



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Análisis Comparativo de la regeneración de tres poblaciones de planarias  
(Platyhelminthes) del Río Pita y la potencial existencia de dos nuevas especies  
para el género *Girardia***

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias  
Biológicas**

**Camilo Miguel Morán Solís**

**Quito, 2023**

*Dedico este trabajo a mi madre, padre y hermano por apoyarme durante todo mi proceso formativo, a pesar de las dificultades.*

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE ANEXOS.....	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
OBJETIVOS .....	10
Objetivo General.....	10
Objetivos específicos.....	10
METODOLOGÍA.....	11
Área de colecta.....	11
Especímenes .....	11
Mantenimiento en laboratorio.....	12
Supervivencia y regeneración.....	12
Análisis estadístico.....	13
Extracción de ADN.....	14
Secuenciación y alineamiento.....	14
Análisis filogenético .....	15
RESULTADOS .....	15
Morfortipos.....	15
Regeneración.....	15
Análisis en la regeneración de Morfortipos y sus poblaciones .....	17
Supervivencia .....	17
Análisis filogenético .....	18
DISCUSIÓN .....	18
Regeneración.....	18
Supervivencia .....	19
Análisis filogenético .....	21
CONTRIBUCIONES .....	22
AGRADECIMIENTOS .....	23
REFERENCIAS .....	23
FIGURAS.....	28
ANEXOS.....	36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de individuos de morfotipo M1.....	27
Figura 2. Morfología de los individuos de morfotipo M2.....	27
Figura 3. En el morfotipo M1 el proceso de regeneración se completa entre los 3 y 21 días post-amputación.....	28
Figura 4. El morfotipo M2 completa su proceso de regeneración entre los 3 y 21 días post-amputación.....	29
Figura 5. Etapas de regeneración de morfotipos M1 y M2 a diferentes temperaturas.....	30
Figura 6. Comparativa de las poblaciones de morfotipo M1 en los ensayos de regeneración en diferentes temperaturas.....	31
Figura 7. Comparativa de las poblaciones de morfotipo M2 en los ensayos de regeneración en diferentes temperaturas.....	32
Figura 8. Porcentaje de supervivencia de dos morfotipos (M1 y M2) expuestas a diferentes temperaturas.....	33
Figura 9. Los soportes demuestran que existe una clara distinción entre el morfotipo M1 del morfotipo M2 y ambos están estrechamente relacionados con el género <i>Girardia</i> .....	34

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1. Sección de corte para ensayo de regeneración. ....</b>	<b>35</b>
<b>Anexo 2. Disposición utilizada en el ensayo de regeneración de las planarias para cada piscina.....</b>	<b>35</b>
<b>Anexo 3. Imágenes de las piscinas con sus debidas instalaciones para los ensayos de regeneración.....</b>	<b>36</b>
<b>Anexo 4. Tabla 1. ANOVA realizado de ensayos de regeneración a diferentes temperaturas con poblaciones de M1.....</b>	<b>37</b>
<b>Anexo 5. Tabla 2. ANOVA realizado de ensayos de regeneración a diferentes temperaturas con poblaciones de M2.....</b>	<b>37</b>
<b>Anexo 6. Tabla 3. Post - hoc de Bonferroni realizado para determinar en qué población de M2 hay diferencias significativas del valor p.....</b>	<b>38</b>
<b>Anexo 7. Tabla 4. Post - hoc realizado para determinar entre qué temperatura y que etapa de regeneración de M2 hay diferencias significativas del valor p.....</b>	<b>38</b>
<b>Anexo 8. Cebadores utilizados para la realizar las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). ....</b>	<b>39</b>

**Análisis Comparativo de la regeneración de tres poblaciones de planarias (Platyhelminthes) del Río Pita y la potencial existencia de dos nuevas especies para el género *Girardia***

**Comparative analysis of the regeneration of three populations of planaria (Platyhelminthes) from the Pita River and the potential existence of two new species for the genus *Girardia***

**Autores:** Camilo Miguel Morán Solís,<sup>1,2</sup> Andrés Romero-Carvajal<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador

<sup>2</sup>[cmoran932@puce.edu.ec](mailto:cmoran932@puce.edu.ec)

<sup>3</sup>maromero@puce.edu.ec

## RESUMEN

El estudio planarias de la familia Dugesiidae es muy escaso en Ecuador. Este grupo es de gran importancia por su capacidad regenerativa. Gracias a estudios pioneros realizados en los últimos años, se ha encontrado la presencia de estos organismos a lo largo del Río Pita que se ubica entre los cantones de Mejía y Rumiñahui. Este río viene del Páramo y es alimentado por glaciares de los Andes, donde las temperaturas pueden tener picos de temperatura bajo los cero grados centígrados o picos de temperatura altos sobre los veinte grados centígrados en un mismo día. En esta investigación se encontró dos morfotipos (M1 y M2) pertenecientes al género *Girardia* dentro de este río, los cuales conviven en las mismas poblaciones, pero su capacidad regenerativa es diferente cuando se las expone a varias temperaturas, donde el morfotipo M1 se regeneró mejor a temperaturas entre los 8.5°C y 15°C y tuvo una mortalidad del 100% a 23°C, mientras que, el morfotipo M2 pudo regenerarse a 15°C y 23°C y tuvo una mortalidad alta a 8.5°C. La temperatura ideal para la regeneración para ambos morfotipos es de 15°C donde terminan su proceso regenerativo a los 15 días.

**PALABRAS CLAVE:** *Girardia*, regeneración, supervivencia, Páramo, temperatura.

## ABSTRACT

The study of planarians of the Dugesiidae family is very scarce in Ecuador. This group is of great importance for its regenerative capacity. Thanks to pioneering studies carried out in recent years, the presence of these organisms has been found along the Pita River, which is located between the cantons of Mejía and Rumiñahui. This river comes from the Páramo and is fed by glaciers from the Andes, where temperatures can peak below zero degrees Celsius or peak temperatures above twenty degrees Celsius in the same day. In this investigation, two morphotypes (M1 and M2) belonging to the genus *Girardia* were found within this river, which coexist in the same populations, but their regenerative capacity is different when exposed to various temperatures, where the M1 morphotype regenerated better. at temperatures between 8.5°C and 15°C and had a 100% mortality at 23°C, while the M2 morphotype could regenerate at 15°C and 23°C and had a high mortality at 8.5°C. The ideal temperature for regeneration for both morphotypes is 15°C where they finish their regenerative process after 15 days.

**KEYWORDS:** *Girardia*, regeneration, survival, Páramo, temperature.

## INTRODUCCIÓN

En los Páramos de Ecuador se tiene una riqueza abundante de agua, la cual es fuente hídrica para las ciudades aledañas a estos ecosistemas y para una gran diversidad de organismos (MAE, 2012). Como se ha encontrado anteriormente por Oviedo (2019) y Pinto (2020), existen dos poblaciones de planarias (Platyhelminthes: DugesIIDae) que habitan los Bosques Montanos y de Páramos que existen alrededor del Río Pita (Jacobsen, Brown & Dangles, 2012; MAE, 2012; Padrón, 2019; Romero, 2016).

El Río Pita nace en la Cordillera de los Andes, de los volcanes Sincholagua y Cotopaxi, es cuenca hídrica para el Río San Pedro y más adelante, Río Esmeraldas (Farinango & otros, 2019). Sin embargo, en los primeros kilómetros del río su caudal no es de gran tamaño y el suelo del río tiene fondo rocoso y está acompañado de perifiton que sirve de refugio para las planarias de agua dulce (Quiñónez, 2015). La temperatura juega un rol crucial en estos ríos debido a la altura en la que se encuentran, esta oscila entre los 12°C y 15°C, aunque puede llegar a menos de los 8°C lo que puede afectar a la regeneración de tejido de las planarias cuando se han lesionado o requieren hacer fisión (Farinango & otros, 2019; Pinto, 2020; Quiñónez, 2015).

La regeneración de tejido en la familia DugesIIDae es de gran importancia, incluso existen especies de planarias que son exclusivamente asexuales y su único medio para mantener sus poblaciones estables es por medio de la fisión binaria (Collins, 2017; Reuveni, 2021). En la naturaleza, utilizan la regeneración para restaurar partes del cuerpo perdidas en situaciones traumáticas, incluso, individuos completos se pueden regenerar de una sola planaria que ha sido mutilada en varios segmentos (Alvarado & Stonis, 2006; Reuveni, 2021). En el ámbito científico se ha utilizado a *Schmidtea mediterranea* (DugesIIDae) como organismo modelo para estudiar mecanismos de regeneración y desarrollo (Alvarado & Stonis, 2006; Reuveni, 2021). Esta especie es empleada para la investigación en distintos campos para entender procesos biológicos en organismos similares, aunque no es la única. Por ejemplo, *Girardia tigrina* es principalmente estudiada por su regeneración frente plaguicidas tóxicos como difenoconazola, RoundUp® O hidrocarburos aromáticos

policíclicos (Canales-Chávez, 2017; Dornelas et al., 2022; López et al., 2019; Simão et al., 2020).

Ya que se ha descrito anteriormente que las poblaciones de planarias en el Río Pita poseen características diferentes de regeneración y proliferación celular en comparación con el organismo modelo *Schmidtea mediterranea* (Oviedo, 2019; Pinto, 2020), surge la pregunta de si las poblaciones que habitan este río pertenecen a especies diferentes y si, además de la regeneración, tienen otras características que las diferencian entre sí, como su tolerancia a la temperatura. Esta investigación se realizó con la finalidad de esclarecer, describir y comparar la regeneración de dos morfotipos (M1 y M2) provenientes de tres poblaciones de planarias acuáticas encontradas en distintas elevaciones del Río Pita y mostrar la relación filogenética entre los dos morfotipos gracias a herramientas moleculares. Los resultados de esta investigación indican que claramente los dos morfotipos se encuentran en clados separados. Además, el morfotipo M2 sobrevivió a temperaturas mayores a 15°C en comparación al morfotipo M1. Por último, se determinó que la temperatura ideal de regeneración para ambos morfotipos es de 15°C ya que ambos se regeneran de manera óptima y al menos el 50% de los individuos sobrevivieron a esta temperatura.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Describir la capacidad regenerativa de los diferentes morfotipos encontrados, así como su relación filogenética.

### **Objetivos específicos**

- Clasificar morfotipos de las tres poblaciones dependiendo su morfología y describir la anatomía de cada uno de los morfotipos.
- Identificar sus secuencias genómicas.

- Comparar el proceso de regeneración de tres poblaciones de planarias acuáticas de alturas de 2800, 3300 y 3400 metros sobre el nivel de mar.
- Observar si el proceso de regeneración puede estar influenciado por la temperatura ambiental.
- Determinar la temperatura idónea para la regeneración de los morfotipos.

