



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE LOS COPÉPODOS
Leptodiptomus cf. sicilis (COPEPODA: CALANOIDA) EN
LOS LAGOS DE LA CUENCA ORIENTAL, MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(LIMNOLOGÍA)**

P R E S E N T A

OMAR ALFREDO BARRERA MORENO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE CIROS PÉREZ

COMITÉ TUTORAL: DR. FERNANDO ÁLVAREZ NOGUERA
DR. MANUEL ELÍAS GUTIÉRREZ
DR. ALEJANDRO MAEDA MARTÍNEZ
DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A ti, Miri, por caminar conmigo, compartiendo con mucho amor y paciencia los buenos y malos momentos de esta gran aventura que decidimos vivir de la mano. Sin tu apoyo no daría mis pasos con tanto ánimo y ganas de ser mejor en todos los aspectos. Mi muy hermosa esposa miriposa, te amo.

A Mamá y Papá, a Rodrigo y Anthar, a Uvas y Leova, así como a toda mi gran familia materna, paterna y política por apoyarme siempre en los proyectos y decisiones que he tomado en la vida. Un beso a todos.

A mis amigos y hermanos de espíritu: Oscar, Erik, Eduardo, Efrén, Manuel, Miguel, Rubén, Rodrigo, Adán, Erik y Raúl. Así como a mis amigas Karla, Jessica y Faby. *Ich dien.*

A todos los compañeros y amigos del PILT, por los buenos ratos que hemos pasado tanto en el laboratorio como en las salidas al campo y fuera del aspecto académico: Arturo, Laura, Osvaldo, Fernando, Armando, Norma, Carmen, Aideé, Lilia, Brenda, Benjamín, Luis, Dr. Lugo, Dra. Rosario, Dra. Eli, Dr. Miroslav, todos. ¡Qué bonita familia!

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Jorge Ciros, por confiarme un proyecto tan interesante y de gran desafío, gracias por guiarme de una manera inmejorable por el maravilloso mundo de los contadores de historias, demostrando siempre que es posible ser un buen maestro, ejemplo y amigo.

A mi Comité Tutorial, Drs. Fernando Álvarez Noguera, Manuel Elías Gutiérrez, Alejandro Maeda Martínez y Elías Piedra Ibarra, por las sugerencias, comentarios y correcciones que enriquecieron en gran medida este trabajo.

A la Dra. Tania Escalante por sus valiosos comentarios y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Javier Armengol Díaz, por recibirme tan amablemente en la Universitat de Valencia, así como a los compañeros con los que pude convivir un corto mes y cuya hospitalidad fue excepcional: Carla, María, Nayeli, Maru, el Dr. Sáenz y Cristina, entre otros.

A la Maestra Yolanda Hornelas del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM y a los encargados del Servicio de Microscopía de la Universitat de Valencia, por su ayuda en la obtención de las fotografías utilizadas en el análisis de morfología.

Al M. en C. Alejandro Monsalvo Reyes y al Dr. Elías Piedra Ibarra por su apoyo en la obtención y análisis de las secuencias genéticas utilizadas en el análisis molecular.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, especialmente a Chantal, Diana, Gaby, Lupita y a la Dra. Gloria por todas las facilidades que me dieron para que pudiera terminar a tiempo y en forma este proyecto.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado y sin el cual no hubiera sido posible terminar satisfactoriamente esta tesis. Así como por el apoyo recibido para realizar una estancia académica en el extranjero.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
La especie y algunos conceptos sobre ella.....	3
Procesos de especiación.....	6
Plasticidad fenotípica, Adaptación local e Hipótesis de Monopolización.....	7
Copépodos.....	9
Los copépodos <i>Leptodiptomus</i> cf. <i>sicilis</i> en los lagos de la Cuenca Oriental.....	10
Justificación.....	12
Hipótesis.....	13
Objetivos.....	14
Área de estudio.....	15
Métodos.....	18
Análisis de la variabilidad y divergencia genética intra e interpoblacional.....	18
Análisis de morfología comparada.....	20
Efecto de la salinidad sobre la supervivencia y desarrollo de las diferentes poblaciones.....	21
Experimentos de entrecruzamiento.....	23
Estatus biológico y taxonómico de las tres poblaciones pertenecientes al taxón <i>Leptodiptomus</i> cf. <i>sicilis</i>	25

Resultados.....	26
Análisis de la variabilidad y divergencia genética intra e interpoblacional.....	26
Análisis de morfología comparada.....	29
Efecto de la salinidad sobre la supervivencia y desarrollo de las diferentes poblaciones.....	33
Experimentos de entrecruzamiento.....	38
Discusión.....	43
Análisis de la variabilidad y divergencia genética intra e interpoblacional.....	43
Análisis de morfología comparada.....	45
Efecto de la salinidad sobre la supervivencia y desarrollo de las poblaciones.....	48
Experimentos de entrecruzamiento.....	50
Estatus biológico y taxonómico de las tres poblaciones pertenecientes al taxón <i>Leptodiptomus cf. sicilis</i>	53
Conclusiones.....	56
Literatura citada.....	57

Resumen

El copépodo calanoideo *Leptodiptomus sicilis* ha sido considerado de amplia distribución geográfica en América del Norte, habitando cuerpos de agua dulce y salobres; en México se ha encontrado en algunos lagos de la Cuenca Oriental: dos profundos y perennes (La Preciosa; SDT: 1.1 g L⁻¹ y Atexcac; SDT: 6.5 g L⁻¹) y uno somero y efímero (El Carmen; SDT: 1.4-10 g L⁻¹), con características limnológicas distintas, distribución insular, pero muy cercanos entre sí. A pesar del posible flujo genético intenso por medio de la dispersión pasiva de sus estructuras de resistencia, hallazgos recientes muestran que la adaptación local y/o la especiación críptica son fenómenos frecuentes en este tipo de organismos. Para analizar si el aislamiento geográfico y la salinidad son factores de diversificación entre estos copépodos, se evaluó: (1) la divergencia del gen mitocondrial COI entre las poblaciones, (2) la divergencia morfológica de algunas estructuras implicadas en la reproducción, (3) la adecuación biológica (patrones de supervivencia y desarrollo) en respuesta a tres salinidades experimentales y (4) el posible flujo genético entre las poblaciones (reproducción intra e interpoblacional). Los resultados indican que: (1) la divergencia genética interpoblacional fue relativamente baja (K2P <2%) pero muestra una separación clara entre poblaciones; (2) solo se encontraron diferencias significativas en la talla de los organismos adultos, pero no en la forma y/o proporción de los caracteres comparados; (3) las tres poblaciones tienen tolerancias diferenciales a la salinidad, observándose: (a) una mayor adecuación en los copépodos de los lagos perennes a la salinidad de su lago de origen; (b) en la salinidad más alta el tiempo de desarrollo siempre fue menor; (c) la supervivencia, eficiencia de muda, fecundación y eclosión de huevos de los copépodos de Atexcac es significativamente menor en las salinidades bajas; (d) los copépodos de La Preciosa tuvieron una mayor adecuación en todos los parámetros a la salinidad baja; (e) los copépodos de El Carmen tuvieron una alta plasticidad; finalmente, (4) se observó reconocimiento de pareja, entrecruzamiento y formación de híbridos viables entre todas las poblaciones analizadas, aunque se observaron diferencias entre ellas. Se concluye que los copépodos de los lagos de la Cuenca Oriental pertenecen a la misma especie biológica y se encuentran en un proceso de diversificación complejo, teniendo barreras ecológicas importantes que aparentemente impiden el flujo genético eficiente entre ellas a pesar de conservar las posibilidades de mantenerlo; la hipótesis se refuerza con la evidencia de adaptación significativa a las condiciones locales que presentaron las poblaciones de los lagos perennes.

Palabras clave: copépodos, adaptación local, salinidad, ecología evolutiva, procesos de diversificación biológica.

Abstract

The copepod *Leptodiaptomus sicilis* has been considered as a widely distributed species in North America, occurring in freshwater and saline lakes. In Mexico it has been found inhabiting three lakes at Cuenca Oriental: two of them being deep and permanent (La Preciosa and Atexcac; TDS: 1.1 and 6.5 g L⁻¹, respectively), while the other is shallow and ephemeral (El Carmen; TDS: 1.4-10 g L⁻¹); the three with different limnological characteristics, island distribution, but close one from each other. Despite the possible gene flow due to the passive dispersal of their resting stages, recent evidence shows that the local adaptation and/or cryptic speciation are frequent phenomena within this type of organisms. In order to analyze if geographic isolation and salinity are important factors conducting diversification among these copepods, we analyzed: (1) the interpopulation genetic divergence by sequencing fragments of the mitochondrial gene COI, (2) the morphological divergence on structures implicated in reproduction, (3) the biological fitness (patterns of both survivorship and growing) at three experimental salinities (1.1, 3.8 and 6.5 g L⁻¹), and (4) the possible genetic flow (inter and intrapopulation reproductive success) among the three populations. Our results indicate that: (1) interpopulation genetic divergence was relatively low (KP2:<2%), but the populations were clearly separated among them; (2) differences were found only in size of adults, but not in the form and proportion of the compared characters; (3) the three populations had differential tolerance to salinity, those are: (a) copepods from permanent lakes had higher fitness when exposed to their original salinity; (b) the highest salinity reduces the time of molting in all populations; (c) survivorship, molting efficiency, fertilization and hatching rates of Atexcac copepods were significantly lower at low salinities; (d) contrarily, copepods from La Preciosa had the highest values in all parameters at low salinity; (e) copepods coming from the shallow lake (El Carmen) showed a higher plasticity to salinity; and (4) interpopulation mating was successful among the three population, sexual recognition of mates, interbreeding and formation of viable hybrids were observed, although some differences occurred. These results indicate that the copepods from lakes at Cuenca Oriental belong to the same biological species, having a complex process of diversification, with important ecological barriers that apparently prevent a natural genetic flow among them, even that they have the potential to maintain it; this hypothesis is reinforced by the evidence of significant adaptation to local conditions in populations inhabiting the permanent lakes.

Key words: copepods, local adaptation, salinity, evolutionary ecology, biological diversification processes.

Introducción

La especie y algunos conceptos sobre ella

La alta riqueza biológica de México es resultado de su particular historia geológica y posición geográfica, así como de una gran variación topográfica y de climas en su territorio que en conjunto, al combinarse crean condiciones ambientales muy diversas, que hacen al país uno de los de mayor diversidad biológica en el mundo (Flores-Villela y Navarro-Sigüenza, 1993). Dado el creciente deterioro de los hábitats naturales, tanto acuáticos como terrestres, y a que no podemos conservar o aprovechar de manera adecuada lo que no conocemos, es necesario estudiar la biodiversidad de los organismos que se distribuyen en nuestro país, pues el valor ecológico, industrial, alimenticio y cultural que pueda tener un organismo no debería pasar desapercibido. En particular, es importante señalar la importancia de estudiar y preservar los cuerpos de aguas epicontinentales y su diversidad biológica que cada vez están más amenazados por las actividades humanas debido a un manejo ineficiente y falta de planeación (Aguilar, 2003).

Para lograr el objetivo anterior es necesario, entre otras cosas, conocer la cantidad y composición de las especies de un lugar; sin embargo, surge la pregunta: ¿qué es una especie? Para las personas, en general, este término describe a un grupo de organismos protegidos o extintos, causante de enfermedades o de una cura, alimento o plaga (Valencia-Ávalos, 2009), pero para los biólogos en particular, este representa mucho más; sabemos por ejemplo que la especie es considerada la entidad filogenética básica (Lee, 2003), y que en ella se fundamenta la construcción de clasificaciones biológicas (Mishler y Luna, 1997). Sin embargo, no se tiene un concepto general que la defina, por lo que “algo” que con un concepto puede considerarse como una especie, con otro no logra este calificativo. De este modo, desde que Platón introdujo el término *eidos* pensando en cosas o ideas y Aristóteles lo retomó en el plano biológico (Valencia-Ávalos, 2009), con el tiempo se han propuesto distintos conceptos, como el biológico, morfológico (o fenético) y el filogenético, entre otros.

Aunque cada definición utilizada tiene un énfasis distinto, por lo general se refieren a un mismo tipo de entidad, teniendo que las diferencias en cada concepto se deben a la interpretación de la compleja naturaleza de las especies y de los procesos que las originaron (De Queiroz, 1998), así como a los distintos tipos de preguntas evolutivas y/o de organismos con los cuales los autores estaban principalmente interesados (Templeton, 1989). Sin embargo, Lee (2003) considera que, en general, el aislamiento reproductivo o el entrecruzamiento proveen un buen criterio para definir a una especie, por lo menos en organismos de reproducción sexual (las denominadas “bioespecies”, *sensu* Lee, 2003).

Apoyando la idea anterior, existe el denominado concepto biológico (Dobzhansky, 1935; Mayr, 1942), en el que la especie es definida como una población natural reproductivamente aislada de otras poblaciones, con individuos capaces de cruzarse entre sí y tener descendencia fértil. El aislamiento reproductivo deriva en un linaje evolutivo distinto y se origina a partir de barreras geográficas o ecológicas. El principal problema que se tiene con este concepto es al tratar de diferenciar entre organismos cuya reproducción es asexual (como algunos partenogénéticos), pero resulta útil cuando se requiere diferenciar entre poblaciones con reproducción sexual, cercanas filogenéticamente y con poca divergencia fenética. El concepto de reconocimiento de pareja (Paterson, 1985), varía con el anterior al enfatizar el reconocimiento de pareja y un sistema de fertilización en común entre un grupo de organismos, más que el aislamiento reproductivo, para caracterizarlos como una especie.

Por su parte, según el concepto filogenético (Hennig, 1966; Cracraft, 1987; Mishler y Luna, 1997), la especie se define como un grupo de organismos en el cual todos comparten un único carácter apomórfico (que no se encuentra en sus ancestros o grupos semejantes), originado por la divergencia de linajes hermanos. Sin embargo, si este se utiliza con rigor, el resultado es que poblaciones separadas por poca divergencia podrían ser consideradas como especies diferentes si existieran variaciones genéticas particulares entre cada una de ellas.

Por último, utilizando criterios fenéticos, se encuentra el ampliamente utilizado concepto morfológico, donde cada especie se distingue de otra principalmente por las diferencias en los caracteres referentes a la morfología. Aquí los problemas se tienen al encontrar especies muy similares, con polimorfismo o con dimorfismo sexual; además, el autor tendría que fijar un límite (más o menos arbitrario) de divergencia fenotípica para separar a las especies. Por lo que, utilizar solamente la morfología por muy detallada que sea, no es suficiente para definir una especie pues pueden existir diferencias genéticas, biológicas y ecológicas, aún cuando dos poblaciones sean muy cercanas filogenéticamente y parecidas en su forma (Montiel-Martínez, 2006).

Históricamente la identificación y definición de especies se han basado principalmente en el estudio comparativo de la morfología de los seres vivos (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2004), sin embargo, con el tiempo y el uso de distintas herramientas (p.e., moleculares, etológicas, reproductivas y ecológicas), se ha comprobado que la semejanza en la forma no es suficiente para clasificar a los organismos, llegándose a encontrar la existencia de grupos de organismos de especies biológicas distintas pero difíciles o imposibles de distinguir por métodos morfológicos, a los que se ha denominado como especies crípticas o gemelas, las cuales han sido registradas como muy comunes en diversos grupos de organismos acuáticos (Knowlton, 1993). Con este problema de reconocimiento entre entidades biológicas se encuentran los organismos zooplanctónicos (Ciros-Pérez *et al.*, 2001; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Alcántara-Rodríguez, 2010), en particular aquellas consideradas como taxones con amplios rangos de distribución y tolerancia a diferentes condiciones del medio, pero que, tras el análisis cuidadoso, han sido reveladas como complejos de especies con características y papeles ecológicos distintos entre sí (Serra *et al.*, 1998; Lee, 2000). Debido a que el reconocimiento de pareja en muchas de estas especies no se da por medios visuales sino químicos, es probable que no se presenten asociadas modificaciones morfológicas importantes entre los diferentes taxones de un mismo complejo críptico, por lo que de presentarse divergencias, éstas tendrían su origen en procesos azarosos u otras presiones de selección, pero no determinadas por selección sexual.

Es importante señalar que al demostrarse que la especiación críptica es un fenómeno frecuente, se evidencia que la riqueza de especies (p. e., en el zooplancton) ha estado subestimada, por lo que se tendrían que hacer adecuaciones en cuanto a los patrones de distribución geográfica, historia evolutiva y características ecológicas descritas de cada especie perteneciente a un complejo, información que, hasta ahora ha estado sesgada por la percepción tradicional de que los invertebrados de agua dulce cuentan con una distribución extensa al tener una eficiente capacidad de transportarse de manera pasiva o activa. Esta idea solo nos da, en general, una percepción del gran potencial de dispersión de los taxones, pero no debe confundirse la capacidad de movimiento (traslado) individual con el flujo génico que se pueda tener entre las poblaciones, pues no necesariamente un organismo que invade un nuevo ambiente cuenta con la capacidad de sobrevivir y reproducirse en éste (Bohonak y Jenkins, 2003).

Procesos de especiación

Para Mayr (1982), la especiación es el mecanismo por el cual una especie puede formar dos o más especies y ha sido vista desde dos perspectivas diferentes por los evolucionistas: vertical, en la que una especie se transforma en otra (especiación filética); y horizontal, donde hay una multiplicación de especies cuando diferentes poblaciones se separan (especiación cladogénica).

Así tenemos que otro punto a considerar cuando se estudia la biodiversidad es la adaptación de cada taxón a su ambiente y los procesos de especiación que pueden ocurrirle, mediante los cuales se generan nuevas especies (De Queiroz, 1998). Uno de estos procesos es la cladogénesis, mecanismo producido por el aislamiento reproductivo de diferentes poblaciones de la misma especie por medio de barreras precigóticas o postcigóticas (Badii *et al.*, 2007). Las primeras son originadas, por ejemplo, por aislamiento mecánico (variaciones en el tamaño o forma de los genitales), o etológico (diferencias en el comportamiento durante el cortejo o el apareamiento), químico (diferencias en los factores de reconocimiento sexual o compatibilidad de células sexuales), etc., y aparecen antes o durante la fecundación, impidiendo el adecuado intercambio genético; las segundas afectan

la viabilidad de los nuevos individuos, ocasionando abortos, esterilidad, enfermedad o la muerte prematura.

Para explicar la cladogénesis se han propuesto varios modelos de especiación. La especiación alopátrida se origina cuando se genera una barrera geográfica que separa la distribución espacial de una especie, impidiendo el flujo genético entre las subpoblaciones, que, con el tiempo, terminan adaptándose a las condiciones de su medio y eventualmente, quedan aisladas reproductivamente entre sí. Otro proceso es la denominada especiación simpátrida, en la que dos subpoblaciones que comparten la misma área de distribución (p. e., el mismo lago), sin necesidad de barreras geográficas tienen algún tipo de aislamiento, por ejemplo ecológico (diferentes condiciones de luz, temperatura o alimento como sucede en un mismo cuerpo de agua), etológico, mecánico o genético que impedirían el libre flujo de genes (Ruíz-Gutiérrez y Rodríguez-Caso, 2009). Un tercer mecanismo es el conocido como especiación parapátrida y tiene lugar cuando poblaciones que coinciden en una misma distribución geográfica mantienen un intercambio genético muy restringido, que con el tiempo puede ser nulo y llegar a generar especies distintas (Galán y Herrera, 1998).

Plasticidad fenotípica, Adaptación local e Hipótesis de Monopolización

Bajo el concepto de que la especiación no es un evento que sucede entre todas las poblaciones de una especie, se puede pensar en dos procesos que independientemente de la especiación ocurren en general entre ellas: (1) por un lado la denominada la adaptación local, donde el fenotipo de un grupo de organismos evoluciona para soportar las condiciones de un ambiente en particular, y por el otro (2) la plasticidad fenotípica, que puede definirse como la habilidad de un genotipo para producir varios fenotipos en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales a lo largo de su ontogenia, (Kingsolver *et al.*, 2002); las respuestas plásticas incluyen cambios en el comportamiento, fisiología, morfología, crecimiento, historia de vida, etc., y pueden expresarse a nivel de individuo o a través de generaciones (Miner *et al.*, 2005).

