



# FILOGENIA Y BIOGEOGRAFÍA DEL GÉNERO *ZAPOTECIA* (OLIGOCHAETA: ACANTHODRILIDAE)

TESIS QUE PRESENTA **GABRIELA CERVANTES OLVERA**  
PARA OBTENER EL GRADO DE **MAESTRO EN CIENCIAS**

Xalapa, Veracruz, México 2012

---



**Aprobación final del documento de tesis de grado:**

**“Filogenia y Biogeografía del Género *Zapotecia* (Oligochaeta: Acanthodrilidae)”**

**Director**

Dr. Carlos Enrique Fragoso González

**Comité Tutorial**

Dr. Alejandro Espinosa de los Monteros Solís

Dr. Samuel W. James

**Jurado**

Dra. Isabelle Barois Boullard

Dr. Thibaud Decaëns

## RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue financiado por las siguientes instituciones:

- **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**. Apoyo económico otorgado para la formación profesional a través de la beca de estudios de posgrado nacional en el programa de maestría en ciencias (CVU/Becario: 370598/250329).
- **Instituto de Ecología A.C. (INECOL)**. Financiamiento para la realización del trabajo de campo y de laboratorio.
- **international Barcode Of Life project (iBOL)**. Financiamiento para el procesamiento de las muestras de tejido y la obtención de secuencias de ADN del gen COI de las especies del género *Zapotecia*.

Quiero ofrecer un reconocimiento a los miembros del comité tutorial y jurado de tesis:

- **Dr. Carlos Fragoso** (Director de tesis y Tutor académico) por su excelente labor en la supervisión del proyecto, proporcionar todos los medios económicos, materiales y el espacio físico necesarios para el desarrollo de la investigación, por capacitarme en taxonomía de oligoquetos y por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo.
- **Dr. Samuel W. James** (Asesor Externo de tesis), por enriquecer este trabajo con sus valiosos comentarios, sugerencias y revisión del manuscrito. Es un honor haber contado con la asesoría de uno de los mayores expertos en sistemática de oligoquetos.
- **Dr. Alejandro Espinosa de los Monteros** (Asesor Interno de tesis) por ser mi maestro en el área de Sistemática Filogenética y por fungir como revisor de tesis.
- **Dra. Isabelle Barois** y **Dr. Thibaud Decaëns** (miembros del jurado) por su revisión detallada del documento de tesis y su apoyo académico.

Mi agradecimiento sincero a los participantes de este proyecto:

- **Dr. David Porco, Dr. Thibaud Decaëns** y **Dr. Samuel W. James** (coordinador y codirectores de la campaña iBOL Earthworm Barcode of life) por el apoyo y facilidades otorgadas para la inclusión de las muestras de este proyecto en la campaña Earthworm Barcode of life.
- **Biol. Antonio Ángeles** y **Biol. Jesús Omar Lázaro** (asesores técnicos del INECOL) por su gran esfuerzo y compromiso mostrado durante su participación en el muestreo de campo.

Cabe resaltar la importancia de los propietarios, autoridades y habitantes de las localidades donde se efectuó el trabajo de campo. Gracias por conceder la autorización y brindar las facilidades para la búsqueda y colecta de lombrices dentro de sus terrenos:

- **Rancho Santa Cruz**, Mpio. Papantla, Estado de Veracruz. A su propietario Sr. Cruz
- **Rancho El Polvorín**, Mpio. Tuxpan, Estado de Veracruz. Al propietario y al encargado.
- **Localidad de San Pedro Benito Juárez**, Mpio. Atlixco, Pue. A toda su comunidad.

La presentación de este trabajo en cartel durante el XVI International Colloquium on Soil Zoology fue posible gracias al apoyo económico de:

- **Posgrado del Instituto de Ecología A.C**
- **Dr. Carlos Fragoso**
- **Dra. Isabelle Barois**
- **Dr. José Antonio García**

## **DEDICATORIA**

**AL DR. CARLOS FRAGOSO**  
EN RECONOCIMIENTO A SU LABOR CIENTÍFICA,  
SU GRAN CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO  
DE LA OLIGOQUETOFAUNA DE MÉXICO,  
Y POR SER COMO UN PADRE PARA MÍ.

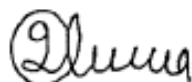
## DECLARACIÓN

---

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis fue efectuado por la Biol. Gabriela Cervantes Olvera como estudiante de la carrera de Maestro en Ciencias entre septiembre de 2010 y agosto del 2012, bajo la supervisión del Dr. Carlos Enrique Fragoso González.

Las investigaciones reportadas en esta tesis no han sido utilizadas anteriormente para obtener otros grados académicos, ni serán utilizadas para tales fines en el futuro.

Candidato: Biol. Gabriela Cervantes  
Olvera



---

Director de tesis: Dr. Carlos Enrique Fragoso  
González



---

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	8
II.	MARCO TEÓRICO.....	9
	La importancia de los análisis moleculares en los estudios filogenéticos sobre lombrices de tierra.....	9
	Caracteres morfológicos utilizados en taxonomía y sistemática de lombrices de tierra.....	10
	Aspectos generales de la familia Acanthodrilidae.....	11
	El género <i>Zapotecia</i> Eisen 1900.....	12
III.	OBJETIVOS DEL PROYECTO .....	14
	Objetivo general.....	14
	Objetivos particulares.....	14
IV.	HIPÓTESIS.....	14
V.	METODOLOGÍA.....	15
	Muestreo.....	15
	Colecta y preservación del material.....	15
	Identificación morfológica.....	16
	Obtención de secuencias de ADN del gen citocromo c oxidasa subunidad I.....	16
	Análisis filogenético.....	16
	Estimación de los tiempos de divergencia.....	17
	Distancias genéticas.....	18
	Mapeo de caracteres morfológicos.....	18
	Delimitación de especies .....	18
	Patrones biogeográficos.....	18
VI.	RESULTADOS .....	19
	Análisis filogenético, edades absoluta de los clados e implicaciones biogeográficas .....	19
	Redefinición del género <i>Zapotecia</i> EISEN 1900.....	25
	Diagnos de las especies del Género <i>Zapotecia</i> .....	25
	Distribución geográfica actual.....	31
VII.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	33
VIII.	REFERENCIAS .....	37

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1	Taxa muestreados y descripción de los sitios de colecta.....	21
Cuadro 2	Matriz de distancias genéticas promedio del género <i>Zapotecia</i> .....	22
Cuadro 3	Edades de las especies del género <i>Zapotecia</i> .....	22
Figura 1	Relaciones filogenéticas de las especies mexicanas del género <i>Zapotecia</i> .....	23
Figura 2	Proyección de los caracteres morfológicos informativos.....	24
Figura 3	Mapa de distribución actual del género <i>Zapotecia</i> en México.....	32

## RESUMEN

Se efectuó una revisión del género *Zapotecia* con base en información morfológica, molecular y bibliográfica. Se presenta la filogenia molecular de las especies mexicanas del género *Zapotecia* basada en el análisis bayesiano del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI). El análisis filogenético corroboró la validez de las especies descritas de *Zapotecia* y colocó al género *Protozapotecia* dentro de *Zapotecia*. A pesar de las diferencias que presentan estos dos géneros en el número de mollejas y la posición de los poros prostáticos, se tomó esta decisión con base en los altos valores de probabilidad posterior del análisis bayesiano y en los porcentajes de divergencia genética. La estimación de los tiempos de divergencia reveló que el ancestro común más reciente del género *Zapotecia* surgió hace 9.9 millones de años y que la separación de especies de *Zapotecia* pudo deberse a una adaptación a microbarreras geográficas y a los diferentes tipos de ecosistemas. Con el reacomodo de las especies de *Protozapotecia* dentro de *Zapotecia* y el descubrimiento de tres especies nuevas se elevó de tres a ocho el número de especies del género: *Zapotecia amecamecae*, *Zapotecia aquilonalis*, *Zapotecia aff. keiteli*, *Zapotecia nova*, *Zapotecia australis*, *Zapotecia sp. nov. 1*, *Zapotecia sp. nov. 2* y *Zapotecia sp. nov. 3*. Se concluye que es necesario realizar trabajos en los que se incluyan otros genes como 16S, 28S y 12S rRNA para comprobar si se mantiene el reacomodo de *Protozapotecia* dentro de *Zapotecia* y la separación de especies propuesta en este estudio, además de incluir en el análisis a ejemplares de las localidades tipo de las especies *Z. keiteli*, *Z. nova* y *P. aquilonalis*.

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Zapotecia* fue descrito por Eisen (1900) para acomodar a la especie *Zapotecia amecamecae* caracterizada por el arreglo acanthodrilido de las próstatas, por presentar tres mollejas, holonefridios y por la falta de glándulas calcíferas. Actualmente el género incluye dos especies más, *Z. keiteli* (Michaelsen 1903) y *Z. nova* (James 1993). Es un género predominantemente neártico que se distribuye en México (Eje Neovolcánico y Planicie costera del Golfo Norte), Cuba (Rodríguez 2004) y Haití (Michaelsen 1903). Probablemente se originó en Norteamérica a partir de un ancestro con dos mollejas como el actual género *Diplocardia* (Fragoso 1993; Rodríguez 2004) o, más probable, *Protozapotecia*. El estatus de las especies *Z. amecamecae* y *Z. keiteli* es incierto debido a las características intraespecíficas e interespecíficas observadas en los ejemplares y a la falta de consenso entre taxónomos sobre la validez de las especies. Zicsi y Csuzdi (1991) consideraron a *Z. keiteli* como un sinónimo de *Z. amecamecae* con base en la ornamentación de las quetas peniales, mientras que James (1993) señaló que la sinonimia no puede ser mantenida ya que *Z. amecamecae* y *Z. keiteli* difieren en caracteres tales como el tiflosol, el número de segmentos y la posición de los corazones lateroesofágicos. Por otra parte, Fragoso (com. pers.) ha observado diferencias intraespecíficas en la ubicación del último par de corazones lateroesofágicos de *Z. amecamecae*. Mientras que Eisen (1900) señala que estos corazones se encuentran en el segmento 12, otros autores indican que están en el segmento 13, como en los ejemplares descritos por Zicsi y Csuzdi (1991) de Amecameca, y el material de la colección IEOL colectado por Fragoso (1993, 2001) y Cervantes (2010) en la región del Eje Neovolcánico. Debido a que en la familia Acanthodrilidae la variación en el último corazón lateroesofágico generalmente se considera variación interespecífica, y en ocasiones hasta genérica, es necesario corroborar estas diferencias y si se corresponden con diferentes distribuciones geográficas (a nivel macro y micro). En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis filogenético y biogeográfico del género *Zapotecia* con base en caracteres morfológicos y moleculares. Dado que no fue posible obtener material fresco de ejemplares del Caribe, solamente se revisó el material de México. Los muestreos tuvieron también por objeto ubicar con



exactitud el rango de distribución de este género en la región continental. Considerando la gran variedad de gradientes altitudinales, tipos de vegetación y climas presentes en México, se espera encontrar nuevas especies del género, dado que la heterogeneidad ambiental es un factor que promueve la diversidad de lombrices de tierra (Fragoso *et al.* 1995). Este estudio es una aportación más al escaso conocimiento sobre la oligoquetofauna nativa de México.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **La importancia de los análisis moleculares en los estudios filogenéticos sobre lombrices de tierra**

