



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
ECOLOGÍA EVOLUTIVA

**LOS LAGOS DE LA CUENCA ORIENTAL COMO MODELO PARA ESTUDIAR
COMUNIDADES ACUÁTICAS CON PATRONES DE DISTRIBUCIÓN INSULAR
MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES EN ROTÍFEROS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOSÉ ARTURO ALCÁNTARA RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Jorge Ciro Pérez
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Píndaro Díaz Jaimes
Instituto de ciencias del mar, UNAM
Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

CD. MX., febrero 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presenta

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de octubre de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ALCANTARA RODRIGUEZ JOSE ARTURO**, con número de cuenta **99507987**, con la tesis titulada **"Los lagos de la Cuenca Oriental como modelo para estudiar comunidades acuáticas con patrones de distribución insular mediante el uso de marcadores moleculares en rotíferos"**, realizada bajo la dirección del **DR. JORGE CIROS PÉREZ**:

Presidente: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
Vocal: DRA. ELIZABETH ORTEGA MAYAGOITIA
Secretario: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
Suplente: DR. JOSE MARTÍN GARCÍA VARELA
Suplente: DR. ALFONSO LUGO VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 4 de diciembre de 2017.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por haberme brindado el apoyo institucional para llevar a cabo la presente investigación y contribuir de manera notable en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (317516) que me otorgó para realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento en Investigación Científica Básica (255788), otorgado para el proyecto “Evolución adaptativa en ambientes divergentes: organismos zooplanctónicos lacustres como modelo ecogenómico” (R. Técnico: Dr. Jorge Ciros Pérez).

Al proyecto PAPIIT IN217513.

Al Dr. Jorge Ciros Pérez por su confianza, apertura para escuchar mis puntos de vista y discutirlos siempre en un ambiente cordial, así como por su apoyo, dedicación e invaluable consejos para mi formación científica.

Al Dr. Píndaro Díaz Jaimes por sus contribuciones en el desarrollo de la presente investigación y de manera especial por sus sugerencias sobre el uso de métodos bayesianos.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras por su asesoría en genética de poblaciones y su gran apoyo en el desarrollo de la presente investigación científica.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A los miembros de mí jurado para la obtención de grado:

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Dr. José Martín García Varela

Dr. Alfonso Lugo Vázquez

Por sus valiosos comentarios y sugerencias sobre la presente tesis.

A mis compañeros y amigos del proyecto en limnología tropical.

A la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM por su asesoría durante el proceso de secuenciación y análisis de datos moleculares.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a todos aquellos seres queridos que son o han sido parte de mi vida, y que en muchas maneras han contribuido a establecer el sistema de redes neuronales que definen la persona que soy. Agradezco de manera muy especial a mi madre por la libertad en la que crecí y la confianza que depositó en mí desde niño, por aquella computadora que me regaló a los 10 años y me generó el gusto por la programación, así como por su apoyo y amor incondicional en todos los sentidos. A mi esposa Brenda por estos 20 años de crecimiento en conjunto, amor y alegría, así como por su apoyo y comprensión ante mi peculiar personalidad. Agradezco enormemente a mi querida familia, abuelos y tíos con quienes crecí rodeado de campo y de máquinas, que me enseñaron el valor del trabajo y me formaron en los valores cívicos fundamentales. Agradezco de manera muy especial a mi tío Mickey por aquella noche en la que subimos a la azotea a ver el cometa Halley en 1985 en aquel cielo despejado que se podía disfrutar en nuestro barrio de la Concepción en las afueras de la ciudad. Fue él quien me enseñó que existían los astrónomos (y que son diferentes de los astronautas) y que estos a su vez pertenecían a un grupo de personajes llamados científicos, siendo a mis cinco años la primera profesión de la que tuve conocimiento. Hasta la fecha, todas las noches volteo al cielo buscando las estrellas y no dejo de preguntarme cómo serán las otras formas de vida que seguramente habitan en el universo. Les dedico también esta tesis a todos mis grandes amigos a quienes he tenido la dicha de conocer a lo largo de mi vida, algunos siguen cerca, otros no tanto, pero les agradezco a todos por igual, en especial a Miguel, Loth, Luis y Carlos. Dedico también esta tesis a la música, especialmente a la memoria de los grandes compositores clásicos que me acompañan en todo lugar, sobre todo a Bach, Beethoven y Chopin. Y finalmente, como agradecimiento por la vida, me permito compartir a continuación la primera de las piezas que he escrito para piano (mientras escribía esta tesis) y que significa mucho para mí, y al mismo tiempo agradezco las enseñanzas del maestro y amigo Edgardo Romero, quien ha guiado mis pasos para incursionar en el maravilloso mundo de la composición musical, que me ha permitido canalizar algo de aquello que no se puede expresar con palabras.

50
2

57 * Ped. * Ped. * Ped. * Ped. *

64 Ped. * Ped. *

71

78 Ped. * Ped. * rall. * Ped. * Ped. accel. Ped. * Ped. *

86 Ped. * Ped. * Ped. * Ped. * Ped. *

94 * Ped. * Ped. * Ped. * Ped. rall. - - -

99 pp smorz molto rall. ppp

Ped. Ped. *

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	i
AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL	ii
DEDICATORIAS	iii
ÍNDICE	iv
Resumen	v
Abstract	1
INTRODUCCIÓN: PROCESOS DE DIVERSIFICACIÓN BIOLÓGICA BAJO LA LUZ DE LAS METACOMUNIDADES	2
<i>SISTEMAS INSULARES</i>	2
<i>ETAPAS DE LATENCIA EN EL ZOOPLANCTON</i>	4
<i>ROTÍFEROS</i>	5
<i>CLADÓCEROS</i>	6
<i>COPÉPODOS</i>	7
<i>LATENCIA, DISPERSIÓN EN ESPACIO Y TIEMPO</i>	8
<i>VÍAS DE DISPERSIÓN PASIVA</i>	10
<i>HIPÓTESIS DE LA MONOPOLIZACIÓN</i>	13
<i>REPERCUSIONES SOBRE LA ESTRUCTURACIÓN DE METAPOBLACIONES Y METACOMUNIDADES</i>	14
<i>LA CUENCA ORIENTAL COMO MODELO</i>	17
Hipótesis	21
Objetivo	21
Organización de la tesis	22
CAPÍTULO 2: DIVERSIDAD DE ESPECIES DE ROTÍFEROS EN LA CUENCA ORIENTAL	25
<i>INTRODUCCIÓN</i>	25
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	27

<i>RESULTADOS</i>	29
<i>DISCUSIÓN</i>	38
CAPÍTULO 3: POTENCIAL DE COLONIZACIÓN DE LAS ESPECIES EN FUNCIÓN DE LA SALINIDAD	41
<i>INTRODUCCIÓN</i>	41
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	44
<i>RESULTADOS</i>	48
<i>DISCUSIÓN</i>	61
Capítulo 4: Adaptación local de <i>b. sp.</i> ‘méxico’ a la salinidad en la cuenca oriental	68
<i>INTRODUCCIÓN</i>	68
CAPÍTULO 5: ANÁLISIS MOLECULAR DE DIVERSIDAD: GEN COI COMO CÓDIGO DE BARRAS PARA DIFERENCIAR ESPECIES CRÍPTICAS	70
<i>INTRODUCCIÓN</i>	70
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	74
<i>RESULTADOS</i>	75
<i>DISCUSIÓN</i>	80
CAPÍTULO 6: ANÁLISIS MOLECULAR DE DIVERSIDAD GENÓMICA (GBS) DE TRES POBLACIONES DE <i>Brachionus sp.</i> ‘Mexico’	87
<i>INTRODUCCIÓN</i>	87
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	91
<i>RESULTADOS</i>	97
<i>DISCUSIÓN</i>	101
DISCUSIÓN GENERAL SOBRE LA DINÁMICA DE LA METACOMUNIDAD	105
LITERATURA CITADA	113
ANEXO	128

RESUMEN

La diversidad biológica de las comunidades zooplanctónicas de aguas continentales está determinada tanto por la dispersión pasiva de sus estructuras de resistencia como por los factores ambientales locales que permiten o no la colonización por parte de los diferentes taxones. En este contexto, se ha identificado a la salinidad como un factor local determinante para la producción y la eclosión de las estructuras de resistencia, y se sabe que las concentraciones iónicas del agua pueden ser determinantes para su eclosión, y por ende de su colonización. La Cuenca Oriental resulta ser un modelo muy atractivo para estudiar el efecto de la salinidad sobre la eclosión de las estructuras de resistencia del zooplancton como un factor determinante para la diversidad de las metacomunidades en ambientes con distribución insular. Para evaluar el potencial de colonización de los diferentes taxones que habitan la cuenca se realizaron experimentos de jardín común con las comunidades zooplanctónicas presentes en los bancos de huevos de resistencia, evaluando el efecto de la salinidad sobre el potencial de eclosión y donde se observa que la salinidad del agua desempeña un papel fundamental sobre el potencial de eclosión de los diferentes taxones. A escala regional, el análisis de conglomerados (Bray-Curtis) revela que la diversidad se distribuye heterogéneamente, dando como resultado un conjunto de comunidades locales muy disímiles. Estos resultados sugieren que la salinidad es un factor clave que determina la composición de la comunidad local, actuando como una barrera fisiológica para las especies. Se muestran evidencias de un proceso de adaptación local a la salinidad en una población del rotífero *B. sp.* 'México'. Utilizando marcadores moleculares se obtuvo información sobre la existencia de dos linajes morfológicamente idénticos que están tan separados genéticamente uno de otro que lo más probable es que pertenezcan a diferentes especies biológicas. Finalmente, se eligió a la especie *B. sp.* 'México' como modelo para evaluar el flujo genético potencial de poblaciones vecinas, los resultados indican una distribución heterogénea de la diversidad genética, lo cual sugiere que las interacciones en la escala de metapoblación son débiles. Estos resultados tienen relevancia evolutiva para los procesos de diversificación biológica regional, ya que cada población se ve afectada por las presiones locales selectivas de cada hábitat, entre ellas la salinidad del agua.

ABSTRACT

The biological diversity of the zooplanktonic communities of inland waters is determined both, by the passive dispersion of their resistance structures and by the local environmental factors that allow or not the colonization by the different taxa. In this context, salinity has been identified as a determinant local factor for the production and hatching of resistance structures, and it is known that ionic water concentrations can be determinant for its hatching, and therefore its colonization. The Cuenca Oriental basin turns out to be a very attractive model to study the effect of salinity on the hatching of zooplankton resting structures as a determining factor for the diversity of metacommunities in patchy environments. In order to evaluate the colonization potential of the different taxa that inhabit the basin, common garden experiments were carried out with the zooplanktonic communities present in the resistance egg banks, evaluating the effect of salinity on the hatching potential and where it is observed that the water salinity plays a fundamental role on the hatching potential of different taxa. At the regional level, the cluster analysis (Bray-Curtis) reveals that diversity is distributed heterogeneously, resulting in a set of very different local communities. These results suggest that salinity is a key factor that determines the composition of the local community, acting as a physiological barrier for the species. In addition, here are shown evidence of a process of local adaptation to salinity in a population of the rotifer *B. sp.* 'Mexico'. Using molecular markers we gained insights about the existence of two morphologically identical lineages that are so separated from each other that they probably belong to different biological species. Finally, the species *B. sp.* 'Mexico' was chosen as a model to evaluate the potential genetic flow of neighboring populations, the results indicate a heterogeneous distribution of genetic diversity, which suggests that interactions on the metapopulation scale are weak. This set of results has evolutionary relevance for the processes of regional biological diversification, since each population is affected by the selective local pressures of each habitat, among them the salinity of the water.

INTRODUCCIÓN: PROCESOS DE DIVERSIFICACIÓN BIOLÓGICA BAJO LA LUZ DE LAS METACOMUNIDADES

SISTEMAS INSULARES

En la naturaleza es muy frecuente observar poblaciones de una misma especie separadas por barreras que limitan el tránsito de individuos entre dos o más zonas geográficas. Son raras las especies endémicas que se distribuyen en sistemas cerrados configurando poblaciones panmícticas, en las que todos los individuos tienen la misma probabilidad de coincidir en un espacio y tiempo determinado, dando lugar a un apareamiento aleatorio (especies con reproducción sexual) y a la ausencia de flujo génico dado que sería la única población. Tal es el caso de *Cyprinodon diabolis* Miller, 1943, una especie de pez de la familia Cyprinodontidae con una única población natural conocida, aislada en un hábitat discreto constituido por una pequeña poza en el Parque Nacional *Death Valley* en California en la que, hasta hace relativamente poco tiempo, habitaban todos los individuos de esta especie, hasta su introducción artificial en otros sitios como medida de conservación (Williams, 1977). Sin embargo no es frecuente que las especies habiten en un espacio geográfico continuo, en la mayoría de los casos se distribuyen en hábitats discontinuos separados por barreras geográficas formando parte de comunidades locales. En este sentido los sistemas insulares pueden ser definidos como conjuntos de ambientes afines distribuidos a manera de parches, delimitados por ambientes hostiles que representan barreras geográficas que limitan o impiden el flujo de individuos entre las poblaciones que los habitan (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007).

A mediados del siglo XIX, Charles Darwin fue de los primeros en proponer el origen monofilético de las especies y, en consecuencia, que las especies se deben originar a partir de una ubicación geográfica única, en contraste con la visión creacionista de la época en la que predominaba la idea de múltiples centros de origen para explicar la distribución actual de las especies: *“The view of each species having been produced in one area alone, and having subsequently migrated from that area as far as its powers of migration and subsistence under past and present conditions permitted is the most probable”* (Darwin, 1859). Hoy en día, sabemos que la distribución actual

de los individuos que componen a las especies es el resultado de procesos históricos de vicarianza y dispersión. En el caso de la vicarianza las poblaciones son divididas por la formación de barreras geográficas como la separación de continentes por la deriva continental, la aparición de una cadena montañosa, la construcción de una carretera o la desecación de un segmento intermedio de un lago somero, dando lugar a parches de hábitat separados. Por otra parte, los procesos de dispersión juegan un papel central en el establecimiento de poblaciones y comunidades en ambientes nuevos, creados a partir de eventos geológicos como por ejemplo las islas volcánicas y los lagos-cráter tipo *maar*.

Los archipiélagos son considerados sistemas insulares o porciones de tierra bien delimitadas y separadas entre sí por el océano que representa una barrera geográfica para los organismos terrestres y limita su dispersión. Sin embargo, los archipiélagos no son el único tipo de Sistema insular, existe una gran variedad de hábitats que se deben considerar como sistemas insulares debido que se integran por un conjunto de elementos discretos aislados geográficamente. Por ejemplo, las fuentes hidrotermales submarinas y las surgencias frías albergan vastas comunidades de organismos sustentados por bacterias quimiosintéticas que llevan a cabo el papel de productores primarios que metabolizan el metano y el sulfuro de hidrógeno abundante en estos ambientes, por lo que los espacios entre cada fuente son zonas estériles incapaces de sustentar la vida, lo cual limita el tránsito de organismos entre sistemas vecinos (Mullineaux & France, 2013). Dentro de los continentes, los sistemas montañosos son porciones de terreno que comparten características físicas como un gradiente de elevación, tipos de suelo, condiciones atmosféricas, etc., y como consecuencia una biota adaptada a esas condiciones, por lo tanto los valles entre las montañas representan una barrera geográfica a los organismos adaptados a las tierras altas. Por otra parte, entre los sistemas de aguas continentales, los conjuntos de lagos y estanques en una cuenca son en esencia análogos a los archipiélagos, se trata de parches discretos de agua embebidos en una matriz de tierra que limita el flujo de los organismos acuáticos y que constituye también una especie de Sistema insular integrado por elementos independientes de forma similar a las isla oceánicas (Wilson & Bossert, 1971).

ETAPAS DE LATENCIA EN EL ZOOPLANCTON

Uno de los grupos de organismos que habita en los ambientes acuáticos epicontinentales (p. ej. lagos y estanques) que pueden integrar sistemas insulares es el zooplancton. Este grupo puede definirse como el conjunto de los organismos heterótrofos presentes en la columna de agua e incluye a diferentes grupos taxonómicos, desde pequeños protozoos hasta metazoos macroscópicos como las medusas y las etapas larvarias de algunos otros organismos incluyendo peces (Sanders, 2014). El zooplancton habita en la columna de agua de ambientes tales como los océanos y las aguas continentales y, en contraste con el neuston (p. ej., peces) los organismos zooplanctónicos poseen una capacidad relativamente restringida para desplazarse de manera sostenida en una dirección determinada, debido a esto su ubicación en la columna de agua está principalmente sujeta a la dirección del movimiento del agua. Los organismos zooplanctónicos juegan un papel clave en las redes tróficas de los ambientes acuáticos, sirviendo como un vínculo entre los productores primarios y los depredadores, consumiendo el fitoplancton y a su vez sirviendo como alimento para otros organismos tales como peces e insectos. El zooplancton de las aguas continentales se compone principalmente de tres grupos de invertebrados: rotíferos (Phylum Rotifera) y dos grupos de pequeños crustáceos, los cladóceros (Superorden: Cladocera) y los copépodos (Subclase: Copepoda) que habitan en ambientes acuáticos lóticos (arroyos, ríos, canales, etc.) y lénticos (lagunas, lagos, estuarios, zonas de inundación, etc.).

Al igual que ocurre en los ambientes terrestres, las condiciones ambientales locales en este tipo de ecosistemas acuáticos no siempre las adecuadas para los organismos que los habitan. Sin embargo, en la historia evolutiva de los diferentes grupos taxonómicos han aparecido estrategias, como la migración y la latencia, para hacer frente a los cambios en condiciones ambientales. La latencia por su parte envuelve a dos estrategias, la dormancia y la diapausa. La dormancia hace referencia a una suspensión abrupta en el desarrollo de los organismos, es causada por cambios en el ambiente en cualquiera de las fases de los ciclos de vida de los organismos y es reversible en cualquier momento cuando las condiciones ambientales son favorables. Por otra parte, la diapausa se define como una pausa en el desarrollo en una etapa definida de la ontogenia (especie-específico) y es irreversible temporalmente durante un

período refractario (Ricci, 2001). La capacidad para producir estados latentes es un atributo que ha evolucionado independientemente en una amplia variedad de grupos taxonómicos. En particular, cabe destacar que en los tres grandes grupos taxonómicos del zooplancton de aguas continentales han evolucionado de forma independiente estrategias para producir estados latentes, relacionados con las diferentes etapas del desarrollo de los ciclos de vida de los organismos.

Con la finalidad de discutir la importancia de la latencia en el zooplancton de aguas continentales y su papel en la dispersión en los sistemas insulares, a continuación se revisan las diferentes estrategias para la producción de estados latentes en los rotíferos, así como de los otros dos grandes grupos taxonómicos del zooplancton, los cladóceros y copépodos presentes en los sistemas acuáticos continentales.

ROTÍFEROS

En el ciclo de vida de los rotíferos de la clase Monogononta las hembras, que son diploides, se reproducen de manera asexual, mediante la formación de huevos subitáneos partenogenéticos. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales se tornan desfavorables para los individuos activos en la columna de agua, se desencadenan los mecanismos moleculares de la meiosis, dando lugar a la aparición de hembras míticas o sexuales. Estas hembras míticas producen huevos haploides, de los cuales eclosionan machos, estos a su vez cortejan a otras hembras míticas y fertilizan los gametos que portan éstas. Una vez que las hembras míticas son fertilizadas, los embriones empiezan a crecer por divisiones mitóticas, sin embargo, este proceso se detiene en una etapa temprana del desarrollo, y los embriones quedan envueltos individualmente en una cobertura gruesa, que les confiere una forma ovoide o esférica, compuesta por una capa externa y una capa interna principalmente de quitina que puede presentar ornamentaciones y algunas especies pueden presentar cámaras de aire (Schröder, 2005).

La aparición de hembras míticas en una población, y por lo tanto de la formación de huevos de resistencia, está regulada por factores ambientales tales como: la salinidad (Lubzens et al.,

1985), la dieta (Pourriot & Rougier, 1979) y la densidad poblacional (Carmona et al., 1993; Stelzer & Snell, 2003), además de factores internos como el genotipo y la edad de las hembras (Gilbert, 1980). Por otra parte, hay algunos ejemplos de rotíferos monogonontes que pueden producir huevos de resistencia asexuales como las especies *Keratella quadrata* (Ruttner-Kolisko, 1946) y *Synchaeta pectinata* (Gilbert & Schreiber, 1998). En cuanto a los rotíferos de la clase Bdelloidea, se trata de un grupo partenogénico obligado y no producen huevos de resistencia sexuales como los rotíferos monogonontes. Sin embargo los rotíferos bdelloideos poseen la capacidad para entrar en una etapa de dormancia en la que los adultos pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en desecación, perdiendo casi toda el agua de sus cuerpos y contrayéndose en una estructura con forma de barril metabólicamente inactiva en un proceso llamado anhidrobiosis, y reanudar su actividad metabólica cuando se rehidratan (Wallace & Snell, 2001).

CLADÓCEROS

Los cladóceros son capaces de reproducirse tanto sexual como asexualmente en un ciclo de vida partenogénico cíclico. En este grupo taxonómico las hembras se reproducen asexualmente la mayor parte del tiempo, pero después de un número variable de ciclos de partenogénesis las hembras producen machos diploides (a diferencia de los machos haploides de rotíferos de la clase Monogononta) como respuesta a las condiciones ambientales, tales como el hacinamiento y los fotoperiodo con corta duración del día (Hobaek & Larsson, 1990), con diferencias determinadas genéticamente (Carvalho & Hughes, 1983) con lo que la población entra en un ciclo con reproducción sexual. Una vez que las hembras son fertilizadas comienza la producción de huevos de resistencia, unas pocas especies liberan estos huevos al medio (Fryer, 1996; Korovchinsky & Boikova, 1996), pero la mayoría de las especies de cladóceros producen una estructura de protección adicional que envuelve a los huevos de resistencia llamada efipio (Cerny & Hebert, 1993). Los efipios son estructuras quitinosas hechas de una parte modificada del caparazón de las hembras, y pueden contener un número variable (especie-específico) de embriones que se liberan con las mudas de las hembras (Fryer, 1996). Estas estructuras pueden permanecer viables en diapausa durante periodos prolongados de tiempo y eclosionar cuando las condiciones ambientales son favorables. A pesar de que los huevos de resistencia de los

cladóceros se producen principalmente como resultado de la reproducción sexual, existen poblaciones de *Daphnia pulex* que no presentan reproducción sexual y, sin embargo, los efipios se producen asexualmente (Cerny & Hebert, 1993).

COPÉPODOS

En contraste con los rotíferos y cladóceros que principalmente se reproducen asexualmente, los copépodos son, en general, de reproducción sexual, a excepción de raros casos de partenogénesis reportados en el orden Harpacticoidea. Los copépodos se reproducen sexualmente, con algunas excepciones (Sarvala, 1979). Los copépodos machos producen espermatozoides que pegan cerca del poro genital de las hembras y cuando los espermatozoides se liberan, los gametos son fertilizados produciendo huevos subitáneos o huevos de resistencia (sólo el orden Calanoida) en función de factores internos, tales como reloj biológico, neuro-secreciones, lípidos, metabolitos, así como factores externos tales como el fotoperiodo, temperatura y densidad poblacional (Dahms, 1995). Los huevos de resistencia producidos son ligeramente diferentes de los huevos subitáneos en cuanto a su morfología, siendo un poco más grandes, en algunos casos con ornamentaciones o más oscuros y pueden poseer una cubierta más gruesa que pueden servir como una protección frente a las enzimas digestivas de los vertebrados, la desecación y la degradación bacteriana, lo cual puede extender su viabilidad de 3 a más de 15 años (Dahms, 1995). Por otra parte, se pueden encontrar individuos post-embrionarios inactivos en algunos copépodos marinos calanoides en los estadios larvales de nauplio, como respuesta a condiciones ambientales adversas (Uye, 1980), sin embargo, no hay evidencias de nauplios latentes en las especies de aguas continentales. En contraste es frecuente encontrar copepoditos en estado de latencia en copépodos ciclopoideos, los cuales entran en dormancia como una respuesta directa a las bajas temperatura y reservas de alimentos (Dahms, 1995), con frecuencia las etapas de copepoditos C2 a C5 son las que entran en fases latentes, pero también se ha observado que las hembras fertilizadas del ciclopoide *Cyclops strenuus* pueden entrar en dormancia y se ha reportado que una fracción de los individuos pueden prolongar así su ciclo de vida por un periodo de hasta un año (Næss & Nilssen, 1991). Así mismo, se ha observado que los individuos de la especie *Cyclops scutifer*

pueden prolongar sus ciclos de vida hasta por cuatro años al entrar en dormancia dos veces durante diferentes etapas de desarrollo (Elgmork, 1981). Por otra parte, los calanoides no producen copepoditos latentes, sin embargo, *Eudiaptomus graciloides* presenta un tipo de latencia en los individuos activos similares a lo que ocurre en ciclopoideos (Pasternak & Arashkevich, 1999).

LATENCIA, DISPERSIÓN EN ESPACIO Y TIEMPO

Cabe destacar la relevancia ecológica y evolutiva de que la producción de etapas de latencia, ya que es una característica universal en los diferentes grupos taxonómicos del zooplancton de aguas continentales, mientras que es menos común en los que habitan los ambientes marinos (Hairston & Cáceres, 1996). Tan solo dentro de Rotifera En el grupo de los rotíferos existen dos estrategias de latencia evolutivamente independientes, la producción de huevos de resistencia en los monogonontes y la anhidrobiosis en los bdeloideos. Resulta notable el hecho de que a lo largo de la historia evolutiva de cladóceros, copépodos y rotíferos hayan aparecido etapas de latencia similares de manera independiente como la formación de huevos de resistencia durante la fase sexual del ciclo de vida de partenogénesis cíclica de los cladóceros, así como la producción de huevos diapáusicos en copépodos calanoides y la entrada en dormancia de los ciclopoideos. Esta serie de convergencias evolutivas parece indicar que existe una fuerte presión selectiva sobre este carácter de historia de vida para estos grupos de microinvertebrados en los sistemas acuáticos epicontinentales.

Una hipótesis que puede explicar las estrategias de vida es que en los ambientes acuáticos epicontinentales son más reducidos y pueden sufrir cambios repentinos en temperatura, salinidad etc. en comparación con los ambientes marinos. Debido a esto, la presión selectiva sobre este atributo de historia de vida es mayor en los ambientes de aguas continentales, de tal manera que la capacidad para producir estados latentes puede permitir que rotíferos, cladóceros y copépodos persistan en ambientes cambiantes durante largos períodos de tiempo en condiciones desfavorables para las etapas activas tales como la presencia de depredadores, la escasez de alimentos, cambios en la salinidad debido a la evaporación e incluso

perturbaciones mayores como la desecación temporal de estanques y lagos poco profundos (Bohonak & Jenkins, 2003). En particular, se ha documentado que los incrementos en la salinidad pueden impedir la eclosión de los huevos de resistencia de rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis* (Pourriot & Snell, 1983). También se ha documentado que los huevos de resistencia de varias especies de rotíferos pueden permanecer viables 22 meses en salinidades elevadas y eclosionar cuando la salinidad disminuye (Nielsen *et al.*, 2012).

Otra hipótesis evolutiva para explicar la universalidad de la producción de etapas de latencia propone que debido a que estos organismos no pueden dispersarse activamente, las estructuras de resistencia son la única manera que tienen para migrar y colonizar nuevos ambientes, ya que estas estructuras pueden tolerar las condiciones adversas durante la dispersión, tales como la desecación o las enzimas digestivas de las aves que las pueden ingerir y pasar a través del tracto digestivo. Por lo tanto la producción de estructuras de resistencias habilitaría el transporte pasivo de los organismos de un cuerpo de agua a otro a través de vectores bióticos y abióticos (Havel & Shurin, 2004).

La producción de las etapas de latencia resulta ventajosa ya que aumenta la supervivencia de linajes en hábitats cambiantes, y permite la expansión del rango de distribución a éstos hacia localidades desocupadas y que representan nichos con potencial para ser explotados. En una escala de tiempo evolutivo, esto podría representar una oportunidad para la diversificación biológica de los linajes en función de las presiones selectivas ejercidas por los ambientes recién colonizados. Adicionalmente, a estas dos hipótesis, en el caso de rotíferos monogonontes y cladóceros, en los que la producción de estados de latencia está íntimamente ligada a la reproducción sexual, la producción de estructuras de resistencia puede significar un incremento en la variabilidad genética debido a los eventos de recombinación, lo cual puede resultar ventajoso para la selección natural en periodos de variabilidad ambiental (Carmona *et al.*, 2009; Roger Pourriot & Snell, 1983).

Si bien la producción de estados latentes puede resultar muy ventajosa en la dispersión y supervivencia a largo plazo en estos organismos zooplanctónicos de aguas epicontinentales así como para la variabilidad genética de las poblaciones, lo cierto es que en el corto plazo, los

mecanismos de latencia pueden representar importantes costos para la eficiencia biológica de estos organismos en términos de gasto energético, de tiempo, de riesgo y de pérdidas de oportunidad (Bonte *et al.*, 2012). Poniendo como ejemplo a los rotíferos monogonontes, la expresión de los mecanismos de latencia implica un costo energético elevado ya que las hembras amicticas se reproducen asexualmente de manera iterópara, produciendo cada una varias descendientes, sin embargo, cuando se presenta en el ambiente el estímulo para la reproducción sexual las hembras producen machos y los eventos reproductivos implican un mayor gasto energético (Carmona *et al.*, 2009), además de que cada hembra fecundada producirá un solo huevo de resistencia (o unos pocos), tomando más tiempo la producción de descendientes y disminuyendo así la eficiencia biológica a corto plazo. A esto hay que sumar el riesgo que existe de que los huevos de resistencia producidos no lleguen a eclosionar en el sitio al que sean transportados debido a que el ambiente no presente las condiciones ambientales adecuadas o a que sean dañados durante el transporte. Por otra parte, los descendientes que pudieron estar adaptados a las condiciones ambientales locales pueden perder la oportunidad de habitar un ambiente óptimo al ser dispersados a otro sitio con condiciones distintas, en donde su eficiencia biológica puede ser menor.

Sin embargo, este conjunto de desventajas que aparentemente implican un costo en términos de eficiencia biológica a corto plazo, en el largo plazo deben ser compensadas por las ventajas que ofrece la dispersión, porque lo cierto es que en cualquiera de ambos casos, las etapas de latencia representan una vía de dispersión ya sea en el tiempo (persistencia en un mismo sitio en momentos diferentes) y en el espacio, respectivamente (Cáceres, 1997; Gyllström & Hansson, 2004).

VÍAS DE DISPERSIÓN PASIVA

Las etapas latentes pueden resistir las condiciones adversas del transporte pasivo de un ecosistema acuático a otro, debido a esto, históricamente se ha considerado que los eventos de colonización de estos grupos de organismos zooplanctónicos, debido a sus altas tasas de crecimiento poblacional, son muy frecuentes y se dan en periodos cortos. Incluso el mismo

Charles Darwin ya hace referencia a la alta capacidad de dispersión de los acuáticos (Darwin, 1859). Posteriormente en el siglo XX Ernst Mayr también apunta sobre este hecho: “...*species (of freshwater organisms) that are successful in colonizing temporary bodies of water have in general such superb dispersal abilities that their entire world population may well be nearly panmictic*” (Mayr, 1965; citado en De Meester *et al.*, 2002). En este sentido, existen reportes anecdóticos de zooplancton transportado por insectos, aves, anfibios y mamíferos (citados en Cáceres & Soluk, 2002), sin embargo, estudios más recientes demuestran que existen diferencias entre las especies en el zooplancton en cuanto a su potencial y vías de dispersión (Jenkins, 1995). A continuación, se revisan los principales mecanismos de dispersión documentados para los rotíferos en particular, para posteriormente discutir el papel de la dispersión sobre la conectividad entre poblaciones.

Dispersión por viento y lluvia

Jenkins & Underwood (1998) utilizaron trampas para capturar las estructuras de resistencia de invertebrados acuáticos transportadas por el viento y la lluvia en una estación ubicada junto a un cuerpo de agua y en otra distante. En las trampas para viento solamente encontraron rotíferos bdeloideos, mientras que en las trampas para lluvia encontraron además de bdeloideos, tres especies de rotíferos monogonontes. A partir de estos resultados, concluyeron que la dispersión por estos medios es factible para los rotíferos, aunque poco frecuente a distancias mayores de 1 km, además de que registraron la presencia de la especie *Keratella cochlearis* en la misma fecha en trampas de lluvia separadas por 80 km, lo cual bien podría no tratarse de una coincidencia, sino de eventos interrelacionados (Jenkins & Underwood, 1998). En contraste, en otro experimento se registró la colonización de 12 especies de rotíferos monogonontes y un bdeloideo, así como varias especies de cladóceros y copépodos en un conjunto de estanques experimentales, preparados como varios tratamientos en los que los estanques fueron cubiertos con mallas de diferentes aperturas y otras completamente descubiertas que permitían el acceso diferencial a animales de diferentes tallas (posibles vectores de dispersión). Dado que no encontraron diferencias significativas entre los

tratamientos con las diferentes mallas, los autores concluyeron que la colonización de los ambientes se dio principalmente por medio del viento y la lluvia (Cáceres & Soluk, 2002).

Dispersión por animales.

En este apartado se pueden considerar dos tipos de dispersión para el zooplancton, la ectozoocoria, en la que los organismos se dispersan adheridos en la parte exterior de los animales, y la endozoocoria, cuando son transportados dentro del tracto digestivo. En cuanto al transporte en endozoocoria por parte de las aves, existen evidencias de que las estructuras de resistencia del zooplancton pueden pasar a través del tracto digestivo de aves alimentadas intencionalmente con estas estructuras en condiciones experimentales y seguir siendo viables (Proctor & Malone, 1965). Por otra parte, Jenkins & Underwood (1998) incubaron heces de patos en estado salvaje y no detectaron la eclosión de estructuras de resistencia de organismos acuáticos. Sin embargo, existe evidencia anecdótica de que las aves pueden dispersar de manera endozoocoria organismos acuáticos incluyendo rotíferos hasta a miles de kilómetros de distancia, aunque hacen falta más estudios para tratar de determinar la frecuencia y cantidad de organismos transportados (Figuerola & Green, 2002). En cuanto a los mamíferos como vía de dispersión, existe evidencia del transporte pasivo de huevos de resistencia de rotíferos tanto en endozoocoria como en ectozoocoria, principalmente en lodo adherido a la piel en jabalíes de la especie *Sus scrofa* (Vanschoenwinkel *et al.*, 2008) y en elefantes de la especie *Loxodonta africana* y que potencialmente podrían dispersar los huevos de resistencia a largas distancias en un tiempo relativamente corto (Vanschoenwinkel *et al.*, 2011), sin embargo, ambos estudios coinciden en que, contrario a lo que cree que ocurre en las aves, la ectozoocoria es más común en mamíferos que la endozoocoria.

Dispersión antropogénica

Las actividades humanas también juegan un papel importante sobre la dispersión a larga distancia de las estructuras de resistencia del zooplancton, particularmente la globalización del transporte por vías acuáticas ha generado un flujo sin precedentes, no solo de mercancías, sino

de especies transportadas de manera involuntaria entre sistemas acuáticos a grandes distancias. Existen registros contemporáneos de invasiones de especies de cladóceros provocadas por el transporte marítimo de carga entre continentes, y principalmente por el transporte de agua de un continente a otro en los tanques de lastre de los barcos, como en el caso de linajes del complejo de especies crípticas del cladocero *Daphnia pulex* originarios de Norteamérica detectados en Kenia (Mergeay *et al.*, 2005) y Nueva Zelanda (Duggan *et al.*, 2012), revelados mediante el uso de marcadores moleculares, así como *Daphnia lumholtzi* de África en Norteamérica (Havel *et al.*, 2000). También se ha reportado el transporte de estructuras de resistencia del zooplancton, entre ellas los huevos de resistencia de algunas especies de rotíferos, en el sedimento de los tanques de lastre en algunos barcos que transitan continuamente entre los Grandes Lagos, en la frontera de los EUA con Canadá, se ha observado que estas estructuras de resistencia son viables y tienen el potencial para eclosionar después del viaje y, si bien, el contenido de este tipo de tanques en particular no es depositado directamente en los lagos, los autores sugieren que se debe tener cuidado en las maniobras de deslastre y limpieza de los tanques para evitar el intercambio de huevos de resistencia viables entre lagos vecinos (Bailey *et al.*, 2005).

HIPÓTESIS DE LA MONOPOLIZACIÓN

A la luz del hipotético alto potencial del zooplancton para dispersarse de manera pasiva a través de los vectores que se discutieron anteriormente, se esperaría un alto flujo génico entre poblaciones vecinas de una especie debido a la gran vagilidad de sus individuos. Sin embargo, lo que se ha observado en diversos análisis de estructura poblacional mediante el uso de marcadores moleculares, es que el flujo génico entre las poblaciones que habitan en sistemas vecinos es relativamente bajo. Este aparente aislamiento geográfico de las poblaciones parece representar una paradoja para organismos que poseen esta alta capacidad para dispersarse como los rotíferos, ya que se podría esperar una marcada conectividad entre poblaciones vecinas y, sin embargo, es común encontrar una marcada subdivisión poblacional aún en una escala geográfica reducida (De Meester *et al.*, 2002).

A este respecto, la estructura poblacional frecuentemente observada en poblaciones zooplanctónicas puede ser atribuida a la persistencia de eventos de fundador, es decir, que las poblaciones se fundan a partir de unos pocos genotipos (dispersados pasivamente a través de estructuras de resistencia) y, debido a las altas tasas reproductivas en este tipo de organismos, son estos mismos genotipos fundadores los que persisten a través del tiempo (hasta la aparición de mutaciones) y conforman a las poblaciones, dando como resultado que los nuevos genotipos que posteriormente pudieran dispersarse hasta dicho hábitat y establecerse, tengan una frecuencia muy reducida (Boileau *et al.*, 1992). De esta manera, la persistencia del efecto fundador ofrece una parte de la posible explicación para este tipo de fenómenos de subdivisión poblacional como en el caso de los organismos zooplanctónicos que habitan en sistemas insulares.

En este sentido la Hipótesis de la Monopolización representa un complemento teórico a la persistencia del efecto fundador como explicación para esta aparente paradoja entre la aparente alta vagilidad de este tipo de organismos y los patrones de distribución heterogénea de la diversidad genética observados. Esta hipótesis postula que cuando una población de partenogénicos cíclicos es fundada a partir de una o unas pocas variantes genéticas, el efecto fundador es preservado a través del tiempo debido a que estas poblaciones se pueden establecer y proliferar rápidamente reproduciéndose de manera asexual monopolizando el espacio y los recursos, y más tarde, durante los eventos de reproducción sexual se pueden generar bancos de huevos de resistencia que actúan como un reservorio genético protegiendo a las poblaciones de eventuales extinciones en ambientes cambiantes (Hairston, 1996). Este efecto aún se puede ver reforzado por la adaptación de las poblaciones a las condiciones ambientales locales, de tal manera que si nuevas variantes genéticas se dispersaran hasta un hábitat previamente ocupado, estas difícilmente podrían contribuir de manera importante al reservorio genético ya que estarían en desventaja en términos de eficacia biológica, reforzándose así la persistencia del efecto fundador y dando como resultado un fenómeno importante de aislamiento genético entre las poblaciones (De Meester *et al.*, 2002).

REPERCUSIONES SOBRE LA ESTRUCTURACIÓN DE METAPOBLACIONES Y METACOMUNIDADES

El aislamiento genético característico observado en las poblaciones de rotíferos (ver capítulo 6) tiene implicaciones sobre las dinámicas ecológicas y evolutivas a nivel local y regional. En este sentido, un sistema insular integrado por varios cuerpos de agua (p. ej. una cuenca hidrológica) puede estar habitado por diversas especies distribuidas a manera de subpoblaciones entre los diferentes cuerpos de agua conformando un sistema de metapoblaciones. Las metapoblaciones pueden ser definidas como conjuntos de poblaciones establecidas en parches de hábitat separados, pero que interactúan debido al intercambio de individuos producto de la dispersión (Gilpin, 1991). En este sentido el flujo génico resultado de los procesos regionales de migración representa un elemento de cohesión entre las poblaciones que viven en parches separados, en donde se puede esperar que a mayor flujo de individuos exista una mayor tendencia hacia una distribución homogénea de la diversidad genética.

En contraparte, la aparente falta de interacción entre poblaciones vecinas (inferida a través del patrón de estructura genética de las poblaciones) observada en este tipo de organismos puede tener una gran relevancia evolutiva, ya que cada población aislada en un parche estará siendo afectada por los factores locales de cada hábitat tales como la composición química del agua (Tobler *et al.*, 2008; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), los recursos limitantes (Dodson *et al.*, 2000), la competencia (DeMott, 1989) y la presencia de depredadores (Brooks & Dodson, 1965), entre otros. Dando lugar así a presiones selectivas propias de cada ambiente que pueden promover la formación de linajes cada vez más diferenciados unos de otros debido a la falta de intercambio de migrantes y que eventualmente pueden quedar separados hasta perder la capacidad de entrecruzarse dando origen, eventualmente, a nuevas especies. En este sentido, el reciente descubrimiento de una gran cantidad de nuevas especies crípticas de rotíferos (Suatoni, *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2011; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) parece indicar la existencia de un patrón general de diversificación biológica que bien podría estar promovido por el alto grado de aislamiento entre poblaciones.

Por otro lado, el aislamiento geográfico de las poblaciones de rotíferos debido a la persistencia de los efectos fundador, y reforzado por las diferencias en los factores locales tales como la salinidad y los componentes biológicos, daría como resultado a nivel regional a una dinámica

particular para la metacomunidad emergente. Las metacomunidades pueden ser definidas como “una comunidad de metapoblaciones”, conjuntos de comunidades locales que están vinculadas por la dispersión de especies que potencialmente interactúan ecológicamente (Gilpin & Hansky, 1991). En este sentido, los sistemas insulares juegan un papel central para la integración de las dinámicas metacomunitarias.

Bajo este esquema se han formulado cuatro modelos de metacomunidad en función de la capacidad de dispersión de los organismos que las integran, 1) Dinámica de parches, asume la existencia de múltiples parches idénticos con dinámicas estocásticas y determinísticas de extinción y colonización que pueden ser promovidas por las interacciones ecológicas locales. 2) Ordenamiento de especies, la metacomunidad está integrada por comunidades locales aisladas entre sí, en donde a pesar de que las tasas de dispersión pueden ser elevadas, esto no resulta suficiente para alterar la distribución de las especies, dando como resultado una distribución heterogénea de la diversidad biológica en la escala regional. 3) Efecto de masas, a diferencia de los otros modelos en los cuales la escala temporal de los procesos de colonización y extinción está desacoplada de los procesos ecológicos locales, asume que la dispersión puede tener efectos directos sobre las dinámicas de comunidades locales fuertemente conectadas. 4) modelo neutral, a diferencia de los otros modelos, los cuales asumen que las especies difieren ya sea en sus relaciones ecológicas con los factores locales o bien en su capacidad de dispersión, el modelo neutral puede ser visto como la hipótesis nula, integrado por especies ecológicamente equivalentes y con la misma capacidad de dispersión, dando como resultado una distribución homogénea de la diversidad biológica en la escala regional (Leibold *et al.*, 2004).

Un sistema insular como el que constituyen varios cuerpos de agua dentro de una cuenca hidrológica, puede dar lugar a comunidades locales de rotíferos disímiles entre sí, a pesar de que los parches se encuentren muy cercanos, configurando sistemas en los que la riqueza regional de especies se encuentra distribuida de manera heterogénea, es decir con una diversidad β alta. Sin embargo, hasta la fecha una buena parte de los esfuerzos para tratar de entender las metacomunidades son teóricos y aún hacen falta más aproximaciones empíricas

que permitan establecer de manera más clara las dinámicas ecológicas en este nivel (Logue *et al.*, 2011).