La plasticidad fenotípica puede ser un mecanismo importante que facilite la evolución de los taxones al propiciar la asimilación en el genotipo de un carácter específico cuando una población llegan a un nuevo entorno (p. e., un cuerpo de agua), de este modo la variaciones del fenotipo pre-existentes necesarias para generar la plasticidad podrían permitir a una población persistir en las nuevas condiciones, a pesar de que inicialmente podría estar subadaptada a ellas. La persistencia daría tiempo a que nuevas variaciones genéticas surjan a través de mutaciones y/o la recombinación, reforzando la adaptación a las condiciones del medio recién colonizado (Pigliucci, 2005); con el tiempo la selección natural podría favorecer una disminución de la plasticidad y favorecer eventualmente la adaptación local.

En cuerpos de agua epicontinentales, la adaptación local de los organismos a las condiciones particulares de un lago, por ejemplo, puede ser tan fuerte que en relativamente poco tiempo quedaría limitado el flujo genético entre poblaciones que, en principio, tienen una capacidad potencial de colonizar diversos ambientes a través de diferentes mecanismos de dispersión (De Meester *et al.*, 2002). Las adaptaciones que un linaje puede haber adquirido en un lago con el paso de las generaciones podrían permitirle ventajas sobre los nuevos colonizadores, provocando, a la larga, el aislamiento reproductivo requerido para ser considerado como una especie biológica distinta.

A partir de las evidencias cada vez más importantes de adaptación local en organismos acuáticos epicontinentales, principalmente en partenogénicos cíclicos, De Meester *et al.* (2002) plantean la denominada hipótesis de la monopolización, explicando que cuando algunas variantes genéticas de una población en particular colonizan (por medios activos y/o pasivos) un nuevo hábitat, al no existir competidores, lo hace tan eficazmente que terminan acaparando los recursos y creciendo rápidamente. Con el tiempo esta adaptación inicial se ve complementada por factores de competencia intrapoblacional, selección por los depredadores y además con la formación de un banco de estructuras de resistencia que refuerza el efecto fundador. Así, cuando nuevos genotipos de la misma especie invaden el lugar, se ven en desventaja al no tener la capacidad de obtener los recursos necesarios para desarrollarse adecuadamente y terminan siendo desplazados. De

acuerdo con esta hipótesis, se sugiere un papel primordial de la adaptación local durante el proceso de la reducción del flujo genético intrapoblacional, y finalmente de especiación parapátrida.

Por lo anterior, es de esperarse que este fenómeno puede ocurrir en organismos zooplanctónicos que habitan cuerpos de aguas epicontinentales, principalmente los lagos endorreicos que, como analogía a las islas en el mar, se encuentran aislados entre sí. Dado el alto potencial de dispersión pasiva que tienen estos organismos (De Meester *et al.*, 2002) no es difícil entender los registros de distribución geográfica muy amplia que se les han asignado (Knowlton, 1993). Sin embargo, bajo la idea planteada por la hipótesis de la monopolización, la adaptación rápida de la primera población a las condiciones locales terminaría por reducir el flujo genético después de un tiempo relativamente corto, generando grandes diferencias en la composición de los genotipos entre poblaciones vecinas, que sumado a los bajos niveles de divergencia morfológica (especiación críptica) en este tipo de organismos, explican el porqué han pasado desapercibidas a nuestros ojos; como se ha evidenciado con rotíferos, cladóceros y copépodos (e.g. Serra *et al.*, 1998; Lee, 2000; Ciro-Pérez *et al.*, 2001; Montiel-Martínez *et al.*, 2008).

Copépodos

En México, la riqueza de los organismos que conforman el subphylum Crustacea se calcula en más de 3000 especies (Cordero y Llorente-Bousquets, 2000). Entre los crustáceos, la Subclase Copepoda, cuyos miembros tienen su primera mención histórica en 1688 (Marsh, 1918), cuenta con alrededor de 600 especies registradas en el país, lo que corresponde a $\approx 5\%$ del total mundial para este grupo (Cordero y Llorente-Bousquets, 2000). Estos organismos han mostrado una gran plasticidad evolutiva, adaptándose a diferentes ambientes y formas de vida, por lo que encontramos copépodos de vida libre, parásitos, en ambientes salobres, marinos y de agua dulce (Suárez-Morales *et al.*, 2000a), siendo capaces de invadir y sobrevivir con éxito en todos los ambientes continentales (Reid, 2001). De los taxones de agua dulce o epicontinentales, la Familia Diaptomidae es la más diversa entre los calanoides de México, y en ella destacan los géneros *Mastigodiatomus* y

Leptodiptomus, con 8 y 7 especies respectivamente (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008; Montiel-Martínez *et al.*, 2008).

En el mundo existen alrededor de 2300 especies descritas de calanoides, de las que alrededor del 25% son dulceacuícolas. Los copépodos de este Orden tienen un rango de tamaño de alrededor de 1 y 5 mm. Se encuentran en cuerpos de agua permanentes donde son planctónicos; algunas especies se asocian con plantas y sedimentos, y otros se pueden encontrar en charcos temporales y pantanos (Williamson y Reid, 2001). Muchas especies acumulan sustancias químicas dentro de su cuerpo o apéndices, que les dan colores vistosos como naranja, rojo, o azul (Dussart y Defaye, 2001). Éstos copépodos son omnívoros y tienen un papel importante en las redes tróficas acuáticas como consumidores primarios, alimentándose de algas, bacterias y rotíferos, y posteriormente sirven como alimento de peces y otros consumidores secundarios.

Los calanoides combinan quimio y mecanoreceptores cuando toman, seleccionan e ingieren las partículas con las que se alimentan (Friedman, 1980). La reproducción es zigogénica (gonocórica) y los organismos secretan feromonas que ayudan al macho a reconocer a una hembra (Chow-Fraser y Maly, 1988). Al carecer de un sentido de la vista efectivo, se puede pensar que para encontrar y acoplarse mecánicamente a la hembra es de gran importancia el reconocimiento olfativo entre estos organismos, por lo que el poder distinguir visualmente a la pareja pasa a ser una condición innecesaria. Conociendo la existencia de especies gemelas dentro de este grupo, el papel del reconocimiento químico podría ayudar a establecer límites entre taxones diferentes, pero esta metodología no ha sido bien establecida (Knowlton, 1993).

Los copépodos *Leptodiptomus* cf. *sicilis* en los lagos de la Cuenca Oriental

Históricamente la distribución geográfica del copépodo *Leptodiptomus sicilis* (Forbes, 1882) ha sido restringida al norte de América, abarcando cuerpos de agua tanto dulces como salobres, de la costa este a la oeste de Estados Unidos y Canadá, y del sur de Alaska a

Missouri, principalmente habitando los Grandes Lagos como el Michigan, Superior, Huron, Eire, Ontario y St. Clair, entre otros (Robertson y Gannon, 1981; Balcer *et al.*, 1984).

En México, análisis preliminares en los lagos de la Cuenca Oriental (véase descripción abajo), confirmaron el registro en el Lago Atexcac de un copépodo que morfológicamente coincide con las descripciones del taxón *L. sicilis* (Macek *et al.*, 1994); además se encontraron otras tres poblaciones de la misma especie en los lagos La Preciosa, El Carmen y Tepeyahualco.

Debido a la naturaleza de estos lagos, endorreicos, con una distribución a manera de islas, dentro de una zona geográfica relativamente pequeña, cercanos entre sí (<20 km), donde hay lagos temporales (El Carmen y Tepeyahualco) y perennes profundos (Atexcac y La Preciosa), dentro de un gradiente de salinidad considerable (1.1-6.5 g L⁻¹), los hace el escenario natural ideal para probar hipótesis concretas relativas a los procesos de diversificación biológica entre especies zooplanctónicas.

Dadas las características de los lagos, además de que se han observado diferencias morfológicas sutiles entre los individuos de cada población, se pueden plantear en principio tres posibilidades: (1) que *L. cf. sicilis* tiene la capacidad para habitar con éxito todos los lagos, mostrando una alta plasticidad fenotípica y se trata de una misma especie biológica; (2) que existe una tolerancia diferencial a las condiciones ambientales (i. e., salinidad), resultado de un procesos de adaptación local a las condiciones particulares de cada lago, sin embargo existe aún flujo génico interpoblacional, por lo que se trata de la misma especie biológica, o (3) existe una tolerancia diferencial a las condiciones ambientales (i. e., salinidad), que en la historia de este taxón han conducido a la restricción del flujo génico interpoblacional y nos encontramos ante un complejo de especies gemelas que por su gran parecido morfológico pueden ser confundidas como una misma especie taxonómica.

Justificación

La comprensión de los procesos que determinan los patrones de diversificación de las poblaciones de *L. cf. sicilis* de la Cuenca Oriental es de gran importancia para la conservación y planes de manejo de éste sistema endorreico y puede ser de utilidad para trasladar el conocimiento generado hacia otros grupos de organismos de igual o distinto nivel taxonómico que presenten dentro de sus poblaciones patrones similares de morfología, distribución de sus poblaciones, mecanismos de reconocimiento durante la reproducción o en su adaptación a soportar modificaciones del medio en el que se desarrollan.

Hipótesis

H₀: Las poblaciones de copéodos pertenecientes al taxón *L. cf. sicilis*, localizadas en ambientes con características disímiles en la Cuenca Oriental, constituyen una sola especie biológica, con dos alternativas posibles:

1. La especie esta constituida por poblaciones con gran plasticidad fenotípica al cambio en las condiciones de salinidad.
2. La especie está constituida por poblaciones parapátridas con fuerte adaptación local a las condiciones de su medio, presentando baja plasticidad fenotípica a los cambios de salinidad.

H₁: Las poblaciones de copéodos pertenecientes al taxón *L. cf. sicilis*, localizadas en ambientes con características disímiles en la Cuenca Oriental, corresponden a especies biológicas distintas, formando un complejo de especies gemelas resultado de un proceso de especiación críptica. En este caso, hay la posibilidad de que:

1. Todas las poblaciones mantengan aislamiento reproductivo entre sí, teniendo tres especies distintas.
2. Sólo algunas poblaciones lo presenten, teniendo al menos dos especies diferentes.

Objetivo General: Comparar mediante análisis morfológicos, ecológicos, genéticos y de compatibilidad reproductiva, tres poblaciones parapátricas de *L. cf. sicilis* (Copepoda: Calanoida) con la finalidad de determinar si entre estas existe especiación críptica, plasticidad fenotípica o adaptación local.

Objetivos Particulares

1. Establecer cepas de laboratorio del taxón *L. cf. sicilis*, proveniente de tres cuerpos de agua con características limnológicas distintas, entre los que se incluyen dos sistemas perennes y profundos (lagos Atexcac y La Preciosa) y un sistema temporal (lago El Carmen), todos con salinidades diferentes.
2. Analizar en las tres poblaciones del copépodo la variabilidad y posible divergencia genética intra e interpoblacional del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI).
3. Realizar un análisis de morfología comparada de las diferentes poblaciones de *L. cf. sicilis*.
4. Caracterizar el efecto de la salinidad sobre la supervivencia y desarrollo de las diferentes poblaciones de *L. cf. sicilis* en condiciones de laboratorio.
5. Analizar experimentalmente la compatibilidad reproductiva de las tres poblaciones, para evaluar si existe divergencia intrapoblacional en el sistema de apareamiento y reconocimiento de pareja. De existir apareamiento interpoblacional, evaluar la formación y viabilidad de los híbridos.
6. Definir, con base en el conjunto de resultados obtenidos de todos los análisis, el estatus biológico y taxonómico de las tres poblaciones pertenecientes al taxón *L. cf. sicilis*.

Área de estudio

La Cuenca Oriental se localiza en una porción de los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz, entre las coordenadas 18° 48' - 19° 43' N y 97° 09' - 98° 03' W, dentro del Distrito Oeste de la Faja Volcánica Transmexicana (Escalante *et al.*, 2007) a una altitud promedio de 2,300 m.s.n.m. y abarcando una superficie de 5,250 km² aproximadamente (Alcocer *et al.*, 1993). Esta cuenca hidrográfica es endorreica, por lo que no presenta una salida en forma de corrientes superficiales como podrían ser ríos o arroyos (Lugo *et al.*, 1994), mientras que el agua que alimenta a sus lagos proviene de fuentes subterráneas principalmente y en menor medida de la precipitación pluvial directa (Álvarez, 1950).

Se cree que durante el Pleistoceno, parte de su área estaba cubierta por un gran lago que actualmente se encuentra reducido a algunos cuerpos de agua que se llenan durante la época de inundaciones pero que permanecen secos la mayor parte del año (Arredondo, 1995), como es el caso de El Carmen (también conocido como Totolcingo) y Tepeyahualco (también conocido como El Salado), por su cercanía se piensa que ambos pudieron estar conectados en el pasado (Fig. 1); en su área se tienen registros de un aterínido (*Chirostoma jordani*) y un ajolote (*Ambystoma tigrinum*) (Alcocer *et al.*, 1997), así como del calanoideo *Mastigodiptomus albuquerquensis* y el ciclopoideo *Acanthocyclops* grupo *robustus* (B. López-López, comunicación personal).

Por otro lado, en la zona se encuentra varios lagos de tipo maar, conocidos como axalapascos (“ollas de arena con agua”, en náhuatl), originados en conos de explosión volcánica en el Pleistoceno tardío (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007), ejemplos de éstos son La Preciosa (también conocido como Las Minas) y Atexcac. Las características de estos lagos varían desde agua dulce hasta salobres, aunque todos ellos son alcalinos, con alta concentración de cloruros, bicarbonatos de sodio y magnesio, y con una elevada conductividad eléctrica (Davies *et al.*, 2002). La parte de la Cuenca Oriental que comprende al Llano de San Juan (con los lagos Atexcac, La Preciosa, Quechulac y Alchichica), muestra en general un clima templado húmedo, con 14.4 °C de temperatura media anual y una precipitación anual de 656 mm (Arredondo, 1995). Entre estos lagos, La

Preciosa se considera oligosalina, mientras que Atexcac es mesosalino, según la clasificación de Cowardin *et al.* (1979).

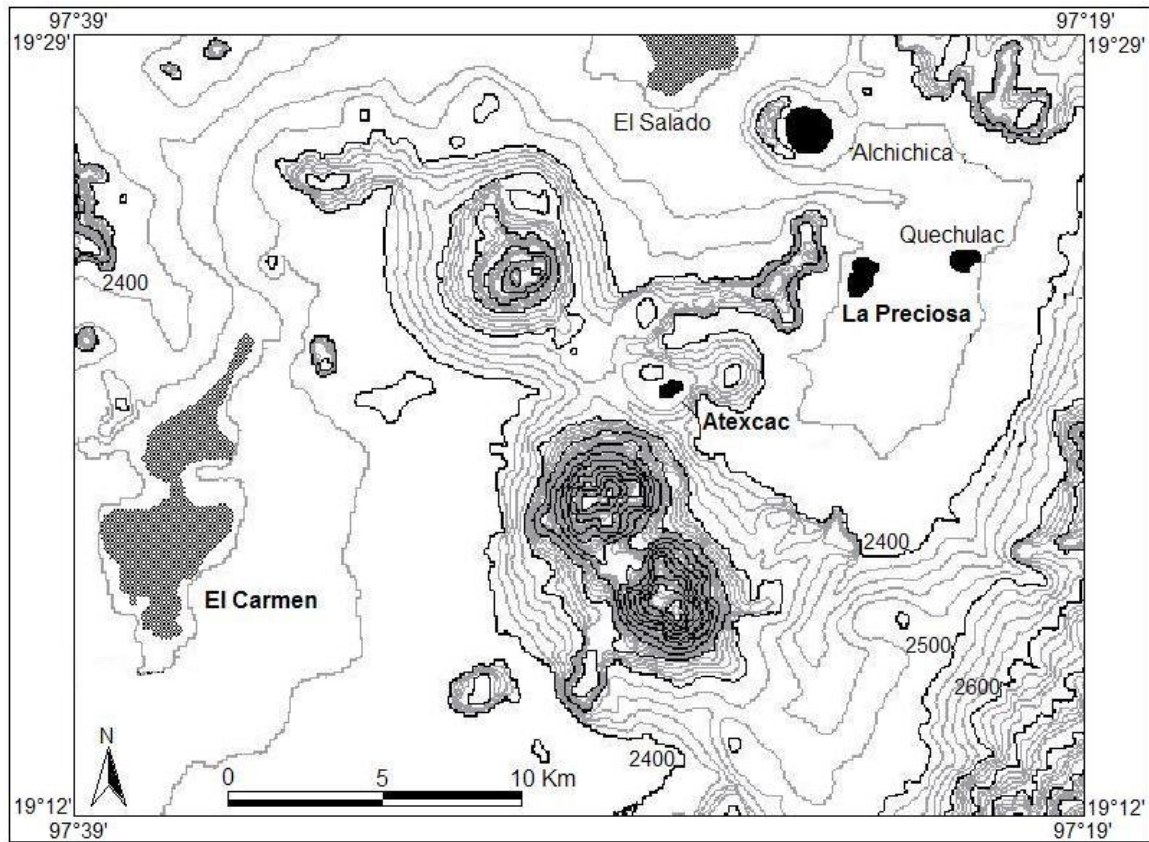


Fig. 1. Localización del lago efímero El Carmen y de los lagos-cráter La Preciosa y Atexcac.

El lago La Preciosa (Fig. 1) es el segundo más grande de la Cuenca en cuanto a área y volumen, sólo detrás de Alchichica, su forma es triangular a grandes rasgos y con una longitud máxima de 1,300 m, con orientación NE-SW, la máxima profundidad se encuentra a los 45 m (Arredondo, 1995). El agua del lago tiene una salinidad de 1.1 g L^{-1} ; al igual que en Atexcac y Alchichica, la concentración de cloruros es mayor que la de carbonatos y sulfatos (son de tipo atalasoalinos). Las especies de metazooplancton registradas (J. Ciro-Pérez y B. López-López, comunicación personal) muestran una mezcla de especies de afinidad salobre: un copépodo del grupo *Leptodiptomus sicilis*, los cyclopoideos *Eucyclops* cf. *pectinifer*, *E. torresphilipi* y *Macrocyclops albidus*, y dos especies de rotíferos (*Brachionus* grupo *plicatilis* y *Hexarthra jenkiniae*), además de cladóceros (*Ceriodaphnia* sp., *Pleoroxus varidentatus*, *Alona setulosa* y *Chydorus brevilabris*) y otros rotíferos (*B.*

calyciflorus y *Filinia opoliensis*) comunes en aguas dulces. En el lago se distribuye una especie de pez, *Poblana letholepis*, endémica al lugar y considerada como amenazada según la NOM-059-SEMARNAT-2001 (Semarnat, 2002).

Atexcac es un lago originado en el Cuaternario por una explosión freática que ha sufrido con el tiempo un proceso de desecación natural y humana, basado en el análisis de la lava, su origen ha sido calculado en 0.33 ± 0.08 millones de años (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007); es un lago de forma ovoide (Fig. 1), con una longitud máxima, superficie, volumen y profundidad menores que en La Preciosa (Cuadro 1), su orientación es SW-NE. La temperatura del agua es templada y oscila de 14.6 a 22 °C con el periodo de mezcla de enero a marzo a una temperatura alrededor de 15 °C. Su salinidad es de 6.5 g L⁻¹ y en su geología se observa que cuenta con una pared formada por calizas de origen mesozoico, mientras que las demás son de material volcánico. Es un lago con baja diversidad de fitoplancton y zooplancton, se tienen registradas algunas especies de metazooplancton (J. Ciros-Pérez y B. López-López, comunicación personal): un copépodo del grupo *Leptodiaptomus sicilis*, los cyclopoideos *E. torresphilipi*, *E. pseudoensifer* y *Paracyclops chiltonii* y dos especies de rotíferos (*B.* grupo *plicatilis* y *H. jenkiniae*), también hay un registro de cladóceros del género *Ceriodaphnia* (Macek *et al.*, 1994). El picoplancton presenta sus máximos poblacionales durante la mezcla (10⁷ cél. ml⁻¹), previo al crecimiento de las cianobacterias filamentosas. Los nanoflagelados heterotróficos y los ciliados abundan (<10² cél. ml⁻¹ y <5 cél. ml⁻¹).

Cuadro 1. Comparativo de algunas características de los lagos de la Cuenca Oriental considerados en este estudio (modificado de Arredondo, 1995).