En el estudio de las lombrices de tierra, existen diferencias de opinión acerca del reconocimiento y diferenciación de taxa y de sus relaciones jerárquicas. De modo que la taxonomía y la filogenia molecular son vistas como herramientas prometedoras para la resolución de los numerosos problemas que existen en las clasificaciones de géneros y familias (Pop y Wink 2004). Los genes más comúnmente usados en estudios filogenéticos de oligoquetos pueden clasificarse por su origen o por su tasa de evolución. Por su origen los genes se clasifican en nucleares (18S rDNA, 28S rDNA, ITS y EF-1a) y mitocondriales (16S rDNA, 12SrDNA, ND1, COI y COII y varios tRNA) (Pop *et al.* 2007); mientras que por su tasa de evolución se dividen en cuatro categorías (de los que evolucionan más rápido a los que lo hacen más lento): 1) citocromo c oxidasa subunidad I (COI), NADH deshidrogenasa subunidad 1 (ND1) y el espacio interno transcrito (ITS); 2) 12S rDNA y 16S rDNA; 3) 28S rDNA; y 4) 18S rDNA. Los genes de los grupos 1 (y a veces también los del 2) son apropiados para estudios filogenéticos a nivel intra-genérico o de géneros relacionados, mientras que los de los grupos 2 y 3 lo son para estudios dentro de una familia. El 18S rDNA (grupo 4) es usualmente utilizado en filogenias a nivel de clase o phylum y por tanto no es adecuado para estudios de lombrices de tierra (Chang y James 2011). Klarica *et al.* 2012 compararon cuatro genes mitocondriales (12S rRNA, 16S rRNA, COI, y COII) con respecto a su variabilidad entre y dentro de 14 especies de lombrices de tierra de la familia Lumbricidae para determinar su potencial en la identificación de especies,

construcción de filogenias y descubrimiento de especies crípticas; encontraron que los cuatro genes fueron adecuados para la identificación de especies pero que las distancias genéticas fueron dos veces mayores para los genes que codifican para proteínas (COI y COII) que para los que codifican para RNA ribosomal (12S rDNA y 16S rDNA) y por tanto proponen la utilización de los genes 12S rDNA y 16S rDNA para identificación de especies debido a que presentan menores distancias genéticas intraespecíficas que los genes COI y COII; también encontraron que el gen COI es la mejor opción para separar linajes y realizar estudios con especies que presentan baja variabilidad genética intraespecífica y para probar especiación críptica. Por otra parte Briones *et al.* 2009 compararon la filogenia molecular con la clasificación morfológica tradicional dentro de la familia Lumbricidae concluyendo que los genes 16S rDNA y COI poseen un limitado valor discriminatorio por arriba del nivel de género en los análisis filogenéticos, que estos marcadores moleculares solo pueden resolver eventos filogenéticos recientes y que por tanto solo deberán usarse para resolver filogenias dentro de un género. Por otra parte, mencionan que la información anatómica y genética por sí sola es insuficiente para definir cualquier género lumbrícido, y que los datos morfológicos, fisiológicos, ecológicos y genéticos en conjunto constituyen la mejor herramienta para resolver el caos actual de la taxonomía y la dilucidación plena de las relaciones filogenéticas dentro de la familia Lumbricidae.

### **Caracteres morfológicos utilizados en la taxonomía y sistemática de lombrices de tierra**

En la taxonomía de lombrices de tierra la mayor importancia es conferida a los órganos del sistema reproductivo debido a que son altamente conservados, es decir, que presentan menor afectación por la influencia del ambiente a través del tiempo. El número y la posición de los testículos, las aberturas de los poros masculinos, la forma de las próstatas, la forma de los ovarios, el grosor de las células que forman el clitelo y la forma de las espermatecas que almacenan el esperma, asumen importancia primaria en taxonomía (Michaelsen 1900; Stephenson 1923; Stephenson 1930; Blakemore 2006). El sistema digestivo aunque es importante, es probablemente más adaptativo, influenciado por factores ambientales y climáticos como la edafología y la humedad del suelo, de tal

manera que los órganos que lo componen son considerados, por lo general, como características de valor secundario en taxonomía; entre éstos se encuentran el número y posición de las mollejas, la presencia o ausencia de glándulas calcíferas y el grado de desarrollo del intestino. El sistema excretor posee cierta importancia taxonómica, principalmente la clasificación de los nefridios en estados holoicos y meroicos. Las características del sistema nervioso y vascular son consideradas como valiosas en clasificaciones por arriba del nivel de especie (Blakemore 2006). Las características externas como la forma del cuerpo, el número de los segmentos, la anulación secundaria, la forma y posición del clitelo, el tipo de prostomio, el tipo de quetas y el arreglo de los poros son utilizadas en taxonomía, sin embargo, se les ha concedido menor valor debido a que pueden presentar gran variabilidad aún entre individuos de la misma especie (Blakemore 2007). La pigmentación y la longitud del cuerpo, han sido considerados tradicionalmente como las características de menor valor debido a que son los más adaptativos, es decir, están más sujetos a la acción inmediata del ambiente; sin embargo, recientemente James *et al.* (2010) encontró que la separación de las especies *Lumbricus terrestris* y *L. herculeus* basada en información molecular también es apoyada por las diferencias en la coloración y el tamaño del cuerpo.

### **Aspectos generales de la familia Acanthodrilidae**

El género *Zapotecia* se sitúa dentro de la familia Acanthodrilidae, subfamilia Acanthodrilinae. La ubicación definitiva de este género deberá quedar establecida cuando se realicen los análisis filogenéticos y moleculares para los diferentes géneros de Acanthodrilidae de todas las regiones del mundo (Fragoso 2007, James com. pers. 2011). La familia Acanthodrilidae incluye a las lombrices terrestres caracterizadas por presentar: i) glándulas prostáticas tubulares y poros masculinos independientes de los poros prostáticos en la región de los segmentos 16-20, ii) holonefridios o meronefridios, iii) el último corazón lateroesofágico en el segmento 12 o 13, iv) el canal alimentario comúnmente con mollejas esofágicas (de una a tres) y v) el inicio del intestino ubicado entre los segmentos 14 y 19 (Omodeo 2000, Fragoso 2007). Los acanthodrilidos están

divididos en tres subfamilias: i) Acanthodrilinae, que son lombrices con holonefridios y con o sin glándulas calcíferas, ii) Octochaetinae lombrices con meronefridios y con o sin glándulas calcíferas y iii) Benhamiinae con meronefridios y siempre con glándulas calcíferas en algunos segmentos de la región 14-17 (Csuzdi 1996). Algunos autores no aceptan la existencia de Octochaetinae ni de Benhamiinae, y consideran a los acanthodrilinos como una subfamilia (Acanthodrilinae) dentro de la familia Megascolecidae (Jamieson 2001, Dyne y Jamieson 2004)

La subfamilia Acanthodrilinae presenta especies endémicas en el centro y oeste de Norteamérica, islas del Caribe, México, Centroamérica, sur de Sudamérica, oeste y sur de África, Madagascar, Nueva Zelanda, Australasia, Oceanía, islas del Océano Sur y Nueva Caledonia (Omodeo 2000, Blakemore 2006). Es una familia típica de origen gondwánico, aunque su presencia en América del Norte, América Central y el Caribe constituye un problema biogeográfico no completamente resuelto.

### **El género *Zapotecia* Eisen, 1900**

Diagnosis: Tres mollejas en los segmentos 5, 6 y 7. Holonefridios. Dos pares de espermatecas, uno en el segmento 8 y otro en el segmento 9, con divertículo imperfecto. Dos pares de próstatas que se abren en los segmentos 17 y 19. Poros masculinos en el segmento 18. Quetas peniales presentes. Conductos deferentes intraparietales. Glándulas calcíferas ausentes.

Especie tipo: *Zapotecia amecamecae* Eisen, 1900.

Especies. *Zapotecia amecamecae* Eisen, 1900, *Zapotecia keiteli* Michaelsen, 1902, *Zapotecia nova* James, 1993.

Géneros relacionados. Los géneros más parecidos a *Zapotecia* son *Diplocardia* y *Protozapotecia*. Del primero se separa por presentar tres mollejas separadas en lugar de dos fusionadas y los poros protáticos en los segmentos 17 y 19, en lugar de los segmentos 18 y 20. De *Protozapotecia* se separa por presentar tres mollejas separadas en lugar de dos mollejas separadas (James 1993).

Información curatorial de las especies

*Zapotecia amecamecae*. Autor Gustav Eisen 1900. Colector: Albert Koebele. Localidad: Amecamecae, México. Fecha de colecta: agosto 1897. Colección: sin registro. *Typus amissus* (Reynolds y Cook 1976). El tipo probablemente se destruyó durante el gran temblor de San Francisco en 1906 (Brown y Fragoso 2007). Es poco probable que se encuentre material adicional de la colecta de Eisen, pues en la descripción original se menciona un solo individuo (Eisen 1900, p. 206); en el caso de otras especies colectadas por Eisen se han encontrado ejemplares en los museos alemanes, a donde Eisen mandó algunos paratipos (*i.e. Eutrigaster eiseni*, Csuzdi y Zicsi 1991).

*Zapotecia keiteli*. Autor: Wilhelm Michaelsen. Año de descripción: 1903. Colector: G. Keitel. Localidad. Puerto Príncipe, Haití. Fecha de colecta: sin registro. Colección: Museo de Zoología de Hamburgo, Alemania. *Typus amissus* (Reynolds y Cook 1976). Probablemente se destruyó durante el incendio del antiguo Museo de Zoología de Hamburgo ubicado en Steintorwall que ocurrió durante la Segunda Guerra Mundial (Brown y Fragoso 2007).

*Zapotecia nova*. Autor: Samuel W. James. Año de descripción: 2003. Colector: W.R. Murchie. Localidad: Estado de México. Fecha de colecta: octubre de 1962. Colección: Museo Nacional de Historia Natural, Estados Unidos. No. Catálogo: USNM 169143.

#### Distribución geográfica

En México, en la parte oriental del Eje Neovolcánico Transverso (también llamada Faja Volcánica Transmexicana) y en la llanura costera del Golfo norte, abarcando los estados de México, Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Fragoso 1993, 2007; Cervantes 2010), en un gradiente altitudinal que va de los 100 a los 3000 msnm, entre los paralelos 18° 30' y 21° 30' de latitud norte y los meridianos 96° 30' y 99° 00' de longitud oeste. Dos de las tres especies que componen el género ocurren en este país: *Z. amecamecae* y *Z. nova*. El género (*Z. keiteli*) también se distribuye en Cuba (en la provincia de Cienfuegos, Rodríguez 2004) y en Haití (Michaelsen 1903, Puerto Príncipe) con tan solo un registro para cada isla. Áreas potenciales de distribución: República Dominicana y en México en los Estados de Hidalgo, Morelos y el Distrito Federal.

### III. OBJETIVOS DEL PROYECTO

#### Objetivo general:

Efectuar la revisión del género *Zapotecia* en México.

#### Objetivos particulares:

- i. Establecer las relaciones filogenéticas de las especies del género *Zapotecia* presentes en México con base en caracteres moleculares (gen citocromo c oxidasa subunidad I) y mapeo de caracteres morfológicos.
- ii. Analizar en detalle la distribución geográfica del género *Zapotecia* en México.

