



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

ECOLOGÍA EVOLUTIVA DE LA PARTENOGENESIS CÍCLICA EN  
UN ROTÍFERO EN UN AMBIENTE POCO VARIABLE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA GABRIELA CRUZ CRUZ



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JORGE CIROS PEREZ

Los Reyes, Iztacala, Edo. de México, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Agradecimientos

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por la formación y conocimientos que me han brindado.*

*Al Proyecto PAPIIT (IN-222916), al CONACYT, por los apoyos económicos en las diferentes etapas de la tesis, para la*

*Le agradezco sinceramente al Dr. Jorge Ciro Pérez, por el crecimiento académico que logre con sus asesorías. Gracias por haber tenido la confianza de depositar en mí y por dirigir exitosamente este trabajo.*

*A los miembros de mi comité tutorial y jurado para examen de grado: Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia, Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, Dr. Alfonso Lugo Vazquez, Mtra. Nohemi Dimas Flores, por sus valiosos y acertados comentarios en la realización de este trabajo de investigación, por el tiempo dedicado a la mejora de este.*

*Al Dr. José Arturo Alcántara Rodríguez por su apoyo brindado para la mejora de este trabajo.*

*A todas las personas con las que conviví del PILT, investigadores, alumnos y estudiantes, todos y cada uno de ustedes aportaron al desarrollo del presente trabajo.*

## Dedicatorias

*A mis padres, por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado en el desarrollo de mi vida académica, por su motivación, interés y respaldo en todo momento.*

*A mi hermana, que me dio un propósito para mejorar constantemente, por tu manera de ser tan contraste y complementaria con la mía.*

*A mi familia, quienes desde el inicio de esta aventura me dieron toda la confianza que pudiera albergar en su ser.*

*A mis amigos de la licenciatura: Erika, Iván y Rodrigo, con quienes he pasado momentos alegres y no tanto y de quienes aprendí cosas que jamás olvidaré.*

## **Contenido**

<b>Resumen</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	7
<b>Hipótesis</b> .....	14
<b>Objetivos</b> .....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Particulares.....	15
<b>Área y especie de estudio</b> .....	16
<b>Métodos</b> .....	20
Establecimiento y mantenimiento de las poblaciones experimentales .....	20
Inducción de mixis asociada a la densidad poblacional .....	23
Análisis morfológicos.....	26
Análisis de divergencia genética .....	29
<b>Resultados</b> .....	32
Respuesta de mixis a la densidad poblacional.....	32
Análisis Morfológicos.....	35
Análisis de divergencia genética .....	40
<b>Discusión</b> .....	42
Crecimiento poblacional e inversión reproductiva .....	42
Divergencia morfológica y genética.....	49
Consideraciones finales .....	50
<b>Conclusiones</b> .....	52
<b>Literatura citada</b> .....	54

## Resumen

La respuesta de mixis puede variar significativamente entre diferentes clones en rotíferos del género *Brachionus*, esto puede ser importante ecológicamente ya que dependiendo del escenario ambiental una u otra estrategia puede verse favorecida. Análisis recientes del banco de huevos diapáusicos sugieren que las características ambientales del lago Alchichica (Puebla;  $Z_{\max}$  64 m) no son adecuadas para la eclosión de estas estructuras. Por lo cual, se puede hipotetizar que estas presiones de selección reducen la probabilidad de inducción de mixis, así, es de esperarse un incremento de la fase asexual en individuos que habitan regularmente la columna de agua. Por el contrario, los individuos eclosionados de los huevos diapáusicos deberán tener una mayor tendencia a inducir la reproducción sexual. En caso de existir diferencias en los patrones de reproducción de las poblaciones nominales, también es de esperarse que existan diferencias genéticas y fenéticas (morfología, eficacia biológica). Se recolectaron muestras vivas de zooplancton en columna de agua y en sedimentos para analizar si existen patrones de inducción sexual diferencial entre las poblaciones activa (planctónica) vs. latente (huevos diapáusicos). Se obtuvieron 8 clones de cada población nominal y se realizaron experimentos de crecimiento poblacional en condiciones controladas de laboratorio para analizar la densidad inicial y momento de inducción de la mixis, así como los patrones de crecimiento poblacional y de inversión reproductiva. Adicionalmente, se hicieron análisis de morfología geométrica y con marcadores moleculares neutrales para evaluar la posible divergencia interpoblacional. Los resultados obtenidos muestran que hay rasgos poblacionales significativamente diferentes entre las poblaciones, la población activa induciendo la mixis a densidades más altas y de manera más tardía, y alcanzando

capacidades de carga menores, mientras que la población latente indujo la reproducción sexual a densidades más bajas y de manera temprana con capacidades de carga mayores, pero con tasas de crecimiento muy similares para ambas poblaciones. Además, se observaron diferencias significativas en su morfología, la población activa con fenotipos más pequeños que la población latente. Sin embargo, a pesar de que se encontraron genotipos particulares entre poblaciones, el análisis no evidenció alguna estructura genética clara entre las poblaciones. Con el conjunto de evidencias recabadas se concluye que existen por lo menos dos fenotipos con estrategias de historia de vida diferentes, pero ambas con potenciales aparentemente eficaces, para hacer frente a las condiciones en este tipo de lago (i.e., estable –monomítico-cálido-, oligotrófico, profundo, con sedimentos anóxicos y oscuros), los genotipos de la población activa como aquellos de la población latente realmente se comportan como subpoblaciones con dinámicas relativamente independientes producto de presiones de selección divergentes.

*Palabras clave:* partenogénesis cíclica, rotíferos, historias de vida, lagos profundos, ecología evolutiva.

## Introducción

La diapausa es un rasgo que se encuentra en el ciclo de vida de muchos organismos. Es una característica que tiene importantes implicaciones desde un punto de vista demográfico y evolutivo. Los individuos que entran en diapausa generalmente quedan protegidos contra las condiciones adversas del ambiente en ese momento particular (Schröder & Gilbert, 2004).

Los rotíferos monogonontes son un grupo de organismos que tienen diapausa en su historia de vida, el tipo de reproducción que presentan es llamado partenogénesis cíclica. Un ciclo de crecimiento típico para estos organismos comienza con la eclosión de huevos diapáusicos en el sedimento que dan lugar a hembras asexuales (amícticas; Fig. 1). Estas hembras son diploides y se reproducen por partenogénesis ameiótica, que da lugar a hijas que son genéticamente idénticas a sus progenitoras, salvo en el caso de que se produzcan mutaciones (Stelzer & Snell, 2003). Durante esta fase de propagación clonal, las poblaciones de rotíferos presentan altas tasas de crecimiento poblacional lo que les permite colonizar rápidamente el hábitat. No obstante, como respuesta a cambios que eventualmente ocurren en determinadas condiciones ambientales (p. ej., fotoperiodo, temperatura, dieta o hacinamiento) se induce la fase sexual o mixis (Stelzer & Snell, 2003).

La mixis comienza cuando algunos huevos partenogenéticos diploides (producidos por las hembras asexuales) se desarrollan para producir hembras sexuales (mícticas) diploides que producirán por meiosis huevos haploides. Si estos huevos no son fecundados, se desarrollarán como machos haploides. Pero, si ya hay machos en la población y las

hembras son fecundadas, se producirán huevos diploides que entran en estado de diapausa, permitiendo su supervivencia en las condiciones adversas mediante la formación de banco de huevos de resistencia (Cáceres, 1997).