	Atexcac	La Preciosa	El Carmen
Longitud máxima (km)	0.78	1.34	~14
Área superficial (km ²)	0.29	0.78	~84
Volumen (m ³ X 10 ⁶)	6.15	16.20	---
Profundidad máxima (m)	39.1	45.5	1.5
Salinidad (g L ⁻¹)	6.5	1.1	1.1-10.7

Métodos

Establecimiento y mantenimiento de cepas de *Leptodiatomus cf. sicilis* en laboratorio

Se tomaron muestras vivas de zooplancton provenientes de los lagos Atexcac (19° 20' N y 97° 27' W), La Preciosa (19° 22' N y 97° 23' W) y El Carmen (19° 15' – 19° 20' N y 97° 35' - 97°38' W). A partir de las muestras se aislaron aleatoriamente entre 100-150 organismos adultos (machos y hembras ovígeras), que fueron utilizados para iniciar las cepas de cultivo en el laboratorio. Los copépodos se colocaron en recipientes de vidrio de 4L, con agua preparada con sales comerciales (Instant Ocean®, Aquarium Systems) a la salinidad en la que se encontraba cada cuerpo de agua durante la colecta. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de temperatura y fotoperiodo constantes siguiendo la metodología propuesta por Montiel-Martínez *et al.* (2008).

Para el mantenimiento general y alimentación de las cepas de copépodos se han utilizado microalgas procedentes de cepas mantenidas en la colección del Laboratorio de Limnología de la FES Iztacala, UNAM: las algas verdes *Tetraselmis suecica* y *Chlorella vulgaris*, originalmente cedidas por el Instituto de Ciencias del Mar de Andalucía (Cádiz, España) y por la Universidad de Texas, respectivamente. Estas microalgas se eligieron porque se encuentran en el intervalo de tamaños de las partículas alimenticias de las cuales se alimentan los diferentes estadios de copépodos en condiciones naturales (Santer, 1996; Schallenberg y Burns, 2001). Con el fin de que las algas tuvieran una calidad constante, se establecieron cultivos semicontinuos (véase Boraas, 1993). Para *T. suecica*, el medio de cultivo se preparó con sales marinas comerciales o con medio EPA (USEPA, 1985) para *C. vulgaris*, disueltas en agua electrodesionizada (de un sistema Millipore Elix-5), esterilizada en autoclave y fertilizada con medio f/2 modificado (Guillard y Ryther, 1962).

Análisis de variabilidad y divergencia genética intra e interpoblacional

Durante las colectas realizadas para el aislamiento de copépodos, se colectaron muestras cualitativas de zooplancton con una malla de apertura de poro de 63 µm, que fueron

preservadas en alcohol absoluto. A partir de ellas, se aislaron 10 hembras adultas ovígeras y 10 machos adultos de *L. cf. sicilis* de cada una de las poblaciones estudiadas.

Se secuenció el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) cuya región de ~655 pares de bases ha sido probada como buen indicador para la identificación de organismos a nivel de especie (Ratnasingham y Hebert, 2007), y particularmente para el análisis filogenético de copépodos calanoideos (Lee, 2000). A partir de cada uno de los individuos aislados, se extrajo el ADN total utilizando el método de la Proteinasa K (Hoelzel y Green, 1992). Para amplificar el fragmento del gen COI se utilizaron los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Después se utilizó la técnica de ciclos de perfiles de temperatura para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) descrita por Lee (2000) y Cristescu *et al.* (2001), para detalles de la técnica ver Lodish *et al.* (1996) y Ruíz-Pérez (2008). El producto de PCR fue purificado con el kit QIAquick® (Qiagen, 2001) y posteriormente enviado para su secuenciación. Los productos obtenidos se alinearon utilizando el editor BigDye© Terminator v.3.1 como se describe en Hajibabaei *et al.* (2006) y secuenciados bidireccionalmente utilizando un secuenciador capilar ABI 3730 (Laboratorio de Análisis y Química de ADN, FES Iztacala, UNAM) siguiendo las instrucciones del fabricante (Martínez-Montiel *et al.*, 2008).

Además de las secuencias de los individuos de las tres poblaciones, también se utilizaron las de *L. siciloides* (ZPLMX814-06|ZPLMX845, ZPLMX816-06|ZPLMX847, ZPLMX817-06|ZPLMX848) *L. minutus* (GBA3095-08|EU825134, GBA3092-08|EU825137, GBA3041-08|EU825188), *L. novamexicanus* (ZPLMX182-06|ZPLMX213, ZPLMX921-06|ZPLMX928, ZPLMX922-06|ZPLMX929) y de *Mastigodiptomus albuquerquensis* (ZPLMX248-06|ZPLMX279, ZPLMX526-06|ZPLMX557, ZPLMX528-06|ZPLMX559), obtenidas de la base de datos del Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems, 2010) para hacer una comparación entre las especies. En este punto es necesario señalar que no fue posible utilizar secuencias de *L. sicilis* de la localidad tipo (Lago Michigan) u otra para compararlas con las de la Cuenca Oriental debido a que si bien ya fueron obtenidas por un grupo de trabajo de la Universidad de Windsor, Canadá, todavía no están disponibles para su uso al público general; por otro lado, del material colectado y

donado por el Dr. Manuel Elías Gutiérrez para nuestra revisión, proveniente los lagos Eire (Lei, 29-06-10; Centro, Toledo-Ohio, 10-07-10), Hurón (Warden, 25-07-10; Weter 2, 25-07-10) y Gran Lago (sin fecha), así como del río Detroit (Windsor, 30-07-10), no fue posible aislar ningún ejemplar de *L. sicilis*, por lo que el análisis de secuencias no pudo realizarse como se planeó. Todas las secuencias se alinearon usando el software Chromas 2.13 (Technelysium Pty Ltd., 2001) y MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007), las divergencias genéticas se calcularon utilizando el modelo de distancia de dos parámetros de Kimura o K2P (Kimura, 1980; 1981) y con los árboles de vecinos cercanos generados con las distancias K2P se obtuvo una representación gráfica del patrón de divergencia entre las especies (Saitou y Nei, 1987), por último, con el software MEGA 4 se elaboró un árbol simplificado de todas las poblaciones (Kumar *et al.*, 2004).

Análisis de morfología comparada

A partir de las muestras colectadas en campo y de los cultivos preexperimentales, se seleccionaron individuos adultos de ambos sexos de los tres diferentes cuerpos de agua. El trabajo de morfología comparada se realizó utilizando ejemplares completos así como diseccionados y montados en preparaciones, poniendo especial atención en aquellas características que definen a *L. sicilis* s.s como especie taxonómica, haciendo énfasis en las estructuras implicadas en el reconocimiento de pareja y apareamiento (Ting *et al.*, 2000; Dussart y Defaye, 2001).

Con el microscopio compuesto y el tubo de dibujo (Leica DM LB2), se realizaron los esquemas correspondientes (a un aumento de 1000x) y se midieron las estructuras ya referidas en cada individuo. Mediante fotografías obtenidas utilizando los microscopios electrónicos de barrido Hitachi S-400 de la Universidad de Valencia, España y JEOL JSM6360LV del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM se intentó encontrar diferencias a nivel fino entre las poblaciones. Además, se realizó una caracterización de las diferentes estructuras anatómicas siguiendo procedimientos estándar utilizados en la taxonomía de copépodos del género *Leptodiptomus* (p. e., Elías-Gutiérrez *et al.*, 1999; Suárez-Morales *et al.*, 2000b; Montiel-Martínez *et al.*, 2008).

Efecto de la salinidad sobre la supervivencia y desarrollo de las diferentes poblaciones

Se analizó la respuesta de las poblaciones a tres salinidades (1.1, 3.8 y 6.5 g L⁻¹), que incluyen las salinidades de los lagos La Preciosa (1.1 g L⁻¹), la de Atexcac (6.5 g L⁻¹), y una cercana a la presentada en El Carmen durante la colecta de los organismos (4.4 g L⁻¹) e intermedia con las de los otros lagos. Las diferentes salinidades se prepararon mediante la dilución de sales marinas comerciales con agua electrodesionizada y estéril. Se adicionaron microalgas en exceso (una mezcla de *C. vulgaris* y *T. suecica*; en una proporción 1:1; >20 mg CL⁻¹) como alimento para los copépodos, evitando así los efectos de limitación de recursos.

Supervivencia. Para determinar si existe o no tolerancia a los cambios en la salinidad (plasticidad fenotípica), se evaluó la supervivencia relativa de cada población en las diferentes salinidades experimentales utilizando la metodología propuesta por Montiel-Martínez *et al.* (2008). Previamente al inicio del experimento, los organismos fueron aclimatados gradualmente durante una semana al tratamiento correspondiente (cultivos preexperimentales).

Cada tratamiento se aplicó con 8 réplicas; las unidades experimentales consistieron de placas de poliestireno de seis pocillos, cada una con 8 ml de medio. En cada uno de los pocillos se colocó un organismo juvenil en estadio de copepodito 3 (C3). Esta elección se debe a dos razones: 1) los estadios C3 son etapas del desarrollo en las que hay una tolerancia intermedia a la salinidad, es decir, no son tan sensibles como las larvas nauplio y los estadios de copepodito temprano (C1 y C2), ni tan resistentes como los adultos (Cervetto *et al.*, 1999); y 2) los C3 tienen estructuras morfológicas fáciles de diferenciar respecto a los estadios predecesores.

Diariamente se hicieron los recuentos de los organismos y, en su caso, se eliminaron los organismos muertos; adicionalmente se hizo el recambio de las unidades experimentales y el medio de cultivo con la salinidad y alimento respectivos. Con los resultados se calcularon las tasas de supervivencia diarias para cada población.

Para comparar los efectos principales de los factores salinidad y tiempo en cada lago, así como su interacción, se hizo un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVAR; von Ende, 1993) de las supervivencias relativas en cada salinidad. Al encontrarse diferencias significativas en el ANOVAR, se realizaron pruebas *post hoc* de Student-Newman-Keuls (Sokal y Rohlf, 1969). Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa informático SPSS 17.0 (SPSS Inc., 2008).

Desarrollo. Para realizar estos experimentos se prepararon los medios con las diferentes salinidades y cantidad de alimento, de la misma manera que en los experimentos previos. Se evaluaron dos aspectos: 1) el efecto de las diferentes salinidades sobre el éxito de muda entre estadios en los organismos, y 2) el porcentaje de juveniles que llegaron a la madurez.

En cada experimento se contó con ocho réplicas por tratamiento, cada unidad experimental fue como se describió previamente y los organismos experimentales utilizados fueron copépodos en estadio C3. Los recambios y observaciones al microscopio, se efectuaron diariamente al igual que en los experimentos anteriores. En el caso del experimento de éxito de muda, se contabilizó la proporción de aquellos individuos que mudaron entre cada estadio (de C3 a C4, de C4 a C5 y de C5 a adulto). Si se encontraban organismos mudados, éstos eran contabilizados y puestos en medio nuevo, mientras que los exoesqueletos y los muertos se eliminaron.

Al finalizar el experimento de madurez se registró el estadio de desarrollo de los copépodos supervivientes y el número de aquellos que alcanzaron el estadio adulto. Para determinar si hay o no diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de salinidad se hicieron análisis estadísticos de comparación de medias (Dytham, 2003) y al encontrarse diferencias significativas en los análisis estadísticos, se realizaron pruebas *post hoc* de Student Newman Keuls (Dytham, 2003).

Experimentos de entrecruzamiento

Reproducción intrapoblacional. Se siguieron los procedimientos básicos con las salinidades experimentales que se describieron en los experimentos de supervivencia. Dado que se necesitaban hembras fecundadas, los cultivos preexperimentales consistieron de hembras en estadios avanzados de copepodito (C5) y machos adultos colocados en proporción 2:1, obtenidos de las poblaciones provenientes de los cultivos stock. Se seleccionaron 12 triadas de cada lago por tratamiento de salinidad (1.1, 3.8 y 6.5 g L⁻¹), colocándose cada una en matraces con 50 ml de medio. Las observaciones y recambios de medio se realizaron diariamente durante 15 días. Los individuos muertos se eliminaron y en caso de ser machos se sustituían por otros. Por otro lado, las hembras ovígeras o con espermatóforo fueron transferidas individualmente a placas de acrílico con 9 ml del medio. Se contabilizó el número de huevos puestos por hembra y se calculó el porcentaje de eclosión de los mismos (Santer y van den Bosch, 1994; Santer, 1996; Montiel-Martínez *et al.*, 2008). Para determinar si hubo o no diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se utilizaron las pruebas de comparación de medias y las pruebas *post hoc* de Student Newman Keuls, como se indica en el experimento de efecto de salinidad.

Reproducción interpoblacional. Este análisis se realizó comparando el éxito de apareamiento entre hembras y machos originarios de diferentes poblaciones (apareamientos interpoblacionales), y contrastándolo con el observado entre hembras y machos de una misma población (apareamientos intrapoblacionales). Los tratamientos se llevaron a cabo en condiciones de alimento en exceso, así como fotoperiodo y temperatura constantes. La salinidad a la cual se hicieron los experimentos se determinó a partir de los resultados de los experimentos tolerancia a la salinidad, eligiéndose 3.8 g L⁻¹, por ser la condición en la que las tres poblaciones involucradas mostraron un comportamiento relativamente óptimo y sobrevivieron exitosamente.

Los copépodos se obtuvieron de los cultivos preexperimentales y fueron aclimatados gradualmente incrementando o disminuyendo la salinidad durante periodos de 24 horas entre recambios de medio hasta alcanzar la salinidad experimental. Se siguió el

método de “no elección”, es decir, los machos que se colocaron pertenecían solamente a una población y las hembras a otra. Se separaron organismos juveniles en estadio C5 en los cuales se reconocían características sexuales de hembra, para así asegurar que en el experimento se utilizaran hembras no copuladas previamente y con características fisiológicas comparables.

Una vez alcanzada la madurez, se colocó cada hembra con dos machos adultos, en matraces de 50 ml de medio con alimento abundante y condiciones abióticas controladas, durante 15 días, hasta obtener un total de 80 observaciones (i. e., 3 apareamientos intrapoblacionales que fungieron como control y 5 apareamientos interpoblacionales, cada tratamiento contó con 10 réplicas); los datos de las cruzas interpoblacionales, que fungieron como control, fueron tomados del experimento anterior (véase Cuadro 2). Durante el experimento no se montó la crusa de hembras de Atexcac contra machos de El Carmen pues se estimó que el resultado obtenido no sería diferente al generado en la crusa de hembras de La Preciosa y los machos mencionados debido a la talla similar entre las hembras de ambas poblaciones. Se calculó el porcentaje de encuentros resultantes en cópula (transferencia de espermátforo) en cruzas intra e interpoblacionales, y en el caso de generarse cópulas interpoblacionales, las hembras copuladas se aislaron y se mantuvieron en observación para determinar la formación de huevos y posteriormente si éstos fueron viables y hubo eclosión de larvas. Para determinar si hubo o no diferencias significativas entre las diferentes cruzas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas *post hoc* de Student-Newman-Keuls (Sokal y Rohlf, 1969) utilizando el programa SPSS 17.0.

Cuadro 2. Combinaciones posibles de los experimentos de reproducción. Se indica el origen y sexo de los organismos experimentales. *i*: cruzas intrapoblacionales; ×: cruzas interpoblacionales; NO: esta crusa no se montó experimentalmente.

	♂ Atexcac	♂ La Preciosa	♂ El Carmen
♀ Atexcac	<i>i</i>	×	NO
♀ La Preciosa	×	<i>i</i>	×
♀ El Carmen	×	×	<i>i</i>

Estatus biológico y taxonómico de las tres poblaciones pertenecientes al taxón *Leptodiptomus cf. sicilis*

Sobre la base del conjunto de resultados obtenidos de las cuatro aproximaciones (i. e., ecología, reproducción, marcadores moleculares y morfología) se determinó si una, dos o las tres poblaciones se pueden considerar como especies biológicas distintas con morfología similar (especies gemelas), o si se trata de una sola especie con amplia plasticidad fenotípica o con fuerte adaptación local.

Resultados

Análisis de variabilidad y divergencia genética intra e interpoblacional

De los 30 individuos de las tres poblaciones de *L. cf. sicilis* a los que se les extrajo el ADN y amplificó el gen mitocondrial COI, se obtuvieron las secuencias correspondientes, pero se desecharon algunas por su tamaño deficiente (menor de 550 pb); de estas, se utilizaron para el análisis 7 de Atexcac, 6 de La Preciosa y 7 de El Carmen, todas con tamaño ≥ 607 pb; en el análisis también se incluyeron 3 secuencias de tres especies (9 en total) del género *Leptodiptomus* (*L. novamexicanus*, *L. siciloides* y *L. minutus*), y 3 secuencias de una especie de otro género afín (*Mastigodiptomus albuquerqueensis*), como grupo externo, para obtener un árbol de distancias genéticas más robusto (Fig. 2). Sin embargo, no fue posible incluir las secuencias de *L. sicilis* de organismos provenientes de los Grandes Lagos (i. e., *terra typica*), ya que no están disponibles en la base de datos del Barcode of Life Data o GenBank, ni tampoco se pudieron obtener de organismos provenientes de muestras colectadas en dichos cuerpos de agua, y donadas por el Dr. Manuel Elías Gutiérrez, con las que se tendría una idea completa de las relaciones filogenéticas de las poblaciones de la Cuenca Oriental con aquellas provenientes de localidades del norte del continente.

Las secuencias de *L. cf. sicilis* fueron editadas hasta un tamaño de 607 pb y alineadas junto a las de las especies de comparación seleccionadas, después se obtuvieron los valores medios de las distancias genéticas con el modelo de K2P, que se resumen en la Cuadro 3, obteniéndose en todas las poblaciones de Oriental valores menores al 2%, con la mayor divergencia entre El Carmen y La Preciosa (1.59%).

Cuadro 3. Porcentaje promedio \pm error estándar de la distancia genética según el modelo de 2 parámetros de Kimura (K2P). La representación gráfica se muestra en la Fig. 11. Car: El Carmen; Pre: La Preciosa; Ate: Atexcac; Ls: *L. siciloides*; Ln: *L. novamexicanus*; Lm: *L. minutus*; Ma: *M. albuquerquensis*.

	1. Car	2. Pre	3. Atex	4. Ls	5. Ln	6. Lm	7. Ma
1	0.26 \pm 0.1						
2	1.59 \pm 0.4	0.90 \pm 0.3					
3	0.94 \pm 0.3	1.47 \pm 0.4	0.42 \pm 0.2				
4	22.6 \pm 2.2	23.3 \pm 2.3	22.8 \pm 2.3	0.0 \pm 0.0			
5	22.2 \pm 2.3	23.3 \pm 2.4	23.0 \pm 2.4	20.1 \pm 2.2	0.13 \pm 0.1		
6	26.9 \pm 2.6	27.9 \pm 2.7	26.9 \pm 2.6	23.4 \pm 2.4	25.2 \pm 2.6	0.0 \pm 0.0	
7	25.4 \pm 2.5	25.8 \pm 2.4	25.3 \pm 2.4	22.6 \pm 2.4	27.0 \pm 2.7	28.9 \pm 2.8	1.0 \pm 0.4

Posteriormente se realizó el test de filogenia de vecinos más cercanos (*neighbor joining*), con un bootstrap de 1000 réplicas y el modelo de K2P, generándose un árbol de identidad (Fig. 2) y por último un árbol simplificado de todas las poblaciones (Fig. 3), en los cuales se observó que los individuos de cada población de la Cuenca Oriental se agrupan entre sí y separados de las otras, con una mayor cercanía entre los copéodos de La Preciosa y Atexcac con respecto a los de El Carmen, con haplotipos propios de cada población. Como era de esperarse, las secuencias de *L. novamexicanus*, *L. minutus*, *L. siciloides* y *M. albuquerquensis*, se separan por una distancia mayor (>20%) formando clados distintos.