### IV. HIPÓTESIS

**Justificación 1:** La distribución geográfica actual de un grupo es el resultado de tres parámetros: el origen de los fundadores, su capacidad migratoria y su habilidad para sobrevivir (Bouché 1983). Considerando que i) la distribución del género *Zapotecia* coincide con el patrón neártico de la Zona de Transición Mexicana, que incluye taxa generalmente asociados con hábitats montañosos al norte del Istmo de Tehuantepec emparentados con grupos provenientes de Estados Unidos o Canadá; ii) los géneros *Zapotecia* y *Protozapotecia* probablemente se originaron de un ancestro proveniente de Norteamérica con dos mollejas, como el actual género *Diplocardia* (Fragoso 1993; Rodríguez 2004) y iii) que las lombrices endogeas tienen una baja capacidad migratoria (Bouché 1983); se puede suponer que el género *Zapotecia* se originó en las montañas del Eje Neovolcánico Transverso y posteriormente se dispersó a las tierras bajas del Golfo de México. En consecuencia la primera hipótesis establece que:

**H1: Las especies primitivas se situarán en las montañas del Faja Volcánica Transmexicana y las derivadas en las tierras bajas tropicales del Golfo de México.**

**Justificación 2 y 3:** En general se considera que la posición del último corazón es un carácter constante a nivel intraespecífico. Ljungström (1971) considera que en la superfamilia Megascolecoidea, la adquisición de corazones adicionales posteriores es una

condición apomórfica. Dyne y Jamieson (2004) al hacer una comparación entre los géneros *Diploptrema* y *Microscolex* también establecen como condición plesiomórfica la ubicación del último par de corazones en 12 y apomórfica en 13. Fragoso (1993) también considera que las especies mexicanas de *Ramiellona* ubicadas al norte del Istmo de Tehuantepec (con corazones en 13) se originaron de las del sur (corazones en 12). Tomando todo esto en consideración, la segunda y tercera hipótesis establecen:

**H2: Todas las poblaciones con corazones en 13 se ubicarán en un clado diferente de las poblaciones con corazones en 12.**

**H3: El análisis filogenético colocará en los clados basales a las especies con corazones en 12 y en los clados más derivados a las especies con corazones en 13.**

## V. METODOLOGÍA

### Muestreo

Se efectuó un muestreo cualitativo durante la temporada de lluvias (julio-octubre) del año 2011, en 41 sitios distribuidos en seis estados del país: Hidalgo, San Luis Potosí, Puebla, Veracruz y Estado de México, con la finalidad de definir con mayor exactitud el área de distribución geográfica de *Zapotecia* y obtener muestras para los análisis moleculares de ADN. El muestreo consistió en la revisión de suelo (0 - 40 centímetros de profundidad) y bajo troncos y bajo piedras, sin hacer referencia a un área dada, tiempo de búsqueda o distancia entre búsquedas.

### Colecta y preservación del material

Las lombrices fueron colectadas manualmente. Previo a su fijación, los individuos fueron anestesiados hasta su total relajamiento por medio de inmersión en agua a la que se adicionó lentamente etanol al 10% (Righi 1979). Para la obtención de muestras de ADN se extrajeron de los ejemplares vivos muestras de tejido muscular (diámetro 3mm) de la parte posterior del cuerpo y se preservaron en etanol al 96% siguiendo las especificaciones del internacional Barcode Of Life project (iBOL). Posterior a la obtención de muestras de ADN los ejemplares fueron preservados en formol al 4% para la

identificación morfológica. La solución de formol fue renovada periódicamente debido a que los líquidos del cuerpo enturbian la solución conservadora. Todo el material colectado se depositó en la colección de lombrices de tierra del Instituto de Ecología A.C. (IEOL).

### **Identificación morfológica**

Los ejemplares pertenecientes a especies de los géneros de la *Zapotecia*, *Protozapotecia*, *Diplocardia*, *Lavello-drilus* (subfamilia Acanthodrilinae) y *Zapatadrilus* (subfamilia Octochaetinae) fueron identificados con base en las descripciones de Eisen (1900), Michaelsen (1902), Gates (1977), Fragoso (1988), James (1993) y Zicsi y Csuzdi (1991). La identidad de los ejemplares fue corroborada por el Dr. Carlos Fragoso.

### **Obtención de secuencias de ADN del gen citocromo c oxidasa subunidad I**

Las muestras de tejido fueron procesadas y analizadas en el Canadian Centre for DNA Barcoding, Biodiversity Institute of Ontario (CCDB). Los procesos se efectuaron de acuerdo al protocolo del international Barcode Of Life Project. Las secuencias de ADN del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI, 648 pb) fueron generadas como parte del proyecto Earthworms of México (EWMEX) del international Barcode Of Life Project. Los taxa muestreados y la descripción de los sitios de colecta se presentan en el Cuadro 1.

### **Análisis filogenético**

Con la finalidad de establecer las relaciones filogenéticas de las especies del género *Zapotecia* y de esclarecer si las especies presentes en México son especies filogenéticamente válidas, se efectuó un análisis filogenético usando las secuencias del COI. La matriz se construyó empleando como taxa a los individuos colectados de cada población e identificados como *Zapotecia*. Como grupos externos se seleccionaron a los géneros acanthodrilinos *Protozapotecia*, *Diplocardia* y *Lavello-drilus* y al género octochaetino *Zapatadrilus*.

Las secuencias de ADN fueron alineadas de manera automática en el programa Clustal X y corregidas manualmente en MEGA 5 (Tamura et al. 2011). El modelo de evolución del



gen COI fue seleccionado en el programa jModeltest v0.1.1 (Posada 2008) usando el criterio de información de Akaike; el modelo elegido fue el TPM3uf+I+G (tasa: AC=0.5341, AG=6.7232, AT=1.0000, CG=0.5341, CT=6.7232, GT=1.0000, p-inv = 0.5940, forma de gamma = 1.4070). La filogenia se determinó mediante los métodos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud. El análisis bayesiano se realizó en el programa Mr Bayes utilizando un algoritmo de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). El análisis bayesiano tuvo dos corridas simultáneas de 10 millones de generaciones con cuatro cadenas para cada corrida y árboles muestreados cada 100 generaciones y se eliminó el 10% de los árboles de las corridas. Se determinó que el número de generaciones de las corridas (10 millones) era el adecuado ya que el valor de la desviación estándar de las frecuencias fue menor a 0.01. La estabilidad de las corridas y convergencia entre éstas fue verificada en usando Tracer 1.5 (Rambaut y Drummond 2009). El análisis de máxima verosimilitud se efectuó en el programa RAxML 7.2.6 (Stamatakis 2006) usando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR gamma con 1000 réplicas bootstrap de árboles generados al azar.

### **Estimación de los tiempos de divergencia**

Para estimar los tiempos de divergencia se utilizó BEAST v1.6.2 (Drummond y Rambaut 2007) mediante calibración secundaria empleando la tasa de sustitución conocida para las lombrices de tierra del gen COI, equivalente a 2.4% por sitio por millón de años (Chang y James 2011). Los parámetros utilizados fueron: modelo de reloj relajado no correlacionado lognormal (tasa 0.024), modelo de sustitución de nucleótidos GTR, frecuencias base estimadas, modelo de heterogeneidad de sitios gama + sitios invariables, árbol prior proceso de especiación Yule. Las distribuciones prior de los parámetros del modelo fueron AC (valor inicial=0.5341), AG (valor inicial=6.7232), AT (valor inicial=1.0000), CG (valor inicial=0.5341), GT (valor inicial=1.0000), forma de gamma (1.4070), proporción de sitios invariables (0.5941), tasa de nacimiento Yule (exponencial, valor inicial=1, media=1) y altura de la raíz del árbol usando árbol prior. Se efectuaron tres corridas de 100 millones de generaciones con muestreo de los árboles y parámetros cada

1000 generaciones. Los archivos obtenidos como resultado de las tres corridas fueron examinados usando Tracer 1.5 (Rambaut y Drummond 2009) para verificar que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad. La convergencia entre corridas fue confirmada por comparación de los valores de probabilidad posterior entre corridas. Las tres corridas se combinaron y los tiempos de divergencia se colocaron en los árboles con LogCombiner v1.6.1 (Drummond y Rambaut 2007). El análisis de BEAST v1.6.2 (Drummond y Rambaut 2007) se realizó en CIPRES Science Gateway (Miller *et al.* 2010).

### **Distancias genéticas**

Se elaboró una matriz de distancias genéticas promedio de las especies del género *Zapotecia* en el programa Phylip 3.69 (Felsenstein 2009) empleando el modelo de Kimura de dos parámetros.

### **Mapeo de caracteres morfológicos**

Los caracteres morfológicos se obtuvieron mediante la revisión de los ejemplares depositados en la colección de lombrices de tierra del Instituto de Ecología A.C. (IEOL), de los ejemplares colectados mediante el muestreo, y de la revisión bibliográfica que contuvo información taxonómica relevante sobre el grupo de estudio. La proyección de los caracteres morfológicos sobre el árbol filogenético de caracteres moleculares fue realizada en el programa Mesquite (Maddison y Maddison 2011).

### **Delimitación de especies**

Las especies del género *Zapotecia* fueron delimitadas con base en la filogenia molecular, el mapeo de caracteres morfológicos y las distancias genéticas. Para este último criterio se consideraron como especies diferentes a aquellas con porcentajes de divergencia mayores a 15% con base en lo sustentado por Decaëns *et al.* (2013).

## Patrones biogeográficos

Se analizó la distribución geográfica de los taxa a partir de los resultados del análisis filogenético y de la estimación de los tiempos de divergencia; para esto se sustituyó el nombre de cada taxa por el nombre de la región biogeográfica en donde se distribuyeron. De esta forma se considera que las áreas que aparecen basales en la filogenia corresponden a las áreas ancestrales, mientras que las áreas apicales corresponderían a sitios de reciente invasión.

## VI. RESULTADOS

### Análisis filogenético, edades absolutas de los clados e implicaciones biogeográficas

Los árboles obtenidos de los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud del gen COI (648 pb) presentaron la misma topología, sin embargo, solo en la filogenia obtenida por el método bayesiano se obtuvo un gran soporte en la mayoría de los clados con valores de probabilidad posterior oscilando entre 0.8 y 1.0 (Fig. 1).

El análisis filogenético sitúa al género *Protozapotecia* dentro del género *Zapotecia*, lo que es apoyado por los altos valores de probabilidad posterior (Fig.1). Esto sugiere que el género *Protozapotecia* debería ser reacomodado dentro *Zapotecia* a pesar de que estos géneros difieren entre sí por el número de mollejas (dos y tres, respectivamente) y la posición de los poros prostáticos (segmentos 17 y 19 ó 18 y 20 en *Protozapotecia*; y en los segmentos 17 y 19 en *Zapotecia*).

Las especies morfológicas corresponden a siete grupos naturales: *Z. amecamecae*, *Zapotecia aff. keiteli*, *Z. australis* (*P. australis*), *Z. nova*, *Zapotecia* sp. nov. 1, *Zapotecia* sp. nov. 2, *Zapotecia* sp. nov. 3.

