de Vx para *L. tenuiseta* también a las 48 h. Sin embargo, utilizaron 20°C y diferentes tipos y concentraciones de alimentos. En nuestro trabajo, *L. bulla* mostró los mayores valores de Vx después de 72 h a 25°C. Respecto a los valores de r en nuestro trabajo que son de cuatro a siete órdenes de magnitud más altos que los reportados por Serrania-Soto *et al.*, (2011) para la misma especie (*L. cornuta* y *L. papuana*) alimentados con *Scenedesmus acutus* (1×10^6 células/ml) y aclimatados a 24°C.

Los parámetros antes descritos sugieren que 25°C es la temperatura más adecuada para el crecimiento de *L. bulla* y *L. cornuta*, al compararlos con los valores a 20, 25 y 30°C. La excepción fue la especie *L. papuana* que si bien su desarrollo a 25°C fue bueno, los resultados de este trabajo muestran que su temperatura óptima es 30°C. Estos resultados concuerdan con la hipótesis del especialista térmico de Huey y Slatkin (1976) y Huey y Hertz (1983), que establece que un individuo que funciona bien en su rango de temperatura óptimo podría funcionar mal a temperaturas no óptimas.

Para mantener la homogeneidad en los parámetros de cultivo y en las pruebas toxicológicas se decidió que la aclimatación para las pruebas agudas se realizarían a 25°C para todas las especies incluida *L. papuana*, si bien se mencionó que la temperatura óptima para esta especie es de 30°C, los valores obtenidos a 25°C demostraron que también era candidata para realizar los ensayos aclimatada a esta temperatura.

El uso de especies de *Lecane* para la toxicidad no es nuevo. Finesinger (1926) fue el primer autor en proponer el uso de *Lecane inermis* como biomonitor de los efectos causados por la exposición a algunos productos químicos. Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001)

desarrollaron pruebas agudas con tres especies de rotíferos del género *Lecane*: *L. hamata*, *L. luna* y *L. quadridentata* con 11 sustancias tóxicas (cinco orgánicos y seis metales), bajo el argumento de que las pruebas de toxicidad más representativas en todo el mundo fueron realizadas con especies planctónicas, esto a pesar de que la deposición de contaminantes en los sedimentos es un evento importante para la toxicología (Rand y Petrocelli, 1985). Desde ese trabajo, este género se ha utilizado en México para analizar muestras ambientales en el río San Pedro en Aguascalientes (Rico-Martínez et al., 2000; Santos-Medrano et al., 2007; Torres-Guzmán et al., 2010a) En la región sur de la Huasteca (Mejía-Saavedra et al., 2005), para monitorear: el sistema de agua potable (Rico-Martínez et al., 2000) y las plantas de tratamiento de aguas residuales (Torres-Guzmán et al., 2010b; Robles-Vargas et al., 2012). Recientemente, en Polonia, Klimek y colaboradores (2013) utilizaron *L. inermis* para estudiar la sensibilidad a los metales traza seleccionados: Al, Cu, Fe, Mn, Sn y Zn.

Para evaluar la sensibilidad inter e intraespecífica se realizaron pruebas de toxicidad agudas empleando cinco especies: *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* colectadas en el estado de Aguascalientes (Tabla 3), las cuales fueron expuestas a cinco metales pesados y cinco pesticidas. Además seis cepas, una de ellas colectada en el Lago de Chapala, la cual a sido cultivada en el laboratorio aproximadamente durante 16 años, también se utilizaron ocho clonas de la especie *L. quadridentata*, las cuales fueron intoxicadas con plomo.

Al comparar los valores de CL50 de los pesticidas para cada especie se observó el siguiente arreglo en la sensibilidad a los tóxicos, *L. bulla* (deltametrina > carbarilo > metil-paratión > vinclozolin > glifosato) (Tabla 13), *L. cornuta* (deltametrina > carbarilo > metil-paratión > glifosato > vinclozolin) (Tabla 14), *L. luna* (deltametrina > carbarilo > metil-paratión > vinclozolin > glifosato) (Tabla 15), *L. papuana* (deltametrina > carbarilo > metil-paratión > vinclozolin > glifosato) (Tabla 16) y *L. quadridentata* (carbarilo > metil-paratión > deltametrina > vinclozolin > glifosato) (Tabla 17). El rotífero *L. luna* fue más sensible a la deltametrina, y *L. bulla* fue el más resistente para el glifosato. Los valores proporcionales entre sensibilidad y tolerancia a los cinco tóxicos empleados por especie fue: *L. bulla* = 211.71 (Figura: 57-61), *L. cornuta* = 840 (Figura: 62-66), *L. luna* = 24,847.14 (Figura: 67-

71), *L. papuana* = 3,210.26 (Figura: 72-76) y *L. quadridentata* = 47.17 (Figura: 77-81). Para el género los valores proporcionales por toxico fueron: carbarilo = 5.42, deltametrina = 1,482.85, glifosato = 2.80, Metil paratión = 3.92 y vinclozolin = 4.90.

El análisis de los datos sobre los efectos de los tóxicos muestran que en general para las cinco especies el glifosato fue menos toxico comparado con los diez tóxicos empleados en este trabajo. La especie *L. bulla* (CL50 = 146 mg/l), fue la más resistente al herbicida seguida por *L. luna* (CL50 = 173.93 mg/l), *L. quadridentata* (CL50 = 150.97.93 mg/l), *L. papuana* (CL50 = 121.99 mg/l), y la más sensible fue *L. cornuta* (CL50 = 67.87 mg/l) (Figura 92). Al analizar la bibliografía encontramos que para *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna* y *L. papuana*, no se tenían datos registrados. En el caso de *L. quadridentata*, Domínguez-Cortinas y colaboradores (2007) realizaron estudios con esta especie obtenida del Lago de Chapala (CL50 = 150 mg/l), bajo las mismas condiciones utilizadas en este ensayo, al compararlos con los resultados obtenidos en este trabajo pero con una especie local, se observó que los valores de toxicidad son semejantes (Figura 84). En el mismo trabajo Domínguez-Cortinas y colaboradores (2007) determinaron la CL50 para el cladóceros *Daphnia magna* (CL50 = 146 mg/l), no teniendo este valor diferencias significativas al ser comparado con *L. quadridentata*, sin embargo si presenta diferencias significativas con las otras cuatro especies. Los valores obtenidos de MATC sobrepasan la concentración recomendada para la protección de la vida acuática por Canadá y la ANZ (Figura 95).

En el caso del carbarilo la especie menos sensible fue *L. quadridentata* (CL50 = 3.20 mg/l), seguida por *L. bulla* (CL50 = 1.01 mg/l), después por *L. cornuta* (CL50 = 1.37 mg/l) y *L. luna* (CL50 = 1.27 mg/l), quienes no presentaron diferencias significativas en sus resultados, y la especie más sensible fue *L. papuana* (CL50 = 0.59 mg/l) (Figura 82). Pérez-Legaspi y colaboradores (2010) realizaron ensayos con este toxico con el rotífero *L. quadridentata* proveniente del lago de Chapala el cual presento un valor de CL50 = 13.72 mg/l, el cual es mayor 4.28 veces para el cultivo de la misma especie utilizado en este bioensayo, y 23.25 veces mayor que *L. papuana*. Los valores de MATC para las cinco

especies rebasan los límites permitidos planteados por la norma canadiense y la EPA, es decir no están protegidas (Figura 93).

La deltametrina fue el toxico para el que se presentó mayor sensibilidad, el rotífero *L. luna* presento un CL50 = 0.007 mg/l, siendo este el valor más bajo para los diez tóxicos analizados en este trabajo. También se obtuvieron valores bajos para *L. papuana* (CL50 = 0.038 mg/l), *L. cornuta* (CL50 = 0.18 mg/l), *L. bulla* (CL50 = 0.90 mg/l) y la especie con mayor tolerancia fue *L. quadridentata* (CL50 = 10.38 mg/l) (Figura 83), siendo 1,482.85 veces más grande su valor de CL50, en comparación con la especie más sensible. En la búsqueda bibliográfica no se encontraron trabajos realizados con el género *Lecane* para este piretroide, siendo este trabajo la primera aportación. Solo la norma canadiense considera los límites permisibles para este toxico, dan un valor para la protección de la vida acuática de 0.004 µl/l, este valor fue rebasado por los valores de MATC obtenidos en este trabajo (Figura 94).

Se han realizado estudios de los efectos del metil paratión en organismos del género *Brachionus* (Gama-Flores *et al.*, 2004; Fernández-Casalderrey *et al.*, 1993; Sarma *et al.*, 2001; Guzzella *et al.*, 1997), al comparar los datos con nuestros resultados se encontraron diferencias significativas, sin embargo en los ensayos los organismos fueron expuestos durante solo 24h, difiriendo con la metodología empleada en este trabajo, que fue de 48h de exposición. También se encontraron registros con *L. quadridentata*, la cual presento un valor de CL50 = 9.45 mg/l (Pérez-Legaspi *et al.*, 2010), al compararlo con *L. cornuta* (CL50 = 9.10 mg/l) no presento diferencias significativas. Sin embargo con el resto de las especies utilizadas en este trabajo si se encontraron diferencias en los valores de toxicidad, incluso para la misma especie. Con *L. quadridentata* (CL50 = 6.25 mg/l) nativa de Aguascalientes se encontró una diferencia de 1.51 veces mayor. Las especies *L. luna* (CL50 = 3.61 mg/l) y *L. papuana* (CL50 = 3.95 mg/l) no presentaron diferencias significativas entre sí, finalmente la menos resistente al metil paratión fue *L. bulla* (Figura 85). Las normas para la protección de la vida acuática de la EPA y la ANZ no protegen a las especies utilizadas en este trabajo (Figura 96).

Para el vinclozolin la especie *L. cornuta* obtuvo un CL50 = 151.2 mg/l, siendo la especie que presento mayor resistencia a dicho toxico, le siguen en sensibilidad *L. luna* (CL50 = 111.69 mg/l) que es 1.3 veces más sensible, *L. papuana* (CL50 = 67.01 mg/l) y *L. quadridentata* (CL50 = 60.75 mg/l) las cuales obtuvieron una diferencia promedio de 2.25 y 2.48 respectivamente, estas dos especies no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. La especie que presento mayor sensibilidad fue *L. bulla* (CL50 = 30.82 mg/l) (Figura 86), al compararla con la especie más resistente obtuvo una diferencia de 4.9. No se encontraron normas para la protección de la vida acuática que legislen los valores del vinclozolin, esto sugiere que no existe riesgo aparente, ignorando los riesgos crónicos de dicho toxico.

Al comparar los valores de CL50 de los metales para cada especie se observó el siguiente arreglo en la sensibilidad a los tóxicos, *L. bulla* (Cd = Cu > Pb > Zn > As) (Tabla 6), *L. cornuta* (Cu > Pb > Cd > Zn > As) (Tabla 7), *L. luna* (Cd > Cu > Zn > Pb > As) (Tabla 8), *L. papuana* (Pb > Cu > Cd > Zn > As) (Tabla 9) y *L. quadridentata* (Cu > Pb > Cd > Zn > As) (Tabla 10). Los valores de proporciones entre la especie más sensible y más tolerante fue: *L. bulla* = 6.78 (Figura 12-16), *L. cornuta* = 90.25 (Figura 17-21), *L. luna* = 105 (Figura 22-26), *L. papuana* = 83.91 (Figura 27-31) y *L. quadridentata* = 53.33 (Figura 32-36). Los valores entre sensibilidad y tolerancia a los cinco metales pesados utilizados en las cinco especies son los siguientes: As = 20.21, Cd = 14.58, Cu = 3.35, Pb = 12.60 y Zn = 5.93.

Entre los metales pesados analizados el arsénico presento menor toxicidad. La especie más sensible fue *L. bulla* (CL50 = 0.19 mg/l) seguida de *L. papuana* (CL50 = 1.93 mg/l), *L. luna* (CL50 = 2.52mg/l), *L. cornuta* (CL50 = 3.61mg/l) y la especie con menor sensibilidad fue *L. quadridentata* (CL50 = 3.83mg/l) (Figura 37), sin embargo estas dos últimas estadísticamente hablando no presentan diferencias significativas. Los datos obtenidos en este trabajo son los primeros en ser reportados para la sensibilidad al arsénico en el género *Lecane*. Las normas de Canadá, ANZ, EPA y la NOM no protegen a la mayoría de las especies, *L. bulla* es la única que protegen la NOM y la EPA (Figura 87).

Al comparar los datos obtenidos con la bibliografía se encontraron algunos datos similares para el cadmio en el trabajo de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001), ellos realizaron ensayos con *L. quadridentata* (CL50 = 0.28 mg/l) y *L. luna* (CL50 = 0.35mg/l), los cuales no presentan diferencias estadísticamente significativas con los valores obtenidos en este trabajo para: *L. cornuta* (CL50 = 0.35 mg/l) y *L. quadridentata* (CL50 = 0.32 mg/l). También realizaron ensayos con *L. hamata* (CL50 = 0.23 mg/l), este valor fue similar al obtenido en *L. quadridentata* (CL50 = 0.22 mg/l) en nuestro trabajo. Las especies que tuvieron mayor sensibilidad fueron *L. bulla* (CL50 = 0.028mg/l) y *L. luna* (CL50 = 0.024 mg/l), las cuales entre si no presentan diferencias significativas (Figura 38). El valor de CL50 para *L. luna* (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001) fue mayor 14.58 veces en comparación con el dato obtenido en este trabajo. Las concentraciones del límite máximo permitido para la protección de la vida acuática según la NOM es de 0.1 (promedio mensual) protegiendo a la mayoría de los organismos excepto a *L. quadridentata*. *L. bulla*, *L. cornuta* y *L. papuana* no son protegidas por la EPA, la ANZ y la canadiense (Figura 88).

En el trabajo de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001) se obtuvieron valores para el cobre con tres especies del género *Lecane*, obteniendo para *L. quadridentata* un CL50 = 0.33 mg/l, el cual fue mayor 4.58 veces comparado el valor de *L. quadridentata* (CL50 = 0.072mg/l) obtenido en este trabajo. En el caso de *L. luna*, reportaron un valor de CL50 = 0.060 mg/l, este presentó una diferencia en la sensibilidad de 1.56. En el mismo trabajo (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001) se analizó a *L. hamata* (CL50 = 0.23 mg/l) la cual al ser comparada con el resto de las especies presentó diferencias estadísticamente significativas, siendo más tolerante para este tóxico que el resto de las especies analizadas en este trabajo, las cuales se encuentran en un rango de 0.028 – 0.094 mg/l (Figura 39). En contraste, Klimek y colaboradores (2013) presentaron un valor de CL50 = 0.025 mg/l para *L. inermis*, este dato si bien no tiene diferencia estadísticamente significativa con el obtenido para *L. bulla* en el trabajo presente, es el más bajo reportado para este género. Las normas de Canadá y ANZ no protegen a ninguno de los organismos, en cambio la NOM propone un valor de 4 mg/l, siendo este valor muy superior al resto de las normas (Figura 89).

Se encontraron registros para cinco con la especie *L. quadridentata* la cual presentó un valor de $CL_{50} = 0.123$ mg/l, (Torres-Guzmán *et al.*, 2010), al ser comparado con el valor reportado para *L. inermis* $CL_{50} = 0.1574$ mg/l (Klimek *et al.*, 2013), no se observaron diferencias significativas. Estos valores coinciden con el valor de *L. bulla* ($CL_{50} = 0.15$ mg/l) obtenido en este trabajo. En contraste con los valores antes citados la especie *L. quadridentata* ($CL = 0.35$ mg/l) que fue analizada en este ensayo mostró el doble de tolerancia para este tóxico, *L. cornuta* ($CL = 0.36$ mg/l) también presentó el mismo comportamiento. La especie *L. Luna* ($CL = 0.096$ mg/l) fue la que mayor sensibilidad presentó y *L. papuana* ($CL = 0.89$ mg/l) obtuvo un valor de 9.2 veces mayor de tolerancia al tóxico (Figura 41). Los valores propuestos para la ANZ no protegen a ninguno de los organismos, la canadiense solo protege a *L. bulla* y *L. luna*. Las directrices de la EPA excluyen de su protección a *L. papuana* y *L. quadridentata* (Figura 91).

Se realizaron pruebas agudas con plomo para cinco especies y seis cepas y ocho clonas de la especie *L. quadridentata*, esto con la finalidad de evaluar no solo la sensibilidad interespecífica, sino también la intraespecífica. A continuación se enlistan las especies utilizadas, de la más sensible a la más tolerante: *L. papuana* ($CL_{50} = 0.023$ mg/l), *L. bulla* ($CL_{50} = 0.06$ mg/l), *L. cornuta* ($CL_{50} = 0.11$ mg/l) y *L. luna* ($CL_{50} = 0.13$ mg/l) (Figura 40), Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001) también realizaron ensayos con plomo en *L. luna* ($CL_{50} = 0.14$ mg/l), sus resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los valores obtenidos en este trabajo. Los mismos autores reportaron valores para *L. hamata* ($CL_{50} = 0.68$ mg/l), esta especie fue una de las más resistentes para el plomo. Las normas CAN y ANZ no protegen a ninguna de las cinco especies utilizadas en este ensayo, los valores de MATC para *L. quadridentata* rebasan los límites propuestos por la norma EPA, el límite que establece la NOM protege a todos los organismos (Figura 90).

Al evaluar la toxicidad del plomo en la especie *L. quadridentata* se observó que el rango de toxicidad era de 0.28 a 0.69 mg/l, la diferencia entre la sensibilidad entre los organismos fue de 2.46 veces. En seguida se enlistan del más resistente al más sensible. La clona R1

(CL50 = 0.69 mg/l) fue la que presentó mayor tolerancia al plomo, seguida de R16 (CL50 = 0.45 mg/l). La cepa LqCH (CL50 = 0.38 mg/l), proveniente del lago de Chapala no presentó diferencias significativas con la clona R5 (CL50 = 0.36 mg/l), las siguientes cepas y clones tampoco presentaron diferencias significativas entre sí: clona R9 (CL50 = 0.33 mg/l), cepa Lq10-11 (CL50 = 0.32 mg/l), cepa LqCV (CL50 = 0.31 mg/l), clona R6 (CL50 = 0.31 mg/l), clona R10 (CL50 = 0.31 mg/l), las especies más sensibles son las siguientes: cepa Lq-6 (CL50 = 0.29 mg/l), cepa Lq10-67 (CL50 = 0.28 mg/l), cepa Lq34 (CL50 = 0.26 mg/l) y clona R8 (CL50 = 0.26 mg/l) (Figuras 48 y 56). La NOM es la única de las normas que protege del plomo a la mayoría de las cepas y los clones, a excepción de la clona R1 y R16 (Figura 92).

Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001) también realizaron estudios con *L. quadridentata* (CL50 = 3.7 mg/l) proveniente del lago de Chapala, en el presente trabajo se empleó la misma cepa utilizada por los autores antes citados, al comparar ambos resultados se observó que esta cepa era más resistente al plomo 9.73 veces hace 16 años. Al analizarlo contra el valor más alto obtenido para esta especie se obtuvieron diferencias significativas al compararlo con el trabajo de los autores antes citados, ya que la clona R1 fue 5.33 veces más sensible.

A pesar de que el género *Lecane* es uno de los más diversos del Phylum Rotífera (Segers, 1995) existen pocos estudios moleculares; Walsh y colaboradores (2009) realizaron un estudio con dos marcadores moleculares para encontrar especiación críptica en *L. bulla*, García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013) utilizaron el código de barras de ADN (COX) como herramienta para identificar especies. Con este trabajo se propuso estudiar la relación entre la distancia filogenética y la sensibilidad a tóxicos utilizando dos marcadores moleculares (COX e ITS). Para el análisis filogenético con COX se utilizaron secuencias del Genbank las cuales al realizar las hipótesis filogenéticas se agruparon con los organismos de su misma especie, sin embargo se encontraron diferencias en las distancias genéticas; entre las especies de *L. cornuta* un 3.63%, *L. luna* un 9.53%, *L. bulla* un 15.28%, *L. papuana* un 15.88%, las especies *L. ludwigii* y *L. ohioensis*, son tratadas como sinónimos o variedades (Segers, 1995), la distancia encontrada entre ellas fue de 18%. La

mayor distancia se encontró entre los organismos de la especie *L. quadridentata* que presentaron una distancia de 18.30% con uno de los haplotipos de esta misma especie y de 18% con la clona R8.

En el análisis de distribución de haplotipos para COX se obtuvo una diversidad de 0.7353; de los 17 cultivos analizados se obtuvieron nueve haplotipos, de los cuales cuatro pertenecen a la especie *L. quadridentata*. La clona R8 obtuvo un valor de variabilidad del 18.15%, la cepa del Lago de Chapala 0.30% y la cepa LqCV un 0.15% (Anexo) el resto de los cultivos de la especie *L. quadridentata* no presentó ningún porcentaje de variación. El nivel de divergencia genética entre R8 (18.15%) y los cultivos de *L. quadridentata* fue similar a los observados entre las especies dentro del género *Lecane* obtenidos en este trabajo, el porcentaje de variación fue de 24.96 a 0%. Walsh y colaboradores (2009) mencionan un valor de variación aproximado de 12 a 15%, entre especies dentro de otros géneros de rotíferos. Quizá este valor represente un proceso de especiación en la clona R8. Contrario a lo esperado en el análisis de distribución de haplotipos para ITS se obtuvo una diversidad de 0.6405, menor que para COX. De los 17 cultivos analizados se obtuvieron siete haplotipos, dos dentro de los cultivos de *L. quadridentata*. La clona R8 obtuvo un valor de variabilidad del 3.85%, con respecto a los otros cultivos de *L. quadridentata* siendo menor que la distancia encontrada con el marcador COX. La literatura sugiere que el marcador ITS es una herramienta útil para calcular y detectar la variación genética entre especies de un mismo género, de una especie y de subespecies, esto debido a su rápida evolución (Devran *et al.*, 2002), sin embargo en este trabajo se encontró mayor variación genética para el marcador Cox.

En los últimos años se ha incrementado el estudio filogenético en el Phylum Rotífera, sin embargo no se han utilizado como una herramienta para predecir la toxicidad de químicos, la hipótesis planteada para este trabajo fue que entre más cercanas fueran las relaciones filogenéticas, más parecida sería la sensibilidad a los tóxicos; al hacer la correlación de los CL50 y la distancia genética para las cinco especies y los diez tóxicos se aprecia en el cuadrante inferior derecho (Figura 102) que *L. bulla* es altamente sensible al arsénico,

cadmio, metil paratión, vinclozolin, cinc, también muestra una relación negativa con *L. cornuta*, estas especies tienen una distancia genética de 20.64%, en el mismo cuadrante se muestra que *L. cornuta* es más resistente al arsénico, cadmio, metil paratión y vinclozolin. En el cuadrante inferior izquierdo solo se concentra en la distancia genética, en donde se muestra una relación negativa entre las especies *L. quadridentata* y *L. papuana*, siendo estas las especies con mayor distancia filogenética (23.56%), sin embargo no se observa que sigan un patrón opuesto en la sensibilidad a los tóxicos. En el cuadrante superior izquierdo se observa que *L. cornuta* es la especie más sensible para el glifosato y *L. bulla* la más resistente. El cuadrante superior derecho muestra que *L. quadridentata* tiene una relación positiva con el carbarilo, deltametrina y plomo, esto significa que es más resistente para estos tóxicos. *L. luna* muestra mayor resistencia al cobre y una relación negativa para *L. quadridentata* presentando un porcentaje de variación de 23.23%.

La figura 103 muestra la sensibilidad de las especies, cepas y clonas intoxicadas con plomo, en el cuadrante inferior derecho las especies *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna* y *L. papuana* muestran una relación negativa hacia este tóxico, es decir tienen mayor sensibilidad. En la parte media de los cuadrantes derechos se muestra un agrupamiento de las especies de *L. quadridentata*, esto debido a la poca o nula variabilidad genética presentada entre las cepas y clonas, también se aprecia la relación positiva, es decir la resistencia de la clona R1, seguida por R16, siendo estas las más resistentes a dicho tóxico, este resultado causa controversia en los datos ya que genéticamente es igual a los demás cultivos (excepto LqCh, LqCv y R8) y pertenece al mismo lugar que el resto de las clonas. La clona R8 se observa justo en el centro de la figura, esto indica su alta diferencia genética (10.80%) y susceptibilidad al plomo, comparado con el resto de los organismos de su misma especie. Probablemente la divergencia genética de la cepa R8 fue causada por un evento aislado de inserción de ADN por un transposón o un elemento parecido. A pesar de esta divergencia genética la sensibilidad a plomo entre las clonas de *L. quadridentata* es muy similar como se esperaba, esto se muestra en el agrupamiento de cepas y clonas de esta especie (figura 103). Este análisis sugiere que existe relación entre la distancia genética y la sensibilidad a tóxicos, sin embargo las diferencias en los resultados pueden sugerir que existen otros factores o/y otros genes que influyen en su respuesta al estrés tóxico.

7. CONCLUSIONES

Con los resultados de las tablas de vida, se aumentó el conocimiento sobre la demografía de tres especies más del género *Lecane*. Al comparar los parámetros de la tabla de vida con los valores encontrados para otras especies del género *Lecane* en la literatura, se encontraron diferencias importantes entre ellos. Se determinó que la temperatura óptima para estos tres organismos del género *Lecane* es a 25°C, la especie que mejores resultados obtuvo en general fue *L. papuana*, siendo la que mejor reacciona a 30°C, por lo que se concluyó es una especie de estenotérmica. En base a los parámetros de la tabla de vida, la producción de huevos partenogénicos y la eclosión, se concluyó que estas tres especies eran buenas candidatas para desarrollar pruebas de toxicidad o ecotoxicología.

Existen diferencias significativas en la sensibilidad a los tóxicos entre los miembros del género *Lecane*, tanto en la literatura citada como en los datos reportados para el trabajo presente. *L. bulla* fue la especie que presentó mayor sensibilidad para seis (metil paratión, vinclozolin, arsénico, cadmio, cobre y plomo) de los diez tóxicos empleados. No se observó un patrón visible en cuanto a la resistencia a los tóxicos. En general se presentó mayor sensibilidad a los metales pesados, el rango fue de 0.023 – 3.84 mg/l, presentando el siguiente arreglo: cobre > plomo > cadmio > cinc > arsénico. En cambio para los pesticidas fue de 0.007 – 190.54 mg/l, con el siguiente orden: deltametrina > carbarilo > metil-paratión > vinclozolin > glifosato. En el análisis realizado con plomo entre especies el rango fue 0.023 – 0.69 mg/l, para el caso de las cepas y clones de *L. quadridentata* fue 0.26 – 0.69 mg/l. Estas diferencias sugieren que es necesario realizar pruebas de toxicidad con diferentes especies para tener un entendimiento integrado de la sensibilidad de los organismos a sustancias tóxicas en ambientes acuáticos.

El análisis de componentes principales muestra que existe relación entre la distancia genética y la sensibilidad a los tóxicos, esta relación se aprecia mejor en las pruebas de toxicidad entre especies, clones y cepas intoxicadas con plomo. Sin embargo se sugiere realizar estudios con un mayor número de especies del género *Lecane* para comprender los rasgos demográficos y los usos potenciales de un género tan prolífico.

8. GLOSARIO

Aclimatación: cambios fisiológicos graduales que sufre un organismo en respuesta a modificaciones lentas y relativamente perdurables del ambiente.

CL10: dosis calculada estadísticamente, de un agente químico o físico que se espera que mate al 10% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

CL50: dosis calculada estadísticamente, de un agente químico o físico que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

Cosmopolita: organismo que puede encontrarse en cualquier parte del mundo siempre que se halle las condiciones climáticas adecuadas para su sobrevivencia.

Ecotoxicología: estudia el destino y los efectos de los contaminantes en los ecosistemas, intentando explicar las causas y prever los riesgos probables. La ecotoxicología prospectiva evalúa la toxicidad de las sustancias antes de su producción y uso. La ecotoxicología retrospectiva se ocupa de confirmar si la sustancia produce daños en el ecosistema.

Efecto agudo: efecto de rápida aparición y curso (en las primeras 24 h o en los primeros 14 d, según el tipo de estudio) producidos por una sola dosis o por corta exposición a una sustancia o radiación.

Especie críptica: especie diferente que muestra poca o ninguna diferenciación morfológica y por lo tanto es difícil de distinguir.

Fungicidas: sustancias tóxicas que se emplean para impedir el crecimiento o para matar los hongos y mohos perjudiciales para las plantas, los animales o el hombre.

Haplotipo: Un haplotipo es un conjunto de variaciones del ADN, o polimorfismos, que tienden a ser heredados juntos.

Herbicidas: sustancia o mezcla de sustancias utilizada para matar o inhibir el crecimiento de plantas consideradas como indeseables (malezas o malas hierbas).

Insecticidas: Sustancia química, de origen orgánico o inorgánico, empleada para destruir insectos no deseados.

Monoclonal: cultivo producido a partir de solo un organismo.

NOEC: concentración donde no se observa un efecto significativo con respecto al control.

LOEC: concentración mínima donde no se observa un efecto significativo con respecto al control.

Lóriga: cubierta dura de cutícula de los Rotíferos.

Partenogénesis: desarrollo de un organismo adulto a partir de un ovulo no fecundado.

Pseudocelomados: Animales cuya cavidad corporal no es de origen mesodérmico, sino que representa un blastocele embrionario persistente y recibe el nombre pseudoceloma o blastoceloma.

Toxicidad: capacidad intrínseca de una sustancia para causar un efecto adverso en un organismo.

Xenobiótico: sustancia ajena o extraña a los seres vivos, es decir, las sustancias que no han sido producidas por la biota. El término incluye a los agentes benéficos, los tóxicos y los inactivos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2003. Piretrinas y Piretroides. (En línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts155.pdf). Última revisión mayo 2014.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).ATSDR. 2004. Cobre. (En línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts132.pdf). Última revisión mayo 2014.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).ATSDR. 2004. Plomo. (En línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts13.pdf). Última revisión mayo 2014.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).ATSDR. 2005. Zinc. (En línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts60.pdf). Última revisión mayo 2014.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).ATSDR. 2007. Arsénico. (En línea: <http://www.atsdr.cdc.gov/es/>). Última revisión mayo 2014.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).ATSDR. 2012. Cadmio (En línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts5.pdf). Última revisión mayo 2014.
- Ahmed A. O., Mukhtar M. M., Kools-Sijmons M., Fahal A. H., de Hoog S., van den Ende B. G., y van Belkum A. 1999. Development of a Species-Specific PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Procedure for Identification of *Madurella mycetomatis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(10); 3175-3178.
- Arredondo M. y Núñez M. T. 2005. Iron and Cooper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*. 26; 313-327.
- Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality. 2000. National Water Quality Management Strategy. Australian and New Zealand. Environment and Conservation Council. Agriculture and Resource. Management Council of Australia and New Zealand.

- Begon M., Harper J. L. y Townsend C. P. 1996. Ecology: Individuals, Populations, and Communities, Third edition. Blackwell Scientific: 1068.
- Badii M. H. y Varela S. 2008. Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente. CULCyT.5 (28); 5-17.
- Burguer M. y Fernández S. 2004. Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. Revista Médica del Uruguay. 20(3); 202-207.
- Bustos L. M. C., Díaz B. M. C. y Espinosa R. A. J. 2004. Pruebas de toxicidad acuática. Fundamentos y métodos. Universidad nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, sección de Ingeniería Ambiental. Bogotá D.C.; 36.
- Castañé P. M., Topalián M. L., Cordero R. R., y Salibián A. 2003. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. Revista de Toxicología. 20; 13-18.
- Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life. 2007 Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Imidacloprid. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.
- Cebrián J., Díaz-Alersi R., Coma M. J. y Bello D. G. 2007. Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. (En línea: <http://www.uninet.edu/tratado/indautor.html>).
- Córdoba P. 2002. Toxicología. Manual moderno. Bogotá. 110,111- 128-129.
- Dahms H., Hagiwara A. y Lee J. 2010. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. Aquatic toxicology. 101; 1–12.
- Decourtye A., Devillers J., Cluzeau S., Charreton M. y Pham-Delègue M. H. 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57(3); 410-419.
- Devran Z., Gözel U., Söğüt M. A., Yildiz Ş., y Elekçioğlu İ. H. 2002. Identification of root-knot nematodes in the Mediterranean region of Turkey by using rDNA and mtDNA markers. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 26(6): 337-341.

- Domínguez-Cortinas G., Mejía-Saavedra J., Santos-Medrano G. E. y Rico-Martínez R. 2008. An analysis of the toxicity of glyphosate and Faena® using the freshwater invertebrates *Daphnia magna* and *Lecane quadridentata*. Toxicological and Environmental Chemistry. 90 (2): 377-384.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2000. Vinclozolin. (En línea: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/2740fact.pdf>).
- Ehrenberg C. G. Über die Entwicklung und Lebensdauer der Infusions, nebst fernere Beiträgen zu einer Verleischung ihrer organischen Systeme. Abh. Akad. Wiss., Berlin. 1-154.
- Fernández-Casalderrey F, Ferrando F. M. y Andreu-Moliner E. 1993. Effect of the insecticide methylparathion on filtration and ingestion rates of *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia magna*. Science of the total environment. 134; 867–876.
- Ferrer D. A. 2003. Intoxicación por metales (Metal poisoning). ANALES Sis San Navarra. 26 (1): 141-153.
- FinchTV 1.4.2 (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>).
- Finesinger J. E. 1926. Effect of certain chemical and physical agents on fecundity and length of life, and on their inheritance in a rotifer, *Lecane (Distyla) inermis* (Bryce). Journal of Experimental Zoology. 44; 63.
- Finol G., Del Pilar B. M., Maldonado M., Marcanno L. y Valero N. 2008. Acumulación y efecto del Cadmio sobre la proliferación de células mononucleares humanas (CMN) en cultivo. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 42: 39-51.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. y Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3(5); 294-299.
- Fontaneto D., Murat K., Herniou, E. A. y Barraclough T. G. 2009. Extreme levels of hidden diversity in microscopic animals (Rotifera) revealed by DNA taxonomy. Molecular Phylogenetics and Evolution, 53: 182-189.
- Fukuto T. R. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environmental Health Perspectives, 87; 245–254.

- Galkovskaja G. A. 1987. Planktonic rotifers and temperature. *Hydrobiologia*. 147; 307-317.
- Gama-Flores J. L., Sarma S.S.S. y Nandini S. 2004. Acute and chronic toxicity of the pesticide methyl parathion to the rotifer *Brachionus angularis* (Rotifera) at different algal (*Chlorella vulgaris*) food densities. *Aquatic Ecology*. 38; 27–36.
- Gandolfi A., Bonilauri P., Rossi V., y Menozzi P. (2001). Intraindividual and intraspecies variability of ITS1 sequences in the ancient asexual *Darwinula stevensoni* (Crustacea: Ostracoda). *Heredity*. 87(4); 449-455.
- Garcia S., Abu-Qare A., Meeker-O'Connell W., Borton A. y Abou-Donia M. 2003. Methyl parathion: a review of health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 6(2); 185-210.
- García-Morales A. E., y Elías-Gutiérrez M. 2004. Rotifera from southeastern Mexico, new records and comments on zoogeography. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 75(1): 99-120.
- García-Morales A. E. y Elías-Gutiérrez M. 2013. DNA barcoding of freshwater Rotifera in Mexico: Evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecology Resources*. 13: 1097–1107.
- Geovanny F., M. Del P. Bracho M. B., Maldonado L., Marcano y Valero N. 2008. Acumulación y efecto del cadmio sobre la proliferación de células mononucleares humanas (cmn) en cultivo. *Boletín Del Centro De Investigaciones Biológicas*. 42 (1): 39–51.
- Gilbert J. J., y Walsh E. J. 2005 *Brachionus calyciflorus* is a species complex: mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. *Hydrobiologia*, 546: 257–265.
- Gilbert S. G. 2010. A small dose of toxicology. 2th Ed. Healthy World Press 83-85pp.
- Gi-Sik M., y Joong-Ki P. 2009. *Eurotatorian paraphyly*: Revisiting phylogenetic relationships based on the complete mitochondrial genome sequence of Rotaria rotatoria (Bdelloidea: Rotifera: Syndermata). *BMC Genomics*. 10:533.