LA CUENCA ORIENTAL COMO MODELO

La Cuenca hidrológica endorreica Oriental está localizada en la parte central de México, en la zona de colindancia de los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz. Está ubicada en la parte oriente de la Faja Volcánica Transmexicana y limita hacia el este con el Cofre de Perote, hacia el sur con un sistema de rocas marinas sedimentarias que datan del periodo Mesozoico, hacia el norte con la caldera de Los Humeros y hacia el oeste con una cadena volcánica del Mioceno. En la cuenca están presentes formaciones ígneas tales como conos cineríticos, domos volcánicos y aproximadamente una docena de cráteres tipo *maar*. Cabe destacar que la edad de los sistemas que integran a la Cuenca Oriental es relativamente breve en la escala de tiempo geológico, ya que se remonta al Cenozoico tardío, entre las épocas del Plioceno y Holoceno (Carrasco-Núñez, *et al.*, 2007; Ort & Carrasco-Núñez, 2009). En la actualidad seis de los cráteres presentes en la Cuenca Oriental contienen agua superficial, conformando un conjunto de lagos-cráter, estos son: La Preciosa, Aljojuca, Quechulac, Tecuitlapa, Alchichica y Atexcac, los cuales datan del Pleistoceno (Armienta *et al.*, 2008). Estos lagos-cráter presentan características físicas comparables entre sí, son profundos, monomícticos cálidos (Lewis, 1983), con un evento de mezcla de la columna de agua por año durante el invierno, (Tabla 1; excepto Tecuitlapa) y perennes, además, cada uno es estable en su salinidad en el mediano-largo plazo (sin cambios importantes entre estaciones (Caballero *et al.*, 2003). Por ello, las condiciones producidas por los eventos de mezcla y estratificación de los lagos profundos son las más contrastantes a lo largo del año. Por otra parte, Tepeyahualco y El Carmen son dos lagos playa someros que son considerados como cuerpos de agua temporales de llenado episódico (Alcocer & Hammer, 1998). Si bien, este conjunto de lagos presenta algunas diferencias en las composiciones iónicas del agua (Caballero *et al.*, 2003; Armienta *et al.*, 2008), sin duda el parámetro físico-químico que se destaca como factor común que es contrastante entre los diferentes lagos es el gradiente de salinidad, que va desde 0.48 g L^{-1} en Quechulac hasta 48 g L^{-1} en El Carmen (Figura 1; Tabla 1). Los cuerpos de agua que integran la cuenca se encuentran distribuidos en un área

relativamente pequeña y la distancia máxima entre lagos es < 40km (Figura 1). Cabe destacar que en los lagos de esta cuenca es común observar diversas especies de aves acuáticas como: *Aythya affinis*, *Oxyura jamaicensis*, *Podiceps nigricollis*, *Calidris minutilla*, *C. bairdii*, *C. mauri* y *Fulica americana* (Alcocer *et al.*, 2014).

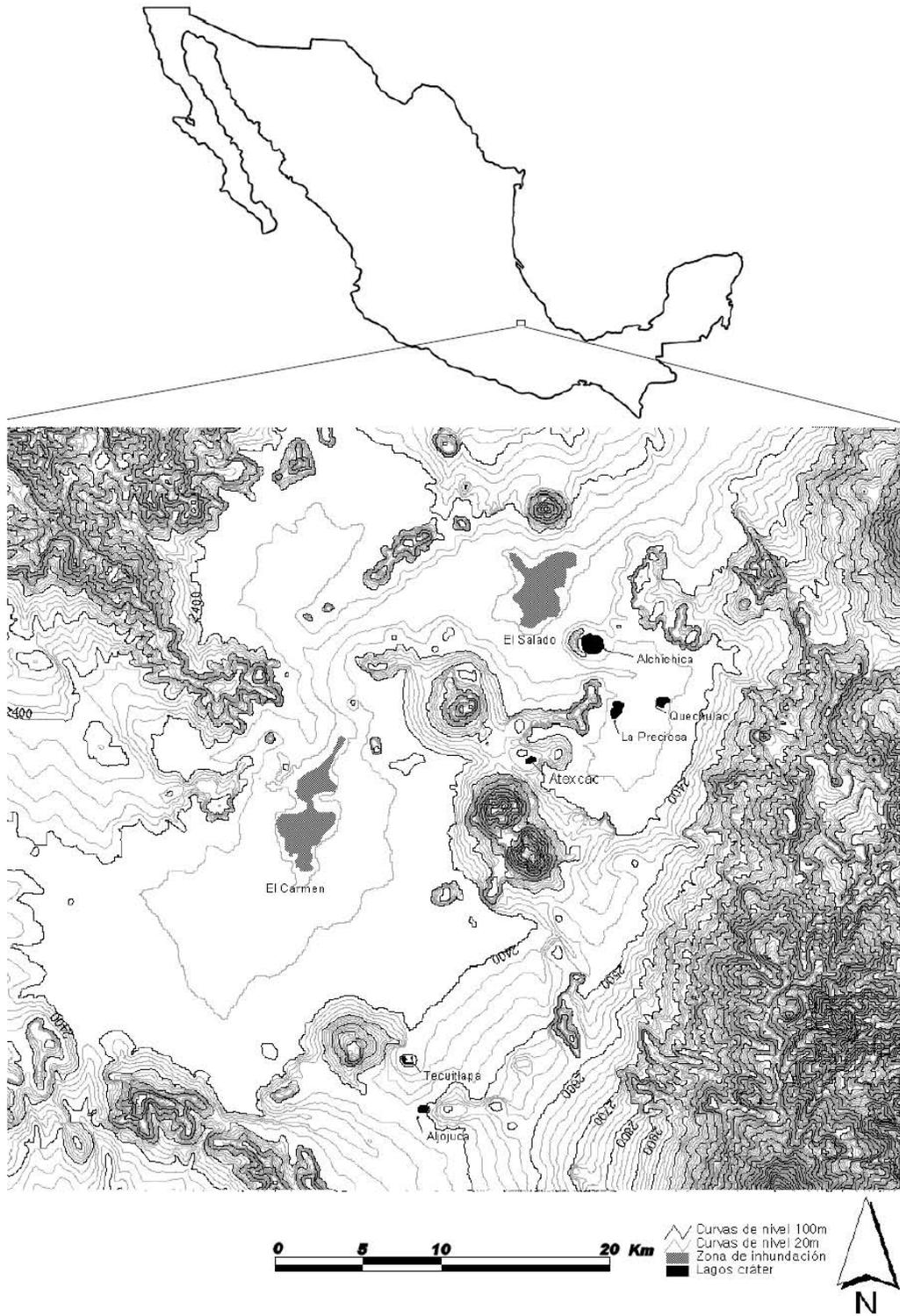


Figura 1. Modelo altimétrico de la Cuenca Oriental (Modificado de Alcántara-Rodríguez, 2010)

Tabla 1. Principales características físico-químicas de los lagos de la Cuenca Oriental. Datos tomados de Caballero *et al.*, 2003; Ramírez-García *et al.*, 1989; observaciones personales. Alc, Alchichica; Atx, Atexcac; Pre, La Preciosa; Alj, Aljojuca; Tec, Tecuitlapa; Que, Quechulac; Car, El Carmen; Tep, Tepeyahualco.

	Alc	Atx	Pre	Alj	Tec	Que	Car	Tep
Área (km ²)	1.81	0.29	0.78	0.44	0.26	0.5	Variable	Variable
Z _{max} (m)	64	35	45	45	2.5	35	Variable	Variable
Salinidad (g L ⁻¹)	9.0	6.5	1.1	0.78	2.1	0.48	1.4-48	Variable
Perenne	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No

El presente estudio busca entender mejor los patrones de diversificación de los rotíferos en sistemas acuáticos continentales con distribución insular utilizando la Cuenca Oriental (estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz) como modelo. Las poblaciones de rotíferos monogonontos de la Cuenca Oriental resultan particularmente interesantes dadas las características de su ciclo de vida, que involucra a la partenogénesis cíclica, y de las peculiaridades de los lagos que habitan, principalmente su distribución insular, cercanía, su historia común (desde el Pleistoceno tardío), así como el gradiente de salinidad entre los lagos que integran la cuenca y el régimen hídrico (altamente estables vs. altamente variables). Así, en este escenario ecológico y evolutivo particular, se pueden analizar patrones de diversificación biológica, producto del posible aislamiento reproductivo entre poblaciones y de procesos de selección natural divergente, poniendo a prueba la hipótesis de la monopolización y dilucidando los patrones de configuración de comunidades locales independientes o metacomunidades como responsables de la diversificación biológica local y regional.

HIPÓTESIS

Dadas las restricciones en el flujo génico predichas por la hipótesis de la monopolización para las poblaciones de rotíferos en sistemas acuáticos vecinos y dada la disimilitud ambiental de los lagos, la diversidad regional de los rotíferos de la Cuenca Oriental presenta un patrón de estructura de poblaciones y composiciones comunitarias locales propias para cada sistema ajustándose al modelo metacomunitario de Ordenamiento de especies (Leibold *et al.*, 2004).

OBJETIVO

Objetivo General

Analizar los procesos de diversificación biológica regional y local de los rotíferos de la Cuenca Oriental por medio de experimentos de jardín común y análisis poblacionales con marcadores moleculares como método indirecto para inferir la intensidad de los procesos de migración entre lagos.

Objetivos particulares

1. Analizar la distribución de la diversidad regional de especies de rotíferos en los lagos de la cuenca.
2. Inferir el potencial de colonización de las diferentes especies de rotíferos en función de la salinidad a partir de experimentos de jardín común en el laboratorio.
3. Analizar la posible presencia de especies crípticas en linajes seleccionados que habitan en ambientes divergentes mediante el análisis de secuencias del gen COI como marcador molecular.

4. Determinar la estructura genética de las poblaciones de una especie seleccionada (*B. grupo plicatilis*) a través del análisis de *SNP's* mediante el uso de GBS (genotyping by sequencing) e inferir así el grado de flujo genético actual entre las poblaciones.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La presente tesis se organiza en seis capítulos. Partiendo de la hipótesis de que la heterogeneidad ambiental puede promover el ensamblaje de comunidades locales disímiles, en el segundo capítulo se analiza la diversidad regional de especies de rotíferos y se discute la distribución de las 63 especies de rotíferos registradas en función de la salinidad de los lagos, donde los análisis de ordenamiento muestran un patrón de heterogeneidad en la composición de las comunidades locales. Además, se observa que algunas de las especies se encuentran preferentemente en los lagos más salinos de la cuenca, mientras que otras sólo pueden habitar en los lagos de menor salinidad, en un patrón donde la riqueza de especies está inversamente relacionada con la salinidad de los lagos.

La heterogeneidad en la distribución de especies en un sistema insular como la Cuenca Oriental puede ser originada por un gran número de factores ecológicos. En este conjunto de lagos en particular el factor que se destaca por presentar una amplia diversidad en la cuenca es la salinidad. Por esto, con la finalidad indagar si la salinidad es el factor determinante de la distribución de la diversidad de rotíferos observada, en el tercer capítulo se analiza el efecto que esta tiene sobre el potencial para colonizar ambientes de salinidad distinta a la que habitan. Utilizando experimentos de jardín común en laboratorio se evaluaron las posibles barreras eco-fisiológicas a corto plazo en los ciclos de vida (eclosión de huevos de resistencia), responsables de la distribución de la diversidad de rotíferos a lo largo de la cuenca. Dichos experimentos revelaron que algunas de las especies como *F. terminalis*, *P. dolichoptera*, *A. girodi*, y *A. silvestrii* presentan una tolerancia muy estrecha a la salinidad, eclosionando únicamente en las salinidades más bajas y para las cuales resultaría imposible colonizar los ambientes más salinos, explicando su presencia exclusivamente en los lagos de agua dulce. Sin embargo, los experimentos también revelan la presencia de especies como *H. jenkinsae*, *B. urceolaris* y *B. sp.* 'México' con una amplia plasticidad fenotípica para la eclosión en diferentes salinidades, siendo

capaces de eclosionar exitosamente en todo el espectro de salinidad de los lagos de la cuenca, de tal manera que el efecto de la salinidad sobre la eclosión de estas especies no es suficiente para explicar su distribución.

Hasta este punto los resultados obtenidos revelan el papel de la heterogeneidad de la salinidad entre los diferentes lagos como factor determinante para explicar (al menos en parte) la estructura de la metacomunidad de rotíferos que habita la Cuenca Oriental. En el cuarto capítulo se seleccionó a la especie *B. sp 'México'* como modelo para ser analizada a mayor detalle. De los resultados obtenidos para desarrollar este capítulo se publicó el artículo "*Local adaptation in populations of a Brachionus group plicatilis cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico*" en la revista *Freshwater Biology*, en donde se explora el papel de la salinidad en etapas posteriores a la eclosión en el ciclo de vida de esta especie (capaz de eclosionar en todas las salinidades de la cuenca) para poner a prueba su capacidad para fundar poblaciones estables, capaces de mantener el crecimiento poblacional en el mediano y largo plazo en las diferentes condiciones de salinidad de los lagos la cuenca. Entre los resultados obtenidos con esta especie se destaca que los huevos de resistencia pueden eclosionar, e incluso puede reproducirse partenogenéticamente, en el mediano plazo, las salinidades bajas representan una presión selectiva importante para estos organismos, en los que se observa una disminución en su eficiencia biológica (medida a partir de su tasa de crecimiento poblacional) y develando la adaptación local de la población del lago La Preciosa a la condición de baja salinidad en la que habita. También se llevaron a cabo análisis de diversidad genética con las secuencias del gen COI (Subunidad I de la Citocromo c Oxidasa) que revelan que esta es una especie que aún no se ha descrito y se encuentra en el complejo de especies crípticas *B. plicatilis*, lo cual se confirmó mediante pruebas de conducta reproductiva y análisis morfométricos. De acuerdo con los resultados de respuesta a la salinidad, se obtuvieron indicios de la existencia de rasgos ecofisiológicos exclusivos para una de las poblaciones, lo cual se atribuye a un proceso de evolución adaptativa e interrupción del flujo génico con un patrón de fragmentación alopátrica. Sin embargo, los análisis de las secuencias de COI no revelaron patrones de estructura poblacional.

Por otra parte, con la finalidad de obtener más información acerca de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de rotíferos en la Cuenca Oriental, en el quinto capítulo se analiza la diversidad de dos especies de rotíferos (*H. jenkiniae* y *B. sp. 'México'*) a partir de datos moleculares. Se muestran los resultados del análisis realizado con COI a la especie *H. jenkiniae*, el cual revela la presencia de dos posibles especies (distancia Kimura-2-Parámetros ~27%), morfológicamente idénticas entre sí, pero que bien podrían formar parte de un complejo más amplio de especies crípticas similar al de *B. grupo plicatilis*.

Finalmente, con el propósito de inferir de forma indirecta la intensidad de la migración de individuos de la especie *B. sp. 'México'* entre las poblaciones que habitan en los lagos de la cuenca, en el capítulo seis se analiza la diversidad genética de las poblaciones de *B. sp. 'México'* a partir de información genómica, específicamente de una representación reducida del genoma obtenida mediante el uso de la metodología de GBS (*Genotyping by Sequencing*). Los análisis bayesianos realizados a partir de 296 sitios polimórficos encontrados mediante esta técnica revelan la presencia de tres grupos genéticos bien definidos, integrados cada uno por individuos de cada población analizada (Alchichica, Atexcac y La Preciosa). A partir de estos resultados, se infiere que el flujo génico entre las tres poblaciones de *B. sp. 'México'* que habitan en la Cuenca Oriental se encuentra interrumpido. De esta manera, los análisis moleculares indican que a pesar de la cercanía de los lagos (lo cual permitiría la fácil dispersión a través de huevos de resistencia) y a la capacidad de esta especie para eclosionar en las diferentes salinidades, las poblaciones no mantienen flujo génico entre sí, dando lugar a tres poblaciones que actualmente están aisladas y no a una metapoblación cohesionada por procesos de dispersión y colonización de genotipos. Así, tomando como modelo a *B. sp. 'México'* la diversidad de rotíferos en la cuenca está integrada por un conjunto de poblaciones aisladas entre sí, dando lugar a una dinámica de metacomunidad que se ajusta más probablemente al modelo de ordenamiento de especies (Leibold *et al.*, 2004).

CAPÍTULO 2: DIVERSIDAD DE ESPECIES DE ROTÍFEROS EN LA CUENCA ORIENTAL

INTRODUCCIÓN

Las comunidades bióticas son sistemas biológicos integrados por un conjunto de poblaciones de diferentes especies superpuestas en un espacio y tiempo determinados, dando como resultado dinámicas emergentes, producto de las interacciones bióticas y abióticas y que normalmente tienen efectos sobre las eficiencias biológicas de las poblaciones que las integran. A su vez, el ensamblaje de las comunidades, es decir, el proceso de reclutamiento de las especies que integran a la comunidad está determinado tanto por factores locales como las condiciones ambientales y las interacciones ecológicas como la competencia y la depredación, así como en una escala regional las restricciones de dispersión definidas por la vagilidad de los organismos, la presencia de barreras geográficas y la distancia entre parches entre los hábitats determinan también la integración o no de determinadas especies a una comunidad en el proceso de ensamblaje en una escala local y regional (Begon *et al.*, 2009).

Las comunidades bióticas se establecen en un sinfín de hábitats terrestres y acuáticos, lo cierto es que no siempre es fácil discriminar entre una comunidad y otra, debido a que un conjunto de parches de hábitat pueden estar embebidos en una matriz continua sin barreras geográficas fácilmente identificables teniendo como resultado que los límites entre parches no sean siempre del todo claros. Sin embargo, los sistemas acuáticos continentales, particularmente los lénticos, representan parches de hábitats discretos con barreras perimetrales más o menos identificables. En este sentido, en una escala regional un conjunto de lagos cercanos (p. ej., dentro de una cuenca hidrológica) pueden integrar un sistema insular conformado por parches discretos en donde es posible establecer límites claros entre las comunidades. Este tipo de sistemas insulares dan origen al siguiente nivel de organización de la diversidad biológica, la metacomunidad, definida como un conjunto de comunidades locales que están unidas por el intercambio de colonizadores de múltiples especies con potencial para interactuar por medio de la dispersión (Leibold *et al.*, 2004). En este sentido, las poblaciones y por ende las comunidades de rotíferos en un Sistema insular como la Cuenca Oriental, en teoría, deberían de mantener

una fuerte cohesión debido al alto potencial de colonización de estos organismos (Leibold *et al.*, 2004).

Sin embargo, como se ha discutido en el primer capítulo las poblaciones se fundan a partir de unos pocos colonizadores y debido a sus altas tasas reproductivas, son estos mismos genotipos fundadores los que persisten a través del tiempo (Boileau *et al.*, 1992), y en el caso de los organismos partenogénéticos cíclicos (como los rotíferos monogonontes), la hipótesis de la monopolización (De Meester, 1996) propone que el efecto fundador puede ser reforzado por la adaptación de las poblaciones a las condiciones ambientales locales y la formación de bancos de huevos de resistencia, dando origen a la estructura poblacional frecuentemente observada en poblaciones zooplanctónicas. En este sentido, se ha observado que la salinidad es uno de los factores ecológicos locales que tienen un mayor impacto sobre la fisiología de los organismos acuáticos, incluso, dentro de la Cueca Oriental, se ha observado que este factor ha promovido la adaptación local de poblaciones de rotíferos (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) y copépodos (Barrera-Moreno *et al.*, 2015).

La salinidad del ambiente representa una fuerza selectiva que ha dado origen a adaptaciones fisiológicas que les permiten a los organismos subsistir en las diferentes condiciones de salinidad. A nivel celular, se ha observado que este factor local resulta determinante para la actividad de la enzima Na⁺/K⁺ ATPasa, encargada del transporte activo de los iones y ha sido identificada como un mecanismo relevante para la regulación de la presión osmótica de las células, y que tiene efectos sobre las tasas de crecimiento poblacional del rotífero *B. plicatilis* (Lowe *et al.*, 2007). Los factores ecológicos locales como la salinidad pueden representar un papel fundamental en los procesos de ensamblaje de las comunidades bióticas, determinando su estructura y diversidad, actuando como una barrera eco-fisiológica para la colonización de las especies en una dinámica de metacomunidad que conduce al ordenamiento de especies a nivel regional, dando origen a comunidades locales disímiles entre sí en términos de composición (Leibold *et al.*, 2004).

El sistema que se utiliza como modelo en el presente estudio, la Cuenca Oriental, se encuentra ocupado por un conjunto de comunidades acuáticas sujetas a diferentes condiciones de salinidad que en teoría deberían de ejercer presiones selectivas particulares en cada uno de los lagos, siendo un fuerte promotor del ordenamiento de especies a nivel regional. En este capítulo se analiza la distribución de la diversidad regional de especies de rotíferos mediante la caracterización de las comunidades locales que habitan cada uno de los lagos y se discuten los resultados en el contexto de la Cuenca Oriental como modelo de metacomunidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de poder detectar la mayor parte de la diversidad de especies de rotíferos presente en los lagos de la Cuenca Oriental se llevaron a cabo muestreos de zooplancton tanto en la columna de agua, así como en el banco de huevos de resistencia presente en los sedimentos recientes de los lagos durante los meses de septiembre de 2010 y marzo de 2011. Para muestrear la columna de agua se llevaron a cabo muestreos cualitativos a partir de arrastres verticales (en los lagos profundos) utilizando una red de zooplancton con una apertura de 80 μm . Así mismo, en la zona litoral de los lagos se filtraron ~50 L agua de dos sitios en cada lago con presencia de vegetación acuática (tratando de capturar organismos asociados a la vegetación) a través de un tamiz con una apertura de 80 μm . Los organismos filtrados fueron fijados en formol y transportados al laboratorio. Posteriormente en el laboratorio se analizaron las muestras con la ayuda de un microscopio estereoscópico Leica™ MZ6 y las especies fueron identificadas con base en su morfología mediante el uso de claves de identificación taxonómica (Voigt & Koste, 1978; Nogrady *et al.*, 1995; Segers, 1995; Nogrady & Segers, 2002).

Para muestrear el banco de huevos de resistencia se llevó a cabo la extracción de sedimento de la zona más profunda cada uno de los lagos tipo *maar* con una draga tipo Eckman, (de la orilla en el caso de los lagos someros) tomando muestras cualitativas y cuantitativas del sedimento más superficial (primeros 3 cm), mismas que fueron transportadas al laboratorio en oscuridad y a una temperatura de ~4 °C para reducir los posibles estímulos ambientales de eclosión durante su traslado (Hagiwara *et al.*, 1989). Las muestras cuantitativas (núcleos de sedimentos) fueron recuperadas de la draga Eckman con la ayuda de un nucleador manual ($\emptyset = 2.63$ cm; largo = 3

cm; área = 5.43 cm²; volumen = 16.3 cm³) fabricado a partir de una jeringa de polipropileno de 60 mL.

Muestras cualitativas de 10 g de sedimento húmedo fueron sometidas a la técnica de flotación en sacarosa (Gomez, *et al.*, 2000), disolviéndolas en una solución de sacarosa al 60% en tubos de centrifuga de 50 mL que fueron centrifugadas a 700 rpm durante 5 min; posteriormente se recuperó el sobrenadante y se filtró por un tamiz de 20 µm. Finalmente, para recuperar las estructuras de resistencia, los tamices fueron lavados con agua preparada a la salinidad de cada uno de los lagos de donde era originario el sedimento (Gomez, *et al.*, 2000). El agua utilizada para preparar los medios era agua del grifo que fue filtrada y desionizada a través del sistema Millipore Elix® *Water purification system* y esterilizada en autoclave. Para preparar el agua a las diferentes salinidades se utilizó sal para acuario comercial de la marca Seachem Reef Salt™, la cual fue disuelta en el agua estéril hasta alcanzar el valor de salinidad deseado, el cual fue estimado usando un conductivímetro YSI®, modelo 63.

Los huevos de resistencia fueron aislados y fotografiados con una cámara digital (Moticam™ 2500, 5.0 M Píxel) adaptada a un microscopio invertido Leica™ modelo DMIL. Posteriormente fueron trasladados individualmente a pocillos de placas de cultivo de poliestireno y sometidos a estímulos de eclosión dentro de una cámara ambiental (Biotronette, *Plant Growth Chamber*) en condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo e intensidad lumínica (i. e., 18 ±1 °C, 13 horas luz y 280 µmol quanta m⁻² s⁻¹) características de la temporada de estratificación del lago Alchichica (Alcocer *et al.*, 2001). Los rotíferos eclosionados fueron identificados a nivel de especie mediante uso de las claves taxonómicas arriba mencionadas.

Por otra parte, a partir de las muestras cuantitativas de sedimento se determinó la diversidad y abundancia de especies de rotíferos formando bancos de huevos de resistencia. Con esta finalidad los núcleos (16.3 cm³) se diluyeron (i. e., 3 réplicas × 7 lagos) en una solución de sacarosa al 60% para someterse a la técnica de flotación en sacarosa arriba descrita. Cada núcleo fue procesado 3 veces seguidas mediante la misma técnica de flotación, esto con la finalidad de aumentar la eficiencia de la técnica y recuperar así la mayor parte de los huevos

presentes en los sedimentos. Posteriormente el sobrenadante se colocó en cámaras de sedimentación para zooplancton y con ayuda de un microscopio invertido se realizaron conteos de las estructuras de resistencia por especie, las cuales se determinaron con base en el tipo, forma, tamaño y color, así mismo se determinó su viabilidad con base en los criterios descritos por García-Roger *et al.*, (2006).

Los análisis de estructura de comunidad se llevaron a cabo mediante el uso del software Biodiversity Pro V 2 (McAleece *et al.*, 1997). A partir de los datos obtenidos de los muestreos cualitativos de la columna de agua se generó una matriz de presencia-ausencia de especies, la cual fue sometida a un análisis de similitud de Jaccard (datos cualitativos). Por otra parte, con los datos cuantitativos obtenidos de los núcleos de sedimento se generó una matriz de abundancia de especies en estado de latencia en los sedimentos. A partir de la matriz de datos de abundancia de huevos aparentemente viables, se estimó el índice de diversidad de Shannon para cada banco de huevos, así mismo para determinar la similitud entre comunidades se llevó a cabo análisis de ordenación de Bray-Curtis.

RESULTADOS

Diversidad de rotíferos en la columna de agua y zona litoral

En la columna de agua y zona litoral se identificaron un total de 63 especies de rotíferos de 14 familias pertenecientes a dos órdenes (Ploima y Flosculariaceae), siendo las familias Lecanidae y Brachionidae las más diversas, con 17 y 10 especies, respectivamente, distribuidas en los diferentes lagos de la Cuenca Oriental (Tabla 2. Taxones de rotíferos encontrados en la columna de agua de los lagos (1 Tecuítlapa; 2 Aljojuca; 3 Quechulac; 4 La Preciosa; 5 Atexcac; 6 Alchichica; 7 Tepeyahualco; 8 El Carmen) de la Cuenca Oriental..

Tabla 2. Taxones de rotíferos encontrados en la columna de agua de los lagos (1 Tecuitlapa; 2 Aljojuca; 3 Quechulac; 4 La Preciosa; 5 Atexcac; 6 Alchichica; 7 Tepeyahualco; 8 El Carmen) de la Cuenca Oriental.

	Especies de rotíferos	Lagos							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	Orden Ploima								
I	Familia Brachionidae								
1	<i>Brachionus calyciflorus</i> Pallas, 1766		+	+					
2	<i>Brachionus</i> sp. 'México'				+	+	+		
3	<i>Brachionus</i> sp.	+							
4	<i>Brachionus pterodinooides</i> Rousselet, 1913	+							+
5	<i>Brachionus urceolaris</i> Müller, 1773	+	+	+					+
6	<i>Brachionus variabilis</i> Hempel, 1896		+	+				+	
7	<i>Keratella americana</i> Carlin, 1943			+					
8	<i>Keratella quadrata</i> (Müller, 1786)			+	+				
9	<i>Notholca squamula</i> (Müller, 1786)				+				
10	<i>Platyias quadricornis</i> (Ehrenberg, 1832)			+					
II	Familia Euchlanidae								
11	<i>Euchlanis dilatata</i> Ehrenberg, 1832			+	+				
12	<i>Euchlanis</i> cf. <i>dilatata</i> Ehrenberg, 1832		+						
13	<i>Dipleuchlanis</i> cf. <i>plicata</i> (Levander, 1894)						+		
14	<i>Dipleuchlanis plicata</i> (Levander, 1894)			+					
III	Familia Mytilinidae								
15	<i>Lophocharis oxysternon</i> (Gosse, 1851)			+					
16	<i>Mytilina mucronata</i> (Müller, 1773)		+	+					
17	<i>Mytilina ventralis</i> (Ehrenberg, 1830)			+					
18	<i>Mytilina bisulcata</i> (Lucks, 1912)			+					
IV	Familia Trichotriidae								
19	<i>Trichotria pocillum</i> (Müller, 1776)		+		+				
V	Familia Colurellidae								
20	<i>Colurella uncinata</i> (Müller, 1773)				+				

21	<i>Colurella obtusa</i> (Gosse, 1886)		+	+		
22	<i>Colurella geophila</i> Donner, 1951				+	
<hr/>						
VI	Familia Lepadellidae					
23	<i>Lepadella (Lepadella) princisi</i> Berzins 1943	+				
24	<i>Lepadella</i> sp.	+				
25	<i>Lepadella (Lepadella) ovalis</i> (Müller, 1786)		+	+		
26	<i>Lepadella (Lepadella) patella</i> (Müller, 1773)				+	+
27	<i>Lepadella (Lepadella) triptera</i> (Ehrenberg, 1832)				+	
<hr/>						
VII	Familia Lecanidae					
28	<i>Lecane aculeata</i> (Jakubski, 1912)		+			
29	<i>Lecane</i> sp. 1				+	
30	<i>Lecane</i> sp. 2			+		+
31	<i>Lecane bulla</i> (Gosse, 1851)		+	+	+	+
32	<i>Lecane closterocerca</i> (Schmarda, 1859)	+	+	+	+	
33	<i>Lecane curvicornis</i> (Murray, 1913)				+	
34	<i>Lecane furcata</i> (Murray, 1913)			+		
35	<i>Lecane hamata</i> (Stokes, 1896)			+	+	
36	<i>Lecane</i> cf. <i>punctata</i> (Murray, 1913)					+
37	<i>Lecane lamellata</i> (Daday, 1893)					+
38	<i>Lecane luna</i> (Müller, 1776)	+			+	
39	<i>Lecane lunaris</i> (Ehrenberg, 1832)			+		
40	<i>Lecane nana</i> (Murray, 1913)				+	
41	<i>Lecane inermis</i> (Bryce, 1892)			+	+	
42	<i>Lecane ohioensis</i> (Herrick, 1885)	+				
43	<i>Lecane pyriformis</i> (Daday, 1905)	+	+	+		
44	<i>Lecane quadridentata</i> (Ehrenberg, 1830)			+		
<hr/>						
VIII	Familia Notommatidae					
45	<i>Cephalodella catellina</i> (Müller, 1786)		+	+	+	+
46	<i>Cephalodella gibba</i> (Ehrenberg, 1830)		+			
47	<i>Cephalodella</i> sp.	+				

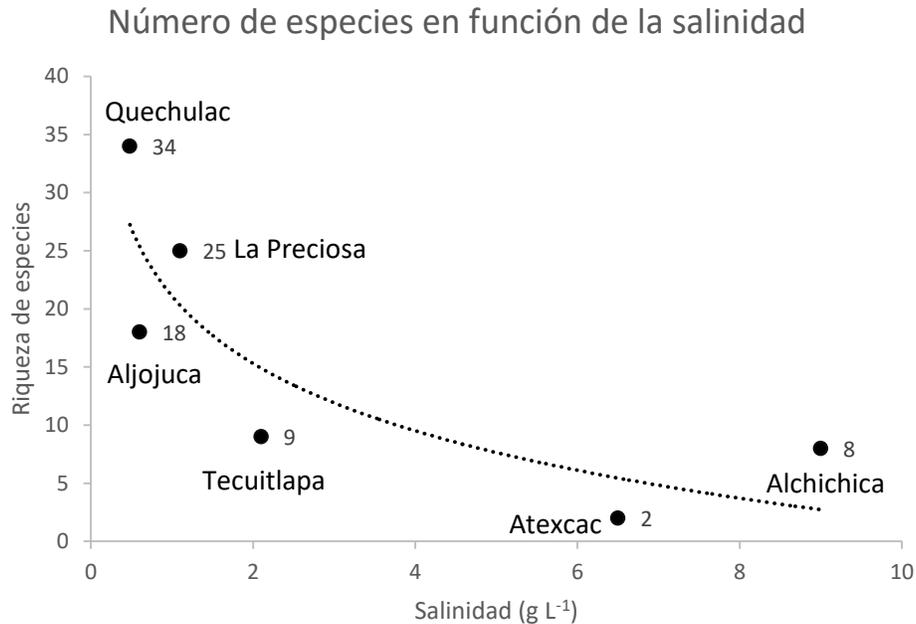


Figura 2. Riqueza específica de los rotíferos en los seis lagos-cráter de la cuenca Oriental en función de la salinidad. Los valores indican el número de especies encontradas en la columna de agua y zona litoral de cada lago. La línea punteada indica la función de la regresión logarítmica ($R^2 = 0.72$; $p = 0.031$)

En términos generales, los lagos menos salinos presentan una mayor riqueza de especies, siendo el lago Quechulac el de mayor riqueza de especies con 34, más de la mitad de las encontradas en toda la cuenca, seguido de los lagos La Preciosa y Aljojuca, mientras que el lago menos diverso es Atexcac, en donde solo están presentes las especies *Hexarthra jenkiniae* y *Brachionus* sp. 'México' (Figura 2).

En cuanto al análisis de ordenación de Jaccard (Figura 3), se observa que el porcentaje de similitud entre la composición de especies de los ocho lagos es menor al 30% en todas las comparaciones, siendo El Carmen y Tecuitlapa los lagos más parecidos en cuanto a composición de especies con un 33% de similitud (Jaccard), en tanto que el lago Tepeyahualco no comparte ninguna de las ocho especies que lo habitan con los lagos Tecuitlapa, Atexcac ni Alchichica.

rotíferos activos de la clase Bdelloidea durante los conteos de las muestras cuantitativas, mismos que debieron estar presentes en forma anhidrobiótica en los sedimentos de los lagos donde fueron observados (La Preciosa y Tecuitlapa).

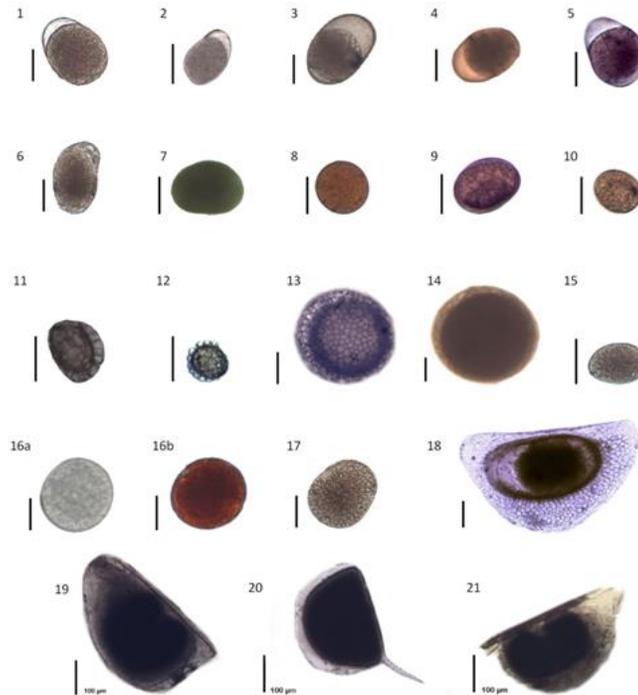


Figura 4. Diversidad de estructuras de resistencia del zooplancton en los sedimentos de los lagos de la Cuenca Oriental. 1-15. Rotíferos (Rotifera: Monogononta): 1. *Brachionus* sp. 'México', 2. *B. variabilis*, 3. *B. calyciflorus*, 4. *B. urceolaris*, 5. *Brachionus* sp. 6. *B. pterodinoides*, 7. *Hexarthra* sp., 8. *H. jenkiniae*, 9. *H. cf. jenkiniae*, 10. *H. mira*, 11. *Filinia terminalis*, 12. *Filinia* sp., 13. *Asplanchna silvestris*, 14. *A. girodi*, 15. *Cephalodella catellina*. 16-17. Crustáceos (Copépoda: Calanoida): 16a. *Leptodiptomus* cf. *sicilis* de La Preciosa, 16b. *L. cf. sicilis* de Atexcac, 17. *Mastigodiptomus* cf. *albuquerqueensis*. 18-21. (Branchiopoda: Anomópoda). 18. *Ceriodaphnia lacustris*, 19. *Daphnia* cf. *pulex*, 20. *Daphnia mendotae*, 21. *D. cf. exilis*. Las barras de referencia en cada fotografía indican 100 μ m de longitud.

Muestras cuantitativas de diversidad en los sedimentos

Una vez determinada la identidad de las especies con base en el tipo de los huevos de resistencia (Figura 4), se llevaron a cabo conteos de estas estructuras a partir de las muestras cuantitativas de sedimento. La abundancia de las especies presentes en los sedimentos en etapas de latencia fue determinada con base en conteos por tipo de huevo de resistencia así

como su viabilidad, tomando en cuenta para los análisis únicamente aquellos huevos aparentemente viables (Figura 5).

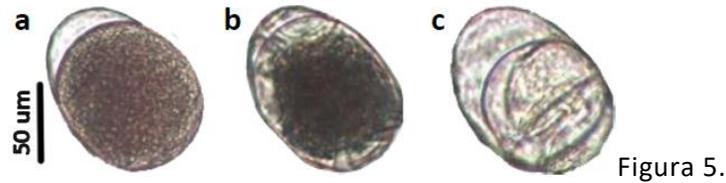


Figura 5. Huevos de resistencia del rotífero *Brachionus* sp. 'México': a) Huevo viable con embrión íntegro, b) Huevo no viable con embrión deteriorado, c) huevo sin embrión.

En total se contaron los huevos de resistencia de 16 especies de rotíferos monogonontes en siete de los lagos de la cuenca Oriental (no se obtuvieron datos del lago Tepeyahualco). En el lago Aljojuca se contaron los huevos de resistencia de 6 especies de rotíferos, siendo el lago que presenta la mayor densidad con 79.1 huevos de resistencia/cm³, así como un mayor índice de diversidad (Shannon = 1.27). El siguiente lago en términos de diversidad es Tecuitlapa, con 6 especies al igual que Aljojuca, sin embargo, el índice de diversidad es menor (Shannon = 0.9), siendo la especie *Filinia terminalis* la dominante (57.9%), mientras que especies como *Cephalodella catelina* y *Asplanchna silvestris* se encuentran representadas en muy bajas densidades. Por otra parte, el lago Quechulac presenta una riqueza de 5 especies de rotíferos y una diversidad (Shannon = 0.27) dominada por la especie *Hexarthra mira* (69.5%). Para los lagos La Preciosa, Atexcac y El Carmen, la riqueza de especies en los sedimentos está integrada únicamente por dos especies en cada lago con índices de diversidad (Shannon) de 0.64, 0.28 y 0.69 respectivamente, siendo una de las dos especies la dominante, mientras que la otra se presenta en densidades menores. Por último, el banco de huevos de resistencia del lago Alchichica está únicamente conformado por la especie *Brachionus* sp. 'México', la cual está presente en grandes densidades (72.1 huevos de resistencia/cm³).

Tabla 3. Abundancia y diversidad de estructuras de resistencia en los sedimentos de los lagos de la cuenca Oriental (núcleos de 16.3 cm³). Media \pm error estándar N = 3; (% del total de huevos en cada lago).

Especies	Diversidad/lago						
	Tecuitapa	Aljicica	Quechulac	La Preciosa	Atzacac	Alchichica	El Carmen
<i>Brachionus sp. 'México'</i>				340.0 \pm 25.2 (95.2)	1.7 \pm 0.3 (1.5)	1181.0 \pm 58.9 (100.0)	
<i>Brachionus variabilis</i>	13.7 \pm 2.8 (4.3)						38.7 \pm 7.4 (10.8)
<i>Brachionus calyciflorus</i>		83.7 \pm 1.8 (6.5)	40.3 \pm 6.3 (5.7)				
<i>Brachionus urceolaris</i>		4.3 \pm 0.3 (0.3)					
<i>Brachionus sp.</i>	70.7 \pm 19.2 (22.4)						
<i>Brachionus pterodinaoides</i>							
<i>Hexarthra sp.</i>		536.3 \pm 65.6 (41.6)					
<i>Hexarthra jenkinsae</i>	42.3 \pm 15.6 (13.4)	318.7 \pm 32.4 (24.7)			109.3 \pm 29.7 (98.5)		
<i>Hexarthra mia</i>			494.7 \pm 53.2 (69.5)				
<i>Filinia terminalis</i>	182.7 \pm 28.5 (57.9)		30.7 \pm 6.8 (4.3)	17.0 \pm 1.5 (4.8)			
<i>Filinia sp.</i>		1.7 \pm 0.7 (0.1)					
<i>Asplanchna silvestris</i>	5.7 \pm 1.5 (1.8)		50.7 \pm 1.8 (7.1)				
<i>Asplanchna girodi</i>		344.3 \pm 88.7 (26.7)					
<i>Cephalodella catenina</i>	0.7 \pm 0.3 (0.2)						320.0 \pm 148.1 (89.2)
<i>Keratella americana</i>			95.7 \pm 3.8 (13.4)				
Total de huevos	315.7	1289.0	712.0	357.0	111.0	1181.0	358.7
Huevos/cm²	19.4	79.1	43.7	21.9	6.8	72.5	22.0
Riqueza específica	6	6	5	2	2	1	2
Índice de diversidad (Shannon)	0.9	1.27	0.27	0.64	0.28	0	0.69

A partir de las abundancias de las especies en los bancos de huevos de resistencia se llevó a cabo un análisis de ordenación de Bray-Curtis para determinar la similitud entre las comunidades locales (Figura 6). Los bancos de huevos de resistencia más parecidos entre sí (73.8% de similitud) son los de los lagos Alchichica y La Preciosa, los cuales están integrados casi en su totalidad por la especie *Brachionus sp. 'México'*, ya que *Filinia terminalis* está presente en

La Preciosa, pero en bajas densidades. Por otra parte, la similitud entre los otros bancos de huevos de resistencia es $\leq 31\%$, siendo el lago El Carmen el menos parecido a los demás, ya que no comparte especies con los demás lagos, salvo con con el lago Tecuitlapa, con el cual comparte una sola especie (*Cephalodella catelina*), la cual se encuentra en altas abundancias en El Carmen, mientras que en Tecuitlapa su abundancia es muy baja (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

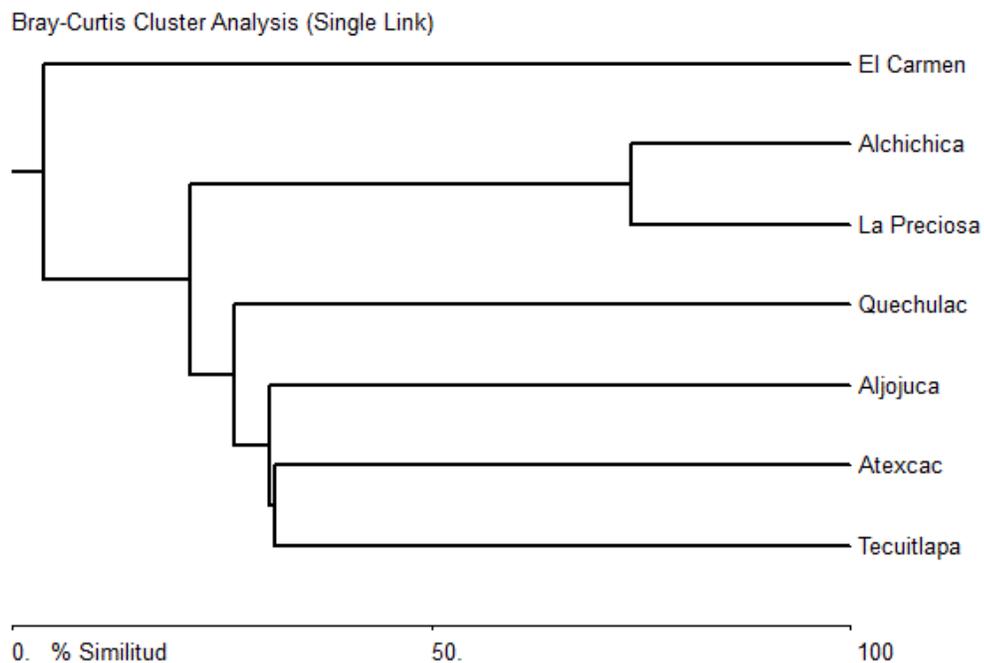


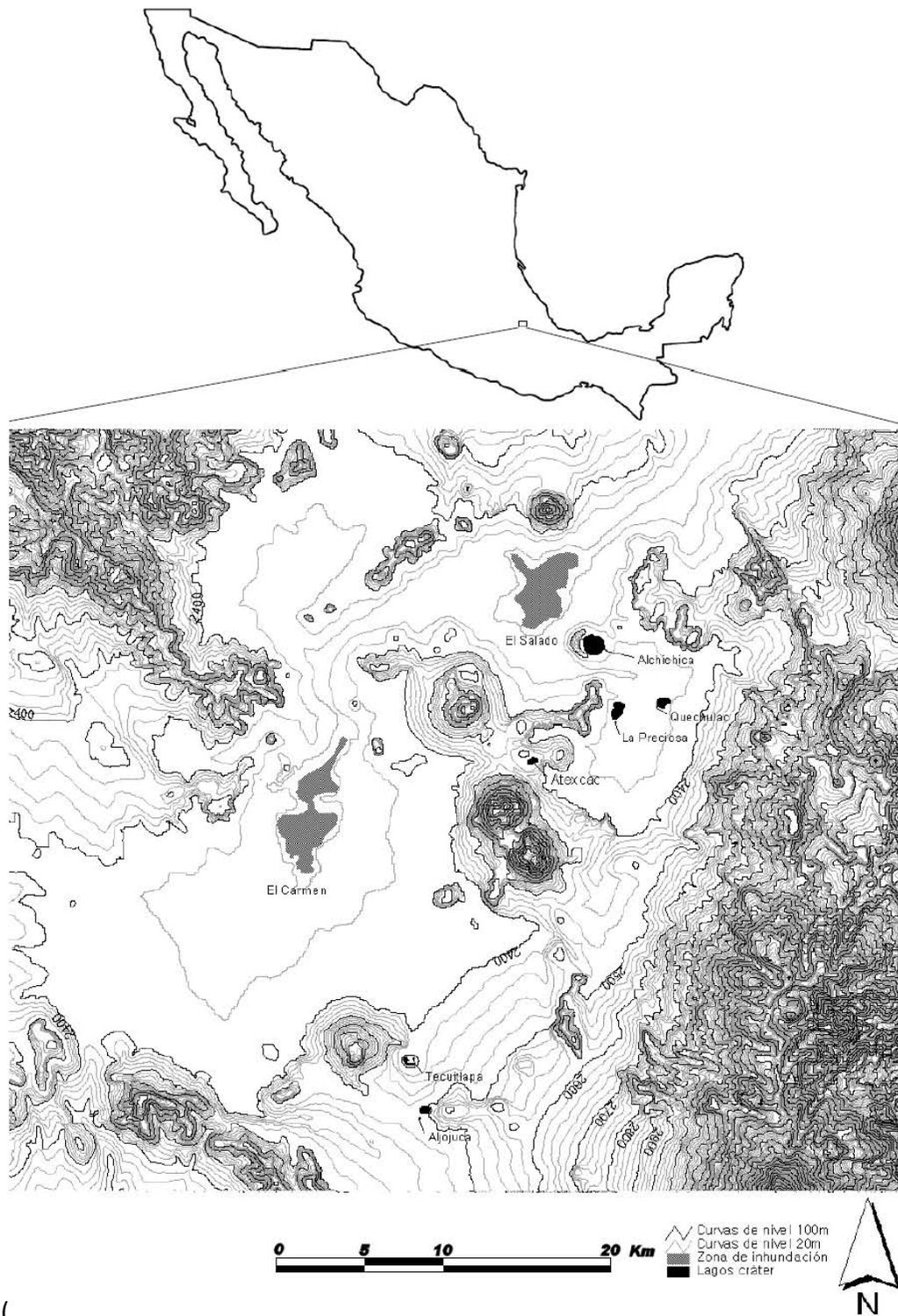
Figura 6. Análisis de ordenación de Bray-Curtis generado a partir de las abundancias absolutas de huevos “viables” de las diferentes especies en los lagos de la Cuenca Oriental.