De acuerdo a la topología del árbol filogenético y los tiempos de divergencia estimados, el ancestro de los géneros *Diplocardia*, *Lavellodrilus* y *Zapotecia* se originó hace 12.9 millones de años (Mioceno medio, Serravaliano). Por otra parte, el ancestro común más reciente (MRCA por sus siglas en inglés) del género *Zapotecia* surgió hace 9.9 millones de años (Mioceno tardío, Tortiano). Durante este tiempo ya se habían formado las crestas mexicanas (las sierras Madre Oriental, Occidental y del Sur) y la planicie costera

del Golfo de México estaba cubierta de arenas desde Texas hasta el sur de Veracruz (Padilla y Sánchez 2007). En las grandes llanuras los pastos dominaban el paisaje con bosques reducidos a los cursos de agua y zonas húmedas. En las regiones más húmedas como el este de Norteamérica los bosques eran dominantes. La separación del género *Zapotecia* en dos grandes grupos puede explicarse por el tipo de ambiente en el que se establecieron. El primer grupo se distribuyó de manera exclusiva en las sabanas y selvas tropicales (nodo C, Figura 2) mientras que el segundo grupo tanto en los bosques húmedos de las crestas montañosas como en las zonas tropicales (nodo B).

La primera sección del Eje Neovolcánico Transverso que emergió fue la parte occidental durante el Plioceno (5.3-2.5 Ma); posteriormente en el Pleistoceno-Holoceno (1.8 Ma) surgieron en dirección este-sureste las formaciones volcánicas más altas de Norteamérica: Iztaccihuatl, Malinche, Citlaltepetl y Popocatepetl (Cadoux *et al.* 2011). Considerando que : i) los tiempos de divergencia indican que el género *Zapotecia* apareció antes que el Faja Volcánica Transmexicana; y que ii) la especie más antigua de este género (*Zapotecia aff. keiteli*) habita en el Golfo de México (Cuadro 3), no podemos afirmar que el origen del género *Zapotecia* se debe a la formación de esta cadena montañosa y por tanto, se rechaza la hipótesis 1 (*Las especies primitivas se situarán en las montañas del Faja Volcánica Transmexicana y las derivadas en las tierras bajas tropicales del Golfo de México*).

El análisis filogenético colocó en un mismo clado (nodo B) tanto a las especies con corazones en 12 como a las especies con corazones en 13, por lo que la hipótesis 2 (*Todas las poblaciones con corazones en 13 se ubicarán en un clado diferente de las poblaciones con corazones en 12*) es rechazada.

La estimación de los tiempos de divergencia de los nodos y la topología del árbol filogenético permiten el reconocimiento de la posición del último par de corazones lateroesofágicos en el segmento 12 como el carácter plesiomórfico y la posición en 13 como la condición apomórfica (Figs. 3 y 4). Por tanto se acepta con reservas la hipótesis 3 "*El análisis filogenético colocará en los clados basales a las especies con corazones en 12 y en los clados más derivados a las especies con corazones en 13*".

**Cuadro 1.** Taxa muestreados y descripción de los sitios de colecta. Las siglas indican la región biogeográfica: FVT= Faja Volcánica Transmexicana y GM= Golfo de México

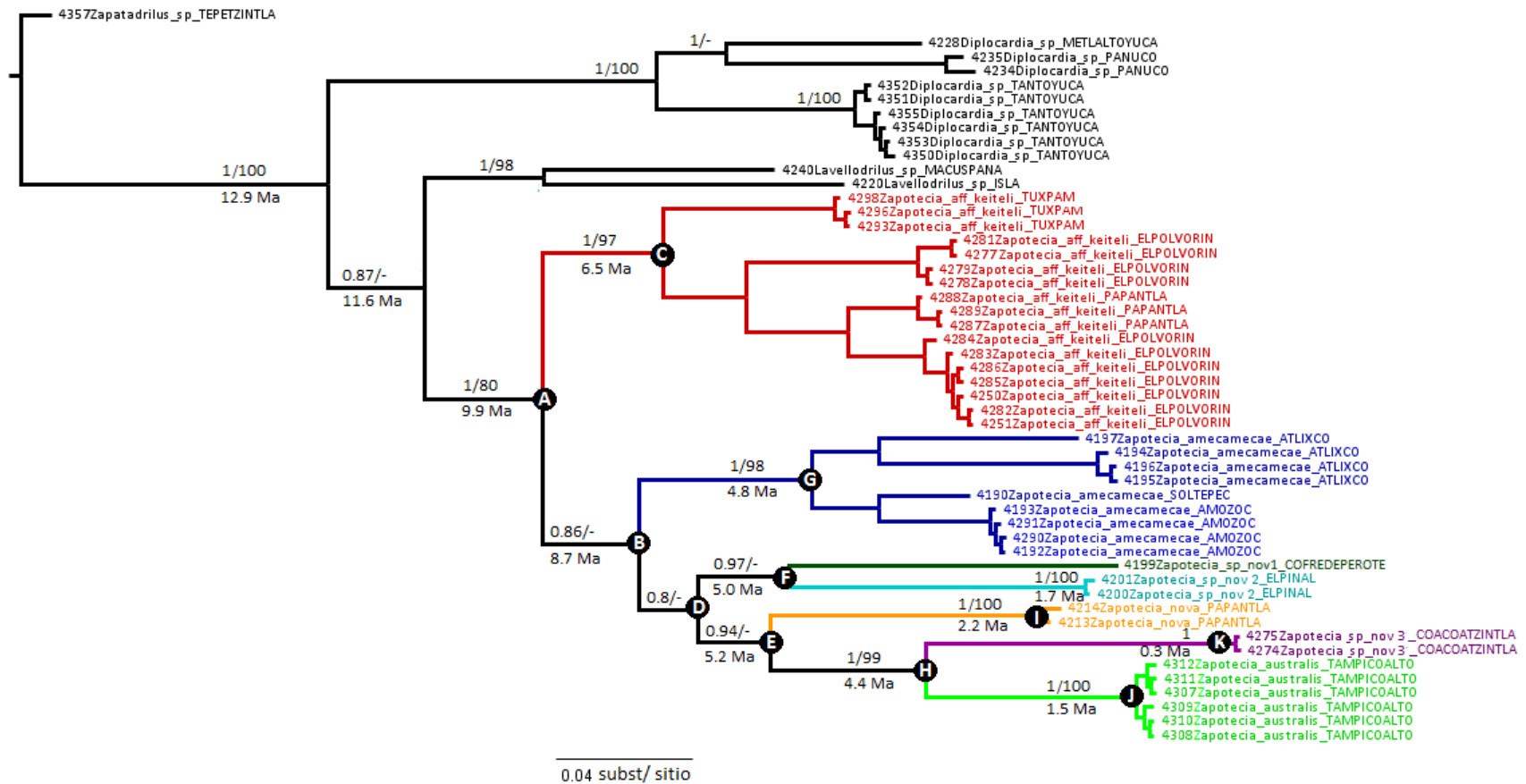
Ejemplar	Especie	Localidad	Estado	Tipo vegetación	Latitud	Longitud	Altitud	Región
IEOL4228	<i>Diplocardia sp.</i>	Metlatoyuca	Puebla	Potrero	20.788889	-97.860389	310	GM
IEOL4234	<i>Diplocardia sp.</i>	Pánuco	Veracruz	Solar con arboles	22.095583	-98.156361	30	GM
IEOL4235	<i>Diplocardia sp.</i>	Pánuco	Veracruz	Solar con arboles	22.095583	-98.156361	30	GM
IEOL4350	<i>Diplocardia sp.</i>	Tantoyuca	Veracruz	Potrero	21.119611	-98.169194	90	GM
IEOL4351	<i>Diplocardia sp.</i>	Tantoyuca	Veracruz	Potrero	21.119611	-98.169194	90	GM
IEOL4352	<i>Diplocardia sp.</i>	Tantoyuca	Veracruz	Potrero	21.119611	-98.169194	90	GM
IEOL4353	<i>Diplocardia sp.</i>	Tantoyuca	Veracruz	Potrero	21.119611	-98.169194	90	GM
IEOL4354	<i>Diplocardia sp.</i>	Tantoyuca	Veracruz	Potrero	21.119611	-98.169194	90	GM
IEOL4355	<i>Diplocardia sp.</i>	Tantoyuca	Veracruz	Potrero	21.119611	-98.169194	90	GM
IEOL4220	<i>Lavellodrilus sp.</i>	Isla	Veracruz	Solar con arboles	18.090936	-95.58975	10	GM
IEOL4240	<i>Lavellodrilus sp.</i>	Macuspana	Tabasco	Solar con arboles	17.621694	-92.473639	30	GM
IEOL-4357	<i>Zapatadrilus sp. 1</i>	Tepetzintla	Veracruz	Selva mediana	21.161194	-97.871139	321	GM
IEOL4190	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Soltepec	Puebla	Bosque pino-encino	19.068833	-97.692444	2430	FVT
IEOL4192	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Amozoc	Puebla	Pastizal con pinos	19.151194	-97.979861	2723	FVT
IEOL4193	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Amozoc	Puebla	Pastizal con pinos	19.151194	-97.979861	2723	FVT
IEOL4194	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Atlixco	Puebla	Bosque pino	18.968806	-98.558139	2507	FVT
IEOL4195	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Atlixco	Puebla	Bosque pino	18.983083	-98.570139	2765	FVT
IEOL4196	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Atlixco	Puebla	Bosque pino	18.983083	-98.570139	2765	FVT
IEOL4197	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Huamantla	Puebla	Bosque pino	19.285667	-98.040417	3043	FVT
IEOL4290	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Amozoc	Puebla	Pastizal con pinos	19.151194	-97.979861	2723	FVT
IEOL4291	<i>Zapotecia amecamecae</i>	Amozoc	Puebla	Pastizal con pinos	19.151194	-97.979861	2723	FVT
IEOL4250	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal introducido	20.856953	-97.469347	10	GM
IEOL4251	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal introducido	20.856953	-97.469347	10	GM
IEOL4281	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal nativo	20.857556	-97.469750	28	GM
IEOL4282	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal introducido	20.857556	-97.469750	28	GM
IEOL4283	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal introducido	20.857556	-97.469750	28	GM
IEOL4284	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal introducido	20.857556	-97.469750	28	GM
IEOL4285	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal introducido	20.857556	-97.469750	28	GM
IEOL4286	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal introducido	20.857556	-97.469750	28	GM
IEOL4287	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Papantla	Veracruz	Potrero	20.400917	-97.451861	143	GM
IEOL4288	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Papantla	Veracruz	Potrero	20.400917	-97.451861	143	GM
IEOL4289	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Papantla	Veracruz	Potrero	20.400917	-97.451861	143	GM
IEOL4278	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal nativo	20.857556	-97.469750	28	GM
IEOL4279	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Pastizal nativo	20.857556	-97.469750	28	GM
IEOL4293	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Selva mediana	21.022944	-97.572500	56	GM
IEOL4296	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Selva mediana	21.022944	-97.572500	56	GM
IEOL4298	<i>Zapotecia aff. keiteli</i>	Tuxpan	Veracruz	Selva mediana	21.022944	-97.572500	56	GM
IEOL4213	<i>Zapotecia nova</i>	Papantla	Veracruz	Selva mediana	22.095583	-98.156361	30	GM
IEOL4214	<i>Zapotecia nova</i>	Papantla	Veracruz	Selva mediana	22.095583	-98.156361	30	GM
IEOL4199	<i>Zapotecia (Protozapotecia) sp. nov. 1</i>	Cofre Perote	Veracruz	Bosque oyamel	19.587806	-97.158306	3475	FVT
IEOL4200	<i>Zapotecia (Protozapotecia) sp. nov. 2</i>	Acajete	Puebla	Bosque oyamel	19.159722	-97.913889	2910	FVT
IEOL4201	<i>Zapotecia (Protozapotecia) sp. nov. 2</i>	Acajete	Puebla	Bosque oyamel	19.159722	-97.913889	2910	FVT
IEOL4275	<i>Zapotecia sp. nov. 3</i>	Coacoatzintla	Veracruz	Potrero	19.668972	-96.900389	1615	FVT
IEOL4307	<i>Zapotecia (Protozapotecia) australis</i>	Tampico Alto	Veracruz	Selva mediana	22.003806	-97.777417	30	GM
IEOL4308	<i>Zapotecia (Protozapotecia) australis</i>	Tampico Alto	Veracruz	Selva mediana	22.003806	-97.777417	30	GM
IEOL4309	<i>Zapotecia (Protozapotecia) australis</i>	Tampico Alto	Veracruz	Selva mediana	22.003806	-97.777417	30	GM
IEOL4310	<i>Zapotecia (Protozapotecia) australis</i>	Tampico Alto	Veracruz	Selva mediana	22.003806	-97.777417	30	GM
IEOL4311	<i>Zapotecia (Protozapotecia) australis</i>	Tampico Alto	Veracruz	Selva mediana	22.003806	-97.777417	30	GM
IEOL4312	<i>Zapotecia (Protozapotecia) australis</i>	Tampico Alto	Veracruz	Selva mediana	22.003806	-97.777417	30	GM

**Cuadro 2.** Matriz de distancias genéticas promedio del género *Zapotecia* de acuerdo con el modelo Kimura de dos parámetros (los valores están expresados en porcentaje). Los números de la diagonal principal corresponden a las distancias intraespecíficas y los restantes a las distancias interespecíficas.