## **METODOLOGÍA**

### **Área de colecta**

El área de estudio comprendió tres puntos geográficos de colecta a lo largo del Río Pita, donde en cada punto se encontraba una población de planarias. Las planarias fueron colectadas con el permiso N° 011-2018-IC-FAU-DNB/MA del Museo de Zoología (QCAZ) - Sección invertebrados de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. La primera población correspondió a la población proveniente del río Pita a 3400 m.s.n.m. (0°31'31.4" S, 78°26'37.7"O), provincia de Pichincha, cantón Mejía. Para la segunda población se realizaron colectas de individuos a 3300 m.s.n.m. en la estación de recolección de agua "H12 Pita Bocatoma", provincia de Cotopaxi (0°29'44.4"S, 78°26'14.1"O). La tercera población se recolectó a 2800 m.s.n.m. en la ruta Cóndor Machay, cascada Molinuco, Provincia de Cotopaxi (0°25'11.6"S, 78°24'28.1"O).

### **Especímenes**

Se recolectó 100 individuos de cada población. Se clasificó los individuos de las poblaciones en base a su morfología externa (tamaño y pigmentación), su tipo de estrategia reproductiva y su tolerancia a diferentes temperaturas ambientales. De acuerdo con estas características se establecieron dos morfotipos que se nombraron como M1 y M2, ubicando a M1 en las elevaciones de 2800, 3300 y 3400 m.s.n.m., mientras que M2 se registró en las elevaciones de 2800 y 3400 m.s.n.m.

*Morfología externa:* se utilizó la observación para determinar la pigmentación de la piel de los individuos y se clasificó en dos grupos: piel llana y piel parda.

*Estrategia reproductiva:* una vez separados los dos grupos se observó que aquel grupo de piel llana, mostraban comportamientos copulatorios y depositaban huevos fértiles; por otro lado, en el grupo de los individuos de piel parda no se observó deposición de huevos en ningún momento durante el periodo de mantenimiento en laboratorio.

*Tolerancia térmica:* se expuso a los individuos a tres temperaturas diferentes en base a parámetros vistos por Pinto (2020). Se utilizó el equipo de enfriamiento TANK chiller line TK 1000 para exponer a los individuos a temperaturas de 8,5°C y 15°C; para la temperatura de 23°C se utilizó el equipo ES1135983U (Patente pendiente; Pintanel et al., 2022). Se definió como tolerantes a todos los individuos que lograsen sobrevivir en las temperaturas expuestas durante el proceso de regeneración.

### **Mantenimiento en laboratorio**

Todas las poblaciones de planarias se mantuvieron en el laboratorio en condiciones de 17° C durante tres meses, antes de empezar los estudios. Se mantuvo a las poblaciones en contenedores plásticos y cilíndricos de 200 centímetros cúbicos. Se alimentó a los individuos una vez por semana con hígado licuado y se limpió los contenedores dos veces por semana.

### **Supervivencia y regeneración**

Los estudios de regeneración se hicieron en tres temperaturas establecidas (8.5°C, 15°C y 23°C) para discernir cual es la más idónea para la regeneración. Para el proceso regenerativo en los morfotipos se realizó un corte, separando la parte anterior y posterior de la planaria utilizando la probóscide como referencia para realizar el corte (Anexo 1). Se observó el proceso de regeneración cada tres días por medio del estereomicroscopio Olympus SZX16 y se documentó con fotografías tomadas con el programa CellSense Standard (Olympus Corporation, 2020). Se identificaron cuatro etapas de regeneración anteriormente definidas para *Girardia tigrina* por Spiegelman y Dudley (1973) utilizando el fragmento posterior como referente (Pinto, 2020). Las etapas fueron identificadas como se describe a continuación: curación de la herida: etapa 1; formación del blastema, etapa 2;

crecimiento y diferenciación temprana, etapa 3; y diferenciación definitiva, etapa 4. Se expuso a estas temperaturas a los individuos de los morfotipos M1 y M2 de la población 2800 y 3400; para la población de 3300 solo se vio la regeneración en el M1. Este ensayo se realizó hasta los 21 días donde Oviedo (2019) y Pinto (2020) han observado una regeneración completa. Las etapas de regeneración y supervivencia fueron observadas en un total de 219 fragmentos. A 8.5 °C se utilizaron 44 fragmentos para M1 y para M2, 31 fragmentos; a los 15°C se utilizaron 42 fragmentos de M1 y 31 fragmentos para M2; Finalmente, a 23°C se utilizaron 41 fragmentos de M1 y 31 de M2.

Los ensayos de regeneración se llevaron a cabo en el laboratorio de eco-fisiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, donde se instalaron tres piscinas de 60 centímetros de largo por 30 centímetros de ancho y 20 centímetros de profundidad. Se llenaron las piscinas con agua hasta los 12 centímetros para que cubrieran los contenedores y se tempere el ambiente interno del contenedor con la temperatura de la piscina (Anexo 2-3). Las temperaturas se mantuvieron estables gracias a los equipos termorreguladores de enfriamiento (TANK chiller line TK 1000) que se encargan de mantener el agua en movimiento gracias a una bomba de agua; para el tratamiento de temperatura más cálida se utilizó el equipo ES1135983U (Patente pendiente; Pintanel et al., 2022). Cada piscina se estableció a la temperatura respectiva (8.5°C, 15°C y 23°C) y en ellas por cada morfotipo de cada población se colocó un contenedor plástico de control, un contenedor plástico de fragmentos anteriores y un contenedor plástico de fragmentos posteriores (Anexo 2-3;). No se utilizó morfotipo M2 para la población 3300 m.s.n.m. debido a que había pocos ejemplares.

### **Análisis estadístico**

Se hicieron Análisis de Varianza (ANOVA) en el programa R Studio v. 4.2.2 (R Core Team, 2022) para determinar si las poblaciones de cada morfotipo se comportaban de manera similar en los ensayos de regeneración de diferentes temperaturas, tomando en cuenta los días que se demoró en llegar a las etapas de regeneración establecidas por Spiegelman y Dudley (1973) y la supervivencia de los morfotipos en cada temperatura. Se realizó un post-hoc de Bonferroni para

determinar entre qué poblaciones y en que temperaturas se dio valores significativos de  $p$  ( $\leq 0.05$ ).

### **Extracción de ADN**

ADN nuclear y mitocondrial fue extraído de catorce planarias completas con un peso de ~10mg utilizando el mini kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific) usando el protocolo del fabricante. Secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) y el gen nuclear Factor de Elongación 1-alfa (EF-1 $\alpha$ ) fueron amplificadas usando la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) con las condiciones especificadas para la polimerasa Invitrogen™ Taq DNA Polymerase (Genomic DNA Mini Kit® Reagent, 2022). Los cebadores fueron seleccionados en base a las previas investigaciones de Carbayo et al., Oviedo, Pinto & Sunnucks et al. (2013, 2019, 2020 & 2006). La información sobre los cebadores usados puede encontrarse en Anexo 7. Las amplificaciones se realizaron siguiendo el protocolo de Carbayo et al., (2013). Los productos del PCR fueron visualizados en geles de agarosa y purificados usando ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Genomic DNA Mini Kit® Reagent, 2022). Los genes mitocondriales y nucleares fueron secuenciados comercialmente por Macrogen Inc, En Corea del Sur.

### **Secuenciación y alineamiento**

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas utilizando el software Geneious, v5.4.6 con las configuraciones por defecto para la alineación múltiple MAFFT como está indicado por Pinto (2020). Las matrices concatenadas se construyeron en Mesquite (Mesquite Project) con las secuencias consenso de cada individuo secuenciado junto con las especies obtenidas a partir del programa BLAST de la NCBI (2008) y otros representantes de los géneros de la Familia Dugesiidae, disponibles en GenBank. Los modelos evolutivos y esquema de particiones se escogieron simultáneamente usando phyML (Lanfear, Calcott, Ho, y Guindon, 2012).

## **Análisis filogenético**

Se realizaron análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud (ML) con los genes COI y el gen EF-1 $\alpha$  para establecer relaciones entre individuos de cada población y de cada morfotipo. Se determinó si existen especies nuevas de acuerdo con el concepto filogenético que Ridley (1993) estableció para determinar una especie. Las secuencias mitocondriales y nucleares fueron analizadas usando IQ-TREE E 1.6.8 (Nguyen et al., 2015). Los árboles filogenéticos fueron visualizados a través de FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2014).

## **RESULTADOS**

### **Morfotipos**

En cada población se identificó dos grupos distintivos de planarias las cuales fueron clasificadas como morfotipo 1 (M1) y morfotipo 2 (M2). El M1 en condiciones de laboratorio mantiene un tamaño de seis milímetros de largo en promedio, se caracteriza por tener una anatomía delgada, pigmentación parda, una línea dorsal distintiva de coloración negra y su reproducción es de carácter asexual en condiciones de laboratorio, son sumamente sensibles a cambios en la temperatura o calidad del agua (Figura 1). Por otro lado, el M2 puede llegar a los tres centímetros de largo, se caracteriza por tener una anatomía robusta y ancha, en su mayoría con pigmentación llana, pueden tener o no tener una línea dorsal blanca y tienen una reproducción sexual continua, son tolerantes a los cambios de temperatura probados (Figura 2).

### **Regeneración**

En el morfotipo M1 el proceso de regeneración se completa a los 21 días post-amputación. La etapa 1 de regeneración (cierre de la herida) se observó el primer día post amputación (dpa), la etapa 2 (formación del blastema) se dio entre el tercer y noveno dpa, la etapa 3 (crecimiento y diferenciación temprana) se dio

entre el doceavo y quinceavo dpa, por último, la etapa 4 (Diferenciación definitiva) se observó al veintiunavo dpa (Figura 3). En el morfotipo M2 completa su proceso de regeneración entre el quinceavo y veintiunavo dpa. El cierre de la herida se dio entre el primer y el tercer dpa, la formación del blastema. Se observó entre el sexto y el noveno dpa, el crecimiento y la diferenciación temprana se observó al doceavo dpa y finalmente la diferenciación definitiva se observó entre el quinceavo y veintiunavo dpa (Figura 4).

El morfotipo M1 a 8.5°C se mantuvo durante los primeros seis días post amputación (dpa) en la etapa 1 de regeneración, entre el noveno y el doceavo dpa se mantuvo en etapa 2 de regeneración, al quinceavo dpa llegó a la etapa 3 de regeneración y finalmente en el dpa veintiunavo culminó su proceso regenerativo con la etapa 4 de regeneración; el morfotipo M2 a 8.5°C se mantuvo durante los primeros seis días post amputación (dpa) en la etapa 1 de regeneración, entre el noveno y el veintiunavo dpa se mantuvo en etapa 2 de regeneración (Figura 5, A).

El morfotipo M1 a 15°C estuvo en la etapa 1 de regeneración durante el primer dpa, llegó a la etapa 2 de regeneración entre el tercer y sexto dpa, entre el noveno y doceavo dpa se mantuvo en la etapa 3 de regeneración y en el dpa quinceavo culminó su proceso regenerativo con la etapa 4 de regeneración; El morfotipo M2 a 15°C estuvo en la etapa 1 de regeneración durante los primeros tres dpa, entre sexto y el noveno dpa pasó su etapa 2 de regeneración, en el dpa doceavo llegó a la etapa 3 de regeneración y en el dpa quinceavo culminó su proceso regenerativo con la etapa 4 de regeneración (Figura 5, B).

El morfotipo M1 a 23°C estuvo en la etapa 1 de regeneración durante el primer dpa, llegó a la etapa 2 de regeneración en el tercer dpa; El morfotipo M2 a 23°C estuvo en la etapa 1 de regeneración durante el primer dpa, llegó a la etapa 2 de regeneración en el tercer dpa, llegó a la etapa 3 de regeneración al sexto dpa y en el dpa noveno culminó su proceso regenerativo con la etapa 4 de regeneración (Figura 5, C).