- Glez-Peña D., Gómez_Blanco D., Reboiro-Jato M., Fdez-Riverola, F. y Posada, D. 2010. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic acids research. Web Server issue.* W14-8.
- Gosse P. H. 1851. A catalogue of Rotifera found in Britain; with descriptions of five new genera and thirty-two new species. *Journal of Natural History.* 8(45); 197-203.
- Graeme K. A. y Pollack C. V. 1998. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *The Journal of Emergency Medicine.* 16(1); 45-56.
- Guerrero-Bosagna C., Settles M., Lucker B. y Skinner M. K. 2010. Epigenetic Transgenerational Actions of Vinclozolin on Promoter Regions of the Sperm Epigenome. *PLoS ONE.* 5(9): 1-17.
- Guzzella L., Gronda A. y Colombo L. 1997. Acute toxicity of organophosphorus insecticides to marine invertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 59 (2); 313–320.
- Hanazato T. 2000. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution.* 112; 1-10.
- Hernández-Rodríguez M. A., Rico-Martínez R., Santos-Medrano G. E., Velázquez-Rojas C. A. y Sánchez-Martínez V. G. 2000. Life Table of the rotifer *Lecane furcata* (Murray, 1913). *Scientiae Naturae* 3; 18-26.
- Huang X. y Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9, 868-877.
- Huey R. B. y Hertz P. E. 1983. Is a Jack-of-All-Temperatures a Master of None? *Evolution* 38; 441-444.
- Huey R. B. y Slatkin, M. 1976. Cost and benefits of lizard thermoregulation. *The Quarterly Review of Biology.* 51(3); 363-384.
- Janssen C. R. y Persoone G. 1993. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. I. Conceptual framework and applications. *Hydrobiologia.* , vol. 255-56: 21–32.
- Jaramillo F., Rincón A. R. y Rico-Martínez R. 2009. *Toxicología Ambiental.* 261.

- Katoh K. y Standley D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*. 30(4); 772-780.
- Katsanevakis S. y Verriopoulos G. 2006. Modelling the effect of temperature on hatching and settlement patterns of meroplanktonic organisms: the case of octopus. *Scientia marina*. 70(4); 699-708.
- Klimek, B., Fiałkowska E., Kocerba-Soroka W., Fyda, M. Sobczyk J. y Pajdak-Stós A. 2013. The Toxicity of Selected Trace Metals to *Lecane inermis* Rotifers Isolated from Activated Sludge. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 91; 330–333.
- Krebs C. J., 1985. *Ecología: Estudio de la distribución y la abundancia*, 2ª. Edición. Ed. Harla. México D.F., México: 753.
- Kress W. J. y Erickson D. L. 2008. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(8); 2761-2762.
- Liston A., Robinson W. A., Piñero D. y Alvarez-Buylla E. R. 1999. Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 11(1); 95-109.
- Llorente-Bousquets J. y Ocegueda S. 2008. Estado del conocimiento de la biota. Pp. 283-322. En: *Capital Natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. <http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/cuantasesp.html>, última consulta: enero 2013.
- Manthey G. M. y McEwen J. E. 1995. The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 14 (6): 4031-4043.
- McMann C. M., y Cohen, G. C. 1991. U.S. Patent No. 5,014,220. Reliability model generator. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Mejía-Muñoz M., Rodríguez-Serna M. y Güemez-Ricalde J. 2001. Determinación de la Concentración Letal Media (Cl50) y Efecto Histopatológico del Permanganato de

Potasio, en Renacuajos de Rana Toro *Rana catesbeiana* (Anura:Ranidae). Universidad y Ciencia. 17 (34): 65-72.

- Mejía-Saavedra J., Sánchez-Armas S., Santos-Medrano G. E., González-Amaro R., Razo-Soto I., Rico-Martínez R. y Díaz-Barriga F. 2005. Effect of coexposure to DDT and manganese on freshwater invertebrates: pore water from contaminated rivers and laboratory studies. *Environmental toxicology and chemistry*. 24(8); 2037-2044.
- Melo R. V. 2007. *Bioquímica de los Procesos Metabólicos*. 2ª edición. 374.
- Miller G. T. 2002. *Sustaining the Earth, An integrated Approach*. 5th Ed. Brooks/Cole. 227-2332.
- Miller M. A., Pfeiffer W., y Schwartz, T. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in proceedings Gateway Computing Environments Workshop (GCE). pp. 1-8.
- Mills S., Alcántara-Rodríguez J. A., Ciro-Pérez J., Gómez, A., Hagiwara A., Galindo K. H., Jersabek C. D., Malekzadeh-Viayeh R., Leasi F., Lee j., Welch, D. B. M., Papakostas S., Riss S., Segers H., Serra M., Shiel R., Smolak R., Snell T. W., Stelzer C. P., Tang C. Q., Wallace R. L., Fontaneto D. y Walsh E. J. 2016. Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*. 1-20.
- Minkoff G., Lubzens E. y Kahan D. 1983. Environmental factors affecting hatching of rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting eggs. *Hydrobiologia*. 104; 61-69.
- Monroy C. M., Cortés A. C., Sicard D. M. y de Restrepo H. G. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*. 25(3); 335-45.
- Montero-Pau J., y Gómez A. 2011. Development of genomic resources for the phylogenetic analysis of the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia*. 662:43-50.
- Moraga P., Ávila, R. y Vilaxa, A. 2015. Salinidad y temperatura óptimas para reproducción ovípara y desarrollo de *Artemia franciscana*. *Idesia (Arica)*. 33(1); 85-92.

- Müller O. F. 1776. Zoologiae Danicae prodromus: seu Animalium Daniae et Norvegiae indigenarum characteres, nomina, et synonyma imprimis popularium. typis Hallageriis. Havniae. 282.
- Muller O. F. 1786. Animalcula infusoria fluviatilia et marina, quae detexit, systematice descripsit et ad vivum delineari curavit Otho Fridericus Muller... sistit opus hoc posthumum quod cum tabulis aeneis L. in lucem tradit vidua ejus nobilissima, cura Othonis Fabricii. Quarto. Havniae. 367.
- Murray J. (1913). Notes on the family *Cathypnidae*. J. r. microsc. Soc, 545-564.
- Navarro-Aviño J. P., Aguilar A. I. y López-Moya J. R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Ecosistemas. 16(2): 10–25.
- Nichols H. W. 1973. Growth media - freshwater. In: Stein, J. R. (Ed.). Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press. Cambridge, MA., U. S. A. Chapter one.
- Nogrady T., Wallace R. L. y Snell T. W. 1993. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. Rotifera. SPB Academic Publishing. 4: 142.
- NOM-001-ECOL-1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación 30 de abril de 1997.
- Nordberg G. 2012. Metales: Propiedades químicas y toxicidad productos químicos. (En línea:<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf>) Última revisión mayo 2017.
- OMS. 2010. Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas: directrices para el registro de plaguicidas. (En línea: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70602/1/WHO_HTM_NTD_WHOPES_2010.7_spa.pdf) Última revisión junio 2017.
- Pagaza M. S., Pérez C. A. y Villaseñor C. R. 2001. Biología de protozoarios e invertebrados no artrópodos. Instituto Politécnico Nacional. 84, 85 pp.

- Pérez-García P. E. y Azcona-Cruz Maria Isabel. 2012. Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 17 (3); 199-205.
- Pérez-Legaspi I. A., Quintanar J. L., y Rico-Martínez R. 2010. Comparing toxicity endpoints on *Lecane quadridentat* (Rotifera: Monogononta) exposed to two anticholinesterases pesticides. *Environmental Toxicology*. 27(9); 518-525.
- Pérez-Legaspi I. A., y Rico-Martínez R. 1998. Effect of temperature and food concentration in two species of litoral rotifers. *Hydrobiologia*. 341-348.
- Pérez-Legaspi I. A., y Rico-Martínez R. 2001. Acute toxicity tests on three species of the genus *Lecane* (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia*. 375-381.
- Plum L. M., Rink L. y Haase H. 2010. The essential toxin: impact of zinc on human health. *International journal of environmental research and public health*, 7(4); 1342-1365.
- Ramírez R. P. y Mendoza C. A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México. *Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología*. 5-8.
- Rand G. M. y Petrocelli S. R. 1985. *Fundamentals of Aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation. 666 pp.
- Rangel-Montoya. E. A., Montañez-Hernández L. E., Luévanos-Escareño M. P. y Balagurusamy N. 2015. Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. *Terra Latinoamericana*. 33(2); 103-118.
- Rathore H. S. y Nollet L. M. L. 2012. *PESTICIDES: Evaluation of Environmental Pollution*: 4.
- Reynolds C. S. 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press. www.cambridge.org/9780521844130.
- Rico-Martínez R., Arzate-Cárdenas M. A., Robles-Vargas D., Pérez-Legaspi I. A., Alvarado-Flores J. y Santos-Medrano G. E. 2016. Rotifers as Models in Toxicity Screening of Chemicals and Environmental Samples. *Invertebrates-Experimental Models in Toxicity Screening*. 76.
- Rico-Martínez R., Pérez-Legaspi I. A., Arias-Almeida J. C. y Santos-Medrano G. E. 2013. Rotifers in ecotoxicology. In *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. 973-996.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Rico-Martínez R., Velázquez-Rojas C. A., Pérez-Legaspi I. A., y Santos-Medrano G. E. 2000. "The use of aquatic invertebrate toxicity tests and invertebrate enzyme biomarkers to assess toxicity in the states of Aguascalientes and Jalisco, Mexico." In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Volume 2 (F. M. Butterworth, A. Gunatilake, y M. E. Gensebatt Bonaparte, eds.). Plenum Press; 427-438.
 - Robles-Vargas D., Montoya-Castillo S. M., Avelar-González F. J., Jáuregui-Rincón J., Rodríguez-Valadez F. J. y Rico-Martínez R. 2012. Assessment of the quality and toxicity of the discharges of a wastewater treatment plant and alternatives to improve its operation. *Journal of Environmental Health and Science Part A*. 47; 589-597.
 - Routt R., y Roberts J. R. 1999. Recognition and Management of Pesticide Poisonings (En línea: <http://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare>). 34, 48. Última revisión Mayo 22, 2014.
 - Rozas J. 2009. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. *Bioinformatics for DNA sequence analysis*. 337-350.
 - Salazar López N. J. y Aldana Madrid M. L. 2012. Herbicida Glifosato: Usos, Toxicidad y Regulación. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 8 (2): 23-38.
 - Sánchez-Bain A., Forget G., Feola G., y Ronco A. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. CIID, Ottawa, ON, CA. 115.
 - Santos-Medrano G. E. y Rico-Martínez R. 2013. Lethal effects of five metals on the freshwater rotifers *Asplanchna brighwellii* and *Brachionus calycifloru*. *Hidrobiológica* 23 (1): 82-86.
 - Santos-Medrano G. E. y Rico-Martínez R. 2015. Acute and chronic effects of five metals in a battery of freshwater planktonic organisms. *Fresenius Environmental Bulletin*. 24 (12b); 4658-4666.
 - Sarma S. S. S. y Elías-Gutiérrez M. 1999. Rotifers (Rotifera) from Four Natural Water Bodies of Central Mexico. *Limnologica* 29: 475-483.
 - Sarma S.S.S., Nandini S.y Gama-Flores J.L. 2001. Effect of methyl parathion on the population growth of the rotifer *Brachionus patulus* (O. F. Müller) under different algal

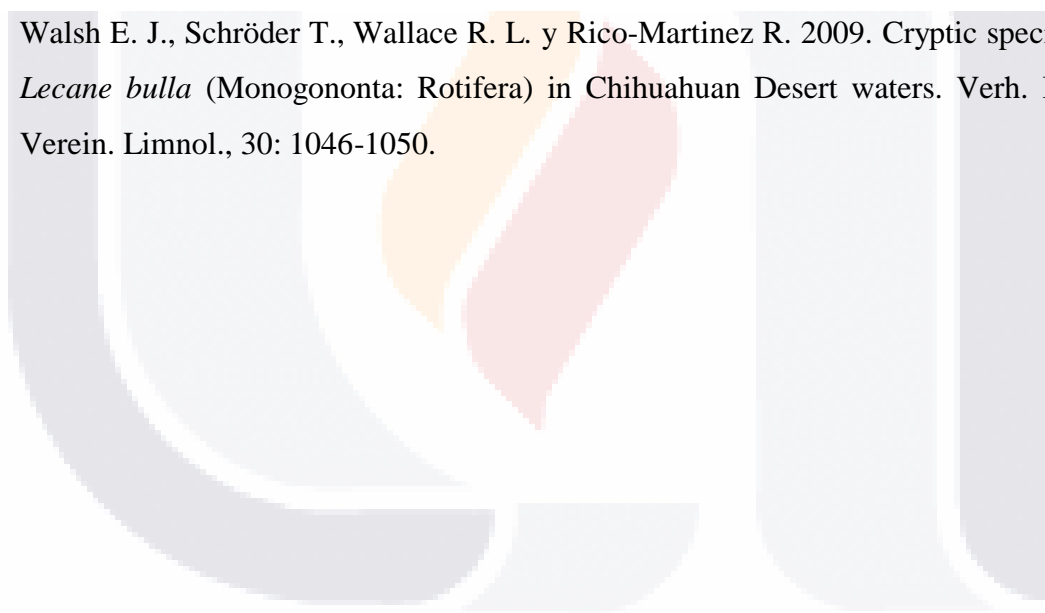
food (*Chlorella vulgaris*) densities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 48; 190–195.

- Sayeed I., Parvez S., Pandey S., Bin-Hafeez B., Haque R. y Raisuddin, S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(2); 295-301.
- Schröder T. y Walsh E. J., 2007. Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species. *Hydrobiologia*, 593:129-140.
- Segers H. 1994. On four new tropical and subtropical *Lecane* (Lecanidae, Monogononta, Rotifera). *Hydrobiologia*. 287(3); 243-249.
- Segers H. 1995. Rotifera Vol: 2 The Lecanidae (Monogononta). Nogrady T, Chengalath R., Shiel R., Dumont H. J. F., (Eds). *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World 6*. The Netherlands: SPB Academic Publishing. 225 pp.
- Segers H. 2002. The nomenclature of the Rotifera: annotated checklist of valid family and genus-group names. *Journal of Natural History*. 36; 631–640.
- Segers H. 2004. Rotifera: Monogononta. En: Yule C. M. Yong H. S. (Eds.). *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*. Akademi Sains Malaysia, Kuala Lumpur: 106-120.
- Segers H. 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*. 1564; 1–104.
- Serrania-Soto C. R., Sarma S.S.S y Nandini S, 2011. Studies on comparative population growth of some species of the rotifer *Lecane* (Rotifera). *Journal of Environmental Biology* 32; 523-527.
- Snell T. W. y Janssen C. R. 1998. Microscale Testing with rotifers. En: *Microscale Testing in Aquatic Toxicology*. Wells, Lee y Blaise (Eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida, E.U.A.: 409-422.
- Solano M. A. M. 2005. Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del cinc. Tesis Doctoral, Doctorado en

Química, Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología. Universidad de Murcia, España, 370p.

- StatSoft, Inc. Statistica 10.0 (2011). Tulsa, OK: StatSoft Inc., 2325 East 14th Street, Tulsa OK 74104. <https://www.qualitydigest.com/inside/twitter-ed/statsoft-releases-statistica-version-10-analytics-solutions.html>.
- Stemberger R. S. 1979. A Guide to Rotifers of The Laurentian Great Lakes. U.S. Environmental Protection Agency. EPA-600/4-79-021. 84-89pp.
- Stemberger R. S. 1981. A general approach to the culture of planktonic rotifers. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 38(6); 721-724.
- Swofford D. L. 2002. PAUP 4.0 b10: Phylogenetic analysis using parsimony.
- Tchounwou P. B., Yedjou C. G., Patlolla A. K. y Sutton D. J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. In Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Springer Basel. pp. 133-164.
- Torres-Guzmán, F., Avelar-González F. J. y Rico-Martínez R. 2010a. Implementing *Lecane quadridentata* acute toxicity tests to assess the toxic effects of selected metals (Al, Fe and Zn). Ecotoxicology and Environmental Safety 73; 287–295.
- Torres-Guzmán F., Avelar-González F. J. y Rico-Martínez R. 2010b. An assessment of chemical and physical parameters, several contaminants including metals, and toxicity in the seven major wastewater treatment plants in the state of Aguascalientes, Mexico. Journal of Environmental Science and Health Part A. 45; 2-13.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA-600/4-85-013, E.U.A. Environmental Protection Agency, Washington D.C., E.U.A.
- US EPA. 2017. Current national recommend water quality criteria. United States Environmental Protection Agency. National Recommended Water Quality Criteria. En línea Junio 2017: <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>
- Vázquez D. E. 2007. Filogeografía y vertebrados. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad CONABIO. México.

- Vera M. S., Di Fiori E., Lagomarsino L., Sinistro R., Escaray R., Iummato M. M., Juárez A., Ríos M. del C., Tell G. y Pizarro H. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*. 21(7); 1805-1816.
- Viran R., Erkoç F. Ü., Polat H. y Koçak, O. 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55(1); 82-85.
- Wallace R. L. y Snell T. W. 2010. Rotifera. Thorp JH, Covich AP editores. *Ecology and Clasification of North American Invertebrates*. Academic Press. Canada: 173-234.
- Wallace R. L., Snell T. W. y Nogrady T. 2006. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. *Rotifera*. 2 nd edition. SPB Academic Publishing.
- Walsh E. J., Schröder T., Wallace R. L. y Rico-Martinez R. 2009. Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 30: 1046-1050.



10. ANEXO A

Medios de cultivo

Medio EPA (Environmental Protection Agency) (Nichols, 1973).

Químicos	1L de agua desionizada (mg)
NaHCO ₃	96
CaSO ₄ 2H ₂ O	60
MgSO ₄ 7H ₂ O	60
KCL	4

Ajustar el pH a 7.5 con HCl o KOH

Medio basal BOLD'S (U.S EPA, 1985).

Macronutrientes	1L de agua desionizada (mg)
NaNO ₃	250
CaCl ₂ 2H ₂ O	25
MgSO ₄ 7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
NaCl	25

Una vez esterilizado el medio se adicionan 2ml de Vitaminas y Trazas de metal por litro.