DISCUSIÓN

Con los datos generados se espera que la riqueza de especies en una comunidad sea mayor conforme las tasas de dispersión de los posibles colonizadores sean mayores (MacArthur & Wilson, 1967). En este sentido, la cercanía entre los lagos en la Cuenca Oriental (Figura 1) y el

hipotético alto potencial de dispersión de los organismos zooplanctónicos en un entorno regional habitado por diversas especies de aves acuáticas (Alcocer *et al.*, 2014), representaría un importante promotor para la riqueza de especies de rotíferos presentes en cada comunidad local. Sin embargo, en el proceso de ensamblaje de las comunidades los factores locales bióticos y abióticos son los responsables en última instancia de “permitir o no” el ingreso de un taxón a un determinado hábitat para formar parte de la comunidad, esto en función de la capacidad de respuesta eco-fisiológica al ambiente a colonizar. Se sabe que factores locales tales como como el área de los lagos (Green, 1992), la profundidad y estado trófico (Ejsmont-Karabin, 1995), la presencia de macrofitas (van Donk & van de Bund, 2002), la depredación y la salinidad (Hammer, 1986), entre otros, juegan un papel determinante para la composición y riqueza de especies en las comunidades zooplanctónicas. En este sentido, la riqueza de especies de rotíferos presentes en los diferentes lagos de la Cuenca Oriental sigue un patrón acorde con el que se ha descrito anteriormente (Hammer, 1986), donde en términos generales, se observa que los lagos menos salinos presentan una mayor riqueza de especies de rotíferos, la cual va disminuyendo conforme incrementa la salinidad (Figura 2. Riqueza específica de los rotíferos en los seis lagos-cráter de la cuenca Oriental en función de la salinidad. Los valores indican el número de especies encontradas en la columna de agua y zona litoral de cada lago. La línea punteada indica la función de la regresión logarítmica ($R^2 = 0.72$; $p = 0.031$)).

De esta forma se puede reconocer a las diferencias en salinidad entre los lagos de la Cuenca



Oriental (

Figura 1. Modelo altimétrico de la Cuenca Oriental (Modificado de Alcántara-Rodríguez, 2010)

Tabla 1) como un factor determinante para la riqueza de especies de las comunidades locales. El análisis de agrupación de Jaccard (Figura 3) realizado a partir de organismos en la columna de agua, así como en el análisis de diversidad de los bancos de huevos de resistencia (Bray-Curtis; Figura 6), muestran que a nivel regional la riqueza de especies de la Cuenca Oriental se encuentra distribuida de manera heterogénea en los diferentes lagos que la componen, dando como resultado comunidades locales muy disímiles entre sí, con pocas especies compartidas entre lagos.

A este respecto, las especies *Brachionus* sp. 'México' y *Hexarthra jenkiniae* son aquellas que representan el elemento de cohesión más fuerte entre los lagos en términos de composición de especies, ya que las dos se distribuyen en todos los lagos-cráter de la cuenca, excepto en Quechulac, en el cual habitan otras dos especies del género *Hexarthra* (*Hexarthra mira* y *Hexarthra* sp.), lo cual podría explicar la ausencia de *H. jenkiniae* en este lago debido a un efecto de prioridad y exclusión competitiva. Por otra parte, se ha observado que la especie *B.* sp. 'México' tiene una disminución importante en su eficiencia biológica en salinidades inferiores a 1.1 g L^{-1} , lo cual puede explicar su ausencia en los lagos menos salinos de la cuenca (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

Otras especies de rotíferos que representan elementos de cohesión entre la diversidad de las comunidades locales de rotíferos en la Cuenca Oriental son *Lecane bulla*, *Lecane closterocerca*, *Cephalodella catellina* y *Filinia terminalis*, que también se encuentran ampliamente distribuidas en la cuenca y son compartidas por varios lagos. Sin embargo, a pesar de que algunas de las especies que integran la diversidad de rotíferos de la cuenca habitan en varios de los lagos, se puede reconocer un patrón de aislamiento de las comunidades locales en términos de diversidad (Figura 3), lo cual parece indicar que los procesos de ensamblaje de las comunidades no solo se llevaron a cabo de manera independiente para cada lago, sino también que la interacción entre lagos mediante el intercambio de colonizadores es un proceso débil que no ha llevado a la metacomunidad en su conjunto hacia un estado homogéneo en términos de diversidad de especies, ajustándose así a un modelo de ordenamiento de especies (Leibold *et al.*, 2004).

En particular se sabe que la salinidad es un factor que afecta los procesos fisiológicos de los organismos acuáticos, siendo una importante presión ambiental que puede determinar por sí misma la presencia o ausencia de especies en un determinado hábitat en función de su tolerancia a este factor (Bielańska-Grajner & Cudak, 2014). Por lo tanto, si bien las diferentes especies de rotíferos que habitan en la Cuenca Oriental podrían tener un alto potencial de dispersión en este sistema de lagos relativamente cercanos, la heterogeneidad ambiental de este factor (diferencia de salinidad entre los diferentes lagos) y su efecto sobre la ecofisiología (Lowe *et al.*, 2007) de las diferentes especies de rotíferos presentes en la cuenca podría explicar en una buena medida la heterogeneidad en la composición comunitaria a nivel regional.

Debido a que la dispersión pasiva de las estructuras de resistencia juega un papel determinante en los procesos de colonización del zooplancton, en el siguiente capítulo se pone a prueba la salinidad como factor determinante de la eficiencia biológica de las diferentes especies de rotíferos que habitan en la Cuenca Oriental, midiendo el efecto de ésta sobre la eclosión de los huevos de resistencia de las especies latentes en los sedimentos.

CAPÍTULO 3: POTENCIAL DE COLONIZACIÓN DE LAS ESPECIES EN FUNCIÓN DE LA SALINIDAD

INTRODUCCIÓN

En un Sistema Insular como la Cuenca Oriental, los procesos de colonización cruzada por parte de las especies de rotíferos tienen un alto potencial para ocurrir de manera frecuente entre los distintos lagos que la integran. En este sentido, existe una gran cantidad de evidencia que sustenta el transporte pasivo de la estructura de resistencia del zooplancton a través de las aves acuáticas como vectores de dispersión (p.e., Figuerola & Green, 2002). En este punto cabe destacar que en los lagos la Cuenca Oriental es común observar diversas especies de aves acuáticas como *Aythya affinis*, *Oxyura jamaicensis*, *Podiceps nigricollis*, *Calidris minutilla*, *C. bairdii*, *C. mauri* y *Fulica americana*, las cuales tienen el potencial para transportar materiales en endozoocoria y ectozoocoria de los diferentes lagos, facilitando así el transporte de huevos de resistencia entre un lago y otro.

Bajo un modelo neutral de metacomunidad, donde todos los individuos dentro de un nivel trófico particular tienen las mismas probabilidades de supervivencia y reproducción (Rosindell *et al.*, 2011), este alto potencial de dispersión de las especies que integran el sistema tendría como consecuencia que a nivel regional las comunidades locales de rotíferos fueran similares entre sí. Sin embargo, los resultados discutidos en el capítulo anterior muestran que la diversidad de especies se encuentra repartida de manera heterogénea a lo largo de la cuenca, dando lugar a comunidades locales muy disímiles entre sí, y a nivel regional revelan una metacomunidad que parece ajustarse a un modelo de ordenamiento de especies (Leibold *et al.*, 2004).

Los factores ecológicos locales representan un papel fundamental en los procesos de ensamblaje de las comunidades bióticas determinando su estructura y diversidad, y conduciendo el ordenamiento de especies a nivel regional. A este respecto, en el capítulo anterior se discutió el papel de la salinidad sobre la riqueza de especies en la Cuenca Oriental, donde se observa un claro patrón de disminución de la riqueza de especies conforme los lagos presentan salinidades más altas. En primera instancia estos resultados parecen apuntar hacia este factor como responsable de la repartición heterogénea de la diversidad en la cuenca, posiblemente actuando como una barrera ecofisiológica que impide que las especies colonicen todo el gradiente de salinidad en la cuenca.

En este sentido la salinidad del agua es uno de los factores ambientales que tienen un impacto muy relevante sobre la fisiología de los organismos acuáticos como el zooplancton. Dicho impacto representa una fuerte presión selectiva que ha llevado a los diferentes taxones acuáticos a desarrollar adaptaciones fisiológicas que les permiten hacerle frente a la presión osmótica en un determinado gradiente de salinidad, pudiendo ser un factor determinante para la distribución de las especies de rotíferos (Lowe *et al.*, 2007). Respecto a esto, la enzima Na^+/K^+ ATPasa, proteína integral de la membrana celular encargada del transporte activo de los iones de sodio y potasio ha sido identificada como un importante mecanismo en la regulación de la presión osmótica y volumen de las células. Se sabe por ejemplo, que esta enzima está relacionada con la tolerancia a la salinidad en la especie de rotífero *Brachionus plicatilis*, mostrando mayores niveles de actividad en salinidades altas, lo cual podría implicar una

reducción en la eficiencia biológica en estas condiciones debido al consumo energético (consumo de ATP) que conlleva su actividad (Lowe *et al.*, 2005). Por otra parte, en el copépodo *Eurytemora affinis* (adaptado a ambientes salinos y salobres) se ha observado un patrón de evolución paralela, asociado a una mayor actividad (mediada por factores hereditarios) de la enzima V-tipo H⁺ ATPasa en las poblaciones de esta especie que han colonizado (en múltiples eventos) ambientes acuáticos con bajas concentraciones iónicas, representado así un rasgo determinante que estaría sujeto a selección en la adaptación a ambientes dulceacuícolas (Lee *et al.*, 2011).

Uno de los atributos esenciales para la fundación de una población de rotíferos en un hábitat determinado es el potencial que tengan sus huevos de resistencia para eclosionar en las nuevas condiciones ambientales a donde sean dispersados (p. ej., por aves acuáticas). En este sentido, la salinidad del agua en el hábitat a colonizar puede representar en primera instancia un factor fisicoquímico limitante para el potencial establecimiento de una población debido a su efecto sobre la fisiología de los organismos en el proceso de eclosión. Se ha documentado que los huevos de resistencia de diversas especies de zooplancton pueden permanecer viables hasta por 22 meses en ambientes altamente salinos, preservando la capacidad para eclosionar cuando disminuye la salinidad del agua (Nielsen *et al.*, 2012). Por otra parte, en las etapas del ciclo de vida posteriores a la eclosión la salinidad podría representar un factor determinante para la eficiencia biológica de estos organismos acuáticos, afectando a las tasas de crecimiento de las poblaciones y limitando su potencial para fundar poblaciones que sean estables al mantener tasas intrínsecas de crecimiento poblacional $r > 0$ en el mediano-largo plazo (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

A pesar de que es bien conocido que la salinidad juega un papel crucial en la diversidad del zooplancton en ambientes continentales, la mayoría de los estudios que tratan de evaluar el efecto de la salinidad sobre la diversidad de las comunidades se ha centrado en las etapas metabólicamente activas de los ciclos de vida de zooplancton (Bielańska-Grajner & Cudak, 2014). Por otra parte, los esfuerzos para comprender el efecto de la salinidad sobre la eclosión de comunidades acuáticas enteras (representadas en los bancos de huevos de resistencia) son

escasos y se han centrado solamente en el estudio de ambientes con condiciones de salinidad cambiantes entre temporadas tales como humedales y lagunas costeras (Brock, *et al.*, 2003; Santangelo *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado el efecto de la salinidad sobre la eclosión de los bancos de huevos de resistencia en ambientes estables en escalas temporales de mediano o largo plazo (como lagos profundos de la Cuenca Oriental que no presentan variaciones importantes en la salinidad a lo largo del año) en una escala regional, teniendo en cuenta el potencial de las diferencias en salinidad para los procesos de estructuración de metacomunidades de zooplancton que habitan en este tipo de ambientes.

En este contexto, la Cuenca Oriental constituye un modelo excelente para estudiar el efecto de la salinidad como un factor local que afecta a la diversidad de especies a nivel regional. Partiendo del supuesto de que los procesos de dispersión de los rotíferos de la Cuenca Oriental deben ser frecuentes debido a la cercanía de los lagos y la existencia de estructuras eficientes para su dispersión pasiva por medio de, p. e., aves acuáticas, lo cual tendría como consecuencia que las comunidades locales fueran similares entre sí, se plantea la hipótesis de que la salinidad tiene un efecto sobre la eficacia de eclosión de los huevos de resistencia y la eficiencia biológica de las etapas adultas, fungiendo como factor clave para la estructuración de las comunidades locales. Lo cual podría explicar los patrones observados de diversidad local y regional de zooplancton en la cuenca según un modelo de metacomunidad de ordenamiento de especies (véase Capítulo 2), donde las tasas de colonización de las poblaciones aisladas, en función de su tolerancia a la salinidad no son lo suficientemente altas como para alterar la distribución regional de las especies (Leibold *et al.*, 2004, Heino *et al.*, 2015).

Tomando como punto de partida a la diversidad de rotíferos de la cuenca como un modelo de metacomunidad, en el presente capítulo se analiza el efecto de la salinidad como barrera ecológica para la colonización de las diferentes especies de rotíferos. Se llevaron a cabo experimentos de laboratorio para tratar de inferir así el papel que desempeñaría la eclosión de estas estructuras sobre los patrones de diversidad en la cuenca. Para esto, se diseñó un experimento de jardín común para simular un escenario donde los procesos de dispersión sean extremadamente frecuentes y tratar de determinar el potencial que tienen las especies para

fundar poblaciones en nuevos hábitats a partir de los huevos de resistencia (¿son capaces de eclosionar en una salinidad distinta a la de su ambiente de origen?) y determinar así lo que eventualmente ocurriría si en la naturaleza son transportadas (aves u otros vectores abióticos) entre los distintos lagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto de la salinidad sobre la eclosión del banco de huevos de resistencia

Con la finalidad evaluar el efecto de la salinidad sobre las dinámicas de eclosión de los huevos de resistencia de los rotíferos de la Cuenca Oriental se llevaron a cabo experimentos de laboratorio en donde se probaron tres tratamientos experimentales de salinidad, “alta”, “media” y “baja” (

Lago	Salinidad de origen (g L-1)	Tratamiento "baja" (g L-1)	Tratamiento "media" (g L-1)	Tratamiento "alta" (g L-1)
Quechulac	0.48	0.5	3.8	6.5
Aljojuca	0.78	0.5	3.8	6.5
Tecuitlapa	2.1	0.5	2.0	6.5
La Preciosa	1.1	1.1	6.5	9.0
El Carmen	1.4-48	0.5	3.8	9.0
Atexcac	6.5	1.1	6.5	9.0
Alchichica	9.0	1.1	6.5	9.0

; con seis réplicas cada uno) en un rango de 0.5 – 9.0 g L⁻¹ dependiendo de la salinidad del lago de dónde provenía el sedimento (*i. e.*, 6 lagos × 3 salinidades × 6 réplicas). Para llevar a cabo los experimentos se obtuvieron muestras de sedimento recientes (3 cm más superficiales) de cada uno de los lagos-cráter tipo *maar* con una draga tipo Eckman, y de una zona cercana a la orilla en los lagos someros, mismas que fueron transportadas al laboratorio en condiciones de oscuridad y a una temperatura de ~4 °C para reducir los posibles estímulos ambientales de eclosión durante su traslado (Hagiwara *et al.*, 1989). Cada unidad experimental consistió de un matraz de vidrio de 50 ml inoculado con 3 cm³ de sedimento e inundado con 20 ml de medio experimental.

Tabla 4. Tratamientos experimentales de salinidad ("baja", "media" y "alta") en función de la salinidad de los lagos de origen de los sedimentos

Lago	Salinidad de origen (g L-1)	Tratamiento "baja" (g L-1)	Tratamiento "media" (g L-1)	Tratamiento "alta" (g L-1)
Quechulac	0.48	0.5	3.8	6.5
Aljojuca	0.78	0.5	3.8	6.5
Tecuitlapa	2.1	0.5	2.0	6.5
La Preciosa	1.1	1.1	6.5	9.0
El Carmen	1.4-48	0.5	3.8	9.0
Atexcac	6.5	1.1	6.5	9.0
Alchichica	9.0	1.1	6.5	9.0

El agua utilizada para preparar los medios experimentales fue agua de grifo filtrada y desionizada a través del sistema *Millipore Elix® Water purification system* y esterilizada en autoclave. Para preparar el medio a las diferentes salinidades, se utilizó sal comercial para acuario de la marca *Seachem Reef Salt™*, la cual fue disuelta en el agua estéril hasta alcanzar el valor de salinidad deseado, el cual fue medido utilizando un conductivímetro marca YSI®, modelo 63. Las unidades experimentales fueron incubadas en una cámara ambiental (*Biotronette, Plant Growth chamber*) en condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad lumínica controladas (*i. e.*, 18±1 °C, 13 h/11 h luz/obscuridad; 280 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) características del epilimnion del lago Alchichica en la temporada de estratificación (Alcocer & Lugo, 2003). Diariamente se filtró y renovó el medio de los matraces a través de un tamiz con una apertura de 20 μm y se revisó el sobrenadante realizando conteos de los organismos eclosionados por especie hasta la fecha en la que se dejaron de registrar eclosiones durante un periodo de 4 días.

Eclosión y reproducción de *B. sp.* 'México' en un gradiente de salinidad

Con la finalidad de evaluar el efecto de la salinidad sobre la eficiencia de eclosión de los huevos de resistencia y la reproducción partenogenética de una de las especies representativas de la

cuenca, se analizó a *Brachionus* sp. 'México'. Se obtuvieron huevos de resistencia de esta especie a partir de muestras de sedimento húmedo (~10 g) reciente (véase Capítulo 2) de los tres lagos en donde habita esta especie, Alchichica, Atexcac y La Preciosa. Las muestras fueron sometidas a la técnica de flotación en sacarosa (Gomez *et al.*, 2000), que consiste en disolver los sedimentos en una solución de sacarosa al 60% en tubos para centrífuga de 50 mL, mismas que fueron centrifugadas a 700 rpm durante 5 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se filtró por un tamiz de 20 μm . Los tamices fueron lavados con un medio preparado a la salinidad de cada uno de los lagos de donde era originario el sedimento y el material retenido fue observado en un microscopio estereoscópico para aislar los huevos de resistencia aparentemente viables de *B.* sp. 'México' con base en su morfología (Figura 5).

Los huevos aislados se colocaron individualmente en pocillos de placas de poliestireno marca Evergreen® con 200 μl de medio, y fueron incubados en la cámara ambiental en las mismas condiciones controladas que se describen en la sección anterior (epilimnion de Alchichica en estratificación). En total se aislaron 144 huevos de resistencia de cada población (*i. e.*, 12 huevos \times 3 tratamientos \times 4 réplicas \times 3 poblaciones) para analizar las dinámicas de eclosión de esta especie en las condiciones de salinidad de sus lagos de origen (La Preciosa: 1.1 g L^{-1} ; Atexcac: 6.5 g L^{-1} ; Alchichica 9.0 g L^{-1}) y comparar así el desempeño biológico de las poblaciones en función de la salinidad. Las unidades experimentales fueron revisadas cada 24 horas renovando el medio y registrando el día de la eclosión de cada huevo. Posteriormente los individuos eclosionados fueron mantenidos en las mismas condiciones experimentales y fueron alimentados con las microalgas *Tetraselmis suecica* y *Scenedesmus* sp. (cultivos semicontinuos; proporción 1:1; ~10 mg C mL^{-1} en total) hasta registrar el primer evento reproductivo (partenogénesis).

Análisis estadísticos

Con la finalidad de evaluar el efecto de la salinidad sobre la eclosión del banco de huevos de resistencia, se generaron series de porcentaje acumulado de eclosiones por especie en cada lago con respecto al tiempo a partir de los conteos de organismos eclosionados. Con la finalidad de evaluar el porcentaje de individuos eclosionados en cada tratamiento de cada especie y dado

que se trabajó con bancos de huevos de resistencia naturales (no se aislaron los huevos), primero se estimó el número aproximado de huevos viables (100%) en los sedimentos de cada lago, esto se llevó a cabo promediando los tres valores más altos obtenidos en los conteos (entre los datos de todos los tratamientos de cada lago) para cada especie. Debido a que el valor del 100% de huevos en los sedimentos fue estimado a partir del promedio de los tres valores más altos fue necesario normalizar los valores (debido a que en algunas ocasiones podían alcanzar valores superiores al 100%) utilizando un valor K , que fue definido como el número más alto de eclosiones por especie en los diferentes tratamientos.

A partir de los conteos de individuos eclosionados cada día en los experimentos se generaron series de datos con el porcentaje acumulado de eclosiones de cada especie con respecto al tiempo. Las diferencias en las dinámicas de eclosión en respuesta a la salinidad fueron evaluadas mediante un análisis de varianza de mediadas repetidas (ANOVAR; von Ende, 2001) utilizando los porcentajes de eclosiones acumuladas con respecto al tiempo de los últimos 5 días del experimento, con el tiempo como elemento de repetición y la salinidad como factor. Por otra parte, la respuesta a la salinidad también se analizó a partir del número máximo de eclosiones acumuladas en cada tratamiento y las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) con la salinidad como factor y un test *post hoc* de Tukey en caso de que las diferencias fueran significativas.

RESULTADOS

Efecto de la salinidad sobre la dinámica de eclosión del banco de huevos de resistencia

Se analizaron las dinámicas de eclosión de las especies de rotíferos presentes en los sedimentos de los lagos de la Cuenca Oriental en estado de latencia en diferentes tratamientos de salinidad. De los sedimentos de los lagos analizados eclosionaron un total 15 especies de rotíferos monogonontes, así como al menos una especie de rotífero bdelloideo (que no fue considerado para los análisis) y varias especies de microcrustáceos (cladóceros y copépodos) en las diferentes salinidades exploradas experimentalmente (

Especie	Eclosión en salinidad		
	Baja	Media	Alta
<i>Filinia terminalis</i>	+		
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	+		
<i>Asplanchna girodi</i>	+		
<i>Asplanchna silvestrii</i>	+	+	
<i>Keratella americana</i>	+	+	
<i>Brachionus variabilis</i>	+	+	
<i>Brachionus pteridinoides</i>	+	+	
<i>Brachionus</i> sp. "México"	+	+	+
<i>Brachionus urceolaris</i>	+	+	+
<i>Brachionus</i> sp. 2	+	+	+
<i>Hexarthra</i> sp.	+	+	+
<i>Hexarthra jenkiniae</i>	+	+	+
<i>Hexarthra mira</i>	+	+	+
<i>Synchaeta</i> cf. <i>litoralis</i>	+	+	+
<i>Cephalodella catellina</i>	+	+	+

), estas especies son las mismas que fueron reportadas en el análisis de diversidad del banco de huevo de resistencia (Capítulo 2; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), excepto la especie *Filinia* sp. que fue reportada para Aljojuca como parte del banco de huevos de resistencia con una abundancia relativa muy baja (~0.1%) y no se registraron eclosiones de esta especie durante los experimentos.

Entre las 15 especies eclosionadas en los diferentes tratamientos de salinidad, se observa que algunas como *F. terminalis*, *P. dolichoptera*, *A. girodi* eclosionan únicamente en el tratamiento de salinidad baja. Por otra parte, las especies *K. americana*, *B. variabilis* y *A. silvestris* (de esta última especie se registraron sólo dos individuos eclosionados en el tratamiento de 3.8 g L⁻¹) eclosionaron tanto en la salinidad "baja" como en la "media". No se encontraron especies que eclosionaran exclusivamente en aguas salinas.

Tabla 5. Especies de rotíferos eclosionados en los diferentes tratamientos en la salinidad i. e. 0.5 – 9.0 g L⁻¹ dependiendo de la salinidad del lago de dónde provenía el sedimento (ver Tabla 4)

Especie	Eclosión en salinidad		
	Baja	Media	Alta
<i>Filinia terminalis</i>	+		

<i>Polyarthra dolichoptera</i>	+		
<i>Asplanchna girodi</i>	+		
<i>Asplanchna silvestrii</i>	+	+	
<i>Keratella americana</i>	+	+	
<i>Brachionus variabilis</i>	+	+	
<i>Brachionus pteridinoides</i>	+	+	
<i>Brachionus</i> sp. "México"	+	+	+
<i>Brachionus urceolaris</i>	+	+	+
<i>Brachionus</i> sp. 2	+	+	+
<i>Hexarthra</i> sp.	+	+	+
<i>Hexarthra jenkinsae</i>	+	+	+
<i>Hexarthra mira</i>	+	+	+
<i>Synchaeta</i> cf. <i>litoralis</i>	+	+	+
<i>Cephalodella catellina</i>	+	+	+

Como se puede observar en la

Especie	Eclosión en salinidad		
	Baja	Media	Alta
<i>Filinia terminalis</i>	+		
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	+		
<i>Asplanchna girodi</i>	+		
<i>Asplanchna silvestrii</i>	+	+	
<i>Keratella americana</i>	+	+	
<i>Brachionus variabilis</i>	+	+	
<i>Brachionus pteridinoides</i>	+	+	
<i>Brachionus</i> sp. "México"	+	+	+
<i>Brachionus urceolaris</i>	+	+	+
<i>Brachionus</i> sp. 2	+	+	+
<i>Hexarthra</i> sp.	+	+	+
<i>Hexarthra jenkinsae</i>	+	+	+
<i>Hexarthra mira</i>	+	+	+
<i>Synchaeta</i> cf. <i>litoralis</i>	+	+	+
<i>Cephalodella catellina</i>	+	+	+

, las especies *B.* sp. "México", *B. urceolaris*, *Brachionus* sp. 2, *Hexarthra* sp., *H. jenkinsae*, *H. mira*, *S.* cf. *litoralis* y *C. catellina*, tienen el potencial de eclosionar en los tres tratamientos de

salinidad, sin embargo, en algunos casos existen diferencias significativas en cuanto al tiempo y proporción de huevos que eclosionan en función de la salinidad.

En este sentido, las dinámicas de eclosión acumulada de la especie *P. dolichoptera* presente en los sedimentos del lago Aljojuca, muestran que esta especie eclosiona únicamente en el tratamiento de salinidad baja a partir del día 9 en los experimentos (Figura 7).

Por otra parte, las primeras eclosiones de la especie *F. terminalis* se registraron entre los días 3 y 4 en las unidades experimentales con sedimentos de los lagos La Preciosa y Quechulac, únicamente en los tratamientos de salinidad baja (0.5 y 1.1 g L^{-1}), sin que se registrara ninguna eclosión en los tratamientos con salinidades superiores a estas (Figura 8).

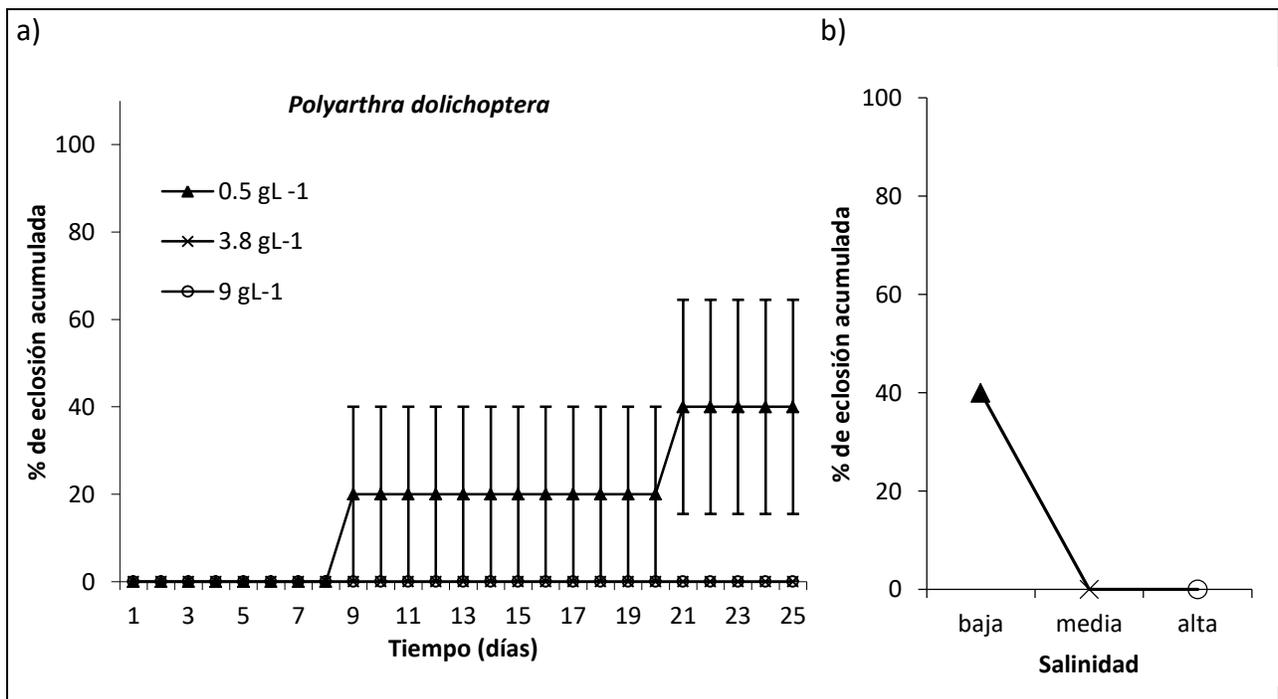


Figura 7. (a) Dinámica de eclosión acumulada (N = 5) de *Polyarthra dolichoptera* con respecto al tiempo a partir de los sedimentos del lago Aljojuca y (b) promedio de eclosiones acumuladas hasta los últimos 5 días del experimento. Las barras representan el error estándar.

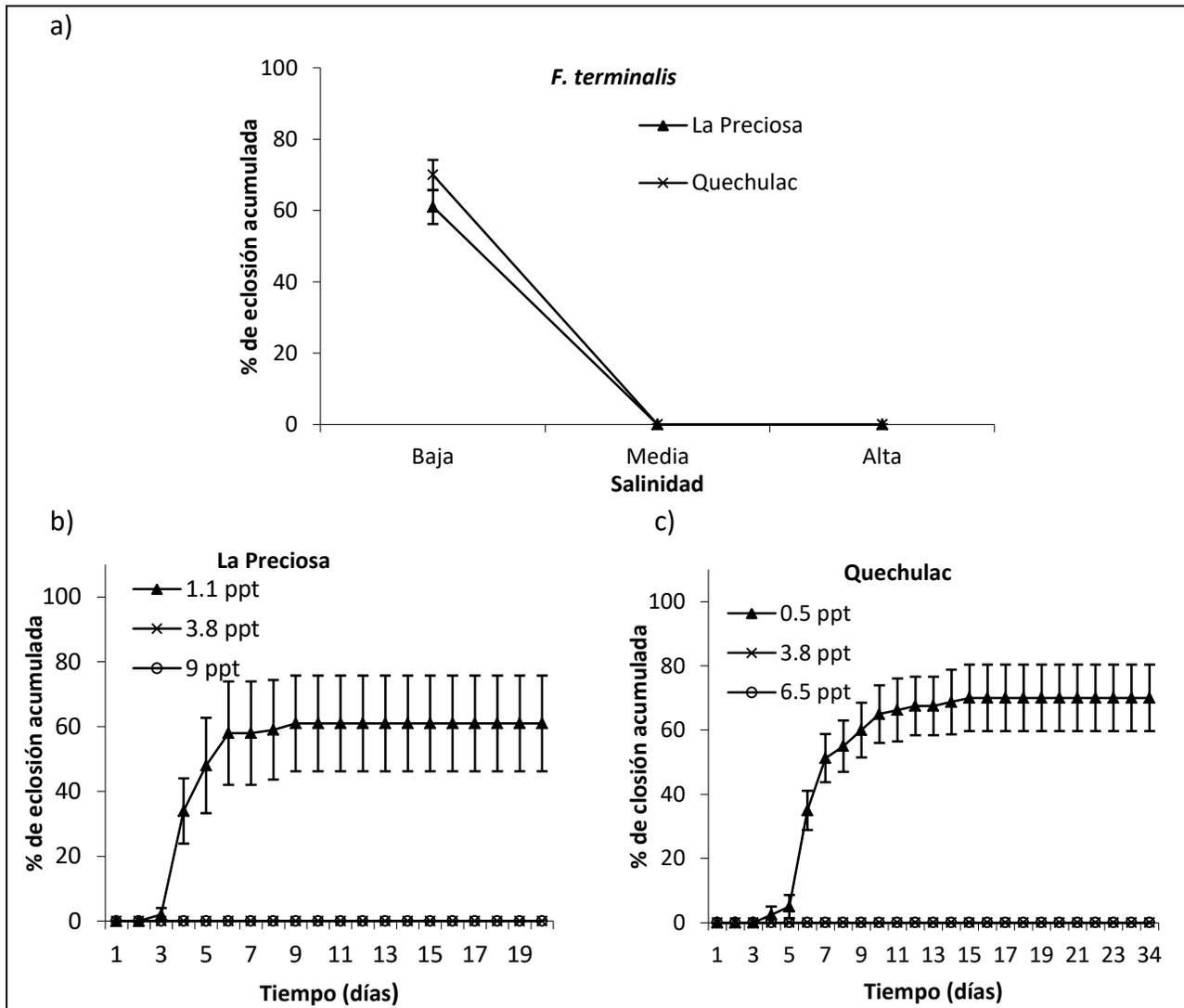


Figura 8. Eclosión de *F. terminalis* en diferentes tratamientos de salinidad. (a) Promedio de eclosiones acumuladas hasta los últimos 5 días del experimento y dinámica de eclosión acumulada (N = 5) con respecto al tiempo a partir de los sedimentos de los lagos La Preciosa (b) y Quechulac (c). Las barras representan el error estándar.

En la especie depredadora *A. girodi* presente en el lago Aljojuca, las primeras eclosiones registradas fueron en el día 9 para el tratamiento de salinidad baja, mientras que la proporción de eclosión en esta salinidad fue de ~53%, por otra parte, en la salinidad intermedia el promedio fue de 3.5%, ya que se registraron tan solo dos eclosiones a partir del día 16 en el tratamiento

de salinidad intermedia (3.8 g L^{-1}). En la salinidad alta (9.0 g L^{-1}) no se registraron organismos eclosionados (Figura 9).

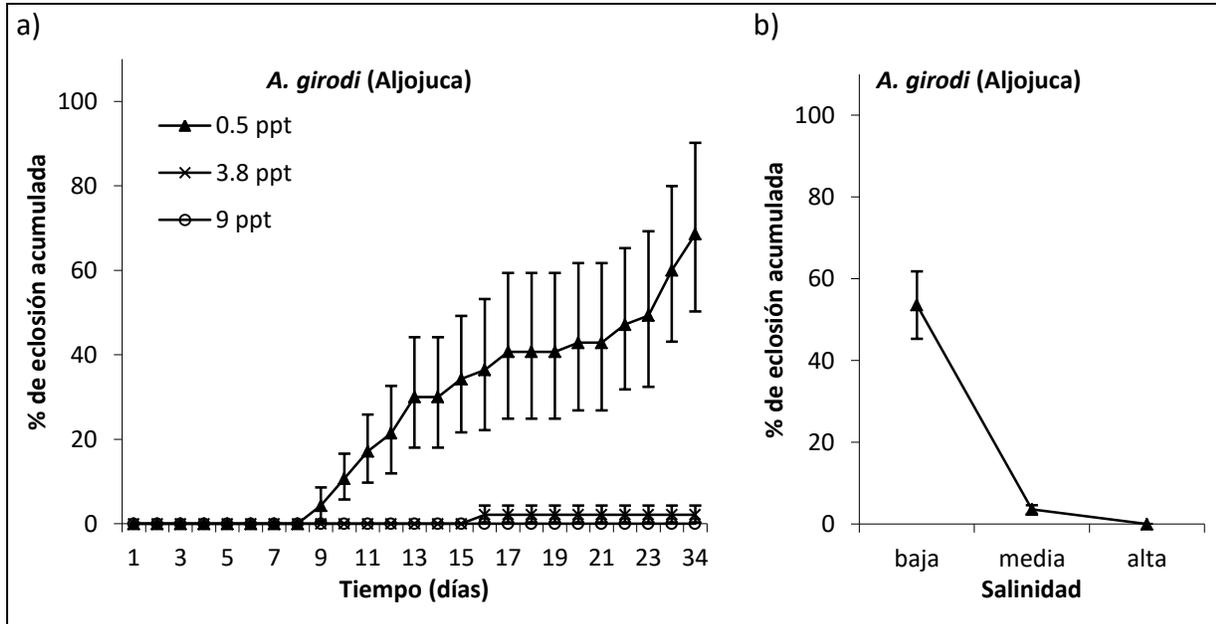


Figura 9. (a) Dinámica de eclosión acumulada ($N = 5$) de la especie *A. girodi* con respecto al tiempo a partir de los sedimentos del lago Aljojuca y promedio de eclosiones acumuladas hasta los últimos 5 días del experimento (b). Las barras representan el error estándar.

Por su parte, los huevos de la especie *A. silvestrii* (Figura 10) presentes en los sedimentos de los lagos Tecuitlapa y Quechulac eclosionaron en los tratamientos de salinidad baja y media, mientras que, entre los tratamientos de salinidad alta, sólo se registró una eclosión en una unidad experimental (6.5 g L^{-1}) con sedimento del lago Tecuitlapa. También se observó que en los tratamientos de salinidad baja los huevos de esta especie originarios del lago Quechulac comienzan a eclosionar significativamente (ANOVA; $P < 0.05$) en un menor tiempo (5.09 ± 0.43 días) que los del lago Tecuitlapa (12.4 ± 1.08 días). Además, existen diferencias significativas entre las dinámicas temporales del porcentaje acumulado de eclosión (últimos 5 días) entre los tratamientos de salinidad baja y media (ANOVAR; *Post hoc Tukey*; $P < 0.05$).

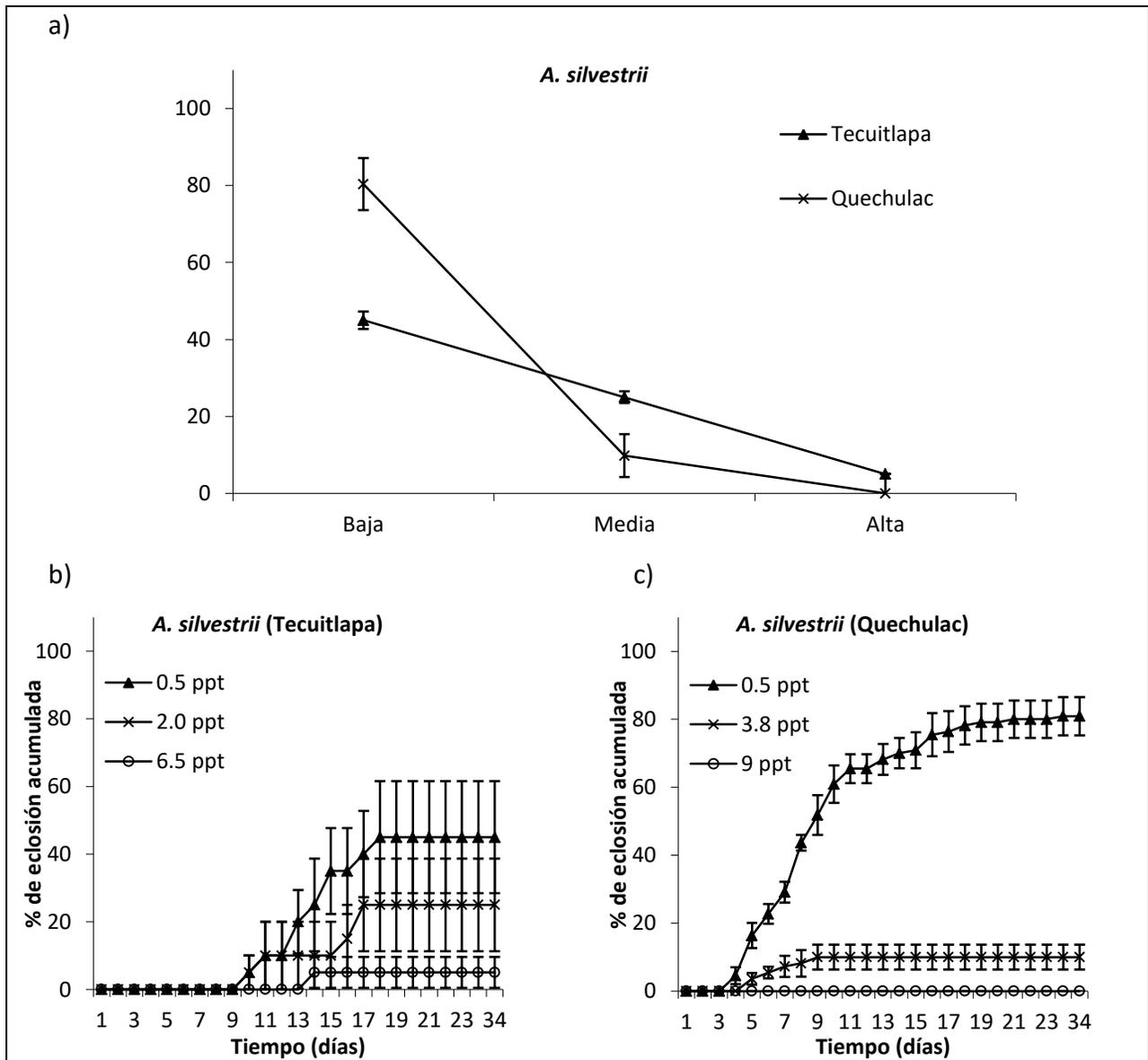


Figura 10. Eclosión de *A. silvestrii* en diferentes tratamientos de salinidad. (a) Promedio de eclosiones acumuladas hasta los últimos 5 días del experimento y dinámicas de eclosión acumulada ($N = 5$) con respecto al tiempo a partir de los sedimentos de los lagos Tecuitlapa (b) y Quechulac (c). Las barras representan el error estándar.

En lo que respecta a la especie *B. variabilis* originaria del lago Tecuitlapa (Figura 11), no existen diferencias significativas entre los tratamientos de salinidad baja (0.5 g L^{-1}) y media (3.8 g L^{-1}) en cuanto las dinámicas de eclosión de los huevos de resistencia, mientras que en el tratamiento de salinidad alta (6.5 g L^{-1}) no se registraron eclosiones.