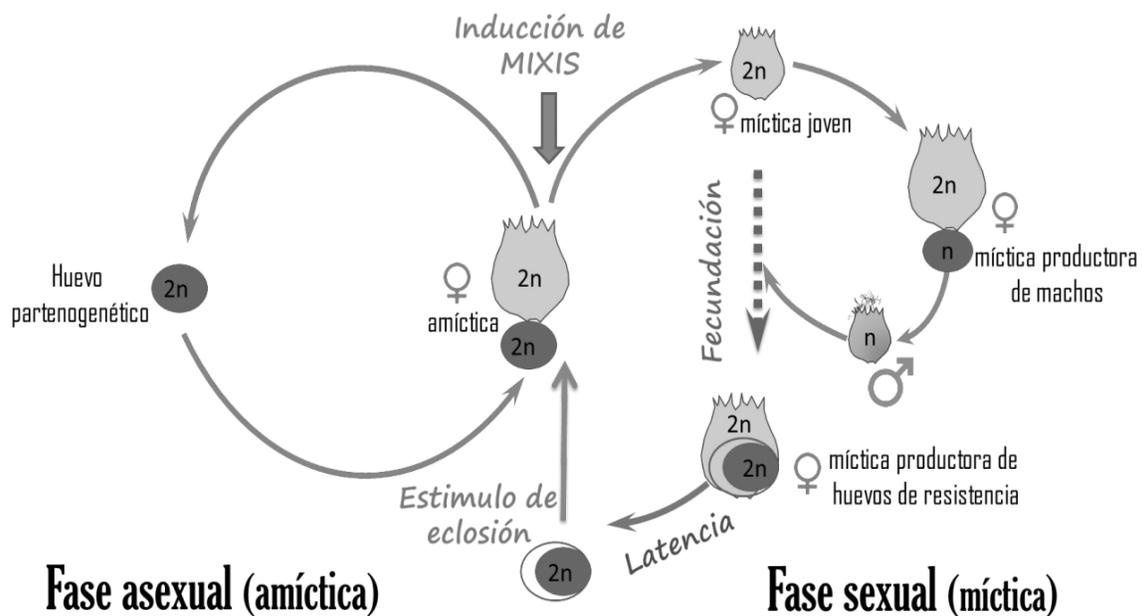


Figura 1. Ciclo de vida de *Brachionus* grupo *plicatilis*, modificado de Ciro-Pérez (2001).

La mayoría de los aspectos del ciclo de vida de los rotíferos está estrechamente regulada, especialmente la reproducción. Características como la inducción, la velocidad, la duración y de la reproducción están estrechamente controladas, como se confirma en numerosos experimentos de tabla de vida con varias especies de rotíferos. La razón de esta estricta regulación es que el momento en que ocurre la reproducción en el ciclo de vida tiene efectos importantes en la eficacia biológica de las poblaciones (véase, Serra *et al.*, 2003).

Los rotíferos utilizan señales que regulan muchos aspectos de su ciclo de vida, se basan principalmente en señales químicas y mecánicas para detectar su entorno (Snell, 1998).

Un conjunto de señales externas (feromonas) coordinan la actividad en las poblaciones, mientras que las señales internas (hormonas) coordinan las respuestas fisiológicas dentro de los individuos. La feromona de reconocimiento de pareja (MRP) es un ejemplo de una feromona reproductiva que induce el comportamiento de apareamiento en los braquiúridos machos (Snell, 1998).

Varias especies inician la mixis (reproducción sexual) en respuesta al hacinamiento, incluida la mayoría de las especies de *Brachionus* (Gilbert, 2004). La respuesta a las señales de mixis puede ser modificada por factores endógenos y exógenos. Los factores que inducen la producción de hembras míticas son aún muy poco conocidos para la mayoría de las especies, estos incluyen el fotoperiodo en especies de *Notommata* y *Trichocerca*, o la ingesta de  $\alpha$ -tocoferol en la comida de algunas especies del género *Asplanchna* (Gilbert, 1980).

La inducción de mixis en el género *Brachionus* es dependiente de la densidad (Gilbert, 1977). A densidades de población bajas, las hembras se reproducen asexualmente. Conforme la población crece cerca de un umbral de densidad crítico, las hembras míticas aparecen y la reproducción sexual se inicia. La densidad poblacional afecta la producción de hembras míticas en las especies *B. plicatilis* y *B. calyciflorus* (Pourriot & Snell, 1983), así como en *Epiphanes brachionus* (Pourriot & Rougier, 1999), *B. angularis*, *E. senta* y *Rhinoglena frontales* (Schröder & Gilbert, 2004).

El modelo general para explicar la respuesta de hacinamiento es que los rotíferos excretan una variedad de compuestos en el medio produciendo un “medio acondicionado” cuya

composición química ha sido analizada. Snell *et al.* (2006) demostraron que la señal que induce la mixis en *B. manjavacas* es una proteína, a la que designaron como proteína inductora de mixis (MIP), la cual tiene un peso molecular de 22 kDa y es la primera molécula candidata a ser la feromona responsable de este cambio en el ciclo de vida (Snell, 2017).

Snell (2011) propuso un modelo de señalización reproductiva en monogonontes y la hipótesis de la existencia de un receptor MIP en la corona de las hembras. Este receptor al unirse al MIP inicia una ruta de transducción de señales que estimulaba la biosíntesis de esteroides que a su vez regulan directamente la maduración de los ovocitos, para permitir así la reproducción mítica.

La inducción de la mixis en hembras conespecíficas cuando se encuentran en densidades poblacionales altas ha sido considerada como un factor adaptativo en muchos aspectos. Primero, se ha argumentado que las densidades altas incrementan la probabilidad de encuentros macho-hembra, el cual es aleatorio y depende de que los machos reconozcan a las hembras una vez que entran en contacto con ellas (Snell, 1998). Segundo, si se alcanzan densidades altas por reproducción amítica, y subsecuentemente se cambia al modo de reproducción mítica a una tasa de fertilización alta, se producirán más huevos de resistencia simplemente porque el número de hembras sexuales será más alto (Snell & Boyer, 1988; Serra & King, 1999).

Se ha argumentado que las densidades de población altas pueden llevar a la sobreexplotación de los recursos alimenticios y por lo tanto causar deterioro en un futuro

cercano (Carmona & Serra, 1993; Ciro-Pérez *et al.*, 2002). En este caso, el incremento de las densidades puede llevar a la producción de huevos de resistencia en anticipación del deterioro del hábitat. Sin embargo, los umbrales de densidad que inducen la mixis están muy por debajo de lo observado en las densidades de población máxima (Gilbert, 2002; Gilbert & Schröder, 2004), lo que indica que los huevos de resistencia deben ser producidos cuando los recursos alimenticios son aún abundantes. Además, se sabe que a pesar de que el hacinamiento induce la mixis, no es claro que esté asociado con la reducción de la fecundidad (Schröder & Gilbert, 2004). De acuerdo con estos descubrimientos, la reproducción mítica y la producción de huevos de resistencia son más probables de ocurrir bajo condiciones aún favorables, mucho antes de que se deteriore el hábitat y que las condiciones se vuelvan desfavorables para el crecimiento de la población, por lo que el alcanzar una densidad poblacional umbral, debería funcionar como un factor proximal, más que un factor último. Así, no se puede descartar la posibilidad de que la falta de alimento asociada con el deterioro inminente del hábitat pueda influir directamente en el patrón de selección que regula la reproducción mítica en el ciclo de vida partenogenético cíclico.

Los lagos oligotróficos profundos muestran un conjunto de características que crean presiones conflictivas para las poblaciones de los animales pelágicos que constituyen el zooplancton. Generalmente, debido a la escasez de nutrientes, la biomasa de productores primarios (fitoplancton) en la columna de agua es baja, permitiendo que la luz penetre profundamente en la columna de agua. El escenario de baja disponibilidad de recursos y

alta incidencia de luz representa problemas importantes para la supervivencia del zooplancton (Ciros-Pérez *et al.*, 2015).