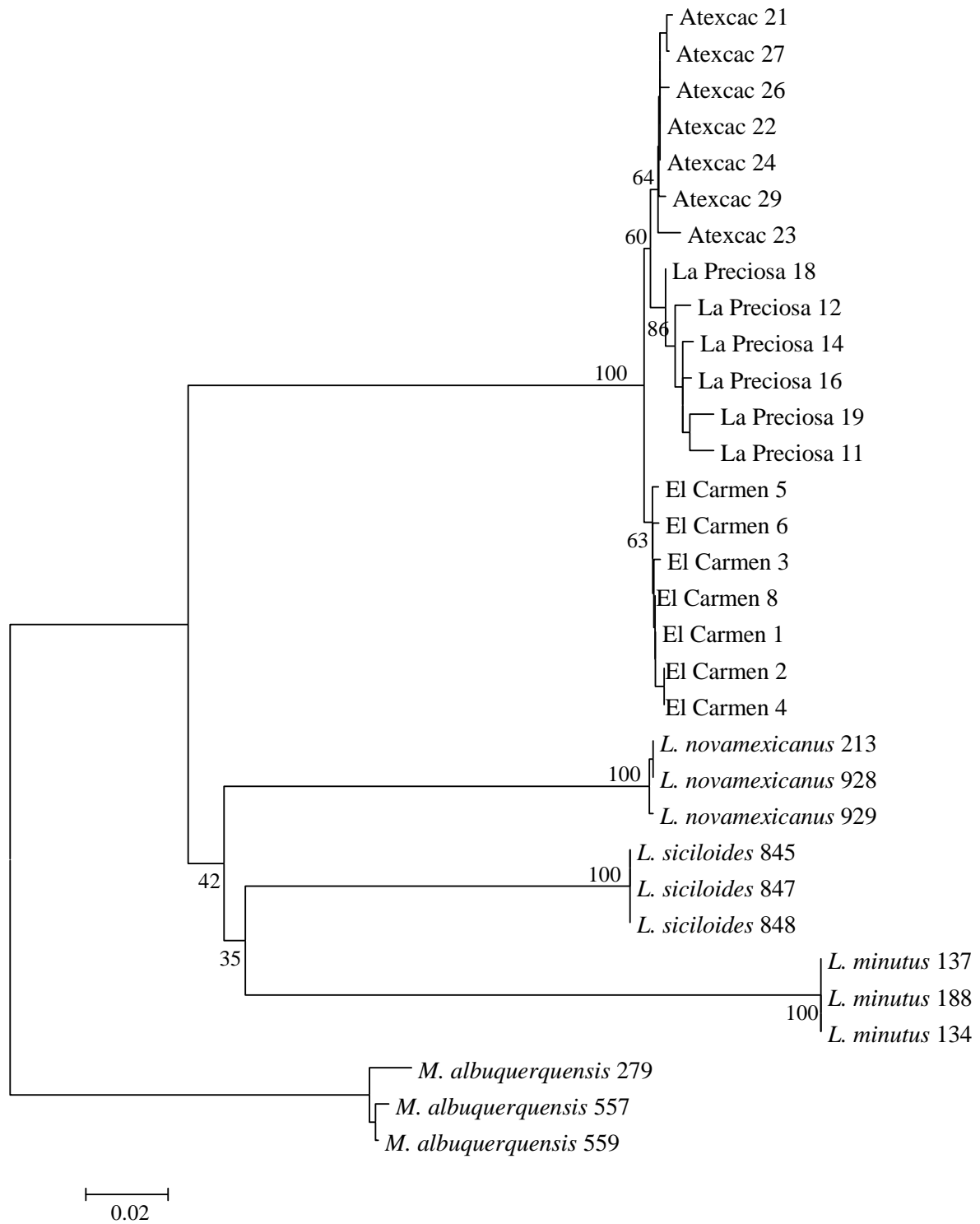


Fig. 2. Árbol de divergencia genética generado mediante el método de *neighbor-joining* (vecino más cercano) de las secuencias del gen COI de individuos de las 3 poblaciones de *L. cf. sicilis* provenientes de la Cuenca Oriental y de *L. siciloides*, *L. novamexicanus*, *L. minutus* y *M. albuquerqueensis* (véanse detalles en el texto) según el modelo de K2P. Los valores mostrados en cada clado corresponden al valor de *bootstrap* obtenido con el análisis de *neighbor joining*.

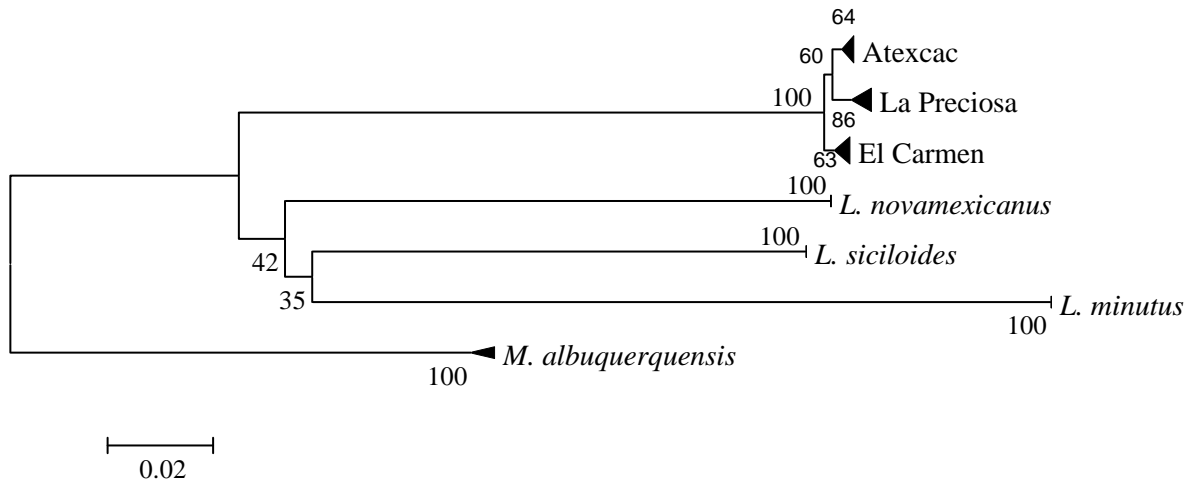


Fig. 3. Árbol simplificado de divergencia genética (vecino más cercano) de los individuos de las 3 poblaciones de *L. cf. sicilis* provenientes de la Cuenca Oriental y de *L. siciloides*, *L. novamexicanus*, *L. minutus* y *M. albuquerquensis*, según el modelo de 2 parámetros de Kimura. Los valores mostrados en cada clado corresponden al valor de *bootstrap* obtenido con el análisis de *neighbor joining*.

Análisis de morfología comparada

Al comparar a los copépodos de las tres poblaciones de la Cuenca Oriental con respecto a la descripción original de Forbes (1882), quien lo describió originalmente como *Diaptomus sicilis*, y con otra literatura especializada y las diferentes claves de identificación para adultos (Herrick, 1884; De Guerne y Richard, 1889; Schacht, 1897; Marsh, 1907 y 1918; Wilson y Yeatman, 1959; Lesko *et al.*, 2003; Aliberti *et al.*, 2009) y nauplios (Czaika, 1982), se confirmó que todos los especímenes corresponden al taxón *Leptodiptomus sicilis* (Fig. 4). Sin embargo, se observaron diferencias en las tallas tanto de machos como de hembras de cada población (Cuadro 4), siendo los organismos de El Carmen significativamente más grandes (ANOVA $P \leq 0.05$) que los de La Preciosa y éstos a su vez, que los de Atexcac (Fig. 5). En las tres poblaciones los machos son de menor talla que las hembras en poco más del 10%. También se encontraron patrones de coloración constantes en los organismos (rojos en El Carmen y Atexcac e incoloros en La Preciosa).

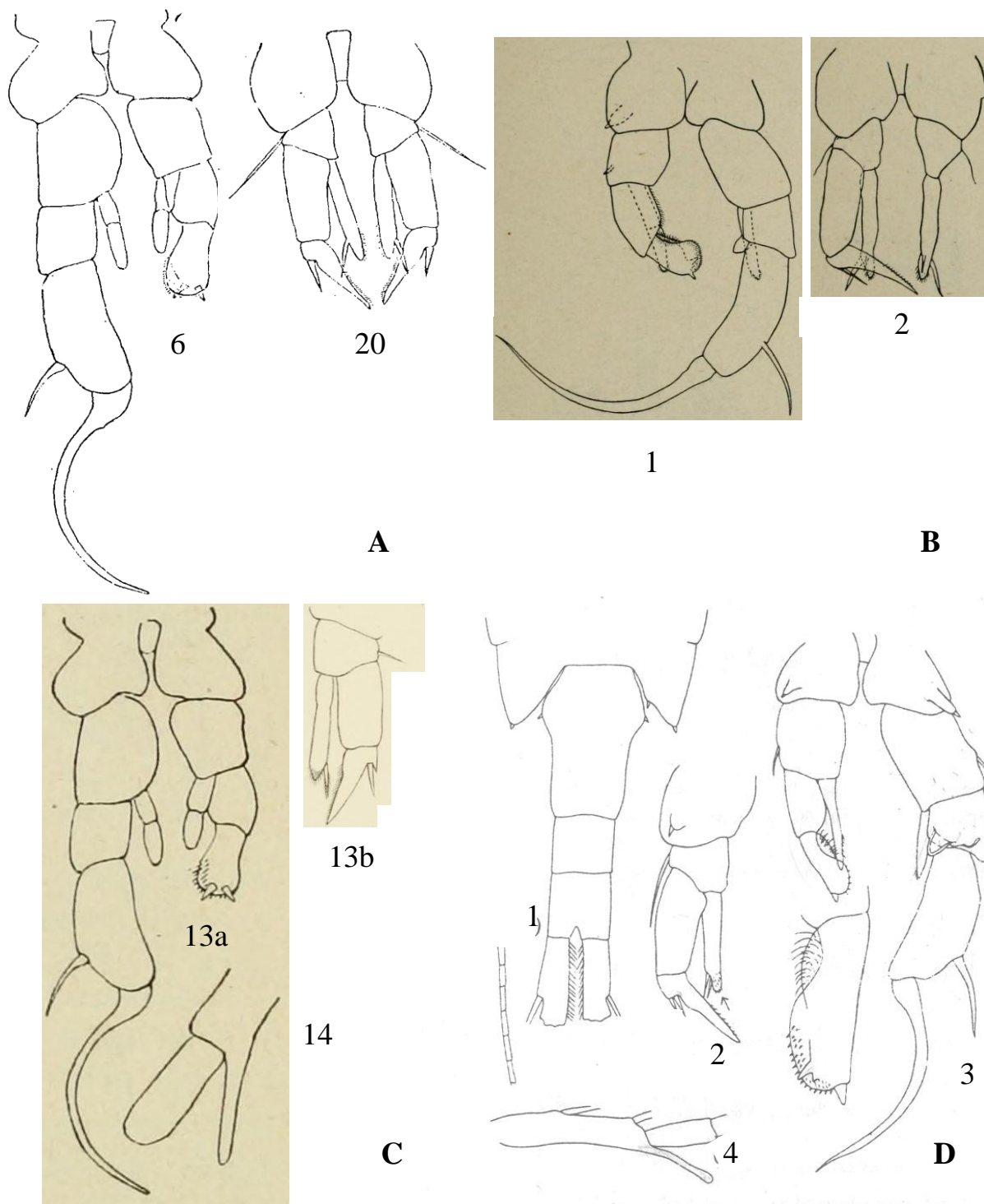


Fig. 4. Esquemas de *Leptodiaptomus sicilis*. A) Descripción original, 20: Quinta pata de hembra; 6: Quinta pata de macho (tomado de Forbes, 1882, Lám. VIII); B) 1: Quinta pata de macho; 2: Quinta pata de hembra; 3: Urosoma de hembra (tomado de Schacht, 1897, Lám. XXI); C) 13a: Quinta pata de macho; 14: Crecimiento en el segmento 23 de la anténula derecha del macho; 13b: Quinta pata de hembra; (tomado de De Guerne, 1889, Lám. II); D) 1: Urosoma de hembra; 2: Quinta pata de hembra; 3: Quinta pata de macho; 4: Crecimiento en el segmento 23 de la anténula derecha del macho (tomado de Wilson y Yeatman, 1959, Fig. 29.75).

Para comparar las poblaciones de los lagos estudiados con las provenientes de lugares próximos a la localidad (Lago Michigan) en la que fue descrito el taxón *L. sicilis* (Forbes, 1882) se pidió material biológico proveniente de los Grandes Lagos, el cuál fue donado por el Dr. Manuel Elías Gutiérrez, y colectado en los lagos: Eire (Lei, 29-06-10; Centro, Toledo-Ohio, 10-07-10), Hurón (Warden, 25-07-10; Weter 2, 25-07-10) y Gran Lago (sin fecha), así como del río Detroit (Windsor, 30-07-10), pero desafortunadamente no fue posible aislar ejemplares de *L. sicilis* de este material.

Cuadro 4. Comparación de la talla (mm; 0.88 - 1.43♀ : 0.77 - 1.29♂) de hembras y machos adultos de cada población estudiada, provenientes de ejemplares de campo. Se indican la existencia (*, °, “) de diferencias significativas resultado de la comparación entre hembras por una lado y machos (’) por el otro, de las tres poblaciones, según pruebas *post hoc* de Student Newman Keuls (ambas $P < 0.05$).

Lago	Atexcac		La Preciosa		El Carmen	
Sexo	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Rango de tallas (mm)	0.88 – 0.93 *	0.77 – 0.83 *’	1.06 – 1.16 °	0.92 – 1.01 °’	1.33 – 1.43 “	1.18 – 1.29 “’
Media y error est.	0.91±0.004	0.80±0.003	1.13±0.006	0.96±0.006	1.38±0.007	1.24±0.008
<i>n</i>	20	20	20	20	20	20
proporción ♂ / ♀	0.87		0.84		0.89	

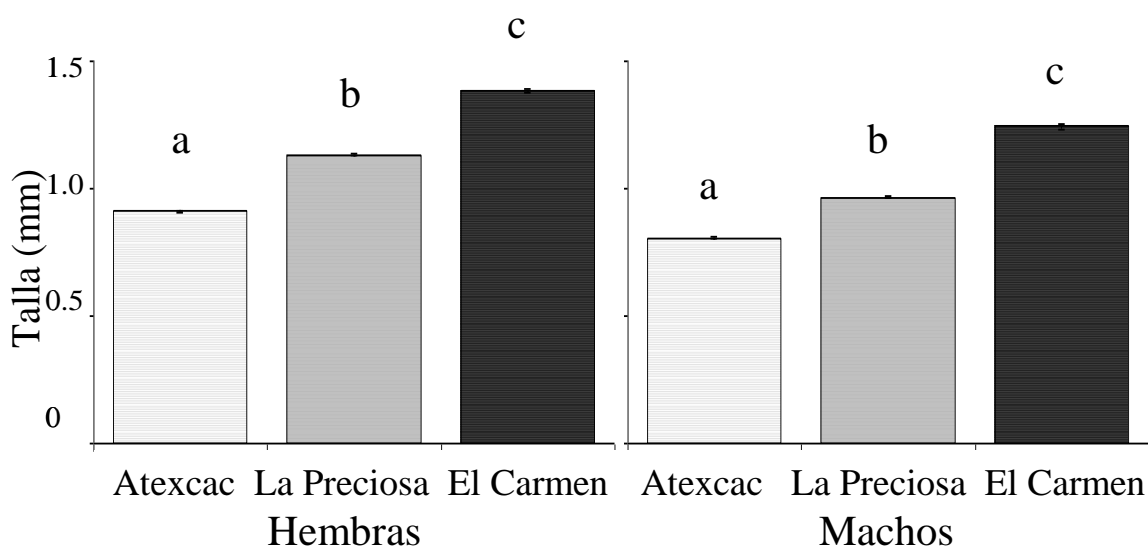


Fig. 5. Comparación de las tallas (mm) de los copépodos *L. cf. sicilis* de la Cuenca Oriental. Se indican las medias \pm error estándar y la existencia (a, b, c) de diferencias significativas entre las poblaciones, según una prueba *post hoc* de Student Newman Keuls ($P < 0.05$).

Después de hacer numerosas disecciones, esquemas, fotografías y observaciones en los microscopios compuesto y electrónico de barrido, se encontró que los organismos de los tres lagos tienen, en general, características similares en cuanto a la morfología de estructuras asociadas al dimorfismo sexual y proporción entre distintas estructuras de interés taxonómico del cuerpo. En la Cuadro 5 se muestra un resumen de algunas proporciones obtenidas de algunas estructuras implicadas en la reproducción, las cuáles, debido a su importancia en el apareamiento, nos harían suponer alguna divergencia en el reconocimiento de pareja, por lo menos temprana, entre las poblaciones. Sin embargo, se observó que, a pesar de las diferencias de tamaño del cuerpo entre las poblaciones de la Cuenca Oriental (Fig. 5), no existen diferencias importantes en los tamaños relativos de las diferentes estructuras analizadas, tales como en el proceso del antepenúltimo segmento de la anténula derecha del macho, de las proporciones entre los endópodos y exópodos de las quintas patas tanto de machos como de hembras, así como de las espinas laterales y garra del macho, etc. Tampoco se observaron diferencias importantes en la presencia o ausencia de procesos, espínulas, membranas, etc. en alguna parte del cuerpo.

Cuadro 5. Medidas de diferentes estructuras anatómicas de los copéodos de la Cuenca Oriental. Se indican los valores de media \pm error estándar (mm).

Proporción	Atexcac	La Preciosa	El Carmen
♂ A1, segmento 24 / crecimiento	1.363 \pm 0.007	1.361 \pm 0.021	1.365 \pm 0.023
♂ P5 izq., End./ Exp.2	1.056 \pm 0.005	1.058 \pm 0.006	1.060 \pm 0.006
♂ P5 der., End./Exp.2	0.484 \pm 0.010	0.477 \pm 0.013	0.505 \pm 0.010
♂ P5, espina lateral / Exp.2	0.456 \pm 0.005	0.457 \pm 0.010	0.468 \pm 0.009
♂ P5 der., garra / Exp.2	1.587 \pm 0.012	1.581 \pm 0.014	1.581 \pm 0.022
♀ P5 izq., End./ Exp.2	1.184 \pm 0.018	1.239 \pm 0.016	1.226 \pm 0.007

Efecto de la salinidad sobre la supervivencia y desarrollo de las diferentes poblaciones

Supervivencia. En nuestros experimentos se observó que las tres poblaciones tienen tolerancias diferenciales a la salinidad. En la Fig. 6 se resumen estos resultados. Se observa un efecto negativo a la salinidad baja (1.1 g L^{-1}) sobre la supervivencia de los copéodos de El Carmen y Atexcac, sobre todo en estos últimos; sin embargo, este efecto es al contrario en los copéodos de La Preciosa quienes muestran una supervivencia mayor a esta salinidad (Fig. 6). En el análisis dentro de cada lago, en Atexcac y La Preciosa se observan efectos significativos de la salinidad y el tiempo sobre la supervivencia de los copéodos (ambas, ANOVAR, $P \leq 0.05$), en El Carmen las diferencias no son significativas (ANOVAR, $P > 0.05$). Hay una mayor adecuación a la salinidad de su lago de origen en los copéodos de los lagos perennes.

Desarrollo. En los tres tratamientos se observó que bajo la salinidad más alta, el tiempo de desarrollo siempre fue menor que en la salinidad baja (Fig. 7), incluyendo La Preciosa, donde si bien una mayor cantidad de individuos llegaron antes al estadio adulto en la salinidad de 6.5 g L^{-1} , la tasa de supervivencia fue mayor en la salinidad de 1.1 g L^{-1} . Al término del experimento (15 días) se observó que en los tratamientos con la salinidad más baja había un número alto de copepoditos en estadios juveniles (C4 y C5) provenientes de los tres lagos, mientras que en la salinidades altas éstos eran pocos o ninguno.

La eficiencia de muda de los copépodos de las tres poblaciones es significativamente menor en las salinidades bajas durante las mudas de C4 a C5 y de C5 a adulto (todas, ANOVAs dos vías, $P \leq 0.05$; Fig. 8). En condiciones de salinidad más altas (3.8 y 6.5 g L^{-1}) los copépodos mostraron un menor tiempo entre mudas, desde C3 hasta adulto, que al someterse a la salinidad de 1.1 g L^{-1} .

Debido a que la supervivencia en la salinidad baja fue menor en El Carmen y Atexcac, era de esperarse, tal como pasó, que el número de organismos que se desarrollaron completamente hasta llegar a adultos tuviera niveles inferiores que los organismos tratados en salinidad alta.