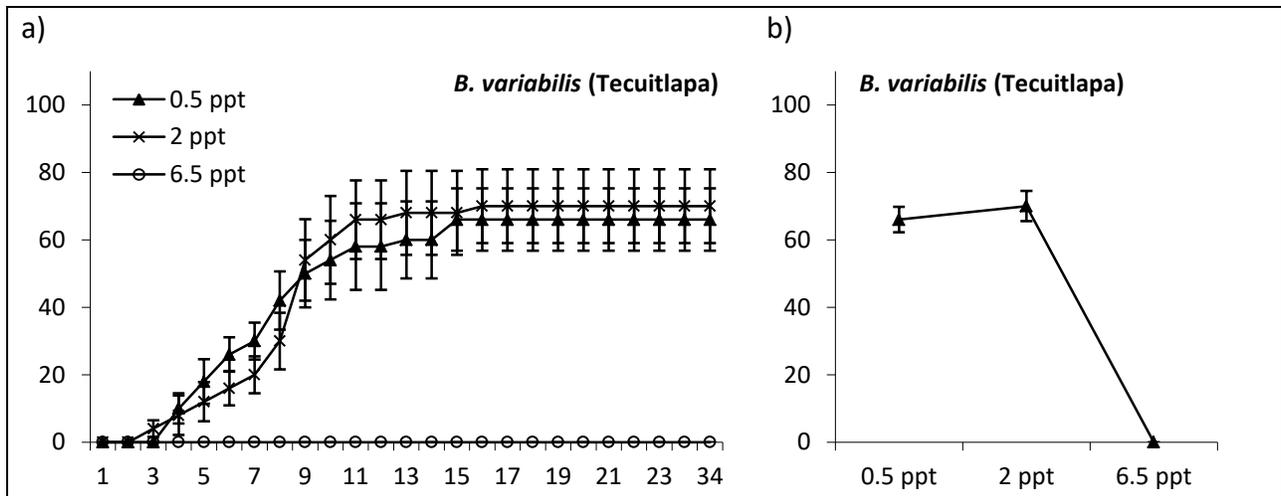


Figura 11. (a) Dinámica de eclosión acumulada ($N = 5$) de la especie *B. variabilis* con respecto al tiempo a partir de los sedimentos del lago Tecuitlapa y promedio de eclosiones acumuladas hasta los últimos 5 días del experimento (b). Las barras representan el error estándar.

La especie *K. americana* originaria del lago Quechulac (Figura 12) presenta diferencias significativas (ANOVAR; $P < 0.05$) entre los tratamientos de salinidad baja (0.5 g L^{-1}) y media (3.8 g L^{-1}) en las dinámicas de eclosión, eclosionando en mayor proporción en la salinidad baja, mientras que en el tratamiento de salinidad alta (6.5 g L^{-1}) no se registraron eclosiones.

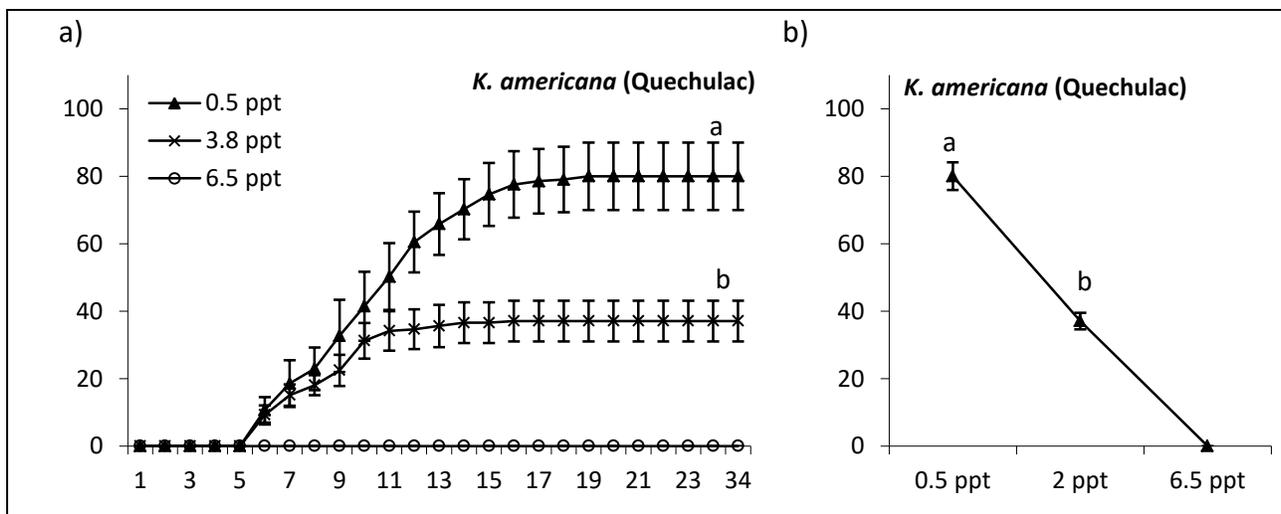


Figura 12. (a) Dinámica de eclosión acumulada ($N = 5$) de la especie *K. americana* con respecto al tiempo a partir de los sedimentos del lago Quechulac y promedio de eclosiones hasta los últimos 5 días del experimento (b). Las barras representan el error estándar y las letras representan grupos distintos (ANOVAR; *Post hoc Tukey*; $P < 0.05$).

Los huevos de resistencia de la especie *B. pteridinoides* presentes en los sedimentos del lago El Carmen (Figura 13) eclosionaron en los tratamientos de salinidad baja (0.5 g L^{-1}) y media (3.8 g L^{-1})

¹) sin que se registraran diferencias significativas entre ambos tratamientos ($P = 0.475$); sin embargo, no se registró ninguna eclosión en el tratamiento de salinidad alta (9 g L^{-1}).

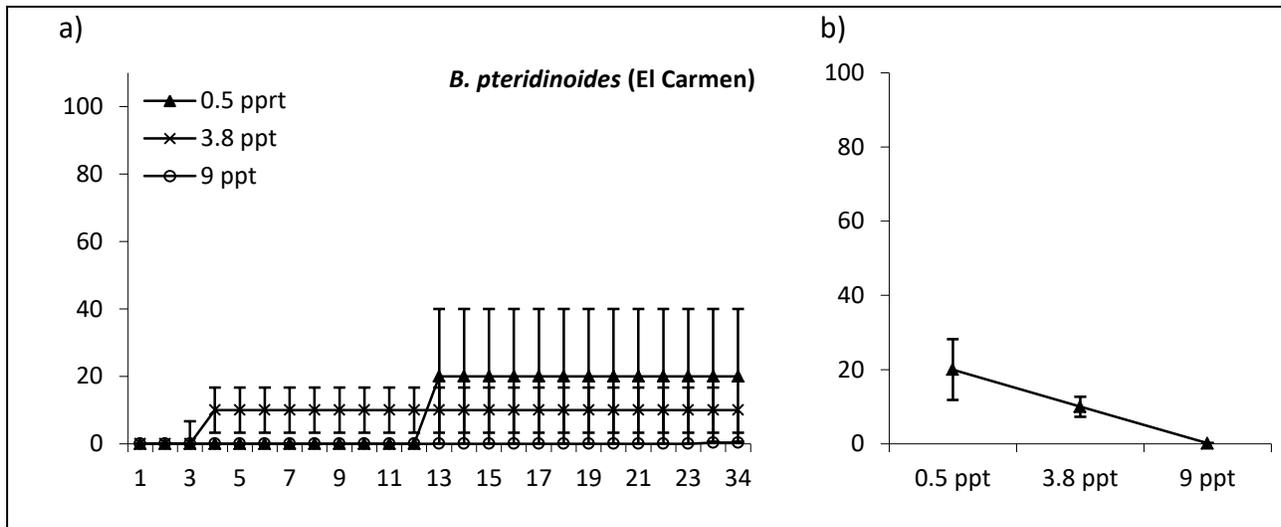


Figura 13. (a) Dinámica de eclosión acumulada ($N = 5$) de *B. pteridinoides* con respecto al tiempo a partir de los sedimentos del lago El Carmen y (b) promedio de eclosiones acumuladas hasta los últimos 5 días del experimento. Las barras representan el error estándar.

La especie *C. catellina* originaria del lago El Carmen (Figura 14a) eclosionó en los tres tratamientos de salinidad, siendo los tratamientos de salinidad baja (0.5 g L^{-1}) y media (3.8 g L^{-1}) en los que el porcentaje de eclosión acumulada fue significativamente mayor, mientras que en la salinidad alta (9.0 g L^{-1}) la proporción de eclosión fue menor (últimos 5 días; ANOVA; $P < 0.05$). Por otra parte, los huevos de resistencia de la especie *Hexarthra* sp. presentes en los sedimentos del lago Aljojuca (Figura 14b) también eclosionaron en las tres salinidades experimentales, pero alcanzando valores significativamente más altos de porcentaje acumulado en los tratamientos de las salinidades media (3.8 g L^{-1}) y alta (6.5 g L^{-1}), mientras que en la salinidad baja (0.5 g L^{-1}) el porcentaje de eclosiones fue significativamente menor (ANOVAR; $P < 0.05$).

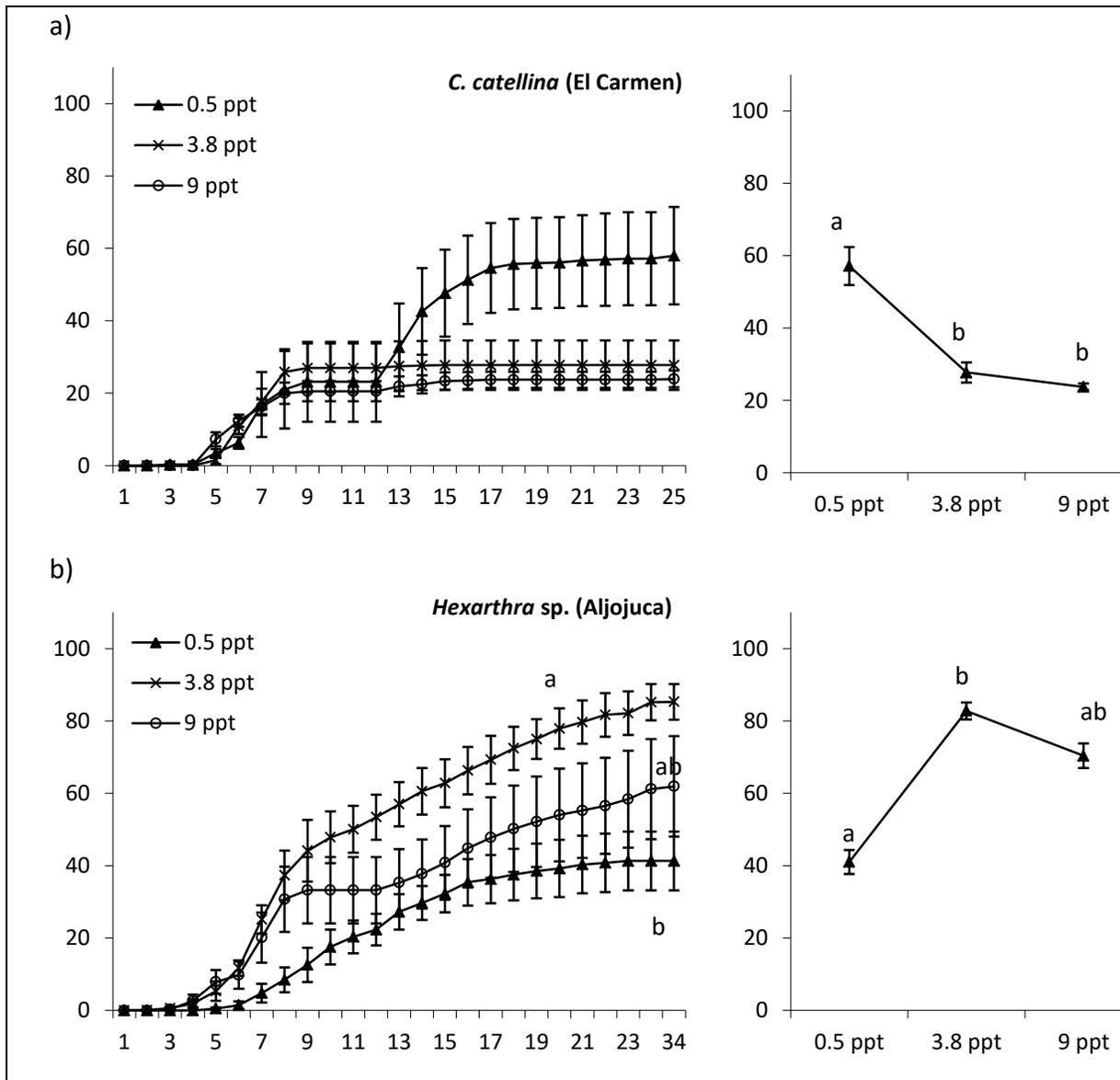


Figura 14. Dinámica de eclosión acumulada (N = 5) de las especies *C. catellina* (a) y *Hexarthra* sp. (b) con respecto al tiempo a partir de los sedimentos y promedio de eclosiones acumuladas (derecha) hasta los últimos 5 días del experimento. Las barras representan el error estándar y las letras representan grupos distintos (ANOVA; *Post hoc* Tukey; $P < 0.05$).

Por otra parte, los huevos de resistencia de las especies *S. cf. littoralis* y *H. mira* originarias del lago Quechulac, así como *Brachionus* sp. 2, y *B. urceolaris* originarias de los lagos Tecuitlapa y El Carmen respectivamente, son capaces de eclosionar en los tres tratamientos de salinidad y no muestran diferencias significativas en su dinámica de eclosión como respuesta a la salinidad del medio (Figura 15).

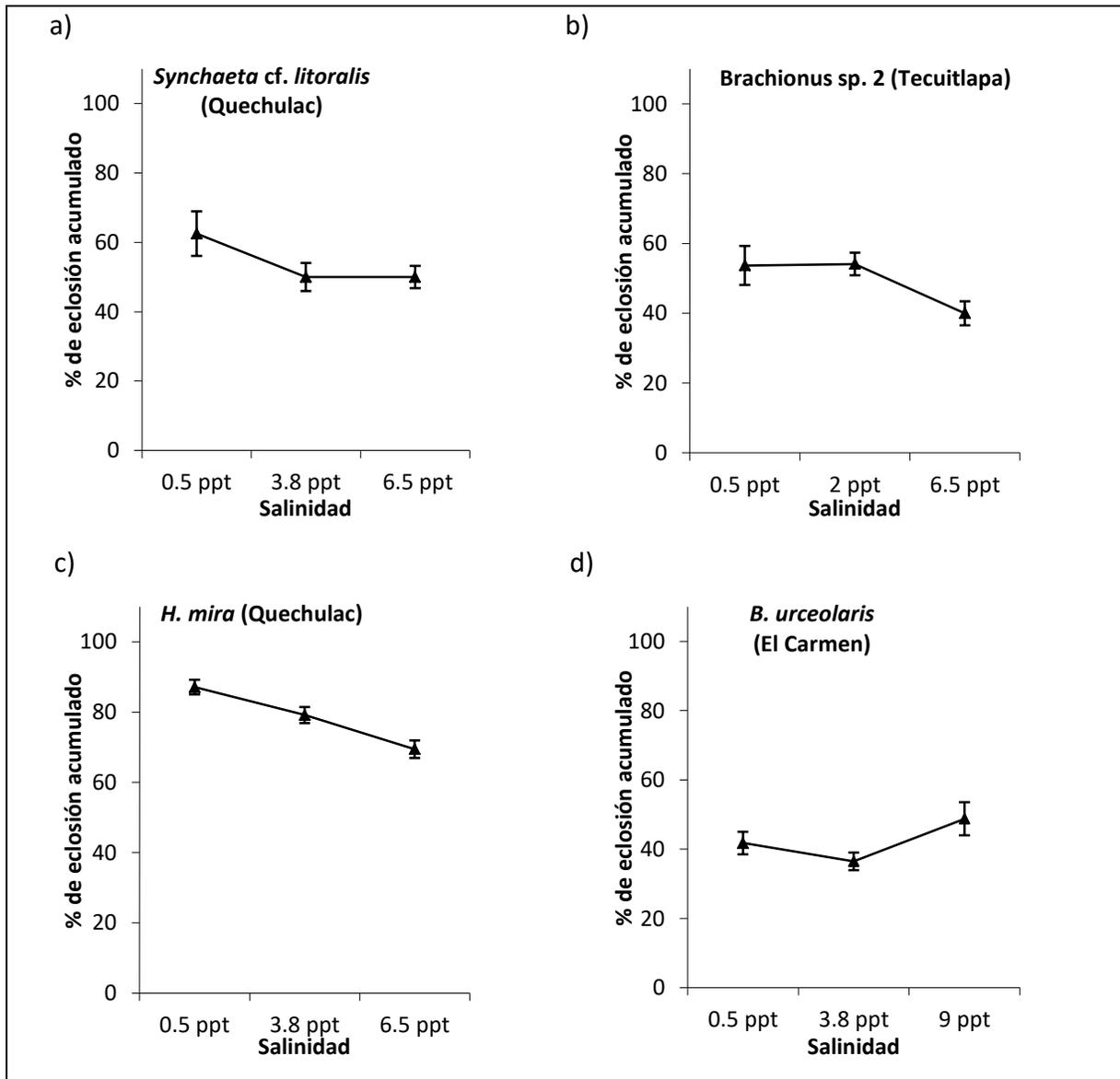


Figura 15. Promedio de eclosiones acumuladas hasta los últimos 5 días del experimento de las especies *S. cf. litoralis* (a), *Brachionus sp. 2* (b), *H. mira* (c) y *B. urceolaris* (d). Las barras representan el error estándar.

Los huevos de resistencia de la especie *B. sp.* 'México' presentes en los sedimentos de los lagos Alchichica y La Preciosa eclosionaron en los tres tratamientos experimentales y no se observaron diferencias significativas en respuesta a la salinidad (Figura 16). Esta especie también eclosionó a partir de los sedimentos del lago Atexcac (no se muestran datos) aunque

en un número muy reducido debido a que es una especie muy poco abundante en el banco de huevos de resistencia de este lago (Capítulo 2; ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

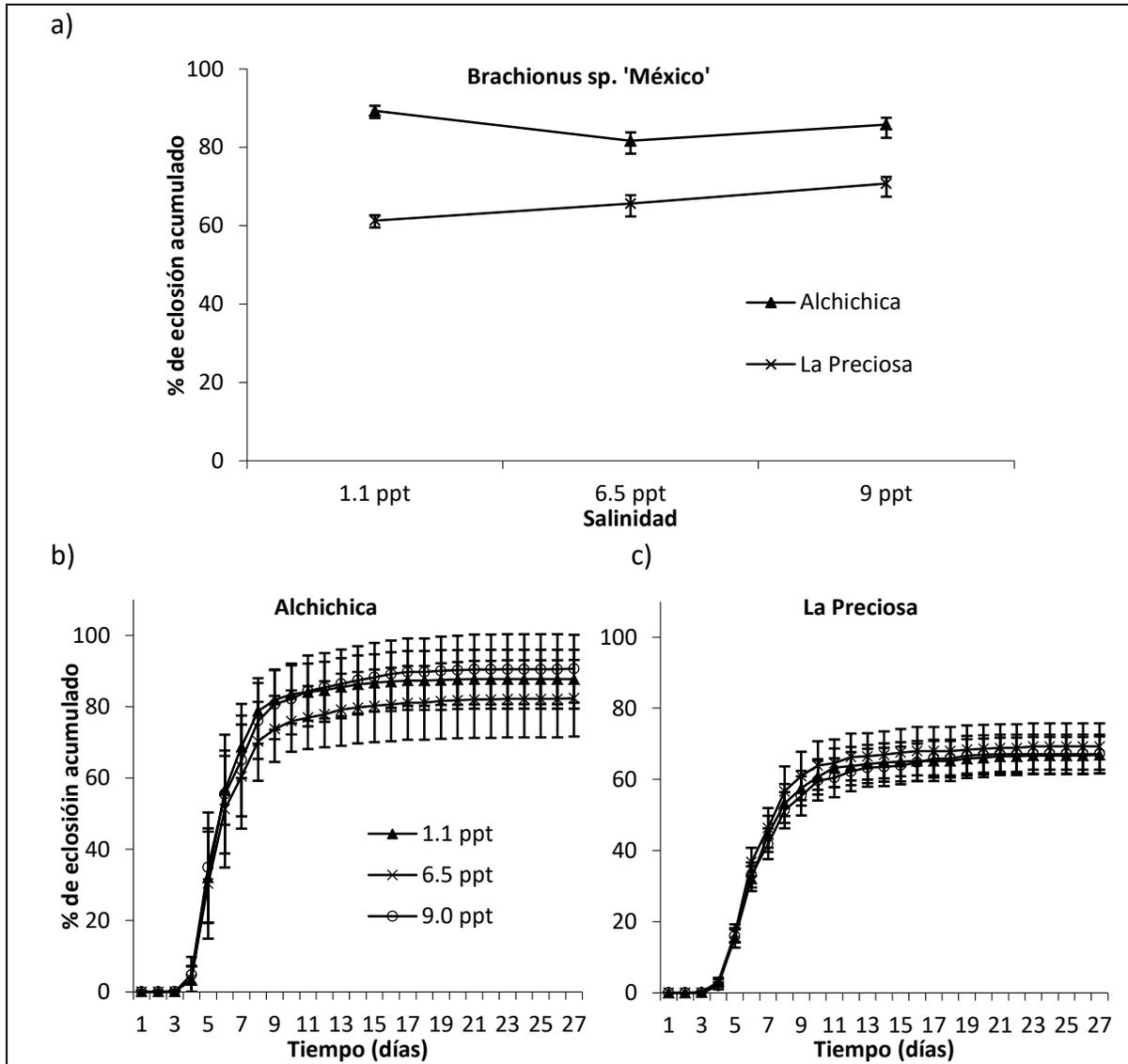


Figura 16. Eclosión de *B. sp. 'México'* en diferentes tratamientos de salinidad. (a) Promedio de eclosiones acumuladas hasta los últimos 5 días del experimento y dinámica de eclosión acumulada ($N = 5$) con respecto al tiempo a partir de los sedimentos de los lagos Alchichica (b) y La Preciosa (c). Las barras representan el error estándar.

Finalmente, la especie *H. jenkiniae* eclosionó a partir de los huevos de resistencia presentes en los sedimentos de los lagos Aljojuca, Atexcac y Tecuitlapa y La Preciosa, sin embargo, en este

último lago la cantidad de eclosiones fue muy baja en todos los tratamientos, posiblemente debido a que su abundancia es muy baja en el banco de huevos de resistencia (no se detectaron huevos de resistencia de esta especie en los análisis de diversidad; Capítulo 2; **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), y debido al reducido tamaño de la muestra no fue analizada su dinámica de eclosión. Por otra parte, la población originaria del lago Aljojuca muestra diferencias significativas en su dinámica de eclosión, alcanzando valores más altos de eclosión acumulada en todos los tratamientos de salinidad con respecto a las otras poblaciones analizadas (Figura 17).

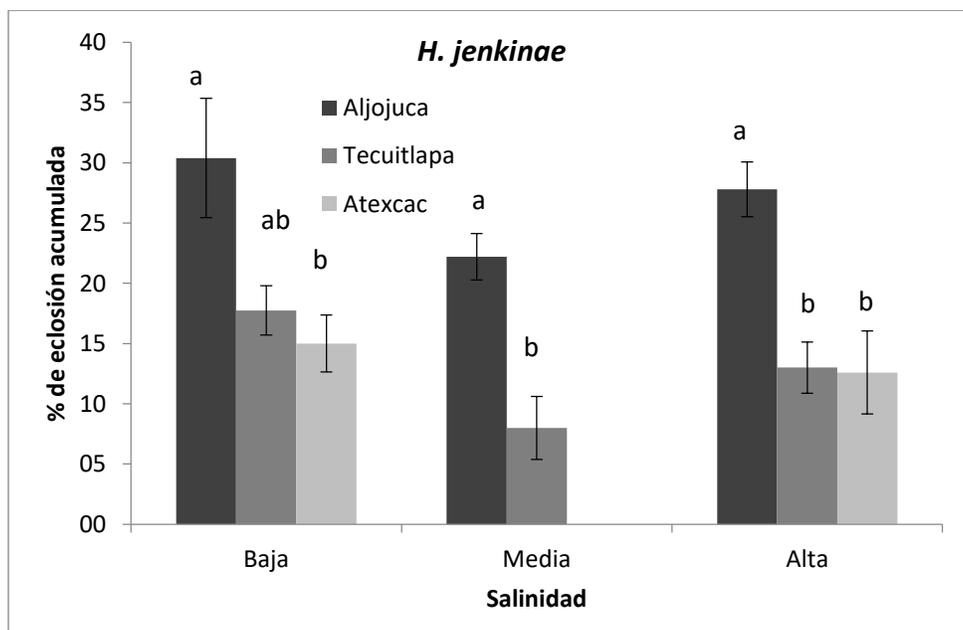


Figura 17. Norma de reacción a la salinidad en la eclosión de huevos de resistencia de tres poblaciones de *H. jenkiniae*. Las barras de error representan el error estándar. Las letras (a y b) representan grupos diferentes (ANOVA; *Post hoc* Tukey; $P < 0.05$).

Eclosión de huevos de resistencia y reproducción asexual de *B. sp.* 'México' en un gradiente de salinidad

La dinámica de eclosión de los huevos de resistencia de las tres poblaciones de *Brachionus sp.* 'México' (Figura 18a) no muestra diferencias significativas en respuesta a la salinidad. La eclosión de los huevos se produce 2-4 días después de ser colocados en condiciones controladas de incubación, y la proporción de éxito en la eclosión es relativamente alta (>60 %). Por otra parte, el tiempo y el porcentaje de organismos eclosionados que produjo su primer descendiente asexual (Figura 18b) fue significativamente diferente entre los grupos en respuesta a los tratamientos de salinidad (ANOVAR, $P < 0.05$). Para este atributo de historia de vida, las tres poblaciones comienzan a reproducirse en el día 6 después de que ocurre la eclosión de los individuos desde huevos de resistencia en los tratamientos de salinidad media y alta (6.5 y 9 g L⁻¹). Por otra parte, en el tratamiento de baja salinidad (1.1 g L⁻¹) las hembras de las poblaciones de Alchichica y La Preciosa comienzan a reproducirse de manera asexual el día 7 después de haber eclosionado, mientras que la población de Atexcac no comienzan a reproducirse asexualmente sino hasta el día 13. En cuanto al porcentaje de hembras que llegan a reproducirse partenogenéticamente, este alcanza cerca del 100% en los tratamientos de salinidades altas de las tres poblaciones, sin embargo, en la salinidad baja solo llegó alrededor del 60% para la población de Alchichica, ~40% para la población de La Preciosa y tan sólo el 25% para la población de Atexcac, lo que indica que la eficiencia biológica de las tres poblaciones se ve afectada negativamente por la salinidad baja.

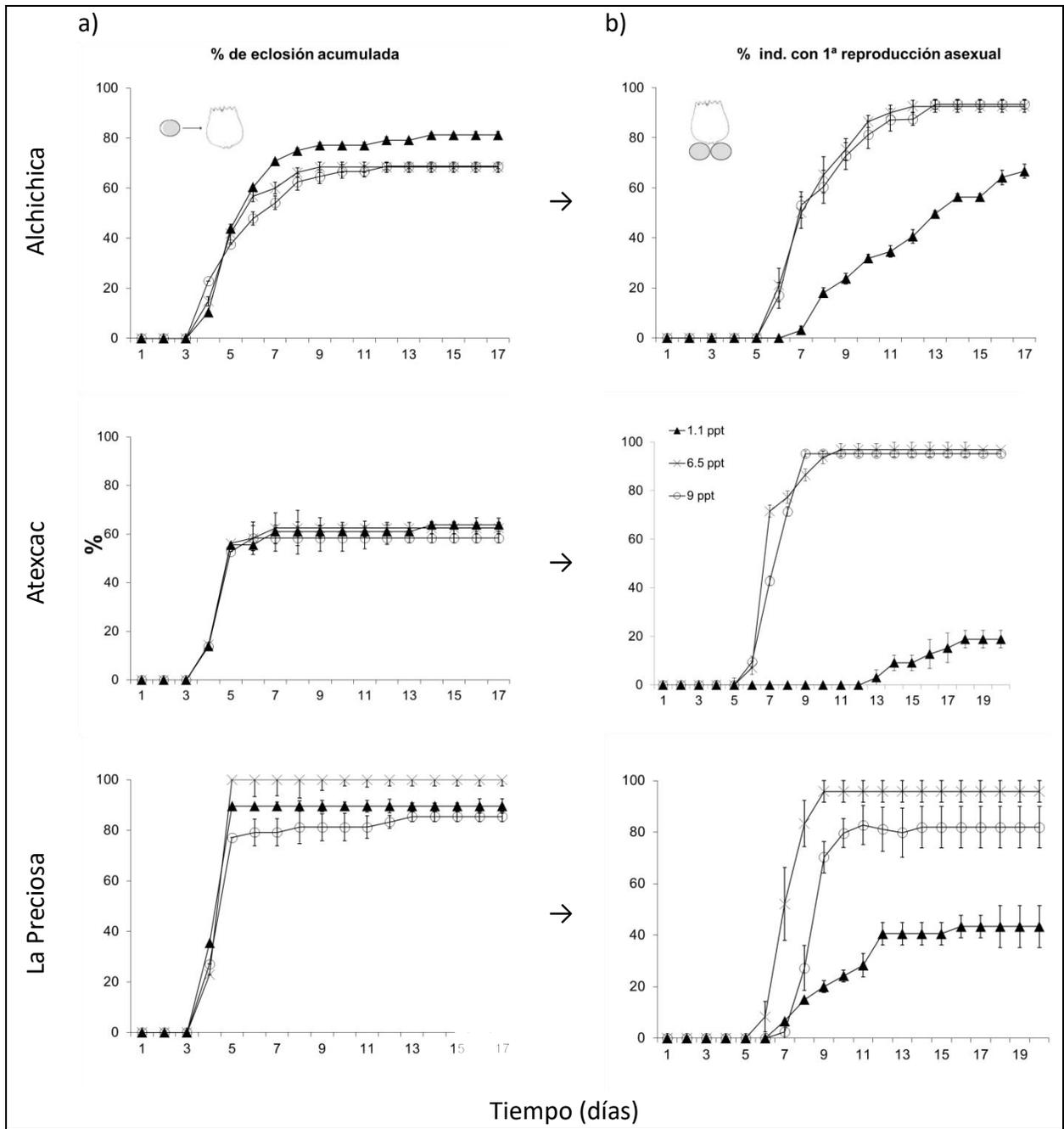


Figura 18. Dinámica de reproducción de tres poblaciones de la especie *Brachionus* sp. México en tres salinidades: 9 (Alchichica), 6.5 (Atexcac) y 1.1 g L⁻¹ (La Preciosa).

DISCUSIÓN

La salinidad como factor local determinante de la diversidad

Partiendo de la hipótesis de que la salinidad juega un papel importante para los procesos de estructuración de la comunidad local, el objetivo del análisis presentado en este Capítulo fue evaluar la eficacia de la eclosión del zooplancton en etapas latentes en función de la salinidad, esto como una aproximación para dilucidar el papel de este factor sobre la distribución heterogénea de la diversidad de especies de rotíferos a escala regional observada en la Cuenca Oriental (Capítulo 2).

Los experimentos mostrados en el presente capítulo tuvieron como objetivo modelar en el laboratorio un escenario donde los huevos de resistencia son “transportados” fácilmente por un vector entre los diferentes lagos, con la finalidad de conocer el potencial que las especies presentes en la cuenca colonicen los diferentes ambientes en función de la salinidad en un escenario de alta dispersión pasiva en un área geográfica relativamente pequeña como la Cuenca Oriental. De los resultados obtenidos destaca la presencia de especies con afinidad a salinidades bajas como *A. silvestris*, *A. girodi*, *K. americana* y *F. terminalis*, sobre las cuales las salinidades relativamente altas (6.5 y 9 g L⁻¹), probadas experimentalmente y que corresponden a las de los lagos Alchichica y Atexcac, respectivamente, representan un factor ambiental que imposibilita la eclosión de los huevos de resistencia de estas especies y, por lo tanto, actúa como un factor determinante de la composición de especies de cada comunidad, explicando en parte la distribución heterogénea de estas especies en la región de la Cuenca Oriental, a pesar de su alta capacidad hipotética de dispersión pasiva. De esta manera se infiere que a nivel regional la salinidad representa en términos ecológicos una barrera fisiológica que limita la capacidad de las especies para colonizar todos los lagos de la cuenca. Sin embargo, también existen especies con una amplia plasticidad fenotípica de eclosión de huevos de resistencia en respuesta a la salinidad, tales como *B. sp. 'México'* y *H. jenkiniae* que, en teoría, podrían dispersarse a ambientes en todo el gradiente de salinidad de la Cuenca Oriental. Sin embargo, estas especies no fueron registradas en las muestras de todos los lagos, lo cual es un indicio de que además de la salinidad y/o la eclosión existen otros tipos de factores que afectan este u otro rasgo de la historia de vida que determinan la distribución de las especies. Así mismo,

especies como *B. variabilis*, *B. urceolaris*, *Brachionus* sp. 2, *Hexarthra* sp., *H. mira*, *C. catelina*, a pesar de tener la capacidad fisiológica para eclosionar en un amplio rango de salinidad, cada especie tiene una distribución restringida a un solo lago (Capítulo 2; Tabla 2).

La salinidad es uno de los factores ambientales que tienen un importante efecto sobre la fisiología de los organismos acuáticos como peces (Boeuf *et al.*, 2001), cladóceros (Hall & Burns, 2002) y rotíferos (Lowe *et al.*, 2005), y representa una presión selectiva en términos evolutivos y, en consecuencia, a nivel comunitario también es uno de los parámetros fisicoquímicos que determinan la composición de las comunidades de organismos acuáticos de aguas continentales. En este contexto, a nivel comunitario la presencia o ausencia de una especie en un parche de hábitat, como cada uno de los lagos de la Cuenca Oriental, está determinada tanto por las condiciones ambientales locales, así como las restricciones intrínsecas de dispersión de las especies presentes en la región. Particularmente para el zooplancton, históricamente (ver Darwin, 1859) se ha considerado que las restricciones de dispersión no son importantes para las etapas de latencia del zooplancton, tales como los huevos de resistencia de los rotíferos, y que en teoría los eventos de colonización deberían de ser muy comunes y en términos ecológicos ocurrir en períodos cortos de tiempo (De Meester *et al.*, 2002). En la Cuenca Oriental, la dispersión pasiva de estructuras de resistencia debería de ser facilitada por la presencia de aves acuáticas que se trasladan entre los lagos, permitiendo desde esta perspectiva dispersalista, la homogenización en la distribución de la diversidad de especies a escala regional. Sin embargo, el origen geológico de cada cuenca lacustre podría representar un factor importante para la diversidad del ambiente a escala regional, debido a que las características fisicoquímicas de los lagos de la cuenca son el resultado de características litológicas locales, así como de las condiciones de precipitación-evaporación donde cada cuenca lacustre está delimitada, principalmente, por las características geológicas del cráter, dando como resultado una heterogeneidad en la composición química de cada lago (Armienta *et al.*, 2008), y determinando que la salinidad sea el factor abiótico más relevante que difiere entre los lagos.

Así, se puede considerar que los factores locales en efecto desempeñan un papel central en los procesos de estructuración de la comunidad en una escala de tiempo ecológica.

Particularmente, dada la amplia gama de salinidades entre los diferentes lagos de la Cuenca Oriental es muy factible que esta represente un factor local de presión selectiva, lo cierto es que los resultados de los experimentos sugieren que la salinidad es en primera instancia un factor clave que determina las composiciones de las comunidades locales.

La salinidad como factor determinante sobre la eclosión de huevos de resistencia

Mientras que la mayoría de las especies de rotíferos que habitan en Cuenca Oriental tienen afinidad por aguas con bajas concentraciones iónicas, y sus estructuras de resistencia solo eclosionan en salinidades bajas (

Especie	Eclosión en salinidad		
	Baja	Media	Alta
<i>Filinia terminalis</i>	+		
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	+		
<i>Asplanchna girodi</i>	+		
<i>Asplanchna silvestrii</i>	+	+	
<i>Keratella americana</i>	+	+	
<i>Brachionus variabilis</i>	+	+	
<i>Brachionus pteridinoides</i>	+	+	
<i>Brachionus</i> sp. "México"	+	+	+
<i>Brachionus urceolaris</i>	+	+	+
<i>Brachionus</i> sp. 2	+	+	+
<i>Hexarthra</i> sp.	+	+	+
<i>Hexarthra jenkinsae</i>	+	+	+
<i>Hexarthra mira</i>	+	+	+
<i>Synchaeta</i> cf. <i>litoralis</i>	+	+	+
<i>Cephalodella catellina</i>	+	+	+

), otras especies como *B.* sp. 'México' y *H. jenkinsae* son capaces de eclosionar dentro del gradiente de salinidades probados experimentalmente. Sin embargo, a nivel intraespecífico también se observaron diferencias en los atributos de historias de vida en función de la salinidad entre las poblaciones de las especies analizadas. Por ejemplo, las poblaciones de *H. jenkinsae* muestran diferencias significativas en la respuesta de este carácter de historia de vida en función de la salinidad (Figura 17). También en el caso de las especie *B.* sp. 'México', en la

cual se observa que las tres poblaciones pueden eclosionar en las tres salinidades experimentales (Figura 18a), cuando se analiza la dinámica de reproducción (Figura 18b) y de crecimiento poblacional (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) también se observan evidencias que refuerzan la hipótesis de que la población de La Preciosa está adaptada localmente a la baja salinidad de este lago como resultado de la presión selectiva que representa esta condición ambiental, teniendo en cuenta la afinidad por las aguas salobres y salinas de este taxón.

Dado que los caracteres de historia de vida, por ejemplo, la proporción de eclosión de huevos de resistencia, pueden estar asociados a factores hereditarios (Spitze, 1993; Campillo *et al.*, 2009), las diferencias intrapoblacionales observadas experimentalmente en este rasgo cuantitativo entre las poblaciones de *H. jenkinsae* y *B. sp. 'México'* sugieren que podría existir variabilidad genética asociada a la localidad en estas especies de la Cuenca Oriental, lo cual en teoría supone una evidencia indirecta de aislamiento geográfico, pero sobretodo ecológico, y en consecuencia de una posible estructuración genética, abriendo la posibilidad de que, en caso de que las condiciones se mantengan sin cambios importantes durante un periodo de tiempo prolongado, aparecieran barreras reproductivas entre los linajes separados dando paso a eventos de especiación críptica (Slatkin, 1987).

Estos resultados son consistentes con las observaciones realizadas en un conjunto de poblaciones de copépodos afines a la especie *Leptodiptomus cf. sicilis* que habitan en esta misma cuenca. Los análisis realizados en copépodos, sugieren que las poblaciones de esta especie que habitan en la Cuenca Oriental han diversificado en un proceso mediado por selección disruptiva, donde la salinidad de los lagos es el principal factor de selección, dando lugar a genotipos especializados a las salinidades de los diferentes lagos. En este contexto, dichos genotipos especializados a las condiciones locales de sus propios lagos, ven fuertemente reducido su potencial para colonizar los otros lagos, ya que dichos migrantes son inviables en las condiciones foráneas de salinidad, dando lugar a una barrera precigótica de naturaleza ecológica, que indica que estas poblaciones se encuentran en una etapa avanzada de especiación (Barrera-Moreno *et al.*, 2015). Estos procesos también se ven reflejados por la presencia de genotipos privativos de cada lago en un patrón de estructura genética revelado

por un análisis con marcadores moleculares neutrales (*SNP's*; *GBS*¹) a lo largo del genoma de esta especie (datos no publicados). Dicha diversificación también es evidente en la coloración observada en los individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones, donde los individuos originarios del lago La Preciosa son incoloros, mientras que los de Atexcac presentan una intensa coloración roja (observación personal).

Perspectiva para la diversidad en función de la salinidad Como ya se ha discutido, la salinidad es uno de los factores ambientales que tiene un efecto más relevante sobre la diversidad de las comunidades acuáticas, en este contexto se puede argumentar que, en general, en un ambiente lacustre un incremento en la salinidad representaría una disminución en la riqueza de especies (Bielańska-Grajner & Cudak, 2014). Así, la alteración de los ciclos hidrológicos producto de actividades humanas, tales como la sobreexplotación de los acuíferos, tala de la vegetación circundante, etc., tendrían como consecuencia la acumulación de sales en los ambientes de agua dulce provocando, eventualmente, la disminución de la diversidad como resultado de la extinción de especies dulceacuícolas y la colonización y sustitución por parte especies capaces de tolerar altas salinidades, propiciando así la integración de comunidades dominadas por pocas especies capaces de habitar en estos ambientes (Nielsen & Brock, 2009).

La Cuenca Oriental es una región muy importante en términos de biodiversidad acuática, que incluye especies microendémicas de diferentes grupos taxonómicos como el copépodo *Leptodiptomus garciai* (Montiel-Martínez *et al.*, 2008), el rotífero *B. sp. "México"* (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), la microalga *Cyclotella alchichicana* (Oliva *et al.*, 2006) o el pez *Poblana alchichica* (Alcocer *et al.*, 2010). Sin embargo, la importancia biológica de esta cuenca no reside únicamente sólo en las especies presentes ahora, sino también que se trata de un sistema natural que permite analizar los procesos ecológicos y evolutivos que han ocurrido a nivel intra e interpoblacional, como lo ponen de manifiesto las diferencias observadas entre las poblaciones de algunas de las especies, cuyos patrones de distribución se corresponden bien con la heterogeneidad de este sistema en cuanto a salinidad, que en su conjunto revelan

¹ *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Nucleótido Único); *Genotyping By Sequencing* (Genotipificación por Secuenciación)

importantes procesos de diversificación biológica en esta región. Un peligro potencial para el futuro de la biodiversidad en Cuenca Oriental es la salinización secundaria de los lagos, producto de la actividad humana. Estos lagos podrían estar en una tendencia de salinización en el medio-largo plazo como resultado de la extracción de las aguas subterráneas y el cambio del régimen hídrico (Armienta *et al.*, 2008). Si esto es cierto, en el futuro cercano la composición de especies de las comunidades tenderá a cambiar, ya que un aumento en la salinidad de los lagos tendería a reducir la diversidad del zooplancton en la cuenca, siendo los rotíferos y cladóceros, quienes tienen mayor afinidad dulceacuícola, los taxones más afectados.

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que la salinidad juega un papel fundamental en los procesos de estructuración de las comunidades locales de la Cuenca Oriental, actuando como una barrera fisiológica para las especies adaptadas al agua dulce, cuyos huevos de resistencia sólo eclosionan en condiciones de salinidad baja, viéndose imposibilitadas para colonizar ambientes con salinidades más altas como Atexcac y Alchichica (6,5 y 9 g L⁻¹, respectivamente) promoviendo además la diversificación biológica de los linajes de rotíferos que habitan en estos lagos.

Hasta ahora no podemos descartar la relevancia de otros factores ecológicos para los procesos de estructuración de la comunidad en Cuenca Oriental, como el efecto de prioridad (Symons & Arnott, 2014), o la limitación de la dispersión regional mediada por las interacciones bióticas locales (Shurin, 2000; Jones, 2012), los resultados indican que la salinidad es un factor local clave que conduce la diversidad de zooplancton en la cuenca, ya que representa un primer filtro para la entrada de nuevas especies a los lagos impidiendo la colonización de algunos taxones, además de que actúa como una fuerza selectiva. Por lo tanto, la salinidad por sí misma es un factor ecológico que juega un papel clave en los procesos de ensamblajes de la comunidad en Cuenca Oriental. Es muy importante llevar a cabo más investigaciones para evaluar el efecto de la actividad humana sobre la composición química de las aguas de estos lagos, así como acumular más evidencias sobre los procesos ecológicos y evolutivos en otros sistemas similares con el fin de contrastar los resultados.

Dado que se encontró evidencia importante de subdivisión poblacional inferida a partir de rasgos cuantitativos de algunas respuestas ecofisiológicas diferenciales a la salinidad para algunas de las especies que habitan la cuenca, en el siguiente capítulo se analizarán las secuencias del gen que codifica para la Subunidad I de la Citocromo c Oxidasa (COI) para tratar de detectar la presencia de posibles especies crípticas, así como para inferir la posible estructura genética de las poblaciones de las especies *B. sp. 'México'* y *H. jenkinsae* en los lagos de la Cuenca Oriental.