### **El zooplancton del lago Alchichica como caso de estudio**

El lago Alchichica es un lago cráter profundo, salino, ubicado en el sureste del Altiplano Mexicano (véase descripción detallada en área de estudio), el cual se caracteriza por tener poca diversidad biológica en comparación con la observada en otros sistemas acuáticos. El zooplancton está constituido básicamente por tres especies, un copépodo calanoideo y dos especies de rotíferos (Lugo *et al.*, 1999; Montiel-Martínez *et al.* 2008), las cuales no siguen una sucesión predecible cada año, a diferencia de lo que ocurre con las condiciones abióticas, representadas principalmente por un ciclo de estratificación-mezcla anual (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011; Cirós-Pérez *et al.*, 2015). El lago se mezcla durante la época seca y fría del año (invierno hemisférico), por lo que se clasifica como un lago monomíctico cálido (Alcocer *et al.*, 2000). Análisis recientes del banco de huevos de resistencia de los organismos zooplanctónicos del lago Alchichica (Dimas-Flores *et al.*, manuscrito en preparación), han señalado que dada la naturaleza de este lago profundo, oligotrófico, con sedimentos en permanente oscuridad y anoxia, representa un escenario inhóspito para este tipo de estructuras diapáusicas, lo cual se ve reflejado en que solo existen huevos de resistencia del rotífero *Brachionus* grupo *plicatilis*, y no de las otras especies, las cuales, además, tienen un periodo relativamente corto de viabilidad en los sedimentos (<10 años; Ayala-Arce, 2006).

Además, se sabe que en las zonas poco profundas del lago (zona litoral) la viabilidad de estas estructuras es aún menor, donde, dada la alta diversidad de organismos bentónicos (Peralta *et al.*, 2002) es de esperarse una tasa de depredación alta. Adicionalmente, se sabe que la producción de huevos de resistencia en estos rotíferos es muy costosa en términos energéticos, y que existe una alta probabilidad de supervivencia de los huevos subitáneos (amícticos) después de ser depredados por peces (Dimas-Flores *et al.*, comunicación personal). De acuerdo con este escenario, es lógico preguntarse: ¿Es la mixis una buena estrategia del zooplancton para evadir las condiciones desfavorables en este tipo de ambientes tan demandantes?

La selección de la reproducción sexual temprana ocurre de manera más intensa en poblaciones de lagos temporales a diferencia de las poblaciones estacionales de lagos profundos (Schröder, 2005). Las variantes que habitan ambientes estables tienden a una menor frecuencia de reproducción sexual, invirtiendo más en crecimiento poblacional partenogénico; de manera que la inducción de la mixis solo debería ocurrir en condiciones de densidades poblacionales relativamente altas (Serra, 1999).

Dadas las características particulares en las que viven los rotíferos de Alchichica, es de esperarse que sus rasgos de historia de vida se vean sometidos a compromisos para subsistir a corto y a largo plazo en el lago, por lo que la alternancia entre la reproducción asexual y sexual debe tener costos y beneficios que conducen a una diversificación dentro de la población debida a la selección natural (Tobler *et al.*, 2008), que amerita ser dilucidada.

De acuerdo con este escenario, y a que se cuenta con abundante información ecológica de las poblaciones zooplanctónicas de Alchichica (Lugo *et al.*, 1999; Montiel-Martínez *et al.* 2008; Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Ciro-Pérez *et al.*, 2015), este sistema natural se vuelve un modelo de estudio importante para comprender mejor los procesos ecológicos y evolutivos que determinan la estructura y dinámica de las comunidades acuáticas en un sistema tropical por lo que, el conocimiento que se genere, eventualmente puede ser extrapolado para comprender otros sistemas ecológicos similares.

## **Hipótesis**

Si los rotíferos *Brachionus* grupo *plicatilis* que habitan el lago Alchichica se han sometido a presiones de selección que reducen la probabilidad de inducción de mixis, es de esperarse un incremento de la fase asexual en individuos que habitan regularmente la columna de agua. Por el contrario, los individuos eclosionados de los huevos diapáusicos deberán tener una mayor tendencia a inducir la reproducción sexual.

Dadas las diferencias en los patrones de reproducción de las poblaciones nominales, “población latente” (individuos que habitan la columna de agua) y “población activa” (individuos eclosionados de huevos diapáusicos) es de esperarse que existan diferencias genéticas (marcadores moleculares) y fenéticas (morfología y eficacia biológica).

## Objetivos

### Objetivo General

Comparar los patrones reproductivos, rasgos de crecimiento poblacional, morfología y genética entre individuos clonales del rotífero *B. grupo plicatilis* obtenidos de la columna de agua vs. aquellos obtenidos del banco de huevos de resistencia (denominadas poblaciones activa vs. latente).

### Objetivos Particulares

- Caracterizar y comparar los patrones de inducción de mixis asociados a la densidad poblacional en diversas variantes clonales del rotífero *B. grupo plicatilis* provenientes de la población activa vs. la población latente.
- Analizar la divergencia morfológica interclonal utilizando morfología geométrica con la finalidad de evaluar la posible divergencia interpoblacional.
- Analizar la divergencia genética por medio de marcadores neutrales con la finalidad de evaluar la posible divergencia interpoblacional.

## Área y especie de estudio

Alchichica es un lago cráter que se encuentra entre los estados de Puebla y Veracruz, las coordenadas geográficas son 19°24'22" N y 97°23'52" W, a una altitud de 2,345 m s.n.m. Tiene una forma semicircular, es uno de los lagos naturales más profundos en México, con una profundidad máxima cercana a los 62 m y una profundidad media de 40.9 m, tiene pendientes abruptas desde la orilla, un diámetro de 1.8 km, un área de 2.3 km<sup>2</sup>, un volumen de  $9.4 \times 10^7$  m<sup>3</sup> y un perímetro de 5.06 km. La zona litoral tiene un área aproximada del 1% del área superficial del lago (Figura 2; Filonov *et al.*, 2006).

Sus aguas provienen principalmente del manto freático y en menor proporción de la escorrentía de lluvia hacia el agua superficial o subsuperficial. Alchichica presenta aguas hiposalinas ( $8.7 \pm 0.29$  g L<sup>-1</sup>) y un pH básico que fluctúa entre 8.7 a 9.2. Este lago sigue el típico patrón estacional de un cuerpo monomítico cálido, mezclándose completamente a una temperatura entre 14.2 y 15°C, aproximadamente a partir de finales de diciembre o principios de enero y finalizando en marzo. La estratificación se extiende al resto del año (Macek *et al.*, 2009).

Durante los periodos de estratificación, el oxígeno disuelto (OD) en los primeros 20 m es bastante estable. La sobresaturación se alcanza durante la estratificación temprana. Durante la estratificación bien establecida el OD disminuye rápidamente en la zona superior de la termoclina llegando a valores  $\leq 0.2$  mg L<sup>-1</sup> a pocos metros por debajo del metalimnion. El hipolimnion es completamente anóxico de mayo a diciembre (Macek *et al.*, 2009).

De acuerdo con la radiación fotosintéticamente activa (PAR), la zona eufótica ( $\geq 1\%$  PAR) varía de 15 a 20 m durante la mezcla y hasta los 35 m durante la estratificación, encontrando frecuentemente sus límites en el metalimnion (Macek *et al.*, 2009; Ciro-Pérez *et al.*, 2015). Este lago se clasifica como oligo-mesotrófico, con concentraciones promedio de clorofila *a* en la columna de agua de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , aproximadamente. Las mayores concentraciones ( $>10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) se alcanzan en enero, coincidiendo con la mixis, o en el metalimnion en la época de estratificación plena (Macek *et al.*, 2009; Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011).