## **Análisis en la regeneración de Morfotipos y sus poblaciones**

Se realizó un ANOVA analizando las poblaciones del morfotipo M1 y el tiempo que les tomó a estas poblaciones completar las etapas de regeneración en las diferentes temperaturas de los ensayos de regeneración. Este análisis indicó que existen diferencias significativas entre las temperaturas ( $p=0.00000103$ ) y en las etapas de regeneración ( $p=0.0371$ ) mas no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones 2800, 3300 y 3400 m.s.n.m. (Figura 6; Anexo 3). Otro ANOVA fue ejecutado para las poblaciones del morfotipo M2 donde se analizó nuevamente el tiempo que les tomó a estas poblaciones del morfotipo completar las etapas de regeneración en las diferentes temperaturas de los ensayos de regeneración. Este ANOVA dio valores significativos en la relación de etapa de regeneración y temperatura (Figura 7; Anexo 4); por lo cual se hizo un post-hoc de Bonferroni que determinó que en la población 3400 del M2 existían diferencias significativas entre temperaturas y etapas de regeneración de la población, donde se determina que la etapa 3 de regeneración a 8.5° C presenta una diferencia significativa de  $p=0.031$  (Figura 7; Anexo 5).

## **Supervivencia**

El morfotipo M1 a 8.5°C comenzó con 42 fragmentos (100%), a partir del tercer día post amputación (dpa) empezó a declinar con su población hasta que en el noveno dpa se estableció la supervivencia y en el ensayo de regeneración culminó con 33 fragmentos (75%); El morfotipo M2 a 8.5°C comenzó con 31 fragmentos (100%), a partir del tercer dpa declinó su población más del 50% y su declinación poblacional no se detuvo hasta el dpa veintiuno donde sobrevivieron en promedio 11 fragmentos (36%) (Figura 8, A).

El morfotipo M1 a 15°C comenzó con 42 fragmentos (100%), tuvo una declinación considerable en la población entre el sexto y doceavo día donde la se establece hasta el día veintiuno con 22 fragmentos (53%); El morfotipo M2 a 15°C comenzó con 31 fragmentos (100%), a partir del primer dpa declinó sufre un decrecimiento poblacional mayor al 25% y sigue decreciendo hasta el dpa quince donde se establece la línea de supervivencia con 15 fragmentos (50%) (Figura 8, B).

El morfotipo M1 a 23°C comenzó con 42 fragmentos (100%), Sin embargo, después del tercer dpa la supervivencia de los fragmentos es nula (0%); El morfotipo M2 a 23°C comenzó con 31 fragmentos (100%), tiene dos picos de decrecimiento poblacional, el primero se da al primer dpa donde la población se reduce un 30% y el segundo pico se da del doceavo al quinceavo dpa donde se reduce la población un 10% más. Finalmente, al dpa veintiuno permanecen vivos 13 fragmentos (13%) (Figura 8, C).

### **Análisis filogenético**

El árbol de máxima verosimilitud de la familia Dugesiidae de un análisis particionado de donde se incluyeron 338 pares de bases para el gen mitocondrial COI, y 621 pares de bases para el gen nuclear EF1- $\alpha$  (Figura 9). El grupo externo está conformado por el género *Schmidtea* y el género *Dugesia*. Ambos morfotipos formaron su propio clado separado, el clado M2 se ubicó basalmente al género *Girardia* y al clado M1 con unos valores de soporte de 95.5 y 92; el clado M1 formó un clado hermano al clado del género *Girardia* con valores de soporte de 100 y 87. Dentro del clado M2 se ubicó la secuencia DB00621\_M1 perteneciente al morfotipo M1. De igual manera, dentro del clado M1 se ubicó la secuencia DB00591\_M2 perteneciente al morfotipo M2.

## **DISCUSIÓN**

### **Regeneración**

Los resultados obtenidos en los ensayos de regeneración de los morfotipos demostraron que a temperaturas bajas la regeneración es lenta, por otro lado, las temperaturas altas, aceleran el proceso de regeneración, aunque esto afecta su supervivencia. En cuanto al proceso de regeneración para el morfotipo M1, la temperatura más idónea fue de 15°C (Figuras 3, 5-B) ya que pudo llegar a culminar las etapas de regeneración en el quinceavo día post amputación. Estos resultados señalan una diferencia entre cambio de etapas de regeneración en promedio de tres días menos en comparación a lo obtenido a 17°C por Pinto (2020), donde culminan

su regeneración al dieciocho día post amputación. Se debe mencionar que con Pinto (2020) las poblaciones tuvieron un comportamiento distinto en sus ensayos a 22°C, sí se observó un proceso de regeneración culminado, mientras que, en esta investigación el morfotipo llegó únicamente a etapa 2 y no se pudo observar después de ese día porque esa temperatura resulto mortal.

El proceso de regeneración para el morfotipo M2 de igual manera que en el morfotipo M1 fue ideal a los 15°C (Figuras 4, 5-B). A pesar de que los resultados más rápidos de regeneración se vieron a 23°C donde el morfotipo pudo culminar la regeneración a los 9 días post amputación, los días posteriores a ello los individuos volvían a fragmentarse, justamente lo encontrado por Hammoudi (2018), a mayor temperatura, mayor número de fragmentaciones. En comparación a los ensayos realizados por Oviedo (2019) a 22°C el proceso regenerativo se culminó 4 días antes a 23°C y dos días después a 15°C.

Los ensayos realizados en esta investigación marcaron diferencias en el tiempo de regeneración frente a los estudios realizados por Oviedo (2019) y Pinto (2020). Sin embargo, en esta investigación la temperatura ambiental fue monitoreada con sistemas exclusivamente diseñados para control de temperatura por medio del agua, lo que hace que la temperatura llegue a todos individuos experimentales de manera homogénea y equitativa (Pintanel et al., 2022), provocando que estos resultados sean más homogéneos y veraces.

## **Supervivencia**

Se ha estudiado a la temperatura como un factor de letalidad en el orden Tricladida, donde se ha visto que *Policelys tenuis* y *Crenobia alpina* que viven entre los 800 y 1000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) toleran temperaturas máximas de 25° y 27° centígrados (C), respectivamente (Pattee, Lascombe & Delolme, 1973). Por otro lado, especies como *Policelys nigra* que sus poblaciones no superan los 300 m.s.n.m. pueden sobrevivir a más de 30°C (Pattee, Lascombe & Delolme, 1973). Esto nos indicaría que existe una correlación entre la elevación donde habitan las poblaciones de los morfotipos y las temperaturas que podrían tolerar (A mayor elevación, menor tolerancia térmica).

Basándonos en el estudio de Pattee, Lascombe & Delolme (1973), la población 2800 m.s.n.m. tendría una mayor tolerancia térmica que las poblaciones 3300 y 3400 m.s.n.m., independientemente del morfotipo. En estudio se definió como tolerantes a todos los individuos que lograsen sobrevivir en las temperaturas expuestas, sin embargo, no se observó que la elevación tenga efecto en la supervivencia de las poblaciones (Anexo 3, 4). A pesar de esto, sí se encontró diferencias en la supervivencia entre los dos morfotipos a causa de la temperatura, lo cual nos indicaría que, aunque los morfotipos M1 y M2 habitan en las mismas elevaciones (2800 a 3400 m.s.n.m.) han evolucionado con rangos de tolerancia térmica propios de su morfotipo.

En el estudio realizado por Pinto (2020) se investigó una población de la elevación 3300 m.s.n.m. que en esta investigación hemos denominado M1. Anteriormente, se describió una baja supervivencia del morfotipo M1 al exponerlo a una temperatura de 22°C (Pinto, 2020). Esto se verificó en los ensayos realizados en esta investigación ya que de igual manera a 23°C los individuos no sobrevivieron por más de tres días. En cuanto a la supervivencia idónea, se encontró que el morfotipo no decrece su tamaño poblacional en temperaturas de 8.5°C más que un 25%, en cuanto a lo descrito por Pinto (2020) su población de páramo no decreció más de un 20% ni a 4°C ni a 17°C. La sensibilidad a las condiciones del agua también puede afectar al morfotipo M1, así como fue observado por Duncan et al. (2022) en *Girardia* sp. (Guanajuato) en comparación a *S. mediterranea*, la cual también es una especie asexual, lo que podría ser un indicativo de correlación entre la asexualidad y la sensibilidad ambiental.

La supervivencia del morfotipo M2 se comparó con la investigación realizada por Lewallen, M., & Burggren, W. (2020) donde a 23°C *Girardia tigrina* tiene una alta sensibilidad a esta temperatura, lo que provoca que la especie consuma más microlitros de oxígeno y por ende gaste mayor energía en intentar sobrevivir a esas condiciones. A 23°C la supervivencia del morfotipo M2 tuvo un porcentaje más alto que M1(8-C), sin embargo, después de los quince días los individuos empezaron a segmentarse. Este comportamiento de segmentación asemeja al descrito por

Hammoudi et al. (2018) en *Schmidtea mediterranea*, donde después de 23 días de exposición a 26°C los individuos llegaron a sufrir hasta 10 segmentaciones.

### **Análisis filogenético**

Ecuador cuenta con uno de los primeros registros de planarias de agua dulce en Latinoamérica, esta descripción fue realizada por Borelli (1898) el cual denominó a la especie encontrada como *Planaria festae*, la cual actualmente se la conoce como *Girardia festae* (Canales, 2017). Una recopilación del conocimiento actual del orden Tricladida en Chile, describe a *G. festae* como una especie que alcanza dimensiones de 1 a 2 centímetros de largo y 4 milímetros de ancho, con cabeza triangular y aurículas puntiagudas, con pigmentación dorsal es variable, de tonos marrones a amarillos, con o sin línea media longitudinal clara. (Vásquez-Doorman, Escobedo & Allende, 2022).

Esta descripción coincide en algunos aspectos con el morfotipo M2 descrito en esta investigación, con sus diferencias principales en las dimensiones, y a pesar de que la información brindada por Vásquez-Doorman, Escobedo & Allende (2022) es amplia, solo incluyen una ilustración de un morfotipo de la especie, debido a la escasez de estudios dedicados a esta especie. Incluso se ha realizado una filogenia recuperando toda la información molecular sobre el género *Girardia* con 147 secuencias de especies diferentes mas esta no incluye a *G. festae* por falta de estudios moleculares (Benítez-Álvarez, 2023).

El árbol filogenético que se construyó en este estudio ubicó a planarias M1 junto a planarias de páramo del Río Pita analizadas por Pinto (2020) como un clado diferente a las planarias M2 junto a las planarias de boque montano del mismo río, analizadas por Oviedo (2019). El valor de soporte en el árbol filogenético de 95,5 y 92 para el clado M2 y con valores de soporte de 100 y 87 para el clado M1 nos dan confianza para decir que estos dos clados pertenecen a especies distintas entre sí, dentro del género *Girardia*. Los dos morfotipos son evidentemente distanciados y si se toma en cuenta los resultados de distancia génica de 9.5% para el gen nuclear EF 1- $\alpha$  y 19.33% para el gen mitocondrial COI realizados por Pinto (2020) podemos decir, que se trata de dos especies distintas una de la otra.