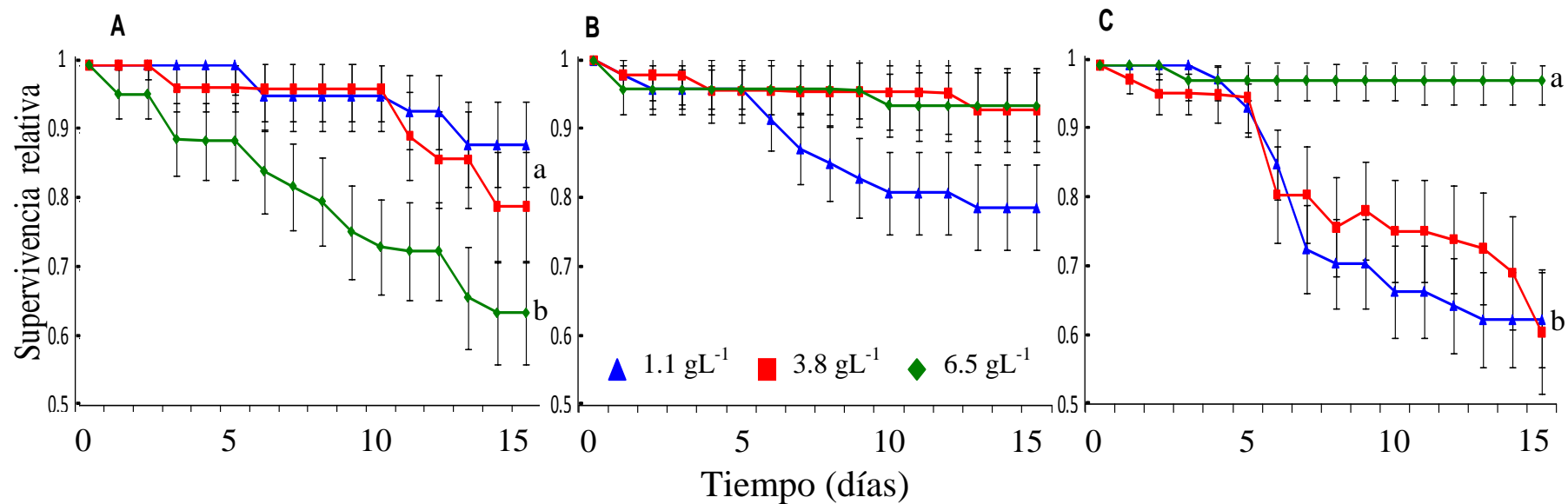


Fig. 6. Efecto de la salinidad sobre la supervivencia de las tres poblaciones de *L. cf. sicilis*: A) La Preciosa, B) El Carmen y C) Atexcac. Se indican las medias \pm de error estándar; letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos según pruebas *post hoc* de Student Newman Keuls ($P < 0.05$); véanse detalles en el texto.

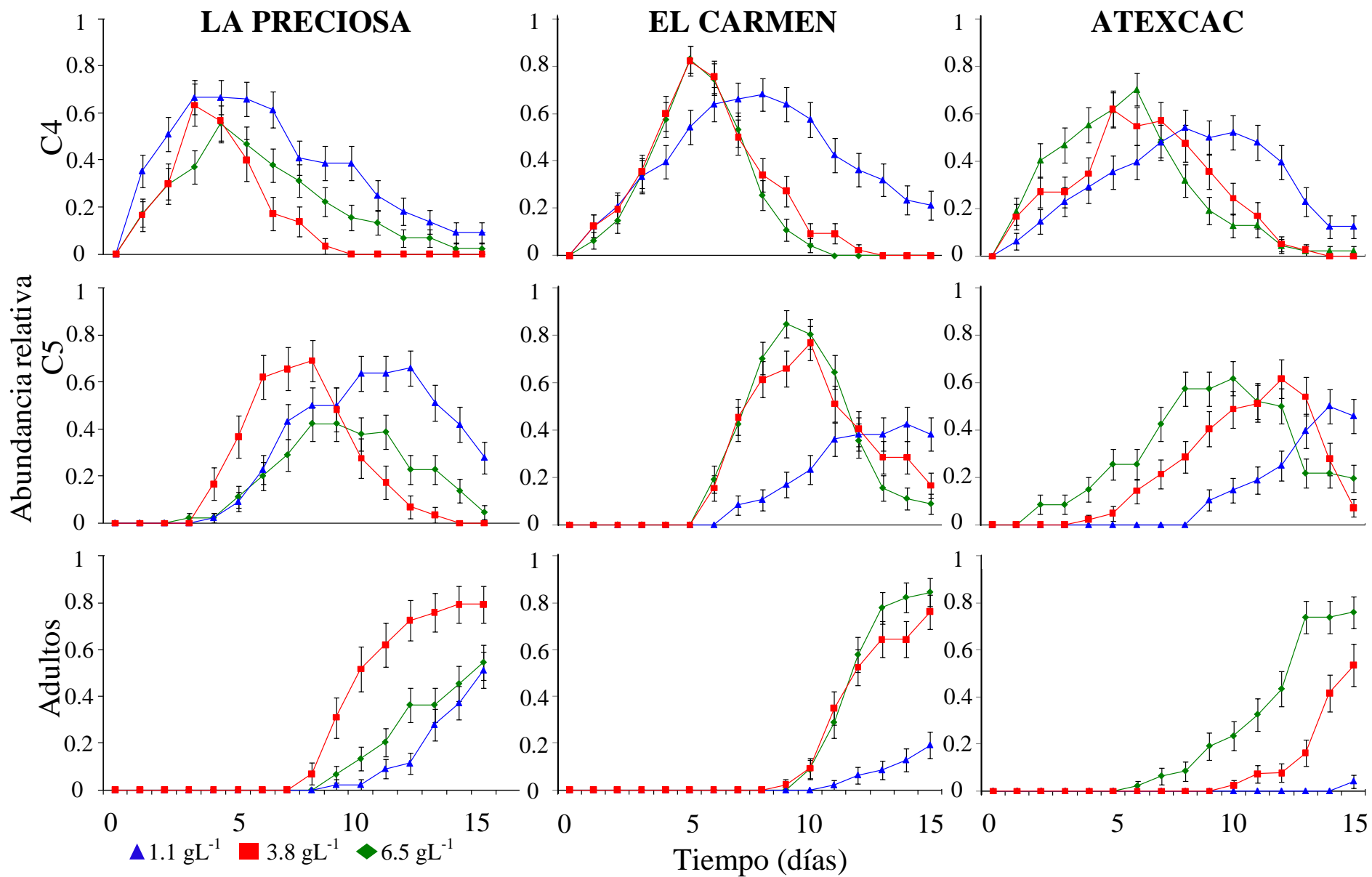


Fig. 7. Efecto de la salinidad sobre la dinámica de crecimiento (abundancia relativa de cada estadio en la cohorte experimental) de las tres poblaciones de *L. cf. sicilis*. Se indican las medias \pm de error estándar.

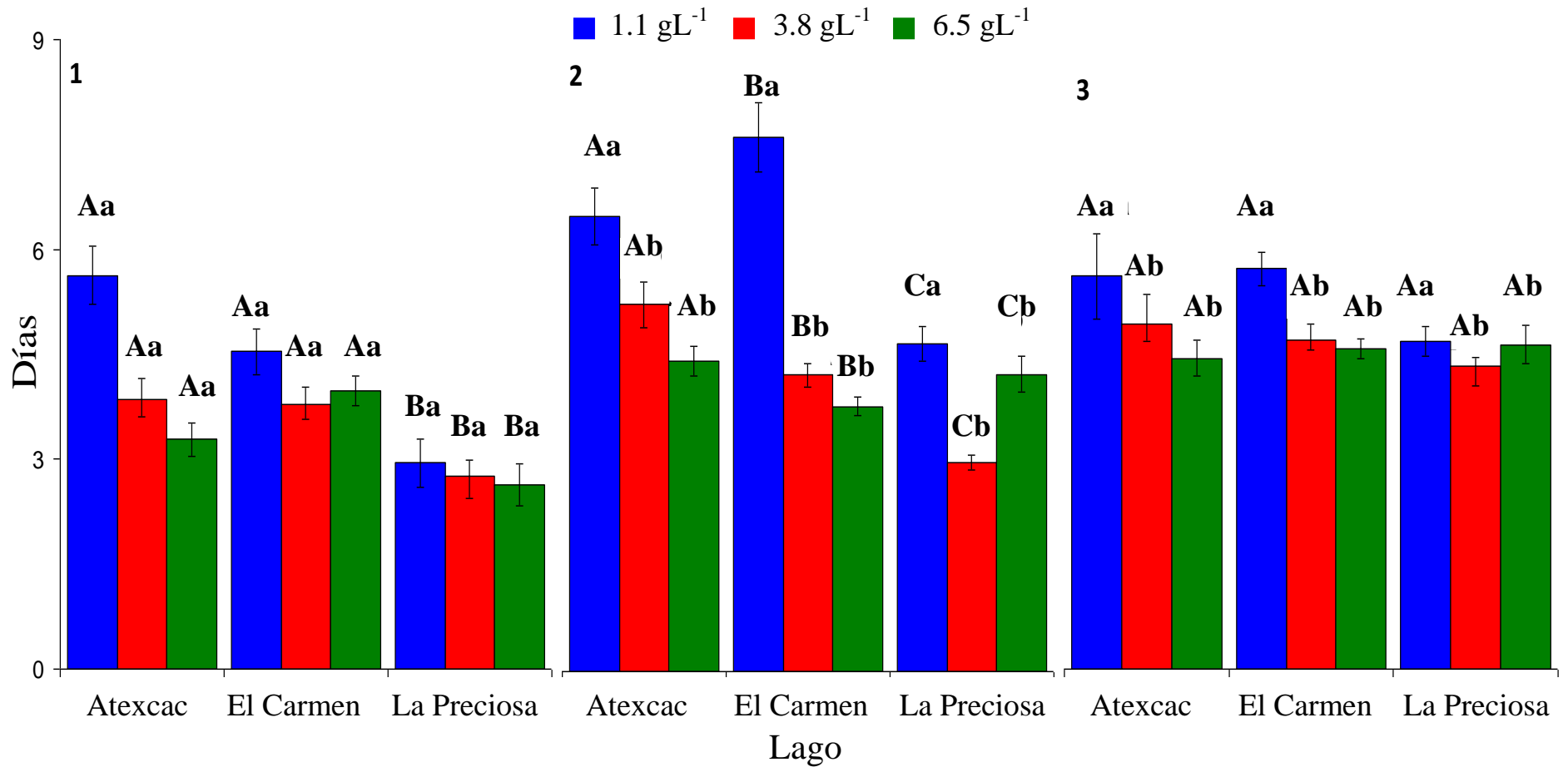


Fig. 8. Efecto de la salinidad sobre el desarrollo (tiempo transcurrido para mudar de un estadio a otro) de las tres poblaciones de *L. cf. sicilis*. 1) Tiempo de muda de estadio C3 a C4; 2) de estadio C4 a C5; 3) de estadio C5 a Adulto. Se indican las medias \pm de error estándar y la existencia de diferencias significativas entre algunos tratamientos, según pruebas *post hoc* de Student Newman Keuls ($P < 0.05$). Las letras mayúsculas (A, B y C) indican diferencias significativas en el factor Lago; las letras minúsculas (a y b) indican diferencias significativas en el factor salinidad; véanse detalles en el texto.

Experimentos de entrecruzamiento

Reproducción intrapoblacional. En la población de Atexcac se observó un efecto negativo importante de la salinidad baja (1.1 g L^{-1}) sobre la cantidad de hembras fecundadas; caso contrario a los copépodos de La Preciosa donde a su salinidad habitual, las hembras tuvieron un mayor porcentaje de fecundación, el cual decreció cerca del 75% al aumentar la salinidad (Fig. 9). En El Carmen, el efecto de la salinidad sobre la proporción de hembras fecundadas no fue notorio, teniendo relativamente una menor cantidad de hembras con espermatóforo en la salinidad baja (Fig. 9).

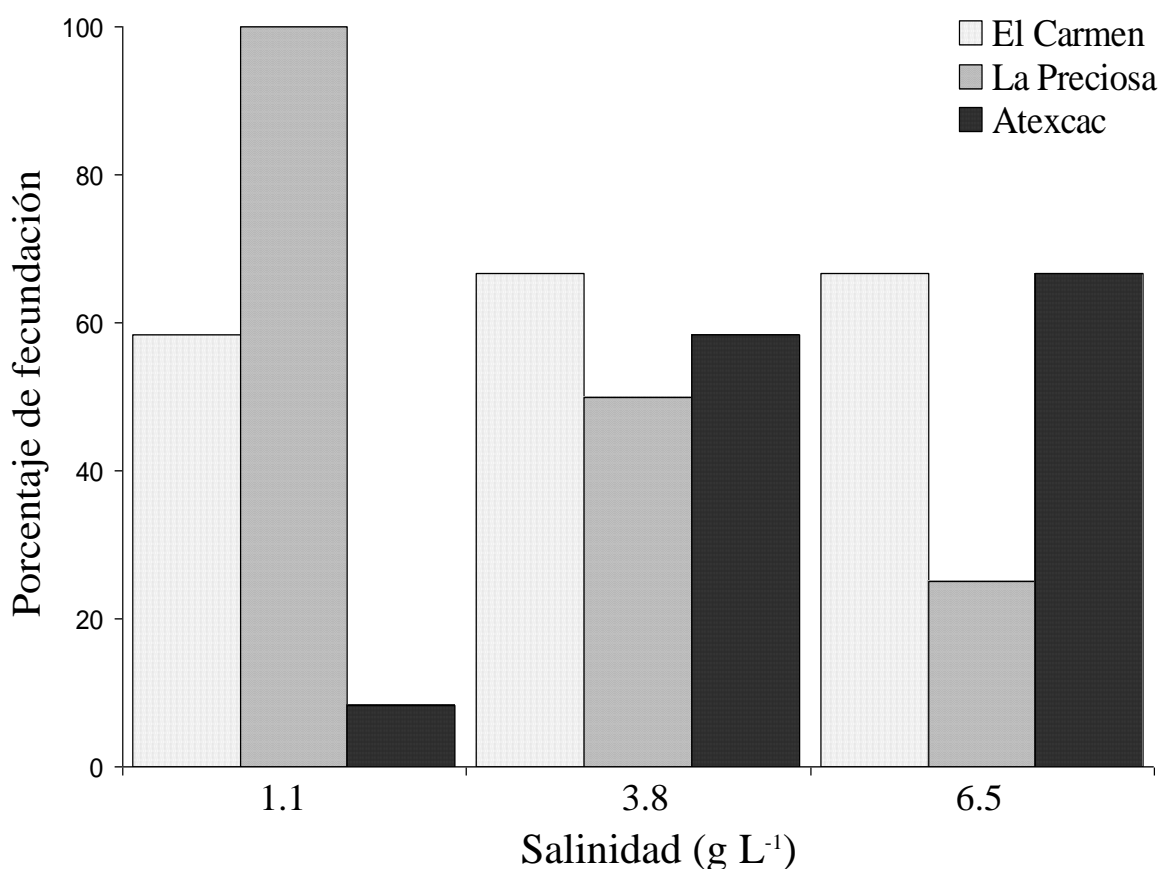


Fig. 9. Porcentaje de hembras fecundadas en las cruzas intrapoblacionales en cada tratamiento de salinidad.

En cuanto a la cantidad de huevos producidos (Fig. 10A) y larvas nauplio (Fig. 10B) eclosionadas en las poblaciones experimentales de cada lago, las hembras de El

Carmen mostraron valores significativamente mayores a su salinidad natural (3.8 g L^{-1}) en ambos parámetros respecto a las hembras de las otras poblaciones (ANOVAs, $P \leq 0.05$). En estas hembras se observó el número mayor de huevos (más de 20 en algunos casos) y nauplios en las salinidades intermedia y mayor; en la salinidad de 1.1 g L^{-1} las hembras de La Preciosa mostraron diferencias significativas respecto a El Carmen y Atexcac tanto en el número de huevos producidos como en la cantidad de larvas eclosionadas (ANOVAs, $P \leq 0.05$); mientras que las hembras de Atexcac mostraron cantidades menores en ambos casos en los tres tratamientos, pero con valores mayores bajo las salinidades altas.

Respecto a la tasa de eclosión (no. de nauplios eclosionados respecto al no. de huevos producidos por hembra) solamente se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $P \leq 0.05$) en la salinidad menor entre los copépodos de La Preciosa y El Carmen (Fig. 10C), en los demás tratamientos no se observaron diferencias significativas asociadas al factor de salinidad (ANOVAs, $P > 0.05$). Así, en Atexcac, aún cuando el número de huevos y nauplios fue menor que las presentadas por las hembras de El Carmen y La Preciosa en el mismo tratamiento, se observó una mayor proporción de nauplios eclosionados a su salinidad natural (6.5 g L^{-1}), aunque como ya se indicó, no existieron diferencias significativas con respecto a las otras poblaciones. Por otro lado, en esta misma población se observó un decremento en la tasa de eclosión al disminuir la salinidad, siendo nula en la salinidad de 1.1 g L^{-1} . Por el contrario, las hembras de La Preciosa mostraron una tasa de eclosión descendente conforme aumentó la salinidad, siendo mucho mayor bajo sus condiciones naturales. En las hembras de El Carmen se observa una mayor tasa de eclosión a su salinidad natural, similar a la presentada en la salinidad alta, pero mayor a la registrada en la salinidad baja.

Reproducción interpoblacional. En las cinco cruzas interpoblacionales en las que consistió el experimento se observó, aunque con diferentes tasas de éxito (ANOVA, $P < 0.05$), el reconocimiento de pareja, la transferencia de espermatóforo del macho a la hembra (Fig. 11), la formación de huevos (Fig. 12A) y la eclosión de larvas nauplio (Fig. 12B).

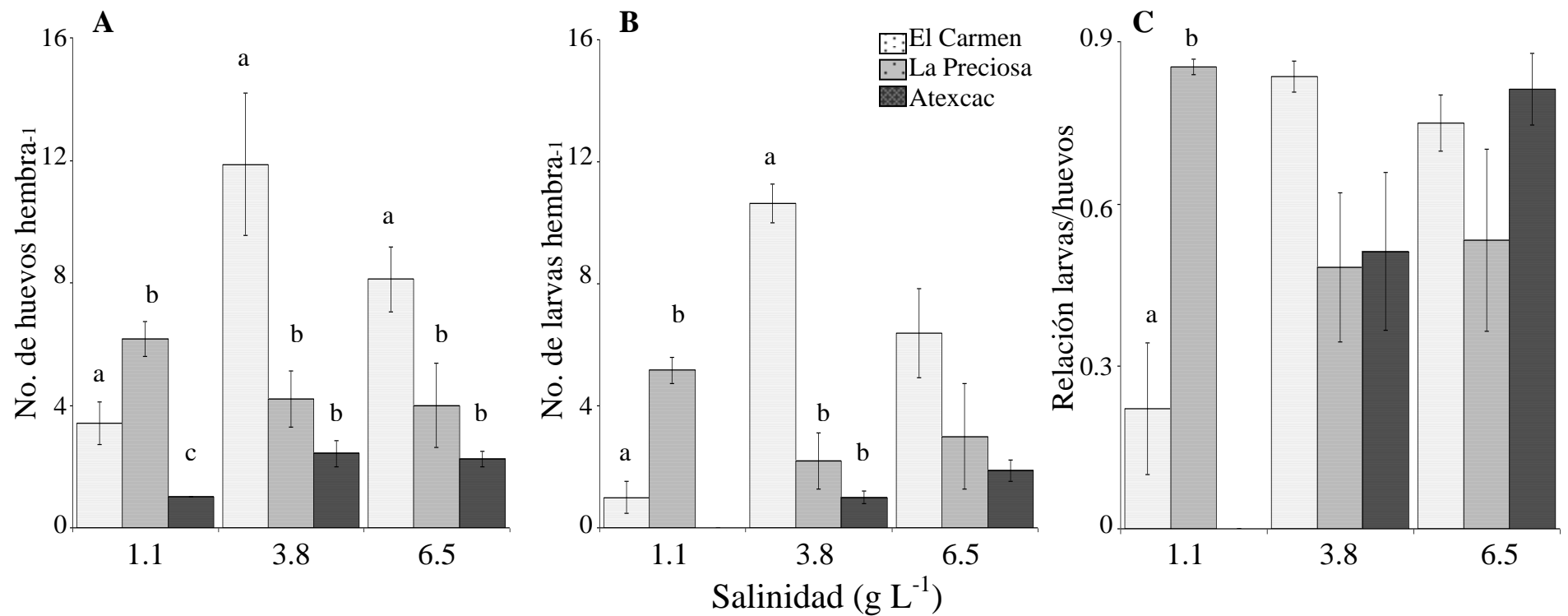


Fig. 10. Reproducción intrapoblacional. A) Número de huevos producidos por hembra; B) Número de larvas nauplio eclosionadas por cada hembra fecundada en las cruces a diferentes salinidades; C) Tasa de eclosión (proporción de nauplios eclosionados del total de huevos puestos por cada hembra). Se indican las medias \pm error estándar y la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas *post hoc* de Student Newman Keuls ($P < 0.05$).