	<i>Zapotecia amecamecae</i>	<i>Zapotecia aff. Keiteli</i>	<i>Zapotecia australis</i>	<i>Zapotecia nova</i>	<i>Zapotecia sp. nov. 1</i>	<i>Zapotecia sp. nov. 2</i>	<i>Zapotecia sp. nov. 3</i>
<i>Zapotecia amecamecae</i>	10.08	17.54	18.71	18.90	18.49	18.64	20.73
<i>Zapotecia aff. Keiteli</i>	17.54	8.51	20.54	18.37	20.05	20.02	18.67
<i>Zapotecia australis</i>	18.71	20.54	0.22	17.58	20.74	20.21	15.21
<i>Zapotecia nova</i>	18.90	18.37	17.58	0.30	18.31	17.30	19.88
<i>Zapotecia sp. nov. 1</i>	18.49	20.05	20.74	18.31	0	18.40	21.00
<i>Zapotecia sp. nov. 2</i>	18.64	20.02	20.21	17.30	18.40	0.15	20.85
<i>Zapotecia sp. nov. 3</i>	20.73	18.67	15.21	19.88	21.30	20.85	0

**Cuadro 3.** Edades de las especies del género *Zapotecia*.

Especie	Región biogeográfica	Edad (millones de años)
<i>Zapotecia aff keiteli</i>	Golfo de México	6.5
<i>Zapotecia sp. nov. 1</i>	Faja Volcánica Transmexicana	5.0
<i>Zapotecia amecamecae</i>	Faja Volcánica Transmexicana	4.8
<i>Zapotecia nova</i>	Golfo de México	2.2
<i>Zapotecia australis</i>	Golfo de México	1.5
<i>Zapotecia sp. nov. 3</i>	Faja Volcánica Transmexicana	0.3
<i>Zapotecia sp. nov. 2</i>	Faja Volcánica Transmexicana	0.4



**Figura 1.** Relaciones filogenéticas de las especies mexicanas del género *Zapotecia*. Filograma obtenido del análisis bayesiano de secuencias del gen citocromo c oxidasa subunidad I realizado en BEAST. Los nombres de los nodos son indicados por letras sobre círculos. Los números sobre los nodos indican los valores de probabilidad posterior del análisis bayesiano de MrBayes, seguidos por los valores de bootstrap del análisis de máxima verosimilitud de RAxML. Los valores menores a 0.8 se representan con el símbolo de guión. Los números debajo de los nodos indican la edad absoluta de los clados del análisis con reloj relajado en BEAST. La longitud de las ramas es proporcional al número esperado de sustituciones por sitio.

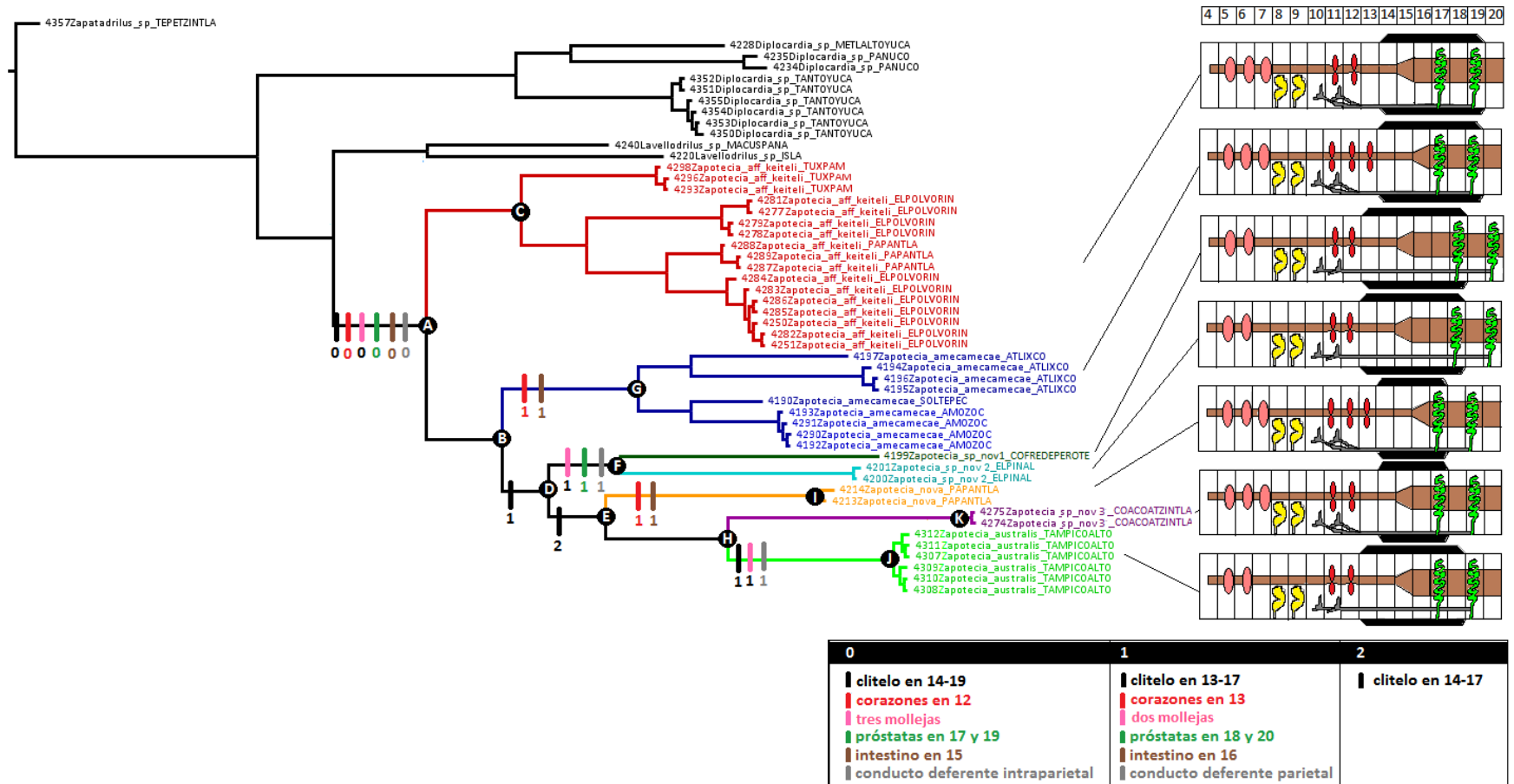


Figura 2. Proyección de los caracteres morfológicos informativos sobre el árbol filogenético bayesiano de secuencias del gen citocromo c oxidasa subunidad I.



## **Redefinición del género *Zapotecia* EISEN 1900**

La redefinición del género *Zapotecia* y la delimitación de especies que integran este género se realizaron con base en los resultados de los análisis filogenéticos del gen COI, en las distancias genéticas y en el mapeo de caracteres morfológicos sobre el árbol. El género *Zapotecia* deberá incluir a las lombrices de tierra caracterizadas por presentar dos o tres mollejas esofágicas en los segmentos 5 y 6 ó 5, 6 y 7, **separadas siempre por septos musculares**, glándulas calcíferas ausentes, poros prostáticos en 17 y 19 ó en 18 y 20, arreglo genital acanthodrilino y holonefridios. El género *Zapotecia* se diferencia del género *Zapatadrilus* por presentar holonefridios en lugar de meronefridios y del género *Diplocardia* por presentar muscularizado el septo que separa a las mollejas. En *Diplocardia* el septo 5/6 es muy delgado y membranoso, dando la apariencia de que las mollejas de los segmentos 5 y 6 están fusionadas como una única molleja.

## **Diagnosis de las especies del Género *Zapotecia***

Familia Acanthodrilidae Clauss 1880

Subfamilia Acanthodrilinae

Género *Zapotecia* Eisen, 1900

### ***Zapotecia amecamecae* Eisen, 1900**

Características externas: Longitud: 130-170 mm. Diámetro: 8 mm. Prostomio: epilóbico. Coloración: rosada en los primeros segmentos, después sin color. Quetas: cercanamente pareadas a todo lo largo, ocho por segmento. Primer poro dorsal en 11/12. Poros femeninos en 14. Poros prostáticos en 17 y 19. Poros masculinos en 18. Poros espermatecales en 7/8 y 8/9. Clitelo: de 14 a 19, en forma de silla de montar. Marcas genitales: presentes en forma labial, ausentes de forma circular, lenticular y de moño. Engrosamiento de los últimos segmentos: ausente.

Características internas: Mollejas: tres, separadas por septos musculares, la primera en 5, la segunda en 6 y la tercera en 7. Glándulas calcíferas: ausentes. Inicio del intestino en 15/16. Tiflosol: ausente. Surco ventral intestinal: ausente. Holonefridios. Próstatas:

tubulares en 17 y 19. Conducto deferente: intraparietal. Ovarios en 13. Espermatecas: dos pares, el primero en 8 y el segundo en 9. Últimos corazones lateroesofágicos en 13.

Categoría ecológica: endogea.

Material examinado: (1) **Puebla**. Mpio. Amozoc. Autopista Puebla-Perote km 14+220. Pastizal. Coordenadas N19.151194, W97.979861, Altitud 2723 msnm. Julio 30, 2008 (Col. G. Cervantes). Julio 01, 2011. Col. G. Cervantes. (2) **Puebla**. Mpio. Atlixco. San Pedro Benito Juárez. Bosque de encino. Coordenadas N18.983086, W98.570139, Altitud 2765 msnm. Septiembre 02, 2009 Cols. C. Fragoso y G. Cervantes. (3) **Puebla**. Mpio. Soltepec. El Seco. Bosque de encino. Coordenadas N19.068833 W97.692444 Altitud 2430 msnm. Octubre 26, 2006 (Col. C. Fragoso). (4) **Tlaxcala**. Mpio. Huamantla. La Malinche. Bosque de pino. Coordenadas N19.285667 W98.040417 Altitud 3043 msnm. Septiembre 01, 2009 Cols. C. Fragoso y G. Cervantes.