El árbol que se visualiza en la Figura 7 indica que para ambos genes utilizados (COI y EF 1- $\alpha$ ) los morfotipos se encuentran relacionados al género *Girardia*. En el caso del morfotipo M1 se asume que mantiene proporciones grandes de ADN mitocondrial debido a que todos los individuos heredan su ADNmt (Rosa, Oliviera & Loreto, 2017), en comparación al morfotipo M2 que su descendencia heredaría el material genético mitocondrial de uno de sus parentales (Ramm, 2017).

En 2003 se realizó una filogenia de *Schmidtea polychroa* que tomó en cuenta a la distribución geográfica de la especie dentro del continente Europeo y su forma reproductiva (sexual o asexual) (Pongratz, et al., 2003). Los resultados de esta investigación indicaron que, a pesar de que las poblaciones asexuales no compartían hábitat con las poblaciones sexuales, la forma asexual de cualquier población de *S. polychroa* desciende, ancestralmente, de la forma sexual de la especie (Pongratz, et al., 2003). Sin embargo, los dos morfotipos que se utilizó en esta investigación, tiene la suficiente evidencia morfológica, fisiológica y genética para concluir que cada uno de los morfotipos corresponde a una especie diferente y no se trata de una variación de la misma especie.

Para las secuencias atípicas DB00621\_M1 y DB00591\_M2 se cree que pudo haber sido ejecutado un error de etiquetado de muestras en la cual los morfotipos habrían sido intercambiados y debido a esto se encuentran desvinculadas a su clado correspondiente en la Figura 9.

## **CONTRIBUCIONES**

Esta investigación fue financiada por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

Erika Pinto perfeccionó y estandarizó la metodología utilizada en esta investigación. Además, su guía y conocimientos previos fueron fundamentales para la realización de esta investigación.

Andrés Merino brindó las instalaciones del Laboratorio de Ecofisiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, sede Quito para poder realizar los debidos ensayos de regeneración a temperaturas controladas

Jhael Ortega y Nicolás Tinoco aportaron con su experiencia en construcción de árboles filogenéticos y el alineamiento de las secuencias de los especímenes.

### **AGRADECIMIENTOS**

A Sofi Loor, Daniela Zurita y Erika Pinto por ser un apoyo incondicional durante los buenos y los malos tiempos.

A Andrés Romero y Erika Pinto por guiarme en la elaboración de esta investigación.

### **REFERENCIAS**

- Alvarado, A. S., & Tsonis, P. A. (2006). Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*, 7(11), 873-884.
- Benítez-Álvarez, L., Sluys, R., Leal-Zanchet, A. M., Leria, L., & Riutort, M. (2023). First molecular phylogeny of the freshwater planarian genus *Girardia* (Platyhelminthes: Tricladida) unveils hidden taxonomic diversity and initiates resolution of its historical biogeography. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 197(1), 1-19.
- Borelli A (1898) Viaggio del Dr Enrico Festa nell' Ecuador e regioni vicine, IX: Planarie d'acqua dolce. *Bollettino del Museo di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Torino* 13: 1-6. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.16811>.
- Collins, J. J. (2017). Platyhelminthes. *Current Biology*, 27(7), R252-R256. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016>.
- Carbayo, F., Álvarez-Presas, M., Olivares, C. T., Marques, F. P. L., Froehlich, E. M., & Riutort, M. (2013). Molecular phylogeny of Geoplaninae (Platyhelminthes) challenges current classification: proposal of taxonomic actions. *Zoologica Scripta*, 42(5), 508-528. <http://doi.org/10.1111/zsc.12019>.

- Canales Chávez, A. B. (2017). Efecto del cloruro de mercurio sobre la regeneración celular de la planaria de agua dulce *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Tricladida: Dugesiidae).
- Dornelas, A. S. P., de Jesus Ferreira, J. S., Silva, L. C. R., de Souza Saraiva, A., Cavallini, G. S., Gravato, C. A. S., ... & Almeida Sarmiento, R. (2022). The sexual reproduction of the nontarget planarian *Girardia tigrina* is affected by ecologically relevant concentrations of difenoconazole: new sensitive tools in ecotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.
- Duncan, E. M., Nowotarski, S. H., Guerrero-Hernández, C., Ross, E., D’Orazio, J., McKinney, S., Alvarado, A. S. (2022). Molecular characterization of a flatworm *Girardia* isolate from Guanajuato, Mexico. *Developmental Biology*.
- Farinango, K. S., Romero, D., Jácome, G. Y., Benavides, D., & Navarrete, H. (2019). Evaluación de la calidad del agua del río Pita (Ecuador), implicación para la conservación de la vida acuática y silvestre. *infoANALÍTICA*, 7(2), 71-93.
- Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J.-F., & Gascuel, O. (2003). Estimating Maximum Likelihood Phylogenies with PhyML. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*.
- Hammoudi, N., Torre, C., Ghigo, E., & Drancourt, M. (2018). Temperature affects the biology of *Schmidtea mediterranea*. *Scientific Reports*, 12.
- Jacobsen, D., Milner, A. M., Brown, L. E., & Dangles, O. (2012). Biodiversity under threat in glacier-fed. *Nature Climate Change*, 361-364.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., y Guindon, S. (2012). PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>.
- Lewallen, M., & Burggren, W. (2020). Metabolic physiology of the freshwater Planaria *Girardia dorocephala* and *Schmidtea mediterranea*: Reproductive mode, specific dynamic action, and temperature. *American Journal of*

Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 319(4), R428-R438.

López, A. M. C., Sarmiento, R. A., de Souza Saraiva, A., Pereira, R. R., Soares, A. M., & Pestana, J. L. (2019). Exposure to Roundup® affects behaviour, head regeneration and reproduction of the freshwater planarian *Girardia tigrina*. *Science of The Total Environment*, 675, 453-461.

Ministerio Ambiente Ecuador. (2012). *Sistema de clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental*. Quito : Subsecretaría de Patrimonio Natural.

Olympus Corporation. (2022). Software cellSens. Recuperado el 11 de noviembre de 2022, de <https://www.olympus-lifescience.com/es/software/cellsens/>.

Oviedo, E. (2019). Regeneration, reproduction and laboratory maintenance of aquatic and land planarians from Ecuador. Quito, Pichincha, Ecuador: PUCE.

Padrón, C. (2019). Determinación de gremios tróficos de macroinvertebrados en riachuelos del Páramo del Macizo del Cajas, Azuay-Ecuador. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay.

Pattee, E., Lascombe, C., & Delolme, R. (1973). Effects of temperature on the distribution of turbellarian triclads. *Effects of Temperature on Ectothermic Organisms: Ecological Implications and Mechanisms of Compensation*, 201-207.

Pintanel, P., Tejedo, Merino-Viteri, Almeida-Reinoso, F., Salinas-Ivanenko, S., López-Rosero, A. C., & Gutiérrez-Pesquera, L. M. (2022). Elevational and local climate variability predicts thermal breadth of mountain tropical tadpoles. *Ecography*.

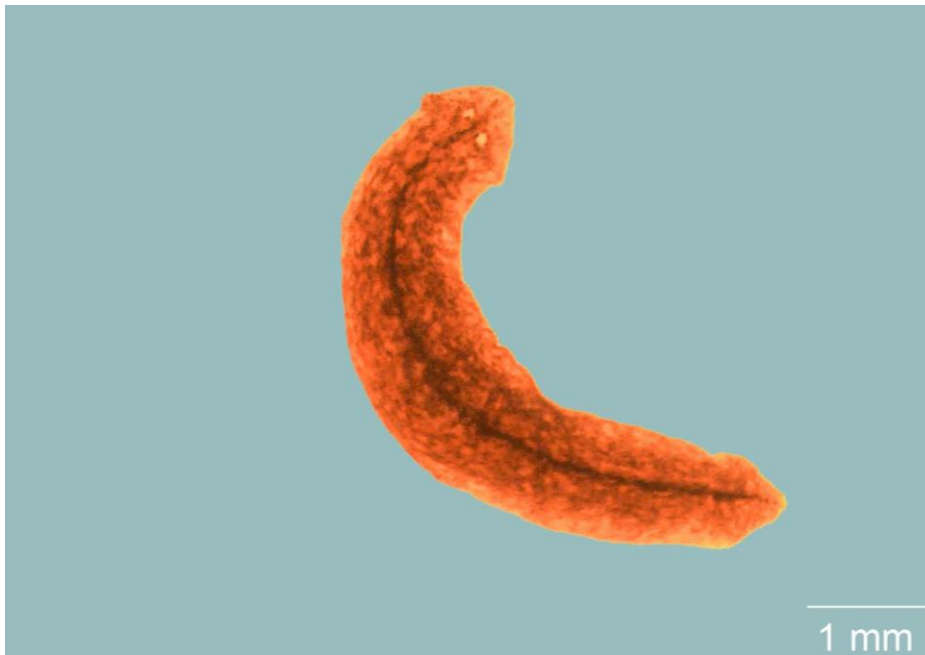
Pinto, E. (2020). Descripción comparada de la regeneración en planarias acuáticas de bosque montano y páramo. Quito, Pichincha, Ecuador: PUCE.

Pongratz, N., Storhas, M., Carranza, S., & Michiels, N. K. (2003). Phylogeography of competing sexual and parthenogenetic forms of a freshwater flatworm: patterns and explanations. *BMC Evolutionary Biology*, 3, 1-15.

- Quiñónez, P. (2015). Evaluación del estado de salud ecológica de la microcuenca del río Pita (sector Molinuco, canteras y antiguo botadero Cashapamba) utilizando macroinvertebrados como bioindicadores de calidad de agua.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4.2. Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ramm, S. A. (2017). Exploring the sexual diversity of flatworms: Ecology, evolution, and the molecular biology of reproduction. *Molecular reproduction and development*, 84(2), 120-131.
- Reuveni, M. (2021). Sex and Regeneration. *Biology*, 10.
- Ridley, M. (1993). Evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(1993), 615–617.
- Romero, R. (2016). Bioevaluación de los ríos de Páramo en la cuenca alta de Río Chama en la Cordillera de Mérida, Venezuela. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes.
- Rosa, M. T., Oliveira, D. S., & Loreto, E. L. (2017). Characterization of the first mitochondrial genome of a catenulid flatworm: *Stenostomum leucops* (Platyhelminthes). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 55(2), 98-105.
- Simão, F. C., Gravato, C., Machado, A. L., Soares, A. M., & Pestana, J. L. (2020). Toxicity of different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to the freshwater planarian *Girardia tigrina*. *Environmental Pollution*, 266, 115185.
- Spiegelman, M., y Dudley, P. L. (1973). Morphological stages of regeneration in the planarian *Dugesia tigrina*: A light and electron microscopic study. *Journal of Morphology*, 139(2), 155–183. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051390203>.
- Sunnucks, P., Blacket, M. J., Taylor, J., Sands, C. J., Ciavaglia, S. A., Garrick, R. C., ... Pavlova, A. (2006). A tale of two flatties: different responses of two terrestrial flatworms to past environmental climatic fluctuations at Tallaganda in montane southeastern Australia. *Molecular Ecology*, 15(14), 4513–4531. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03107.x>.