CAPÍTULO 4: ADAPTACIÓN LOCAL DE *B. SP. 'MÉXICO'* A LA SALINIDAD EN LA CUENCA ORIENTAL

INTRODUCCIÓN

A continuación, se anexa (Anexo) un sobretiro del artículo “*Local adaptation in populations of a Brachionus group plicatilis cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico*” que fue publicado en la revista *Freshwater Biology* (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). En este artículo se puso a prueba la hipótesis de que, a pesar del supuesto alto potencial de flujo génico entre poblaciones de rotíferos que habitan ambientes vecinos, las diferencias en salinidad entre los diferentes lagos (cada uno con salinidad constante en el largo plazo) en donde habita esta especie ha promovido la adaptación local de las poblaciones de este rotífero en la Cuenca Oriental.

Para esto, se llevaron a cabo experimentos de jardín común para probar el efecto de diferentes salinidades sobre la tasa de crecimiento intrínseco poblacional (r) de los rotíferos. Además, se evaluó la divergencia genética mediante la secuenciación de una región del gen que codifica la subunidad I de la Citocromo *c* Oxidasa (COI) y se llevaron a cabo ensayos reproductivos para evaluar el potencial de flujo génico entre estas tres poblaciones, así como con otras especies del complejo *B. plicatilis* estrechamente relacionadas filogenéticamente.

Los resultados confirman que las poblaciones de este rotífero presentes en la cuenca tienen una cierta plasticidad fenotípica en la tolerancia a la salinidad (como ya se veía reflejado en los resultados del Capítulo 3). Sin embargo, en el mediano plazo sólo los rotíferos del lago menos salino (La Preciosa) en donde habita esta especie están adaptados a esa condición de baja salinidad (1.1 g L^{-1}).

Entre las poblaciones, la divergencia en la secuencia del gen COI fue muy baja (se encontró un solo haplotipo), lo que sugiere un efecto fundador persistente de una colonización relativamente reciente y dispersión posterior de un lago a los otros, con una tasa de inmigración muy restringida. En el análisis filogenético, los rotíferos de esta zona de México se agrupan en el

mismo clado con las especies de tamaño medio *Brachionus ibericus* y *B. sp. 'Almenara'* (véase Gómez *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2016). Los rotíferos de la Cuenca Oriental mostraron con éxito el reconocimiento, la cópula y la formación de híbridos entre sí, pero la cruce inter-poblacional entre *B. ibericus* y *B. sp. 'Almenara'* no tuvo éxito.

Se concluye que las poblaciones de *B. plicatilis* en los tres lagos pertenecen a una nueva especie biológica no descrita (actualmente llamado *B. sp. 'México'*), siendo este el primer reporte de adaptación local a las condiciones de agua dulce de una población dentro del complejo de especies crípticas *B. plicatilis* (1.1 g L^{-1}).

CAPÍTULO 5: ANÁLISIS MOLECULAR DE DIVERSIDAD: GEN COI COMO CÓDIGO DE BARRAS PARA DIFERENCIAR ESPECIES CRÍPTICAS

INTRODUCCIÓN

En el artículo “*Local adaptation in populations of a Brachionus group plicatilis cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico*” (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) presentado en el capítulo anterior se discute la existencia de una especie críptica perteneciente al complejo *Brachionus* grupo *plicatilis* en la Cuenca Oriental, y que siguiendo con los lineamientos (aunque informales) de nomenclatura que ha adoptado la comunidad científica para el estudio de este grupo, provisionalmente se ha denominado como *B. sp. ‘México’* (Mills *et al.*, 2017). Las especies crípticas se definen como dos o más especies que fueron clasificadas inicialmente como una sola especie debido a su gran similitud morfológica (Pfenninger & Schwenk, 2007). Este fenómeno se observa a lo largo de un gran número de grupos taxonómicos y supone implicaciones relevantes sobre el conocimiento de la diversidad biológica, así como la implementación de programas de conservación. Este patrón de diversidad de especies biológicas con poca variación morfológica parece estar presente en una gran cantidad de organismos acuáticos y se cree que podría estar relacionado con el hecho de que los sistemas de reconocimiento de parejas no están asociados con caracteres morfológicos sino con señales químicas (Knowlton, 1993).

Así, debido a que por definición no es posible diferenciar fácilmente entre especies crípticas mediante el análisis de caracteres morfológicos, y a que el uso del criterio biológico de especie implica la realización de experimentos de entrecruzamiento entre todas las posibles especies crípticas que se quieran analizar (lo cual puede representar dificultades técnicas), es posible que aún se desconozca una gran parte de la diversidad de especies biológicas de rotíferos del mundo.

Sin embargo, debido a los adelantos en las técnicas de biología molecular, así como la reducción en los costos de equipos y reactivos, desde hace más de una década los análisis con marcadores

moleculares han sido utilizados como una herramienta fundamental para el estudio de la diversidad biológica en todos los grupos taxonómicos en una escala global (Hebert *et al.*, 2003). Esto ha tenido una gran repercusión sobre el conocimiento de la biota del planeta y ha sido de particular relevancia para el estudio de la diversidad de especies crípticas en el zooplancton.

Un caso ejemplar de esto es el estudio del complejo de especies crípticas afines a *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786). Este grupo de rotíferos ha representado una pieza clave en el estudio de la ecología evolutiva del zooplancton y es posiblemente el grupo de rotíferos más estudiado a nivel mundial. Históricamente los organismos de este taxón han sido utilizados como modelo para estudiar la naturaleza de una amplia variedad de fenómenos tales como las interacciones ecológicas (Ciros-Pérez *et al.*, 2001, 2004), toxicología (Snell & Persoone, 1989), mecanismos de osmorregulación (Lowe *et al.*, 2005), adaptación local (Campillo *et al.*, 2009; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), evolución de del sexo (Carmona *et al.*, 2009), filogeografía (Mills *et al.*, 2007), procesos de envejecimiento (Snell, 2014), entre otros. Sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo, se consideró que la especie *B. plicatilis* descrita por primera vez a finales del siglo XVIII (Müller, 1786) tenía una distribución cosmopolita debido a los registros alrededor de todo el mundo de especímenes con la morfología general propia de esta especie y la muy escasa variación morfológica detectada, lo cual solía ser interpretada como variabilidad a nivel subespecífico (subespecies, formas o variedades) o bien, como plasticidad fenotípica en respuesta a las condiciones ambientales. Posteriormente, mediante la realización de análisis sistemáticos más detallados se logró distinguir la existencia de diferentes morfotipos, por lo general distintivos de características ambientales y biológicas particulares. Más adelante, con el uso de marcadores moleculares y la realización de experimentos de entrecruzamiento se ha logrado determinar que, lo que se creía era una sola especie, en realidad se trata de un complejo de especies crípticas de las cuales hasta la fecha se han descrito formalmente seis: *B. plicatilis* Müller, 1786, *B. rotundiformis* Tschungunoff, 1921, *B. asplachnoidis* Charin, 1947, *B. ibericus* Ciros-Pérez *et al.*, 2001, *B. manjavacas* Fontaneto *et al.*, 2007 y *B. koreanus* Hwang *et al.*, 2013 (Müller, 1786; Tschungunoff, 1921; Charin, 1947; Ciros-Pérez *et al.*, 2001; Fontaneto *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2013; Michaloudi *et al.*, 2017), así como al menos 9 especies biológicas

más que han sido reconocidas mediante análisis de caracteres moleculares, pero que aún no han sido descritas formalmente (Suatoni *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2017).

. Hasta la fecha se ha detectado la existencia de 42 complejos de especies crípticas (Gabaldón *et al.*, 2016), tal es el caso de la especie *Brachionus calyciflorus*, taxón en el cual mediante el análisis de datos moleculares se ha detectado la posible existencia de al menos ocho especies tan solo dentro del territorio de China (Xiang *et al.*, 2011), así como el complejo de especies afines a *Polyarthra dolichoptera* en el cual se han detectado doce posibles especies crípticas tan solo en la región central de Europa (Obertegger, *et al.*, 2014) y *Keratella cochlearis*, en el que se ha inferido la existencia de ocho especies crípticas (Cieplinski *et al.*, 2017).

A pesar de que por sí solos los análisis de caracteres moleculares no representan herramientas lo suficientemente robustas para la descripción formal de nuevas especies, lo cierto es que este tipo de datos son de gran utilidad ya que abren la posibilidad para develar la existencia de esta diversidad biológica “oculta” a los análisis basados sólo en caracteres morfológicos, y así mismo son en términos prácticos la única fuente de datos que permiten integrar matrices de caracteres útiles para dilucidar las relaciones filogenéticas dentro de este tipo de complejos de especies crípticas. De esta manera es posible proponer hipótesis acerca la existencia de especies aún no descritas, sobre las cuales, una vez detectadas, es posible utilizar una aproximación integrativa que incluya el análisis de caracteres moleculares, morfológicos, ecológicos, reproductivos, etc. de tal manera que se puedan determinar de manera más clara los límites entre dos o más entidades biológicas, y de ser el caso, describir nuevas especies.

La riqueza de rotíferos registrada en la Cuenca Oriental está compuesta por 63 especies, cuya identidad fue determinada mediante caracteres morfológicos utilizando claves de identificación taxonómica especializadas para este grupo de invertebrados. Sin embargo, es importante reiterar que dentro de este grupo es común la existencia de especies crípticas, y que en ocasiones coexisten en el mismo hábitat a pesar de que se podría pensar en un posible solapamiento de nicho que llevara a la exclusión competitiva debido a la estrecha relación

filogenética. Así, en diversos sistemas se ha observado una sucesión estacional de especies a lo largo del año (véase p.e., Ciro-Pérez *et al.*, 2001b; Ortells *et al.*, 2003; Gabaldón *et al.*, 2017).

La diversidad de especies de rotíferos estudiada únicamente a partir de caracteres morfológicos podría estar subestimada para los sistemas acuáticos continentales. Por lo tanto, con la finalidad de determinar la posible presencia de especies crípticas en la zona de estudio, en el presente capítulo se discute la presencia de especies crípticas en la Cuenca Oriental mediante el uso de caracteres moleculares para su identificación, particularmente mediante el análisis de las secuencias del gen que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI) en las especies *B. sp.* 'Mexico' y *H. jenkinsae*, utilizadas aquí como modelo debido a su presencia en varios de los cuerpos de agua de la Cuenca Oriental, en la búsqueda de diversidad biológica subestimada a nivel de especie, así como la posible estructura genética de las poblaciones. A partir de los datos moleculares analizados para el gen COI, en el presente capítulo se discute la existencia de dos especies crípticas afines a *H. jenkinsae*, las cuales no presentan rasgos morfológicos distintivos entre sí, y que en el primer capítulo de esta tesis fueron catalogadas como una sola especie que habita en varios cuerpos de agua de la Cuenca Oriental. Por otra parte, en la especie *B. sp.* 'México' la diversidad genética detectada para este marcador molecular sugiere la presencia de una única especie con una baja diversidad genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de secuencias genéticas

Mediante la técnica de flotación en sacarosa se recuperaron los huevos de resistencia de las especies de interés identificándolos con base en su morfología. Estos huevos fueron enjuagados con agua limpia para luego ser transferidos y macerados individualmente con puntas de pipeta nuevas y estériles (una por individuo) en tubos para PCR de 0.2 mL para extraer el ADN mediante la técnica HotSHOT (Montero-Pau *et al.*, 2008), agregando 15 μ L de solución de lisis (25 mM NaOH; 0.2 mM Na₂EDTA) e incubando las muestras a 95 °C durante 30 min, posteriormente los tubos fueron puestos en hielo durante 5 min para agregar después 15 μ L de la solución neutralizadora (40 mM Tris-HCL) y centrifugarlos a 10,000 RPM durante 3 min, finalmente este “ADN molde” fue almacenado a -20 °C para su preservación hasta ser usado para la amplificación de las regiones de interés. Posteriormente, para las especies *B. sp* ‘México’, *H. jenkinsae* a partir del ADN extraído se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de ~700 pb que codifica para la Subunidad I de la Citocromo c Oxidasa (COI) mediante reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). En el caso de la especie *B. sp* ‘Mexico’ además de COI, se amplificó la región conocida como Br-n2 con los oligonucleótidos: F-CAATGTGCTCTTGAACACCGAATC; R- CCAAAGTTGCCAGCAGTGCTAAA (Montero-Pau & Gómez, 2010). Dicha región tiene una longitud de ~1023 pb y codifica para la proteína ribosomal L11, además de que incluye un intrón de ~600 pb y fue reportada para seis de las especies del complejo *B. plicatilis*. Las condiciones de amplificación para esta región fueron las mismas utilizadas por Gómez *et al.* (2002).

Para amplificar estas regiones genómicas se utilizó una mezcla de la enzima Amplicon Master mix (10 μ l), 0.25 μ l de cada oligonucleótido y 3 μ l de ADN molde, siguiendo los protocolos de amplificación previamente citados. Los productos de las reacciones de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con Midori Green[®] y aquellos que generaron bandas fluorescentes únicas e intensas fueron seleccionados para ser secuenciados bidireccionalmente en un equipo ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con ayuda del

software CodonCode Aligner® y los polimorfismos encontrados fueron cotejados en los electroferogramas correspondientes en ambas direcciones.

Análisis de secuencias

Estas secuencias se analizaron con la ayuda del *software* MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) con el cual se obtuvieron las distancias genéticas mediante el modelo del Parámetro 2 de Kimura (P2K) y se llevó a cabo la selección de los modelos evolutivos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustan a las secuencias analizadas (sustitución Hasegawa-Kishino-Yano con sitios invariantes [HKY+I]; Hasegawa, Kishino & Yano, 1985). Además, se generaron árboles de identidad mediante el método del Máxima Probabilidad (ML) utilizando secuencias de la especie *Notomata cordonella* (GenBank; número de acceso: DQ297785) como grupo externo. Para poner a prueba la hipótesis acerca de la existencia de múltiples especies crípticas dentro de grupo de individuos que comparten características morfológicas muy similares, se llevó a cabo un análisis de Descubrimiento Automático de Gaps para Códigos de Barra para la delimitación de especies o AGBD (*Automatic Barcode Gap Discovery*; Puillandre *et al.*, 2012) con las secuencias del gen COI, esto con la finalidad de inferir de manera indirecta la presencia de múltiples Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares (MOTUs; Floyd *et al.*, 2002). Dicho análisis se llevó a cabo mediante la utilización de la plataforma en línea: <http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>, utilizando los valores de parámetros predefinidos. Igualmente se obtuvieron estimadores básicos de diversidad y estructura genética mediante el uso de DnaSP 5.10 (Librado *et al.*, 2007) y un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) mediante el uso de Arlequín 3.5.1 (Excoffier *et al.*, 2010) con las poblaciones de Atexcac y Aljojuca (de aquí en adelante *Hexarthra* sp. 1) para inferir los componentes de la variación genética dentro y entre poblaciones, además, se estimó el valor F_{ST} con la finalidad de determinar la posible estructura genética asociada a la localidad de origen de los individuos.

RESULTADOS

Se analizaron las secuencias del gen COI de los especímenes de *H. jenkinsae* originarios de 3 de los lagos de la Cuenca Oriental (Tecuitlapa, Atexcac y Aljojuca), cuya identidad específica fue determinada a partir de rasgos morfológicos con la ayuda de claves de identificación

especializadas (Voigt & Koste, 1978). A partir del análisis de estas secuencias genéticas se detectó la presencia de dos MOTUs, correspondientes a dos posibles especies crípticas (Tabla 46), una de ellas registrada en los lagos Atexcac y Aljojuca (de aquí en adelante, *Hexarthra* sp. 1) mientras que la segunda se registró únicamente en el lago Tecuitlapa (de aquí en adelante *Hexarthra* sp. 2). Estas dos especies putativas, afines a la morfología de *H. jenkinsae* se encuentran separadas entre sí por un gap de distancia genética de 26.9 ± 0.60 % en este marcador molecular (K2P; Tabla 7).

Tabla 4. Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares (MOTUs) inferidas a partir de secuencias del gen COI de la morfoespecie *H. jenkinsae* mediante un análisis de AGBD. Entre paréntesis se indica el haplotipo (H1 – H4) de cada individuo secuenciado (HX, Atexcac; HJ Aljojuca; HT, Tecuitlapa).

MOTUs	Secuencias					Lago
Sp1 (n=23)	HX15 (H1)	HX16 (H1)	HX20 (H1)	HX01 (H2)	HX02 (H1)	Atexcac
	HX03 (H2)	HX04 (H1)	HX05 (H1)	HX06 (H1)	HX09 (H1)	
	HJ01 (H1)	HJ02 (H4)	HJ03 (H3)	HJ04 (H1)	HJ05 (H1)	Aljojuca
	HJ06 (H1)	HJ07 (H1)	HJ09 (H1)	HJ10 (H1)	HJ11 (H1)	
	HJ12 (H4)	HJ13 (H1)	HJ14 (H1)			
Sp2(n=5)	HT57 (H5)	HT58 (H5)	HT59 (H5)	HT60 (H5)	HT61 (H5)	Tecuitlapa

Tabla 5. Distancias genéticas (K2P) en el gen COI (%) entre individuos originarios de diferentes lagos con dos posibles especies crípticas de la morfoespecie *H. jenkinsae*; $\bar{x} \pm$ desviación estándar

	Tecuitlapa	Atexcac	Aljojuca
Tecuitlapa			
Atexcac	26.98 ± 0.10		
Aljojuca	26.35 ± 0.60	0.34 ± 0.56	

De la especie *Hexarthra* sp. 2 encontrada en Tecuitlapa se analizaron las cinco secuencias genéticas obtenidas y se detectó un único haplotipo para la región del gen COI analizada. Por otra parte, para *Hexarthra* sp. 1 se obtuvieron 23 secuencias de individuos de los lagos Atexcac y Aljojuca entre las cuales se identificaron 4 haplotipos distintos (H1, H2, H3 y H4) separados

entre sí por una distancia genética máxima de 1.15% (K2P). De estos 4 haplotipos, H1 está presente en los dos lagos, mientras que H2 se encuentra en 2 individuos de Atexcac, en tanto que H3 y H4 individuos de Aljojuca (Tabla 4).

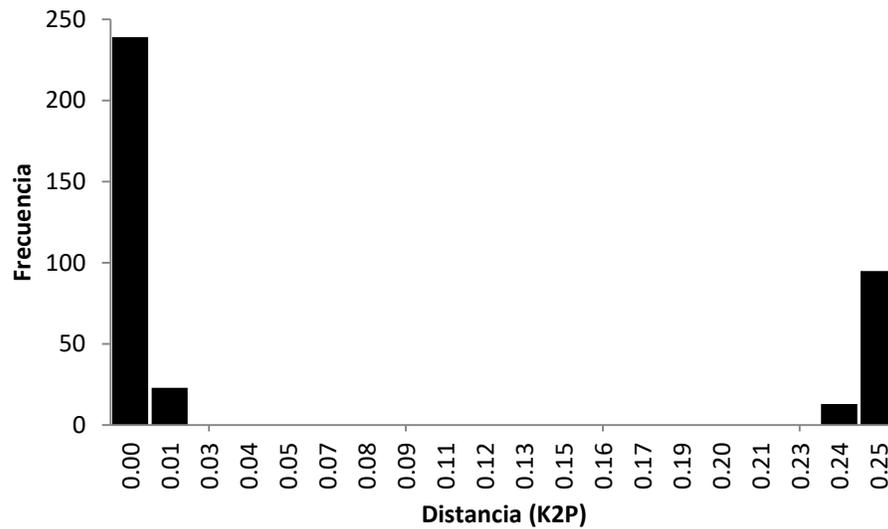


Figura 19. Frecuencia de distancias genéticas (K2P) entre pares de individuos de las dos MOTUs del taxón *H. cf. jenkiniae*

Tabla 6. Diversidad genética del gen mtDNA COI. *H*: número de haplotipos; *Hd*: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica (Nei, 1987); *S*: número de sitios polimórficos de las poblaciones de Atexcac y Aljojuca de *Hexarthra* sp 1.

	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i>	π	<i>S</i>
Atexcac	10	2	0.35	0.00069	1
Aljojuca	13	3	0.41	0.00504	8
Total	23	3	0.38	0.00340	9

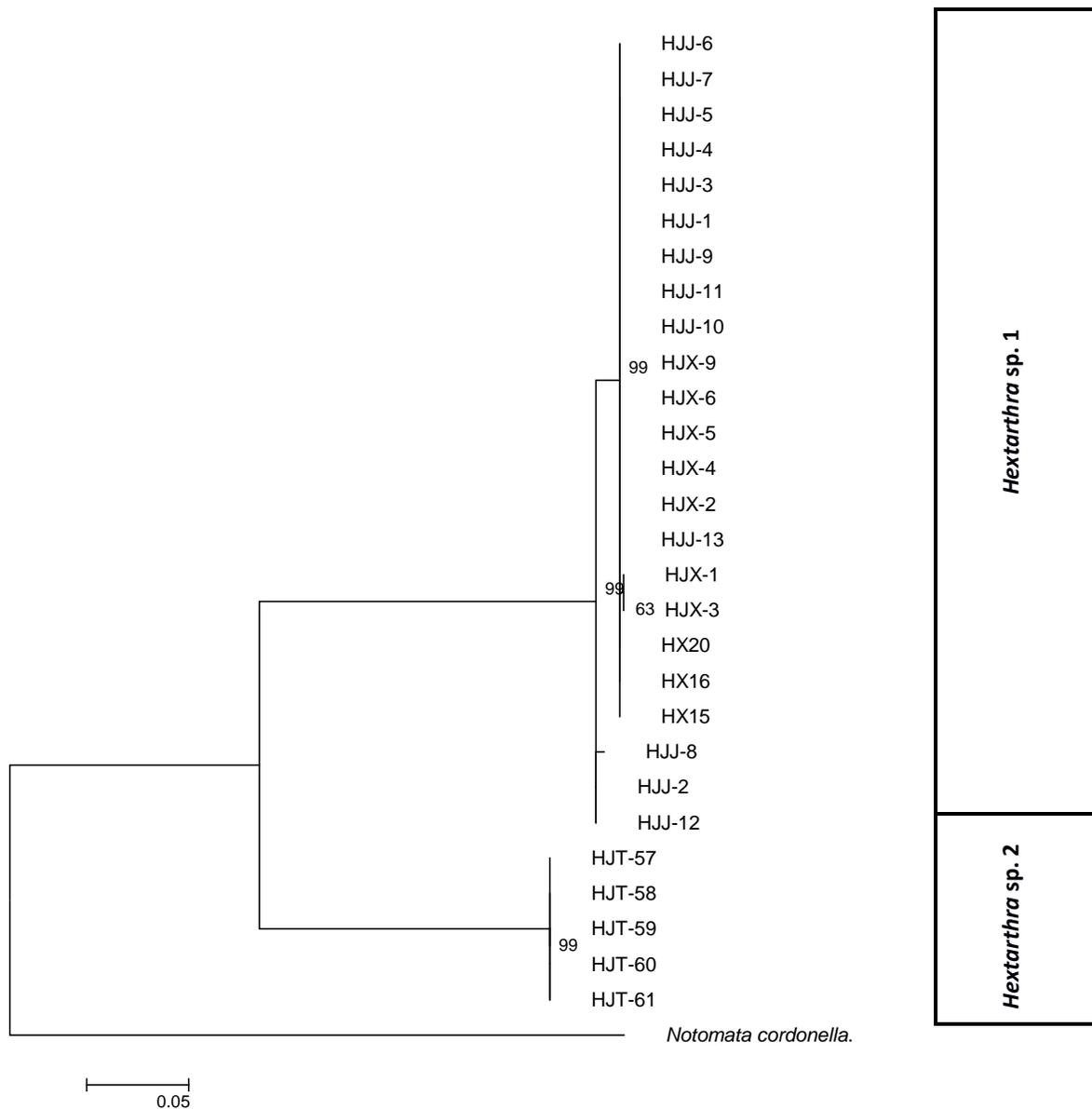


Figura 20. Árbol de identidad (ML) basado en el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa, Kishino & Yano, 1985) con sitios invariantes (HKY+I) entre las secuencias del gen COI de las poblaciones de *H. cf. jenkiniae* de la Cuenca Oriental. Los valores mostrados representan el valor de bootstrap (500). *Notommata cordonella* como grupo externo.

Tabla 7. Análisis molecular de varianza (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) de las poblaciones de Atexcac y Aljojuca de *Hexarthra* sp. 2 a partir de las secuencias del gen COI

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Porcentaje de variación
---------------------	--------------------	-------------------	-------------------------

Entre poblaciones	1	2.099	12.05
Dentro de poblaciones	21	17.292	87.95
Total	22	19.391	100
F_{ST}	0.12		

Los resultados del análisis de ANOVA indican que el 87.95% de la variación genética registrada puede ser atribuida a procesos ocurridos dentro de las localidades, mientras que el 12.05% de esta variación puede ser explicado debido al aislamiento geográfico de las poblaciones (Tabla 9). Por otra parte, la prueba global de diferenciación entre muestras indica que estas dos poblaciones no están estadísticamente diferenciadas entre sí (*Exact Test of Sample Differentiation* $P = 0.2569 \pm 0.0037$; Markov $N = 100,000$; Raymond & Rousset, 1995).

Diversidad genética de *B. sp.* 'México'

Se analizaron 16 secuencias de COI de las tres poblaciones de *B. sp.* 'México' (véase p. ej. GenBank: KU299416) que habitan en la Cuenca Oriental (Tabla 10), de entre las cuales se observaron 4 haplotipos distintos separados por una distancia genética (K2P) de entre 0.19 y 0.39% (Tabla 11).

Tabla 8. Diversidad genética del gen mtDNA COI en de *B. sp.* 'México'. *H*: número de haplotipos; *Hd*: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica (Nei, 1987); *S*: número de sitios polimórficos de las poblaciones de Atexcac, La Preciosa y Alchichica de *B. sp.* 'México'

	<i>N</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	π	<i>S</i>
Atexcac	5	1	0	0	0

Preciosa	4	1	0	0	0
Alchichica	7	4	0.71	0.00169	3
Total	16	4	0.35	0.00074	3

Tabla 9. Distancias genéticas (K2P) entre los distintos haplotipos de *B. sp.* 'México'

	H1	H2	H3
H1			
H2	0.00198		
H3	0.00198	0.0039	
H4	0.00198	0.0039	0.00198

Para *B. sp.* 'Mexico' además del gen COI se amplificó la región conocida como Br-n2 obteniendo fragmentos de ~800 pb (Montero-Pau & Gómez, 2010). Se obtuvieron 10 secuencias de las cuales solo se registró un único haplotipo, el cual guarda una similitud del 91% con respecto a la secuencia más cercana reportada en la base de datos de NCBI (BLAST; GenBank: GQ894785), correspondiente a la especie *B. ibericus* (ver Anexo 1).

DISCUSIÓN

Diversidad críptica de especies

En el capítulo 2 se analizó la estructura de la comunidad de rotíferos de la Cuenca Oriental y se describió la composición de especies de cada lago (Tabla 2). En este punto cabe destacar que la

identificación de las especies se hizo mediante el uso de claves especializadas basadas en el análisis de caracteres morfológicos de los organismos, sin embargo, la existencia de especies crípticas es un fenómeno frecuente en rotíferos lo cual puede resultar en una subestimación de la diversidad. Debido a esto, en el presente capítulo se analizó parte de la diversidad biológica de los rotíferos mediante el uso de marcadores moleculares, concretamente de dos de las especies más representativas (*H. jenkinsae* y *B. sp. 'México'*) de la Cuenca Oriental en términos de su distribución en hábitats contrastantes en cuanto a condiciones de salinidad, y donde un posible efecto fundador y presiones selectivas disruptivas podrían haber tenido como consecuencia la diferenciación genética de las poblaciones.

En este sentido, es importante destacar que en este capítulo se detecta la presencia de dos especies crípticas dentro del género *Hexarthra* en los lagos Aljojuca, Atexcac y Tecuitlapa (véase Capítulo 2; Tabla 2) que, al analizar las secuencias del gen COI, se encontró que entre los haplotipos encontrados en los lagos Aljojuca y Atexcac con respecto a los encontrados en Tecuitlapa presentan un gap de distancia genética de al rededor del 26% (Tabla 7). Este resultado es consistente con el análisis de AGBD que revela la existencia clara de dos MOTU's (Figura 19), lo cual, con base en las distancias genéticas máximas intraespecíficas reportadas en la literatura para rotíferos, hace suponer que se trata en efecto de dos especies biológicas distintas (Suatoni *et al.*, 2006). Además de la evidencia molecular discutida en el presente capítulo, cabe destacar que también existen indicios de diferenciación ecológica entre estas dos posibles especies crípticas, ya que ambas tuvieron una respuesta significativamente diferente en su dinámica de eclosión en una de las salinidades en los experimentos descritos en el Capítulo 3 (Figura 17).

Si bien, no se realizaron ensayos de reproducción entre este par de entidades biológicas para poner a prueba la hipótesis de que la MOTU originaria del lago Tecuitlapa (*Hexarthra* sp2) y la encontrada en los lagos Aljojuca y Atexcac (*Hexarthra* sp1) son especies distintas bajo el criterio biológico de especie (Mayr, 1963), lo cierto es que el gap de distancia genética (K2P) en el gen COI es demasiado elevada como para un par de poblaciones de una misma especie, ya que para

rotíferos se ha reportado una interrupción del flujo génico entre MOTU^s separadas por un gap de 15% de divergencia en este gen (Suatoni *et al.*, 2006).

Por otra parte, el análisis de la diversidad de este gen en las poblaciones de *B. sp.* 'México' muestra una baja diversidad genética (Tablas 10 y 11), de tal manera que el análisis de las nuevas secuencias de este gen confirma la existencia de una única especie biológica (véase Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) afín a la morfología general del grupo *B. plicatilis* dentro de la cuenca. Sin embargo, de manera adicional, nuevas secuencias obtenidas fueron analizadas también en el contexto de la diversidad global para el estudio del grupo de especies crípticas afines a *B. plicatilis*, en conjunto con datos recabados durante años a nivel mundial en colaboración con la comunidad internacional, esto durante un taller de trabajo realizado en el año 2014 en el Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Texas en El Paso, a partir del cual se tuvo como resultado la publicación del artículo de investigación "*Fifteen species in one: deciphering the Brachionus plicatilis species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy*"², (Anexo 3), en donde se presentan evidencias de la existencia de 15 especies crípticas dentro del complejo, además de que se explora la señal filogenética a partir de caracteres ecológicos y morfométricos. Cabe destacar que al agrupar los datos moleculares de los individuos originarios de los lagos de la Cuenca Oriental junto con los demás datos recabados a nivel mundial, los diferentes modelos de taxonomía molecular aplicados sobre el conjunto de secuencias genéticas ofrecen evidencias robustas de que la MOTU SM7 (véase Mills *et al.*, 2017) integrada por los individuos de la Cuenca Oriental constituyen un taxón endémico para México y que corresponde a una nueva especie, a la cual provisionalmente se ha denominado *B. sp.* 'México'. En este sentido, el complejo de especies crípticas *B. plicatilis* se subdivide en 3 grandes clados diferenciados principalmente por la talla, donde el clado L (*large*) corresponde a los organismos más grandes, el clado S (*small*) a los de menor tamaño y el clado SM en donde se ubican los organismos de tamaño intermedio y que está integrado por ocho

² Mills, S., Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciroso-Pérez, J. *et al.* Hydrobiologia (2017). doi:10.1007/s10750-016-2725-7

especies identificadas mediante taxonomía molecular (Mills *et al.*, 2017). La especie *B. sp.* 'México' (SM7) se encuentra ubicada dentro del clado 'SM' junto con las especies *B. ibericus* (SM1) y *B. sp.* 'Almenara' (SM6), las cuales son las más cercanas filogenéticamente a esta, ambas reportadas en Europa (*B. sp.* 'Almenara' también ha sido reportada en México y otros lugares de América), sin embargo, hasta a la fecha no existen más registros de secuencias pertenecientes al grupo SM7, siendo la Cuenca Oriental el único lugar en el mundo de donde se tiene registro de esta especie.

En la actualidad, de estas tres especies únicamente *B. ibericus* cuenta con una descripción formal y es un taxón válido con base en el código internacional de nomenclatura zoológica, sin embargo, como parte de los estudios afines a la presente investigación ya se han realizado análisis taxonómicos integrativos sobre la base de caracteres morfométricos y de conducta reproductiva (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Hernández, 2016), que ofrecen un conjunto robusto de evidencia de que *B. sp.* 'Mexico' y *B. sp.* 'Almenara' son especies biológicas con sutiles diferencias morfológicas distintivas para cada una y actualmente se está preparando un manuscrito y el material tipo con la finalidad de publicar los nombres formales (tentativamente *Brachionus mexicanus* y *Brachionus almenarensis*) para su reconocimiento oficial como taxones válidos.

Estructura poblacional y flujo génico

Como parte de los objetivos de la presente investigación se buscó obtener información genética útil no solo para determinar la existencia de especies crípticas, sino también para inferir de manera general, los patrones de estructuración genética a nivel poblacional tomando en cuenta la distribución discreta de los organismos en parches de hábitats constituidos por los lagos, e inferir de manera indirecta el flujo génico a través de la dispersión pasiva de estructuras de resistencia en el contexto de las metacomunidades. Debido a esto se eligió analizar la diversidad genética a nivel poblacional de dos especies distribuidas en al menos tres lagos ecológicamente contrastantes, en este caso *B. sp.* 'Mexico' y *H. jenkiniae*.

Para el taxón *H. jenkiniae* se registraron dos MOTU's que podrían formar parte de un complejo más amplio de especies crípticas similar al de *B. grupo plicatilis*, de las cuales, la especie que se

analizó a nivel poblacional fue la que está presente en dos lagos distintos, es decir, la especie *Hexarthra* sp1.

En esta especie el análisis de la secuencia COI como marcador molecular no revela el posible efecto del aislamiento geográfico sobre el flujo génico entre poblaciones. En este sentido el análisis molecular de varianza indica que el 12.05% (Tabla 9) de la variación genética puede ser atribuida al componente de aislamiento geográfico, mientras que el valor de F_{ST} entre este par de poblaciones es relativamente bajo (0.12). Sin embargo, cabe destacar este gen como marcador molecular ha sido ampliamente utilizado como una aproximación para analizar la diversidad a nivel de especies (Hebert *et al.*, 2003), no así para estudios de genética de poblaciones debido a que posee una tasa de mutación relativamente lenta para el registro de eventos en periodos de tiempo relativamente cortos como los que posiblemente atañen a las poblaciones de rotíferos de la Cuenca Oriental. El bajo grado de polimorfismo encontrado en las secuencias de COI a nivel intraespecífico en las dos especies analizadas con este marcador molecular puede ser el resultado de que el tiempo de divergencia entre estas poblaciones podría ser relativamente corto si tomamos en cuenta que la antigüedad de los lagos es de ~ 40,000 años (Carrasco-Nuñez, *et al.*, 2007) y la tasa de mutación de este gen que es de alrededor de 1.4%/millón de años (Gómez *et al.*, 2002). De esta manera no es posible determinar de manera confiable si los resultados obtenidos se deben a la baja tasa de mutación del marcador molecular o si en efecto no existe una subdivisión poblacional como producto de procesos intensos de migración. Sin embargo, cabe destacar que la utilización de este gen como marcador molecular en la especie de copépodo *Leptodiaptomus* cf. *sicilis* que habitan en esta misma cuenca mostró un mayor grado de polimorfismos, algunos de ellos exclusivos para cada subpoblación, revelando un fuerte patrón de fragmentación alopátrica en poblaciones que no datan de más allá del pleistoceno tardío. Sin embargo, a diferencia del grado de polimorfismo observado en las especies de rotíferos aquí analizadas, las distancias genéticas (0.23–0.43%) encontradas para *L.* cf. *sicilis* resultan ser mayores a las que se podrían esperar que ocurran en la edad que tienen los lagos, aun usando un reloj molecular con una tasa de mutación el doble de rápida que la utilizada para este tipo de invertebrados, por lo que para estos copépodos sería muy improbable que esta diversidad se hubiera originado dentro de la cuenca a partir de un

solo evento de colonización, por lo que se plantea la hipótesis de que en este caso hubo múltiples eventos de colonización a partir de una población ancestral diversa, acoplados a efectos de prioridad que dieron como resultado cuellos de botella para cada población y a su vez el patrón de fragmentación alopátrica observado reforzado por adaptación local e inviabilidad de los migrantes (Barrera-Moreno *et al.*, 2015).

En este punto cabe destacar que la utilización de este gen como marcador molecular para tratar de inferir patrones de diferenciación genética ya ha sido utilizado con anterioridad en rotíferos de la especie *B. plicatilis* s. s., donde se pudo revelar un patrón filogeográfico en una escala global con la existencia de cuatro clados asociados a cuatro regiones geográficas, una en América del Norte, dos en la zona del Mediterráneo separadas por la península itálica y una más en Australia, con una fuerte correlación ($R^2 = 0.91$) entre la distancia genética y la distancia geográfica (Mills *et al.*, 2007). Por otra parte, como ya se mencionó, la evidencia recabada con este mismo marcador para los rotíferos de la Cuenca Oriental no ofrece evidencias de un patrón de fragmentación alopátrica, por lo cual se puede plantear la hipótesis de que a diferencia de estos copépodos, para las dos especies de rotíferos analizadas que: 1) hubo un evento único de colonización a nivel regional y posteriormente dispersión entre los lagos en donde actualmente habitan, o 2) han existido múltiples eventos de colonización a partir de una población fuente, originalmente muy poco diversa en este gen. Debido a la ausencia de sitios polimórficos informativos en las secuencias de este gen entre las secuencias analizadas, como parte del presente trabajo de investigación se exploraron alternativas con otros marcadores moleculares, como la secuencia de la región Brn-2 (Montero-Pau & Gómez, 2010) en la especie *B. sp.* 'México' con la finalidad de obtener información de utilidad para el análisis poblacional, sin embargo, al igual que el gen COI presenta un bajo polimorfismo ($N = 10$, único haplotipo; Anexo 1). Además de que se trató de amplificar y secuenciar la región no codificante de la mitocondria a partir del diseño de oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia del genoma mitocondrial de *B. plicatilis* s. s. (Suga *et al.*, 2008), sin embargo, no fue posible obtener productos de PCR bajo diversas condiciones de amplificación, lo cual puede ser atribuible a una baja especificidad de los oligonucleótidos ya que, como se mencionó, fueron diseñados a partir de información genética de otra especie.

Los análisis de las secuencias de COI no revelan la existencia de aislamiento, como ya se ha mencionado, muy probablemente debido a la falta de resolución de este marcador para eventos recientes. En los últimos años, gracias a la nueva generación de tecnologías de secuenciación molecular se ha desarrollado una nueva serie de metodologías de secuenciación genómica que resultan de gran utilidad para analizar relaciones filogenéticas recientes entre organismos para los que no se dispone de información genómica previa. En vista de que hasta la fecha no existen otros marcadores moleculares con alta tasa de mutación tales como regiones microsatélites reportados para las especies a analizar en este trabajo de investigación, se plateó utilizar una de las variantes de este tipo de metodologías *RAD sequencing* conocida como GBS (*genotyping by sequencing*) como una herramienta alternativa que puede ofrecer una alta capacidad de resolución para llevar a cabo los análisis a nivel poblacional.

En el siguiente capítulo a manera de modelo se abordará la estructura poblacional de la especie *B. sp. 'Mexico'* utilizando los SNP's encontrados utilizando la metodología de GBS, esto con la finalidad de develar los patrones históricos recientes debidos al aislamiento geográfico y ecológico de las poblaciones presentes en la Cuenca Oriental en el marco de la importancia del flujo génico entre poblaciones para las dinámicas de las metacomunidades, definida como un conjunto de comunidades locales que están unidas por el intercambio de colonizadores de múltiples especies con potencial para interactuar por medio de la dispersión (Leibold *et al.*, 2004).

CAPÍTULO 6: ANÁLISIS MOLECULAR DE DIVERSIDAD GENÓMICA (GBS) DE TRES POBLACIONES DE *Brachionus* SP. 'México'

INTRODUCCIÓN

Además del efecto ecofisiológico de la salinidad sobre la estructura de la metacomunidad, también se observaron diferencias en las respuestas a la salinidad entre poblaciones pertenecientes a la misma especie. Tal es el caso de *B. sp. 'México'* (Capítulo 4; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) y *Hexarthra sp. 2* (Capítulo 5), en las que el efecto de la salinidad es significativamente diferente entre algunas de las poblaciones de estas especies presentes en la cuenca. Dado que los experimentos realizados para comparar las respuestas ecofisiológicas de los rotíferos se llevaron a cabo en condiciones controladas de laboratorio, descartando otras variables ambientales, las diferencias registradas entre poblaciones pueden ser atribuidas a la existencia de caracteres determinados genéticamente, asociados a la localidad de origen de los individuos analizados y producto de una fragmentación alopátrica con bajo flujo génico y presiones ambientales diferentes impuestas por cada lago (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

A raíz de los avances en los métodos de estudio con marcadores moleculares, lo que se ha observado es que el flujo génico entre las poblaciones de zooplancton epicontinental que habitan en lagos vecinos es bajo (De Meester *et al.*, 2002). En este sentido, este alto grado de subdivisión poblacional observado en el zooplancton de aguas continentales puede ser atribuido a la persistencia de eventos fundador (Boileau *et al.*, 1992) y no es producto de procesos de deriva génica ocurridos *in situ*, ya que los tamaños de las poblaciones de este tipo de organismos son muy grandes, lo cual vuelve muy poco probable la erosión de genotipos por azar una vez que las poblaciones están establecidas (Lynch, 1987), por lo cual, la deriva génica juega un papel relevante sólo en el momento de la fundación de las poblaciones (Gómez *et al.*, 2002).

A principios de la década de 1970 los análisis con aloenzimas comenzaron a revelar las primeras evidencias de diferenciación genética entre poblaciones vecinas de cladóceros de la especie

Daphnia magna (Hebert *et al.*, 1972; Hebert, 1974). Posteriormente, se han ido acumulando otros trabajos que han revelado un patrón similar entre poblaciones de otras especies de cladóceros (Lynch, 1983; Vanoverbeke & De Meester, 1997; Thielsch *et al.*, 2009), que en algunos casos, estando separadas por unos pocos cientos de kilómetros, o incluso unos metros (Declerck *et al.*, 2001), se encuentran genéticamente diferenciadas, aunque sin un patrón aparente de aislamiento por distancia. Esto representa una paradoja al tratarse de organismos con un alto potencial de dispersión, ya que se podría esperar una fuerte conectividad entre poblaciones vecinas debido al frecuente intercambio de individuos. Desde hace algunos años, esta aparente paradoja ha sido explicada mediante la persistencia del efecto fundador (Boileau *et al.*, 1992) y la hipótesis de la monopolización (De Meester *et al.*, 2002; ver Capítulo 1) con la incorporación de los procesos evolutivos de adaptación local de las poblaciones de organismos con ciclos de vida de partenogénesis cíclica como los rotíferos.

En este punto cabe destacar que en una escala geográfica reducida se ha encontrado un fuerte patrón filogeográfico en las poblaciones de la especie *B. plicatilis* que habitan en la península ibérica, en donde mediante el análisis de las secuencias del gen COI se logran distinguir dos linajes, uno al norte y uno al sur de la península (Gómez *et al.*, 2000), y lo mismo se observa con la especie *B. manjavacas* (Gómez *et al.*, 2007). Sin embargo, al llevar a cabo un análisis con microsatélites en las poblaciones de *B. plicatilis*, lo que se encontró fue un notable mayor grado de estructura genética ($F_{ST} = 0.43$) con valores altos de F_{ST} aún entre pares de poblaciones separadas por unos cuantos kilómetros dentro de una misma cuenca, indicando un grado bajo de flujo génico aún en distancias cortas (Gómez *et al.*, 2002).

De igual manera, se han encontrado divergencias ecológicas en caracteres de historia de vida entre varias poblaciones de la especie *B. plicatilis* en la península ibérica, estas divergencias observadas en caracteres cuantitativos (Q_{ST}) fueron contrastadas con las divergencias genéticas (F_{ST}) observadas con marcadores moleculares neutrales (*i.e.* microsatélites) y se encontraron valores de Q_{ST} aún mayores a los de F_{ST} para algunos caracteres de historia de vida asociados con la reproducción sexual, lo cual sugiere un proceso de selección natural (Campillo *et al.*, 2009).

La especie *B. sp.* 'México' que habita la Cuenca Oriental que es capaz de mantener tasas de crecimiento poblacional positivas en la de este lago, mientras que las poblaciones originarias de lagos con salinidades más altas (Atexcac con 6.5 g L^{-1} y Alchichica con 9.0 g L^{-1}) no podrían establecer poblaciones estables en el mediano y largo plazo en las condiciones de salinidad del lago La Preciosa, ya que a pesar de que la baja salinidad de este lago no es letal a corto plazo para los individuos, las tasas de crecimiento poblacional se ven severamente disminuidas (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que este atributo de historia de vida fue medido en condiciones controladas en el laboratorio se puede inferir que las diferencias en la respuesta a la salinidad en la población originaria del lago La Preciosa tienen fundamentos de heredabilidad, y por lo tanto debería de existir diferenciación genética entre las poblaciones de esta especie.