### ***Zapotecia aff. keiteli* Michaelsen, 1902**

Características externas: Longitud: 75-170. Diámetro: 4-6. Prostomio: prolóbico. Coloración: rosada en los primeros segmentos y después sin color o ausente. Quetas: cercanamente pareadas a todo lo largo, ocho por segmento. Primer poro dorsal en 9/10, 10/11 (Rancho El polvorín) ó 11/12. Poros femeninos en 14. Poros prostáticos en 17 y 19. Poros masculinos en 18. Poros espermatecales en 7/8 y 8/9. Clitelo: de 14 a 19, en forma de silla de montar. Marcas genitales: presentes de forma labial y circular, ausentes de forma lenticular. Engrosamiento de los últimos segmentos: ausente.

Características internas: Mollejas: tres, separadas por septos musculares, la primera en 5, la segunda en 6 y la tercera en 7. Glándulas calcíferas ausentes. Lamelas esofágicas presentes. Inicio del intestino: en 15 o en 16. Tiflosol: ausente. Surco ventral intestinal: ausente. Holonefridios. Próstatas tubulares en 17 y 19. Conducto deferente: intraparietal. Ovarios en 13. Espermatecas: dos pares, el primero en 8 y el segundo en 9. Últimos corazones lateroesofágicos: en 12.

Categoría ecológica: endogea.

Material examinado: (1) **Veracruz**. Mpio. Tuxpan. 16 km después del Libramiento de Tuxpan. Bosque tropical perennifolio. Coordenadas N21.022944 W97.5725. Altitud 56 msnm. Octubre 05, 2011. Cols. G. Cervantes y A. Ángeles. (2) **Veracruz**. Mpio. Tuxpan. Rancho el polvorín. Pastizal nativo. Coordenadas N20.857556 W97.46975. Altitud 28 msnm. Octubre 06, 2011. Cols. G. Cervantes y A. Ángeles. (3) **Veracruz**. Mpio. Tuxpan. Rancho el polvorín. Pastizal introducido. Coordenadas N20.857556 W97.46975. Altitud 28 msnm. Noviembre 24, 2006. Col. A. Ángeles. Octubre 06, 2011. Cols. G. Cervantes y A. Ángeles. (4) **Veracruz**. Mpio. Papantla. Plan de Hidalgo. Pastizal. Coordenadas N20.400917, W97.451861, Altitud 143 msnm. Octubre 07, 2011. Cols. G. Cervantes y A. Ángeles.

### ***Zapotecia australis* (James, 1993)**

Características externas: Longitud: 50-75 mm. Diámetro: 2 mm. Prostomio: epilóbico. Coloración: ausente. Quetas: cercanamente pareadas a todo lo largo, ocho por segmento. Primer poro dorsal en 6/7. Poros femeninos en 14. Poros prostáticos en 17 y 19. Poros masculinos en 18. Poros espermatecales en 7/8 y 8/9. Clitelo: de 13 a 18, en forma de silla de montar. Marcas genitales: presentes de forma circular en 10/11, ausentes de forma lenticular, labial y moño. Engrosamiento de los últimos segmentos: ausente.

Características internas: Mollejas: dos, separadas por septos musculares, la primera en 5 y la segunda en 6. Glándulas calcíferas: ausentes. Inicio del intestino en 15. Tiflosol: laminar de 19 a 45. Surco ventral intestinal ausente. Holonefridios. Próstatas: en 17 y 19. Conducto deferente: parietal. Ovarios en 13. Espermatecas: dos pares, el primero en 8 y el segundo en 9. Últimos corazones lateroesofágicos en 12.

Categoría ecológica: endogea.

Material examinado: (1) **Veracruz**. Mpio. Tampico alto. Ejido kilómetro 80. Selva mediana. N22.003889 W97.7775 Altitud 30 msnm. Septiembre 19, 2008. Cols. C. Fragoso y A. Ángeles.

### ***Zapotecia nova* James, 1993**

Características externas: Longitud: 7-8 mm. Diámetro: 2 mm. Prostomio: invaginado, aparentemente epilóbico. Coloración: ausente. Quetas: cercanamente pareadas con excepción de los últimos segmentos donde son separadas y se presentan en forma de quetas modificadas de mayor tamaño y grosor, ocho por segmento. Primer poro dorsal en 10/11. Poros femeninos en 14. Poros prostáticos en 17 y 19. Poros masculinos en 18. Poros espermatecales en 7/8 y 8/9. Clitelo: de 14 a 17, en forma de silla de montar. Marcas genitales: presentes de forma lenticular y labial en 19/20 y 21/22, ausentes de forma circular y moño. Engrosamiento de los últimos segmentos: presente.

Características internas: Mollejas: tres, separadas por septos musculares, la primera en 5, la segunda en 6 y la tercera en 7. Glándulas calcíferas: ausentes. Inicio del intestino en 16. Tiflosol: laminar de 22 a 50. Surco ventral intestinal: presente de 34 a 54. Holonefridios. Próstatas: tubulares en 17 y 19. Conducto deferente: intraparietal. Ovarios en 13. Espermatecas: dos pares, el primero en 8 y el segundo en 9. Últimos corazones lateroesofágicos en 13.

Notas: El espécimen identificado como *Z. nova* difiere de la descripción de James (1993) en la posición de las marcas genitales (19/20 y 21/22 este estudio; 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 19/20 y 20/21 en James) la disposición de las quetas de los últimos segmentos (separadas y modificadas en este estudio, cercanamente pareadas en la descripción de James). En nuestro ejemplar el diámetro de los últimos segmentos es mayor que el diámetro de los primeros segmentos, mientras que en la descripción de James (1993) no se menciona que el ejemplar presente alguna diferencia en el diámetro de los segmentos entre la parte anterior y posterior del cuerpo; en caso de que el diámetro de los segmentos sea igual a lo largo de todo el cuerpo en el espécimen de James, esta sería otra diferencia respecto al ejemplar de este estudio.

Categoría ecológica: endogea.

Material examinado: (1) **Veracruz**. Mpio. Papantla. Ejido el Álamo. Selva mediana. N22.095583 W98.156361. Altitud 30 msnm. Noviembre 14, 2006. Cols. C. Fragoso y A. Ángeles.

### ***Zapotecia sp. nov. 1***

Características externas: Longitud: 75 mm. Diámetro: 2 mm. Prostomio: epilóbico. Coloración: ausente. Quetas: cercanamente pareadas a todo lo largo, ocho por segmento. Primer poro dorsal en 10/11. Poros femeninos en 14. Poros prostáticos en 18 y 20. Poros masculinos en 18. Poros espermatecales: en 7/8 y 8/9. Clitelo: de 13 a 18, en forma de silla de montar. Marcas genitales: presentes de forma labial en 10/11, 11/12, 12/13, 14/15, 15/16, 16/17, 20/21 y 22/23. Engrosamiento de los últimos segmentos: ausente.

Características internas: Mollejas: dos, separadas por septos musculares, la primera en 5 y la segunda en 6. Glándulas calcíferas: ausentes. Inicio del intestino: en 14/15. Tiflosol: laminar comenzando en 18, pero más evidente a partir de 22. Surco ventral intestinal: ausente. Holonefridios. Próstatas: en 18 y 20. Conducto deferente: parietal. Ovarios en 13. Espermatecas: dos pares, el primero en 8 y el segundo en 9. Últimos corazones lateroesofágicos en 12.

Notas: *Zapotecia sp. nov. 1* difiere de todas las especies del género por presentar las próstatas en 18 y 20. *Zapotecia sp. nov. 1* y *Zapotecia sp. nov. 2* son especies crípticas.

Categoría ecológica: endogea.

Material examinado: (1) **Veracruz**. Mpio. Perote. Cofre de Perote. Camino El Conejo-La Cima. Bosque de oyamel. Coordenadas N19.587806 W97.158306 Altitud 3475 msnm. Junio 24, 2008. Col. C. Fragoso.

### ***Zapotecia sp. nov. 2***

Características externas: Longitud: 75 mm. Diámetro: 2 mm. Prostomio: epilóbico. Coloración: ausente. Quetas: cercanamente pareadas a todo lo largo, ocho por segmento. Primer poro dorsal en 10/11. Poros femeninos en 14. Poros prostáticos en 18 y 20. Poros masculinos en 19. Poros espermatecales: en 7/8 y 8/9. Clitelo: hinchado de 13 a 18, en forma de silla de montar. Marcas genitales: presentes de forma labial en 10/11, 11/12, 12/13, 14/15, 15/16 y 16/17. Engrosamiento de los últimos segmentos: ausente.

Características internas: Mollejas: dos, separadas por septos musculares, la primera en 5 y la segunda en 6. Glándulas calcíferas: ausentes. Inicio del intestino: en 14/15. Tiflosol:

laminar comenzando en 18, pero más evidente a partir de 22. Surco ventral intestinal: ausente. Holonefridios. Próstatas: en 18 y 20. Conducto deferente: parietal. Ovarios en 13. Espermatecas: dos pares, el primero en 8 y el segundo en 9. Últimos corazones lateroesofágicos en 12.

Notas: *Zapotecia* sp. nov. 2 es muy parecida a *Z.* sp. nov 1, y la única diferencia morfológica sería el patrón de marcas genitales. Se puede considerar que *Zapotecia* sp. nov. 2 y *Zapotecia* sp. nov. 1 son especies crípticas.

Categoría ecológica: endogea.

Material examinado: (1) **Puebla**. Mpio. Acajete. El Pinal. Bosque de oyamel. Coordenadas N19.159722 W97.913889 Altitud 2910 msnm. Agosto 20, 2009. Cols. G. Cervantes y A. Ángeles.

### ***Zapotecia* sp. nov. 3**

Características externas: Longitud: 50-75 mm. Diámetro: 2 mm. Prostomio: epilóbico. Coloración: ausente. Quetas: cercanamente pareadas a todo lo largo, ocho por segmento. Primer poro dorsal en 7/8. Poros femeninos en 14. Poros prostáticos en 17 y 19. Poros masculinos en 18. Poros espermatecales en 7/8 y 8/9. Clitelo: hinchado de 14 a 17, en forma de silla de montar. Marcas genitales: presentes de forma circular en 11/12, 19/20 y 20/21 dando la apariencia de un círculo dentro de otro círculo; ausentes de forma lenticular, labial y moño. Engrosamiento de los últimos segmentos: ausente.

Características internas: Mollejas: tres, separadas por septos musculares, la primera en 5, la segunda en 6 y la tercera en 7. Lamelas esofágicas presentes. Glándulas calcíferas ausentes. Inicio del intestino: en 15. Tiflosol: laminar de 19 a 45. Surco ventral intestinal ausente. Holonefridios. Próstatas en 17 y 19. Conducto deferente: intraparietal. Ovarios en 13. Espermatecas: dos pares, el primero en 8 y el segundo en 9. Últimos corazones lateroesofágicos en 12.