Se observó que las cruzas que involucraban hembras provenientes de La Preciosa y Atexcac mostraron porcentajes de fecundación similares, mientras que en todas las cruzas donde se vieron involucradas las hembras de El Carmen se tuvo una cantidad más elevada de huevos y larvas nauplio producidas, con un valor mayor en la crusa intrapoblacional, pero significativamente menor (ANOVAs $P \leq 0.05$) al cruzarse con machos de las otras poblaciones como se muestra en las Figuras 12A y 12B. Por su parte, tanto las hembras de La Preciosa como las provenientes de Atexcac generaron una menor cantidad de huevos y nauplios en las cruzas intrapoblacionales pero sin mostrar diferencias significativas entre sí y con las cruzas interpoblacionales (ANOVAs $P > 0.05$). Finalmente, la tasa de eclosión (Fig. 12C) no mostró diferencias significativas (ANOVA, $P > 0.05$) entre las diferentes cruza experimentales.

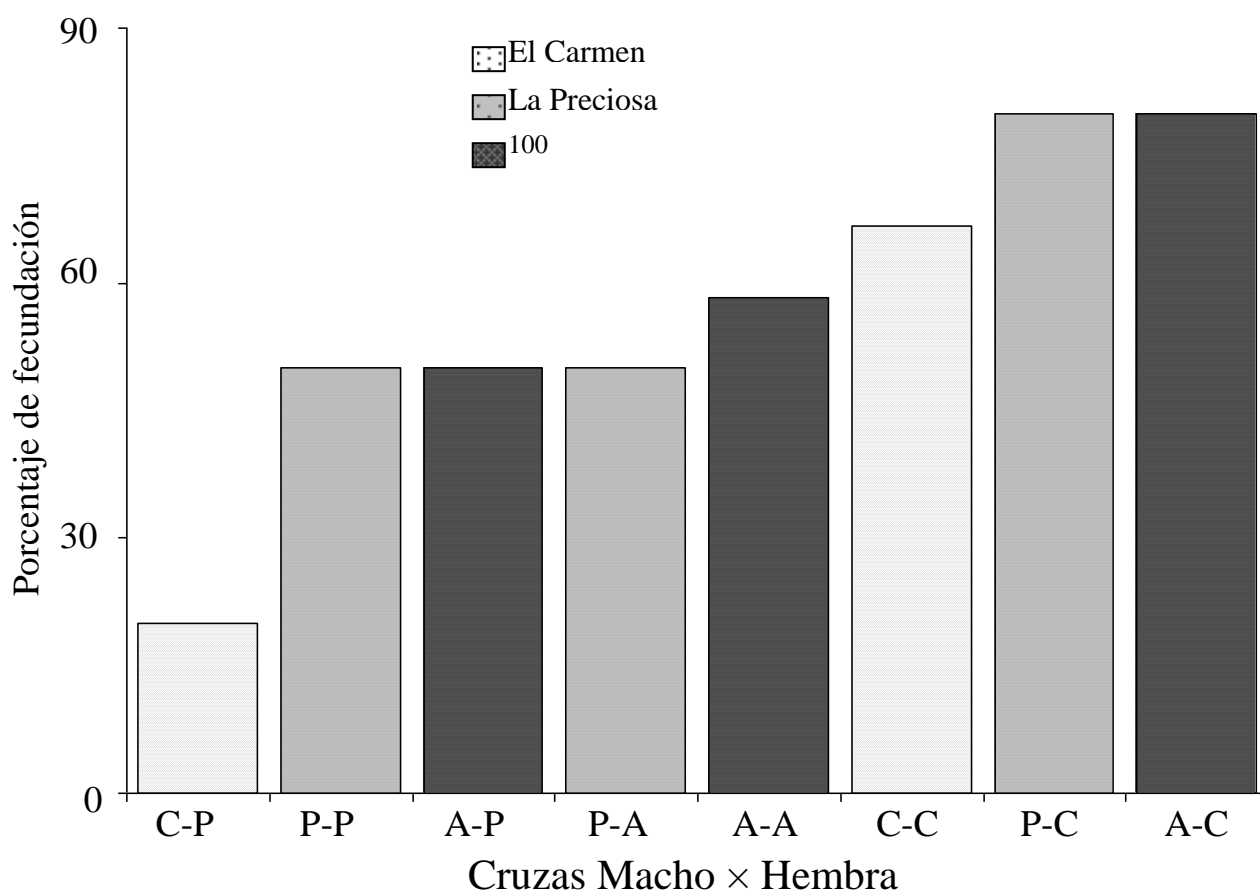


Fig. 11. Porcentaje de hembras fecundadas en las cruza interpoblacionales a 3.8 g L^{-1} de salinidad. C. El Carmen; P. La Preciosa; A. Atexcac.

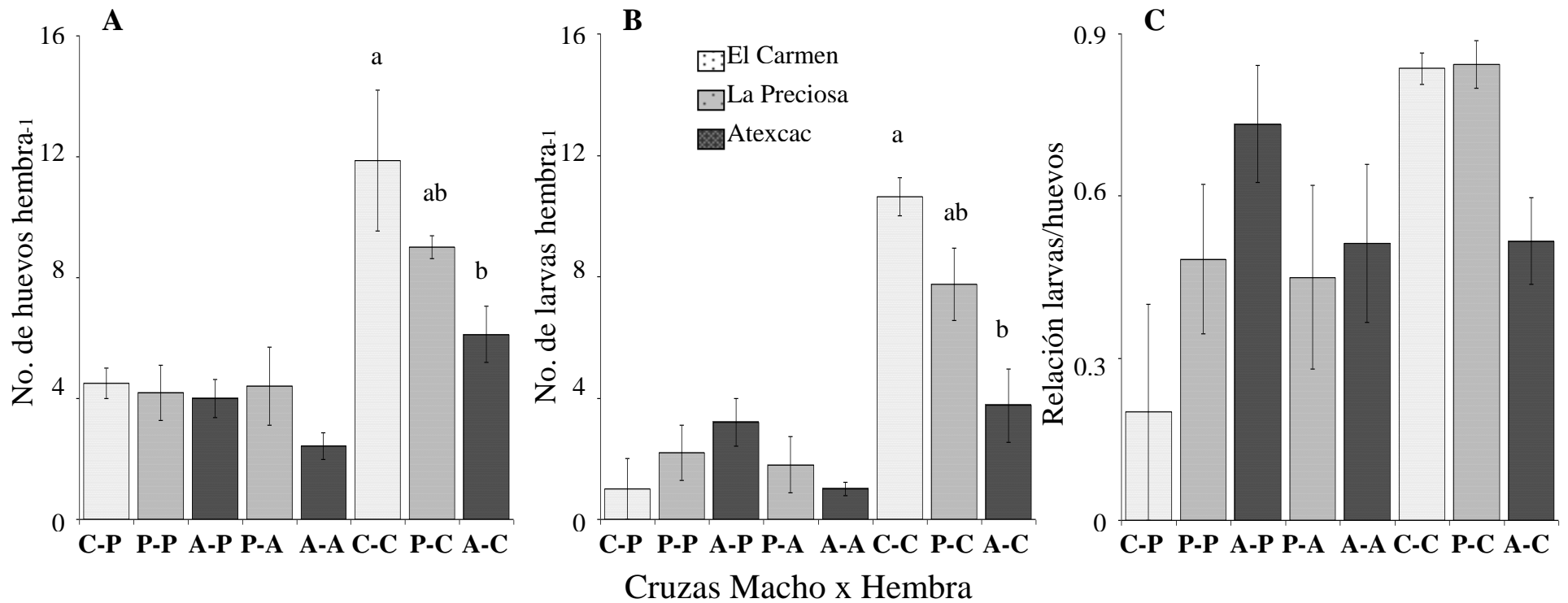


Fig. 12. Reproducción interpoblacional. A) Número de huevos producidos por hembra; B) Número de larvas nauplios eclosionados por cada hembra fecundada en las cruza interpoblacionales; C) Tasa de eclosión (proporción de nauplios eclosionados del total de huevos puestos por cada hembra). Se indican las medias \pm de error estándar y la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, según una prueba *post hoc* de Student Newman Keuls ($P < 0.05$). C: El Carmen P: La Preciosa A: Atexcac.

Discusión

Análisis de variabilidad y divergencia genética intra e interpoblacional

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una pequeña molécula contenida en las mitocondrias y es heredado a los descendientes solo por vía materna. Se caracteriza por la ausencia de recombinación, por lo que los cambios en la secuencia se deben solo a mutaciones, y por una tasa de evolución más rápida que el ADN nuclear, probablemente como consecuencia de la carencia de mecanismos de reparación de las mutaciones tras la replicación (Ruíz-Pérez, 2008). Su mayor tasa de evolución permite descubrir diferencias genotípicas y abordar relaciones de filogenia entre organismos, por lo que se han desarrollado técnicas para identificar especies a partir del análisis de las diferencias en genes del ADNmt, como el citocromo oxidasa subunidad I (COI), considerado una buena herramienta taxonómica conocida como el Código de Barras (Ratnasingham y Hebert, 2007; Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008), y el cual fue utilizado como marcador molecular para analizar la divergencia genética de las poblaciones de *L. cf. sicilis* de la Cuenca Oriental.

En nuestros resultados obtenidos utilizando el gen COI, se encontró que los valores de la variación molecular entre las poblaciones fue menor al 2%, lo cual indica que los organismos que habitan en esta zona geográfica pueden, a priori, agruparse dentro de la misma especie (Costa *et al.*, 2007). Sin embargo, si se analiza la existencia de diferencias genéticas importantes y la existencia de haplotipos que no se comparten entre poblaciones, se puede inferir la existencia de un papel importante del aislamiento geográfico y los factores locales tales como la salinidad, aún en esta región geográfica pequeña. Así, de acuerdo con estos resultados, ambos factores parecen determinar los patrones de diversificación genética de esta especie, por lo que es factible que las divergencias interpoblacionales pueden ir acumulándose con el tiempo, y eventualmente impedir la compatibilidad y flujo genético entre ellas. Además, algunos autores han señalado al proceso de divergencia en genes mitocondriales implicados en el proceso respiratorio como uno de los motores en el proceso de especiación, en donde la interacción entre los genomas mitocondrial y nuclear, con tasas de evolución a diferente velocidad, pueden tener

problemas de falta de sincronía en el proceso bioquímico de transferencia de electrones durante respiración celular, afectando la salud y viabilidad de los híbridos formados en cruza entre poblaciones genéticamente divergentes (Ellison y Burton, 2008).

Si bien los resultados sobre la distancia genética entre las poblaciones de la Cuenca Oriental parecen ser insuficientes para reconocerlas como especies distintas, y que los lagos de la Cuenca y los organismos que los habitan se encuentran a una distancia relativamente corta (menor a 20 Km), además de que el tiempo que llevan separadas las poblaciones desde que colonizaron estos lagos (~35,000 años; Caballero *et al.*, 2003) podría ser todavía insuficiente si tomamos en cuenta los resultados de Lee (2000), cuyos copépodos analizados por lo menos tenían 300,000 años de evolucionar por separado y en ocasiones a miles de kilómetros de aislamiento geográfico, no se debe olvidar que la distancia geográfica que separa a los lagos de la Cuenca Oriental puede tomar gran importancia si se considera que los copépodos en cuestión podrían no presentar una plasticidad fenotípica suficiente para soportar las diferencias en las condiciones abióticas. Además, no solo es importante tolerar ambientes diferentes, se debe de tener la capacidad adecuada para la dispersión pasiva de sus estructuras de resistencia, sin la cual, la diseminación y colonización, aún a estas distancias, no serían posibles. Ligado a lo anterior y al uso de marcadores moleculares para encontrar patrones de diversificación entre invertebrados dulceacuícolas, Bohonak y Jenkins (2003) refieren que estudios que han utilizado estas técnicas a menudo encuentran que poblaciones locales de tales organismos muestran divergencias genéticas, lo que implicaría tasas de dispersión bajas incluso a escalas espaciales pequeñas o flujo génico no muy fuerte, indicando la existencia de patrones de heterogeneidad microgeográfica, persistencia del efecto fundador, posibles endemismos y una profunda estructura filogeográfica.

A diferencia de lo encontrado en la Cuenca Oriental, el uso de marcadores moleculares ha evidenciado diferencias importantes entre distintas poblaciones de organismos sin discrepancias morfológicas entre sí, llegando a separarlas y otorgándoles el rango de especie (Leibold y Geddes, 2005). Un ejemplo sobre esta aproximación es aquel obtenido con el crustáceo *Hyaella azteca*, en el cual se halló que en realidad se trata de un

complejo de especies gemelas con al menos 7 integrantes distintos (Witt y Hebert, 2000). Lane (2009) recuerda otra muestra de la eficacia del gen COI separando al grupo de la mariposa *Astrartes fuligator* en 10 especies diferentes; en copépodos destaca el trabajo de Lee (2000) con *Eurytemora affinis*, donde la autora combinó el asilamiento reproductivo y un par de marcadores moleculares para identificar un conjunto de especies gemelas. Con relación a México, Elías-Gutiérrez *et al.* (2008b) y Montiel-Martínez *et al.* (2008) realizaron estudios que han contribuido al reconocimiento de nuevas especies del zooplancton utilizando entre otros parámetros este gen mitocondrial.

Por último, es necesario señalar que para realizar este análisis no se contó con secuencias de individuos de *L. sicilis* provenientes de los Grandes Lagos de América del Norte, y con las que dadas las divergencias genéticas obtenidas dentro de la Cuenca Oriental y las distancias geográficas mayores con respecto a estos lagos, no se debe descartar la posibilidad de que al comparar nuestra secuencia con aquellas de los lagos donde se describió originalmente la especie, los clados formados por las poblaciones de la Cuenca Oriental muestren divergencias genéticas importantes que revelen la existencia de un taxón diferente en agua mexicanas. Un caso similar ocurrió con los rotíferos *Brachionus* grupo *plicatilis* distribuidos en la misma zona de estudio, los cuales a pesar de mostrar divergencias genéticas bajas entre sus poblaciones, fue posible distinguirlos como una especie distinta al compararlas con secuencias provenientes de organismos de otras regiones del mundo (Alcántara-Rodríguez, 2010).

Análisis de morfología comparada

El ciclo de vida de *L. sicilis*, comprende 12 estadios de desarrollo postembrionario divididos en dos grupos: larvas nauplio (seis estadios; N1-N6) y copepoditos (seis estadios; CI-CVI o adulto). Los machos cuentan con la antena derecha geniculada, con 5 segmentos en el urosoma y una estructura asimétrica del quinto par de patas, donde la pata derecha es alargada y termina en la garra copulatoria; en cambio, las hembras no tienen la antena geniculada, los segmentos del urosoma están fusionados y el quinto par de patas es simétrico (Balcer *et al.* 1984; Sandercock y Scudder, 1994; Great Lakes Science Center,

2008). Todas estas estructuras tienen una gran importancia al momento del reconocimiento de pareja y para llevar a cabo la cópula, por lo que, considerado que el sistema de reconocimiento sexual define el campo para la recombinación genética, de existir diferencias morfológicas entre las poblaciones, muy probablemente estas ocurrirían en tales estructuras, seleccionadas para proporcionar un mayor éxito reproductivo. De esta manera, los caracteres sexuales secundarios de los individuos adultos han sido utilizados exitosamente para diferenciar entre taxones en las claves de identificación (p. e. Wilson y Yeatman, 1959).

Debido a que los resultados de este análisis arrojaron diferencias significativas solo en la talla de los organismos, se debe tener en cuenta que variables como la temperatura del agua tienen un efecto sobre el crecimiento de los diatómidos, los cuales muestran tallas mayores en ambientes con temperaturas frías que bajo temperaturas cálidas (Williamson y Reid, 2001). El tamaño corporal también se ve afectado por el alimento, siendo más grandes los organismos cuando la comida es abundante (Balcer *et al.* 1984). Dado que los ejemplares utilizados en el análisis de morfología comparada fueron obtenidos directamente de muestras de campo, es probable que las condiciones antes mencionadas pudieron influir en las tallas diferenciadas, sin embargo, se pueden descartar tales efectos, pues las diferencias de talla entre poblaciones no cambiaron aún en los organismos mantenidos en condiciones de laboratorio, las cuales fueron las mismas para todos los cultivos utilizados en los experimentos con el fin de eliminar el posible efecto de la variación ambiental (p.e., la temperatura y el alimento).

Al comparar los resultados encontrados de las tallas de los copépodos con respecto a los obtenidos de la literatura (Schacht, 1897; Wilson y Yeatman, 1959; Robertson y Ganon, 1981; Balcer *et al.*, 1984; Torke, 2001), de organismos provenientes de los Grandes Lagos, se observa que éstos siempre son de mayor talla que el promedio de los ejemplares colectados y medidos de la Cuenca Oriental (Cuadro 6), debido tal vez a la menor temperatura del agua que presentan durante todo el año los lagos del norte del continente.

Cuadro 6. Comparación de la talla (mm) de hembras y machos adultos de los Grandes Lagos (Schacht, 1897; Wilson y Yeatman, 1959; Robertson y Ganon, 1981; Balcer *et al.*, 1984; Torke, 2001) y de la Cuenca Oriental (este estudio).

Lago	Lago Michigan		Lago Eire		Lago Superior		Cuenca Oriental	
Sexo	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Rango de tallas (mm)	1.2 - 1.3	1.0 - 1.2	1.2 - 1.9	1.1 - 1.5	1.5 - 1.8	1.3 - 1.4	0.9 - 1.4	0.8 - 1.3
Media	1.25	1.1	1.55	1.30	1.66	1.38	1.14	1.0
Proporción ♂ / ♀	0.88		0.84		0.83		0.86	

Por otro lado, se observó que las variaciones en el color (rojos en Atexcac y El Carmen y traslúcidos en La Preciosa) que se muestran entre las diferentes poblaciones de la Cuenca Oriental (en campo y en cultivos de laboratorio) recuerdan los cambios estacionales en la coloración reconocidos en la descripción de Forbes y que pueden ser ocasionados por el tipo de alimento consumido (Balcer *et al.*, 1984); sin embargo es importante señalar que en las poblaciones mexicanas el color permanece siempre y no de manera temporal, aún cuando el alimento en los cultivos de laboratorio era el mismo para todos los organismos, lo que indicaría una selección de genotipos diferencial entre poblaciones resultado de distintos factores tanto físicos como bióticos, tales como el efecto combinado de la evadir al daño producido por la radiación ultravioleta y el compromiso a evadir la presión de los depredadores (Rhode *et al.* 2001, Hansson, 2004), que, por ejemplo, llevaría a seleccionar variantes traslúcidas en La Preciosa, dada la existencia de poblaciones nativas e introducidas de peces; caso contrario a los otros dos lagos, donde estos depredadores no existen y la selección de variantes coloridas es más probable (Dimas-Flores *et al.*, 2008).

Efecto de la salinidad sobre la supervivencia y el desarrollo de las poblaciones

La salinidad es un factor ambiental que afecta diferentes parámetros de la historia de vida de los crustáceos dulceacuícolas, por ejemplo el crecimiento, desarrollo, la esperanza de vida, el número y tamaño de la descendencia, la edad al reproducirse por primera vez, la distribución y las relaciones filogenéticas entre poblaciones, pudiendo formar una barrera que impida su flujo génico (Lowe *et al.*, 2005a), además de que las concentraciones letales de salinidad son distintas en cada grupo taxonómico (Grzesiuk y Mikulski, 2006). Por lo que, para las poblaciones de *L. cf. sicilis* de los cuerpos de agua estudiados, las tolerancias diferenciales mostradas a los cambios de salinidad pueden generar distribuciones espaciales restringidas, generando la capacidad de habitar solamente su lago de origen y adaptándose a éste con el fin de eliminar la pérdida de energía enfocada en la osmoregulación, en beneficio de procesos como la supervivencia, el desarrollo y la reproducción, los cuales, en caso de estar en otro lago, podrían sufrir alteraciones, aunque sutiles, importantes a largo plazo, como se observó experimentalmente.