Macronutrientes

Vitaminas

Reactivo	1L de agua desionizada (mg)
Tiamina (B1)	200
Biotina	10
Cianocobalamina (B12)	10

Tazas de metal

Reactivo	1L de agua desionizada (mg)
NaFe EDTA	5
MnCL ₂ 4 H ₂ O	180
CuSO ₄ 5 H ₂ O	10
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	22
CoCL ₂ 6 H ₂ O	10
NaMoO ₄ 2 H ₂ O	6.4

Soluciones para biología molecular

Medio MBL (Laboratorio de Biología Marina) (Stemberguer, 1981, modificado por Nichols, 1973).

Reactivos	1L de agua desionizada (g)
CaCl ₂ 2H ₂ O	36.76
MgSO ₄ 7H ₂ O	36.97
NaHCO ₃	12.60
K ₂ HPO ₄	8.71
NaNO ₃	85.01
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	28.42
Na ₂ EDTA	4.36
FeCl ₃ 6H ₂ O	3.15

Adicionar 2ml de Vitaminas y Trazas de metal por litro

Buffer TE

Reactivo	Volumen para 1L	pH
Tris-Cl	10	7.5
500 mM EDTA	2	8

Se utiliza agua con grado para HPLC y se esterilizo la solución antes de utilizar.

Buffer TAE 50X

Reactivo	Volumen
Tris base	242 g
Acido acético glacial	57.1 ml
EDTA (0.5 M, pH 8)	100 ml

Gel de agarosa

Reactivo	Volumen para 100 ml
TAE 1x	100 ml
Agarosa	1.5 g
Bromuro de etidio	55 µl

Se calienta durante dos minutos en el microondas

Solución “NEW Wash”

Reactivo	Volumen para 600 ml
NEW Wash	
H ₂ O destilada	280 ml
Etanol 100%	310 ml

Buffers para la optimización

	1.5 mM Mg ²⁺	2.0 mM Mg ²⁺	2.5 mM Mg ²⁺	3.5 mM Mg ²⁺
Ph 8.5	A	B	C	D
pH 9.0	E	F	G	H
pH 9.5	I	J		

11. ANEXO B

PROBIT

Tabla de relación entre el PROBIT empírico y el porcentaje de la mortalidad (Sánchez-Bain *et al.*, 2004).

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99 ^a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

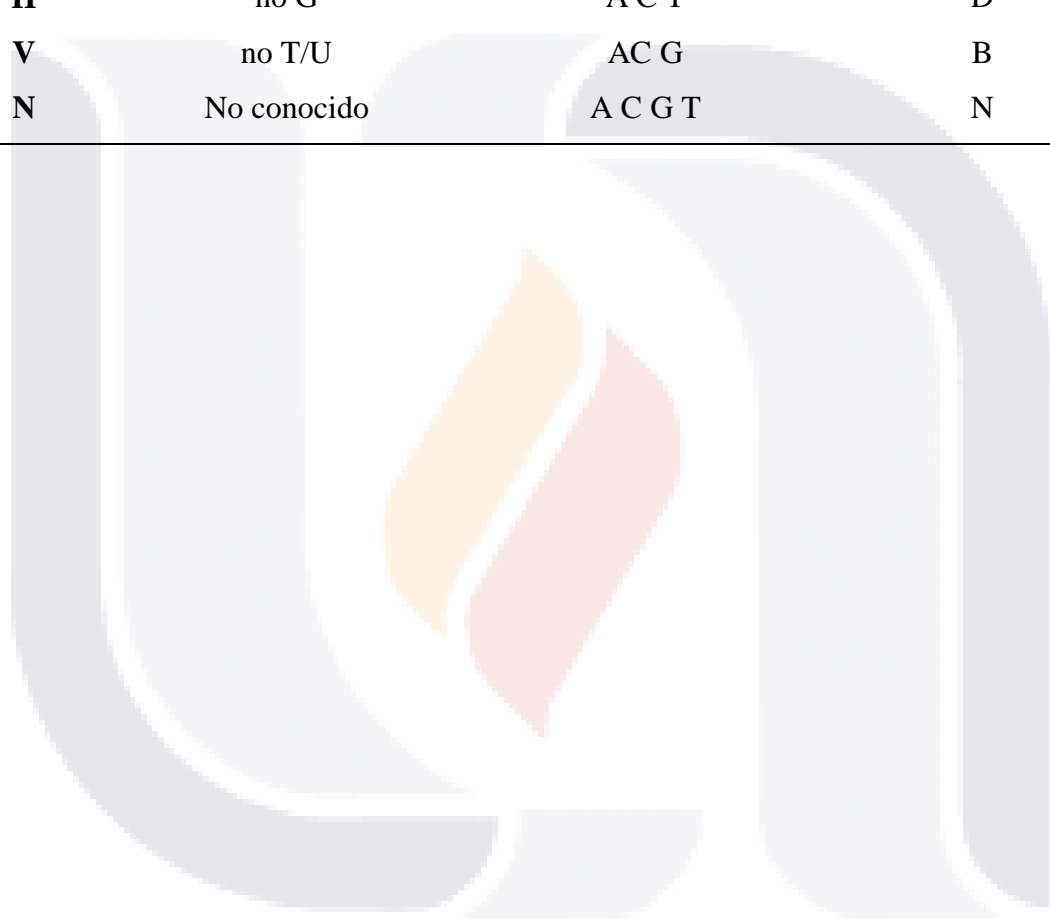
^a Valore entre 99,0 y 99,9.

Tabla IUPAC degeneraciones

Muestra las bases representadas y complementarias (<http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html>).

Base	Nombre	Bases representadas	Base complementarias
A	Adenina	A	T
T	Timidina	T	A
U	Uridina (solo RNA)	U	A
G	Guanidina	G	C
C	Citidina	C	G
Y	pYrimidina	C T	R
R	purina	A G	Y

S	Fuerte (Strong 3Hbonds)	G C	S*
W	Débil (Weak 2Hbonds)	A T	W*
K	Keto	T/U G	M
M	aMino	A C	K
B	no A	C G T	V
D	no C	A G T	H
H	no G	A C T	D
V	no T/U	A C G	B
N	No conocido	A C G T	N



12. ANEXO C

Secuencias

Muestra las secuencias para COI e ITS en formato FASTA

Primer	Secuencia
<i>L. bulla</i> (Lb-PH)	
COI	>SS12_4_Lb_COI TACTTTATACTTTTATTTGGGATGTGAGCTGGTTTTATTGGACTTAGAATAAGACTTCTAA TTCGTTTAGAACTAGGTGTTGTTGGCCCTTATTTGGGTGATGAGCACTTATATAATGTTTTA GTAACAGCCCACGCTTTTGTATGATTTTTTTTATGGTTATGCCATTTCTATAGGTGGTTT TGGAATTGATTAATTCCTTTAATATTAGGAGTTGCGGATATAGCCTTCCCTCGCATAAAT AATCTTTCTTTTTGGTTATTAATCCCTTCTTTCTTATTTCTTTTACTTTCTTCCATCTTAGATG CTGGTGTGGTACAGGGTGGACTGTTTATCCTCCTCTTGCTGATTCTAAATACCATACAGG TATCTCTGTTGACTTGGCTATTTTTAGTTTACATTTAGCTGGTATTCTTCTATTTTTAGGTAG AATTAATTTCTTAACAACATAATTTGTTCTCGTACAACAAAAATAATTTCTATAGATCGT CTACCTTAATACTATGAGCAATTTTTGTTACTGCAGTTTTATTAGTAACCTCTTTACCTGT TTTAGCTGGTGTCTATTACAATACTACTAAGTATCGTAATTTCAATACTTCTTTTTTTGATC CTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTTTTATACCAACATTTATT
ITS	>SS8_10_Lb_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAGTTTGATTTAATTCAAACATCT CATATATGTTTTAATATCTTTACTAATCATCTAAATGAATAACAAATAAAAAGTTTCATCGC AATTTTTGTTTTCATCTTTAGATGAGAGCTAAATAATAAAAACACAGATGCTCGAAAGCCA ATATTAGATTAGCTTTTATAAATCTTAAGTCGATAAATAATTTATTTAACGACCGATCAAA AGTTTAAAACTTTTAGTTTTTACACATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGG AAGTGATCCACGACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAAATC ACATTAATTCACGAGTTTGTGCTGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCA TAGGGTTGTTAATAAATTTAAGAATTTTTAAATCAAAGACTTAATAATTTCTTTATAAAAT GTATTTAAAAAATGTAATTTAAAGAAAAATCGATATGCAACACAGGCGCTATTAATTTAG ATTAATAGTCTTTAAACCTTGCAACAACAACACTCAATGCTGCTTACGAAGCAATATAAAT TGCTTACTAAGGTACCTGACCATATTAATGCTAATATGGAATTTTACAACCTAATAATATT AAGCTGTTTTTTAATTTTTGTGCGAATAGCACAAAGCATAAAGGATAATGATCCTCCCG AGGTTACCTACGAAA
<i>L. cornuta</i> (Lc)	
COI	>SS12_5_Lc_COI GACTTTATATTTTTATTTTCGGTATGTGAGCTGGATTTATTGGAGTAAGAATAAGACTTTTA ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTTGGTCCTTATTTAGGAGATGAACATTTATATAATGTTTT AGTTACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATGGTGATGCCAATTTCTATAGGAGTT TTGGAAATTGATTAATTCCTTTAATGTTGGGTGTTGCTGATATGGCTTTCCCTCGTATGAAT AACTTATCTTTTTGATTATTAATCCCATCTTTATGTTTTTATTATTGCTTCTATTTTTAGAT GCTGGTGTGGAACTGGTTGAACAGTCTACCCACCTTAGCAGATGCTAAGTACCATAGA GGTATTTACAGTAGATTTAGCTATTTTTAGTCTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCTATTTTAGG TAGAATTAATTTTTGACTACAATTTTGTCTCTCGAACTACTAAAACGATTTCTTTAGATC GTCTTCTCTTTTGTATGAGCCTTAGCTGTTACTGCCGTTTTATTAGTTACTAGACTACCA GTTTTAGCTGGTGAATTAATACTTTTAACTGATCGTAATTTTAAATACATCTTTTTTTGA TCCAGCAGGAGGCGGTAATCCTGTTTTATACCAACATTTATT
ITS	>SS13_5_Lc_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAAAATGAAATTAAAAAACACAT TTTAGTTAATTAATAATACCACCACTAAAGAGTTAACAAATAGAAGATTCAATGCAATTTT TGTTAACATCTTTTCGATGAAGCATTTTAAATTTAAATGCGCCTTAAAATAATATAAGAT TAGTTAACATATATCTAAAGTCGATAAATAAAGCTATTTAACGACCGTTCAAAAAGCATT AAAGCCTTTTCACATTTTTACACATTTATACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGC GAACCATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAATACAT TAATTCACGAGTTTGTGCTGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGG GTTATATTTTTGTTACTAATTTTAAATAATATTTAAAATCAGATATTAAGCACATTAATA TATAAATAGTTATATATAGATGTAATTTTTAAATTTTAAAGCAAGCAGGCGTTATTCAAATA GTTGAATAATCTTTAAACCACACGACAAAAGCAATGTCGCTTTTGTGTTGAAAAATATAT CACATACTAAGGTACCCGACCATATTCAAGTAAATATGGTTTTAACACAACCTTTAAGAGA

	TTAAAGCTGCATTATAAATAAAAAAGTGTGTCAGATAAACACTTTGCAAAAAGGATAATGATC CTCCGCAGGTTACCTACGGAAA
L. luna (Ll-72)	
COI	>SS12_3_Ll_COI GACCTTGTATTTTTTATTTGGGATATGAGCGGGATTTATTGGTTAAGAATAAGACTTTTA ATTCGTTTGGAACTTGGTGTGTTGGGCCTTATTTGGGGATGAACATTTGTACAATGTTT TAGTTACTGCTCATGCTTTTGTAAATGATTTTCTCATAGTGATGCCTATCTCTATAGGAGGT TTTGGTAATTGACTAATTCCTTTAATACTAGGCGTTGCTGATATAGCTTTTCCTCGCATAAA TAATTTATCTTTTGTATTATTGATTCTTCGTTTTTATTGTTACTTTTATCTTCTATTCTTGAT GCAGGGTGGTACTGGTTGAACAGTTTATCCTCCTTAGCGGACTCTAAATATCACACAG GAATTTCAAGTTGATTTAGCAATTTTATGTTTACATCTCGCTGGTATTTCTCTATTTAGGG AGAATTAATTTTCTTACTACGATTATTTGTTCTCGTACAACAAAAATGATCTCTCTTGATCG TTTGCCTTTAATGCTTTGAGCTTTAACTGTGACAGCAATCCTTCTAGTCACTAGGTTGCCTG TTTTAGCTGGAGCTATCACCATGTTACTAACAGATCGTAATTTAATACTTCTTCTTTGAT CCTGCAGGTGGAGGAATCCTGTTCTGTATCAACATTTATT
ITS	>SS13_3_Ll_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAAAATGAAATTTAGAAAATGCT ACACATTCTTATGCATATTAGAGCTGCTCCAGTAAGAGTCAACAAATAAAAGAGATTCAA TGCAATTTTGTGACATCTTCCGATGTAAGCAATTCTAATGGAAAAATGTGCCTTTAAAC TAATAGAAGATTAGTTAGCATAAACTAAGCCGATAAATTTAGCGAGAAATTTAACGGCC GATCAAAAGGCGTTAAACCTTTGACGTTTTACACATTTAAACCGACCCTCAGACAGGC GTGGTCATGGAAGCGATCCATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGT CCTGCAAAATCACATTAATTCACGCAGTTTGTGCTGCGCTTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTG ATCCACCGCATAGGGTTATATTTGTGTTAAGATTCAAACAACGAAGTTTAAAATCTGTATA AAACACAAGAGCACATTTAAATAGTTATATTTAAAATGTATGAAATGTTTTTATTTAGGCAT ACAGGCGTTATTCAAAGAAGTTGAATAATCTTTAAACCTCACGACACAGAGCAATGCCGC TTATGCTTTCGCAAGCTAAGGTACCTGACCATATTCAAGCAAATATGGATTTAATACAAT TTTAGAGAAAAGCTGTATGTTTGTAAATAAGTAAAGTGTGTAAGAACACTTTGCAAAA AGGATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA
L. papuana (Lp)	
COI	>SS12_2_Lp_COI CACTCTTTATTTTTATTTTCGGAATTTGAGCAGGCTTCATTGGCTTAAGAATAAGACTTATTA TTCGTCTTGAATTAGGTGTTGTAGGCCCTTACTTAGGTGATGAGCATCTATACAATGTGTT AGTTACTGCTCATGCTTTTGTATAATTTTCTTATAGGTAATACCTATTTCTATAGGGGGAT TTGGAACTGACTGATTCCTTATACTAGGTGTTGCTGATATAGCTTTTCCTCGTATGAAT AATTTATCTTTTGTACTCTTGATCCCTCTTTTTATTTCTTCTGTGTCTCCATTTTAGAC GCTGGTGTGGGACGGGATGAACCCCTTACCCCTTTCAGATTTCAAAATACCATACTG GAATTTCTGTAGATTTAGCTATTTTACGGCTTCATTTAGCTGGTATTTCTCAATTCGGGG AGAATTAATTTTCTAACAATATTATTTGTTCTCGTACTACAAAAATAATTTCTTTAGATCG TTTACCTCTTTTTTATGATCTGTTTCTGTTACTGCTATTCTTTTAGTTACTAGATTGCCTGT ACTAGCTGGTGTATTACAATATTACTTACAGACCGTAATTTAATACCTCTTTTTTTGACC CAGCTGGGGGTGGTAACCCTGTTTTGTATCAACATTTATT
ITS	>SS23_4_Lp_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAAAATAAAATATAAAATCGCAC ATTACAGTTAAATTAATAATGTCATTTACTTGGAAAGAGTTAAACAAATAAAAGATTCAACGC AATTTTTGTAAACATCTTGCCGATGTAGCAATTAATTTTAAATGTGCCTTTAAACTAATA TAAGATTAGTTAGCATAAATCTTAAGTCGATAAATAGCTAAATTTAACGACCGAGCAAAA GGCTTTTAAACCTTTTACATATTTACACATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCAT GGAAGCGATCCATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCTGCAAA TCACATTAATTCACGCAGTTTGTGCTGCGCTTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCG CATAGGGTTATAATTTGTTTAAAGATTTTAAATTCGAAAAATTTAAACCTAAATAAATAAC ATAAATATATAAATAGTTATATATAAATGTAATTTTGGATTTTTTGCATACAGGCGTTAT TCAAATAGTTGAATAATCTTTAAACCACACGACAATTTGCTTTGTGCTTGGCGATGTAAT TTTTATTTACAATCATAGGTACCTGACCATATTCAAGTAAATATGGATTTAATACAATTT AAGAGATAAAGCTGTATAGTTAATAAAAAAGTGCATTATAACACTTTGCAAAAAGGATAA TGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA
L. quadridentata (Cepa: Lq-6)	
COI	>SS12_1_Lq6_COI AACCTTTATTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC

TAGTCACAGCTCATGCTTTTGTAAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG
TTTGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCCTCGCATAA
ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG
ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTGTACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATA
TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTGTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCATCTTAG
GTAGGATTAACCTCTTGACAACATCATTTTGTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGTCACTGCCGTTCTTTTAGTTACATCTCTCC
TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTG
ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT

ITS

>SS13_1_Lq6_ITS
TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTGCGAAATAGAATTAATCAAAGCATT
TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT
TTTTGTTTTATCATGTTTATGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA
ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA
ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC
CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCTGCAAATCACATTAATT
CACGCAGTTTGTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTATCCACCGCATAGGGTTGT
TTTTAGATTTAGAATATAAAATCCAAAGACTTTATATTATTCTAATTAACAAAAAATTTG
TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAAAATAATCTTTA
AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATGCTCTCTAAGGTACCCG
ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAAATTTATGCGTATTTTTAAAA
TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAA
A

L. quadridentata (Cepa:Lq-34)

COI

>SS30_1_Lq34_COI
AACCTTTATTTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG
ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC
TAGTCACAGCTCATGCTTTTGTAAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGG
TTTTGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCCTCGCATAA
ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG
ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTGTACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATA
TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTGTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCATCTTAG
GTAGGATTAACCTCTTGACAACATCATTTTGTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGTCACTGCCGTTCTTTTAGTTACATCTCTCC
TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTG
ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT

ITS

>SS2_9_Lq34_ITS
TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTGCGAAATAGAATTAATCAAAGCATT
TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT
TTTTGTTTTATCATGTTTATGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA
ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA
ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC
CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCTGCAAATCACATTAATT
CACGCAGTTTGTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTATCCACCGCATAGGGTTGT
TTTTAGATTTAGAATATAAAATCCAAAGACTTTATATTATTCTAATTAACAAAAAATTTG
TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAAAATAATCTTTA
AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATGCTCTCTAAGGTACCCG
ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAAATTTATGCGTATTTTTAAAA
TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAA
A

L. quadridentata (Cepa: Lq-CV)

COI

>SS16_3_CV_COI
AACCTTTATTTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG
ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCATCTGTACAACGTAC
TAGTCACAGCTCATGCTTTTGTAAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG
TTTTGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCCTCGCATAA
ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG
ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTGTACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATA
TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTGTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCATCTTAG
GTAGGATTAACCTCTTGACAACATCATTTTGTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGTCACTGCCGTTCTTTTAGTTACATCTCTCC

	TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTTG ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT
ITS	>SS11_9_CV_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATT TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT TTTTGTTTTTCATCGTTAGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA ACTTTTCATTTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAAATCACATTAATT CACGCAGTTTGCTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTGT TTTTAGATTTAGAATATAAAAATCCAAAGACTTTATATTATTCTAATTAACAAAAAATTTG TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAAAATAATCTTTA AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATTGCTCTCTAAGGTACCCG ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAAATTTTATGCGTATTTTTAAAA TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAA A
<i>L. quadridentata</i> (Cepa:Lq-10-11)	
COI	>SS18_1_Lq1011_COI AACCTTTATTTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC TAGTCACAGCTCATGCTTTTGAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG TTTGAAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTTCTCGCATAA ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAAGTGTGACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATAC TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTCGTCATCTTAG GTAGGATTAACCTTCTTGACAACATATCTTGTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGCACTGCCGTTCTTTTAGTTACATCTCTTCC TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTTG ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT
ITS	>SS11_11_Lq1011_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATT TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT TTTTGTTTTTCATCGTTAGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA ACTTTTCATTTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAAATCACATTAATT CACGCAGTTTGCTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTGT TTTTAGATTTAGAATATAAAAATCCAAAGACTTTATATTATTCTAATTAACAAAAAATTTG TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAAAATAATCTTTA AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATTGCTCTCTAAGGTACCCG ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAAATTTTATGCGTATTTTTAAAA TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAA A
<i>L. quadridentata</i> (Cepa: Lq-Ch)	
COI	>SS12_14_CH_COI AACCTTTATTTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCATCTGTACAACGTAC TAGTCACAGCTCATGCTTTTGAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG TTTGAAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTTCTCGCATAA ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAAGTGTGACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATAC TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTTAGACTCCATTTAGCTGGTATTTCGTCATCTTAG GTAGGATTAACCTTCTTGACAACATATCTTGTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGCACTGCCGTTCTTTTAGTTACATCTCTTCC TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTTG ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT
ITS	>SS13_14_CH_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATT TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT TTTTGTTTTTCATCGTTAGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA

ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA
 ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC
 CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAAATCACATTAATT
 CACGCAGTTTGCTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTGT
 TTTTAGATTTAGAATATAAAAATCCAAAGACTTTATATTCTAATTAACAACAAAAATTTG
 TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAATAAATCTTTA
 AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATTGCTCTCTAAGGTACCCG
 ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAATTTTATGCGTATTTTTAAAA
 TTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA
 A

***L. quadridentata* (Clona: R1)**

COI >SS12_6_R1_COI
 AACCTTTATTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG
 ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC
 TAGTCACAGCTCATGCTTTTGAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG
 TTTGGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCTCGCATAA
 ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG
 ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTGACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATAC
 TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCATCTTAG
 GTAGGATTAACCTTCTTGACAATATCATTTGCTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
 TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGCACTGCCGTTCTTTAGTTACATCTTTCC
 TGTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTG
 ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATT

ITS >SS13_6_R1_ITS
 TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATTTT
 TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT
 TTTTGTTTTTCATCGTTTATGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA
 ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA
 ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC
 CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAAATCACATTAATT
 CACGCAGTTTGCTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTGT
 TTTTAGATTTAGAATATAAAAATCCAAAGACTTTATATTCTAATTAACAACAAAAATTTG
 TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAATAAATCTTTA
 AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATTGCTCTCTAAGGTACCCG
 ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAATTTTATGCGTATTTTTAAAA
 TTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA
 A

***L. quadridentata* (Clona: R5)**

COI >SS12_7_R5_COI
 AACCTTTATTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG
 ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC
 TAGTCACAGCTCATGCTTTTGAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG
 TTTGGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCTCGCATAA
 ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATCTCG
 ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTGACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATAC
 TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCATCTTAG
 GTAGGATTAACCTTCTTGACAATATCATTTGCTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
 TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGCACTGCCGTTCTTTAGTTACATCTTTCC
 TGTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTG
 ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATT

ITS >SS13_7_R5_ITS
 TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATTTT
 TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT
 TTTTGTTTTTCATCGTTTATGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA
 ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA
 ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC
 CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAAATCACATTAATT
 CACGCAGTTTGCTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTGT
 TTTTAGATTTAGAATATAAAAATCCAAAGACTTTATATTCTAATTAACAACAAAAATTTG
 TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAATAAATCTTTA
 AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATTGCTCTCTAAGGTACCCG

ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAAATAATTTTTATGCGTATTTTTAAAA
TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA
A

***L. quadridentata* (Clona: R6)**

COI >SS12_8_R6_COI
AACCCCTTATTTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG
ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC
TAGTCACAGCTCATGCTTTTGTAAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG
TTTGGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCCTCGCATAA
ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATTCCATCTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG
ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATAC
TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCAACTTTAG
GTAGGATTAACCTCTTGACAATCATTTGCTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
TCGTTTACCCTTATGTTGTGAGCTTTATTGTCACATGCGTTCCTTTAGTTACATCTCTCC
TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTCTTTG
ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT

ITS >SS13_8_R6_ITS
TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATTTT
TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT
TTTTGTTTTTCATCGTTTATGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA
ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAAATAAATTTAAACGACCGTTGAAAAGAATAA
ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC
CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCTGCAAATCACATTAATT
CACGCAGTTTGTGCGCTTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTGT
TTTTAGATTTAGAATATAAAAATCCAAAGACTTTATATTATTCTAATTAACAACAAAAATTTG
TTTGTGAAAAGTAAAACCTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAAAATAATCTTTA
AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAAGAGGCAATAAATTTGCTCTCTAAGGTACCCG
ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAAATAATTTTTATGCGTATTTTTAAAA
TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA
A

***L. quadridentata* (Clona: R8)**

COI >SS37_3_R8_COI
CACCCCTTATTTCTCTTTGGTATGTGGCAGGATTTATCGGTCTTAGAATAAGACTTACTTA
TTCGTTTAGAGATAGATGTAGTTGGTTCTTACATCGGTGACGAGCACCTATATAATGTGTT
AGTCACAGCTCATGCATTTGTCATGATTTTCTTCATAGTTATGCCTATTTCTATGGGTGGTT
TCGGTAATTGACTTATTCCTCTTATGTAAGGTGTTGCAGATATAGCTTTTCCCTCGTATAAAT
AATCTATCCTTTTGACTTCTTATCCCTCTTTATGTTTCTGCTTTTATCCATTTTAGAC
GCGGGTGTAGGTACAGGTTGAACGTGTTATCCTCCTTTGTCAGATTCCAAATATCATAACAG
GTATTTCTGTCGATCTTGCTATTTTATGCTTTCATTTAGCTGGTATTTCTTCTATTTTAGGTA
GGATCAACTTTCTTACTACTATCATTTGCTCTCGTACTACTAAAATAATTTCCATAGATCGT
CTTCCTTAAATGTTGTGGGCCCTATTCGTTACCGCGTCTACTAGTAACTTCTTTGCCAGT
TTTAGCAGGTGCTATTACCATGCTTTTAAACAGACCGTAATTTAATACCTCGTTCTTTGATC
CGGCGGGTGGTGGAAACCCTGTTTTATACCAACATTTATTC

ITS >SS13_9_R8_ITS
TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATAGAATTAATTAAGCATGTT
TAGTTATGTTAATATTTGATATCTAAATTGACGAAAAACAAATAAAAGTTTCAATGCAA
TTTTTGTTTTTCATCGTTTATGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGATAATATA
AATTATCTTTTATGCATCTCAAGTCGATAAATAAATTTTAAACGACCGTTGAAAAGAATA
AACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGAT
CCATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCTGCAAATCACATTAAT
TCACGCAGTTTGTGCTGCGCTTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTG
TTTTAGATTTAGAATATAAAAATCAAAAGACTTTATATTATTCTAATAAAAACAAAAAATTT
GTTTACAAAAAGTAAAACCTTTATAAGCAAACAGGCGTTATTCTAATAGTAGAATAATCTT
TAAACCTTGCAACAAAAACTCAATGCTGCTTAAAGAGGCAATTGCTCTCTAAGGTACCCGA
CCATATTAAGCAAATATGGAATTTTACGACATAAAAATAATTTTTATGCGTATTTTTTATTA
TTGTGCTTGTAGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

***L. quadridentata* (Clona: R9)**

COI >SS12_10_R9_COI
AACCCCTTATTTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG
ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC

TAGTCACAGCTCATGCTTTTGTAAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG
TTTGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCCTCGCATAA
ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG
ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTGTACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATA
TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTGTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCATCTTAG
GTAGGATTAACCTCTTGACAACATCATTTTGTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGTCACTGCCGTTCTTTTAGTTACATCTCTCC
TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTG
ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT

ITS

>SS13_10_R9_ITS
TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATTTT
TAGTTTTGTTAATAATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT
TTTTGTTTTCATCGTTTAGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA
ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA
ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC
CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCTGCAAATCACATTAATT
CACGCAGTTTGTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTATCCACCGCATAGGGTTGT
TTTTAGATTTAGAATATAAAATCCAAAGACTTTATATTATTCTAATTAACAAAAAATTTG
TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAAAATAATCTTTA
AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATTGCTCTCTAAGGTACCCG
ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAAATTTTATGCGTATTTTTAAAA
TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAA
A

L. quadridentata (Clona: R10)

COI

>SS14_1_R10_COI
AACCTTTATTTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG
ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC
TAGTCACAGCTCATGCTTTTGTAAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG
TTTTGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCCTCGCATAA
ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG
ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTGTACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATA
TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTGTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCATCTTAG
GTAGGATTAACCTCTTGACAACATCATTTTGTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGTCACTGCCGTTCTTTTAGTTACATCTCTCC
TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTG
ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT

ITS

>SS14_5_R10_ITS
TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATTTT
TAGTTTTGTTAATAATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT
TTTTGTTTTCATCGTTTAGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA
ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAAATAAATTATTTAACGACCGTTGAAAAGAATAA
ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC
CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCTGCAAATCACATTAATT
CACGCAGTTTGTGCGCTCTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTATCCACCGCATAGGGTTGT
TTTTAGATTTAGAATATAAAATCCAAAGACTTTATATTATTCTAATTAACAAAAAATTTG
TTTGTGAAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAAAATAATCTTTA
AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATTGCTCTCTAAGGTACCCG
ACCATATTAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAAATTTTATGCGTATTTTTAAAA
TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAA
A

L. quadridentata (Clona: R16)

COI

>SS12_11_R16_COI
AACCTTTATTTTCTGTTTGGTATATGAGCAGGGTTCATTGGCTTAAGTATAAGACTTCTG
ATTCGTTTAGAATTAGGTGTTGTAGGTTCTACATTGGTGACGAGCACCTGTACAACGTAC
TAGTCACAGCTCATGCTTTTGTAAATGATTTTCTTTATAGTCATGCCTATTTCTATAGGTGGG
TTTTGAAATTGACTAATTCCTCTCATGTTAGGTGTGGCTGATATAGCATTTCCTCGCATAA
ATAACCTATCTTTTTGATTACTTATCCATCTTTATGTTCTTACTTTTGTCTTCTATTCTCG
ATGCAGGTGTAGGTACTGGCTGAACGTGTGTACCCACCTCTATCAGATTCCAAGTACCATA
TGGTATCTCCGTTGATCTCGCTATTTTGTAGACTTCATTTAGCTGGTATTTTCGTCATCTTAG
GTAGGATTAACCTCTTGACAACATCATTTTGTCTCGTACTACTAAAATGATCTCTATAGA
TCGTTTACCCCTTATGTTGTGAGCTTTATTTGTCACTGCCGTTCTTTTAGTTACATCTCTCC

	TGTTCTAGCTGGTGCTATTACTATGCTCCTTACTGATCGTAATTTCAACACCTCTTTCTTTG ATCCTGCTGGTGGTGGTAATCCTGTACTCTATCAACATTTATTT
ITS	>SS13_11_R16_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATAGAATTAATCAAAGCATT TAGTTTTGTTAATATTTGACATCTAAACTCACGAAAAACAAATAAGAGTTTCAATGCAAT TTTTGTTTTCATCGTTAGATGATAGCAAATAAAAAACAATAATGCTTGAAAGACAATATGA ATTATCTTTTATACATCTCAAATCGATAAATAAATTTAATTAACGACCGTTGAAAGAATAA ACTTTTCATTTTTTACATATTTAAACCGACCCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATC CATAACCGCAATATGCGTTCAAGATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAAATCACATTAATT CACGCAGTTTGCTGCGCTTTCATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTGT TTTTAGATTTAGAATATAAAATCCAAAGACTTTATATTATTCTAATTAACAAAAAATTTG TTTGTGAAAGTAAAACTTTTAAAGCAAACGGGCGCTATTCTAATTGTAAAATAATCTTTA AACCTTGCAACAAAAATCAATGCTGCTTAAGAGGCAATAAATGTCTCTAAGTACCCG ACCATATAAAGCTAATATGGAATTTTACGACATAAAATAAATTTTTCGCTATTTTTAAAA TTTTGTGCTAAGGCGCACAGCATAAAGGATAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAA A
Grupo externo del género <i>Lecane: L.ludwigii</i>	
COI	>SS14_3_Lwg_COI TACACTTTATTTCTTTTTGGTATGTGAGCTGGGTTTATTGGTTTGAGAATAAGGATATTA TTCGAGTTGAGTTAGGAGTTGTGGCCCTTATTTAAATGATGAACATCTTTATAACGCTAT GGTTACCGCGCACGCCTTTGTGATGATTTTTTTATGGTCATGCCTATTTCTATGGGTGGT TTGGTAACTGATTGATTCCAATAATGCTTGGTGTAGCTGACATGGCTTTCCCGGTATAAA TAATCTATCCTTTTGGTTGCTCATTCCTTCTTTCTTGTCTGCTTCTTTCTAGAATTTTAGA CTCAGGGGTGGGCACTGGTTGAACAGTTTACCCCTCTTTCTGACTCCAAGTTTCACACG GGCATCTCAGTTGATCTCGCTATTTTTAGACTTCACTTAGCTGGTATTTCTTCTATTTTAG TAGGATTAATTTTTTAAACGACAATTTTGTCTCCCGCACTACAAAATCAGTTTCTTTAGAT CGTCTACCGTTGATACTGTGGGCTTTAGCAGTTACAGCAGTTTGTGATCACTAGTCTTC CTGTGTTGGCAGGTGCTATTACGATACTTTAACTGATCGAAATTTCAATACTTCTTTTTT GATCCAGCGGGTGGAGGAAATCCTGTGTTGTATCAGCATCTTTTT
ITS	>SS14_6_Lwg_ITS TTAAATTCAGCGGGTAATCTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATGAATGTTTAGCATAAAGCA CGTAAAGCTTGTTAACACATATGCGTAAATCACACGTAGAGAGACTAACAAACAAATAAG ATAAGTTCAATGCAATTTTTGTTTGCATCTCTAAGCGATGACTGCCAATAATGTGAAAC AAAATTTGTGCTTTAAACTATTAAGAGTAATAGTTAGCATATATCTAGAGTCGATAAATA ATCAAGTTATTTAACGACCGATCAAAGCTCATGATGAGCCTTTACGTTGTTAGACATTT AAACCGACCTCAGACAGGCGTGGTCATGGAAGCGATCCATAACCGCAATATGCGTTCAA GATATCGATGATCAATGTGTCCTGCAAATCACATTAATTCACGCAATTTGCTGCGCTTTC ATCGACTCGCGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTGTAATGGTGTTCAAAAATAGAAT TCTAATTAAGTTTAGAATTCATTTATTTAAACACAATATAATAAAAAATAGTTTTAATATAT ATGTATATTTTTTTGTTTTATTGCTAAGCAGGCGTTATTCAATATAGAGATTGAATAATCTT TAAACCTCACGACAAATCGCAATGTCGCTTATGATGAACAAGTCAAAAAATGAGCTA GCTGAATATCAAAGGTACCCGACCATTTCAAGTAAATATGGAATTTGAAGACATACATC CCTATAAATAGTTATAGAGATGTATTAGATAAATTTATGTGTAAGTAATAATACTTTTACG CAAATAGGATAATGATCCTTCCGAGGTTCCCTACGGAAA
Grupo externo: <i>Floscularia conifera</i> (g9Fcon_dri)	
COI	>g9Fcon_dri GACTTTATACTTTATTTTTAGAATTTGAGCCGGGTTTATTGGATTAGCTATAAGGGTTTTAA TTCGAGTTGAATTAGGAGTTTATGGTCACTTATAGGAGATGATCATATTTATAATGTGAT TGTAATGCTCATGCTTTTGTATGATTTTTTTATGTTATGCTATGGCAATGGCGGAT TTGGTAATGGTTGCTGCCATTGATACTAGGTTGCGTTGATATGGCCTTCCCCGAATGAA CAATCTATCTTTCTGGTTGTTGATTCATCATTGGGTTATTGTTATATCTTCATTAGTTG ACTCCGGGGCGGGTACAGGATGAAGTACTATCCTCCTCTTTCCGATTCAAAATTTCACTC CGGAGCATCCGTGGATATGGCCATTTTTAGTCTTACATTGCAGGGGCTAGTTCTATTTTA GGTTCTATTAATTTCAATTTGACTATTTTGTGTGGCCGAGCTAACTATAAGTTTTCTTTGGC CTATCTTCTCTTTTCAATTTGAGCAGTCTGCTATTACTGCTTTTTGCTAGTAACCAGGTTAC CAGTACTTGTGGTGTATTACTATGTTACTTACCGACCGGAATATTAGTACTAGGTTTTTT GATCCTAGAGGAGGAGGTAACCAATCTTTACCAGCATTTGTTT
ITS	>F6FCON_DRI AAATTCAGCGGGTATACTCGTCTGATCTGAGGTCGAAATGATTGATTAATAGCTAGCG CGTTAGTTAGTAACTAAGCTGAGCATAGTTATCATATACCAGTACTCATTAATACCCTATG