Notas: Esta especie se separa de *Zapotecia australis* por tener el clitelo en 14-17 en lugar de 13-18, marcas genitales circulares en 11/12, 19/20 y 20/21 dando apariencia de

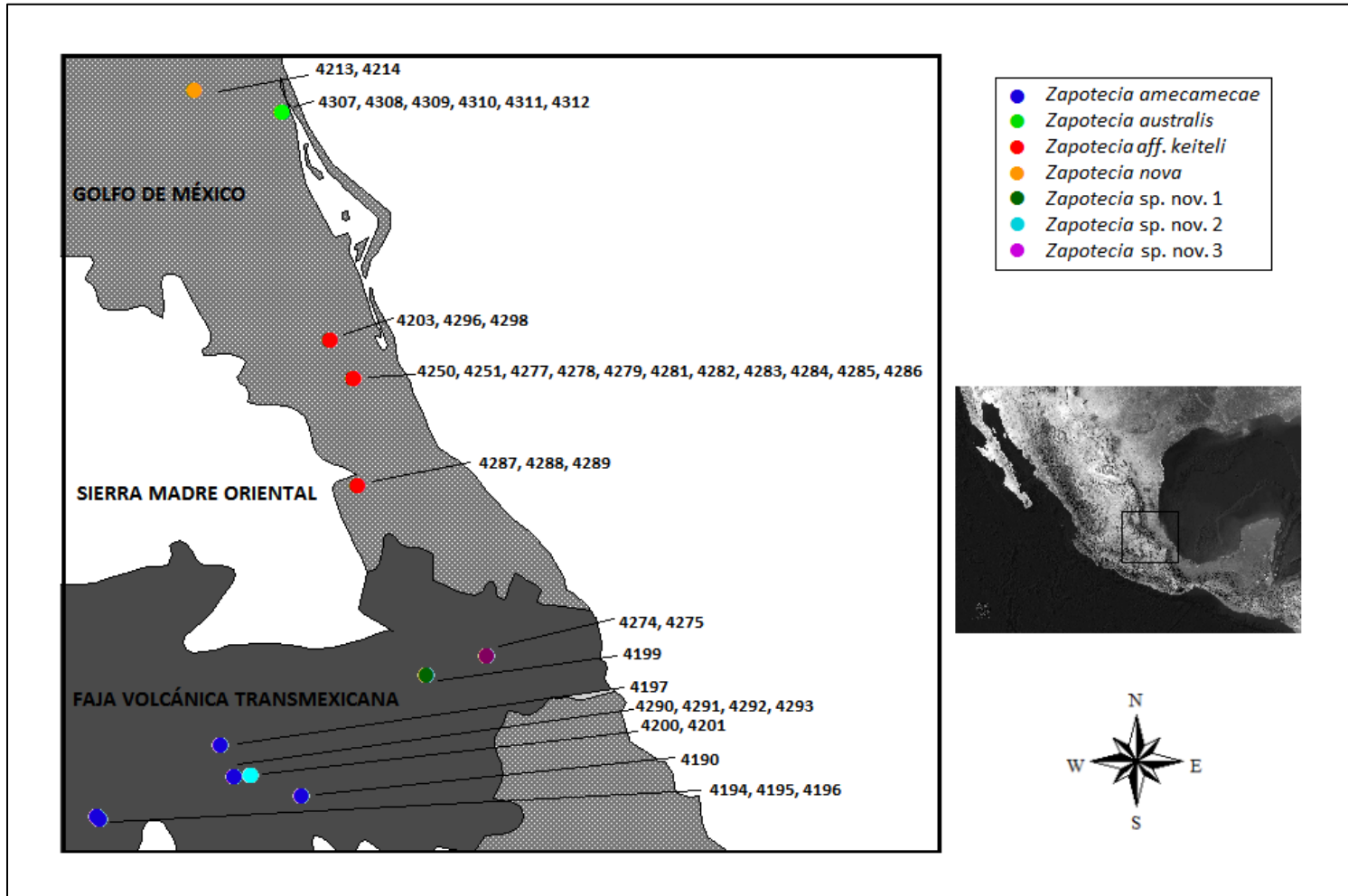
un círculo dentro de otro círculo en lugar de marcas circulares simples en 9, 10/11, tres mollejas en lugar de dos y conducto deferente intraparietal en lugar de parietal.

Categoría ecológica: endogea.

Material examinado: (1) **Veracruz**. Mpio. Coacoatzintla. Dos kilómetros antes de Naolinco. Pastizal. N19.668972 W96.900389. Altitud 1615 msnm. Julio 07, 2011. Cols. G. Cervantes y A. Ángeles.

### **Distribución geográfica actual**

De acuerdo con Fragoso (1993, 2007) y los datos obtenidos de este estudio, el área de distribución del género *Zapotecia* (incluyendo a *Protozapotecia*) comprende dos provincias biogeográficas de México: el Eje Neovolcánico Transverso y las tierras bajas de la porción norte del Golfo de México (Fig. 3). Su distribución se encuentra limitada al oeste por el altiplano y al sur por la depresión del Balsas y el valle de Tehuacán. *Zapotecia* está ausente en la Sierra Madre del Sur y la parte sur del Golfo de México. El género *Zapotecia* se presenta a lo largo de un gran rango altitudinal (que va desde los cero hasta los 3475 msnm) habitando en diversos tipos de vegetación entre los que se incluyen los pastizales tropicales, selvas perenifolias, bosques mesófilos, bosques de encino, pino y oyamel.



**Figura 3.** Mapa de distribución actual del género *Zapotecia* en la zona de estudio. Los números en el mapa corresponden a las claves de los ejemplares mostradas en el cuadro 1.



## VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Chang y James (2011) recomiendan el uso de largas secuencias de ADN (mayores a 2000pb) con una combinación de tres o más genes para obtener filogenias resueltas de lombrices de tierra; sin embargo, en el presente estudio se obtuvo un árbol filogenético completamente resuelto utilizando sólo un fragmento corto de ADN (648 pb) de un solo gen (COI). Esto podría deberse a que el gen utilizado en este estudio (COI) es uno de los más apropiados para análisis a nivel de especies dentro de un género o entre géneros cercanamente relacionados, ya que al evolucionar más rápido presenta la más alta divergencia entre secuencias (Chang y James 2011); sin embargo, serán necesarios otros estudios en los que se incluyan otros genes mitocondriales (16S rRNA) y nucleares (28S y 12S rRNA) para corroborar el reacomodo de *Protozapotecia* dentro de *Zapotecia* y la separación de especies propuesta en este estudio.

El género *Zapotecia* ha sido poco estudiado desde su descripción hace más cien años por Eisen, con tan solo cuatro publicaciones taxonómicas, dos de la cuales ocurrieron hace más de cien años (Eisen 1900, Michaelsen 1903) y las otras dos hace casi veinte años (James 1993 y Zicsi y Csuzdi 1991). Si estos reacomodos se mantienen, el género *Zapotecia* pasaría de tener tres a ocho especies: tres especies previamente descritas (*Z. amecamecae*, *Z. keiteli* y *Z. nova*) dos especies producto del reacomodo del género *Protozapotecia* (*Z. aquilonalis* y *Z. australis*) y tres especies nuevas para la ciencia.

James (1993) describió al género *Protozapotecia* para acomodar a las lombrices acanthodrilinas con dos mollejas en los segmentos 5 y 6 separadas por un septo muscular, holonefridios y glándulas calcíferas ausentes; en la misma publicación el autor menciona que el género *Protozapotecia* está cercanamente relacionado con *Zapotecia*. Los resultados del análisis filogenético con datos moleculares de este estudio, sugieren que *Protozapotecia* no solo está emparentado con *Zapotecia*, sino que para evitar que los dos géneros sean parafiléticos, el primero se debe incluir en el segundo. Al hacer esto automáticamente se infiere que la pérdida de una tercera molleja es un carácter que ha ocurrido varias veces en la historia del grupo y en consecuencia, no es un carácter válido

para la separación de estos géneros. Aunque el número de mollejas es un carácter variable en *Zapotecia s.l.* (*Zapotecia* + *Protozapotecia*), la constante en el grupo es la condición múltiple de las mollejas separadas entre sí por septos musculares (condición que lo diferencia de *Diplocardia*) y la presencia de holonefridios (en lugar de meronefridios como en *Zapatadrilus*).

Aun cuando se trató de encontrar varios caracteres morfológicos que permitieran por sí solos definir al género y delimitar las especies, solamente la separación por septos musculares de las mollejas múltiples en combinación con la presencia de holonefridios avesiculados y próstatas tubulares en arreglo acanthodrilino, aparecen como los caracteres morfológicos exclusivos del género. De hecho en toda la subfamilia Acanthodrilinae solamente dos géneros tienen mollejas múltiples esofágicas, *Diplocardia* y *Zapotecia s.l.* (Fragoso y Rojas 1994). Los caracteres morfológicos que permiten la separación de las especies serían el número de mollejas, el tipo de marcas genitales, el tamaño y el tipo de conducto deferente (parietal en las especies con dos mollejas e intraparietal en las especies con tres mollejas). Entre las características variables a nivel poblacional se encuentran la posición de las marcas genitales (pero nunca la forma), la forma de las quetas peniales y la forma de las espermatecas; esta última es variable incluso dentro de un mismo individuo dependiendo de su posición (lado derecho o izquierdo) o de su ubicación (segmento 8 o 9).

Quizás uno de los resultados más sorprendentes de la filogenia molecular, fue la inclusión en *Zapotecia* de especies con próstatas en los segmentos 18 y 20 provenientes del Cofre de Perote (*Zapotecia* sp. nov. 1) en Veracruz y del Cerro del Pinal (*Zapotecia* sp. nov. 2) en Puebla. La razón por la cual estas dos especies (*Zapotecia* sp. nov. 1 y *Zapotecia* sp. nov. 2) no fueron consideradas dentro de *Diplocardia*, fue por la presencia del septo muscular que separa a las dos mollejas. Si bien este resultado requiere de una confirmación, tanto a nivel molecular (más individuos de ambas poblaciones y más genes) como a nivel biológico, también es cierto que estaría demostrando la ocurrencia de este carácter en diferentes linajes (en *Diplocardia* y en *Zapotecia*). Además estaría indicando la presencia de dos especies crípticas dentro de *Zapotecia* que habitan en condiciones

ambientales similares (vegetación de bosque de oyamel y altitudes superiores a los 2900 msnm), que presentan una alta endemidad, pues cada una se distribuye de manera exclusiva en el pico de una montaña (*Zapotecia* sp. nov. 1 en el Cofre de Perote, Veracruz y *Zapotecia* sp. nov. 2 en el Cerro del Pinal, Puebla) y están separadas geográficamente por una distancia de casi 90 km. Considerando que estas dos especies provienen de la misma especie ancestral (como lo indica el árbol filogenético) podemos suponer que la separación de especies fue causada por eventos vicariantes relacionados con la orogenia del Eje Neovolcánico Transverso, ocurridos en los últimos cinco millones de años.

Asimismo los resultados de la filogenia demuestran que las especies con corazones en 13 (*Z. amecamecae* y *Z. nova*) son más recientes, por lo que se confirma que la adquisición de corazones adicionales posteriores es una condición apomórfica, tal y como había sido sugerido por otros autores (Ljungström 1971, Dyne y Jamieson 2004, Fragoso 1993).

Los ejemplares identificados morfológicamente en este estudio como *Zapotecia aff keiteli* fueron colectados en las tierras bajas del norte del Golfo de México y no en la localidad donde se describió la especie (Puerto Príncipe Haití; Michaelsen 1903); por lo que existe la posibilidad de que estos ejemplares no correspondan genéticamente con los de la localidad del holotipo. Los ejemplares que colectamos difieren de la descripción del material de Michaelsen únicamente por la ausencia de tiflosol en el material de este estudio). Para esclarecer si se trata de la misma especie se requiere de colectas en la zona donde se registró el holotipo, pero considerando que éste fue colectado hace más de cien años y que la vegetación ha disminuido drásticamente en el área, resulta poco probable esclarecer el problema. Otra solución sería buscar individuos de la especie en República Dominicana, ya que es el área más cercana a la zona de descripción y conserva gran parte de su vegetación original.