En el lago Alchichica se encuentran dos especies de rotíferos de hábitos pelágicos, *Brachionus* sp. 'México' (del complejo *B. plicatilis*; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Mills *et al.*, 2017) y *Hexarthra jenkiniae* (Lugo *et al.*, 1999), los cuales se presentan en periodos intermitentes. Una especie de copépodo calanoideo (*Leptodiaptomus garciai*; Montiel-Martínez *et al.*, 2008) presente a lo largo del año, con densidades que varían entre la temporada de circulación y estratificación (de 497 a 2 ind.  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente) siendo más abundante después de los florecimientos de diatomeas y cianofíceas (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011). En la columna de agua también se encuentran una especie de copépodo ciclopoide (*Tropocyclops* sp.), aunque aparece esporádicamente en bajas densidades. El depredador superior en la zona pelágica es el pez planctívoro *Poblana alchichicana*, el cual es muy abundante en primavera (Alcocer *et al.*, 2009; Ciro-Pérez *et al.*, 2015).

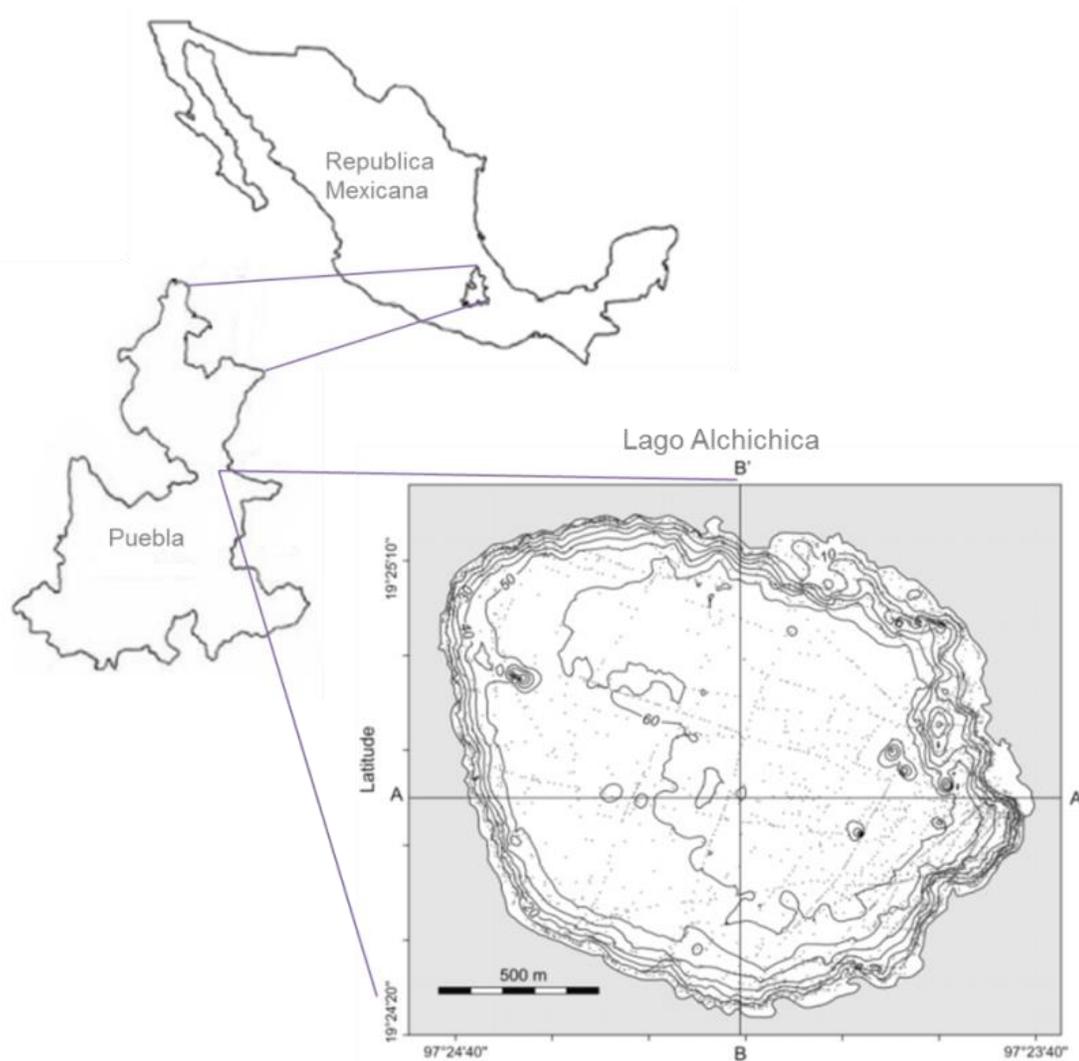


Figura 2. Localización geográfica del Lago Alchichica dentro de la República Mexicana, curvas batimétricas del lago (tomado y modificado de Filonov *et al.*, 2006).

Recientemente, Alcántara-Rodríguez *et al.* (2012) realizaron un análisis comparado de las poblaciones de los rotíferos *B. grupo plicatilis* que sólo habita en los lagos de la Cuenca Oriental, México (Alchichica, Atexcac y La Preciosa), en el que describen que las poblaciones que habitan estos lagos presentan diferencias en su intervalo de adaptación, pero que pueden reproducirse entre ellas sin problemas aparentes, pero no con individuos provenientes de otras especies filogenéticamente cercanas. Con ayuda del gen

mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) y del gen nuclear Espaciador Transcribible Interno 1 (ITS1), se llegó a la conclusión de que estas tres poblaciones son una sola especie que aún no ha sido descrita y dentro de *B. grupo plicatilis* pertenece al clado de tamaño intermedio SM (*Small-Medium*; Alcántara-Rodríguez *et al.* 2012; Mills *et al.*, 2017). Esta especie microendémica es denominada por el momento *B. sp. 'México'*.

Adicionalmente, con el objetivo de analizar la divergencia intra e interpoblacional de *B. sp. 'México'*, J. A. Alcántara-Rodríguez y J. Ciro Pérez (datos no publicados) realizaron un análisis genómico, por medio de Genotipificación por Secuenciación (GBS) la cual consiste en la utilización de enzimas de restricción para reducir el genoma y adaptadores especiales que permiten la secuenciación masiva (Davey *et al.*, 2011). Este análisis se centra en la comparación de las secuencias genéticas de los individuos en busca de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Los SNPs representan variaciones genéticas localizadas a lo largo de todo el genoma, tanto en genes estructurales como en regiones no codificantes. Los polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Las formas alternativas de los polimorfismos (alelos) son más frecuentes que las mutaciones; esto es, tienen una frecuencia mayor al 1% en la población de estudio (Kumar *et al.*, 2014), y no se modifican mucho de una generación a otra, por ello es sencillo seguir su evolución en estudios poblacionales (Seal *et al.*, 2014). A partir de estos resultados, fue posible distinguir una alta variabilidad genética y las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de los tres lagos, que sugiere que la población de Alchichica fue aquella a partir de la cual se colonizaron los otros dos lagos (Alcántara-Rodríguez, 2018).

## Métodos

### Establecimiento y mantenimiento de las poblaciones experimentales

Para llevar a cabo el trabajo experimental se establecieron en el laboratorio cepas de las poblaciones de los rotíferos *B. sp.* 'México' a partir de muestras vivas de zooplancton (denominada población activa) y a partir de huevos de resistencia aislados de sedimentos (denominada población latente) del lago cráter Alchichica.