AATACACTAAGTCAAACAAACAGAACAAGAGTGATGAGCTTAGCAATATGTTTTGTTTGT
 GATTAGCATATAAAGAAAGCAATAGGATTAGAGTACCAGTCTTGATTTTATGCATTTTTA
 CTAATCTATAGAGAGATTAGTAGTTCGAATCTAACGTCGATAAAAGTAACCCGAGTAGG
 TGACTTGAAACGACCGAGCAAAGTGCACGCACACTTTTTACGTATAGTATAAACCGACT
 CTCAGACAGGCGTGGTCACGGAAGCGAACCGTAACCGCAATATGCGTTCAAGATGTCGAT
 GATCAATGTGTCTGCAAATCACATTAATTCACGCAGTTTGCTGCGCTTCATCGACTCG
 CGAGCCAAGTGATCCACCGCATAGGGTTGTGTTTTGTGTTTGTAGTCTAACGTTGATGGCTTG
 ATAATTAATGCATTAGTTAAAGACATAACCAATAGCATCATGAGAGCACATATCGAAGCC
 AAGACGCACAACGTTATACACTTGCACAACAAGAGTAGCTGAAGCGATGAAACAAATTA
 GCAAAAATAATACAAAAGAATTAGCAAAGCTAGGCGTCATATTATTGAATACGATCTTTA
 CACCTTCACGGTCAACATAGGTTAACCGTTATGCTCATGTATATCACGTGATACACACAA
 GAACGCGTAGGTACCCGACCACACGCACGCACGCGTGTGGATTTGAGAGAAGCAAACGAGA
 CACAACGTGAGCAGCAGTACAGAGCTTTTGAATCGTTTGCACGCAATCGAATCTAAC
 GCACAACACAAAGCATGTGAATGCGTGATTCTAGCGTGTGTACATACGATACACACACTC
 TGCAATTAGGATAATGATCCCTCCGCAGGTTCCACCTACGGAA

Secuencias obtenidas del GeneBank para el marcador COX

	Nombre	Voucher
gi 401880257 gb JX216696.1	<i>Lecane hamata</i>	ECOCHZ-AG0590
gi 401880375 gb JX216755.1	<i>Lecane spinulifera</i>	ECOCHZ-AG0888
gi 401880205 gb JX216670.1	<i>Lecane closterocerca</i>	ECOCHZ-AG0915.1
gi 401880285 gb JX216710.1	<i>Lecane ohioensis</i>	ECOCHZ-AG0714
gi 401880355 gb JX216745.1	<i>Lecane rhenana</i>	ECOCHZ-AG0909.1
gi 401880215 gb JX216675.1	<i>Lecane cornuta</i>	ECOCHZ-AG0569
gi 401880243 gb JX216689.1	<i>Lecane curvicornis</i>	ECOCHZ-AG0553
gi 401880271 gb JX216703.1	<i>Lecane leontina</i>	ECOCHZ-AG0894.1
gi 401880333 gb JX216734.1	<i>Lecane papuana</i>	ECOCHZ-AG0440
gi 167842614 gb EU188931.1	<i>Lecane bulla</i> (Tortugas)	
gi 401880345 gb JX216740.1	<i>Lecane quadridentata</i>	ECOCHZ-AG0474
gi 401880287 gb JX216711.1	<i>Lecane luna voucher</i>	ECOCHZ-AG0887
gi 83285136 gb DQ297776.1	<i>Lecane elsa</i>	
gi 401880251 gb JX216693.1	<i>Lecane grandis</i>	ECOCHZ-AG0875
gi 401880311 gb JX216723.1	<i>Lecane lunaris</i>	ECOCHZ-AG0500
gi 401880229 gb JX216682.1	<i>Lecane crepida</i>	ECOCHZ-AG0475
gi 401880261 gb JX216698.1	<i>Lecane hastata</i>	ECOCHZ-AG0702
gi 401880331 gb JX216733.1	<i>Lecane monostyla</i>	ECOCHZ-AG0486

Matriz de distancias entre *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana*, *L. quadridentata* (seis cepas y siete clonas) y secuencias tomadas del Genebank, con el marcador molecular COX.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 g9Fcon dri	-																	
2 L closteroerca GB	0.29652	-																
3 L ohioensis GB	0.31165	0.17247	-															
4 L rhenana GB	0.30336	0.19305	0.17780	-														
5 SS14 3 Lwg COI	0.31467	0.19970	0.18003	0.20749	-													
6 L cornuta GB30	0.28442	0.17095	0.18759	0.20655	0.22542	-												
7 SS12 5 Lc COI	0.28896	0.17398	0.18759	0.21466	0.22390	0.03631	-											
8 L curviconnis GB	0.30205	0.19289	0.22025	0.22213	0.24888	0.16241	0.17149	-										
9 L leontina GB	0.28139	0.17247	0.18306	0.21793	0.21029	0.17095	0.17095	0.18369	-									
10 L papuana GB92	0.29349	0.17852	0.19365	0.21964	0.23601	0.16339	0.16188	0.18850	0.13464	-								
11 SS12 4 Lb COI	0.30408	0.17700	0.18911	0.21324	0.22390	0.17095	0.16490	0.19286	0.16944	0.15431	-							
12 L bulla tortugas GB	0.30408	0.17700	0.17852	0.19743	0.21936	0.19667	0.20424	0.21874	0.17700	0.18306	0.15280	-						
13 SS12 2 Lp COI	0.29501	0.20121	0.20121	0.20930	0.24357	0.18306	0.18003	0.21102	0.18457	0.15885	0.18911	0.16339	-					
14 L luna GB	0.31316	0.17700	0.21331	0.22352	0.24660	0.18608	0.19667	0.19123	0.16793	0.16793	0.19516	0.19213	0.19818	-				
15 SS12 3 Ll COI	0.30408	0.17247	0.20877	0.23456	0.24962	0.18003	0.18911	0.19888	0.17700	0.16944	0.18306	0.19667	0.19970	0.09531	-			
16 L elsa GB	0.28951	0.19390	0.22597	0.21001	0.22288	0.17263	0.17120	0.17923	0.17427	0.18036	0.19856	0.21515	0.19866	0.18347	0.18646	-		
17 L grandis GB	0.30408	0.16490	0.19667	0.20986	0.23752	0.16188	0.16793	0.20049	0.17398	0.18154	0.19062	0.19516	0.19970	0.17852	0.18003	0.19539	-	
18 L quadridentata GB	0.31014	0.20726	0.21785	0.23386	0.24206	0.20272	0.20272	0.22808	0.21785	0.19818	0.18003	0.19062	0.23147	0.19818	0.18911	0.20782	0.21331	-
19 SS12 1 Lq6 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
20 SS18 1 Lq1011 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
21 SS30 1 Lq34 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
22 SS12 6 R1 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
23 SS12 7 R5 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
24 SS12 8 R6 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
25 SS12 10 R9 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
26 SS14 1 R10 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
27 SS12 11 R16 COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23369	0.21483	0.21936	0.20424	0.19818	0.19516	0.20424	0.21029	0.22298	0.21785	0.18306
28 SS16 3 CV COI	0.33283	0.20726	0.21483	0.24758	0.23752	0.19970	0.19365	0.23218	0.21331	0.21785	0.20575	0.19667	0.19365	0.20272	0.20877	0.22146	0.21634	0.18457
29 SS12 14 CH COI	0.33434	0.20877	0.21634	0.24913	0.23903	0.20121	0.19516	0.23216	0.21331	0.21785	0.20575	0.19818	0.19516	0.20272	0.20877	0.22147	0.21785	0.18457
30 SS38 9 R8 COI	0.34039	0.20121	0.21331	0.23982	0.24054	0.20726	0.20877	0.22048	0.19516	0.19667	0.19667	0.19818	0.21180	0.20424	0.21634	0.21540	0.21029	0.18003
31 L crepida GB	0.29198	0.20272	0.19818	0.23054	0.23147	0.19818	0.19970	0.21112	0.18457	0.19365	0.20424	0.20877	0.21331	0.22693	0.22088	0.23498	0.20575	0.21180
32 L hastata GB	0.29501	0.19365	0.19667	0.20022	0.20877	0.18154	0.18911	0.20342	0.17398	0.18003	0.18306	0.18911	0.20272	0.18608	0.18154	0.19557	0.20424	0.20121
33 L monostyla GB	0.29955	0.17549	0.21029	0.23637	0.22239	0.19970	0.19818	0.22615	0.19970	0.21483	0.21029	0.20424	0.22390	0.24054	0.23449	0.22583	0.21180	0.22995
34 L hamata GB	0.30106	0.19970	0.19818	0.20470	0.21936	0.20424	0.20121	0.22163	0.19213	0.18154	0.20121	0.20575	0.19516	0.21634	0.21785	0.20927	0.21029	0.23752
35 L spinulifera GB	0.30408	0.19516	0.20424	0.21856	0.21331	0.21634	0.21483	0.25051	0.22239	0.21936	0.21936	0.19667	0.21634	0.21634	0.23298	0.22441	0.21180	0.23298
36 L lunaris GB	0.31014	0.18154	0.19818	0.22678	0.23298	0.17549	0.18608	0.20676	0.19970	0.19516	0.21180	0.20575	0.21029	0.22239	0.20726	0.21212	0.18154	0.21634

Continuación de la matriz de distancias entre *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana*, *L. quadridentata* (seis cepas y siete clonas) y secuencias tomadas del Genbank, con el marcador molecular COX.

	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
19 SS12 1 Lq6 COI	-																	
20 SS18 1 Lq1011 COI	0.00000	-																
21 SS30 1 Lq34 COI	0.00000	0.00000	-															
22 SS12 6 R1 COI	0.00000	0.00000	0.00000	-														
23 SS12 7 R5 COI	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-													
24 SS12 8 R6 COI	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-												
25 SS12 10 R9 COI	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-											
26 SS14 1 R10 COI	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-										
27 SS12 11 R16 COI	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-									
28 SS16 3 CV COI	0.00151	0.00151	0.00151	0.00151	0.00151	0.00151	0.00151	0.00151	0.00151	-								
29 SS12 14 CH COI	0.00303	0.00303	0.00303	0.00303	0.00303	0.00303	0.00303	0.00303	0.00303	0.00151	-							
30 SS38 9 R8 COI	0.18154	0.18154	0.18154	0.18154	0.18154	0.18154	0.18154	0.18154	0.18154	0.18306	0.18457	-						
31 L crepida GB	0.22239	0.22239	0.22239	0.22239	0.22239	0.22239	0.22239	0.22239	0.22239	0.22390	0.22390	0.23298	-					
32 L hastata GB	0.23449	0.23449	0.23449	0.23449	0.23449	0.23449	0.23449	0.23449	0.23449	0.23298	0.23449	0.23903	0.17095	-				
33 L monostyla GB	0.23601	0.23601	0.23601	0.23601	0.23601	0.23601	0.23601	0.23601	0.23601	0.23449	0.23601	0.24660	0.21785	0.22088	-			
34 L hamata GB	0.22844	0.22844	0.22844	0.22844	0.22844	0.22844	0.22844	0.22844	0.22844	0.22693	0.22844	0.20424	0.22844	0.21180	0.22995	-		
35 L spinulifera GB	0.24206	0.24206	0.24206	0.24206	0.24206	0.24206	0.24206	0.24206	0.24206	0.24054	0.24206	0.22693	0.22693	0.22995	0.21029	0.19667	-	
36 L lunaris GB	0.21634	0.21634	0.21634	0.21634	0.21634	0.21634	0.21634	0.21634	0.21634	0.21483	0.21634	0.20575	0.18608	0.23147	0.21634	0.23298	0.22239	-

Matriz de distancias entre *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* (seis cepas y siete clonas), con el marcador molecular ITS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 f6Fcon dri	-																		
2 SS14 6 Lwg ITS	0.36526	-																	
3 SS13 4 Lb ITS	0.34656	0.23355	-																
4 SS22 3 Lc ITS	0.33066	0.20640	0.23114	-															
5 SS22 5 Ll ITS	0.33941	0.23211	0.25413	0.12891	-														
6 SS23 4 Lp ITS	0.33268	0.21742	0.23506	0.12434	0.14386	-													
7 SS2 7 Lq6 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	-												
8 SS11 11 Lq1011 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	-											
9 SS11 9 CV ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	-										
10 SS13 12 Lq34 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	0.00000	-									
11 SS13 14 CH ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-								
12 SS13 6 R1 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-							
13 SS13 7 R5 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-						
14 SS13 8 R6 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-					
15 SS24 8 R8 ITS	0.28431	0.25522	0.18058	0.21704	0.23770	0.23197	0.03851	0.03851	0.03851	0.03851	0.03851	0.03851	0.03851	0.03851	-				
16 SS13 10 R9 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.03851	-			
17 SS14 5 R10 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.03851	0.00000	-	
18 SS13 11 R16 ITS	0.28744	0.26185	0.18211	0.22689	0.24778	0.23840	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.03851	0.00000	0.00000	-

Matriz de distancias entre *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* (seis cepas y siete clonas), con el marcador molecular COX ITS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1 g9Fcon dri	-																	
2 SS14 2 Lwg COI ITS	0.35274	-																
3 SS12 5 Lc COI ITS	0.32649	0.23116	-															
4 SS12 2 Lp COI ITS	0.33274	0.24525	0.14916	-														
5 SS12 3 L1 COI ITS	0.34082	0.24659	0.16757	0.17217	-													
6 SS12 4 Lb COI ITS	0.35328	0.26202	0.20998	0.22343	0.22445	-												
7 SS12 1 Lq6 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	-											
8 SS18 1 Lq1011 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	0.00000	-										
9 SS30 1 Lq34 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	0.00000	0.00000	-									
10 SS12 6 R1 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	0.00000	0.00000	0.00000	-								
11 SS12 7 R5 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-							
12 SS12 8 R6 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-						
13 SS12 10 R9 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-					
14 SS14 1 R10 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-				
15 SS12 11 R16 COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23794	0.18740	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-			
16 SS16 3 CV COI ITS	0.35846	0.25473	0.21966	0.23106	0.23721	0.18812	0.00072	0.00072	0.00072	0.00072	0.00072	0.00072	0.00072	0.00072	0.00072	0.00072	-	
17 SS12 14 CH COI ITS	0.35916	0.25545	0.22038	0.23178	0.23721	0.18811	0.00144	0.00144	0.00144	0.00144	0.00144	0.00144	0.00144	0.00144	0.00144	0.00144	0.00072	-
18 SS38 9 R8 COI ITS	0.35434	0.25266	0.22470	0.23629	0.23441	0.18494	0.10808	0.10808	0.10808	0.10808	0.10808	0.10808	0.10808	0.10808	0.10808	0.10808	0.10881	0.10952

Matriz de correlación Pearson del análisis de componentes principales entre la relación filogenética con *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. luna*, *L. papuana* y *L. quadridentata* y su sensibilidad aguda con arsénico, cadmio, carbarilo, cobre, deltametrina, glifosato, paratión metílico, plomo, vinclozolin y cinc.

Variables	As	Cd	Cu	Pb	Zn	Carbarilo	Deltametrina	Glifosato	Metil	Vinclozolin	Lb	Lc	Ll	Lp	Lq
As	1	0.769	0.479	0.682	0.091	0.613	0.486	-0.600	0.827	0.635	0.803	-0.409	-0.062	0.060	-0.464
Cd	0.769	1	-0.155	0.401	0.473	0.543	0.443	-0.812	0.871	0.381	0.521	-0.503	0.486	-0.157	-0.463
Cu	0.479	-0.155	1	0.548	-0.302	0.272	0.289	0.271	-0.041	0.253	0.586	0.264	-0.667	0.181	-0.221
Pb	0.682	0.401	0.548	1	-0.336	0.948	0.901	0.082	0.383	0.025	0.273	0.271	0.183	0.635	-0.884
Zn	0.091	0.473	-0.302	-0.336	1	-0.180	-0.067	-0.482	0.107	-0.083	0.404	-0.163	0.293	-0.869	0.064
Carbarilo	0.613	0.543	0.272	0.948	-0.180	1	0.965	-0.001	0.425	-0.119	0.139	0.264	0.485	0.592	-0.968
Deltametrina	0.486	0.443	0.289	0.901	-0.067	0.965	1	0.153	0.221	-0.328	0.100	0.469	0.515	0.500	-0.997
Glifosato	-0.60	-0.812	0.271	0.082	-0.482	-0.001	0.153	1	-0.863	-0.716	-0.559	0.892	-0.123	0.439	-0.133
Metil	0.827	0.871	-0.041	0.383	0.107	0.425	0.221	-0.863	1	0.729	0.524	-0.756	0.177	0.038	-0.239
Vinclozolin	0.635	0.381	0.253	0.025	-0.083	-0.119	-0.328	-0.716	0.729	1	0.640	-0.862	-0.514	-0.140	0.342
Lb	0.803	0.521	0.586	0.273	0.404	0.139	0.100	-0.559	0.524	0.640	1	-0.391	-0.416	-0.449	-0.054
Lc	-0.40	-0.503	0.264	0.271	-0.163	0.264	0.469	0.892	-0.756	-0.862	-0.391	1	0.155	0.312	-0.450
Ll	-0.06	0.486	-0.667	0.183	0.293	0.485	0.515	-0.123	0.177	-0.514	-0.416	0.155	1	0.155	-0.572
Lp	0.060	-0.157	0.181	0.635	-0.869	0.592	0.500	0.439	0.038	-0.140	-0.449	0.312	0.155	1	-0.513
Lq	-0.46	-0.463	-0.221	-0.884	0.064	-0.968	-0.997	-0.133	-0.239	0.342	-0.054	-0.450	-0.572	-0.513	1

Matriz de correlación Pearson del análisis de componentes principales entre la relación filogenética filogenética con seis cepas y ocho clonas de la especie *L. quadridentata* y su sensibilidad aguda al plomo.