Como ya se ha discutido, esto representa una aparente paradoja, debido a la distribución geográfica de los lagos La Cuenca Oriental y a la presencia de aves acuáticas que podrían servir como vectores de dispersión para los rotíferos, sería de esperarse que a nivel poblacional las subpoblaciones que habitan en diferentes lagos de la cuenca mantengan un flujo génico importante a través del intercambio de colonizadores. Sin embargo, las evidencias mostradas hasta ahora indican la presencia de poblaciones estructuradas, lo cual solo puede ser explicado si el flujo génico es débil entre las poblaciones. En este sentido, en la actualidad el uso de marcadores moleculares altamente polimórficos ha marcado la pauta para incrementar la capacidad de resolución en los análisis de genética de poblaciones y con ello la capacidad para inferir patrones en metapoblaciones como las que conforman la diversidad biológica en los lagos de la Cuenca Oriental.

Con la finalidad de llevar a cabo análisis a nivel poblacional infiriendo el flujo génico entre poblaciones vecinas y poner a prueba la hipótesis: "Dadas las restricciones en el flujo génico predichas por la hipótesis de la monopolización para las poblaciones de rotíferos en sistemas acuáticos vecinos y dada la disimilitud ambiental de los lagos, la diversidad regional de los rotíferos de la Cuenca Oriental presenta un patrón de estructura de poblaciones y

composiciones comunitarias locales propias para cada sistema ajustándose al modelo metacomunitario de Ordenamiento de Especies”.

Recientemente, gracias a la nueva generación de tecnologías de secuenciación en paralelo de ADN, se han desarrollado metodologías conocidas de manera genérica como *RAD Sequencing*, basadas en la preparación y secuenciación de bibliotecas genómicas para la secuenciación de una representación reducida del genoma de los organismos. Dichas metodologías se basan en la fragmentación del material genómico de los organismos mediante el uso de enzimas de restricción y la ligación de adaptadores para la secuenciación, optimizando así el uso de los secuenciadores para explorar una gran cantidad (miles) de regiones dentro del genoma (lecturas de ~100 pb) en busca de SNP's con una profundidad de lectura confiable (Emerson *et al.*, 2010). Esto es de gran utilidad para analizar las relaciones filogenéticas recientes en organismos “no modelo” para los cuales no se dispone de mucha información genómica y no hay desarrollados marcadores moleculares con altas tasas de mutación como los microsatélites. Entre los trabajos pioneros que utilizaron esta aproximación se destacan los del mosquito *Wyeomyia smithii* (Emerson *et al.*, 2010) y el pez *Gasterosteus aculeatus* (Hohenlohe *et al.*, 2010), los cuales utilizaron la técnica de *RAD Tags* (Baird *et al.*, 2008) como marcador molecular para develar la estructura poblacional en estas especies.

Actualmente, de entre las técnicas de *RAD Sequencing*, la metodología conocida como *Genotyping By Sequencing* o GBS ofrece una mayor eficiencia que los *RAD Tags* para la detección de sitios polimórficos, la cual utiliza la plataforma Illumina® para la secuenciación en paralelo de bibliotecas generadas a partir de una representación reducida del genoma producida mediante el uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación del ADN, con lo cual se reduce la secuenciación de regiones repetidas (Elshire *et al.*, 2011). En vista de que hasta la fecha no existen marcadores moleculares con altas tasa de mutación reportados para la especie *B. sp.* ‘México’, y con el propósito de obtener una buena cantidad de sitios polimórficos dentro de las secuencias de DNA de este rotífero y utilizarlas como marcadores moleculares altamente polimórficos que permitirán inferir procesos evolutivamente recientes, se utilizó la

metodología de GBS como una alternativa que ofrece una resolución adecuada para llevar a cabo los análisis a nivel poblacional y cumplir así con el objetivo de determinar la estructura genética de las poblaciones de una especie seleccionada a través del análisis de SNP's e inferir así el grado de flujo genético entre las poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de DNA

Cada uno de los individuos de *B. sp.* 'México' utilizados para el análisis por GBS fueron cultivados en cepas monoclonales establecidas a partir de huevos de resistencia sustraídos de los sedimentos de las zonas profundas de los lagos, con la finalidad de obtener suficiente material genético. Para esto, los huevos de resistencia fueron aislados individualmente a partir de los sedimentos mediante la técnica de flotación en sacarosa (Gómez *et al.*, 2000), disolviendo 10 g de sedimento en una solución de sacarosa al 60% en tubos de centrifuga de 50 mL que fueron centrifugadas a 700 rpm durante 5 min, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se filtró por un tamiz de 20 μm . Los huevos de resistencia identificados como pertenecientes al rotífero *B. sp.* 'México' (véase Capítulo 3) fueron aislados individualmente en pocillos de un aplaca de cultivo de polipropileno con medio preparado a 6.5 gL^{-1} de salinidad y revisados periódicamente hasta su eclosión. Una vez que eclosionaron los rotíferos, estos fueron alimentados con el alga *Teraselmis suecica* y conforme las poblaciones fueron creciendo de manera asexual (véase Capítulo 4), cada cultivo monoclonal fue transferido a recipientes de mayor capacidad, hasta llevarlos a matraces de 1 L, en donde se alcanzaron altos tamaños poblacionales para cada genotipo (~20,000 individuos clonales). De esta manera, se aseguró la obtención de la cantidad de ADN requerida para el análisis de GBS y que cada uno de los individuos analizados es el producto de un evento de reproducción sexual dentro del ciclo de vida de partenogénesis cíclica de este rotífero y que por lo tanto las muestras de cada lago utilizadas para el análisis están integradas por individuos reales y no de genetes producto de la reproducción asexual, lo cual podría sesgar los resultados del análisis poblacional.

Una vez que los matraces de cultivo alcanzaron densidades altas de rotíferos, el medio de cultivo con algas fue filtrado y reemplazado por medio limpio, donde los animales permanecieron en inanición y oscuridad (para evitar la fotosíntesis de las algas que hubieran quedado después de filtrar) durante 24 h con la finalidad de que digirieran el poco alimento restante y limitar así la contaminación de las muestras con el ADN de las algas. Posteriormente, el contenido de estos matraces fue filtrado a través de un tamiz con una apertura de poro de 60 μm con la finalidad de eliminar el medio de cultivo y recuperar únicamente a los rotíferos, enjuagarlos y finalmente fueron colocados en tubos de microcentrífuga y posteriormente centrifugados a 10,000 rpm, todo esto con la finalidad de formar una pastilla y eliminar el medio sobrenadante con una pipeta Pasteur. A partir de estas muestras, se llevó a cabo la extracción de DNA genómico de cepas monoclonales de las tres poblaciones analizadas mediante el uso del kit de extracción *DNAeasy blood and tissue* de Quiagen®, siguiendo el protocolo estándar y posteriormente incubando las muestras durante 30 min a 37° C con 5 μl de *RNAasa A* a 2mg/ml con la finalidad de degradar el RNA restante.

Muestras de 5 μl del ADN extraído fueron teñidas con el marcador intercalante GelRed® y sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los geles fueron digitalizados en un fotodocumentador y analizados mediante el uso del software *Image Lab* de Biorad® (Figura 21). A partir de las imágenes de los geles se evaluó el estado de degradación del ADN y las concentraciones del mismo fueron cuantificadas fluorométricamente mediante el uso de un analizador Qubit® *Thermo Fisher Scientific*.

Las muestras que cumplieron con los estándares de calidad (concentración y estado de degradación de ADN) requerida para los análisis fueron colocadas en una placa multipocillo para ADN y enviadas al Departamento de Diversidad Genómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Cornell, EU, para los análisis posteriores de secuenciación.

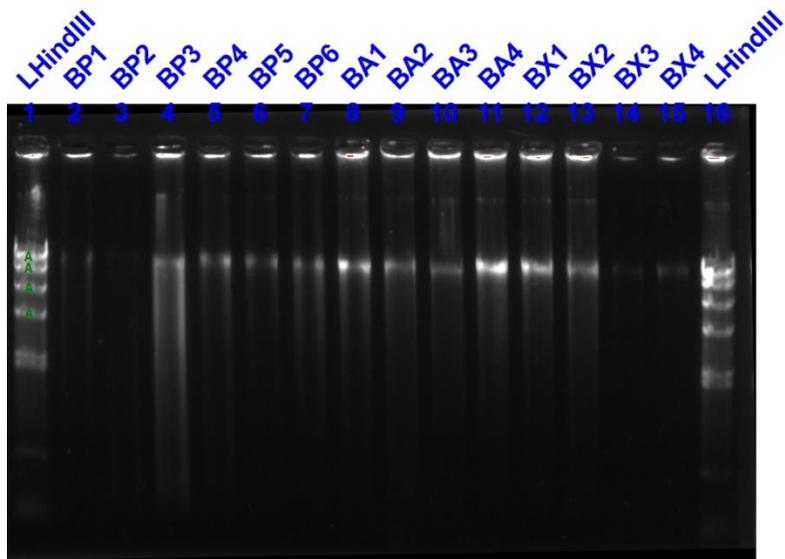


Figura 21. Gel de electroforesis con las muestras de ADN genómico para los análisis de GBS; en el primer y último carril, marcador de peso molecular λ HindIII; BP, La Preciosa; BA, Alchihica; BX, Atexcac.

Preparación y secuenciación de bibliotecas para GBS

Con la finalidad de determinar la enzima de restricción adecuada para el análisis, se llevó a cabo una prueba de digestión con algunas de las enzimas y se evaluó la calidad de la digestión mediante un análisis de electroforesis en un instrumento Bioanalyzer 2100®, determinando así que ApeKI es la enzima más adecuada para la construcción de las bibliotecas genómicas debido a la distribución de tamaños de los fragmentos (<500 pb) después de la digestión (Figura 22).

Posteriormente, cada muestra de ADN fue digerida con 3.6 U de la enzima de restricción ApeKI (New England Biolabs) durante 2 h a 75° C en un volumen de 20 μ l con el Buffer 3 de NEB en concentración de 1 \times . Los adaptadores P1, el cual incluyó un etiqueta (*barcode*) para identificar a cada individuo, y P2 fueron ligados a los *sticky ends* en el ADN, producto de la digestión con la enzima de restricción, agregando 30 μ L de una solución de buffer 1.66 \times para ligasa y 640 unidades cohesivas de ligasa T4 (New England Biolabs) en cada pocillo. Las muestras fueron incubadas a 22° C por 1 h y posteriormente calentadas a 65° C por 30 minutos para inactivar la enzima. Las muestras previamente marcadas mediante la incorporación de los adaptadores P1 con el correspondiente *barcode* para cada individuo fueron combinadas (5 μ L cada una) y purificadas usando el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen®) siguiendo el protocolo estandar y

llevando a cabo una elución para un volumen final de 50 μL . Los fragmentos producidos por la reacción de restricción fueron amplificados en un volumen de 50 μL , con 2 μL de los fragmentos combinados, 1x Taq Master Mix y 25 pM (10^{-12} molar) de los siguientes primers:

(A) 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

(B) 5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT

Los cuales contienen las secuencias complementarias para la amplificación de los fragmentos de restricción con los adaptadores ligados. Posteriormente, estos productos de PCR fueron incorporados a un línea de una celda de flujo de la plataforma Illumina en donde se llevó a cabo la reacción de secuenciación en un secuenciador HiSeq 2000 de Illumina.

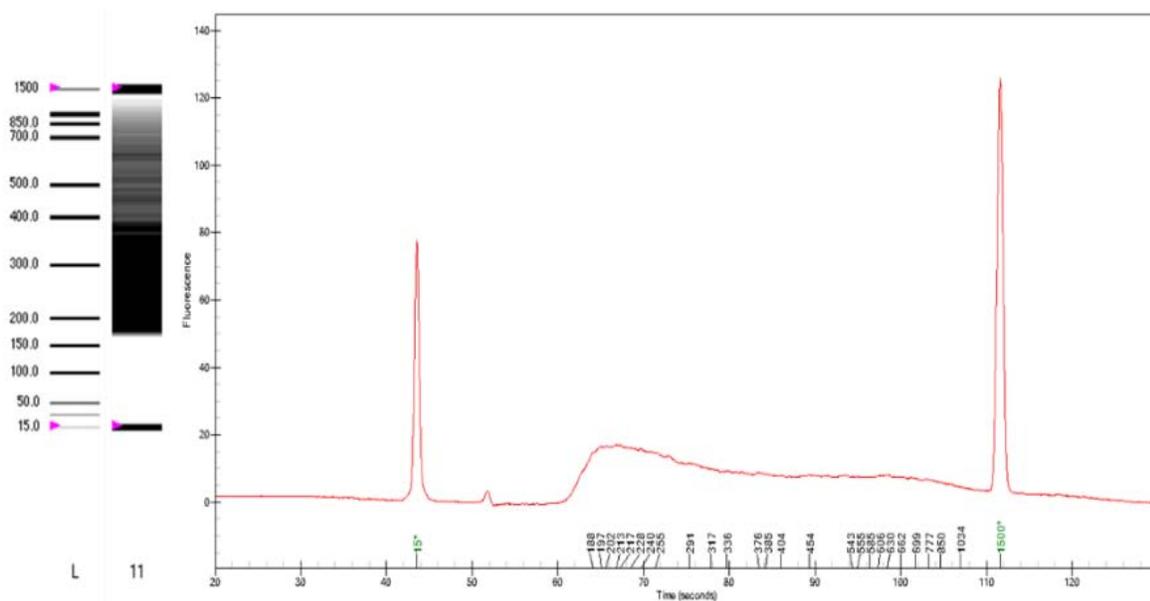


Figura 22. Electroforesis capilar de una digestión del genoma del rotífero *B. sp.* 'México' con la enzima de restricción ApeKI. Los picos indican referencias de 1,500 y 15 pb.

Llamado de polimorfismos de nucleótido único (SNPs)

Las secuencias fueron analizadas mediante el uso del *software* Tassel V4 para el análisis de GBS (Glaubitz *et al.*, 2014). Los datos crudos fueron preprocesados recortando las lecturas originales a una longitud de 64 pb y las lecturas idénticas fueron agrupadas en *tags* que posteriormente fueron alineados entre sí para la búsqueda de SNPs y ordenados por individuo en función de los *barcodes* utilizados en la preparación de las bibliotecas de secuenciación. Las lecturas generadas a partir de los sitios de restricción fueron alineadas sobre un *draft* del genoma del rotífero *B. sp. 'México'* (Alcántara-Rodríguez y Ciro-Pérez; datos no publicados) utilizando los parámetros predefinidos en el *software* (Tabla 12).

Tabla 10. Parámetros definidos para el *software Tassel* en el llamado de SNPs a partir de las secuencias de GBS en el genoma del rotífero *B. sp. 'México'*

Parámetro	Valor
Máximo número de lecturas esperadas por archivo de secuencias	(300,000,000)
Enzima de restricción	(ApeKI)
Número mínimo de <i>tags</i>	(10)
Número máximo de <i>tags</i> fusionados	(200,000,000)
Tolerancia de error	(0.02)
Mínima/máxima frecuencia de alelos menores	(MAF, 0.02 y 0.5)

Una vez que fue identificado el conjunto de genotipos bialélicos para los polimorfismos de nucleótido único dentro de las secuencias, estos fueron filtrados eliminando los *loci* en donde una proporción mayor al 10% de los individuos analizados presentara una ambigüedad de los 4 nucleótidos (“N”), pero tomando en cuenta a los *loci* heterocigotos (H_0) representados con las ambigüedades K, M, R, Y, S, W, siempre y cuando $H_0 > 0.15$; $H_0 < 0.85$. También fueron eliminados del análisis los *loci* en los que el SNP estuviera presente únicamente en uno de los

individuos. Por lo tanto, el conjunto final de *loci* analizados estuvo integrado (en un formato HapMap) únicamente por posiciones polimórficas sin ambigüedades y validadas en al menos dos individuos distintos (*Locus* 4; Tabla 13). De esta manera se descartaron, en la medida de lo posible, los errores derivados del proceso de secuenciación.

Tabla 11. Ejemplo de la estructura del formato HapMap para el llamado de SNPs, dentro de este conjunto de datos el único locus utilizado sería el 4, ya que el 1 presenta una sola “C”, el 2 supera el umbral de 10% para las “N” y en el 3 hay un solo individuo que presenta el alelo “T”

	<i>Locus</i> 1	<i>Locus</i> 2	<i>Locus</i> 3	<i>Locus</i> 4
Individuo 1	A/A	A/A	A/A	A/A
Individuo 2	T/T	A/A	A/A	A/A
Individuo 3	C/A	N	A/A	T/T
Individuo 4	A/A	T/T	T/T	T/A

Análisis de estructura poblacional

El conjunto de genotipos filtrados almacenados en el archivo HapMap fue transformado en un archivo con formato nexus con la finalidad de llevar a cabo los análisis de genética de poblaciones. A partir de los datos transformados, se llevó a cabo un análisis molecular de varianza (AMOVA) y se calcularon los valores de F_{ST} utilizando el *software Arlequin* (Excoffier & Lischer, 2010). Mediante el uso del *software STRUCTURE* (Pritchard *et al.*, 2000), se llevó a cabo un análisis bayesiano de agrupamiento, en el cual se asignaron los diferentes individuos a K subgrupos (100,000 iteraciones) en función de frecuencias alélicas distintivas, en donde el número óptimo de poblaciones (K) fue estimado llevando a cabo una serie de corridas ($N = 3$) estableciendo valores de K en un rango de 1 – 5 y, mediante el método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005) eligiendo para los análisis posteriores, el valor más bajo de K a partir del punto en donde se estabiliza la probabilidad $Ln(X/K)$ del modelo (Porrás-Hurtado *et al.*, 2013), utilizando para esto la plataforma en línea *Structure Harvester* (Earl, 2012). Además, se realizó una

reconstrucción filogenética mediante métodos bayesianos utilizando el software *BEAST* v 2.4.4 (Bouckaert *et al.*, 2014), utilizando la interface *BEAUti* para ordenar los datos y parámetros del análisis (*Length of chain* = 2,000,000) y el paquete *SNAPP* (*SNP and AFLP Package for Phylogenetic analysis*; Bryant *et al.*, 2012). Los árboles producidos fueron visualizados utilizando el software *DensiTree* y resumidos en un árbol consenso mediante la utilización del software *TreeAnnotator* y *FigTree*.

RESULTADOS

Se obtuvieron las secuencias crudas de las bibliotecas genómicas para GBS en un carril de secuenciación Illumina, registrando un total de 217,630,140 lecturas, de las cuales 26,881,551 corresponden a 17 individuos pertenecientes a las tres poblaciones de *B. sp.* ‘México’ que habitan en la Cuenca Oriental y cumplieron con los requisitos de calidad para ser tomadas en cuenta para el análisis. A partir de estas lecturas se generó una tabla de HapMap con 870 sitios polimórficos y una vez aplicados los criterios de filtración se obtuvieron un total de 296 *loci* para analizar. El individuo BA1 originario del lago Alchichica fue eliminado del análisis debido a la baja calidad presentada en el llamado de SNPs

Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

Los 296 *loci* polimórficos de los 17 individuos fueron analizados mediante un análisis molecular de varianza (AMOVA), el cual indica que el 71.56 % de la variación genética registrada se encuentra asociada a procesos ocurridos dentro de las localidades, mientras que el 28.44 % de esta variación puede ser explicado en función de la fragmentación alopátrica de las poblaciones, con un valor de F_{ST} global = 0.28; $Nm \approx 0.64$ (Tabla 14).

Tabla 12. AMOVA (296 SNPs) de las poblaciones de Alchichica, Atexcac y La Preciosa de *B. sp.* ‘México’. $Nm \approx \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$; *sensu* Wright (1969).

Variación	G.L.	Σ de cuadrados	%
-----------	------	-----------------------	---

Entre poblaciones	2	411.55	28.44
Dentro de poblaciones	29	1162.06	71.56
Total	31	1573.61	100
F_{ST}	0.284	$Nm \approx 0.64$	

Por otra parte, los valores pareados de F_{ST} ($P < 0.001$; 1023 permutaciones) estimados entre las tres poblaciones (Tabla 13) indican un bajo grado de flujo génico entre las tres poblaciones, siendo las poblaciones de Atexcac y La Preciosa las que presentan un menor grado de diferenciación genética, con un número de migrantes por generación $N_m \approx 1.138$, mientras que la población originaria del lago Alchichica muestra una diferenciación genética más intensa con respecto a las otras dos poblaciones, con valores de N_m equivalentes a un flujo génico menor a un migrante por generación ($N_m \leq 0.642$).

Tabla 13. Valores de F_{ST} (semi-matriz inferior) y N_m (semi-matriz superior; Wright, 1969) pareados entre las tres poblaciones de *B. sp.* 'México'

	Alchichica	Atexcac	Preciosa
Alchichica		0.464	0.642
Atexcac	0.359		1.138
Preciosa	0.282	0.189	

Análisis bayesianos de agrupamiento

Las pruebas de asignación de individuos a diferentes grupos (K) llevadas a cabo con el *software* STRUCTURE y analizadas mediante la plataforma *Structure Harvester* (Earl, 2012) indican que el número de grupos independientes (K) con mayor soporte de probabilidad posterior $\ln(X/K)$ (Pritchard *et al.* 2000; Evanno *et al.*, 2005) para el conjunto de datos analizados es de 3 poblaciones, al ser el valor más bajo para K a partir del cual se estabiliza la función (Porras-Hurtado *et al.*, 2013; Figura 23).

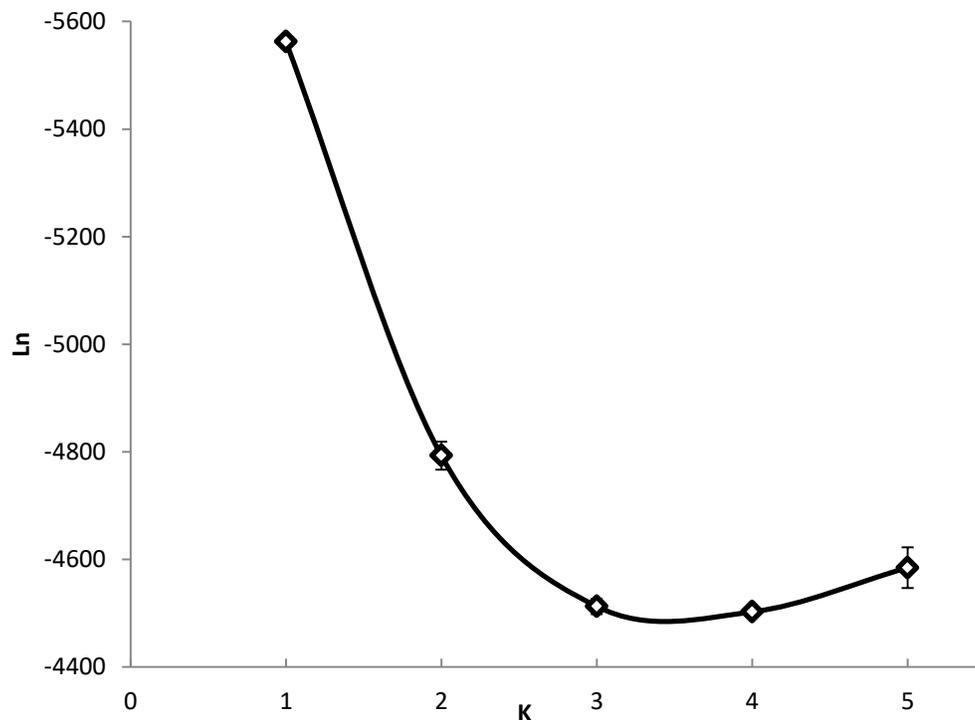


Figura 23. Probabilidad posterior $\ln(X/K)$ de asignación de individuos para diferentes valores de K en un rango de 1 – 5 grupos (poblaciones). Las barras de error indican la desviación estándar ($N = 3$).

Cada uno de los grupos inferidos ($K = 3$) contienen únicamente a individuos originarios de cada uno de los tres hábitat analizados, y en todos los casos la probabilidad de pertenencia de los individuos a los grupos a los que fueron asignados por el análisis es mayor al 97.5%, lo cual indica una fuerte relación de ancestría común entre los individuos de cada grupo.

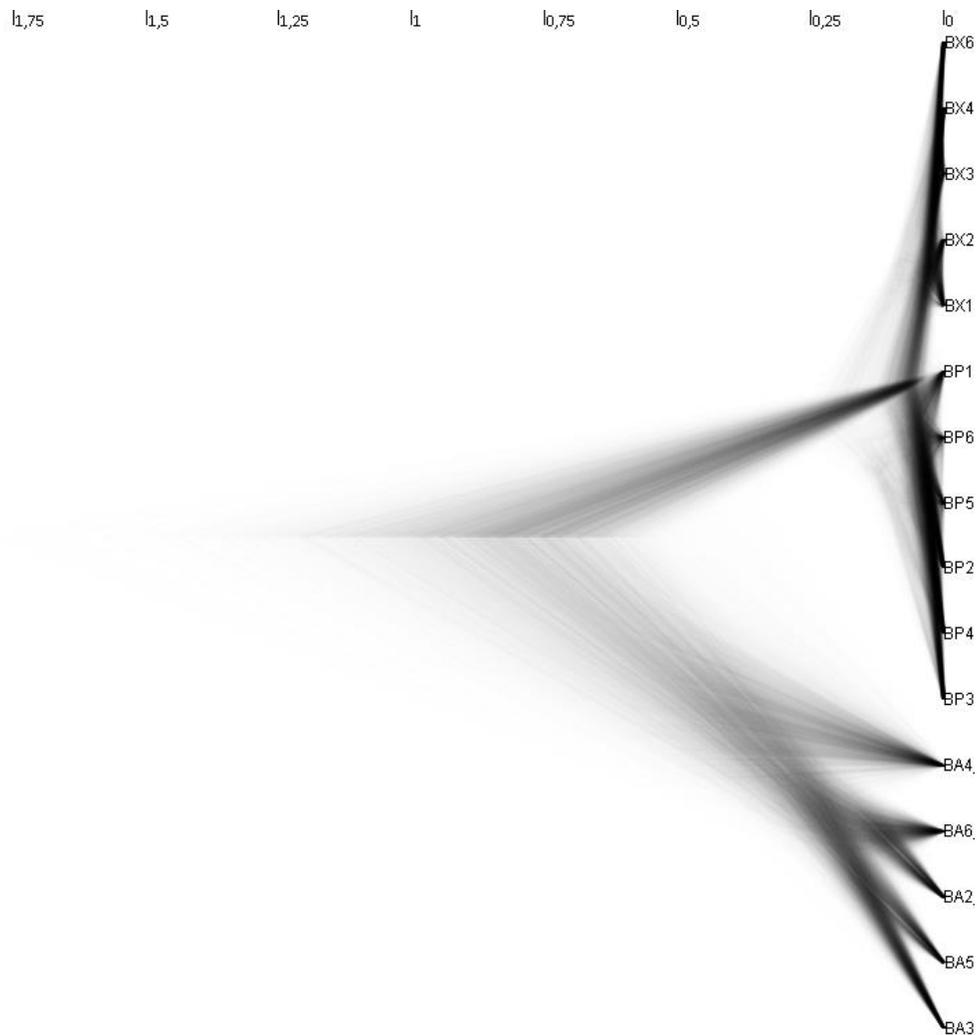


Figura 24. Condensado de 8,999 árboles con 1,555 topologías (software DensiTree) generadas a partir de probabilidades las posteriores (MCMC = 2,000,000) en función de los genotipos de *B. sp.* 'México' de la Cuenca Oriental.

Por otra parte, las reconstrucciones bayesianas de las relaciones filogenéticas entre los individuos (Figuras 24 y 25a) revelan la existencia de tres clados, los cuales agrupan cada uno a individuos originarios de cada una de las poblaciones analizadas. La topología de estos tres clados, a su vez coincide con el análisis bayesiano de asignación de genotipos para $K = 3$ (25b). Cabe destacar también, que ninguna de las topologías con las mayores probabilidades presenta

ramas cruzadas entre el clado integrado por los individuos del lago Alchichica y el que agrupa a los individuos de los lagos La Preciosa y Atexcac (Figura 24).

Figura 25. Análisis de inferencia bayesiana -indica lo que se analiza el test; p.e. relaciones filogenéticas y estructura (o diferenciación) poblacional - de los genotipos de *B. sp. 'México'* de la Cuenca Oriental. a) Reconstrucción filogenética de mayor credibilidad a partir de probabilidades posteriores, los valores sobre las ramas representan la probabilidad posterior (MCMC = 2,000,000); b) probabilidad de pertenencia de los individuos a los diferentes grupos $K = 2$ y 3 (STRUCTURE; Burn in = 100,000; réplicas = 10,000), donde las etiquetas (BX = Atexcac; BP = La Preciosa; BA = Alchichica) corresponden verticalmente con los individuos (cada una de las barras) de las ramas terminales de la reconstrucción filogenética.

DISCUSIÓN

En este capítulo se analizó la diversidad genética de sitios polimórficos de nucleotido único de la especie *B. sp. 'México'*, utilizada aquí como modelo para inferir de manera indirecta la intensidad de la migración como fuerza evolutiva sobre la estructura genética en este tipo de metapoblaciones. Debido a la hipotética alta vagilidad de los rotíferos, una metapoblación integrada es un conjunto de poblaciones locales que habitan en una región hidrológica relativamente pequeña como la especie *B. sp. 'México'* que habita en la Cuenca Oriental, debería de sostener un flujo génico relativamente intenso debido al constante intercambio de individuos entre los diferentes parches de hábitat que ocupa.

En este contexto, la única aproximación metodológicamente viable para inferir la intensidad de los procesos de dispersión y colonización entre poblaciones vecinas, es la utilización de marcadores genéticos. Sin embargo, entre más reciente sea la fragmentación alopátrica de los linajes a analizar, es necesario contar con marcadores altamente polimórficos en los que los eventos de mutación ocurridos *in situ* a partir de la fragmentación alopátrica puedan dar cuenta de la historia evolutiva reciente de los linajes. Por ejemplo, en el Capítulo 5 de este estudio se presentan los resultados del análisis de diversidad genética a partir de las secuencias del gen COI para dos de las especies de rotíferos presentes en la Cuenca Oriental, sin embargo, aunque

estas secuencias resultaron de gran utilidad en la detección de linajes separados a nivel de especies en el caso de *H. jenkinsae*, lo cierto es que a nivel intraespecífico no brindan información suficiente para inferir los procesos más recientes de diversificación a nivel poblacional en las dos especies analizadas.

En el presente capítulo, a partir del análisis de 296 SNPs en la especie *B. sp.* 'México' se ha detectado una fuerte asociación entre las relaciones filogenéticas de los genotipos y su sitio de origen. Las pruebas de asignación de individuos a los diferentes grupos (poblaciones nominales) indican que cuando el número de grupos independientes $K = 2$ para los SNPs analizados, los individuos originarios de los lagos La Preciosa y Atexcac integran un solo grupo, mientras que los originarios de Alchichica se agrupan por separado. Así mismo, las inferencias filogenéticas indican un origen monofilético relativamente reciente para las poblaciones de La Preciosa y Atexcac, las cuales a su vez comparten un ancestro común con la población de Alchichica (Figura 24 y Figura 25a).

Por otra parte, cuando las pruebas de asignación de genotipos asumen un número de grupos independientes de $K = 3$, el cual es el valor más probable para los datos analizados (Figura 25b), se hace evidente que, además de la notable segregación de los individuos de Alchichica, la diferenciación entre los individuos originarios los lagos La Preciosa y Atexcac, en donde la probabilidad de pertenencia para cada uno de los individuos a su grupo asignado es mayor al 97%. Esto concuerda con los diversos estudios en los que se ha medido la subdivisión poblacional en este tipo de organismos y se ha observado que, en general, el flujo génico entre poblaciones vecinas es limitado (De Meester *et al.*, 2002).

Cabe destacar que el grado de diferenciación entre los individuos de La Preciosa y Atexcac es menos intenso que la relación que guardan estas dos poblaciones con la de Alchichica (Tabla 13). De tal manera que, asumiendo de manera estricta el modelo de islas de Wright, y dado el valor de F_{ST} pareado entre estas dos poblaciones, se esperaría un flujo génico con un valor de N_m equivalente a 1.138 migrantes por generación, lo cual bien podría significar que ambas poblaciones se mantienen actualmente vinculadas debido al flujo génico (Wright, 1951).

Sin embargo, en el entorno geográfico regional, los valores de F_{ST} entre estas poblaciones no parecen ajustarse a un modelo de aislamiento por distancia, ya que mientras el valor de F_{ST} = 0.189 entre las poblaciones de La Preciosa y Atexcac, que se encuentran a una distancia de 8 km, este valor es de 0.282 entre las poblaciones de La Preciosa y Alchichica, que se encuentran a una distancia = 4 km. Además, en términos del potencial de colonización se ha demostrado que aunque los individuos originarios del lago La Preciosa tienen el potencial para colonizar ambientes con aguas más salinas como el lago Atexcac (6.5 gL^{-1}), para los individuos de Atexcac, la baja salinidad (1.1 gL^{-1}) del lago La Preciosa (cuya población está localmente adaptada a la salinidad) representa una barrera ecofisiológica (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), lo cual teóricamente restringiría el flujo de migrantes efectivos a una sola dirección (La Preciosa -> Atexcac). Igualmente es importante considerar que la posibilidad de que exista flujo génico entre las poblaciones de La Preciosa y Atexcac, inferido a partir del valor de N_m (estimado a partir de F_{ST} bajo el modelo de islas de Wright, 1951), asume que las poblaciones son de tamaño infinito, que por definición no es posible cumplir, por lo cual en la actualidad se sugiere utilizar otro tipo de estimaciones basadas en modelos probabilísticos o coalescentes (Neigel, 2002). De esta manera, el grado de diferenciación genética relativamente bajo, inferido a partir de los valores de F_{ST} entre las poblaciones de La Preciosa y Atexcac, no necesariamente reflejan un grado alto de flujo de individuos entre las poblaciones.

En este punto, cabe resaltar que los análisis de inferencia bayesiana indican la existencia de tres grupos bien delimitado en los cuales son asignados los individuos con base en sus genotipos (Figura 25b), y en el caso de la inferencia filogenética (Figura 25a) se puede observar que el evento de cladogénesis entre las poblaciones de La Preciosa y Atexcac ocurrió de manera relativamente reciente en comparación con la separación de estos dos linajes hermanos con respecto al de Alchichica. De esta manera, la aparentemente débil separación entre los linajes de La Preciosa y Atexcac podría ser el resultado no del flujo génico actual, sino el producto histórico de una fragmentación alopátrica a partir de un ancestro común que colonizó estos dos lagos hace poco tiempo.

En este sentido, la subdivisión poblacional observada en esta especie puede ser explicada debido a la persistencia de eventos fundador (Boileau *et al.*, 1992), en donde uno, o unos pocos genotipos colonizaron inicialmente el lago Alchichica, posiblemente provenientes de un lago ancestral que ocupó esta región en el pasado (Pleistoceno tardío - Holoceno) y del cual actualmente quedan como remanentes los lagos playa El Carmen y Tepeyahualco. Posteriormente, a partir de estos sitios que potencialmente habitó el linaje ancestral de esta especie, hubo un evento de colonización hacia el lago Atexcac (actualmente con salinidad más cercana) y posteriormente de este lago a La Preciosa, o viceversa, pero lo cierto es que la colonización de estos dos ambientes ocurrió en tiempos relativamente recientes a partir de un ancestro común (véase discusión en Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

Así mismo, la heterogeneidad de las frecuencias alélicas a escala regional no puede ser explicada como un producto de procesos de deriva génica ocurridos *in situ* en los parches de hábitat (i.e., los lagos) ocupados por las poblaciones, ya que los tamaños de las poblaciones de estos organismos son aparentemente grandes, además de que los bancos de huevos de resistencia funcionan como repositorios de la diversidad genética (Hairston & Kearns, 2002), por lo cual los cambios fortuitos en las frecuencias alélicas a partir de que las poblaciones fundadoras serían poco probables (Lynch, 1987).

En este contexto, también se ha señalado que los procesos de selección en este tipo de organismos partenogenéticos cíclicos, asociados al efecto de prioridad podrían tener también un impacto sobre la erosión de genotipos y la estructuración genética de las poblaciones geográficamente separadas (Vanoverbeke & De Meester, 2010). Así, sería de esperarse que los procesos de selección en un sistema como la Cuenca Oriental (con condiciones ambientales heterogéneas entre los diferentes parches de hábitat) favorecieran procesos de diversificación adaptativa, fenómeno que se ha observado en la especie en cuestión, el rotífero *B. sp.* 'México', para la cual se reporta la adaptación local a la baja salinidad (1.1 gL^{-1}) de la población originaria del lago La Preciosa (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

Estas observaciones, concuerdan con la explicación que ofrece la hipótesis de la monopolización (De Meester *et al.*, 2002), la cual postula que el efecto fundador puede ser preservado a lo largo

del tiempo en los organismos partenogenéticos cíclicos como los rotíferos monogonontes, debido a que las poblaciones fundadoras pueden crecer rápidamente de manera asexual y posteriormente generar bancos de huevos de resistencia que actúan como reservorio del acervo genético de tal forma que los linajes colonizadores prevalecen y dominan en la población, además de que la aparición de adaptaciones locales como en el caso de lo reportado para *B. sp. 'México'* (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). De tal suerte que las variantes “foráneas” o invasoras que se dispersen entre los hábitats en un sistema de distribución insular como la Cuenca Oriental, estarán en desventaja ante las poblaciones “locales”. Bajo este esquema, los resultados obtenidos a partir de los análisis bayesianos de los SNPs son congruentes con un modelo en el que el flujo de migrantes es muy restringido entre los diferentes lagos de la cuenca en los que habita este rotífero, dando lugar a linajes independientes en los que las dinámicas locales son los principales componentes de la diversificación del grupo a escala regional. Esta fragmentación alopátrica de la diversidad genética observada en las poblaciones *B. sp 'México'* tiene importantes implicaciones sobre las dinámicas ecológicas y evolutivas a nivel regional, ya que el flujo génico resultado de la migración es un elemento de cohesión entre las poblaciones que integran a una metapoblación (Gilpin, 1991).

DISCUSIÓN GENERAL SOBRE LA DINÁMICA DE LA METACOMUNIDAD

La vida puede ser definida como el conjunto de propiedades y procesos termodinámicos e informáticos de sistemas complejos autoorganizados y autoreplicantes que mantienen una entropía menor a la que existe en sus alrededores. En este sentido, los procesos evolutivos ocupan un papel central en el entendimiento de cómo estos sistemas pueden mantener (al menos temporalmente) un estado de entropía menor al de sus alrededores. Desde su origen, los linajes de seres vivos se han adaptado a las condiciones cambiantes del ambiente y a los diferentes nichos que ocupan, estos procesos evolutivos son inherentes al hecho de que la reproducción de los seres vivos como entidades autoreplicantes está basada en la replicación de moléculas portadoras de información (ADN o ARN), y a que dicha replicación no está libre de errores, dando como resultado individuos con sutiles diferencias en cuanto a su interacción con

el ambiente, y a su vez, dichas diferencias son “filtradas” por la selección natural o por procesos de deriva génica que conducen a la aparición de nuevas formas de vida.

Bajo estos principios, la heterogeneidad ambiental en los sistemas insulares juega un papel central en los procesos de diversificación biológica de los linajes, en donde: 1) la fragmentación alopatrica implica por sí misma un elemento diversificador al limitar el intercambio de información entre los linajes, y 2) las presiones selectivas son particulares para cada linaje en función de los factores locales de cada isla. En este sentido, la capacidad de los organismos para dispersarse entre los hábitats que integran un determinado sistema insular tendrá repercusiones sobre el destino evolutivo de los linajes en cuestión, en donde una alta capacidad de dispersión tendría como consecuencia una tendencia hacia la homogenización de la diversidad biológica a nivel regional, mientras que una capacidad restringida para cruzar las barreras geográficas representaría una distribución desigual de las variantes entre los diferentes hábitats.

Partiendo de esta propuesta, tanto el aislamiento geográfico como la heterogeneidad ambiental a escala regional, representan factores promotores de la diversidad para la vida, y salvo algunas excepciones de especies microendémicas, como el pez *Cyprinodon diabolis* (Williams, 1977) o el copépodo *Leptodiptomus garciai* (Montiel-Martínez *et al.*, 2008), en la mayoría de los casos las especies se componen de diversas poblaciones que se distribuyen en parches más o menos heterogéneos en los que quedan aisladas en mayor o menor grado (Begon *et al.*, 2006). En este sentido, el grado de aislamiento reproductivo entre los linajes juega un papel fundamental en las dinámicas de diversificación biológica, determinando las dinámicas de flujo génico a nivel regional, dando como resultado sistemas complejos conocidos como metapoblaciones.

Las metapoblaciones pueden ser definidas como una “población de poblaciones” que se encuentran vinculadas mediante el intercambio de individuos, y donde la ocupación de los parches de hábitat está determinada mediante dinámicas de colonización y extinción (Hansky & Gilpin, 1997). Sin embargo, las repercusiones de la distribución espacial de las poblaciones no solo se limitan a la presencia o ausencia de las especies en los diferentes elementos de un sistema insular a lo largo del tiempo. Además, en este tipo de sistemas, la distribución espacial

de poblaciones débilmente vinculadas por la migración, y donde los factores locales son determinantes para los cambios en las frecuencias alélicas de las poblaciones, juega un papel clave para las dinámicas evolutivas de los complejos de las variables genéticas en el contexto de los paisajes adaptativos (Wright, 1978).

De manera análoga, en el siguiente nivel de complejidad biológica se encuentran las metacomunidades, las cuales pueden ser definidas como “un conjunto de metapoblaciones de diferentes especies”, en donde las comunidades locales están cohesionadas por la dispersión de especies que pueden interactuar (Gilpin & Hansky, 1991). Bajo este marco teórico se proponen cuatro paradigmas de metacomunidad (véase, Capítulo 1), de los cuales se destacan por su relevancia para los propósitos de la investigación de esta tesis dos modelos: 1) el modelo neutral, el cual representa una hipótesis nula, al suponer que la diversidad regional está compuesta por especies ecológicamente similares y con la misma capacidad de dispersión, dando como resultado una distribución homogénea de la diversidad biológica en la escala regional. Y 2) el modelo de ordenamiento de especies, en donde las tasas de dispersión de las especies resultan insuficientes para alterar la distribución de la diversidad, dando como resultado una distribución heterogénea de la diversidad biológica en la escala regional (Leibold *et al.*, 2004).

Bajo estas definiciones, las dinámicas metacomunitarias tienen su origen tanto en la heterogeneidad ambiental entre los sistemas geográficos que ocupan, así como en el grado de dispersión de las especies que las componen. Así, con la finalidad de abordar la naturaleza de las dinámicas metacomunitarias de los rotíferos en la Cuenca Oriental, en la presente investigación se puso a prueba la hipótesis:

“A pesar de la alta capacidad de dispersión del zooplancton, dadas las restricciones predichas por la hipótesis de la monopolización para la entrada de nuevos genotipos a sistemas previamente colonizados, así como a la disimilitud ambiental entre los lagos (principalmente en salinidad) que puede representar un conjunto de presiones selectivas divergentes, la diversidad de rotíferos (genética y de especies) se encuentra distribuida de manera heterogénea en la Cuenca Oriental. A partir de este escenario se origina un patrón de estructuración de

poblaciones y comunidades con poca interacción entre ellas, dando lugar a selección de genotipos, adaptación a las condiciones ambientales locales, persistencia de eventos fundadores y efectos de prioridad, que promueven la existencia de poblaciones estructuradas y composiciones comunitarias locales disímiles, de tal manera que, la diversidad de rotíferos en la Cuenca Oriental se ajusta al modelo de ordenamiento de especies (Leibold et al., 2004)."

Así, se utilizaron diversas aproximaciones con la finalidad de analizar los procesos de diversificación biológica regional y local de los rotíferos de la Cuenca Oriental e inferir así la intensidad de los procesos de migración entre lagos y dilucidar dinámicas ecológicas y evolutivas de sus poblaciones y comunidades.

En este contexto, se analizó la distribución de la diversidad regional de especies de rotíferos en los lagos de la cuenca y se reconoció que las diferencias en salinidad entre los lagos es un factor determinante para la diversidad de las comunidades locales en cuanto a riqueza de especies, además de que dicha riqueza de especies se encuentra distribuida de manera heterogénea en los diferentes lagos que la componen, dando como resultado comunidades locales muy disímiles entre sí (Capítulo 2). Estos resultados concuerdan con el modelo de ordenamiento de especies, en donde la dispersión resulta insuficiente para alterar la distribución de las especies a nivel regional.