#### ❖ Población activa

Para fundar la población activa experimental de rotíferos se obtuvieron muestras vivas de zooplancton en los meses de agosto-septiembre (temporada de estratificación) y febrero-marzo (temporada de mezcla). A partir de las muestras de campo, se aislaron aleatoriamente numerosas hembras de *B. sp.* 'México'. Se asume que estas hembras representaban la variabilidad de genotipos de *B. sp.* 'México' en la columna de agua. Al momento de aislarlas, cada hembra se colocó individualmente en una placa multipocillos con 1 mL de medio de cultivo a una salinidad de 9 g L<sup>-1</sup>. Se dejaron reproducir partenogénicamente bajo condiciones de luz (35  $\mu\text{mol quanta cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y temperatura (18  $\pm$  1°C) constantes, hasta que fue posible observar diversos descendientes al microscopio. A partir de estos individuos clonales, se establecieron las diferentes cepas monoclonales, de las cuales se seleccionaron al azar cuatro de cada temporada (ocho en total).

## ❖ Población latente

Para la población latente se obtuvieron muestras de sedimento de la parte profunda (55-60 m) del Lago Alchichica por medio de una draga tipo Eckman de 25×25 cm. A partir de estas muestras se tomaron los sedimentos de los 3 cm más superficiales, los cuales fueron transportados al laboratorio a una temperatura de 4°C (Hagiwara & Hino, 1989). En el laboratorio las muestras se almacenaron a 4°C y se mantuvieron en oscuridad por lo menos durante 30 días como periodo refractario (Cáceres, 1997).

Para aislar los huevos diapáusicos se siguió el procedimiento de extracción por flotación en sacarosa descrito por Onbé (1978) modificado, esta técnica ha sido utilizada con éxito para la extracción y aislamiento de formas de resistencia de multitud de organismos zooplanctónicos (véase, p.e., Gómez & Carvalho, 2000; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Se tomaron 3 g de sedimento (en peso húmedo) que se resuspendieron con una solución de sacarosa 1:1 p/v y se homogenizó. El sedimento se depositó en tubos de centrifuga de 50 mL y se rellenaron con la misma solución de sacarosa hasta el volumen final de 45 mL. Posteriormente, los tubos que contenían la mezcla de sedimento y sacarosa se centrifugaron a 1,000 rpm durante 5 min. Tras el centrifugado, el material de baja densidad que permaneció en suspensión se decantó y filtró a través de una malla con diámetro de poro de 30 µm. Con este procedimiento se eliminaron los componentes más finos del sedimento. El material retenido en el filtro, entre el que se encontraban los huevos diapáusicos de rotíferos, se lavó con agua salina abundante para eliminar los restos de sacarosa. Los huevos se transfirieron a una placa Petri donde se procedió a la

identificación y aislamiento de los huevos pertenecientes a las especies del complejo *B.* sp. 'México' con un microscopio estereoscópico a bajos aumentos.

Sólo se aislaron aquellos huevos diapáusicos que presentaban: (1) las cubiertas protectoras intactas y (2) evidencia de contenido embrionario íntegro (véase García-Roger, 2006). Cada huevo fue colocado individualmente en placas multipocillos que contenían 1 mL de medio con 9 g L<sup>-1</sup> de salinidad (Gómez *et al.*, 2002; Ortells, 2002), y se incubaron a 18°C en condiciones de iluminación constante. Estos cultivos se monitorearon para detectar las eclosiones y la aparición de hembras neonatas. Se renovó el medio cada dos días para prevenir el crecimiento de hongos y bacterias sobre la superficie de los huevos que pudiera afectar a la eclosión de los mismos (Balompapueguen *et al.*, 1997).

A partir de los rotíferos eclosionados se establecieron 8 cultivos monoclonales (Tabla 1), las hembras neonatas se transfirieron individualmente a placas multipocillos que contenían 1 mL de medio de cultivo a 9 g L<sup>-1</sup> de salinidad, debidamente alimentados y se dejaron proliferar partenogenéticamente bajo las mismas condiciones de luz y temperatura descritos previamente.

Los cultivos stock de las dos poblaciones (activa y latente) se traspasaron y mantuvieron en tubos de ensayo con 15 mL del medio de cultivo y estuvieron en observación y recambio constante para prevenir la reproducción sexual, hasta que fueron utilizados en los experimentos.

## Mantenimiento de los cultivos

Los organismos fueron alimentados utilizando la microalga *Tetraselmis suecica* a una densidad relativamente alta ( $\geq 6 \text{ mg C L}^{-1}$ ; Ciro-Pérez *et al.*, 2001a). Semanalmente se eliminó una fracción del cultivo de rotíferos y se reemplazó con nuevo medio de cultivo (i.e., *T. suecica* en la densidad adecuada). Los cultivos de *T. suecica* crecieron en medio de cultivo salino ( $9 \text{ g L}^{-1}$ ) que se preparó disolviendo sales marinas comerciales (Instant Ocean®, Aquarium Systems™) en agua electrodesionizada (Milipore®, Elix 5) y autoclavada, que se fertilizó con el medio F/2 (Guillar & Ryther, 1962; véase, Andersen, 2005) antes de la inoculación. La tasa de dilución ( $D$ ) que se empleó fue  $0.7 \text{ semana}^{-1}$  (Boraas, 1993).

## Inducción de mixis asociada a la densidad poblacional

Durante el primer día del experimento, se aislaron de los cultivos stock 400 hembras de *B.* sp. 'México' pertenecientes a los 8 diferentes clones de la población activa (50 hembras  $\times$  8 clones) y 400 hembras pertenecientes a 8 diferentes clones de la población latente (50 hembras  $\times$  8 clones) para fundar las poblaciones experimentales.

Las hembras de cada clon se colocaron en matraces Erlenmeyer con 1000 mL de medio a  $9 \text{ g L}^{-1}$  y se les alimentó con *T. suecica* ( $6 \text{ mg C L}^{-1}$ ), bajo condiciones de luz ( $35 \mu\text{mol quanta cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), temperatura ( $18\pm 1^\circ\text{C}$ ) y aireación constante. Diariamente se colectaba una fracción (100 mL) del cultivo para cuantificar la densidad poblacional y el porcentaje de mixis y se reemplazaba con medio fresco.

El porcentaje de mixis en los cultivos fue estimado con una muestra de 96 hembras jóvenes que fueron aisladas individualmente en placas multipocillo de poliestireno con 24 pozos, cada pozo fue llenado con 1 mL de medio de cultivo (salinidad: 9 g L<sup>-1</sup>) que contenía *T. suecica* a una densidad de 6 mg C L<sup>-1</sup> y cultivadas en las condiciones experimentales generales.

Para determinar el tipo reproductivo de la descendencia, las hembras fueron clasificadas como míticas si producían machos o huevos de resistencia, y amíticas si producían hembras. La fracción restante se fijó con formaldehído al 4% para poder estimar la densidad poblacional de cada cultivo usando una cámara de sedimentación (McCauley, 1984).

El momento de inicio de la reproducción sexual se determinó cuando se observó el primer descendiente macho en el cultivo, tomando en cuenta cuantos días habían pasado desde el inicio del experimento y la densidad poblacional alcanzada hasta este punto, posteriormente se comparó entre los diferentes cultivos.

Las observaciones diarias y los recuentos de hembras míticas y amíticas se realizaron durante 18 días (momento en el cual la mayoría de los cultivos habían alcanzado la fase estacionaria). Como se conocía la densidad poblacional, se calculó la cantidad de hembras míticas y amíticas como porcentaje.