El intercambio de líquidos en los copépodos opera gracias a una glándula maxilar permitiendo mantener el equilibrio osmótico de los organismos (Ramírez, 2002), mientras que la acción de la Na(+), K(+)-ATPasa se relaciona con la tolerancia a los cambios de salinidad, actuando en la osmoregulación celular de organismos eurihalinos, aumentando la actividad enzimática en proporción a la salinidad del medio (Hollyday *et al.*, 1990), observándose que las diferencias en esta característica pueden ser parte de las adaptaciones de los organismos a su entorno. Lowe *et al.* (2005a) encontraron que diferencias en la actividad de esta enzima son resultado de la expresión génica, lo que se reflejaría en respuestas ecofisiológicas diferentes a la salinidad entre poblaciones relacionadas. Al saber que los cambios en la acción de la Na(+), K(+)-ATPasa en respuesta a la salinidad son un buen indicador de la capacidad osmoreguladora de un organismo (Lowe *et al.*, 2005b), podríamos pensar que contar con una gran capacidad de variar su actividad permitiría mantener el balance iónico y osmótico bajo diferentes condiciones de salinidad (Caberoy y Quintio, 2000) y desarrollarse en diferentes medios o en uno con condiciones variables (p. e., en El Carmen), mostrando una alta plasticidad fenotípica a los cambios de salinidad;

mientras que al no tener esta capacidad, un cambio en el medio puede afectar tanto la supervivencia como el crecimiento y la tasa de reproducción, por lo que, con el fin de evitar gastos energéticos importantes, los organismos tenderían a especializarse poco a poco (adaptación local) en cuerpos de agua con poca variación ambiental como lo son Atexcac y La Preciosa; por lo que, con el tiempo y el aislamiento adecuados, el efecto de la salinidad terminaría creando una barreras fisiológicas determinadas por la características genética y las capacidad fenotípica de los organismos.

Al presentarse características ecológicas diferentes entre los lagos de la Cuenca de Oriental, como son los ambientes salinos (como Atexcac) y de agua dulce (como La Preciosa), los organismos que los habitan se ven forzados a presentar adaptaciones particulares para mantener la presión osmótica adecuada y la homeostasis celular (Grzesiuk y Mikulski, 2006). Dados los costos fisiológicos que estas representan, en general, nuestros resultados muestran que los organismos presentan adaptaciones tendientes hacia uno u otro lado. Sin embargo, en hábitats como las lagunas costeras, los estuarios y las zonas de inundación y los lagos temporales (como El Carmen), las condiciones ambientales pueden variar mucho en periodos breves de tiempo, propiciando que los organismos que las habitan hayan sido seleccionados para tolerar mayores cambios de salinidad, generando plasticidad fenotípica. Esta tolerancia a la salinidad también puede ser importante para determinar la distribución geográfica de las especies, facilitando la dispersión por medio de estructuras de resistencia y promoviendo la capacidad de invadir otros sitios (Grzesiuk y Mikulski, 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que los copépodos provenientes de los lagos profundos están mejor adaptados a la salinidad de sus lagos de origen, sobreviviendo y reproduciéndose mejor en sus condiciones naturales y con una respuesta diferencial a las otras condiciones ambientales a las que fueron expuestos, mientras que la población de El Carmen parece haber desarrollado una mejor capacidad de soportar las diferentes salinidades que se le presenta en el medio que habita.

Otro factor que interviene en la tolerancia a los cambios de salinidad es la temperatura del agua, observándose primero que los organismos muestran una mayor tasa de supervivencia si las variaciones en el medio no difieren en gran medida o son graduales,

y después, que una buena aclimatación a la temperatura incrementa la tolerancia a la salinidad (Lance, 1963). En el caso de los experimentos realizados, la temperatura fue en todo momento controlada (18.6 °C) con el fin de afectar en la misma medida a las tres poblaciones, las cuáles si bien tenían un origen distinto al colectarse, fueron aclimatadas en los cultivos durante un largo periodo a una temperatura común; en la naturaleza, es probable que el efecto de los cambios de temperatura afecte en mayor medida a las poblaciones de Atexcac y La Preciosa, adaptadas a vivir bajo condiciones diarias más estables y con cambios graduales en el tiempo (la dinámica hidrodinámica monocíclica de mezcla y estratificación característica de estos lagos; véase p. e., Alcocer *et al.*, 2000; Macek *et al.*, 2009), a diferencia de los copépodos de El Carmen, que deben tolerar intervalos de temperatura importantes cada día, lo que los obligaría a desarrollar la capacidad de soportar estos cambios por medio de adaptaciones encaminadas hacia la plasticidad fenotípica.

Comparando los experimentos de desarrollo, encontramos que Payne y Rippingale (2001) al estudiar al copépodo estuarino *Gladioferens imparipes* señalan que estos son muy plásticos, aunque a salinidades elevadas el tiempo de maduración disminuye, patrón que coincide con los resultados obtenidos en la población de El Carmen los cuales al igual que *G. imparipes* habitan en un sistema con fuertes cambios ambientales. De esta manera, se puede decir que la salinidad alta acelera el proceso de desarrollo en los copépodos de los tres lagos, mientras que la salinidad baja tiene el efecto de atrasarlo o dificultarlo, p. e., se observó a organismos que morían en el intento de separarse de sus exubias o que nunca mudaban; este efecto fue observado más frecuentemente en los organismos provenientes de El Carmen y Atexcac. Por el contrario, los copépodos de La Preciosa parecen haberse adaptado localmente a condiciones de la salinidad baja, resultado posiblemente del efecto fundador y los malos medios de dispersión y colonización de las otras poblaciones.

Experimentos de entrecruzamiento

En relación a estos experimentos, es importante recordar que la reproducción en los copépodos calanoideos es de tipo sexual estrictamente, e inicia con la persecución del

macho siguiendo el rastro de las señales químicas de la hembra; después se realiza el encuentro de ambos y la cópula, que lleva a la unión de los gametos cuando el macho adhiere su espermátforo al poro genital de la hembra. Posteriormente se da la formación del cigoto y el huevo (de tipo subitáneo o de resistencia), de donde eclosionará una larva nauplio que seguirá su desarrollo hasta ser adulto y continuar el ciclo de vida (Williamson y Reid, 2001).

Sobre el efecto de la salinidad en la reproducción, como se observó en los organismos de La Preciosa bajo salinidades de 3.8 y 6.5 g L⁻¹, los cambios en la salinidad sobre la maduración y reproducción en cultivos con exceso de alimento son menores que cuando se tienen a los organismos bajo estrés alimenticio, por lo que aún en condiciones de salinidad más elevadas que las naturales, los copépodos pueden seguir manteniéndose hasta cierto punto fecundos sin padecer tanto el costo energético que requiere la osmoregulación (Payne y Rippingale, 2001). A pesar de estas condiciones, los copépodos de Atexcac, siguiendo el mismo patrón observado en los experimentos de supervivencia y desarrollo (también con condiciones de alimento óptimas), no lograron reproducirse en la salinidad más baja, demostrando que estas variantes genéticas tienen capacidad baja para permanecer en un ambiente con tales características. En contraste, en condiciones de salinidad alta (la de su lago de origen), a la cuál deberían estar bien adaptadas, las hembras de Atexcac produjeron las cantidades de huevos y nauplios más baja en comparación a las hembras de las otras poblaciones, aunque su tasa de eclosión fue la más elevada. En lo que respecta a la mayor cantidad de huevos y nauplios que presentaron las hembras de El Carmen en los tratamientos de salinidad intermedia y elevada, se puede inferir que el tamaño corporal está relacionado positivamente con la cantidad de huevos por hembra que estas pueden producir, por lo que siendo de mayor talla, las de El Carmen tienen la capacidad de destinar una cantidad mayor de energía a la producción de huevos, como también se ha observado con individuos del Lago Eire (Balcer *et al.*, 1984). Otra posibilidad se puede plantear es que quizá la población de El Carmen produzca un número alto de huevos como resultado de la presión de selección de hacer frente a un ambiente impredecible y variable, en espera de que un número mayor de individuos multiplique las apuestas en espera de una mayor tasa de supervivencia de la población.

Por otro lado, al presentarse en cada uno de los lagos de la Cuenca Oriental condiciones bióticas y abióticas diferentes, podría suceder en éstos un proceso similar al descrito en las poblaciones de *L. sicilis* de los Grandes Lagos, en las que se ha observado que tanto la proporción de machos y hembras, así como la época reproductiva y la cantidad de huevos producidos en cada población, no coincide totalmente (Balcer *et al.*, 1984). De acuerdo con esto, sería interesante realizar un estudio con observaciones detalladas de las poblaciones de copépodos de cada lago a lo largo del ciclo anual y determinar si existen variaciones en sus historias de vida que puedan estar relacionadas con la capacidad de los organismos de transportarse y eventualmente poder reproducirse en los distintos cuerpos de agua.

Como se señaló en los resultados del experimento de reproducción interpoblacional, en todas las cruzas analizadas, los individuos tuvieron éxito reproductivo a pesar de que la talla de los organismos pareciera a simple vista un impedimento mecánico pues las hembras de El Carmen son mucho más grandes que los machos de La Preciosa y Atexcac, por ejemplo. Sin embargo, es de destacar que el porcentaje de hembras fecundadas en cruzas interpoblacionales fue, en general más exitoso que en las cruzas intrapoblacionales. Adicionalmente, los resultados indican que aún cuando los gametos provienen de un macho distinto al del lago de origen de la hembra, el reconocimiento gamético, la formación de los huevos y los híbridos son viables, por lo tanto la recombinación genética aún son posibles.

De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos de este experimento señalan que en condiciones de laboratorio, las barreras ecológicas naturales que en principio se establecerían gracias al aislamiento geográfico entre los cuerpos de agua y por las diferencias en salinidades entre cada lago, no son tan relevantes como se esperaría *a priori* y que los organismos tienen la capacidad de mantener flujo genético potencial en condiciones naturales. Lo anterior, basándonos en el concepto biológico de especie (Dobzhansky, 1935; Mayr, 1942), los copépodos de la Cuenca Oriental forman parte de la misma especie biológica y no un complejo de especies crípticas. Existen diversos ejemplos que muestran un patrón contrario al de los lagos de la Cuenca Oriental, por ejemplo los trabajos de Serra *et al.* (1998), Lee (2000) y Montiel-Martínez (2006) donde tanto los

rotíferos del grupo *Brachionus* en España como los copépodos analizados en México y Norteamérica, sí pudieron ser reconocidos como especies crípticas al no formar híbridos en las cruas interpoblacionales además de mostrar tolerancias diferentes en las condiciones ambientales.

Para verificar correctamente la existencia de una panmixis total entre las poblaciones, y por lo tanto la existencia de una sola especie biológica, es necesario evaluar la viabilidad a largo plazo de los híbridos interpoblacionales (F1), haciendo un seguimiento del desarrollo de éstos hasta la etapa adulta y realizar de nuevo entrecruzamientos para verificar su fertilidad y viabilidad a largo plazo (F2) como lo mencionan Lee (2000) y Ellison y Burton (2008) pues en este proceso se pueden evidenciar deficiencias fisiológicas o malformaciones morfológicas o infertilidad de los híbridos (Stebbins, 1958; Wu y Davis, 1993) que de momento no se pudieron observar.

Estatus biológico y taxonómico de las tres poblaciones pertenecientes al taxón *Leptodiptomus cf. sicilis*

Todos los resultados obtenidos a partir de los análisis de biología molecular y morfología comparada, así como los generados por los experimentos de autoecología y reproducción, fueron utilizados con el fin de determinar si las poblaciones de *L. cf. sicilis* de la Cuenca Oriental, corresponden actualmente a especies biológicas distintas pertenecientes a un complejo de especies gemelas o a una especie distribuida ampliamente con plasticidad fenotípica alta o fuerte adaptación local.

El análisis de biología molecular nos da muestras de que las poblaciones se encuentran en un proceso importante de diversificación genética, relacionado aparentemente con un fuerte efecto fundador, reforzado por el aislamiento geográfico que se da por la naturaleza de distribución de los cuerpos de agua, la mala dispersión de las estructuras de resistencia y la visible adaptación local a las condiciones de salinidad del medio que ha ocurrido en los organismos. Estos resultados sugirieron que con el tiempo suficiente, existe la posibilidad de un incremento en la divergencia genética entre las distintas poblaciones.

Por su parte, el estudio de morfología comparada solo reveló diferencias importantes en el tamaño general de los organismos pero no en su forma o estructura de caracteres implicados en la reproducción, por lo, como se comprobó durante el experimento de reproducción interpoblacional, éstos copépodos tienen la capacidad de mantener reconocimiento físico con sus parejas sexuales de otras poblaciones, aún cuando la talla parezca ser un impedimento para lograrlo. Los resultados del experimento de tolerancia a la salinidad sugieren que el aislamiento geográfico y la salinidad tienen un efecto de selección importante como factor de diversificación de las poblaciones de *L. cf. sicilis*, delimitando su distribución espacial y actuando como barreras ecológicas que probablemente impiden el intercambio genético interpoblacional de manera natural.

Los resultados arrojados por el experimento de entrecruzamiento intrapoblacional advierten, de la misma manera que el anterior, que un posible desplazamiento de los copépodos, por lo menos entre los dos lagos perennes, no sería suficiente al momento de intentar entrecruzarse y generar la descendencia necesaria para conquistar otros ambientes con condiciones de salinidades diferentes. Por último, los resultados del entrecruzamiento interpoblacional señalan que existe el potencial de reconocimiento sexual e intercambio genético entre las tres poblaciones, llegando a formar híbridos, aunque éstos tendrían que ser seguidos en el tiempo para comprobar si realmente son fértiles.

Se sabe que los lagos de Atexcac y La Preciosa son ambientes relativamente homogéneos temporal y espacialmente, con condiciones abióticas que, a pesar de ser contrastantes durante los periodos de estratificación y mezcla a lo largo del ciclo anual, resultan predecibles en tiempo evolutivo, por lo que es posible pensar que estos factores han representado presiones de selección en los organismos que los habitan, afectando entre otras cosas las posibilidades de migración e intercambio de genotipos entre los lagos, al parecer, disminuyendo el éxito de dispersión de las estructuras de resistencia implicadas en la dispersión pasiva entre lagos, resultado de dos mecanismos principales: (1) persistencia del efecto fundador, evidenciado por la diferencia haplotípica entre las poblaciones y (2) el favorecimiento de la adaptación local sobre la plasticidad fenotípica, dejando de lado la oportunidad de explotar una gama amplia de condiciones ambientales en beneficio de

aprovechar las condiciones existentes; la posibilidad de adaptarse a un ambiente estable sería mayor que la necesidad de mostrar una respuesta plástica a los cambios drásticos (De Meester *et al.*, 2002; Kingsolver *et al.*, 2002). De acuerdo con lo anterior, en sistemas con heterogeneidad ambiental importante, los “generalistas” tendrían una probabilidad mayor de ser seleccionados, desarrollando estrategias eficientes plasticidad fenotípica y de dispersión pasiva; sin embargo, ante la posibilidad de colonizar ambientes previamente ocupados por especialistas, la posibilidad de establecerse en dichos sistemas ocurriría con una probabilidad muy baja (De Meester *et al.*, 2002). En la Cuenca Oriental parece que ambos escenarios se dan en los organismos que habitan los lagos perenes en contraste de los que habitan el lago temporal.

En conjunto, estas evidencias indican que las poblaciones de *L. cf. sicilis* de los lagos de la Cuenca Oriental se encuentran en un proceso de diversificación que implica la adaptación local (una adecuación mayor para sobrevivir y reproducirse en su ambiente en comparación a los inmigrantes potenciales) a las condiciones de salinidad de sus lagos de origen de los copépodos de Atexcac y La Preciosa, con una plasticidad fenotípica baja, mientras los copépodos de El Carmen por el contrario, representan a una población con adaptaciones a los cambios de salinidad de tipo generalista. Por lo que, teóricamente ambas estrategias no tendrían la capacidad suficiente de colonizar, sobrevivir y desarrollarse adecuadamente si logran alcanzar otros lagos cercanos con algunas condiciones físicas diferentes. A pesar de las diferencias, las tres poblaciones aún comparten características morfológicas, genéticas, ecológicas y reproductivas suficientes para ser consideradas como miembros de la misma especie biológica. Por lo pronto son denominadas como *Leptodiptomus cf. sicilis*, ya que para definir correctamente el estatus taxonómico de estas poblaciones, es necesario comparar su morfología, genética, y de ser posible el comportamiento reproductivo de los individuos de la Cuenca Oriental con ejemplares originarios de la localidad tipo (Los Grandes Lagos, E.U.).

Conclusiones

1. El análisis molecular realizado sugiere que las tres poblaciones de *L. cf. sicilis* estudiadas se hallan en un proceso temprano de divergencia genética. La divergencia interpoblacional es relativamente baja ($K2P < 2\%$), sin embargo, la existencia de haplotipos diferentes entre las poblaciones revela la persistencia del efecto fundador y el poco intercambio genético existente entre ellas.
2. El aislamiento geográfico y la salinidad ejercen un efecto de selección importante como factores de diversificación de las poblaciones de *L. cf. sicilis* en la Cuenca Oriental, México.
3. Las poblaciones de Atexcac y La Preciosa se encuentran en un proceso de adaptación local a sus lagos de origen.
4. La población de El Carmen muestra una alta plasticidad fenotípica a los cambios de salinidad.
5. Existe reconocimiento sexual, fecundación, formación de híbridos y eclosión de larvas en todas las cruas interpoblacionales realizadas, aunque las cruas intrapoblacionales fueron más exitosas. Es necesario seguir en el tiempo a los híbridos formados en las cruas interpoblacionales y analizar su viabilidad fisiológica y reproductiva.
6. Los resultados sugieren que las tres poblaciones de *L. cf. sicilis* de la Cuenca Oriental pertenecen a la misma especie biológica.
7. El estatus taxonómico de los tres poblaciones aún no es definitivo, es necesario comparar al menos la morfología y divergencia genética de los individuos de *L. cf. sicilis* de la Cuenca Oriental con organismos *L. sicilis* sensu stricto provenientes de los Grandes Lagos para concluir correctamente.

Literatura Citada

- Aguilar, V. 2003. Aguas continentales y diversidad biológica de México: un recuento actual. *Biodiversitas* 8(48):1-15.
- Aliberti, M.A., E. Allan, S. Allard, D.J. Bauer, W. Beagen, S.R. Bradt, B. Carlson, S.C. Carlson, U. Mai Doan, J. Dufresne, W.T. Godkin, S. Greene, J.F. Haney, A. Kaplan, E. Maroni, S. Melillo, A.L. Murby, J.L. Smith, B. Ortman, J.E. Quist, S. Reed, T. Rowin, M. Schmuck y R.S. Stemberger. 2009. *An Image-Based Key To The Zooplankton Of The Northeast (U.S.A), Version 3.0*. UNH Center for Freshwater Biology, Department of Biological Sciences. Univ. of New Hampshire, Durham, U.S.A.
- Alcántara-Rodríguez, A. 2010. *Lagos-cráter de la Cuenca de Oriental como modelo de diversificación biológica en sistemas de distribución insular: análisis de las poblaciones del rotífero Brachionus grupo plicatilis*. Tesis de Maestría (Biología Ambiental). Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM, México, D.F. 77 pp.
- Alcocer, J., A. Lugo, S. Estrada, M. Ubeda y E. Escobar. 1993. La macrofauna bentónica de los axalapazcos mexicanos. *Actas VI Congr. Esp. Limnol.* 33:409-415.
- Alcocer, J., A. Lugo, E. Escobar y M. Sánchez. 1997. The macrobenthic fauna of a former perennial and now episodically file Mexican saline lake. *Int. J. of Salt lake Res.* 5:261-274.
- Alcocer J., A. Lugo, E. Escobar, M.R. Sánchez y G. Vilaclara 2000. Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Verh. Inter. Ver. Limnol.* 27:3166-3169.
- Álvarez, J. 1950. Contribución al conocimiento de los peces de la región de los Llanos, estado de Puebla (México). *Anales Esc. Nal. Cienc. Biol.* VI(1-4):81-107.
- Arredondo-Figueroa, J.L., L.E. Borrego-Enriquez, R.M. Castillo-Domínguez M.A. Valladolid-Guerrero. 1983. Batimetría y morfometría de los lagos "maars" de la Cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biótica* 8(1):37-47.
- Arredondo, J.L. 1995. Los axalapascos de la Cuenca Oriental, Puebla. En: De la Lanza-Espino, G. y J. L. García-Calderón. *Lagos y Presas de México*. Centro de Ecología y Desarrollo. México, D. F. pp. 65-87.
- Badii, M.H., J. Landeros, R. Foroughbakhch y J.L. Abreu. 2007. Biodiversidad, evolución, extinción y sustentabilidad. *Daena: Int. J. Good Consc.* 2(2):229-247.
- Balcer, M.D., N.L. Korda y S.I. Dodson. 1984. *Zooplankton of the Great Lakes*. Univ. of Wisconsin Press, Wisconsin, U.S.A. pp. 81-92.