Extraction of DNA using <sup>™</sup> Genomic DNA Mini Kit<sup>®</sup> Reagent - CL. (2022). Retrieved from <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/extraction-of-dna-usingreagent.html#intro>.

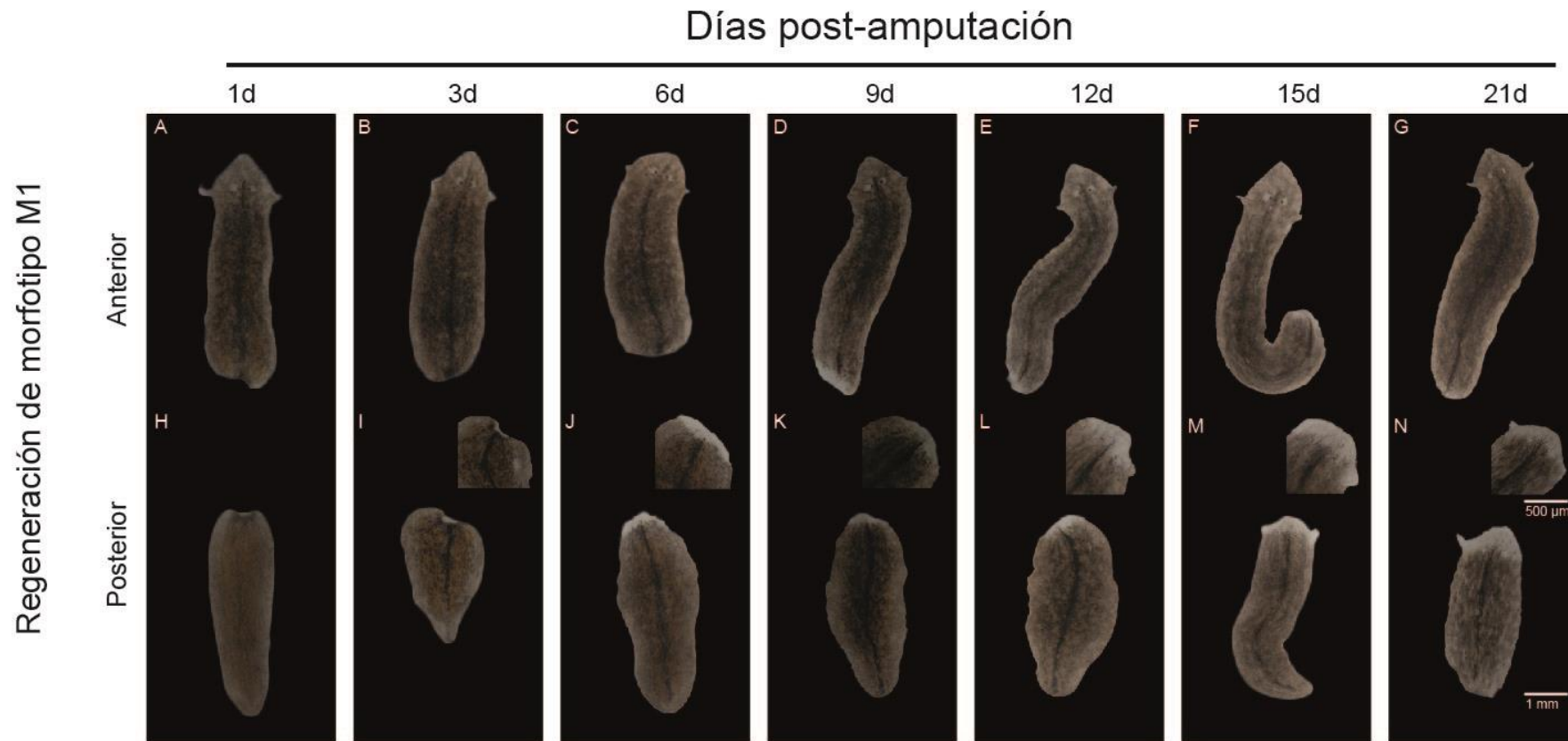
Vásquez-Doorman, C., Escobedo, J., & Allende, M. L. (2022). Current state of knowledge on freshwater planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesiiidae) from Chile. *Neotropical Biology and Conservation*, 185-203.

**FIGURAS**

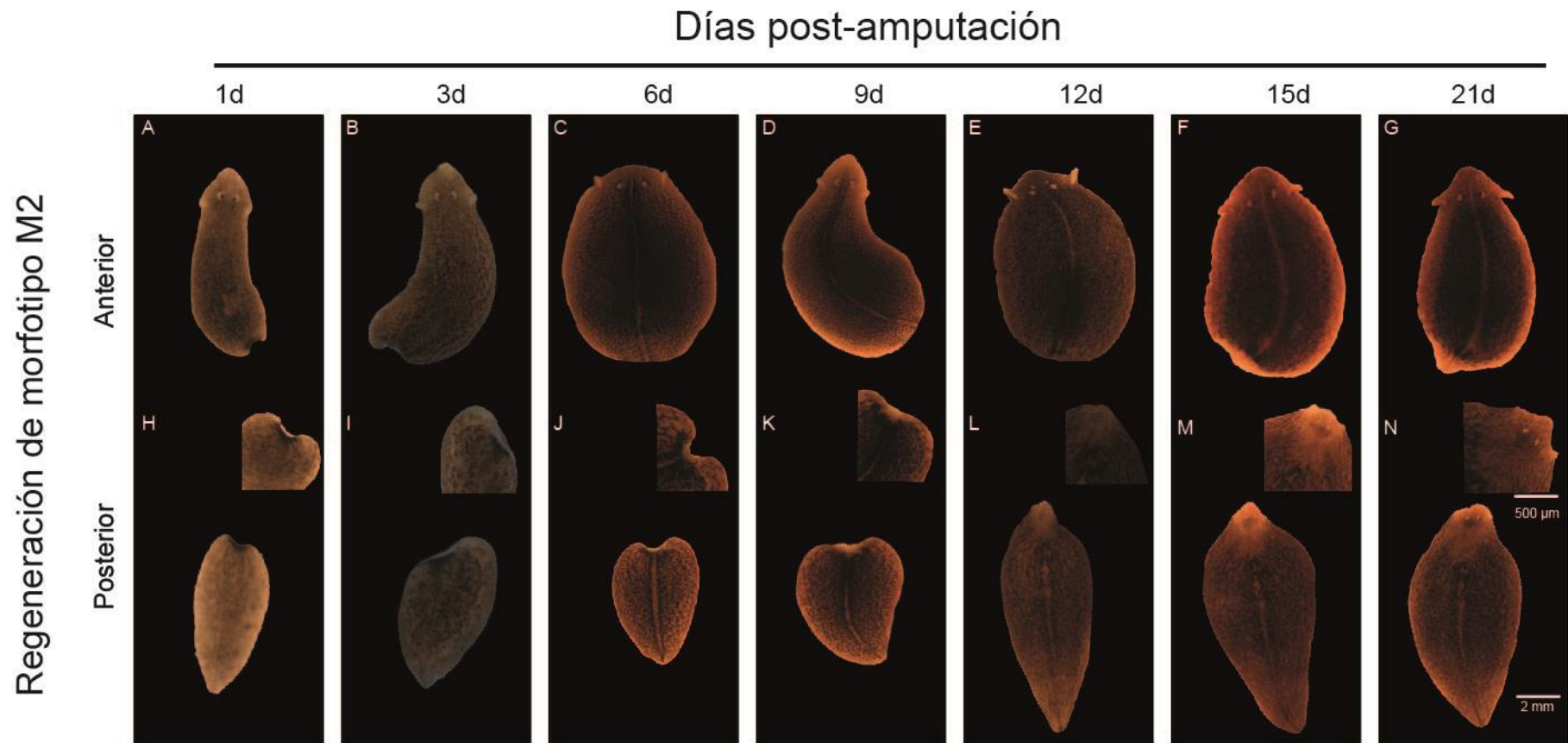
**Figura 1.** Morfología de individuos de morfotipo M1. Anatomía delgada, pigmentación parda, una línea dorsal distintiva de coloración negra y su reproducción es de carácter asexual.



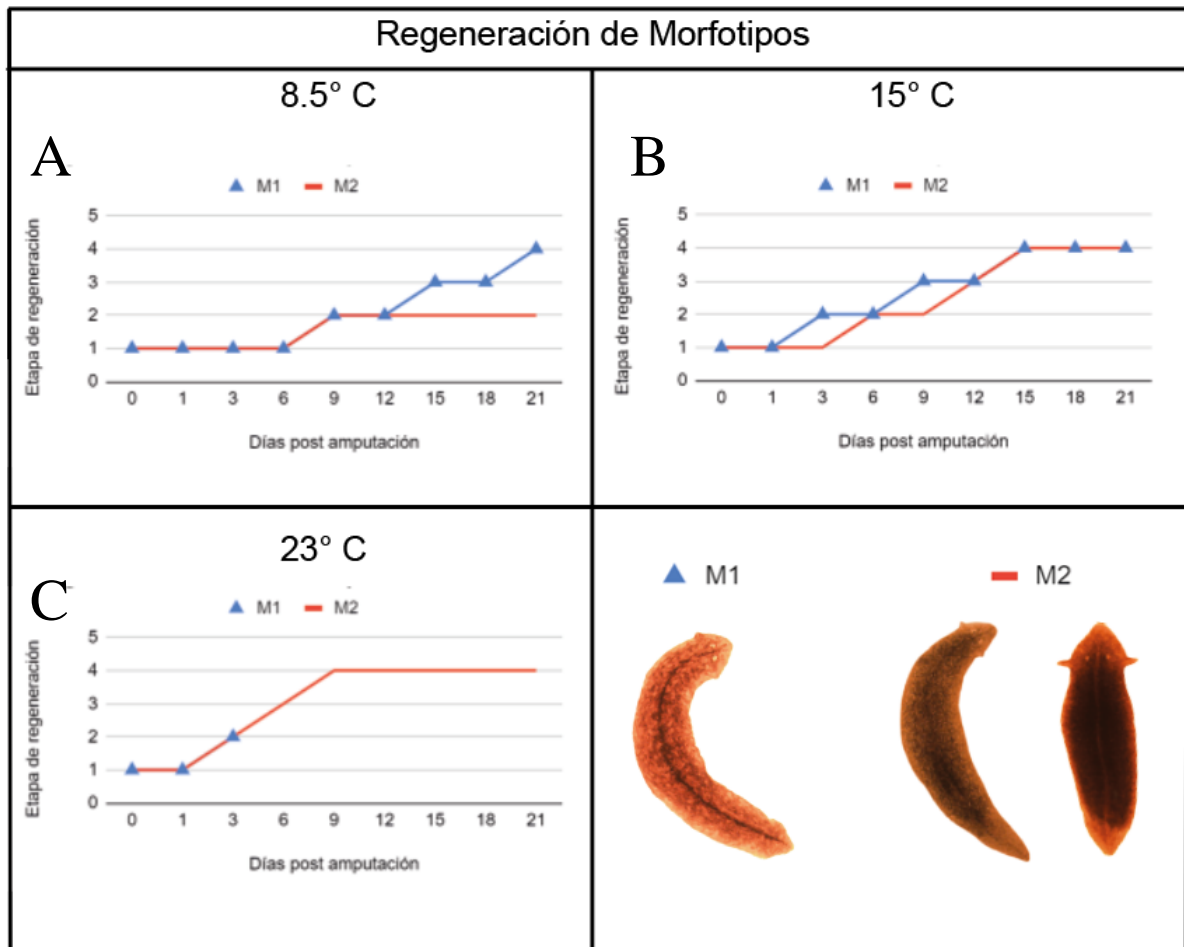
**Figura 2.** Morfología de los individuos de morfotipo M2. Anatomía robusta y ancha, en su mayoría con pigmentación llana, pueden tener o no tener una línea dorsal blanca y tienen una reproducción sexual continua.