Se comparó la densidad de la población activa vs. la población latente durante los últimos 5 días del experimento usando Modelos Lineales Generalizados (GLM, McCullagh, 1989) con la función *glm*, asumiendo una distribución gaussiana (*link= identity*), el tipo de

población y el tiempo fueron considerados como factores fijos. Para calcular la tasa intrínseca de crecimiento ( $r$ ) se utilizaron aquellos clones que alcanzaron un coeficiente de variación del 15% en los últimos días del experimento de esta manera se identificó que el crecimiento estaba frenando y por lo tanto los clones alcanzaban la capacidad de carga ( $K$ ). Se realizó el modelado del crecimiento poblacional como una función logística, de la siguiente manera:  $K/(1+((K-N_0)/N_0)*EXP(1-r*t))$  (Dimas-Flores, manuscrito en preparación) donde  $K$  es la capacidad de carga que alcanzo cada una de las dinámicas de crecimiento,  $N_0$  es el número inicial de organismos en el cultivo,  $r$  es la tasa de crecimiento per cápita; todos los casos se le asignó el valor de 1 asumiendo que las poblaciones se mantenían en crecimiento.  $t$  es el tiempo en días (18 días de experimento), los resultados capturados se analizaron con el test U de Mann-Whitney para analizar la diferencias entre las poblaciones, ambas pruebas se realizaron con ayuda del software IBM® SPSS® Statistics (SPSS® Inc, 2010). La tasa de mixis y la densidad poblacional se combinaron para calcular una inversión integrada en la reproducción sexual de la siguiente manera:

$$\frac{\sum d_i(m_i N_i N_i + m_i + 1 N_i + 1)/2}{\sum d_i(N_i + N_i + 1)/2}$$

Donde  $m_i$  es la tasa de mixis y  $N_i$  la densidad poblacional en el  $i$ -ésimo evento de muestreo y  $d_i$  es el número de días desde  $i$  a  $i+1$  (Carmona *et al.*, 1995). También se comparó el porcentaje de mixis entre las poblaciones usando GLMs con una distribución de Poisson ( $link = log$ ). En ambos casos se utilizó el programa R versión 3.4.2 (Team R Core, 2017); la población y el tiempo se consideraron como factores fijos.

## Análisis morfológicos

Durante la realización del experimento descrito previamente, se observó que los organismos provenientes de los dos tipos poblacionales presentaban tallas diferentes a pesar de que provenían de clones cultivados en laboratorio a lo largo de varios meses, por lo cual no se podía asumir un efecto materno (Gilbert, 2007). De acuerdo con esta observación, se procedió a realizar análisis morfológicos e identificar si es que estas diferencias entre ellos eran significativas.

Estos análisis se realizaron tomando imágenes digitales de 60 individuos pertenecientes a la población activa y 60 imágenes de individuos pertenecientes a la población latente. Para estandarizar a las hembras que se utilizarían para el análisis, se seleccionaron aquellas que presentaban un único huevo subitáneo, esto para asegurar que ya tenían la talla de adulta y reducir la variabilidad.

Posteriormente, fueron fijadas con formaldehído al 4% y se les tomaron fotografías de forma individual con un microscopio Leica® DMLB2 y una cámara digital Motic Imagic plus 2.0®, con el software Motic Imagic plus 2.0, previamente calibrado siguiendo las especificaciones del fabricante. Todas las mediciones fueron obtenidas en  $\mu\text{m}$  y se les promedió. Las imágenes obtenidas fueron de una resolución de  $2088 \times 1550$  píxeles en un formato de mapa de bits (\*.bmp).

Sobre las imágenes se realizaron las mediciones de los caracteres morfológicos más relevantes de los rotíferos del grupo *B. sp.* 'México' con base en lo reportado por Ciro-Pérez *et al.* (2001b) y Alcántara-Rodríguez (2010). Los caracteres medidos son: el largo de

la loriga y el ancho de la loriga. Los resultados capturados de las mediciones fueron analizados con el test U de Mann-Whitney para ver las diferencias entre las poblaciones con ayuda del software IBM® SPSS® Statistics (SPSS® Inc, 2010).

El análisis de morfología geométrica consiste en utilizar marcas (denominadas *landmarks* en inglés) en zonas de importancia morfológica, transformando su imagen a un polígono en un plano cartesiano (Klingenberg, 2011). Para trabajar con las marcas fue necesario la transformación de las fotografías tomadas a imágenes digitales con formato \*.tps con ayuda del software TPSutil® y luego se colocaron las marcas con el software TPSDig2® (Viscosi & Cardani, 2011). Se utilizó el software MorphoJ® desarrollado por Klingenberg (2011) debido a su conjunto de funciones y análisis que toman en cuenta la simetría de la configuración de las marcas y sus herramientas para observar la varianza morfológica (Klingenberg, 2011). Las imágenes digitales con las marcas fueron cargadas en el software, procesando los puntos seleccionados y expresándolos en coordenadas de GPA (análisis generalizado de Procrustes) y con esta información se realizaron los análisis (Klingenberg, 2011; Viscosi & Cardani, 2011).

Las fotografías tomadas fueron transformadas en imágenes digitales a las cuales se les colocaron siete marcas (Fig. 3): cinco en las espinas y apertura de la cabeza, uno en la parte media y más ancha de la loriga y el último en la parte más alejada de la loriga cerca de la apertura del pie.

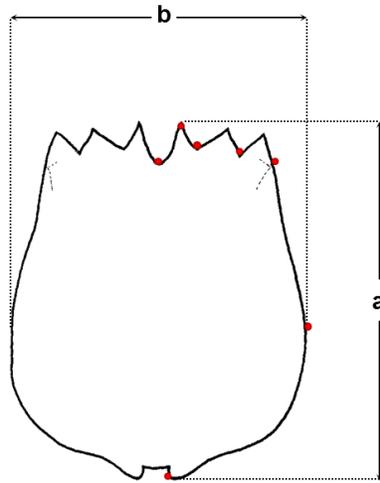


Figura 3. Se muestran las variables utilizadas para los análisis morfológicos: a) largo de la loriga y b) el ancho de la loriga. Las marcas se denotan con puntos rojos. Imagen tomada y modificada de Ciro-Pérez *et al.* (2001).

## Análisis de divergencia genética

Como representantes de la población activa se tomaron 10 clones de la columna de agua, mantenidos en condiciones de laboratorio, para la población latente, se aislaron huevos de resistencia para obtener al menos 10 variantes genéticas siguiendo el protocolo de extracción por flotación y caracterización como se ha describió anteriormente.

Se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo de extracción Hot-SHOT (Montero-Pau *et al.*, 2008) modificado. Para cada uno de los huevos de resistencia aislados ( $n = 10$ ) se utilizó 10  $\mu$ l de solución lítica, además de macerar mecánicamente, posteriormente, se mantuvieron en incubación a 95°C durante 30 min y finalmente se le agregó 10  $\mu$ L de neutralizador. Para la población activa se realizó un concentrado de rotíferos ( $n = 10$ ) de cada clon, utilizando 20  $\mu$ L de solución lítica y se maceró mecánicamente, posteriormente se mantuvieron en incubación a 95°C durante 30 min y finalmente se le agrego 20  $\mu$ L de neutralizador.

En base al análisis genómico previamente realizado por J. A. Alcántara-Rodríguez y J. Ciroso Pérez (datos no publicados) de la población de *B. sp.* 'México' del Lago Alchichica, así como del análisis de genómica de poblaciones por medio de GBS proporcionados por Alcántara-Rodríguez (2018), se obtuvo un conjunto de librerías las cuales fueron mapeadas para la posterior identificación de SNPs.