El material de *Z. nova* de este estudio fue colectado a 200 kilómetros de la localidad del holotipo, y aunque nuestros especímenes son morfológicamente iguales a los de la descripción de James (1993), la distancia geográfica y la diferencia en el tipo de hábitat sugieren que podrían ser especies diferentes (crípticas). Será necesario realizar una

búsqueda intensiva de la especie en la localidad tipo; sin embargo dado que esta localidad se encuentra en el área conurbada del estado de México pegada a la Ciudad de México y que fue colectada hace 50 años, es posible que esta especie haya desaparecido de la zona por la reducción de la vegetación original y el dominio de lombrices exóticas de la familia Lumbricidae.

Cervantes (2010) propuso que la Faja Volcánica Transmexicana fue una barrera geográfica determinante para la separación de los géneros *Zapotecia* y *Diplocardia*, pero los resultados del presente estudio rechazan esta hipótesis ya que los dos géneros surgieron antes de la conformación de este eje montañoso. La separación de especies de *Zapotecia* pudo ser causada por otro tipo de barreras, como climáticas, altitudinales y por el tipo de vegetación.

En 1900 Eisen propuso el subgénero *Naillenia* dentro del género *Diplocardia*, para ubicar a la especie *D. koebeli* (colectada en el estado de Morelos) por tener los poros prostáticos en 17 y 19. De todas las especies de *Diplocardia* que se mencionan en dicho estudio, solo en dos especies (*D. riparia*- colectada en Illinois- y *D. koebeli*) se registró la presencia de un septo en 5/6, aunque en ambos casos delgado. Por tal motivo *D. koebeli* debe pertenecer en realidad al género *Protozapotecia*, tal como lo sugiere Fragoso y Reynolds (1997); y si se acepta nuestra propuesta de unir los géneros *Zapotecia* y *Protozapotecia*, entonces habría que decidir si el nombre válido para el género es *Naillenia* o *Zapotecia*. Considerando que tanto el género *Zapotecia* como el subgénero *Naillenia* fueron propuestos en la misma publicación, habría que decidir si *Naillenia*, por su aparición 8 páginas antes, (página 197) tiene prioridad sobre *Zapotecia* (página 205). Sin embargo el término *Naillenia* nunca ha sido mencionado en ninguna otra publicación, mientras que el nombre *Zapotecia* sí ha sido referido por varios autores (Eisen 1900, Michaelsen 1903, James 1993 y Zicsi y Csuzdi 1991), por lo que, y para evitar mayores confusiones, consideramos más apropiado la utilización de este último nombre.

## VIII. REFERENCIAS

- Blakemore, R. J. 2006. *Cosmopolitan Earthworms, an Eco-Taxonomic Guide to the Peregrine Species of the World*. Ed. 2a. VermEcology, Japan. 600 pp.
- Blakemore, R. J. 2007. An updated list of valid, invalid and synonymous names of Criodriloidea and Lumbricoidea (Annelida: Oligochaeta: Criodrilidae, Sparganophilidae, Ailoscolecidae, Hormogastridae, Lumbricidae, Lutodrilidae). En: Ito, M.T., Kaneko, N. (Eds.), *A Series of Searchable Texts on Earthworm Biodiversity, Ecology and Systematics from Various Regions of the World (Disco Compacto)*. Yokohama University, pp. 1–68
- Bouché, M.B. 1983. Earthworm evolution and distribution patterns. En: Satchell J.E. (Ed) *Earthworm Ecology from Darwin to vermiculture*. Chapman and Hall. 495 pp.
- Briones, M.J.I., P. Morán y D. Posada. 2009. Are the sexual, somatic and genetic characters enough to solve nomenclatural problems in lumbricid taxonomy? *Soil Biology & Biochemistry* 41: 2257–2271
- Brown, G. G y C. Fragoso. 2007. Listado de las especies de lombrices de tierra de América Central (Guatemala, Belice, Honduras, el salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá), las “Guyanas” (Surinam, Guyanne Française, Guyana), Venezuela y Paraguay. En: G. Brown y C. Fragoso (Eds.). *Minhocas na America Latina: biodiversidade e ecología*. Londrina: Embrapa soja, 545 pp.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214. 44. Chang, C. y S. James. 2011. A critique of earthworm molecular phylogenetics. *Pedobiology. Int. J. Soil Biol.* Article in press.
- Cadoux, A., Y. Missenard, R.G. Martinez-Serrano y H. Guillou. 2011. Plio-Quaternary volcanism trench migration on the Trans-Mexican Volcanic Belt: the case of the Sierra Nevada. *Geol Mag*, 148: 492-506.
- Casallas, A. 2012. Filogenia molecular del género *Balanteodrilus* (Annelida: Oligochaeta). Tesis (Maestría). Instituto de Ecología A.C. México.

- Cervantes, G. 2010. Las lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta) de regiones selectas del Estado de Puebla. Tesis (Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Chang, C.H. y S. James. 2011. A critique of earthworm molecular phylogenetics. *Pedobiologia* 54S, S3– S9
- Csuzdi, Cs. 1996. Revision der Unterfamilie Benhamiinae Michaelsen, 1897 (Oligochaeta: Acanthodrilidae). *Mitt. Zool. Mus. Berl.* 72: 347-367.
- Csuzdi, Cs. y A. Zicsi. 1991. Über die Verbreitung neuer und bekannter *Dichogaster* und *Eutrigaster* Arten aus Mittel und Südamerika (Oligochaeta: Octochaetidae). *Regenwürmer aus Südamerika* 15. *Acta Zoologica Hungarica.* 37 (3-4): 177-192.
- Decaëns T., D. Porco, R. Rougerie, G.G. Brown, S.W. James. 2013. Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. *Applied Soil Ecology*, en prensa.
- Dyne G.R. y B.G.M. Jamieson. 2004. Native Earthworms of Australia II (Megascolecidae, Acanthodrilinae). Australian Biological Resources Study. University of Queensland. Australian Government. Department of the environment and heritage. CD monograph.
- Eisen, G. 1900. Researches in American Oligochaeta, with Special Reference to those of the Pacific Coast and Adjacent Islands. *Proceedings of the California Academy of Sciences. Third Series.* 2 (3): 85-276.
- Felsenstein, J. 2009. Phylogeny Inference Package.
- Fragoso, C. 1988. Sistemática y ecología de un género nuevo de lombriz de tierra (Acanthodrilini, Oligochaeta) de la Selva Lacandona, Chiapas, México. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 25: 1-34
- Fragoso, C. 1993. Les peuplements de vers de terre dans l'est et sud-est du Mexique. Tesis (Doctoral). Université Paris 6. Francia.
- Fragoso, C. 2007. Diversidad y patrones biogeográficos de las lombrices de tierra de México (Oligochaeta, Annelida). En: G. Brown y C. Fragoso (Eds). *Minhocas na America Latina: Biodiversidade e Ecología.*

- Fragoso C. y P. Rojas. 1994. Earthworms from southeastern Mexico. New acanthodriline genera and species (Megascolecidae, Oligochaeta). *Megadrilogica*. 6(1): 1-12
- Fragoso, C., S.W. James y S. Borges. 1995. Native earthworms of the North Neotropical Region: current status and controversias. En: P.F. Hendrix (Ed). *Earthworm ecology and Biogeography in North America*. Lewis Publishers. 61-115.
- Gates, G.E. 1977. On some earthworms from north American caves. En: *Studies on the Caves and Cave Fauna of the Yucatan Peninsula*. Association for Mexican Cave Studies. Bulletin 6.
- James, S.W. 1993. New Acanthodrilinae earthworms from Mexico (Oligochaeta: Megascolecidae). *Acta Zool. Mex.* (n.s.) 60: 1-21.
- James, S.W., D. Porco, T. Decaëns, B. Richard, R. Rougerie. 2010. DNA Barcoding Reveals Cryptic Diversity in *Lumbricus terrestris* L., 1758 (Clitellata): Resurrection of *L. herculeus* (Savigny, 1826). *PLoS ONE* 5 (12): e15629.
- Jamieson, B.G.M. 2001. Native Earthworms of Australia (Megascolecidae, Megascolecinae). Supplement, August 2001. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA (Disco compacto).
- Klarica, J., A. Kloss-Brandstätter, M. Traugott y A. Juen. 2012. Comparing four mitochondrial genes in earthworms – Implications for identification, phylogenetics, and discovery of cryptic species. *Soil Biology and Biochemistry*. 45: 23-30
- Ljungström, P. O. 1971. Sistemática de los oligoquetos argentinos. *Asoc. Cien. Nat. Lit.* Nº 2: 39-42.
- Maddison, W.P. y D.R. Maddison. 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>
- Michaelsen, W. 1900. Oligochaeta. In “Das Tierreich”. Friedländer and Sohn. Berlin. 575 pp.
- Michaelsen, W. 1903. Neue Oligochaeten und neue Fundorte alt-bekannter. *Mitt. Mus. Hamburg*. 19: 1-55.

- Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.
- Omodeo, P. 2000. Evolution and biogeography of megadriles (Annelida, Clitellata). Italian Journal of Zoology. 67:2, 179- 201.
- Padilla y Sánchez, R. J. 2007. Evolución geológica del sureste mexicano desde el Mesozoico al presente en el contexto regional del Golfo de México. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, T. LIX (1):19-42.
- Pop, A. A. y M. Wink. 2004. Taxonomía molecular y filogenia de las lombrices de tierra (Oligochaeta, Lumbricidae): 16s rDNA y el gen COI corroboran la taxonomía numérica en el género *Octodrilus* Omodeo, 1956. En: A.G. Moreno y S. Borges (Eds.). Avances en Taxonomía de Lombrices de Tierra.
- Pop, A. A., M. Wink y C. Csuzdi. 2007. Progress in systematics of terrestrial Oligochaeta by using molecular data. En: T. Pavlicek (Ed). Advances in Earthworm Taxonomy III.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution 25: 1253-1256.
- Rambaut, A. y A.J. Drummond. 2009. Tracer: MCMC trace analysis tool. ed. 1.5. Edinburg: Institute of Evolutionary Biology. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Reynolds, J. W y D. G. Cook. 1976. Nomenclatura Oligochaetologica. A catalogue of names, descriptions and types specimens of the oligochaeta. The University of New Brunswick. The Runge Press Ltd. Canada. 217 pp.
- Righi, G. 1979. Introducción al estudio de las lombrices del suelo (Oligoquetos Megadrilos) de la provincia de Santa Fe (Argentina). Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral. 10(2):89-155.
- Rodríguez, C. 2004. Diversity and biogeographical considerations on the earthworms (Annelida: Oligochaeta) of Cuba. En: G. Moreno y S. Borges. Advances in earthworm taxonomy. Editorial Complutense S A. España. 415 pp.
- Ronquist, F. y J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572–1574.



- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Stephenson, J. (1923). "The fauna of British India, including Ceylon and Burma. Oligochaeta." Taylor and Francis. London. Pp. 518.
- Stephenson, J. 1930. *The Oligochaeta*. Clarendon Press, Oxford, 978 pp.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Zicsi, A. y CS. Csuzdi. 1991. Der erste Wiederfund von *Zapotecia amecamecae* Eisen, 1900 aus Mexiko (Oligochaeta: Acanthodrilidae). *Miscellanea Zoologica Hungarica*. Tomus 6, 31-34.