**Figura 3.** En el morfotipo M1 el proceso de regeneración se completa entre los 15 y 21 días post-amputación a 15°C. (A-N) Seguimiento de la regeneración en fragmentos anteriores y posteriores desde el día 1 al 21 post amputación (dpa). (A, H) Cierre de la herida. (1 dpa). (B, I, C, J, D, K) Formación del blastema (3-9dpa). (E, L, F, M) Crecimiento y diferenciación temprana (12-15dpa). (G, N) Diferenciación definitiva (21-dpa).

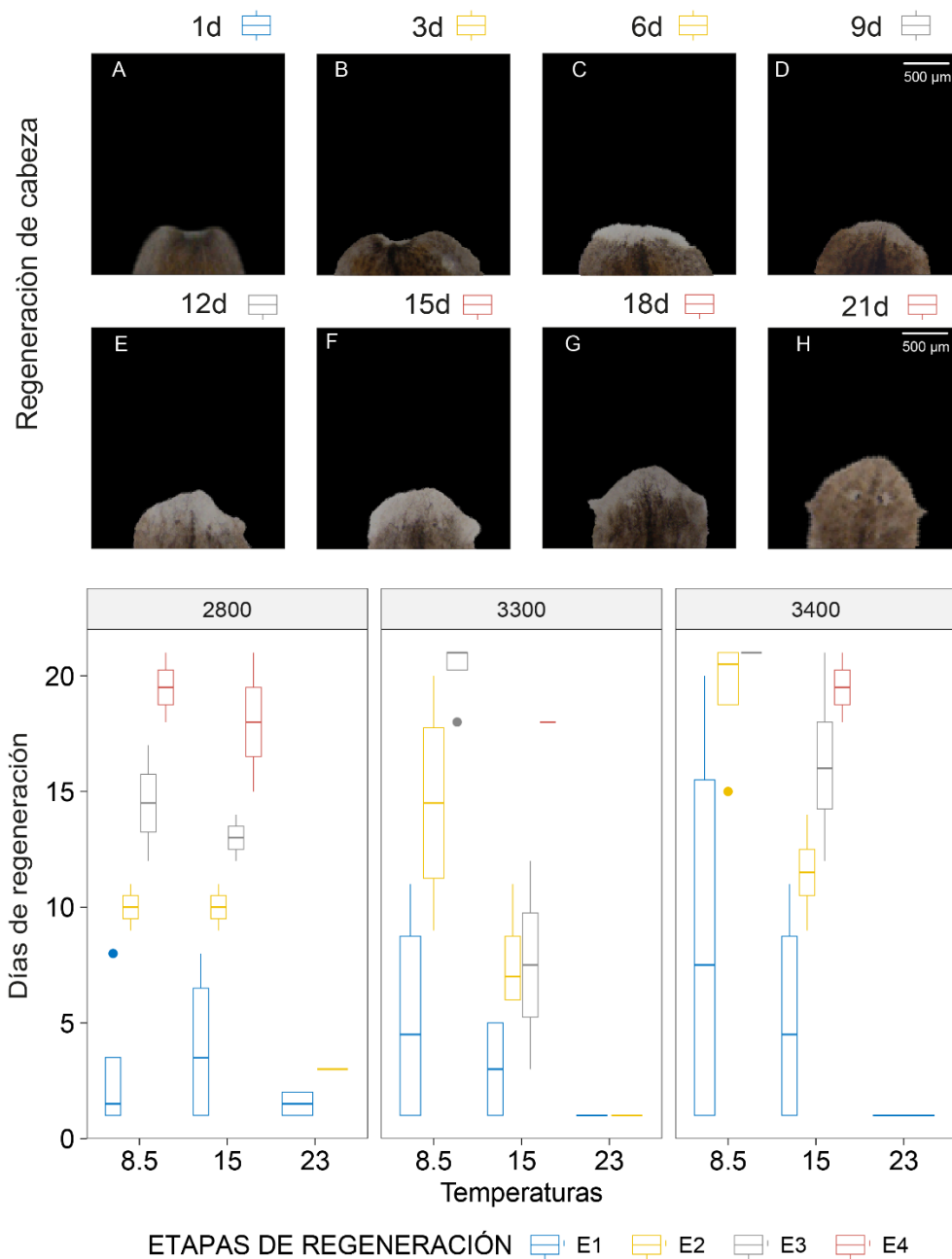


**Figura 4. El morfotipo M2 completa su proceso de regeneración entre los 15 y 21 días post-amputación a 15°C.** (A-N) Seguimiento de la regeneración en fragmentos posteriores desde el día 1 al 21 post amputación (dpa). (A, B, C, H, I, J) Cierre de la herida. (1-3dpa). (D, K) Formación del blastema (3-9dpa). (E, F) Crecimiento y diferenciación temprana (9-15dpa). (G-I) Diferenciación definitiva (15-21dpa).

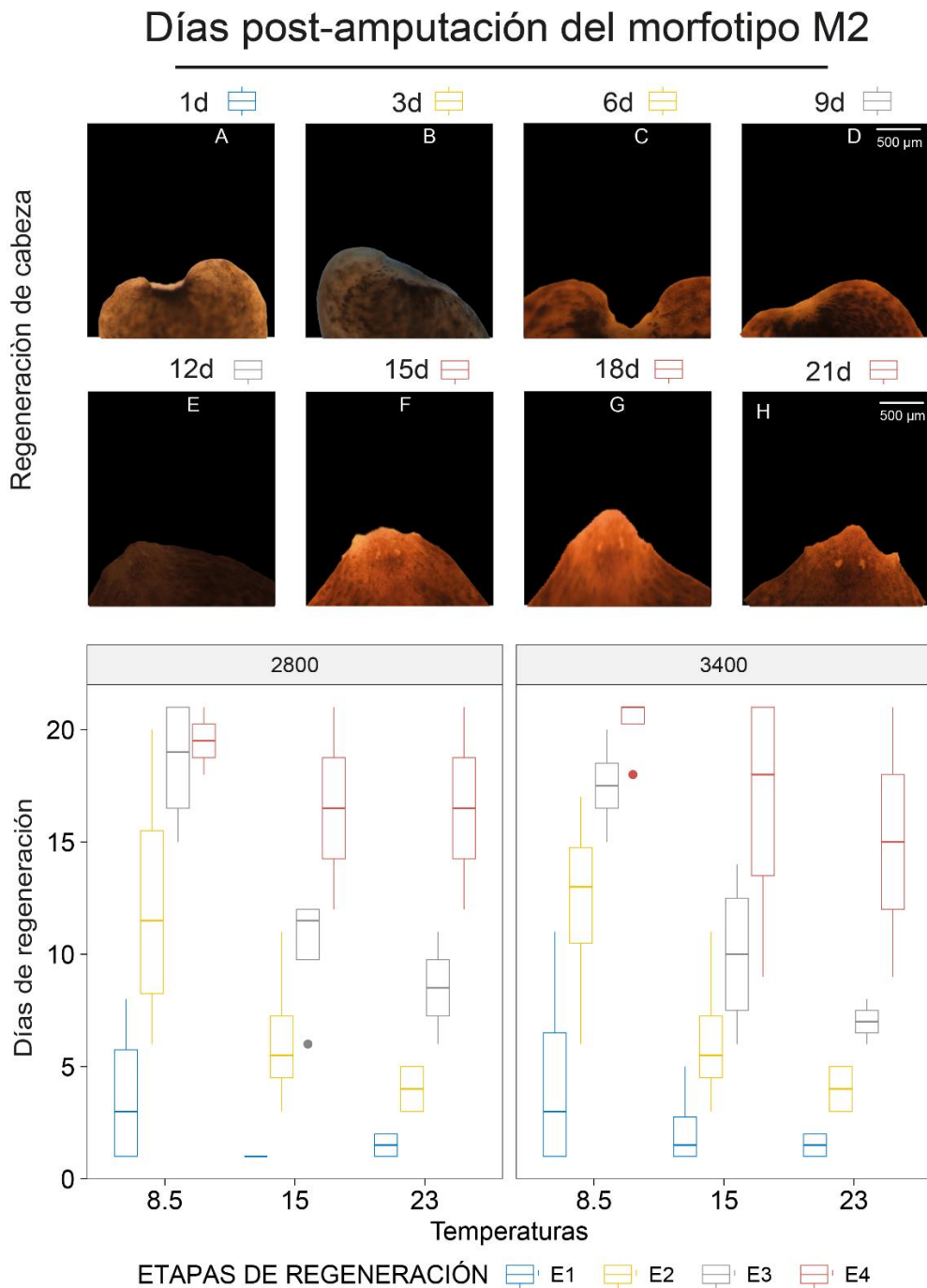


**Figura 5. Etapas de regeneración de morfotipos M1 y M2 a diferentes temperaturas.** **A)** El proceso de regeneración de los individuos de morfotipo M1 a 8.5°C culmina con la cuarta etapa al día 21 post amputación; El proceso de regeneración de los individuos de morfotipo M2 a 8.5°C solo llega a la etapa dos de regeneración; **B)** el proceso de regeneración de los individuos tanto para el morfotipo M1 y el morfotipo M2 a 15°C llegan a la etapa cuatro de regeneración, con la diferencia que M1 cambia de etapa en promedio tres días antes que M2; **C)** Por último, el proceso de regeneración del morfotipo M1 a 23°C es inexistente por su incapacidad de sobrevivir a las condiciones, por el contrario, el morfotipo M2 a 23°C muestra una alta capacidad regenerativa siendo que llega a cuarta etapa de regeneración a los 9 día.