Así, teniendo en cuenta que la Cuenca Oriental ocupa una región geográfica relativamente pequeña, las restricciones geográficas para la dispersión en el entorno regional no ofrecen una explicación para la heterogeneidad observada en la distribución de la diversidad de especies, de tal manera que los factores locales juegan un papel clave en la estructuración de las comunidades. Por esto, con la finalidad de inferir el potencial de colonización de las diferentes especies de rotíferos, en el Capítulo 3 se analizó mediante experimentos de jardín común la relevancia de la salinidad para la estructuración de las comunidades locales, ya que actúa como un filtro ambiental que puede impedir la colonización de taxones específicos incapaces de tolerar las condiciones de salinidad de un determinado ambiente, lo cual puede explicar en buena medida la distribución heterogénea de la diversidad de especies regional. En este mismo contexto, en el Capítulo 4 se discute cómo la heterogeneidad ambiental en salinidad entre los

diferentes lagos en los que habita la especie *B. sp.* 'México' ha desempeñado un papel fundamental en la diversificación de esta especie en la Cuenca Oriental, dando lugar a un proceso de adaptación local a baja salinidad en los rotíferos de esta especie que habitan en el lago La Preciosa, además de revelar la existencia de una especie aún no descrita formalmente, denominada temporalmente como *B. sp.* 'México', y que se ubica taxonómicamente dentro del complejo de especies crípticas *B. grupo plicatilis* (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Mills *et al.*, 2017).

Así, siguiendo esta estrategia de investigación, se pone de manifiesto el hecho de que este sistema insular no solamente resulta interesante desde el punto de vista de la actual diversidad de especies (α y β) que habitan la cuenca, sino que, a escala regional es un sistema proclive a que ocurran procesos de diversificación biológica. Sin embargo, en este punto cabe destacar que uno de los problemas al momento de reconocer la diversidad de especies en este tipo de organismos es la ubicuidad del fenómeno de especiación críptica entre los invertebrados acuáticos, esto debido a que los sistemas de reconocimiento de parejas están asociados con señales químicas y no con caracteres morfológicos sujetos a selección sexual (Knowlton, 1993). En este sentido, entre los rotíferos existen numerosos ejemplos de diversificación críptica en diferentes grupos (Walsh *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2017) en los que resulta virtualmente imposible distinguir a las especies mediante la observación de caracteres morfológicos. Debido a esto, en el Capítulo 5 se abordó la diversidad críptica de especies mediante el análisis de secuencias del gen COI como marcador molecular. Este marcador revela la existencia de dos especies morfológicamente idénticas entre sí afines a la morfología de la especie *H. jenkiniae*, pero que bien podrían formar parte de un complejo más amplio de especies crípticas similar al que se ha descrito en diversos taxones de rotíferos como en *B. grupo plicatilis*, *B. calyciflorus* (Xiang *et al.*, 2011; Papakostas *et al.*, 2016) o *Keratella cochlearis* (Cieplinski *et al.*, 2017). Tomando este caso como ejemplo, la diversidad de especies de rotíferos reportada para la Cuenca Oriental (Capítulo 1), al igual que la del mundo, podrían estar siendo subestimadas, debido a que en la mayoría de los casos se utilizan únicamente caracteres morfológicos para la delimitación de las especies. Por esto, sería necesario llevar a cabo un análisis detallado que abarque a más especímenes de las diferentes morfoespecies registradas

en la cuenca, esto con la finalidad de delimitar mediante la aproximación de taxonomía integrativa la posible existencia de especies crípticas para comprender mejor la diversidad de rotíferos que habita la región.

Finalmente, en el Capítulo 6 se determinó la estructura genética de las poblaciones de *B. sp.* 'México', esto con la finalidad de inferir el grado de flujo génico actual entre las poblaciones de este rotífero. En este sentido, los resultados indican una distribución heterogénea de la diversidad genética, lo cual sugiere que las interacciones (por medio de la dispersión de genotipos) entre las poblaciones de la Cuenca Oriental del rotífero *B. sp.* 'México' son débiles en la escala metapoblacional. Esta escasa interacción entre las poblaciones vecinas del rotífero *B. sp.* 'México', revelada mediante el uso de marcadores moleculares altamente polimórficos, tiene una gran relevancia evolutiva para los procesos de diversificación biológica regional, ya que cada población está siendo afectada por las presiones selectivas locales propias de cada hábitat, entre las que se destaca la salinidad del agua (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Si bien no podemos descartar la relevancia de otros factores ecológicos para los procesos de estructuración de la comunidad en la Cuenca Oriental, como el efecto de prioridad (Symons & Arnott, 2014), limitación de la dispersión regional o las interacciones bióticas locales (Shurin, 2000; Jones, 2012), los resultados indican a la salinidad como el factor local que más probablemente determina la diversidad del zooplancton en la cuenca, ya que como se discute en el Capítulo 3, representa un primer filtro para la entrada de nuevas especies a los lagos impidiendo la colonización de algunos taxones, además de que actúa como una fuerza selectiva promotora de la diversificación biológica (Capítulo 4). Por lo tanto, en este sistema de islas, la salinidad por sí misma representa un factor que juega un papel clave en los procesos de ensamblaje de las comunidades locales y la distribución regional de la diversidad, así como en la modificación de las frecuencias alélicas que dan lugar a los procesos de diversificación adaptativa (véase también, Campillo *et al.*, 2011; Declerk y Papakostas, 2017).

Desde esta misma perspectiva, la Cuenca Oriental ha sido utilizada como modelo para estudiar los procesos de diversificación adaptativa en las poblaciones de copépodos calanoideos de la especie *L. cf. sicilis*. En estos copépodos, al igual que lo que sucede con las poblaciones de

rotíferos, las poblaciones presentan un bajo grado de flujo génico, dando como resultado un patrón de fragmentación alopátrica y donde, para los fenotipos especializados, la salinidad representa una barrera reproductiva precigótica debido al bajo desempeño biológico de los inmigrantes adaptados localmente a la salinidad de sus propios lagos (Barrera-Moreno *et al.*, 2015). Así mismo, en análisis realizados con individuos producto de cruces interpoblacionales obtenidas en condiciones de laboratorio (en una salinidad intermedia) se observó que los individuos de la F2 se veían significativamente disminuidos en términos de eficiencia para pasar entre los diferentes estadios hasta llegar a adultos, y en algunos de los cruces no se observaron individuos que llegaran a adultos, dando lugar a un evento de especiación promovido por la salinidad como factor ecológico (Barrera-Sánchez, 2016). Así, la diversidad de organismos zooplanctónicos que habitan en la Cuenca Oriental representa un excelente modelo de estudio para entender los procesos que conducen a la diversificación biológica en ambientes contrastantes. Tanto la distribución heterogénea de la diversidad de zooplancton a escala regional, las evidencias moleculares de aislamiento geográfico los rasgos ecofisiológicos de adaptación a las condiciones locales e incluso la incompatibilidad reproductiva, ponen de manifiesto la importancia de estudiar la diversidad (genética, poblacional, a nivel específico, comunitaria y de funcionamiento de los ecosistemas) así como los procesos que determinan esta diversificación biológica de organismos como los rotíferos, y zooplancton en general, en la Cuenca Oriental entendiéndolo como un sistema de islas en el que las condiciones ambientales heterogeneas producen una dinámica de metacomunidad que se ajusta al modelo de ordenamiento de especies (*sensu* Leibold *et al.*, 2004).

Así, los lagos de la Cuenca Oriental integran un ecosistema de gran relevancia como promotor de la diversidad biológica y como modelo de estudio de procesos ecológicos y evolutivos en una escala regional. Sin embargo, en la actualidad la Cuenca Oriental enfrenta una seria problemática ambiental derivada de la actividad agroalimentaria y la deforestación, y donde se prevén consecuencias negativas como la salinización de los lagos (Alcocer *et al.*, 2004) y con base en los resultados mostrados en el Capítulo 2, una disminución en la diversidad de especies en los lagos. De esta manera, la implementación de programas de aprovechamiento sustentable

de los recursos naturales en la región de la Cuenca Oriental es fundamental para la preservación de este ecosistema de gran relevancia para la biodiversidad.

LITERATURA CITADA

- Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Serranía-Soto, C. R., & Piedra-Ibarra, E. (2012). Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central México. *Freshwater Biology*, 57(4), 728–740.
- Alcocer, J., Escolero, F. Ó. A., & Marín, L. E. (2004). Problemática del agua de la Cuenca Oriental, estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. *El Agua el Mexico vista desde la academia. Academia Mexicana de Ciencias, Mexico*, 57-77.
- Alcocer, J. & Lugo, A. (2003). Effects of El Niño on the dynamics of Lake Alchichica, central Mexico. *GEOFISICA INTERNACIONAL-MEXICO-*, 42(3), 523–528.
- Alcocer, J., & Hammer, U. T. (1998). Saline lake ecosystems of Mexico. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 1(3–4), 291 – 315.
- Alcocer, J., Chiappa-Carrara, X., Arce, E., & Zambrano, L. (2009). Threatened fishes of the world: *Poblana alchichica* (de Buen, 1945) (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Environmental biology of fishes*, 85(4), 317-318.
- Alcocer, J., del Carmen Hernández, M., Oseguera, L. A., & Escobar, E. (2014). On the ecology of *Cletocamptus gomezi* Suárez-Morales, Barrera-Moreno & Ciro-Pérez 2013 (Crustacea, Copepoda, Harpacticoida) micro-endemic to Lake Alchichica, Central Mexico. *Journal of Limnology*, 73 (AoP).
- Alcocer, J., Lugo, A., Escobar, E., Sánchez, M. del R., & Vilaclara, G. (2001). Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Internationale Vereinigung Fur Theoretische Und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 27(5), 3166–3169.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., ... Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2), 249–258.

- Bailey, S. A., Duggan, I. C., Jenkins, P. T., & MacIsaac, H. J. (2005). Invertebrate resting stages in residual ballast sediment of transoceanic ships. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(5), 1090–1103.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, *et al.* (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One* 3: e3376
- Barrera-Moreno, O. A., Ciroso-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Alcántara-Rodríguez, J. A., & Piedra-Ibarra, E. (2015). From local adaptation to ecological speciation in copepod populations from neighboring lakes. *PloS one*, 10(4), e0125524.
- Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2009). *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. Wiley.
- Bielańska-Grajner, I., & Cudak, A. (2014). Effects of salinity on species diversity of rotifers in anthropogenic water bodies. *Pol J Environ Stud*, 23(1), 21–28.
- Bilton, David T., Joanna R. Freeland, and Beth Okamura. "Dispersal in freshwater invertebrates." *Annual review of ecology and systematics* (2001): 159-181.
- Boeuf, G., & Payan, P. (2001). How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 411-423.
- Bohonak, A. J., & Jenkins, D. G. (2003). Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecology letters*, 6(8), 783-796.
- Boileau, M. G., Hebert, P. D., & Schwartz, S. S. (1992). Non-equilibrium gene frequency divergence: persistent founder effects in natural populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 5(1), 25–39.
- Bonte, D., Van Dyck, H., Bullock, J. M., Coulon, A., Delgado, M., Gibbs, M., ... others. (2012). Costs of dispersal. *Biological Reviews*, 87(2), 290–312.

- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C-H., Xie, D., Suchard, MA., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537
- Brock, M., Nielsen, D. L., Shiel, R. J., Green, J. D., & Langley, J. D. (2003). Drought and aquatic community resilience: the role of eggs and seeds in sediments of temporary wetlands. *Freshwater Biology*, 48(7), 1207–1218.
- Brooks, J. L., & Dodson, S. I. (1965). Predation, body size, and composition of plankton. *Science*, 150(3692), 28–35.
- Bryant, D., Bouckaert, R., Felsenstein, J., Rosenberg, N. A., & RoyChoudhury, A. (2012). Inferring species trees directly from biallelic genetic markers: bypassing gene trees in a full coalescent analysis. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1917-1932.
- Caballero, M., Vilaclara, G., Rodríguez, A., & Juárez, D. (2003). Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional-Mexico*, 42(3), 529-538.
- Cáceres, C. E. (1997). Dormancy in invertebrates. *Invertebrate Biology*, 371–383.
- Cáceres, C. E., & Hairston, N. (1998). Benthic-pelagic coupling in planktonic crustaceans: the role of the benthos (with 4 figures). *Ergebnisse Der Limnologie*, 52, 163–174.
- Cáceres, C. E., & Soluk, D. A. (2002). Blowing in the wind: a field test of overland dispersal and colonization by aquatic invertebrates. *Oecologia*, 131(3), 402–408.
- Campillo, S., García-Roger, E. M., Carmona, M. J., Gómez, A., & Serra, M. (2009). Selection on life - history traits and genetic population divergence in rotifers. *Journal of evolutionary biology*, 22(12), 2542-2553.
- Campillo, S., García - Roger, E. M., Carmona, M. J., Gómez, A., & Serra, M. (2009). Selection on life - history traits and genetic population divergence in rotifers. *Journal of evolutionary biology*, 22(12), 2542-2553.

- Carmona, M. J., DIMAS-FLORES, N., GARCÍA-ROGER, E. M., & Serra, M. (2009). Selection of low investment in sex in a cyclically parthenogenetic rotifer. *Journal of evolutionary biology*, 22(10), 1975-1983.
- Carmona, M. J., Serra, M., & Miracle, M. R. (1993). Relationships between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. In *Rotifer Symposium VI* (pp. 145–152). Springer.
- Carrasco-Núñez, G., Ort, M. H., & Romero, C. (2007). Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 159(1), 179–197.
- Carvalho, G. R., & Hughes, R. N. (1983). The effect of food availability, female culture-density and photoperiod on ephippia production in *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera). *Freshwater Biology*, 13(1), 37–46.
- Cerny, M., & Hebert, P. (1993). Genetic diversity and breeding system variation in *Daphnia pulicaria* from North American lakes. *Heredity*, 71, 497–507.
- Charin, N. N. (1947) O novom vide kolovratki is roda *Brachionus*. *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 56: 107-108
- Cieplinski, A., Weisse, T., & Obertegger, U. (2017). High diversity in *Keratella cochlearis* (Rotifera, Monogononta): morphological and genetic evidence. *Hydrobiologia*, 796(1), 145-159.
- Ciros-Pérez, J., Carmona, M. J., Lapesa, S., & Serra, M. (2004). Predation as a factor mediating resource competition among rotifer sibling species. *Limnology and Oceanography*, 49(1), 40-50.
- Dahms, H.-U. (1995). Dormancy in the Copepoda—an overview. *Hydrobiologia*, 306(3), 199–211.
- Darwin, C. (1859). *On the origins of species by means of natural selection*. London: Murray.

- Declerck, S., Cousyn, C., De Meester, L., 2001. Evidence for local adaptation in neighbouring *Daphnia* populations: a laboratory transplant experiment. *Freshwat. Biol.* 46, 187–198.
- De Meester, L. (1996). Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: patterns and processes. *Ecoscience. Sainte-Foy*, 3(4), 385–399.
- De Meester, L., Gómez, A., Okamura, B., & Schwenk, K. (2002). The Monopolization Hypothesis and the dispersal–gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, 23(3), 121–135.
- DeMott, W. R. (1989). The role of competition in zooplankton succession. In *Plankton Ecology* (pp. 195–252). Springer.
- Dodson, S. I., Arnott, S. E., & Cottingham, K. L. (2000). The relationship in lake communities between primary productivity and species richness. *Ecology*, 81(10), 2662–2679.
- Duggan, I. C., Robinson, K. V., Burns, C. W., Banks, J. C., & Hogg, I. D. (2012). Identifying invertebrate invasions using morphological and molecular analyses: North American *Daphnia “pulex”* in New Zealand fresh waters. *Aquatic Invasions*.
- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359–361.
- Ejsmont-Karabin, J. (1995). Rotifer occurrence in relation to age, depth and trophic state of quarry lakes. *Hydrobiologia*, 313(1), 21–28.
- Elgmork, K. are. (1981). Extraordinary prolongation of the life cycle in a freshwater planktonic copepod. *Ecography*, 4(4), 278–290.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS one*, 6(5), e19379.

- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Figuerola, J., & Green, A. J. (2002). Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology*, 47(3), 483–494.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3, 294–299.
- Fontaneto, D., Giordani, I., Melone, G., & Serra, M. (2007). Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*, 583(1), 297-307.
- Fryer, G. (1996). Diapause, a potent force in the evolution of freshwater crustaceans. *Hydrobiologia*, 320(1-3), 1–14.
- Gabaldón, C., Fontaneto, D., Carmona, M. J., Montero-Pau, J., & Serra, M. (2016). Ecological differentiation in cryptic rotifer species: what we can learn from the *Brachionus plicatilis* complex. *Hydrobiologia*, 1-12.
- Gabaldón, C., Fontaneto, D., Carmona, M. J., Montero-Pau, J., & Serra, M. (2017). Ecological differentiation in cryptic rotifer species: what we can learn from the *Brachionus plicatilis* complex. *Hydrobiologia*, 796(1), 7–18. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2723-9>
- García-Roger, E. M., Carmona, M. J., & Serra, M. (2006). Patterns in rotifer diapausing egg banks: density and viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336(2), 198–210.
- Gilbert, J. (1980). Some effects of diet on the biology of the rotifers *Asplanchna* and *Brachionus*. *Nutrition in the Lower Metazoa*. Perg. Per., Oxford, 57–71.

- Gilbert, J. J., & Schreiber, D. K. (1998). Asexual diapause induced by food limitation in the rotifer *Synchaeta pectinata*. *Ecology*, 79(4), 1371–1381.
- Gilpin, M. (1991). *Metapopulation dynamics: empirical and theoretical investigations*. Academic Press.
- Glaubitz JC, Casstevens TM, Lu F, Harriman J, Elshire RJ, *et al.* (2014) TASSEL-GBS: A High Capacity Genotyping by Sequencing Analysis Pipeline. *PLoS ONE* 9(2): e90346.
- Gomez, A., Carvalho, G. R., & Lunt, D. H. (2000). Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankton: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1458), 2189–2197.
- Gómez, A., Serra, M., Carvalho, G. R., & Lunt, D. H. (2002). Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, 56(7), 1431-1444
- Green, J. (1992). Island biogeography, diversity and dominance of zooplankton in crater lakes on the Azores. *Biological Journal of the Linnean Society*, 46(1-2), 189–205.
- Gyllström, M., & Hansson, L. A. (2004). Dormancy in freshwater zooplankton: induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66(3), 274–295.
- Hagiwara, A., Lee, C. S., Miyamoto, G., & Hino, A. (1989). Resting egg formation and hatching of the S-type rotifer *Brachionus plicatilis* at varying salinities. *Marine Biology*, 103(3), 327–332.
- Hairston Jr, N. G., & Cáceres, C. E. (1996). Distribution of crustacean diapause: micro and macroevolutionary pattern and process. *Hydrobiologia*, 320(1-3), 27–44.
- Hairston, N. (1996). Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography*, 41, 1087–1092.

- Hairston, N. G., & Kearns, C. M. (2002). Temporal dispersal: ecological and evolutionary aspects of zooplankton egg banks and the role of sediment mixing. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 481-491.
- Hall, C. J., & Burns, C. W. (2002). Mortality and growth responses of *Daphnia carinata* to increases in temperature and salinity. *Freshwater Biology*, 47(3), 451-458.
- Hammer, U. T. (1986). *Saline lake ecosystems of the world* (Vol. 59). Springer Science & Business Media.
- Hanski, I., & Gilpin, M. (1991). Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biological journal of the Linnean Society*, 42(1-2), 3-16.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985). Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22 (2): 160–174.
- Havel, J. E., & Shurin, J. B. (2004). Mechanisms, effects, and scales of dispersal in freshwater zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 49(4part2), 1229-1238.
- Havel, J. E., Colbourne, J. K., & Hebert, P. D. (2000). Reconstructing the history of intercontinental dispersal in *Daphnia lumholtzi* by use of genetic markers. *Limnology and Oceanography*, 45(6), 1414–1419.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Heino, J., Melo, A., Siqueira, T., Soininen, J., Valanko, S., & Bini, L. (2015). Metacommunity organisation, spatial extent and dispersal in aquatic systems: patterns, processes and prospects. *Freshwater Biology*, 60(5), 845–869.
- Hernández Lozano, J. (2016). Esclareciendo la estasis morfológica de especies crípticas: análisis morfométrico de las poblaciones de los rotíferos *Brachionus* grupo *plicatilis* de los lagos de la Cuenca Oriental, México (Tesis de licenciatura en biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México

- Hobaek, A., & Larsson, P. (1990). Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology*, 2255–2268.
- Hwang, D. S., Dahms, H. U., Park, H. G., & Lee, J. S. (2013). A new intertidal *Brachionus* and intrageneric phylogenetic relationships among *Brachionus* as revealed by allometry and CO1-ITS1 gene analysis. *Zoological Studies*, 52(1), 1.
- Jenkins, D. G. (1995). Dispersal-limited zooplankton distribution and community composition in new ponds. *Hydrobiologia*, 313(1), 15–20.
- Jenkins, D. G., & Underwood, M. O. (1998). Zooplankton may not disperse readily in wind, rain, or waterfowl. In *Rotifera VIII: A Comparative Approach* (pp. 15–21). Springer.
- Knowlton, N. (1993). Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 189–216.
- Korovchinsky, N., & Boikova, O. (1996). The resting eggs of the Ctenopoda (Crustacea: Branchiopoda): a review. *Hydrobiologia*, 320(1-3), 131–140.
- Lee, C. E., Kiergaard, M., Gelembiuk, G. W., Eads, B. D., & Posavi, M. (2011). Pumping ions: Rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution*, 65(8), 2229–2244.
- Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J., Hoopes, M., ... others. (2004). The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*, 7(7), 601–613.
- Logue, J. B., Mouquet, N., Peter, H., & Hillebrand, H. (2011). Empirical approaches to metacommunities: a review and comparison with theory. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(9), 482–491.
- Lowe, C. D., Kemp, S. J., Bates, A. D., & Montagnes, D. J. S. (2005). Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Marine Biology*, 146(5), 923–929.

- Lowe, C., Kemp, S., Diaz-Avalos, C., & Montagnes, D. (2007). How does salinity tolerance influence the distributions of *Brachionus plicatilis* sibling species? *Marine Biology*, 150(3), 377–386.
- Lubzens, E., Minkoff, G., & Marom, S. (1985). Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Marine Biology*, 85(2), 123–126.
- MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1967). *The theory of island biogeography* (Vol. 1). Princeton University Press.
- Mayr, E., & others. (1963). *Animal species and evolution*. *Animal Species and Their Evolution*.
- McAleece, N., Gage, J., Lamshead, P., & Paterson, G. (1997). BioDiversity Professional statistics analysis software. Jointly developed by the Scottish Association for Marine Science and the Natural History Museum London.
- Mergeay, J., Verschuren, D., & De Meester, L. (2005). Cryptic invasion and dispersal of an *American Daphnia* in East Africa. *Limnology and Oceanography*, 50(4), 1278–1283.
- Michaloudi, E. S. Mills, S. Papakostas, C.-P. Stelzer, A. Triantafyllidis, I. Kappas, K. Vasileiadou, K. Proios, & T. J. Abatzopoulos. 2017. Morphological and taxonomic demarcation of *Brachionus asplanchnoidis* Charin within the *Brachionus plicatilis* cryptic species complex (Rotifera, Monogononta). *Hydrobiologia* (2017) 796:19–37.
- Miller, R. R. (1943). *Cyprinodon salinus*, a new species of fish from Death Valley, California. *Copeia*, 69–78.
- Mills, S., J. A. Alcántara-Rodríguez, J. Ciros-Pérez, A. Gómez, A. Hagiwara, K. Hinson Galindo, C. D. Jersabek, R. Malekzadeh-Viayeh, F. Leasi, J.-S. Lee, D. B. Mark Welch, S. Papakostas, S. Riss, H. Segers, M. Serra, R. Shiel, R. Smolak, T. W. Snell, C.-P. Stelzer, C. Q. Tang, R. L. Wallace, D. Fontaneto and E. J. Walsh. 2017. Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia* 796:39–58.

- Mills, S., Gómez, A., Lunt, D. (2007) Global isolation by distance despite strong regional phylogeography in a small metazoan. *Evolutionary Biology*, 7:225
- Montero-Pau, J., & Gómez, A. (2011). Development of genomic resources for the phylogenetic analysis of the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia*, 662(1), 43-50.
- Montiel-Martínez, A., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., & Elías-Gutiérrez, M. (2008). Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiptomus garciai* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species. *Journal of Plankton Research*, 30(10), 1079-1093.
- Morrone, J. J. (2009). *Evolutionary biogeography: An integrative approach with case studies*. Columbia University Press.
- Mullineaux, L. S., & France, S. C. (2013). Dispersal Mechanisms of Deep-Sea Hydrothermal Vent Fauna. In *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions* (pp. 408–424). American Geophysical Union.
- Næss, T., & Nilssen, J. P. (1991). Diapausing fertilized adults. *Oecologia*, 86(3), 368-371.
- Neigel, J. E. (2002). Is F_{ST} obsolete? *Conservation Genetics*, 3(2), 167-173.
- Nielsen, D. L., & Brock, M. A. (2009). Modified water regime and salinity as a consequence of climate change: prospects for wetlands of Southern Australia. *Climatic Change*, 95(3-4), 523–533.
- Nielsen, D. L., Smith, D., & Petrie, R. (2012). Resting egg banks can facilitate recovery of zooplankton communities after extended exposure to saline conditions. *Freshwater Biology*, 57(6), 1306–1314.
- Nogrady, T., & Segers, H. (2002). Rotifera 6. The Asplanchnidae, Gastropodidae, Lindiidae, Microcodinidae, Synchaetidae, Trochosphaeridae. *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*, 18, 1-264.

- Nogrady, T., Pourriot, R., & Segers, H. (1995). Rotifera 3. Notommatidae and Scardiidae. Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World 8. (H. Dumont, T. Nogrady, eds). SPB Academic Publishing BV, 248 p.
- Obertegger, U., Flaim, G., & Fontaneto, D. (2014). Cryptic diversity within the rotifer *Polyarthra dolichoptera* along an altitudinal gradient. *Freshwater Biology*, 59(11), 2413–2427.
- Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer, J., & Cantoral-Uriza, E. A. (2006). *Cyclotella alchichicana* sp. nov. from a saline Mexican lake. *Diatom Research*, 21(1), 81-89.
- Ort, M. H., & Carrasco-Núñez, G. (2009). Lateral vent migration during phreatomagmatic and magmatic eruptions at Tecuitlapa Maar, east-central Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 181(1), 67–77.
- Papakostas S, Michaloudi E, Proios K, et al. 2016. Integrative taxonomy recognizes evolutionary units despite widespread mitonuclear discordance: evidence from a rotifer cryptic species complex. *Systematic Biology* 65(3):508-24.
- Pasternak, A. F., & Arashkevich, E. G. (1999). Resting stages in the life cycle of *Eudiaptomus graciloides* (Lill.) (Copepoda: Calanoida) in Lake Glubokoe. *Journal of Plankton Research*, 21(2), 309–325.
- Pfenninger, M., & Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 121
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A., & Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67(1), 170-181.
- Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, Á., & Lareu, M. V. (2013). An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4, 98. <http://doi.org/10.3389/fgene.2013.00098>
- Pourriot, R., & Rougier, C. (1979). Influences conjuguées du groupement et de la qualité de la nourriture sur la reproduction de *Brachionus plicatilis* OF Müller (Rotifère). *Netherlads Journal of Zoology*, 29(2), 242–264.

- Pourriot, R., & Snell, T. W. (1983). Resting eggs in rotifers. *Hydrobiologia*, 104(1), 213–224.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Proctor, V. W., & Malone, C. R. (1965). Further evidence of the passive dispersal of small aquatic organisms via the intestinal tract of birds. *Ecology*, 46(5), 728–729.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology*, 21(8), 1864-1877.
- Ramírez-García, P., & Vázquez-Gutiérrez, F. (1989). Contribuciones al estudio limnobotánico de la zona litoral de seis lagos cráter del estado de Puebla. *Anal Inst Cienc Mar Limnol*, 1, 1-22.
- Ricci, C. (2001). Dormancy patterns in rotifers. In *Rotifera IX* (pp. 1–11). Springer.
- Ruttner-Kolisko, A. (1946). Über das Auftreten unbefruchteter "Dauereier" bei *Anuraea aculeata* (*Keratella quadrata*). *Österreichische Zoologische Zeitschrift*, 1, 425–468.
- Sanders, R. W., (2014). Zooplankton. In *AccessScience*. McGraw-Hill Education.
- Santangelo, J. M., Esteves, F. de A., Manca, M., & Bozelli, R. L. (2014). Disturbances due to increased salinity and the resilience of zooplankton communities: the potential role of the resting egg bank. *Hydrobiologia*, 722(1), 103–113.
- Sarvala, J. (1979). A parthenogenetic life cycle in a population of *Canthocamptus staphylinus* (Copepoda, Harpacticoida). *Hydrobiologia*, 62(2), 113–129.
- Schröder, T. (2005). Diapause in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*, 546(1), 291–306.
- Segers, H. (1995). *Rotifera 2. The Lecanidae (Monogononta)*. Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World 6. (HJ Dumont, T. Nogrady, eds). SPB Academic Publishing BV., 226 p.
- Slatkin, Montgomery. "Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236.4803 (1987): 787-792.

- Snell, T. W. (2014). Rotifers as models for the biology of aging. *International review of hydrobiology*, 99(1-2), 84-95.
- Snell, T. W., & Persoone, G. (1989). Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquatic toxicology*, 14(1), 65-80.
- Spitze, K. (1993). Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135(2), 367-374.
- Stelzer, C., & Snell, T. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnology and Oceanography*, 48(2), 939–943.
- Suatoni, E., Vicario, S., Rice, S., Snell, T., & Caccone, A. (2006). An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(1), 86–98.
- Tobler, M., DeWitt, T. J., Schlupp, I., García de León, F. J., Herrmann, R., Feulner, P. G., ... & Plath, M. (2008). Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecilia mexicana*. *Evolution*, 62(10), 2643-2659.
- Uye, S. (1980). Development of neritic copepods *Acartia clausi* and *A. steueri*. I. Some environmental factors affecting egg development and the nature of resting eggs. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 27, 1–9.
- Van Donk, E., & van de Bund, W. J. (2002). Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto-and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. *Aquatic Botany*, 72(3), 261–274.
- Vanschoenwinkel, B., Waterkeyn, A., Nhiwatiwa, T., Pinceel, T., Spooren, E., Geerts, A., ... Brendonck, L. (2011). Passive external transport of freshwater invertebrates by elephant and other mud-wallowing mammals in an African savannah habitat. *Freshwater Biology*, 56(8), 1606–1619.

- Vanschoenwinkel, B., Waterkeyn, A., Vandecaetsbeek, T., Pineau, O., Grillas, P., & Brendonck, L. (2008). Dispersal of freshwater invertebrates by large terrestrial mammals: a case study with wild boar (*Sus scrofa*) in Mediterranean wetlands. *Freshwater Biology*, 53(11), 2264–2273.
- Voigt, M., & Koste, W. (1978). *Rotatoria: die Rädertiere Mitteleuropas: ein Bestimmungswerk: Überordnung Monogonota*. Borntraeger.
- von Ende, C. N. (2001). *Repeated-measures analysis. Design and analysis of ecological experiments*. Oxford University Press, Oxford
- Wallace, R., & Snell, T. (2001). Phylum Rotifera. Chap. 8. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press. New York, 191–254.
- Whittaker, R. J., & Fernández-Palacios, J. M. (2007). *Island biogeography: ecology, evolution, and conservation*. Oxford University Press.
- Williams, J. (1977). Observations on the status of the Devil's Hole pupfish in the Hoover Dam Refugium. Department of the Interior, Bureau of Reclamation, Engineering and Research Center, Division of General Research, Applied Sciences Branch.
- Wilson, E. O., & Bossert, W. H. (1971). *A primer of population biology*. Sinauer Associates.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Wright, S. (1969). *Evolution and Genetics of Populations, vol.2, The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.
- XIANG, X.-L., XI, Y.-L., WEN, X.-L., Zhang, G., WANG, J.-X., & Hu, K. (2011). Genetic differentiation and phylogeographical structure of the *Brachionus calyciflorus* complex in eastern China. *Molecular Ecology*, 20(14), 3027–3044.

Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico

JOSÉ ARTURO ALCÁNTARA-RODRÍGUEZ*, JORGE CIROS-PÉREZ[†], ELIZABETH ORTEGA-MAYAGOITIA[‡], CARMEN R. SERRANIA-SOTO* AND ELÍAS PIEDRA-IBARRA[‡]

*Posgrado en Ciencias Biológicas, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México

[†]Proyecto de Investigación en Limnología Tropical, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México

[‡]Laboratorio de Fisiología Vegetal, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México

SUMMARY

1. Salinity is a strong selective force for many aquatic organisms, affecting both ecological and evolutionary processes. Most of our knowledge on the effects of salinity on rotifers in the *Brachionus plicatilis* species complex is based mainly on populations from waterbodies that experience broad environmental changes both seasonally and annually. We tested the hypothesis that, despite the supposedly high potential for gene flow among rotifers inhabiting neighbouring environments, constant salinity has promoted local adaptation, genetic population divergence and even cryptic speciation in *B. plicatilis* complex populations from three deep maar lakes of distinct salinities [1.1, 6.5 and 9.0 g L⁻¹ total dissolved solids (TDS)] in Central Mexico.

2. To look for local adaptation, we performed common garden experiments to test the effect of different salinities on population density and intrinsic growth rate (*r*). Then, we evaluated the genetic divergence by sequencing the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene and performed reproductive trials to assess the potential gene flow among the three populations and with other closely related *B. plicatilis* complex species.

3. We confirmed that the rotifer populations have phenotypic plasticity in tolerance of salinity, but only rotifers from the least saline lake are adapted to low salinity. Among the populations, sequence divergence at COI was very low (just a single haplotype was found), suggesting a persistent founder effect from a relatively recent single colonisation event and a subsequent dispersal from one lake to the others, and a very restricted immigration rate. In the phylogenetic analysis, rotifers from this area of Mexico clustered in the same clade with the middle-sized species *Brachionus ibericus* and *B. sp. 'Almenara'*. Mexican rotifers showed successful recognition, copulation and formation of hybrids among them, but interpopulation breeding with the Spanish *B. ibericus* and *B. sp. 'Almenara'* was unsuccessful.

4. We conclude that the *B. plicatilis* complex populations from these three lakes belong to a new biological species not yet described (presently named *B. sp. 'Mexico'*). To our knowledge, this is the first report of local adaptation of a natural *B. plicatilis* complex population living in freshwater conditions (1.1 g L⁻¹ TDS).

Keywords: local adaptation, phenotypic plasticity, reproductive isolation, rotifers, sibling species

Introduction

As most animal phyla originated in the sea, colonisers of inland waters face the problem of osmotic regulation.

Mortality results if external salinity exceeds physiological tolerance, precluding persistence of a population unless it can disperse or undergo diapause (Willmer, Stone & Johnston, 2005). Salinity affects growth (Miracle

Correspondence: Jorge Ciros-Pérez, Proyecto de Investigación en Limnología Tropical, UIICSE, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 314, 56090 Tlalnepantla, Edo. Mex., México. E-mail: jorge.ciros@gmail.com

& Serra, 1989; Lowe *et al.*, 2007; Montiel-Martínez *et al.*, 2008), life history (Lowe *et al.*, 2007; Campillo *et al.*, 2009), temporal and spatial distribution (Gómez, Carmona & Serra, 1997; Ortells, Gómez & Serra, 2003), and even the rate of molecular evolution (Hebert *et al.*, 2002; Derry, Hebert & Prepas, 2003 and references therein) of many aquatic organisms. Therefore, it is a powerful selective force governing both ecological and evolutionary processes.

Brachionus plicatilis (O.F. Muller, 1786) is a saline-water rotifer that has been considered to be distributed worldwide (excepting Antarctica), inhabiting marine-brackish waters, inland saline waters and soda lakes (Fontaneto, De Smet & Ricci, 2006), and having extreme phenotypic plasticity in tolerance to salinity and ionic composition: in natural environments, it occurs from 2 to 97 g L⁻¹ total dissolved solids (TDS) (Lowe *et al.*, 2005a and references herein) and has even been recorded in water up to 250 g L⁻¹ (Hammer, 1986; but see Miracle & Serra, 1989). Moreover, in laboratory conditions, it has been maintained at lower salinities (down to 10 mOsmol, corresponding to 0.35 g L⁻¹ approximately) (Epp & Winston, 1978; see the review by Miracle & Serra, 1989).

The broad tolerance of salinity by *B. plicatilis* seems to explain its frequent occurrence in small, ephemeral and highly variable habitats. However, a vast array of ecophysiological, genetic, phylogenetic, molecular and behavioural studies have shown that the taxon '*Brachionus plicatilis*', based on classical principles of morphological taxonomy, is actually a complex of at least 15 cryptic species (Suatoni *et al.*, 2006). Although some variation in body size and ecophysiological and ecological features can be recognised among species of *B. plicatilis* (Ciros-Pérez, Carmona & Serra, 2001b; Ciros-Pérez, Gómez & Serra, 2001a; Ciros-Pérez *et al.*, 2004; Kostopoulou & Vadstein, 2007; Kostopoulou, Miliou & Verriopoulous, 2009), shape and structure are quite similar, making visual identification difficult or even impossible and thus promoting multidisciplinary approaches to study this species complex.

Clearly, the salinity tolerance of species within the *B. plicatilis* complex differs greatly. Indeed, at least three sibling species belonging to this complex have been found to be truly euryhaline and tolerate wide salinity fluctuations by means of osmoregulation (Lowe, Kemp & Montagnes, 2005b; Lowe *et al.*, 2005a, 2007), an attribute that could be common in other species inhabiting ephemeral and seasonally variable habitats. However, the performance of sibling *B. plicatilis* species from permanent, deep lakes where salinity has been constant

over long periods (even ecological and evolutionary timescales) remains unknown. Certainly, phenotypic plasticity should enable *B. plicatilis* species to persist in lakes of different salinities. However, chance and priority effects (Louette & De Meester, 2007; van Cremberghe *et al.*, 2009) during colonisation, interspecific interactions and the intrinsic geographical isolation owing to the characteristic island-like distribution of lakes can lead to strong genetic differentiation among populations of cyclical parthenogens (De Meester *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2002; Haag *et al.*, 2005, 2006; Louette *et al.*, 2007), local adaptation (Campillo *et al.*, 2009), reproductive barriers and, ultimately, speciation (Thibert-Plante & Hendry, 2010).

A group of deep, permanent lakes located in Central Mexico is an ideal place for investigating these ecological and evolutionary processes within the *B. plicatilis* species complex. These are maar lakes, created by explosions caused by ground water coming into contact with hot lava or magma during the Late Pleistocene, about 40 000 years ago (Carrasco-Núñez, Ort & Romero, 2007; G. Vilaclara, pers. comm.), and are close neighbours (<5 km) but have no exchange of water (Alcocer & Hammer, 1998). Populations of *B. plicatilis* complex inhabit at least three, otherwise similar, waterbodies with different salinities, ranging from 1.1 g L⁻¹ TDS (freshwater *sensu* Williams, 1996) to 9.0 g L⁻¹ (see e.g. Alcocer *et al.*, 2000; Armienta *et al.*, 2008). Therefore, these Mexican populations live in the lowest part of the natural salinity range recorded for this rotifer taxon (Table 1).

Our hypothesis is that rotifers in the three lakes have been under the selective pressure of distinct, constant salinity conditions, isolated from each other over a period sufficiently long to allow local adaptation, genetic differentiation among populations and even cryptic speciation. To test this hypothesis, we employed a multidisciplinary approach. To look for evidence of local adaptation to salinity, we designed a common garden experiment, culturing each of the three populations at the salinity of the three lakes and comparing the density attained and intrinsic growth rate as indicators of biological performance (fitness). Subsequently, to evaluate the genetic divergence among our *B. plicatilis* complex populations, we sequenced the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) and compared the sequences with other species in the complex. Finally, following the interbreeding species concept (see the review by Lee, 2003), we carried out reproductive trials to analyse the potential gene flow among our populations and compare it with other closely related species.

Table 1 Geographical distribution and natural salinity recorded for the *Brachionus plicatilis* species used in this study to perform the phylogenetic analyses and the interbreeding assays (*B. sp.* 'Almenara' and *Brachionus ibericus*) with the Mexican *Brachionus* populations (*B. sp.* 'Mexico')

Taxa	World distribution	Salinity range (g L ⁻¹)
<i>B. plicatilis s. s.</i>	Cosmopolitan (1, 4, 6)	1.3–45.0 (2, 3)
<i>B. manjavacas</i>	Spain, Tunisia, Kazakhstan, U.S.A., Russia (4, 6, 9)	10.1–12.0 (8, 10)
<i>B. sp.</i> 'Austria'	Austria, China, U.S.A. (4, 6)	NA
<i>B. sp.</i> 'Nevada'	Japan, U.S.A. (4)	NA
<i>B. ibericus</i>	Spain, Wales (2, 3, 6, 8)	8.0–50.0 (8)
<i>B. sp.</i> 'Almenara'	Spain, U.S.A., Peru (2, 4, 5, 6)	1.1–10.0 (2, 5)
<i>B. sp.</i> 'Mexico'	Mexico (this study)	1.1–9
<i>B. rotundiformis</i>	Spain, Italy, Malaysia (2, 3, 4)	10–57 (8)
<i>B. sp.</i> 'Cayman'	Turkey, U.S.A., Grand Cayman Island (4,6)	15–28 (7)*

References are indicated in parentheses: 1: Mills, Gómez & Lunt, 2007; 2: Ortells *et al.*, 2003; 3: Ciroso-Pérez, 2001; 4: Suatoni *et al.*, 2006; 5: Romero-Guardamino, 2008; 6: Gómez *et al.*, 2002; 7: Snell & Serra, 1998; 8: Ciroso-Pérez *et al.*, 2001a; 9: Gómez *et al.*, 2007; 10: Ortells, 2002; NA, not available information.

*Salinity of West Shore Pond, U.S.A., where Snell & Serra (1998) studied the population dynamics of *Brachionus rotundiformis*, which later was recognized as *B. sp.* 'Cayman' by Suatoni *et al.* (2006).

Methods

Study site

The study lakes are located in the Cuenca Oriental basin, in the eastern part of the Trans-Mexican Volcanic Belt, Central Mexico, at c. 2340 m above sea level. La Preciosa, Atexcac and Alchichica are maar lakes; all of them are endorheic, deep (Z_{\max} = 45, 39 and 62 m, respectively), warm monomictic (the mixing of the water column occurs in winter), alkaline (pH, 8.6–8.9) and oligotrophic. Owing to the chemical composition of rocks and soil, and the absence of groundwater exchange between the lakes (Alcocer & Hammer, 1998; Armienta *et al.*, 2008), they have distinct, constant salinities throughout the year (data shown in parentheses are the average \pm SD of 12 vertical profiles, measured every month in 2009 using a Hydrolab Datasonde 3/Surveyor-3 multiparameter water quality logging system, performed at a fixed station located at the deepest part of each lake): La Preciosa is freshwater (TDS = 1.18 ± 0.09 g L⁻¹, specific conductivity at 25 °C– K_{25} = 2217 ± 157 μ S cm⁻¹; n = 440), Atexcac is saline (TDS = 6.54 ± 0.29 g L⁻¹, K_{25} = $11\,990 \pm 807$ μ S cm⁻¹; n = 415), as well as Alchichica (TDS = 8.7 ± 0.29 g L⁻¹, K_{25} = $13\,216 \pm 531$ μ S cm⁻¹; n = 504). A detailed description of the chemical composition of water and geological and

morphological characteristics can be found elsewhere (Armienta *et al.*, 2008).

Organisms and experimental conditions

A total of nine monoclonal strains of *B. plicatilis* complex were established from resting eggs isolated from sediment samples of the three lakes (three strains per lake): Alchichica (ALC1, ALC2 and ALC3); Atexcac (ATX1, ATX2 and ATX3) and La Preciosa (LPR1, LPR2 and LPR3). Stock cultures were maintained in 20-mL test tubes at 18 ± 1 °C in a temperature-controlled chamber with dim light, at a salinity of 9.0 g L⁻¹, and fed with the microalga *Tetraselmis suecica* (Kyling) Butcher 1959 (about 10–15 mg C L⁻¹); culture medium was renewed weekly. Saline water was prepared with commercial aquarium sea salt (Seachem Reef Salt™, Seachem Laboratories, Madison, GA, U.S.A.) dissolved in autoclaved, deionised water. Algae were cultured in the same saline water and fertilised with f/2 medium (Andersen, 2005) in a semi-continuous regime at a dilution rate (D) of 0.5 day⁻¹, with constant aeration, illumination (c. 120 μ mol photons m⁻² s⁻¹) and temperature (18 ± 1 °C). Carbon content of algae cultures was calculated as described elsewhere (Ciroso-Pérez *et al.*, 2001b). Rotifers were kept in the laboratory for at least 2 months before starting the experiments.