- Bohonak, A.J. y D.G. Jenkins. 2003. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecol. Lett.* 6:783-796.
- BOLD Systems. 2010. *Barcode of Data Systems v. 2.5*. www.boldsystems.org.
- Boraas, M.E. 1993. Semicontinuous culture methods. En: N. Walz (ed.). *Plankton regulation dynamics. Ecological Studies* 98. Springer-Verlag, Berlin. pp. 13-20.
- Caballero, M., G. Vilaclara, A. Rodríguez y D. Juárez. 2003. Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geof. Int.* 42(3):529-537.
- Caberoy, N.B. y G.F. Quintio. 2000. Changes in Na⁺,K⁺-ATPase activity and gill chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and juveniles in response to salinity and temperature. *Fish Physiol. & Biochem.* 23:83-94.
- Carrasco-Núñez G., M.H. Ort y C. Romero. 2007. Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *J. Volcanol. Geothermal Res.* 159:179-197.
- Cervetto, G., R. Gaudy y M. Pagano. 1999. Influence of salinity on the distribution of *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 239:33-45.
- Ciros-Pérez, J., A. Gómez y M. Sierra. 2001. On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *J. Plankton Res.* 23:1311-1328.
- Ciros-Pérez, J., M.J. Carmona y M. Serra. 2004. Predation as a mediating factor of resource competition between sibling rotifer species. *Limnol. Oceanogr.* 49:40-50.
- Cordero, C. y J. Llorente-Bousquets. 2000. Los Arthropoda de México: algunas comparaciones. En: Llorente-Bousquets, J., E. González y N. Papavero (eds.). *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México*. Vol. II. UNAM, México, D.F. pp. 171-190.
- Costa, F. O., J. R. de Waard, J. Boutillier, S. Ratnasingham, R.T. Dooh, M. Hajibabaei y P.D. Hebert. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64:272-295.
- Cowardin, L.M., V. Carter, F.C. Golet y E.T. LaRoe. 1979. *Classification of wetlands and deepwater habitats of the United States*. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C., U.S.A. 131 pp.
- Cracraft. 1987. Species concepts and the ontology of evolution. *Biol. Philos.* 2:329-246.
- Cristescu, M.E.A., P.D.N. Hebert, y J.D.S. Uit. 2001. An invasion history for *Cercopagis pengoi* based on mitochondrial gene sequences. *Limnol. Oceanogr.* 46:224-229.

- Czaika, S.C. 1982. Identification of nauplii N1-N6 and copepodids CI-CVI of the Great Lakes calanoid and cyclopid copepods (Calanoida, Cyclopoida, Copepoda). *J. Great Lakes Res.* 8(3):439-469.
- Chow-Fraser, P. y E.J. Maly. 1988. Aspects of mating, reproduction, and co-occurrence in three freshwater calanoid copepods. *Freshwater Biol.* 19:95-108.
- Davies, S. J., S. E. Metcalfe, M. E. Caballero y S. Juggins. 2002. Developing diatom-based transfer functions for Central Mexican lakes. *Hydrobiol.* 467:199-213.
- De Guerne, J. y J. Richard. 1889. Révision des Calanides d'eau douce. *Mém. Soc. Zool. Fra.* II:53-181.
- De Meester, L., Gómez, A., Okamura, B. y Schwenk, K. 2002. The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecol.* 23:121-135.
- De Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. En: *Endless forms species and speciation*. Howard D.J. y S.H. Barlocher (eds). Oxford University Press, Oxford, Inglaterra. pp. 57-75.
- Dimas-Flores, N., J. Alcocer y J. Ciros-Pérez. 2008. The structure of the zooplankton assemblages from two neighboring tropical high mountain lakes. *J. Freshwater Ecol.* 23(1):21-31.
- Dobzhansky, T. 1935. A critique of the species concept in biology. *Philos. Sci.* 2:344-355.
- Dussart, B. y D. Defaye. 2001. *Introduction to Copepoda*, 2^a ed. Backhuys Publishers. Leiden, Holanda. 344 pp.
- Dytham, C. 2003. *Choosing and using statistics: a biologist's guide*. 2^a ed. Blackwell Publishing, U.S.A.
- Elías-Gutiérrez, M., E. Suárez-Morales y B. Romano-Márquez. 1999. A new species of *Leptodiptomus* (Copepoda, Diaptomidae) from Northwestern Mexico with comments on the distribution of the genus. *J. Plankton Res.* 21:603-614.
- Elías-Gutiérrez M., E. Suárez-Morales y G. Ibarra. 2004. Cuentapatas en ECOSUR, ¿investigación obsoleta o riqueza institucional?. En: Tuñón Pablos E., J.F. Barrera Gaytán, G. Islebe y E. Suárez Morales (Eds.). *Conocer para desarrollar: 30 años de investigación en la frontera sur de México. ECOSUR*. Tapachula, Chiapas, México. pp. 153-158.
- Elías-Gutiérrez, M., E. Suárez-Morales, M. Gutiérrez-Aguirre, M. Silva-Briano, J.G. Granados-Ramírez y T. Garfías-Espejo, 2008. *Guía ilustrada de los microcrustáceos (Cladocera y Copepoda) de las aguas continentales de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 367 pp.

- Elías-Gutiérrez, M., F. Martínez-Jerónimo, N.V. Ivanova, M. Valdez-Moreno y P.D.N. Hebert. 2008b. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala highlights and new discoveries. *Zootaxa* 1839:1-42.
- Ellison, C.K. y R.S. Burton. 2008. Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution* 62(3):631-638.
- Escalante, T., G. Rodríguez, N. Gámez, L. León, O. Barrera y V. Sánchez-Cordero. 2007. Biogeografía y conservación de los mamíferos. En: Luna, I., J. J. Morrone y D. Espinosa (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*. UNAM, México, D.F. pp. 485-502.
- Flores-Villela, O. y A. G. Navarro- Sigüenza. 1993. Un Análisis de los Vertebrados Terrestres Endémicos de Mesoamérica en México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* XLIV (Especial). pp. 387-395.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3:294-299.
- Forbes, S.A. 1882. On some Entomostraca of Lake Michigan and adjacent waters. *Amer. Nat.* XVI(7):537-542.
- Friedman, M. M. 1980. Comparative morphology and functional significance of copepod receptors and oral structures. En: W. C. Kerfoot (ed.). *Evolution and ecology of zooplankton communities*. Univ. Press of New England, Hanover. pp. 185-197.
- Galán, C. y F. Herrera. 1998. Fauna cavernícola: ambiente y evolución. *Bol. Soc. Venez. Espeleol.* 32:13-43.
- Granados-Ramírez, J. G. y E. Suárez-Morales. 2003. A new *Hesperodiptomus* Light (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae) from Mexico with comments on the distribution of the genus. *J. Plankton Res.* 25:1383-1395.
- Great Lakes Science Center. 2008. *Free-living and Parasitic Copepods (Including Branchiurans) of the Laurentian Great Lakes: Keys and Details on Individual Species*. United States Geological Survey. <http://www.glsc.usgs.gov/greatlakescopepods>.
- Grzesiuk, M. y A. Mikulski. 2006. The effect of salinity on freshwater crustaceans. *Pol. J. Ecol.* 54(4):669-674.
- Guillard R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Hajibabaei, M., M. A. Smith, D. H. Janzen, J. J. Rodriguez, J.B. Whitfield y P.D.N. Hebert. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol.* 6(4):959-964.

- Hansson, L.A. 2004. Plasticity induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology* 85:1005-1016.
- Hennig. 1966. *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana, U.S.A.
- Herrick, C.L. 1884. *A final report on the Crustacea of Minnesota included in the orders Cladocera and Copepoda*. The Geological and Natural History survey of Minnesota. pp. 135-142.
- Hoelzel, A. R., y A. Green. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. En: A. R. Hoelzel, (ed.). *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford Univ. Press. pp. 159–187.
- Hollyday, C.H., D.B. Roye y R.D. Roer. 1990. Salinity-induced changes in brachial Na⁺/K⁺ - ATPase activity and transepithelial potential difference in the brine shrimp *Artemia salina*. *J. exp. Biol.* 151:279-296.
- Kelly, L.S y T.W. Snell. 1998. Role of surface glycoproteins in mate-guarding of the marine harpacticoid *Tigriopus japonicus*. *Mar. Biol.* 130:605-612.
- Kelly, L.S., T.W. Snell y D.J. Lonsdale. 1998. Chemical communication during mating of the harpacticoid *Tigriopus japonicus*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353:737-744.
- Kingsolver, J.G., D.W. Pfennig y M.R. Servedio. 2002. Migration, local adaptation and the evolution of plasticity. *TREE* 17(12):540-541.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(1):454-458.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24:189-216.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Analysis and Sequence Alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150-163.
- Lane, N. 2009. On the origin of bar codes. *Nature* 462:272-274.
- Lance, J. 1963. The salinity tolerance of some estuarine planktonic copepods. *Limnol. and Ocean.* 8(4):440-449.
- Lee, C.E. 2000. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate “populations”. *Evolution* 54:2014-2027.

- Lee, M.S.Y. 2003. Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *J. Evol. Biol.* 16:179-188.
- Lesko, L.T., P.L. Hudson y M.A. Chriscinske. 2003. *Calanoid copepods of the Laurentian Great Lakes*. Ann Arbor, Michigan: GLSC Home Page. www.glsc.usgs.gov/greatlakescopepods.
- Leibold, M.A. y P. Geddes. 2005. El concepto de nicho en las metacomunidades. *Ecol. Aust.* 15:117-129.
- Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaria, D. Baltimore y J. Darnell. 1996. *Molecular Cell Biology CD-ROM*. 3^a ed. W.H. Freeman & Co. and Sumanas Inc.
- Lowe, C.D., Kemp, S.J. y D.J.S. Montagnes. 2005a. An interdisciplinary approach to assess the functional diversity of free-living microscopic eukaryotes. *Aquat. Microb. Ecol.* 41:67-77.
- Lowe, C.D., Kemp, S.J., A.D. Bates y D.J.S. Montagnes. 2005b. Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Mar. Biol.* 146:923-929.
- Lugo, A., J. Alcocer, M. Chávez, G. Vilclara, M. Gaytán y M.R. Sánchez. 1994. Seis joyas en el desierto. *Inf. Cient. y Tec.* 16(209):32-36.
- Macek, M., G. Vilaclara y A. Lugo. 1994. Changes in protozoan assemblage structure and activity in a stratified tropical lake. *Mar. Microb. Food Webs.* 8:235-249.
- Macek, M., J. Alcocer, A. Lugo-Vázquez, M.E. Martínez-Pérez, L. Peralta-Soriano y G. Vilaclara. 2009. Long term picoplankton dynamics in a warm-monomictic, tropical high altitude lake. *J. Limnol.* 68(2):183-192.
- Marsh, C.D. 1907. A revision of the North American Species of *Diatomus*. *Wisc. Acad. Sci. Art & Lett.* 15:381-516.
- Marsh, C.D. 1918. Copepoda. En: Ward, H.B. y G.C. Whipple. *Fresh-water Biology*. John Wiley & Sons, New York, U.S.A. pp. 741-773.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press, New York, U.S.A.
- Mayr, E. 1982. Speciation and Macroevolution. *Evolution* 36(6):1119-1132.
- Miner, B.G., S.E. Sultan, S.G. Morgan, D.K. Padilla y R.A. Relyea. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *TREE* 20(12):685-692.
- Mishler, B.D. y E. Luna. 1997. Sistemática filogenética y el concepto de especie. *Boletín Soc. Bot. Mex.* 60:45-57.

- Montiel-Martínez, A. 2006. *Análisis comparativo de poblaciones parapátricas de Leptodiaptomus noavamexicanus (Copepoda: Calanoida): ¿especie eurihalina o complejo de especies gemelas?*. Tesis de Maestría (Ciencias del Mar y Limnología), Posgrado en Ciencias del Mar y limnología. UNAM. México, D.F. 67 pp.
- Montiel-Martínez, A., J. Ciro-Pérez, E. Ortega-Mayagoitia y M. Elías-Gutiérrez. 2008. Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiaptomus garciai* (Osorio-Tafall, 1942) as a valid endemic species. *J. Plankton Res.* 30(10):1079-1093.
- Paterson, H.E.H. 1985. The recognition concept of species. En: Vrba, E.S. (ed). *Species and Speciation*. Pretoria: Transvaal Museum, Sudáfrica. pp. 21-29.
- Payne, M.F. y R.J. Rippingale. 2001. Effects of salinity, cold storage and enrichment on the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture* 201:251-262.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?. *TREE* 20(9):481-486.
- Qiagen. 2001. *QIAquick purification kit*. Qiagen Inc. Valencia, California, U.S.A.
- Ramírez, F.C. 2002. *Plancton sin formol*. Publicaciones Especiales INIDEP, Mar del Plata, Argentina. 96 pp.
- Ratnasingham, S. y P. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinelife.org). *Mol. Ecol. Notes* 1-10.
- Reid, J.W. 2001. A human challenge: discovering and understanding continental copepod habitats. *Hydrobiologia* 453/454:201-226.
- Rhode, S.C., M. Pawlowski, y R. Tollrian. 2001. The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature* 412:69-72.
- Robertson, A. y J.F. Ganon. Annotated checklist of the free-living copepods of the Great Lakes. *J. Great Lakes Res.* 7(4):382-393.
- Ruíz-Gutiérrez, R. y J.M. Rodríguez-Caso. 2009. Especiación: Teorías, modelos y polémicas. En: J.J. Morrone y P. Magaña (eds). *Evolución biológica, Una vision actualizada desde la revista Ciencias*. Fac. de Ciencias, UNAM, México. pp. 297-334.
- Ruíz-Pérez, O. 2008. *Caracterización de diversas poblaciones de Artemia desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos y de sus patrones moleculares*. Tesis doctoral (Ciencias Biológicas). Universitat de Valencia, España. 232 pp.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

- Sandercock, G.A. y G.G.E. Scudder. 1994. *An introduction and key to the freshwater calanoid copepods (Crustacea) of British Columbia*. Dept. of Zoology, Univ. of British Columbia, Vancouver, Canadá. 134 pp.
- Santer, B. 1996. Nutritional suitability of the dinoflagellate *Ceratium furcoides* for four copepod species. *J. Plankton Res.* 18:323-333.
- Santer, B. y F. van den Bosch. 1994. Herbivorous nutrition of *Cyclops vicinus*: the effect of pure algal diet on feeding, development, reproduction and life cycle. *J. Plankton Res.* 16:171-195.
- Schacht, F.W. 1897. The North American Species of Diaptomus. *Bull. Ill. St. Lab. of Nat. Hist.* V:97-224.
- Schallenberg, M. y C.W. Burns. 2001. Test of autotrophic picoplankton as early indicators of nutrient enrichment in an ultra-oligotrophic lake. *Freshwater Biol.* 46:27-37.
- Semarnat. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. *Diario Of. de la Fed.*, México, D.F.
- Serra, M., A. Gómez y M.J. Carmona. 1998. Ecological genetics of *Brachionus* sympatric sibling species. *Hydrobiologia* 387/388:373-384.
- Sokal, R.R., y F.J. Rohlf. 1969. *Biometry*. W. H. Freeman, New York, U.S.A.
- SPSS Inc., 2008. *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Chicago, Illinois, U.S.A.
- Stebbins, G.L. 1958. The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Adv. in Gen.* 9:147-215.
- Suárez-Morales, E., J.W. Reid y R. Gasca. 2000a. Copepoda. En: Llorente-Bousquets, J., E. González y N. Papavero (eds.). *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México*. Vol. II. UNAM, México, D.F. pp. 171-190.
- Suárez-Morales, E., M. Silva-Briano, y M. Elías-Gutiérrez. 2000b. Redescription and taxonomic validity of *Leptodiaptomus cuauhtemoci* (Ososrio-Tafall, 1941) (Copepoda, Calanoida), with notes on its known distribution. *J. Limnology* 59:5-14.
- Swofford, D.L. 2002. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony v.4.0 (PAUP)*. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. and Evol.* 24:1596-1599.

- Technelysium Pty Ltd. 2001. *Chromas 2.13*.
- Templeton, A.R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En: Otte D. y J. Endler (eds.). *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Ting, J.H., L.S. Kelly y T.W. Snell. 2000. Identification of sex, age and species-specific protein on the surface of the harpacticoid *Tigriopus japonicus*. *Mar. Biol.* 137:31-37.
- Torke, B. 2001. The distribution of calanoid copepods in the plankton of Wisconsin Lakes. *Hydrobiologia* 453/454:351-365.
- USEPA. 1985. *Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*. 3^a ed. Environmental Monitoring and Support Laboratory. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A. EPA/600/4-85/0 13.
- Valencia-Ávalos, S. 2009. ¿Es la solución del problema de la especie un ideal platónico en la cima de una torre de Babel?. En: J.J. Morrone y P. Magaña (eds). *Evolución biológica, Una visión actualizada desde la revista Ciencias*. Fac. de Ciencias, UNAM, México. pp. 273-296.
- Von Ende, C.N. 1993. Repeated-measures analysis: growth and other time-dependent measures. En: Scheider, S.M. y J. Gurevitch (eds.). *Design and analysis of ecological experiments*. Chapman and Hall, New York, U.S.A.
- Williamson, C.E. y J.W. Reid. 2001. Copepoda. En: Thorp, J.H. y A.P. Covich (eds.). *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. 2^a ed. Academic Press, Inc., San Diego, U.S.A. pp. 915-954.
- Wilson, M.S. y H.C. Yeatman. 1959. Free-Living Copepoda. En: Edmondson, W.T. (ed). *Fresh-water Biology*. 2^a ed. John Wiley & Sons, New York, U.S.A. pp. 735-861.
- Witt, J.D.S. y P.D.N. Hebert. 2000. Cryptic species diversity and evolution in the amphipod genus *Hyaella* within central glaciated North America: a molecular phylogenetic approach. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57(4):687-698.
- Wu, C.I. y A.W. Davis. 1993. Evolution of Postmating Reproductive Isolation: the Composite Nature of Haldane's Rule and Its Genetic Bases. *Amer. Nat.* 142(2):187.

Un cuento para terminar

Una ciudad árabe. Un niño grita: ¡un elefante! Vengan a verlo, ya viene, va a pasar por esta calle, salgan todos, vengan, ¡un elefante!. Seis ciegos con sus bastones. Uno: yo no sé cómo es un elefante. Dos: yo tampoco lo conozco. Tres: ni yo. Cuatro: me gustaría saber cómo es un elefante. Cinco: esperaremos a que pase por aquí y podremos tocarlo. Seis: lo tocaremos con las manos, nuestros dedos son nuestros ojos. El domador entra con el elefante: abran paso señores, déjenlo pasar, no les vaya a pisar un callo. Uno: buen hombre, deja a estos pobres ciegos tocar a tu elefante, queremos conocerlo. Guía: está bien, acérquense uno por uno, es mansito, no le tengan miedo. Uno avanza y toca el cuerpo del animal: mmm... ya me doy cuenta, el elefante es como una pared no muy lisa. Dos se acerca y le toca una pata: no, no es cierto lo que dices, es igualito a un árbol. Tres le toca un colmillo: ¡mentira! Mis manos me dicen claramente que el elefante es muy parecido a una lanza. Cuatro le toca una oreja: están totalmente equivocados, yo también lo toqué y estoy seguro de que es como un abanico, mis dedos no me engañan. Cinco le toca la trompa: estoy seguro de que el elefante es parecido a una serpiente. Seis le agarra la cola: ¡ninguno sabe! Es como una cuerda que sirve para amarrar bultos. Uno: ¡es una pared!, Cinco: ¡serpiente!, Tres: que serpiente ni que nada ¡estoy seguro que es una lanza!, Cuatro: ¡mentira!, Seis: ¡una cuerda! ¡es una cuerda!, Dos: les digo que es un árbol. Se pegan (tratan pero luego no atinan), gritan, confusión. Guía: ¡calma, calma! escuchen, les explicaré, todos creen tener la razón, pero ninguno la tiene. Todos: ¿Por qué? ¿Por qué?. Guía: porque cada uno tocó una parte del elefante y se imaginaron diferentes cosas. Cinco: ahora entiendo, sí, eso fue lo que pasó y nos enojamos mucho. Guía: hasta de palos se dieron. Uno: nos portamos como tontos. Dos: en lugar de pensar nos pusimos tercos. Tres: y furiosos. Cuatro: en vez de entendernos. Cinco: porque todos teníamos un poco de razón. Seis: pero ninguno tenía toda la razón. Guía: Claro, para conocer la verdad hay que conocer todas sus partes. Dos: seamos amigos de nuevo. Tres: conozcamos bien al elefante. Todos alrededor del elefante, tocándolo.

Mireya Cueto