Para este análisis, se identificaron SNPs presentes en regiones no codificantes del genoma nuclear ya que estas zonas acumulan una cantidad mayor de mutaciones en comparación con zonas codificantes y, por lo tanto, pueden ser un indicador de la variabilidad genética

intrapoblacional entre individuos. A partir de zonas identificadas con SNPs se diseñaron 5 juegos de marcadores moleculares (*primers*) en regiones neutrales utilizando el programa Geneious 7.1<sup>®</sup>. Las secuencias de los *primers* diseñados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligos (*primers*) utilizados en este estudio. Se representa el nombre del *primer*, la secuencia y el largo de cada uno. Los oligos subrayados son aquellos que fueron útiles para los análisis de divergencia genética (véanse Resultados).

Nombre del Oligo	Secuencia	Largo (pb)
16277F	GACCAAACATGAGCACCCAAG	21
16227R	AGTTTTAAACCCTTTATCCTGCG	23
<u>1985F</u>	<u>AGAGATGATGAACGAAGACAAGCC</u>	<u>24</u>
<u>1985R</u>	<u>TGGTAAAGTGCTGGCAGATCC</u>	<u>21</u>
8537F	ACGTGGTTTTCTACAGTCTCC	21
8537R	CATTACCGATAACGACTCTCTGC	23
8727F	CTACTCGACAGGAAGACATCG	21
8727R	GGTCGACCGTATCCCTCC	19
<u>8927F</u>	<u>GGCTCTATTGGAATGATCCAAAGC</u>	<u>24</u>
<u>8927R</u>	<u>TTACTTTTGAATTGGAAGCATCAC</u>	<u>24</u>

Los oligos fueron probados realizando la amplificación de ADN mediante la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 14 µL usando 2 µL de DNA, 1 x PCR buffer 0.5 µL de cada oligo y 11 µL de Taq 2x DNA Polymerase Master mix RED (Ampliqon©). Se realizó un perfil de temperaturas con un termociclador (Boeco Thermal Cycler TC-SQ) para saber cuál era la temperatura de amplificación óptima para cada uno. Desde este paso fue descartado el par 8537 ya que nunca se observó amplificación alguna. Para el par 16227 y 8927 consistió

en un ciclo inicial de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 s, la amplificación fue a 60°C por 30 s, una extensión a 72°C por 40 s, y otra extensión final de 72°C por 3 min. Para el par 1985 consistió en un ciclo inicial de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 s, la amplificación fue a 61°C por 30 s, una extensión a 72°C por 40 s, y otra extensión final de 72°C por 3 min., finalmente para el par 8727 consistió en un ciclo inicial de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 s, la amplificación fue a 58°C por 30 s, una extensión a 72°C por 40 s, y otra extensión final de 72°C por 3 min.

Una vez finalizada la reacción de PCR se procedió a la identificación de los productos. Se separaron 5 µL del producto obtenido de PCR sometiéndolos a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, es decir, a un proceso de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico. Para visualizar las muestras en el gel estas fueron teñidas con el tinte fluorescente Midori Green Direct© (Nippon Genetics Europe) y fue visualizado bajo luz UV en un transiluminador para estimar el tamaño de los fragmentos.

Los productos de PCR se secuenciaron bidireccionalmente usando un secuenciador automático capilar ABI 3730 (Laboratorio de Análisis y Química de ADN, FES Iztacala, UNAM) basado en el método de secuenciación de Sanger. Las secuencias fueron editadas, ensambladas manualmente y alineadas usando el método de MUSCLE en CodonCode Aligner V3.7I. Posteriormente, se analizaron las secuencias y manualmente se anotaron las diferencias entre ellas, es decir si algún par de bases presentaba heterocigosis u homocigosis, se anotaron los haplotipos correspondientes y se compararon para saber si existían diferencias entre las poblaciones de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg

y el equilibrio de ligamiento para identificar el número de grupos genéticamente distintos ( $k$ ) con ayuda del programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000).

## Resultados

### Respuesta de mixis a la densidad poblacional

Las hembras amícticas de las dos poblaciones nominales analizadas no presentaron inducción de mixis a densidades poblacionales bajas, esta sólo se presentó cuando incrementó la densidad poblacional (Fig. 4). Los análisis estadísticos mostraron que al comparar el comportamiento de ambas poblacionales en los últimos 5 días indican que los factores tiempo y población, así como la interacción entre ellos tienen efectos significativos en la variable densidad poblacional (GLM test;  $P < 0.01$ ). De igual manera, al comparar los porcentajes de inducción de mixis, los análisis indican que tanto el tiempo, el tipo poblacional, así como la interacción entre los dos factores determinan la inversión en reproducción sexual (GLM test;  $P < 0.01$ ). La tasa de mixis mostró diferencias significativas para ambas poblaciones (U de Mann-Whitney;  $P > 0.05$ ). La tasa intrínseca de crecimiento poblacional ( $r$ ) no presentó diferencias significativas entre ambas poblaciones, sin embargo si mostró diferencias significativas en la capacidad de carga ( $K$ ) (U de Mann-Whitney;  $P > 0.05$ ).

Para la población activa comienza la producción de descendencia míctica en una densidad de  $1387.14 \pm 124.61$  org.  $L^{-1}$  (i.e., 1 hembra en  $720 \mu L^{-1}$ ; Fig.5A) a partir del día  $6.56 \pm 0.61$  (Fig. 5B) con sólo el  $2.5 \pm 1.44$  % de mixis. Esta población alcanza su capacidad de carga alrededor de los  $3,486.25 \pm 545.35$  org.  $L^{-1}$  (~1 hembra en  $250 \mu L^{-1}$ ), siendo hembras

mícticas el  $9.37 \pm 2.15$  % de la progenie, comenzando a estabilizarse aproximadamente en el día 12 (Fig. 4).

Por otra parte, la población latente comienza la producción de descendencia mítica a densidades poblacionales menores a  $1 \text{ org. mL}^{-1}$  ( $0.91 \pm 0.02 \text{ org. mL}^{-1}$ ; Fig. 5A) al cuarto día del inicio del experimento ( $4.37 \pm 0.37$  días; Fig. 5B), con el  $5.62 \pm 1.57$  % de mixis. La densidad poblacional continuó incrementando a lo largo del experimento. Sin embargo, la producción de hijas míticas se estabilizó aproximadamente a una densidad de  $5,728.12 \pm 284.12 \text{ org. L}^{-1}$  ( $\sim 1$  hembra en  $200 \mu\text{L}^{-1}$ ) con  $19.06 \pm 1.33$  % de mixis, la cual se mantuvo fluctuando alrededor de esta proporción a partir del día 12 hasta el final del experimento (Fig. 4). Aunque el crecimiento poblacional comenzaba a frenarse, no se alcanzó a observar la capacidad de carga en todas las poblaciones cuando se dio por terminado el experimento; en este momento había una densidad máxima de  $11,459.37 \pm 306.27 \text{ org. L}^{-1}$  ( $\sim 1$  hembra en  $87 \mu\text{L}^{-1}$ ).

Las dos poblaciones muestran una tasa de crecimiento poblacional muy similar, para la población activa  $r = 0.349 \text{ d}^{-1}$  y para la población latente  $r = 0.364 \text{ d}^{-1}$  (U de Mann-Whitney;  $P > 0.05$ ), sin embargo si se observan diferencias significativas en la capacidad de carga (U de Mann-Whitney;  $P < 0.05$ ), para la población activa  $K = 7.8 \text{ org. mL}^{-1}$  y la población latente  $K = 12.84 \text{ org. mL}^{-1}$  esta última variable es la que diferencia notablemente las dinámicas de crecimiento poblacional, aunado a las diferencias significativas encontradas en la tasa de mixis ( $m$ ) (U de Mann-Whitney;  $P < 0.05$ ), para la población activa  $m = 7.21$  % y la población latente  $m = 17.28$  %.