Common garden experiments of salinity effects

We performed a common garden experiment to test for phenotypic plasticity and local adaptation to salinity, measuring population density and intrinsic growth rate of the populations from La Preciosa, Atexcac and Alchichica lakes. Moreover, we tested the three strains from each lake to evaluate the intrapopulation variability because of genetic diversity. Before starting the experiments, organisms from each strain were acclimated from the stock cultures (9.0 g L⁻¹) to decreasing concentrations of salt, transferring them every 48 h successively to 6.5, 4.0, 3.0, 2.0 and 1.1 g L⁻¹ until they reached their target concentrations (1.1, 6.5 and 9 g L⁻¹); when necessary, they were transferred into the same salinity to keep constant the number of manipulations and thus to control for any handling effects. After the acclimation period, test organisms were held at the experimental salinity for at least 1 week. Then, 20 actively swimming females of each acclimated strain were pipetted into a 50-mL glass flask containing 20 mL of medium (initial density, 1 mL⁻¹) at the corresponding salinity. Three replicate growth incubations were conducted; therefore, 27 experimental units (three strains \times three salinities \times three replicates) for each

population were set up and monitored, yielding a total of 81 flasks for the whole experiment (27 units \times three populations). During acclimation and experiments, flasks with rotifers were kept in the dark on an oscillating orbital platform shaker (c. 40 rpm) at 18 ± 1 °C with *T. suecica* (10 mg C L⁻¹) as food. Experimental flasks were examined daily under a stereomicroscope to record animal density, and then organisms were transferred to containers with fresh medium and food. During the first few days, the whole flask content was counted, but subsequently two aliquots of 1 mL were used to estimate the rotifer density. Experiments ended on the 15th day. The intrinsic growth rate (r), was calculated in each replicate from the change in total number of organisms as $r = \ln(N_t/N_0)/t$, where N_0 is the initial number of organisms at growth incubation, N_t is the number of organisms after 15 days, and t is time in days.

We analysed the population density during the last 5 days of the experiment with a nested two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). Salinity and population were considered as fixed factors and strain, nested within population, was taken as a random factor. The within-subject factor was time. Data were not spherical, so the probability values for the effect of time and its interactions were obtained by the Greenhouse–Geisser adjustment (von Ende, 1993). Growth rate (r) was analysed with a similar analysis excluding the effect of time. No data transformations were needed to comply with the test assumptions. If significant differences were found ($P < 0.05$), a *post hoc* Student–Newman–Keuls test (SNK; Sokal & Rohlf, 2001) was carried out. We used the software spss rel. 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) to perform all the statistical analyses.

Interpreting the ANOVA results, we considered that a significant effect of salinity is evidence for overall plasticity; a significant population effect is evidence for genetic variance, and a significant salinity \times population interaction is evidence of genetic differentiation among populations in plasticity (Conner & Hartl, 2004). Local adaptation can be said to occur if the salinity \times population interaction is significant and a population shows a higher density or growth rate in its local salinity than populations from the other lakes (the ‘local versus foreign’ criterion, *sensu* Kawecki & Ebert, 2004).

COI sequencing and phylogenetic analyses

DNA was extracted using standard protocols (Hajibabaei *et al.*, 2006) from several individual resting eggs isolated from sediments of the three lakes. The gene (COI) was amplified by PCR method using a mixture of 35.5 μ L of

ultrapure water, 5.0 μ L of 10 \times PCR buffer, 1.5 μ L of MgCl₂, 1.0 μ L each of LCO1490 and HCO2198 primers (Folmer *et al.*, 1994), 1.0 μ L of dNTPs, 0.3 μ L of *Taq* polymerase (1.5 U) and 5.0 μ L of DNA template. PCR products were fractionated through a 2% agarose gel and visualised by UV fluorescence. Fragments of COI (688-bp) were excised from the gel and purified using the Concert™ Rapid PCR Purification System. Sequencing was performed bidirectionally using an ABI 3100 multi-colour fluorescence-based DNA analyser, and electropherograms were analysed using Chromas[®] 2.33 software (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Australia).

Phylogenetic analyses were performed using MEGA rel. 4.0 software (Tamura *et al.*, 2007). Multiple alignments were performed using the ClustalW algorithm included in MEGA 4.0. The genetic distances were inferred using the maximum likelihood (ML) method, and guide trees were constructed based on the neighbour-joining (NJ) method. Reliability of the guide trees was assessed by bootstrap analysis (pseudoreplicates = 1000). A maximum parsimony (MP) analysis with bootstrapping of c. 1000 replicates was also performed. Sequences were compared with other *B. plicatilis* complex sequences deposited in GenBank (original GenBank accession numbers are given in Fig. 3) by Gómez, Carvalho & Lunt (2000), Gómez *et al.* (2002) and Suatoni *et al.* (2006), as well as with *Brachionus calyciflorus* as the external group (Derry *et al.*, 2003) to assess the phylogenetic relation of the populations from Cuenca Oriental to some other members of the *B. plicatilis* complex. Some details of the known world distribution and salinity ranges recorded in natural environments of the *B. plicatilis* group species used for the phylogenetic analysis (see Fig. 3) are given in Table 1.

Evaluation of potential gene flow

We carried out interpopulation reproductive trials to assess the potential gene flow among Cuenca Oriental populations and thus to define their status according to the biological species concept. Intrapopulation crosses were used as controls. The common garden experiments showed that only rotifers from La Preciosa were able to grow at the lowest salinity (see Results), so we hypothesised that this population was the most divergent and reproductively isolated from the others; therefore, it was selected to test for potential gene flow among Cuenca Oriental populations. Crosses combined La Preciosa females \times Atexcac males, and La Preciosa females \times Alchichica males.

Once we observed that the three Cuenca Oriental populations belonged to the same biological species (see

Results), we selected an Alchichica strain (ALC1) as representative of the species to perform reproductive trials with strains of *Brachionus ibericus* (Ciros-Pérez *et al.*, 2001a) (clone SM5; originally isolated from Poza Norte, Torreblanca Marsh, Spain; the type locality of this species) and *B. sp.* 'Almenara' (clone 7C29; originally isolated from Laguna de Almenara, Spain) provided by Prof. Dr. Manuel Serra (University of Valencia, Spain) that, according to our phylogenetic analysis, are closely related to the *B. plicatilis* complex from Cuenca Oriental. Neither *B. ibericus* nor *B. sp.* 'Almenara' have been found in Mexico, and the latter is the only one that has been reported in America (from U.S.A. and Peru; Suatoni *et al.*, 2006; Romero-Guardamino, 2008). The crosses with the Spanish strains were as follows: Alchichica females \times *B. ibericus* males, Alchichica females \times *B. sp.* 'Almenara' males, and *B. ibericus* females \times Alchichica males. Finally, we performed the corresponding intercrosses between *B. ibericus* \times *B. sp.* 'Almenara', given the close phylogenetic relationship that exists between them and with our populations (see Ortells *et al.*, 2003).

Behavioural bioassays followed the protocol of Gómez & Serra (1996), with minor modifications. Since common garden experiments showed that the populations from the three lakes reached the highest densities and growth rates at 6.5 g L⁻¹, the intrapopulation and interpopulation reproductive trials were carried out at this salinity. *Brachionus sp.* 'Almenara' and *B. ibericus* were maintained at a salinity of 9.0 g L⁻¹ and acclimated to 6.5 g L⁻¹ as described for the Mexican strains. Because propensity to mate decreases with age (Gómez & Serra, 1995), neonates aged 4 h or less were used in the assays. Accordingly, 4 h before beginning the crossing experiments, about 120 females bearing female-producing eggs, or 60 females bearing male-producing eggs, were randomly isolated from pre-acclimated cultures. Crosses were conducted in wells of Evergreen™ 96-well polystyrene microplates (Evergreen Sci., Los Angeles, CA, U.S.A.). To initiate a cross, 20 recently hatched females (<4 h old) were selected and transferred to a well with 50 μ L of medium; afterwards one male was introduced. The behaviour of the male was observed, under a stereomicroscope Leica MZ95 (Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Switzerland) with a cold-light source, for 10 min and the number of encounters, circlings and copulations were registered. The mated females were isolated, maintained in culture conditions and monitored during the next days to examine the type of eggs produced. Twenty replicates for each cross were performed (Gómez & Serra, 1996). Results were analysed

with a G-test (Sokal & Rohlf, 2001), comparing the percentage of circlings and copulations in the interpopulation versus intrapopulation trials.

Results

Common garden experiments

The salinity and population factors had significant effects on both population density and intrinsic growth rate of the *B. plicatilis* complex (Figs 1 & 2; Table 2). The main effect of salinity was similar in both variables, as the highest values were attained at 6.5 g L⁻¹ and the lowest at 1.1 g L⁻¹ (6.5 > 9.0 > 1.1 g L⁻¹; SNK test). In fact, the shape of the reaction norms of the three populations was

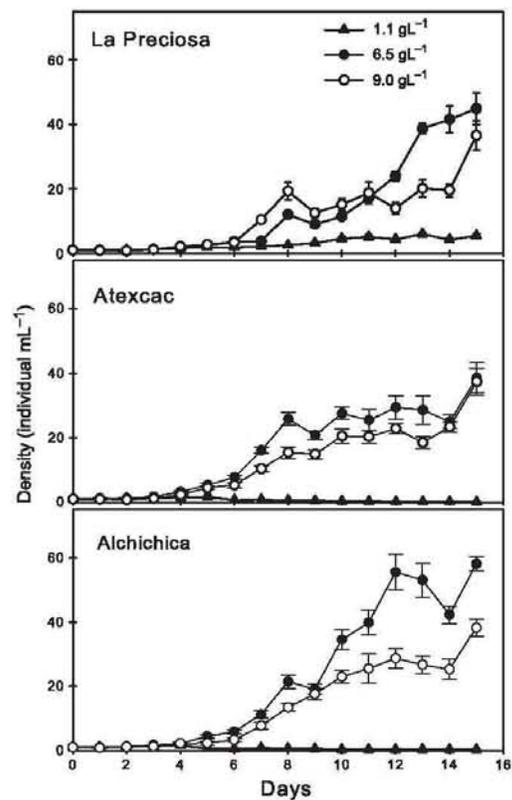


Fig. 1 Effect of salinity on the growth dynamics of three *Brachionus plicatilis* complex populations raised in common garden experiments. Lines represent mean \pm standard error per strain ($n = 3$, three strains per population). Different symbols represent different salinities.

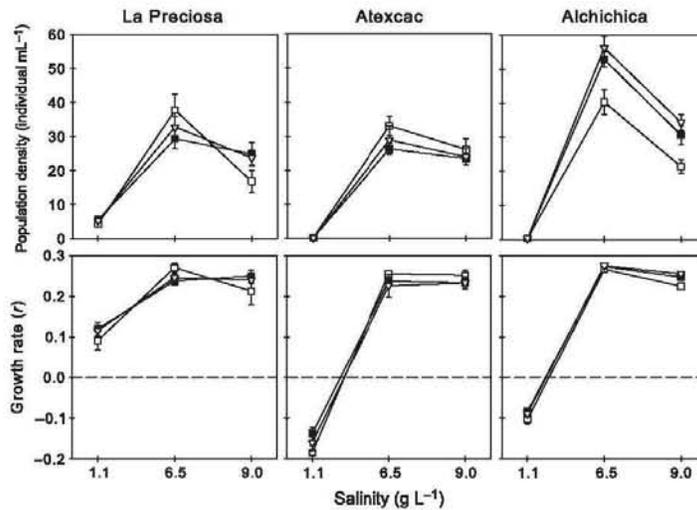


Fig. 2 Reaction norms for the mean population density over the last 5 days of the common garden experiments (top panels) and for intrinsic growth rate (r) (bottom panels) in *Brachionus plicatilis* complex populations raised in common garden experiments at three salinities. Each point represents the mean \pm SE of a strain ($n = 3$); different symbols represent different strains. In some cases, the error bars are smaller than the symbols. The growth rate was calculated with the linearised logistic model using data from the 1st and 15th days shown in Fig. 1.

Table 2 Effects of salinity, population and their interaction, as well as the effects of strains nested on the population factor, on the final density and growth rate (r) of the three *B. plicatilis* complex populations tested in the common garden experiments

Source	d.f.	F	P
Final density			
Salinity	2	213.147	<0.001
Population	2	12.155	<0.001
Strain (population)	6	2.023	0.075
Salinity \times population	4	1835.759	<0.001
Time	2.776	60.402	<0.001
Time \times salinity	5.551	20.421	<0.001
Time \times population	5.551	8.396	<0.001
Time \times strain (population)	16.653	1.190	0.277
Time \times salinity \times population	11.102	4.672	<0.001
Growth rate (r)			
Salinity	2	1271.943	<0.001
Population	2	119.449	<0.001
Strain (population)	6	0.798	0.575
Salinity \times population	4	98.622	<0.001

The final density corresponds to the population density over the last 5 days of the common garden experiment and was analysed by means of a two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA), using time as within-subject factor. The main effects of time and its interactions were obtained by the Greenhouse-Geisser adjustment. Growth rate was analysed with a two-way analysis of variance (ANOVA).

similar, and the slopes indicate that the difference between 1.1 and 6.5 g L⁻¹ was bigger than between 6.5 and 9.0 g L⁻¹ (Fig. 2).

© 2012 Blackwell Publishing Ltd, *Freshwater Biology*, 57, 728–740

On the other hand, the effects of the population factor were different for each variable: the overall population density of Alchichica was the highest (Alchichica > La Preciosa = Atexcac; SNK test), whereas La Preciosa had the highest overall growth rate (La Preciosa > Alchichica > Atexcac; SNK test). However, the impact of salinity was not the same for the different populations, as shown by the significant population \times salinity interaction in both variables (Table 2). The population dynamics (Fig. 1) and the reaction norms (Fig. 2) show that at 1.1 g L⁻¹, only rotifers from La Preciosa (therefore at their original salinity) showed positive population growth, whereas populations from the other two lakes decreased steadily with time (i.e. negative growth rates). In fact, the population from La Preciosa was the only one that showed positive growth rates at all salinities. At 6.5 g L⁻¹, the population density of Alchichica increased significantly, whereas those of Atexcac (the local population) and La Preciosa were lower. Finally, at 9.0 g L⁻¹, the performance of the three populations was similar. No significant effect of the strain factor nested within the population was observed.

COI sequencing and phylogenetic analyses

A total of 27 COI sequences were obtained from the three rotifer populations (i.e. Alchichica = 10; Atexcac = 8; La Preciosa = 9); the GenBank accession numbers are

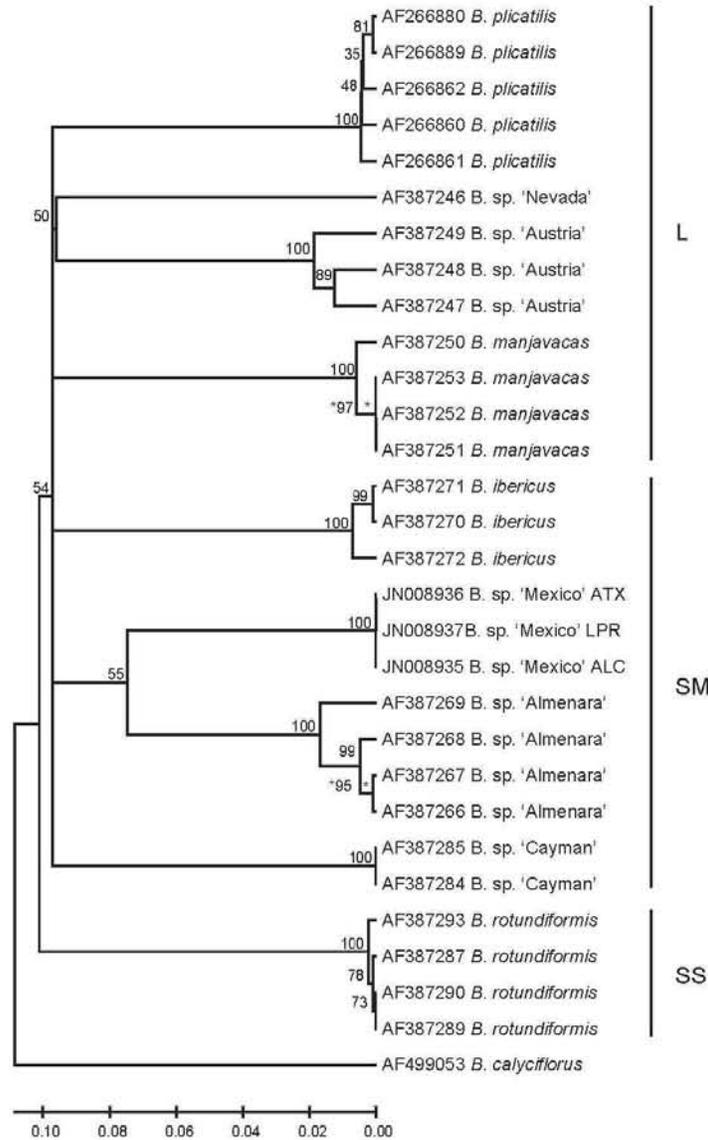


Fig. 3 Neighbour-joining tree based on c oxidase subunit I sequences using a matrix of maximum composition likelihood method. Numbers over branches indicate per cent bootstrap support (1000 replicates). Branches with <50% bootstrap support were collapsed. Designations are as defined by Gómez *et al.* (2002), including GenBank accession numbers. Sequences from Cuenca Oriental populations are named as *B. sp. 'Mexico'* (ATX, Atexcac; LPR, La Preciosa; ALC, Alchichica). *Brachionus calyciflorus* was used as outgroup species. Species groups *sensu* Gómez *et al.* (1995, 2002); SS, small-small; SM, small-medium; L, Large.

shown in Fig. 3. The alignment included 510 bp, revealing the presence of a single haplotype in the three populations. The consensus NJ tree based on the ML method is

given in Fig. 3, showing a clear divergence between rotifers from Cuenca Oriental and other species belonging to the *B. plicatilis* complex. *B. ibericus* (COI; maximum

composition likelihood, MCL = 18.4%) and *B. 'Almenara'* (COI; MCL = 14.5%) are species closest to these Mexican populations, both of them belonging to the medium ('SM') type (Gómez, Temprano & Serra, 1995), or clade B *sensu* Gómez *et al.* (2002; see also Suatoni *et al.*, 2006).

Potential gene flow

Sexual recognition (circling) occurred in 70–80% of replicates of intrapopulation mating trials, but only 40–60% of females were mated (Table 3). Regarding interpopulation crosses among Cuenca Oriental rotifers, no significant differences were observed in the sexual behaviour of males from Atexcac and Alchichica with females from La Preciosa, compared with intrapopulation trials. All mated females produced resting eggs.

According to these results, we selected a single Alchichica clone as a representative of Cuenca Oriental

populations to carry out the mating trials with rotifers from the two most closely related species: *B. ibericus* and *B. sp. 'Almenara'*. In general, the circling behaviour of *B. sp. 'Almenara'* and *B. ibericus* males with Alchichica females was less frequent than in intrapopulation trials (Table 3). Although sexual recognition (circling) was relatively high between Alchichica and *B. ibericus* (about 60%; see Table 3), and copulation occurred in 15% of cases, no hybrids were formed. All mated females produced parthenogenetic eggs, implying that fertilisation had not occurred. Regarding the interpopulation crosses between the two Spanish species, *B. sp. 'Almenara'* males only attempted to mate with *B. ibericus* females at a very low rate (13%), but no copulations were observed; the complementary intercross (*B. ibericus* males × *B. sp. 'Almenara'* females) was unsuccessful in all cases.

Discussion

Common garden experiments: phenotypic plasticity and local adaptation

From the common garden experiments, we showed that the three populations have a phenotypic plasticity to salinity, as the main effect of this factor was significant for both population density and growth rate. Additionally, we found evidence for genetic variation between populations, because the main effect of the factor population in both variables was also significant. Moreover, the salinity × population interaction was significant, which is evidence of genetic differentiation in plasticity (Conner & Hartl, 2004); thus, the effect of salinity was different for each population, and the results should be interpreted accordingly.

The lowest salinity (1.1 g L⁻¹), representing the freshwater Lake La Preciosa, proved to be the least hospitable for the three populations. There were interpopulation differences, however, because although this environment was clearly beyond the tolerance of *Brachionus* from Atexcac and Alchichica, local genotypes were able to maintain positive population growth. Therefore, our results indicate that *Brachionus* from La Preciosa not only constitute the most plastic population tested, but also that it is locally adapted to low salinity ('local versus foreign' criterion *sensu* Kawecki & Ebert, 2004). However, La Preciosa population reached higher density and growth rate at higher salinities, probably as a result of phylogenetic inertia and because a complete specialisation to the diluted environment has not yet evolved.

The salinity of Lake Atexcac (6.5 g L⁻¹) seemed to be the most favourable, because the overall mean population density and growth rate of the three populations were

Table 3 Comparison of the reproductive behaviour of males in intrapopulation versus interpopulation crosses

♂ Origin		Intrapopulation trials	Interpopulation trials	P
La Preciosa	Cir	85.0 ± 8.2	–	–
	Cop	55.0 ± 11.4	–	–
Atexcac			♀ La Preciosa	
Alchichica	Cir	85.0 ± 8.2	90.0 ± 6.9	0.509
	Cop	60.0 ± 11.23	40.0 ± 11.23	0.071
Alchichica			♀ La Preciosa	
Alchichica	Circ	70.0 ± 10.5	85.0 ± 8.2	0.118
	Cop	45.0 ± 11.4	45.0 ± 11.4	0.370
Alchichica			♀ <i>Brachionus ibericus</i>	
<i>B. sp. 'Almenara'</i>	Circ	72.7 ± 10.4	55.3 ± 12.3	0.158
	Cop	45.5 ± 11.7	15.0 ± 9.5	<0.001
<i>B. sp. 'Almenara'</i>			♀ Alchichica	
<i>B. sp. 'Almenara'</i>	Cir	72.7 ± 10.4	10.0 ± 8.2	<0.001
	Cop	45.5 ± 11.7	0	–
<i>B. sp. 'Almenara'</i>			♀ <i>B. ibericus</i>	
<i>B. ibericus</i>	Circ		13.3 ± 9.0	<0.001
	Cop		0	–
<i>B. ibericus</i>			♀ Alchichica	
<i>B. ibericus</i>	Cir	70.0 ± 10.5	20.0 ± 13.3	0.001
	Cop	30.0 ± 10.5	0	–
<i>B. ibericus</i>			♀ <i>B. sp. 'Almenara'</i>	
<i>B. ibericus</i>	Circ		0	–
	Cop		0	–

Mean percentages ± SE of circling (Circ) and copulation (Cop) events are shown. P is the probability of a G-test, using data of intrapopulation trials as controls.

higher under such conditions. Interestingly, the population density of *Brachionus* from Alchichica was affected differently by salinity, because it increased significantly at this value. On the other hand, the responses of the three populations were similar at 9.0 g L⁻¹, and slightly less at 6.5 g L⁻¹. Whereas this might suggest that Lake Atexcac represents the optimal salinity condition under which this taxon evolved, the differences in fitness parameters between 6.5 and 9.0 g L⁻¹ are slight. Perhaps a longer experiment (e.g. 30 days) would have clarified this. Finally, neither Atexcac nor Alchichica rotifers performed better under their local conditions than the other populations, and thus no evidence for local adaptation was found for them.

Cyclical parthenogens have a high potential to respond to natural selection (Lynch & Gabriel, 1983; see review in De Meester, 1996; Campillo *et al.*, 2009), but empirical data on the actual occurrence of local adaptation in rotifers is scarce. The only report seems to be that by Campillo *et al.* (2009), who described very strong genetic differentiation in both neutral markers and several life-history traits linked to local adaptation on populations of *B. plicatilis sensu stricto* inhabiting temporary saline lakes in Spain. To our knowledge, this is the first report of local adaptation of a natural *B. plicatilis* complex population living in freshwater (1.1 g L⁻¹) conditions.

With regard to the response of the *B. plicatilis* species complex to a broader range of salinity, previous studies have shown that the best development is at intermediate values. Lowe *et al.* (2005a,b, 2007) found, for example, that growth rate and egg production for three clones were maximal at salinities between 16 and 18 g L⁻¹, and Miracle & Serra (1989) concluded that the highest growth rate of most *B. plicatilis* clones was at salinities between 10 and 20 g L⁻¹ TDS, with declining values towards lower and higher salinities. Given the low growth rates we measured ($r < 0.3$), it is likely that none of the populations we studied are at optimal salinity conditions, an issue that requires further investigation by tests at higher salinity.

Genetic divergence and reproductive compatibility: taxonomic implications

Cytochrome *c* oxidase I gene (COI) is a standard tool in biological identification through DNA sequencing (Herbert, Ratnasingham & deWaard, 2003), and it has proved to be especially suitable for revealing cryptic species within the *B. plicatilis* species complex (e.g. Ciro-Pérez *et al.*, 2001a; Gómez *et al.*, 2002; Suatoni *et al.*, 2006). Thus, using COI allowed us to test the hypothesis that our three populations belonged to, at least, two cryptic species.

However, we found no sequence divergence at COI among rotifer populations from the three lakes, even though sequences were obtained from resting eggs deposited in the lake sediments, thus representing the potential genetic diversity of rotifers produced over several years (Hairston & Fox, 2009). Furthermore, in the phylogenetic analysis, all specimens from Cuenca Oriental clustered separately from other *B. plicatilis* species. The closest taxa were two sister species originally described from Spain, *B. ibericus* and *B. sp.* 'Almenara', but with a degree of sequence divergence high enough (COI; MCL $\geq 14.5\%$) to consider the Mexican populations to be a different species.

Interbreeding trials provided results congruent with the genetic analysis: the three populations from Cuenca Oriental could interbreed successfully, but crossbreeding with strains from the closely related species *B. sp.* 'Almenara' and *B. ibericus* failed. Although limited recognition and copulation were observed between Alchichica rotifers and the genetically more distant *B. ibericus* (15% resulted in copulation), none of the mated *B. ibericus* females were fertilised, since they produced amictic daughters rather than resting eggs. Thus, populations from Cuenca Oriental are reproductively isolated from *B. ibericus* and *B. sp.* 'Almenara'. Therefore, considering genetic and reproductive evidence, we conclude that the *B. plicatilis* complex populations from La Preciosa, Atexcac and Alchichica lakes belong to a single biological species, not yet described, that we have temporarily called *Brachionus sp.* 'Mexico', applying the standard nomenclature used by Gómez *et al.* (2002).

Although *B. sp.* 'Mexico' is closely related to *B. ibericus* and *B. sp.* 'Almenara', subtle but consistent differences in the morphology of the lorica among the three species are distinguishable (Alcántara-Rodríguez *et al.*, unpubl. data). *Brachionus sp.* 'Mexico' not only seems to be phylogenetically close to *B. sp.* 'Almenara', but is also similar in some ecological requirements, since the latter has been only found at low salinities in the range of 1.1–3.4 g L⁻¹ (Ortells *et al.*, 2003).

Interestingly, as far as we know, this is the first time that clones of *B. sp.* 'Almenara' (7C29) and *B. ibericus* (SM5) isolated from different localities in Spain have been tested for reproductive compatibility. The unsuccessful interbreeding supports the observation of Ortells *et al.* (2000, 2003) that there is no evidence of hybridisation between these closely related species even if they inhabit the same pond (Ortells *et al.*, 2000, 2003). Therefore, under natural conditions, these species are presumably reproductively isolated (but see Suatoni *et al.*, 2006; Stelzer, Riss & Stadler, 2011).

Since small aquatic organisms often have substantial genetic differentiation on small geographical scales (Vanoverbeke & De Meester, 1997; De Meester *et al.*, 2002), as has been reported for this species complex (e.g. Gómez *et al.*, 2002, 2007; Derry *et al.*, 2003; Campillo *et al.*, 2009), the existence of a single COI haplotype is remarkable, because these populations of *B. sp.* 'Mexico' have been under differential selective pressure, producing local adaptation to low salinity in La Preciosa. Moreover, in these lakes, higher genetic diversity has been recorded in calanoid copepods (Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Barrera-Moreno, 2010), and micro-endemic fish are also present (Alvarez, 1950). Nevertheless, the interpopulation genetic variation associated with local adaptation was not reflected in the molecular marker we chose, probably because genes involved in osmotic regulation underwent a stronger and faster selective process than COI, a quite conservative gene that in rotifers changes at a rate of 1.4–2.3% per million years (Gómez *et al.*, 2002; Derry *et al.*, 2003; but see Suatoni *et al.*, 2006).

Although the existence of other *B. plicatilis* COI genotypes cannot be discounted, they would be very rare and/or unimportant in terms of population dynamics. Therefore, if the number of genotypes observed provides a straightforward minimum estimate of the genotypes that colonised the three lakes, the existence of a single haplotype in our study is a strong evidence for one or a few relatively recent colonisation events (Boileau, Hebert & Schwartz, 1992; Hairston *et al.*, 1999; Haag *et al.*, 2006; Louette *et al.*, 2007). If this is correct, we can ask when it is likely to have occurred.

Cuenca Oriental lakes have existed for about 40 000 years (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007; G. Vilaclara, pers. comm.) and have gone through an evaporation-related evolutionary process since their origin, because of a combination of different factors including the input of high conductivity ground water and a precipitation/evaporation ratio <1, the lake becoming gradually more saline over geological time (Armentia *et al.*, 2008). Palaeolimnological analyses suggest that the present alkaline-subsaline conditions of Lake Alchichica have probably prevailed for at least 900 years, with an intermediate (older than c. 300 years) brief period of higher alkalinity (Caballero *et al.*, 2003). On the other hand, the high pH and carbonate concentration in Lake Alchichica cause a rapid loss of subfossil plankton remains in sediments (Caballero *et al.*, 2003), and the oldest rotifer resting eggs we found were produced c. 24.3–27 years ago (Ciros-Pérez, unpubl. data). The first record of *B. plicatilis* in Lake Alchichica is as recent as 1993 (Lugo, 2000), and no data exist for Atexcac or La Preciosa. According to this

gradually changing scenario over geological time, rotifers could originally have colonised the lakes when the salinity became tolerable for them, opening a time frame for the colonisation event in Lake Alchichica of about 24–900 years. Unfortunately, we have no information about the other two lakes.

On the other hand, it is not easy to explain why subsequent colonisation events (detected as a higher COI diversity) have not occurred, considering that zooplanktonic organisms disperse rapidly (Bohonak & Jenkins, 2003; Louette & De Meester, 2005). Further, the arrival and settlement of different genotypes could be restricted by the location of Cuenca Oriental lakes in Central Mexico at 2300 m.a.s.l. The nearest known *B. plicatilis s. l.* populations are at sea level, >70 km to the East, in the Gulf of Mexico (Osorio-Tafall, 1942; Rico-Martínez & Silva-Briano, 1993; Sarma *et al.*, 2000), and the passive transport by waterfowl is unlikely since the existing main flyways of migratory birds in this region are North–South and vice versa, but not East–West (DeGraaf & Rappole, 1995; Barragán-Severo, López-López & Stanley, 2002). Moreover, even if resting eggs could reach the lakes, the probabilities for hatching are low, because these are deep, maar lakes with a very limited littoral zone, and during the stratification phase (March to December), the hypolimnion and profundal sediments are constantly anoxic and dark, and at constant temperature, conditions that have been observed to inhibit hatching of resting eggs (Gilbert & Schröder, 2004; Schröder, 2005).

Overall, low COI diversity suggests persistent founder effects (e.g. Gómez *et al.*, 2000, 2002; De Meester *et al.*, 2002) associated with a single colonisation event, and the subsequent passive dispersal of resting eggs from one lake to the other two, perhaps via the waterfowl they share or by the wind (Bohonak & Jenkins, 2003). In any case, analysis with neutral markers is needed to give a better picture of genetic diversification in these rotifer populations (see e.g. Campillo *et al.*, 2009).

Abiotic factors may be important drivers in animal diversification: differences in abiotic conditions create divergence among populations through divergent natural selection (Tobler *et al.*, 2008). We have studied an ecological system where such an abiotic factor is salinity (which is a particularly strong driver of evolution; Derry *et al.*, 2003), and it forms a gradient of several lakes that share animal and algal species. In this case, the rotifer populations have a high adaptive potential owing to their phenotypic plasticity (Fierst, 2011), and the restricted gene flow among populations facilitates genetic divergence, producing local adaptation to low salinity in a

relatively short time. Owing to their age and characteristics, Cuenca Oriental lakes constitute an unusual natural scenario where divergent selection drives animal populations to genetic diversification; further studies will allow better understanding of key diversification processes at the local and regional scales and at the population and community levels.

Acknowledgments

We are greatly indebted to Laura Peralta-Soriano and Miroslav Macek for their invaluable help in the field samplings. Sergi Campillo kindly performed the initial COI sequencing. Manuel Serra (University of Valencia, Spain) generously provided the *B. ibericus* and *B. sp.* 'Almenara' strains used in the reproductive trials. Alfonso Lugo and Marcelo Silva-Briano kindly provided us some articles that helped us to find early records of *B. plicatilis* in Mexico. The manuscript benefited from helpful comments by Peter Schulze, Alan Hildrew and an anonymous reviewer. We are deeply grateful to Robert Brotherhood for his generous help correcting the English. This research was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico – UNAM (PAPIIT IN-212206, PAPIIT IN-222709), Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación – FES Iztacala, UNAM (PAPCA 2007–2008), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-52387).

References

- Alcocer J. & Hammer U.T. (1998) Saline lake ecosystems of Mexico. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, **1**, 291–315.
- Alcocer J., Lugo A., Escobar E., Sánchez M.R. & Vilaclara G. (2000) Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, **27**, 3166–3169.
- Alvarez I. (1950) Contribución al conocimiento de los peces de la región de los Llanos, estado de Puebla (México). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de México*, **6**, 81–107.
- Andersen R.A. (2005) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, Burlington.
- Armienta M.A., Vilaclara G., De la Cruz-Reyna S., Ramos S., Ceniceros N., Cruz O. et al. (2008) Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **178**, 249–258.
- Barragán-Severo J., López-López E. & Stanley K.A.B. (2002) Spatial and temporal variation patterns of a waterfowl community in a reservoir system of the Central Plateau, Mexico. *Hydrobiologia*, **467**, 123–131.
- Barrera-Moreno O. (2010) *Análisis de las poblaciones de los copépodos Leptodiptomus cf. sicilis (Copepoda: Calanoida) en los lagos de la Cuenca Oriental, México*. M. Sc. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.
- Bohonak A.J. & Jenkins D.G. (2003) Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecology Letters*, **6**, 783–796.
- Boileau M.G., Hebert P.D.N. & Schwartz S.S. (1992) Non-equilibrium gene frequency divergence: persistent founder effects in natural populations. *Journal of Evolutionary Biology*, **5**, 25–39.
- Caballero M., Vilaclara G., Rodríguez A. & Juárez D. (2003) Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional*, **42**, 529–537.
- Campillo S., García-Roger E.M., Carmona M.J., Gómez A. & Serra M. (2009) Selection on life-history traits and genetic population divergence in rotifers. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 2542–2553.
- Carrasco-Núñez G., Ort M.H. & Romero C. (2007) Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **159**, 179–197.
- Ciros-Pérez J. (2001) *Exclusión y coexistencia entre especies gemelas de rotíferos: mecanismos subyacentes*. Ph.D. Thesis, Universitat de València, Spain.
- Ciros-Pérez J., Gómez A. & Serra M. (2001a) On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *Journal of Plankton Research*, **23**, 1311–1328.
- Ciros-Pérez J., Carmona M.J. & Serra M. (2001b) Resource competition between sympatric sibling rotifer species. *Limnology and Oceanography*, **46**, 1511–1523.
- Ciros-Pérez J., Carmona M.J., Lapasa S. & Serra M. (2004) Predation as a factor mediating resource competition among rotifer sibling species. *Limnology and Oceanography*, **49**, 40–50.
- Conner J.K. & Hartl D.L. (2004) *A Primer of Ecological Genetics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- De Meester L. (1996) Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton: patterns and processes. *Ecoscience*, **3**, 385–399.
- DeMeester L., Gómez A., Okamura B. & Schwenk K. (2002) The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica*, **23**, 121–135.
- DeGraaf R.M. & Rappole J.H. (1995) *Neotropical Migratory Birds: Natural History, Distribution, and Population Change*. Cornell University Press, New York.
- Derry A.M., Hebert P.D.N. & Prepas E.E. (2003) Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: a molecular phylogenetic approach. *Limnology and Oceanography*, **48**, 675–685.

- von Ende C.N. (1993) Repeated-measures analysis: growth and other time-dependent measures. In: *Design and Analysis of Ecological Experiments* (Eds S.M. Scheider & J. Gurevitch), pp. 113–137. Chapman and Hall, New York.
- Epp R.W. & Winston P.W. (1978) The effect of salinity and pH on the activity and oxygen consumption of *Brachionus plicatilis* (Rotatoria). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **59A**, 9–12.
- Fierst J.L. (2011) A history of phenotypic plasticity accelerates adaptation to a new environment. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**, 1992–2001.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. & Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–299.
- Fontaneto D., De Smet W.H. & Ricci C. (2006) Rotifers in saltwater environments, re-evaluation of an inconspicuous taxon. *Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom*, **86**, 623–656.
- Gilbert J.J. & Schröder T. (2004) Rotifers from diapausing, fertilized eggs: unique features and emergence. *Limnology and Oceanography*, **49**, 1341–1354.
- Gómez A. & Serra M. (1995) Behavioral reproductive isolation among sympatric strains of *Brachionus plicatilis* Müller 1786: insights into the status of this taxonomic species. *Hydrobiologia*, **313/314**, 111–119.
- Gómez A. & Serra M. (1996) Mate choice in male *Brachionus plicatilis* rotifers. *Functional Ecology*, **10**, 681–687.
- Gómez A., Temprano M. & Serra M. (1995) Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats. *Journal of Evolutionary Biology*, **8**, 601–622.
- Gómez A., Carmona M.J. & Serra M. (1997) Ecological factors affecting gene flow in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Oecologia*, **111**, 350–356.
- Gómez A., Carvalho G.R. & Lunt D.H. (2000) Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankton: mitochondrial DNA variation in a rotifer resting egg bank. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **267**, 2189–2197.
- Gómez A., Serra M., Carvalho G.R. & Lunt D.H. (2002) Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, **56**, 1431–1444.
- Gómez A., Montero-Pau J., Lunt D.H., Serra M. & Campillo S. (2007) Persistent genetic signatures of colonization in *Brachionus manjavacas* rotifers in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, **16**, 3228–3240.
- van Grembergh L., Vanormelingen P., Van der Gucht K., Souffreau C., Vyverman W. & De Meester L. (2009) Priority effects in experimental populations of the cyanobacterium *Microcystis*. *Environmental Microbiology*, **11**, 2564–2573.
- Haag C.R., Riek M., Hottinger J.W., Pajunen V.I. & Ebert D. (2005) Genetic diversity and genetic differentiation in *Daphnia* metapopulations with subpopulations of known age. *Genetics*, **170**, 1809–1820.
- Haag C.R., Riek M., Hottinger J.W., Pajunen V.I. & Ebert D. (2006) Founder events as determinants of within island and among island genetic structure of *Daphnia* metapopulations. *Heredity*, **96**, 150–158.
- Hairston N.G. Jr & Fox J.A. (2009) Egg banks. In: *Encyclopedia of Inland Waters* (Ed. G.E. Likens), Vol. 3, pp. 659–666. Elsevier, Oxford.
- Hairston N.G. Jr, Perry L.J., Bohanak A.J., Fellows M.Q. & Engstrom D.R. (1999) Population biology of a failed invasion: paleolimnology of *Daphnia exilis* in upstate New York. *Limnology and Oceanography*, **44**, 477–486.
- Hajibabaei M., Smith M.A., Janzen D.H., Rodriguez J.J., Whitfield J.B. & Hebert P.D.N. (2006) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 959–964.
- Hammer U.T. (1986) *Saline Lake Ecosystems of the World*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Hebert P.D.N., Remigio E.A., Colbourne J.K., Taylor D.J. & Wilson C.C. (2002) Accelerated molecular evolution in halophilic crustaceans. *Evolution*, **56**, 909–926.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S. & deWaard J.R. (2003) Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **270**, S96–S99.
- Kawecki T.J. & Ebert D. (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, **7**, 1225–1241.
- Kostopoulou V. & Vadstein O. (2007) Growth performance of the rotifers *Brachionus plicatilis*, B. “Nevada” and B. “Cayman” under different food concentrations. *Aquaculture*, **273**, 449–458.
- Kostopoulou V., Miliou H. & Verriopoulous G. (2009) Morphometric changes in a strain of the lineage ‘Nevada’, belonging to the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex. *Aquaculture Research*, **40**, 938–949.
- Lee M.S.Y. (2003) Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 179–188.
- Louette G. & De Meester L. (2005) High dispersal capacity of cladoceran zooplankton in newly founded communities. *Ecology*, **86**, 353–359.
- Louette G. & De Meester L. (2007) Predation and priority effects in experimental zooplankton communities. *Oikos*, **116**, 419–426.
- Louette G., Vanoverbeke J., Ortells R. & De Meester L. (2007) The founding mothers: the genetic structure of newly established *Daphnia* populations. *Oikos*, **116**, 728–741.
- Lowe C.D., Bates A.D., Kemp S.J. & Montagnes D.S.J. (2005a) Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Marine Biology*, **146**, 923–929.
- Lowe C.D., Kemp S.J. & Montagnes D.S.J. (2005b) An interdisciplinary approach to assess the functional diversity of free-living microscopic eukaryotes. *Aquatic Microbial Ecology*, **41**, 67–77.

- Lowe C.D., Kemp S.J., Díaz-Ávalos C. & Montagnes D.S.J. (2007) How does salinity tolerance influence the distributions of *Brachionus plicatilis* sibling species? *Marine Biology*, **150**, 377–386.
- Lugo A. (2000) *Variación Espacial y Temporal de la Estructura de la Comunidad Planctónica del Lago de Alchichica, Puebla, con Algunos Aspectos de Interacciones Tróficas*. Ph.D. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.
- Lynch M. & Gabriel W. (1983) Phenotypic evolution and parthenogenesis. *The American Naturalist*, **122**, 745–764.
- Mills S., Gómez A. & Lunt D. (2007) Global isolation by distance despite strong regional phylogeography in a small metazoan. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 225.
- Miracle M.R. & Serra M. (1989) Salinity and temperature influences in rotifer life history characteristics. *Hydrobiologia*, **186/187**, 81–102.
- Montiel-Martínez A., Ciro-Pérez J., Ortega-Mayagoitia E. & Elías-Gutiérrez M. (2008) Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiatomus garciai* (Osorio-Tafall, 1942) as a valid endemic species. *Journal of Plankton Research*, **30**, 1079–1093.
- Ortells R. (2002) *Diversidad genética y ecológica en especies crípticas de rotíferos: Patrones y procesos*. Ph.D. Thesis, Universitat de València, Valencia, Spain.
- Ortells R., Snell T.W., Gómez A. & Serra M. (2000) Patterns of genetic differentiation in resting egg banks of a rotifer species complex in Spain. *Archiv für Hydrobiologie*, **149**, 529–551.
- Ortells R., Gómez A. & Serra M. (2003) Coexistence of cryptic rotifer species: ecological and genetic characterisation of *Brachionus plicatilis*. *Freshwater Biology*, **48**, 2194–2202.
- Osorio-Tafall R.F. (1942) Rotíferos planctónicos de México I, II y III. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, **3**, 23–79.
- Rico-Martínez R. & Silva-Briano M. (1993) Contribution to the knowledge of the Rotifera of Mexico. *Hydrobiologia*, **255/256**, 467–474.
- Romero-Guardamino L.E. (2008) *Caracterización morfológica y aspectos filogenéticos de cepas de rotíferos del grupo Brachionus plicatilis (Rotifera: Brachionidae) utilizados en la acuicultura peruana*. B.Sc. Thesis, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Peru.
- Sarma S.S.S., Nandini S., Ramírez-García P. & Cortés-Muñoz J.E. (2000) New records of brackish Rotifera and Cladocera from Mexico. *Hidrobiología*, **10**, 121–124.
- Schröder T. (2005) Diapause in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*, **546**, 291–306.
- Snell T.W. & Serra M. (1998) Dynamics of natural rotifer populations. *Hydrobiologia*, **368**, 29–35.
- Sokal R.R. & Rohlf F.J. (2001) *Biometry*. Freeman & Co., New York.
- Stelzer C.P., Riss S. & Stadler P. (2011) Genome size evolution at the speciation level: the cryptic species complex *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 90.
- Suatoni E., Vicario S., Rice S., Snell T.W. & Caccone A. (2006) An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 86–98.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599.
- Thibert-Plante X. & Hendry A.P. (2010) The consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**, 326–342.
- Tobler M., DeWitt T.J., Schlupp L., García de León F.J., Herrmann R., Feulner P.G.D. et al. (2008) Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecilia mexicana*. *Evolution*, **62**, 2643–2659.
- Vanoverbeke J. & De Meester L. (1997) Among-population genetic differentiation in the cyclical parthenogens *Daphnia magna* (Crustacea, Anomopoda) and its relation to geographic distance and clonal diversity. *Hydrobiologia*, **360**, 135–142.
- Williams W.D. (1996) The largest, highest and lowest lakes of the world: Saline lakes. Peter Kilham Memorial Lecture, Sao Paulo, 1995. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, **26**, 61–79.
- Willmer P., Stone G. & Johnston I. (2005) *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Publishing, Malden.

(Manuscript accepted 23 December 2011)