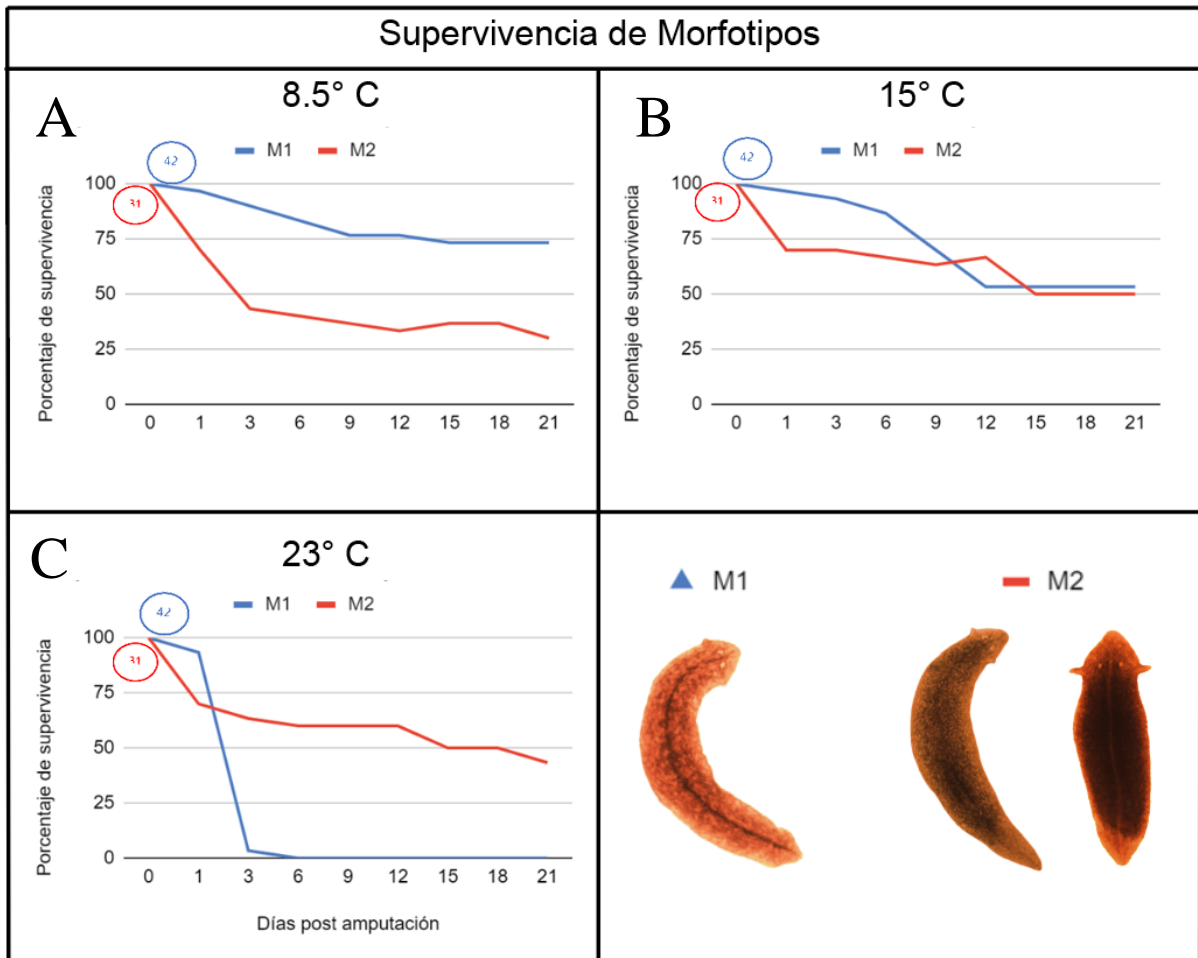
## Días post-amputación del morfotipo M1



**Figura 6. Comparativa de las poblaciones de morfotipo M1 en los ensayos de regeneración en diferentes temperaturas.** Las etapas de regeneración se encuentran diferenciadas por colores de la siguiente manera; etapa 1 (azul), etapa 2 (amarillo), etapa 3 (gris), etapa 4 (rojo). Existe diferencias significativas ( $p=0.00000103$ ) entre temperaturas debido a la incapacidad de regeneración de las poblaciones del morfotipo M1 a 23° C; la población de 2800 a 8.5° C fue la única población que llegó hasta la etapa 4 de regeneración; el morfotipo M1 en etapa 1 es similar en todas las poblaciones en todas las temperaturas, de 1 a 9 días.

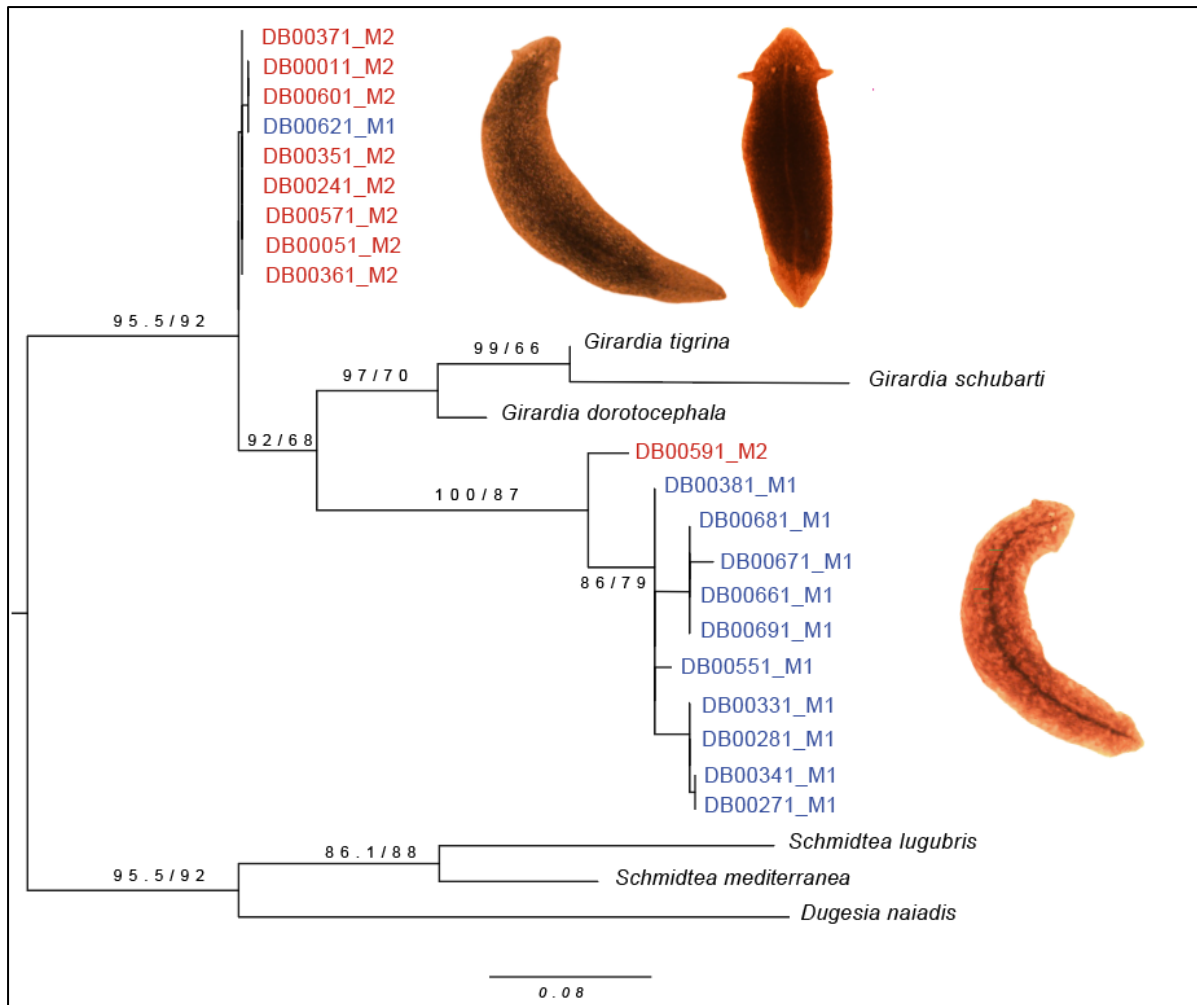


**Figura 7. Comparativa de las poblaciones de morfotipo M2 en los ensayos de regeneración en diferentes temperaturas.** Las etapas de regeneración se encuentran diferenciadas por colores de la siguiente manera; etapa 1 (azul), etapa 2 (amarillo), etapa 3 (gris), etapa 4 (rojo). Existe diferencias significativas ( $p = 0.031.$ ) en la etapa 3 de ambas poblaciones a  $8.5^{\circ}$  C, debido a que la baja temperatura provoca que el crecimiento de blastema sea lento.



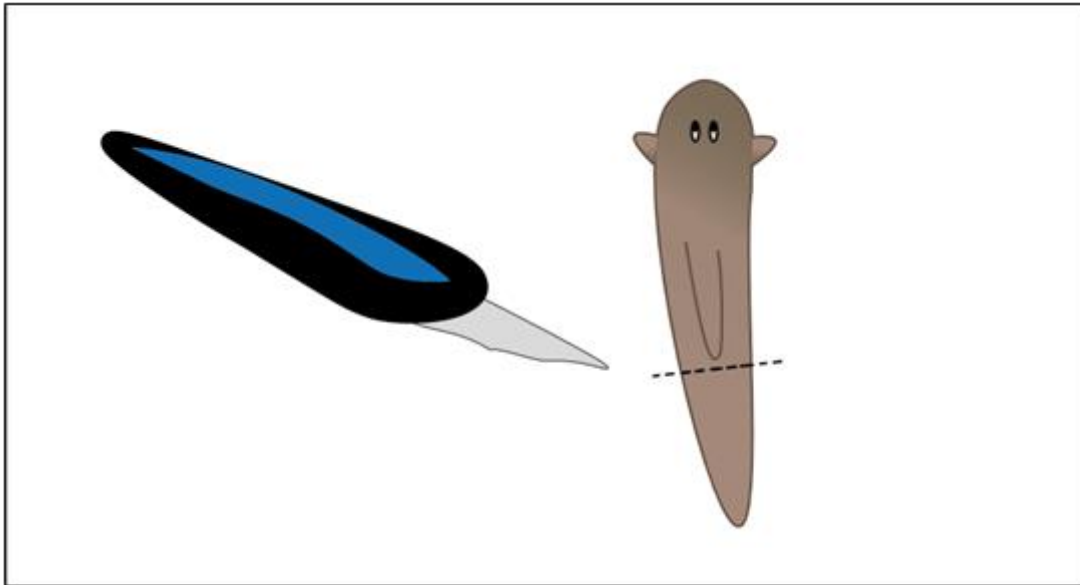
sob

**Figura 8. Porcentaje de supervivencia de dos morfotipos (M1 y M2) expuestas a diferentes temperaturas.** 42 (100%) fragmentos de M1 y 31 (100%) fragmentos de M2 fueron utilizados para cada ensayo de regeneración, dando un total de 219 fragmentos **A)** El morfotipo M1 a 8.5°C tuvo una pérdida poblacional del 25% mientras que el morfotipo M2 a 8.5°C tuvo un decrecimiento poblacional del 70%; **B)** a 15°C ambos morfotipos tienen una supervivencia del 50%; **C)** a 23°C el total de individuos del morfotipo M1 muere entre el tercer y sexto día, del morfotipo M2 sobrevivió el 45% de individuos.