Variable	Lq101																
	s	Pb	Lc	Lp	Ll	Lb	Lq6	1	Lq34	R1	R5	R6	R9	R10	R16	LqCV	LqCH
Pb	1	0.511	0.608	0.636	0.768	-0.043	-0.043	-0.043	-0.043	-0.043	-0.043	-0.043	-0.043	-0.043	-0.043	-0.044	-0.045
Lc	0.511	1	0.879	0.809	0.711	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.116	0.115
Lp	0.608	0.879	1	0.891	0.769	0.129	0.129	0.129	0.129	0.129	0.129	0.129	0.129	0.129	0.129	0.127	0.126
Ll	0.636	0.809	0.891	1	0.855	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127	0.125	0.124
Lb	0.768	0.711	0.769	0.855	1	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.138	0.137
Lq6	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Lq1011	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1.000	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Lq34	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1.000	1.000	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
R1	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1.000	1.000	1.000	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
R5	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1.000	1.000	1.000	1.000	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
R6	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
R9	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
R10	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1	1.000	1.000	1.000	1.000
R16	-0.043	0.117	0.129	0.127	0.140	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1	1.000	1.000	1.000
LqCV	-0.044	0.116	0.127	0.125	0.138	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1	1.000
LqCH	-0.045	0.115	0.126	0.124	0.137	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1

Life table analysis reveals variation in thermal tolerance among three species of the Lecane genus (Rotifera: Monogononta)



Life table analysis reveals variation in thermal tolerance among three species of the *Lecane* genus (Rotifera: Monogononta)

Susana Saucedo-Ríos, Gustavo Emilio Santos-Medrano and Roberto Rico-Martínez*

Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química. Avenida Universidad 940, Aguascalientes, Ags. México, C.P. 20100, México

Received 22 December 2016; Accepted 30 March 2017

Abstract – Variation in thermal tolerance among related species plays an important role in establishing their range and distribution. We conducted life table experiments with three rotifer species of the *Lecane* genus at three temperatures (20, 25 and 30 °C). The rotifers were fed on *Nannochloropsis oculata* at 10^6 cells.mL⁻¹ to test the hypothesis that *Lecane papuana* (Murray, 1913) (a warm stenothermal species) would behave like a thermal specialist and perform better at higher temperatures than the cosmopolitan species *Lecane bulla* (Gosse, 1851) and *Lecane cornuta* (Müller, 1786). Consistent with our hypothesis, *L. papuana* grew better at 30 °C than at 20 and 25 °C, while at 30 °C, *L. cornuta* grew poorly and *L. bulla* did not grow at all. All three species have longer lifespans with decreasing temperature. At 20 °C, the net reproductive rates of *L. cornuta* (3.5 h^{-1}) and *L. papuana* (3.58 h^{-1}) were not significantly different, but were significantly greater than that of *L. bulla* (2.75 h^{-1}). At 25 °C, *L. papuana* had a lower net reproductive rate (6.33 h^{-1}) than either *L. bulla* (11.33 h^{-1}) or *L. cornuta* (7.12 h^{-1}). However, at 30 °C, *L. papuana* had a greater net reproductive rate (14.35 h^{-1}) than *L. cornuta* (1.16 h^{-1}).

Key words: Demography / ecotoxicology / endpoints / invertebrates / temperature

Introduction

Life tables provide information on life history strategies based on observations of reproduction and mortality in individuals of a given population (Krebs, 1985). Life table experiments and ecological studies on rotifers have demonstrated that most of the species investigated so far are *r*-strategists and, therefore, have the ability to occupy new niches (Wallace *et al.*, 2006). Life table experiments have been performed mainly on planktonic rotifer species, but little information is available for littoral species. In fact, in the *Lecane* genus, perhaps one of the most diverse rotifer genera (Segers, 1995), only six species have been studied to determine their life table characteristics: *Lecane inermis* (Bryce, 1892) (Miller, 1931), *Lecane cornuta* (Pray, 1965) and *Lecane tenuiseta* (Harring, 1914) (Hummon and Bevelhimer, 1980), *Lecane luna* (Müller, 1786) and *Lecane quadridentata* (Ehrenberg, 1830) (Pérez-Legaspi and Rico-Martínez, 1998), and *Lecane furcata* (Murray, 1913) (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2000).

The diversity of *Lecane* species seems to be related to their versatility and perhaps to the food specialization

characteristic of the genus (Segers, 1995). Several species in the *Lecane* genus have been cultured successfully, using different types of media. Hummon and Bevelhimer (1980) developed life table experiments with *L. tenuiseta* fed on baker's yeast. Miller (1931) and Pray (1965) used wheat-grain infusions in their experiments. Pérez-Legaspi and Rico-Martínez (1998), Rico-Martínez and Snell (1997) and Segers and Rico-Martínez (2000) used algae to grow four different *Lecane* species.

Protection of aquatic ecosystems requires new protocols for assessing the impact of potentially toxic compounds that enter freshwater ecosystems (De Zwart, 2002). There are many factors concerning rotifers that favor their use as model test organisms for ecotoxicological studies: (a) they are easy to culture, (b) they achieve exponential growth, (c) their small size, (d) their environmental sensitivity, (e) there is a wide range of species that have been cultured and (f) they have a high level of production of cysts or parthenogenetic eggs that hatch easily (Rico-Martínez *et al.*, 2013). Life table parameters have been used in rotifers as the endpoints of ecotoxicological tests (Janssen *et al.*, 1993). For example, hatching diapausing embryos (resting eggs or cysts) has been shown to be a sensitive endpoint of petroleum exposure in rotifers (Rico-Martínez *et al.*, 2013). However, there is a need to

*Corresponding author: rrico@correo.uaa.mx

find “indigenous species that may be as sensitive or more sensitive” than species recommended by the US Environmental Protection Agency (EPA) due to their better adaptation to local environments (United States Environmental Protection Agency, 2002). This has prompted us to collect species with the potential to be good candidates for developing ecotoxicology/toxicology tests for Mexico. The *Lecane* genus is an excellent candidate for toxicological tests due to its ability to be present in both planktonic and benthic communities. One species of this genus, *L. quadridentata*, has been used extensively for toxicity testing (Rico-Martínez *et al.*, 2000; Pérez-Legaspi and Rico-Martínez, 2001; Santos-Medrano *et al.*, 2007; Torres-Guzmán *et al.*, 2010a), and has been shown to be more sensitive than *Daphnia magna*, as recommended by the EPA, when environmental samples were analyzed (Santos-Medrano *et al.*, 2007).

In our search for more appropriate species, we posited that *Lecane bulla*, *L. cornuta* and *L. papuana* would be good candidates because they grow efficiently in the laboratory under defined conditions, and produce a large number of parthenogenetic eggs that hatch quickly over short periods of time. *L. bulla* and *L. cornuta* are cosmopolitan species, whereas *L. papuana* is considered to be a warm stenothermal species (Segers, 1995). These characteristics enabled us to test the hypothesis that *L. papuana* would achieve a higher growth rate at a high temperature (30 °C) than either *L. bulla* or *L. cornuta*.

The aim of our work was to determine the influence of temperature on three species of the *Lecane* genus: *L. bulla*, *L. cornuta* and *L. papuana*, using life table experiments. These data, once analyzed, were used to: (a) test the hypothesis that *L. papuana* behaves as a high-temperature thermal specialist, and (b) determine the feasibility of using these three species as model organisms to develop sensitive toxicity/ecotoxicology tests.

Materials and methods

The littoral rotifer *L. bulla* was collected at Milpillas de Arriba, Aguascalientes, México (21.880°N, 102.491°W). *L. cornuta* was collected at La Mezquitera, Aguascalientes (21.545°N, 102.192°W). *L. papuana* was collected at El Ocote, Aguascalientes (21.464°N, 102.313°W). All geographic coordinates were determined with a GPS 4000XL Magellan Satellite Navigator. The rotifer species were grown in the laboratory for at least 6 months prior to performing the experiments. EPA medium (U.S. EPA, 1985) was used for all rotifer cultures. The animals were fed the green alga *Nannochloropsis oculata* LB2164 UTEX Culture Collection of Algae grown in Bold's Basal Medium (Nichols, 1973). Algae was harvested by centrifugation and added to rotifer cultures. We studied the effect of three different temperatures (20, 25 and 30 °C) at one food concentration (*N. oculata*, 10⁶ cells.mL⁻¹). The life table studies were started with hatchlings from 100 asexual eggs. We observed the eggs every 2 h and assigned a mid-value of 1 h to every individual hatched

within the 2-h period until we collected 24 individuals. All animals were acclimated to the corresponding experimental temperature for at least 48 h prior to the start of each experiment, which means that the parthenogenetic eggs used in the experiment were produced at the corresponding temperature and food concentration with the exception of *L. bulla*, which was unable to produce parthenogenetic eggs at 30 °C. Hatching percentages were recorded for up to 72 h. Neonates were then transferred to individual wells in a 24-well polystyrene plate (Corning®) with the appropriate food concentration and incubated at the corresponding temperature under a 16:8 light:dark photoperiod. The total volume in each well was 750 µL. In total 24 individuals were observed at 20, 25 and 30 °C every 24 h, and their neonates were counted and removed from the well. Instead of changing the original individuals to new wells with fresh food (a procedure that may damage the animals), half of the medium was replaced by fresh medium every 24 h. The algae were counted by means of a hemocytometer. The dry weight of 10⁶ cells.mL⁻¹ of *N. oculata* (2.13 ± 1.90 µg for 1 × 10⁶ cells.mL⁻¹; n = 10) was determined by standard methods (APHA, 1995) to ensure comparability of our results with other studies.

The following parameters were analyzed: the 24 h time intervals (x), mean duration of lifespan (D , h), mean generation time (G , h), net reproductive rate (R_0 , h⁻¹) and the life expectancy (ex , h). All of these parameters were determined according to Krebs (1985). Reproductive value (V_x), mean generation time (G), net reproductive rate (R_0) and intrinsic growth rate (r) were calculated according to Krebs (1985) and Begon *et al.* (1996), using the following formulae:

$$\text{Survivorship (} l_x \text{)} = \frac{n_x}{24}$$

$$\text{Mean fecundity (} m_x \text{)} = \frac{f_x}{n_x}$$

Mean duration of lifespan (D) :

$$D = \frac{\sum (\text{age at death})}{\text{Number of individuals in the cohort}}$$

$$\text{Mean generation time (} G \text{)} = \sum \frac{(x m_x l_x)}{R_0}$$

$$\text{Net reproductive rate (} R_0 \text{)} = \sum (m_x l_x)$$

$$\text{Life expectancy (} ex \text{)} = \frac{T_x}{l_x}$$

= proportion surviving for each time interval

T_x = Total number of organisms living at each age interval

$$\text{Reproductive value (} V_x \text{)} = \frac{m_x}{x}$$

Table 1. Life table parameters of three species of the rotifer *Lecane* genus.

Parameters	<i>Lecane bulla</i>			<i>Lecane cornuta</i>			<i>Lecane papuana</i>		
	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
<i>D</i> (h)	281 ± 19.08	177 ± 9.67	70 ± 10.89	386 ± 32.59	304 ± 27.88	70 ± 10.89	195 ± 15.91	154 ± 10.80	101 ± 6.77
Bootstrap <i>D</i>	281.2 ± 18.57	177.15 ± 9.35	70.14 ± 10.54	385.41 ± 31.60	304.44 ± 26.94	70.14 ± 10.54	195.24 ± 15.42	154 ± 10.52	101.11 ± 6.57
*	242.18 to 319.81	157.49 to 196.51	47.61 to 92.38	329.70 to 452.29	247.58 to 360.41	47.61 to 92.38	162.91–227.09	132.05 to 175.94	87.38 to 114.61
<i>G</i> (h)	248.36 ± 2.47	160.37 ± 3.07	113.79 ± 1.65	266.57 ± 2.08	176.28 ± 1.62	113.79 ± 1.65	104.09 ± 4.11	86.68 ± 3.13	80.62 ± 4.40
Bootstrap <i>G</i>	249.83 ± 2.36	160.34 ± 2.93	113.91 ± 4.62	266.36 ± 1.99	174.94 ± 1.58	113.91 ± 4.62	103.57 ± 3.72	86.50 ± 2.89	81.12 ± 3.95
*	142.3 to 354.42	76.35 to 244.38	16.39 to 211.19	162.67 to 370.46	109.76 to 242.79	16.39 to 211.19	– 15.02 to 223.20	13.76 to 159.60	2.62 to 158.62
Ro (h ⁻¹)	2.75 ± 0.02	11.33 ± 0.20	1.16 ± 0.05	3.50 ± 0.02	7.12 ± 0.08	1.16 ± 0.05	3.58 ± 0.13	6.33 ± 0.24	14.35 ± 0.48
Bootstrap Ro	2.75 ± 0.02	11.26 ± 0.20	1.17 ± 0.05	3.50 ± 0.02	7.12 ± 0.08	1.17 ± 0.05	3.58 ± 0.12	6.33 ± 0.22	14.41 ± 0.74
*	1.51 to 3.90	5.64 to 7.02	0.10 to 2.22	1.98 to 5.01	3.75 to 10.49	0.10 to 2.22	– 0.47 to 7.63	0.69 to 11.97	– 0.063 to 29.38
<i>r</i> (h ⁻¹)	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.01	– 0.18 ± 0.06	– 0.008 ± 0.009	0.11 ± 0.02	– 0.18 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.65 ± 0.01
Bootstrap <i>r</i>	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.01	– 0.18 ± 0.05	– 0.009 ± 0.007	0.12 ± 0.02	– 0.18 ± 0.05	0.15 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.65 ± 0.01
*	0.05 to 0.12	0.22 to 0.28	– 0.34 to (– 0.03)	– 0.03 to 0.01	0.29 to 0.90	– 0.34 to (– 0.03)	0.08 to 0.21	0.48 to 0.58	0.62 to 0.68
Eggs/individual	3.17 ± 0.62	11.67 ± 3.59	0.79 ± 2.02	3.88 ± 0.72	7.50 ± 1.77	0.79 ± 2.02	3.66 ± 2.58	6.58 ± 3.58	7.16 ± 4.74
Fecundity	11.26 ± 0.15	20.86 ± 0.32	6.2 ± 0.62	5.17 ± 0.03	10.45 ± 0.09	6.2 ± 0.62	4.08 ± 0.15	7.23 ± 0.26	23.54 ± 1.14

Abbreviations correspond to: mean lifespan (*D*), mean generation time (*G*), intrinsic growth rate (*r*) for this determination $n = 5$, and net reproductive rate (*Ro*). Values are mean + one standard error. $N = 24$. Bootstrap was set at 10 000 re-samples.

*Variation coefficient for each bootstrap value.

where: x = time (h), n_x = number of animals surviving at each age interval, f_x = number of neonates produced at each age interval.

$$\text{Intrinsic growth rate } (r) = \ln \frac{[N(t_2) - N(t_1)]}{(t_2 - t_1)}$$

where: \ln = natural logarithm, N = number of individuals, t_1 = time 1 (d⁻¹), t_2 = time 2 (d⁻¹).

All of the statistical analyses were done using Statistica 7.0 software. To estimate the variability of life table statistics, 10 000 bootstrap repetitions were used (XLSTAT 5.03 software). These repetitions represent a good measure of the variability found in the actual replicates ($N = 24$). Analysis of variance (ANOVA) and Scheffe *post hoc* tests were used to compare mean values ($P < 0.05$). A Mann–Whitney *U* test with Bonferroni's correction was applied to the data, because our data were not normally distributed (see online Supplementary data).

Results

Several tests for homoscedasticity showed that, in some cases, our survivorship data did not comply with the assumptions of a normal distribution (Levene's tests for homogeneity of variances, $P < 0.001$). Therefore, a complete analysis comparing results of parametric and non-parametric tests is included in the online Supplementary material. In most cases, Scheffe test results were similar to those from Mann–Whitney *U* tests with Bonferroni correction (see online Supplementary data). There are differences in the life table parameters regarding the influence of temperature on *Lecane*. All three species have longer lifespans at 20 °C than at 25 or 30 °C (Table 1). Of the three species, *L. cornuta* had the longest lifespan (137% of that of *L. bulla*, and 198% of that of *L. papuana* at 20 °C), followed by *L. bulla* and *L. papuana* (ANOVA, $P < 0.05$; Scheffe tests). The influence of temperature on lifespan is also reflected in the life expectancy plots (Fig. 1). At 20 and 25 °C, life expectancy (*ex*) was greatest for *L. cornuta*, followed by *L. bulla* and *L. papuana*. Life expectancy decreased with increasing temperature and *L. bulla* failed to grow at all at 30 °C. The net reproductive rates of *L. cornuta* and *L. papuana* at 20 °C were not significantly different, but each is significantly higher than that of *L. bulla* (ANOVA, $P < 0.05$; Scheffe tests). At 25 °C, *L. bulla* had the greatest net reproductive rate followed by *L. cornuta* and *L. papuana* (ANOVA, $P < 0.05$; Scheffe tests). The net reproductive and intrinsic growth rates, and eggs per individual for all three species were greater at 25 °C than at 20 °C, suggesting that 25 °C is a more suitable temperature for growth for the three species tested than 20 °C. However, the greatest net reproductive and intrinsic growth rates and eggs per individual were those of *L. papuana* at 30 °C (Table 1). The bootstrap values are quite similar to the actual values obtained for the life table parameters (Table 1). The reproductive value (*V_x*) in *L. papuana* shows a strong early

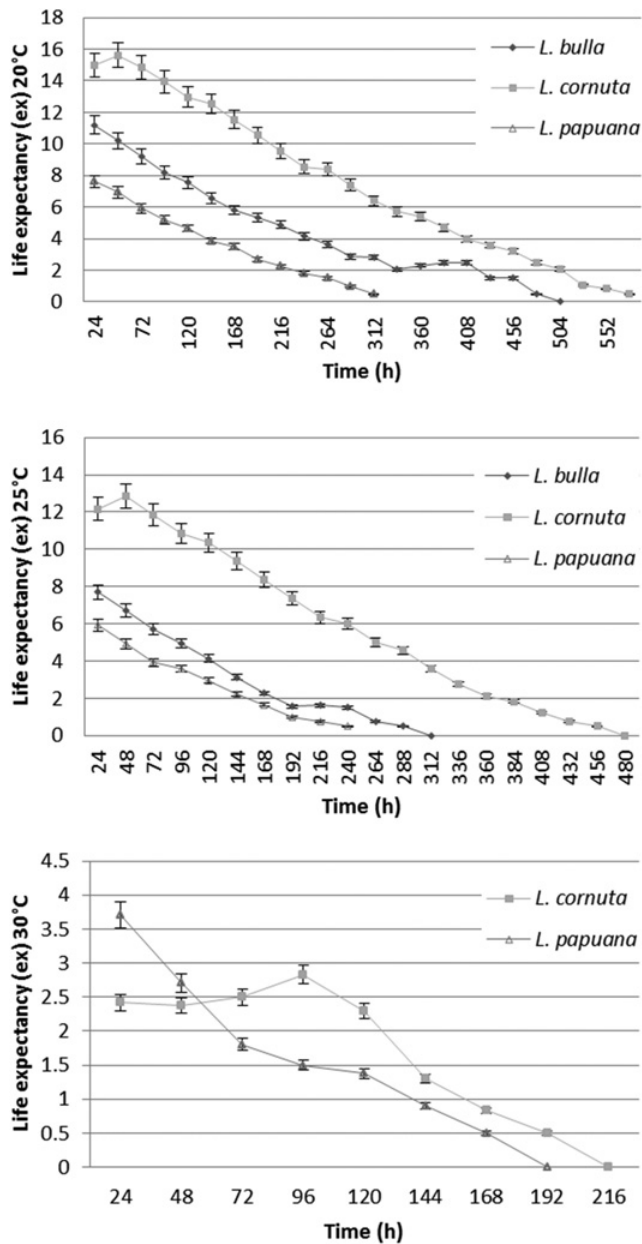


Fig. 1. Life expectancy (*ex*) of *Lecane bulla*, *Lecane cornuta* and *Lecane papuana* at 20, 25 and 30 °C. Values are represented as mean \pm one standard error. $N = 24$.

investment in reproduction for this species, as a consequence of its shorter life cycle at 20, 25 and 30 °C (Fig. 2). In *L. bulla* grown at 25 °C, a strong investment in reproduction is evident between 72 and 240 h before decreasing (Fig. 2). On the other hand, *L. cornuta* appears to make a regular investment in reproduction throughout its life (Fig. 2). Survivorship, as expected, is strongly related to life expectancy (*ex*) and mean lifespan (*D*) (see Table 1). Survivorship is shorter with increasing temperature for all three species, and *L. papuana* has the shortest survivorship in the 20–25 °C interval (Table 1). However, while *L. papuana* excels at 30 °C, the other two species have poor performance at this temperature.