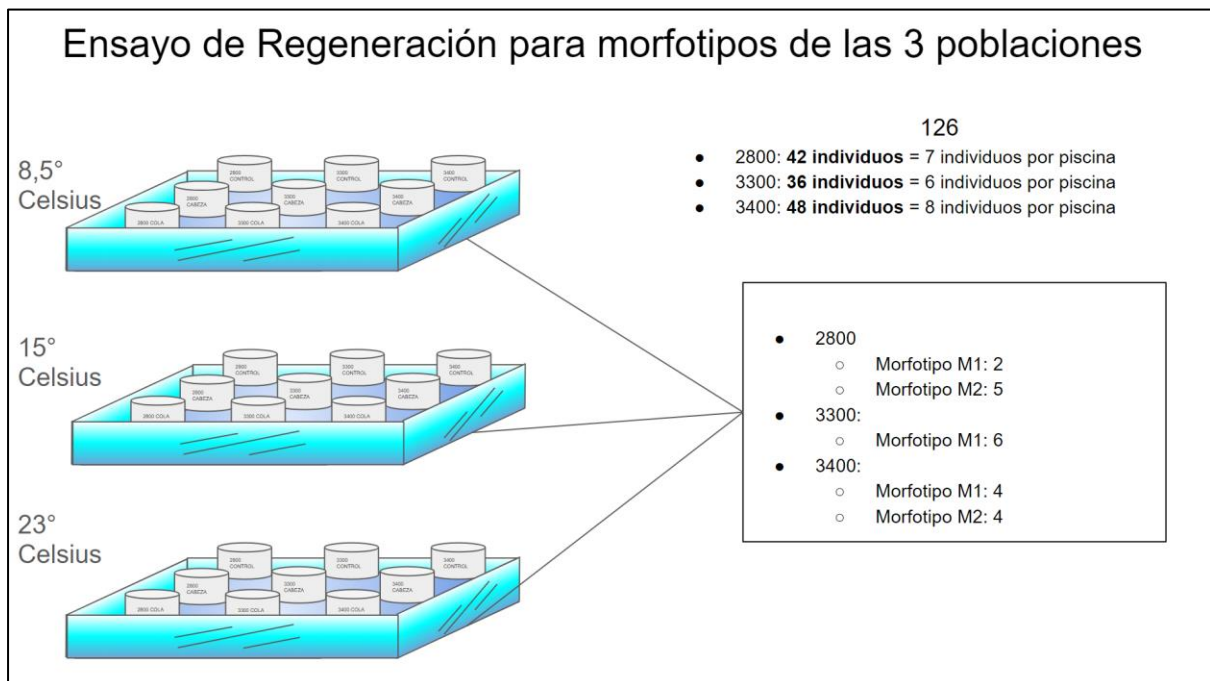


**Figura 9.** Los soportes demuestran que existe una clara distinción entre el morfotipo M1 del morfotipo M2 y ambos están estrechamente relacionados con el género *Girardia*. Filogenia realizada con el gen mitocondrial de la citocromooxidasa 1 (COI) y el gen nuclear del factor de elongación Alpha (EF); el soporte de las ramas fue realizado con los softwares de máxima verosimilitud de Bootstrap y Phy-ML. En letras rojas se encuentra el morfotipo M2 y formando un clado separado del morfotipo M1 con letras azules.

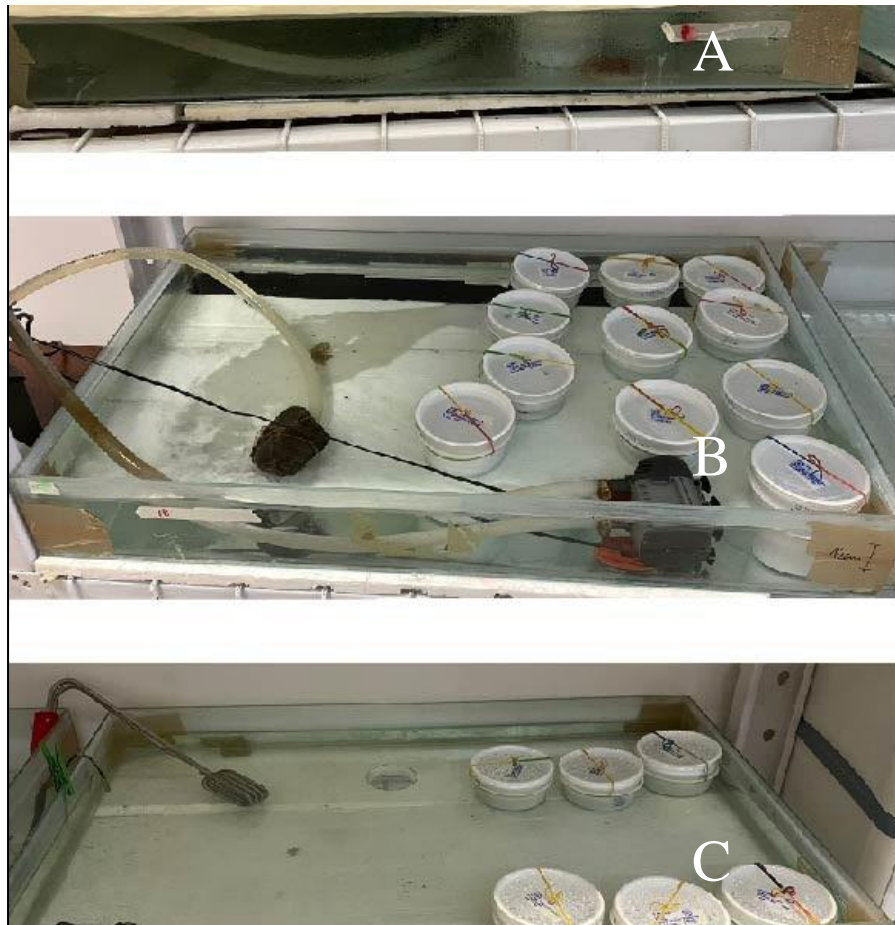
## ANEXOS



**Anexo 1. Sección de corte para ensayo de regeneración.** El corte se debe realizar bajo la probóscide donde se marca la línea entrecortada.



**Anexo 2. Disposición utilizada en el ensayo de regeneración de las planarias para cada piscina.** Para la población 2800 msnm se utilizó un total de 42 individuos incluyendo a los controles; 36 individuos para la población 3300 msnm y 48 individuos para la población de 3400 msnm. Para el morfotipo M1 fueron utilizados 72 individuos y para el morfotipo M2 fueron utilizados 54 individuos, un total de 126 individuo.



**Anexo 3. Imágenes de las piscinas con sus debidas instalaciones para los ensayos de regeneración.** Para el morfotipo M1 fueron utilizados 72 individuos y para el morfotipo M2 fueron utilizados 54 individuos, un total de 126 individuos por ensayo. A) piscina temperada a  $8.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ , con una plancha de espumaflex para evitar que la temperatura ambiental influya en la del agua; B) piscina temperada a  $15^{\circ}\text{C}$ ; C) piscina temperada a  $23^{\circ}\text{C}$ .

**Anexo 4. Tabla 1. ANOVA realizado de ensayos de regeneración a diferentes temperaturas con poblaciones de M1.** Existen diferencias significativas en las temperaturas y en las etapas usados en los ensayos de regeneración de M1. Las temperaturas (TEMP) presentan un valor de significancia de  $p=0.00000103$  mientras que entre etapas (EST) hay un valor de significancia de  $p=0.0371$ .

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
TEMP	1	770.2	770.2	23.513	1.03e-05	***
POBL	1	20.6	20.6	0.628	0.4315	
EST	3	297.0	99.0	3.022	0.0371	*
TEMP:POBL	1	11.1	11.1	0.340	0.5620	
TEMP:EST	3	190.2	63.4	1.935	0.1344	
POBL:EST	3	118.2	39.4	1.203	0.3170	
TEMP:POBL:EST	3	170.2	56.7	1.732	0.1709	
Residuals	56	1834.4	32.8			
---						
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

**Anexo 5. Tabla 2. ANOVA realizado de ensayos de regeneración a diferentes temperaturas con poblaciones de M2.** Existen diferencias significativas entre las temperaturas y las etapas de regeneración usadas en los ensayos de regeneración de M2. Existe una diferencia significativa en la relación entre temperatura (TEMP) y etapa de regeneración (EST) con un valor de  $p = 0.0007$ .

ANOVA Table (type II tests)							
	Effect	DFn	DFd	F	p	p<.05	ges
1	TEMP	1	32	15.990	3.51e-04	*	0.333
2	POBL	1	32	1.222	2.77e-01		0.037
3	EST	3	32	10.699	5.01e-05	*	0.501
4	TEMP:POBL	1	32	0.747	3.94e-01		0.023
5	TEMP:EST	3	32	4.779	7.00e-03	*	0.309
6	POBL:EST	3	32	1.006	4.03e-01		0.086
7	TEMP:POBL:EST	3	32	1.080	3.72e-01		0.092

**Anexo 6. Tabla 3. Post - hoc de Bonferroni realizado para determinar en qué población de M2 hay diferencias significativas del valor p.** Existen diferencias significativas entre las temperaturas y las etapas de regeneración de la población 3400 M2. Existe una diferencia significativa en la relación entre temperatura (TEMP) y etapa de regeneración (EST) de la población 3400 con un valor de  $p = 0.031$ .

	POBL	Effect	DFn	DFd	F	p	`p<.05`	ges
*	<dbl>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<chr>	<dbl>
1	<u>2800</u>	TEMP	1	32	4.91	0.034	"**"	0.133
2	<u>2800</u>	EST	3	32	4.52	0.009	"**"	0.298
3	<u>2800</u>	TEMP:EST	3	32	2.51	0.076	"**"	0.191
4	<u>3400</u>	TEMP	1	32	11.8	0.002	"**"	0.27
5	<u>3400</u>	EST	3	32	7.18	0.000808	"**"	0.402
6	<u>3400</u>	TEMP:EST	3	32	3.34	0.031	"**"	0.239

**Anexo 7. Tabla 4. Post - hoc realizado para determinar entre qué temperatura y que etapa de regeneración de M2 hay diferencias significativas del valor p.** Existen diferencias significativas en las etapas de regeneración de la población 3400 M2 a 8.5° C en la etapa 3. Existe una diferencia significativa en la relación entre temperatura (TEMP) de 8.5 y la etapa de regeneración (EST) 3 de la población 3400 con un valor de  $p = 0.000684$ .

	TEMP	POBL	Effect	DFn	DFd	F	p	`p<.05`	ges
*	<dbl>	<int>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<chr>	<dbl>
1	8.5	<u>2800</u>	EST	3	32	5.28	0.004	"**"	0.331
2	15	<u>2800</u>	EST	3	32	1.19	0.329	"**"	0.1
3	23	<u>2800</u>	EST	3	32	0.646	0.591	"**"	0.057
4	8.5	<u>3400</u>	EST	3	32	7.38	0.000684	"**"	0.409
5	15	<u>3400</u>	EST	3	32	2.54	0.074	"**"	0.192
6	23	<u>3400</u>	EST	3	32	0.808	0.499	"**"	0.07

**Anexo 8. Cebadores utilizados para la realizar las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Región	Nombre del	Secuencia	Fuente
--------	------------	-----------	--------

<b>Génica</b>	<b>Cebador</b>		
<b>COI</b>	COIF	GCAGTTTTTGGTTTTTTG GACATCC	(Sunnucks et al., 2006)
	COIR	GAGCAACAACATAATAAG TATCATG	(Sunnucks et al., 2006)
<b>EF-1a</b>	EFF	GATTGCYCCWGGYCATC G	(Carbayo et al., 2013)
	EFR	GCRATWGAYTCGTGRTG C	(Carbayo et al., 2013)