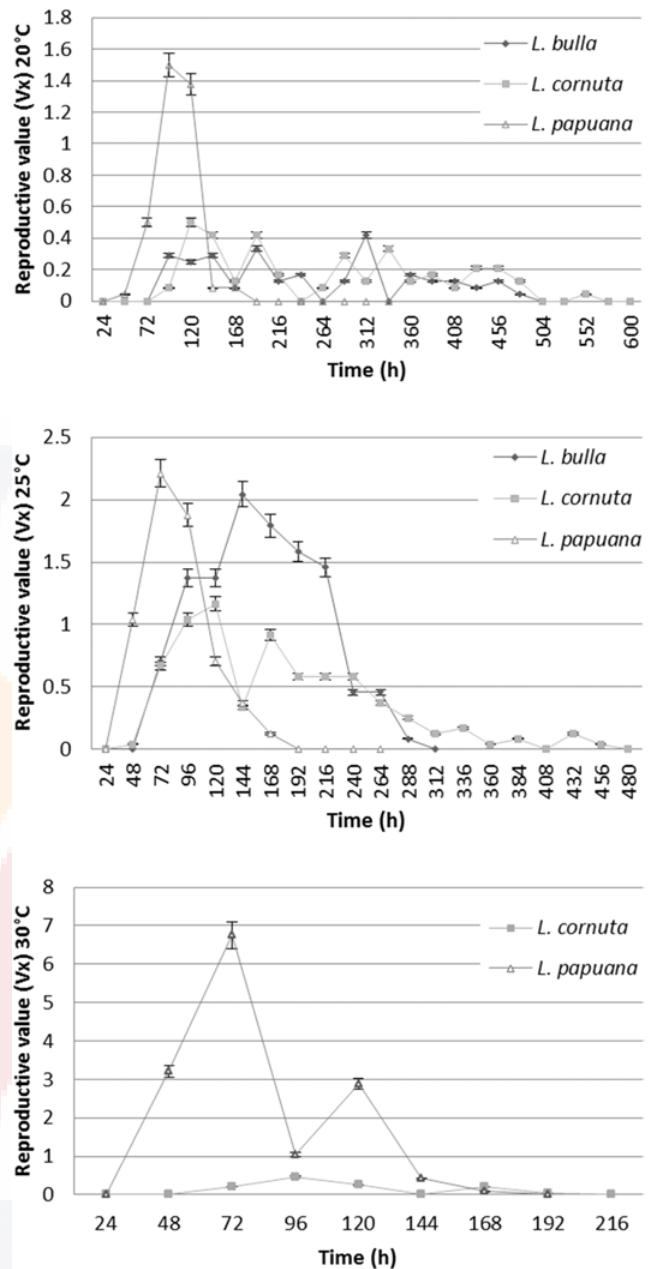


Fig. 2. Reproductive value (*Vx*) of *Lecane bulla*, *Lecane cornuta* and *Lecane papuana* at 20, 25 and 30 °C. Values are represented by the mean \pm one standard error. $N = 24$.

Hatching percentages of parthenogenetic eggs are shown in Table 2. Eggs of *L. papuana* hatched quickly and with higher hatching success at all temperatures. All eggs of *L. cornuta* hatched at 20 and 25 °C after 48 h, but only 60% of eggs hatched after 72 h at 30 °C. *L. bulla* eggs failed to hatch with 100% efficiency after 72 h at 20 and 25 °C and did not hatch at all at 30 °C.

Discussion

These results support the hypothesis that *L. papuana* is a thermal specialist and *L. bulla* and *L. cornuta* behave as

Table 2. Cumulative parthenogenetic egg hatching percentages after 72 h.

Temperature	20 °C			25 °C			30 °C		
Species/time	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>Lecane bulla</i> *	57%	89%	95%	78%	91%	91%	–	–	–
<i>Lecane cornuta</i>	78%	100%	100%	92%	100%	100%	56%	60%	60%
<i>Lecane papuana</i>	98%	98%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

**L. bulla* was unable to grow at 30 °C; eggs of this species produced at 25 °C are unable to hatch at 30 °C.

thermal generalists. *L. papuana* had the lowest life expectancy and reproductive value at 20 and 25 °C and the best performance for these two parameters at 30 °C. In contrast, *L. cornuta* and *L. bulla* grew well at the lower temperatures, but *L. cornuta* grew poorly and *L. bulla* did not grow at all at 30 °C. These results agree with the thermal specialist hypothesis (Huey and Slatkin, 1976; Huey and Hertz, 1984), which states that an individual performing well at its optimal temperature range might perform poorly at non-optimal temperatures. Our results partially agree with those of Pérez-Legaspi and Rico-Martínez (1998), who found that the optimal temperature for *L. luna* and *L. quadridentata* was 25 °C. Although the Ro values for these two species of *Lecane* at this temperature are 10-fold and 20-fold higher than the Ro values found in our work, our Ro values are ten times higher than those of *L. furcata*. This difference might be due to the fact that: (1) *L. furcata* behaves as a *K*-strategist (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2000), and the species in this work behave as *r*-strategists. (2) These studies were performed on different rotifer species with different food qualities. The highest reproductive value (Vx) for *L. luna* and for *L. quadridentata* at the same temperature and food concentration was found at 48 and 60 h, respectively. Hummon and Bevelhimer (1980) also obtained high values of Vx for *L. tenuiseta* at 48 h. However, their experiments were run at 20 °C with a different type of food and a different concentration. In our work, *L. bulla* showed the highest Vx values after 72 h at 25 °C. The *r* values in our work are from 7-fold to four orders of magnitude higher than those reported by Serrania-Soto *et al.* (2011) for the same species (*L. cornuta* and *L. papuana*). This remarkable difference might be explained by either: (a) better acclimation of our strains to culture conditions than those of Serrania-Soto and co-workers, (b) differences in the protocols being used to calculate *r* values and (c) different algal species used as food.

Development of ecotoxicological tests using different indigenous species of rotifers could provide a valuable tool for assessing the toxicity of materials dissolved in freshwater ecosystems worldwide. A first step in the development of ecotoxicological tests is the study and analysis of life table characteristics of the species that could potentially be used for this purpose. Among rotifers, the *Lecane* genus, with 163 species (Segers, 1995), is the most numerous. In this study, we analyzed the life table parameters of three species of *Lecane* to determine their potential as model organisms for traditional toxicity or ecotoxicology tests. Our results suggest that all of the three

species tested have high potential for both traditional toxicology and ecotoxicology tests. In particular, *L. papuana* appears to be an excellent candidate for studies of tropical or subtropical ecotoxicology because it has optimal development at high temperatures (30 °C), which is a characteristic that makes this species very attractive for studies in tropical countries. In terms of ease of obtaining parthenogenetic eggs, the high percentage of hatching after 24–72 h (91–100%, see Table 2) of the three species tested would ensure an abundant supply of neonates for traditional toxicity tests. In addition, the short period over which several life table parameters (*G*, *Ro*, *r*, *Vx*, *ex*, *lx*) can be obtained, and the differences in reproductive effort or survivorship, among other parameters elucidated in all three species, suggest that these species might be potential candidates as ecotoxicological model organisms.

Use of *Lecane* species for toxicity testing is not new. Finesinger (1926) was the first to propose the use of *L. inermis* to biomonitor the effects of exposure to some chemicals. Pérez-Legaspi and Rico-Martínez (2001) developed acute tests for *Lecane hamata*, *L. luna* and *L. quadridentata* for 11 toxicants (five organics and six metals), arguing that the most representative toxicity tests worldwide are with planktonic species, despite the fact that deposition of contaminants in sediments is an important contribution to toxicity (Rand and Petrocelli, 1985). Since that work, *L. quadridentata* has been used in Mexico to analyze environmental samples in the San Pedro River in Aguascalientes (Rico-Martínez *et al.*, 2000; Santos-Medrano *et al.*, 2007; Torres-Guzmán *et al.*, 2010a). It has also been used in the Southern Huastec region to analyze combined effects of manganese and dichloro diphenyl trichloroethane (Mejía-Saavedra *et al.*, 2005), and in Aguascalientes, it has been used to monitor the effectiveness of drinking water systems (Rico-Martínez *et al.*, 2000) and waste water treatment plants (Torres-Guzmán *et al.*, 2010b; Robles-Vargas *et al.*, 2012). In Poland, Klimek *et al.* (2013) found that *L. inermis* is more sensitive to several trace metals (Al, Cu, Fe, Mn, Sn and Zn) than other species commonly used in toxicity tests.

In our work, we have increased knowledge of the demography of three more species of the specious *Lecane* genus. We found that life table parameters and parthenogenetic egg production and hatching made these three species potentially good candidates for developing toxicity or ecotoxicology tests. We have compared their life table parameters with values found for the same species or others in the literature, finding important differences

among them. Our results confirm that *L. papuana* behaves as a thermal specialist and that the cosmopolitan species *L. bulla* and *L. cornuta* behave as thermal generalists. Our results suggest that more rotifer species and species of other phyla of freshwater invertebrates need to be studied to understand the demographic traits and potential of such animals for environmental assessment.

Supplementary material

The supplementary material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1051/limn/2017009>.

References

- APHA, American Public Health Association, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association (19th edn), American Public Health Association, Washington, DC, 541 p.
- Begon M., Harper J.L. and Townsend C.P., 1996. Ecology: Individuals, Populations, and Communities (3rd edn), Blackwell Scientific, Malden, MA, USA, 1068 p.
- De Zwart D., 2002. Observed regularities in SSDs for aquatic species. *In*: Posthuma L., Sutter II G. W. and Traas T. P. (eds.), Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 133–154.
- Finesinger J.E., 1926. Effect of certain chemical and physical agents on fecundity and length of life and on their inheritance in a rotifer *Lecane* (*Distyla*) *inermis* (Bryce). *J. Exp. Zool.*, *44*, 63–94.
- Hernández-Rodríguez M.A., Rico-Martínez R., Santos-Medrano G.E., Velázquez-Rojas C.A. and Sánchez-Martínez V.G., 2000. Life table of the rotifer *Lecane furcata* (Murray, 1913). *Scientiae Naturae*, *3*, 18–26.
- Huey R.B. and Hertz P.E., 1984. Is a Jack-of-all-temperatures a master of none? *Evolution*, *38*, 441–444.
- Huey R.B. and Slatkin M., 1976. Costs and benefits of lizard thermoregulation. *Q. Rev. Biol.*, *51*, 363–384.
- Hummon W.D. and Bevelhimer D.P., 1980. Life table demography of the rotifer *Lecane tenuiseta* under culture conditions and various age distributions. *Hydrobiologia*, *70*, 25–28.
- Janssen C.R., Ferrando-Rodrigo M.D. and Persoone G., 1993. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. I. Conceptual framework and applications. *Dev. Hydrobiol.*, *83*, 21–32.
- Klimek B., Fiałkowska E., Kocerba-Soroka W., Fyda J., Sobczyk M. and Pajdak-Stós A., 2013. The toxicity of selected trace metals to *Lecane inermis* rotifers isolated from activated sludge. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, *91*, 330–333.
- Krebs C.J., 1985. Ecología: Estudio de la distribución y la abundancia (2nd edn), Editorial Harla, Mexico City, Mexico, 753 p.
- Mejía-Saavedra J., Sánchez-Armass S., Santos-Medrano G.E., González- Amaro R., Razo-Soto I., Rico-Martínez R. and Díaz-Barriga F., 2005. Effect of co- exposure to DDT and manganese on freshwater invertebrates: pore water from contaminated rivers and laboratory studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, *24*, 2037–2044.
- Miller H.M., 1931. Alternation of generations in the rotifer *Lecane inermis* Bryce. *Biol. Bull.*, *60*, 345–381.
- Nichols H.W., 1973. Growth media-freshwater. *In*: Stein J.R. (ed.), Handbook of Physiological Methods, Cambridge University Press, Cambridge, MA, 7–24.
- Pérez-Legaspi I.A. and Rico-Martínez R., 1998. Effect of temperature and food concentration in two species of littoral rotifers. *Hydrobiologia*, *387/388*, 341–348.
- Pérez-Legaspi I.A. and Rico-Martínez R., 2001. Acute toxicity tests on three species of the genus *Lecane* (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia*, *446/447*, 375–381.
- Pray F.A., 1965. Studies of the early development of the rotifer *Monostyla cornuta* Muller. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, *84*, 210–216.
- Rand G.M. and Petrocelli S.R., 1985. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications, Washington Hemisphere Publishing Corporation, Washington, DC, 670 p.
- Rico-Martínez R. and Snell T.W., 1997. Mating behavior in eight rotifer species: using cross-mating tests to study species boundaries. *Hydrobiologia*, *356*, 165–173.
- Rico-Martínez R., Velázquez-Rojas C.A., Pérez-Legaspi I.A. and Santos-Medrano G.E., 2000. The use of aquatic invertebrate toxicity tests and invertebrate enzyme biomarkers to assess toxicity in the states of Aguascalientes and Jalisco, Mexico. *In*: Butterworth F.M., Gunatilake A. and Gonsebatt-Bonaparte M.E. (eds.), Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change, Vol. 2, Plenum Press, New York, 427–438.
- Rico-Martínez R., Pérez-Legaspi I.A., Arias-Almeida J.C. and Santos-Medrano G.E., 2013. Rotifers in Ecotoxicology. *In*: Féraud J.F. and Blaise C. (eds.), Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology, Springer, Berlin, 973–996.
- Robles-Vargas D., Montoya-Castillo S.M., Avelar-González F.J., Jáuregui-Rincón J., Rodríguez-Valadez F.J. and Rico-Martínez R., 2012. Assessment of the quality and toxicity of the discharges of a wastewater treatment plant and alternatives to improve its operation. *J. Environ. Health A*, *47*, 589–597.
- Santos-Medrano G.E., Ramírez-López E.M., Hernández-Flores S., Azuara-Medina P.M. and Rico-Martínez R., 2007. Determination of toxicity levels in the San Pedro River Watershed, Aguascalientes, Mexico. *J. Environ. Health A*, *42*, 1403–1410.
- Segers H., 1995. Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World: Volume 2: Rotifera: The Lecanidae (Monogonota), SPB Academic Publishing, Leyden, The Netherlands, 226 p.
- Segers H. and Rico-Martínez R., 2000. The male of *Lecane bulla* (Gosse, 1851): new support for the synonymy of *Lecane Nitzsch*, *Monostyla Ehrenberg* and *Hemimonostyla Bartos*. *J. Nat. Hist.*, *34*, 679–683.
- Serrania-Soto C.R., Sarma S.S.S. and Nandini S., 2011. Studies on comparative population growth of some species of the rotifer *Lecane* (Rotifera). *J. Environ. Biol.*, *32*, 523–527.
- Torres-Guzmán F., Avelar-González F.J. and Rico-Martínez R., 2010a. Implementing *Lecane quadridentata* acute toxicity tests to assess the toxic effects of selected metals (Al, Fe and Zn). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, *73*, 287–295.
- Torres-Guzmán F., Avelar-González F.J. and Rico-Martínez R., 2010b. An assessment of chemical and physical parameters, several contaminants including metals, and toxicity in the

seven major wastewater treatment plants in the state of Aguascalientes, Mexico. *J. Environ. Health A*, 45, 2–13.

United States Environmental Protection Agency, 1985. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms. EPA/600/4-85/013, Washington, DC, USA, 275 p.

United States Environmental Protection Agency (EPA), 2002. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of

Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms (3rd edn). EP-821-R-02-014, Washington, DC, 464 p.

Wallace R.L., Snell T.W., Nogrady T. and Ricci C., 2006. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world: Volume 23. *In*: Segers H. (ed.), Rotifera Volume 1 Biology, Ecology and Systematics (2nd edn.), Kenobi Productions, Ghent, Belgium, 299 p.