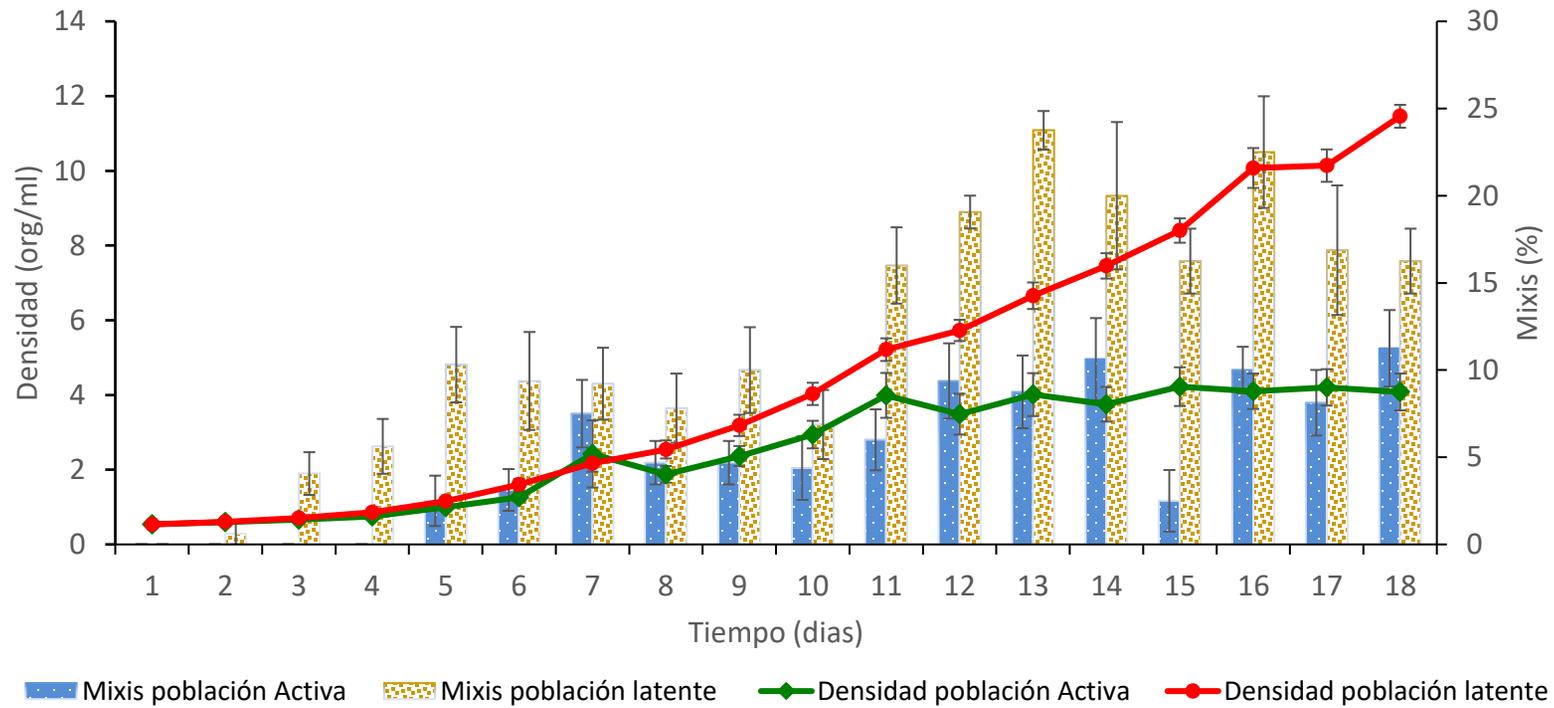


Figura 4. Dinámica de la densidad poblacional y de la razón de mixis del rotífero *B. sp.* 'México' analizados en la población activa (proveniente de la columna de agua) y latente (proveniente del banco de huevos de resistencia) del lago Alchichica en condiciones de laboratorio ( $9 \text{ g L}^{-1}$ ). Se presentan los valores medios  $\pm$  error estándar de ocho clones, con dos repeticiones cada uno, de las dos poblaciones analizadas.

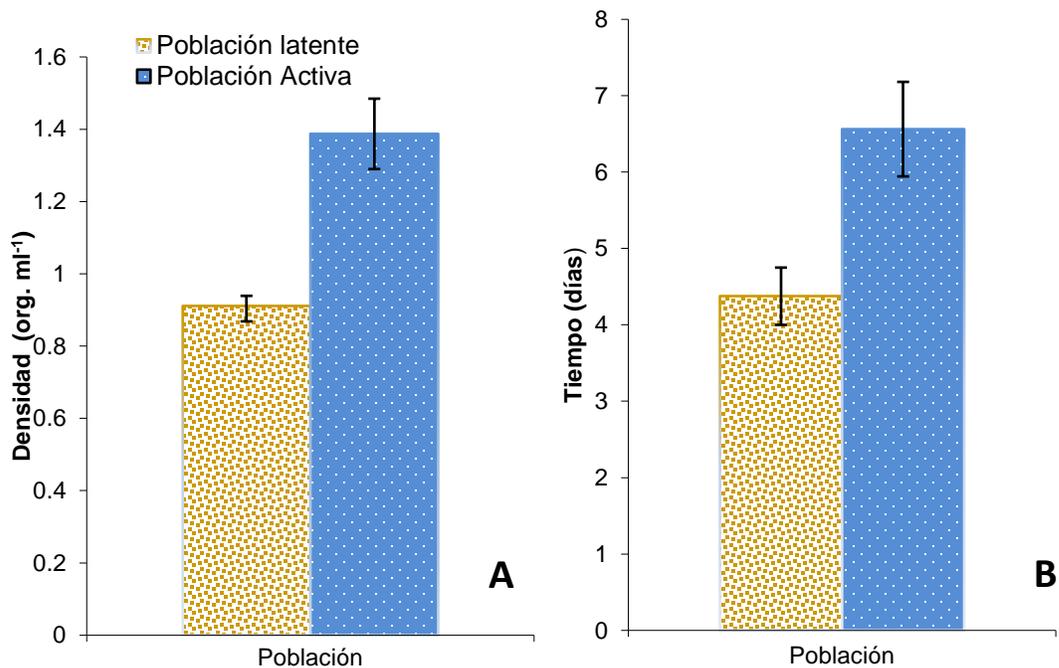


Figura 5. (A) Densidad poblacional, y (B) momento (tiempo transcurrido desde el inicio del experimento) en los cuales se observa por primera vez la presencia de hembras sexuales (inicio de la mixis) del rotífero *B. sp.* 'México' de la población activa vs. latente provenientes del lago Alchichica. Se presentan los valores medios  $\pm$  error estándar de ocho clones, con dos repeticiones cada uno, de las dos poblaciones analizadas.

### Analisis Morfológicos

Se observaron diferencias significativas en el largo y ancho de la loriga (U de Mann-Whitney;  $P > 0.05$ ) entre los individuos pertenecientes a la población activa vs. la población latente (véase Fig. 6A y 6B, que muestran individuos representativos de cada población). El resultado general es que los individuos de la población activa son significativamente más pequeños que aquellos eclosionados de las huevos de resistencia (Fig. 7).

Para el largo de la loriga los individuos pertenecientes a la población activa en promedio muestran  $159.28 \pm 2.19 \mu\text{m}$  mientras que para la población latente es de  $242.94 \pm 3.31 \mu\text{m}$ . En el caso del ancho de la loriga en promedio para la población activa continúa siendo la más pequeña  $115.12 \pm 1.57 \mu\text{m}$ , en comparación con la población latente  $172.74 \pm 1.9 \mu\text{m}$ .

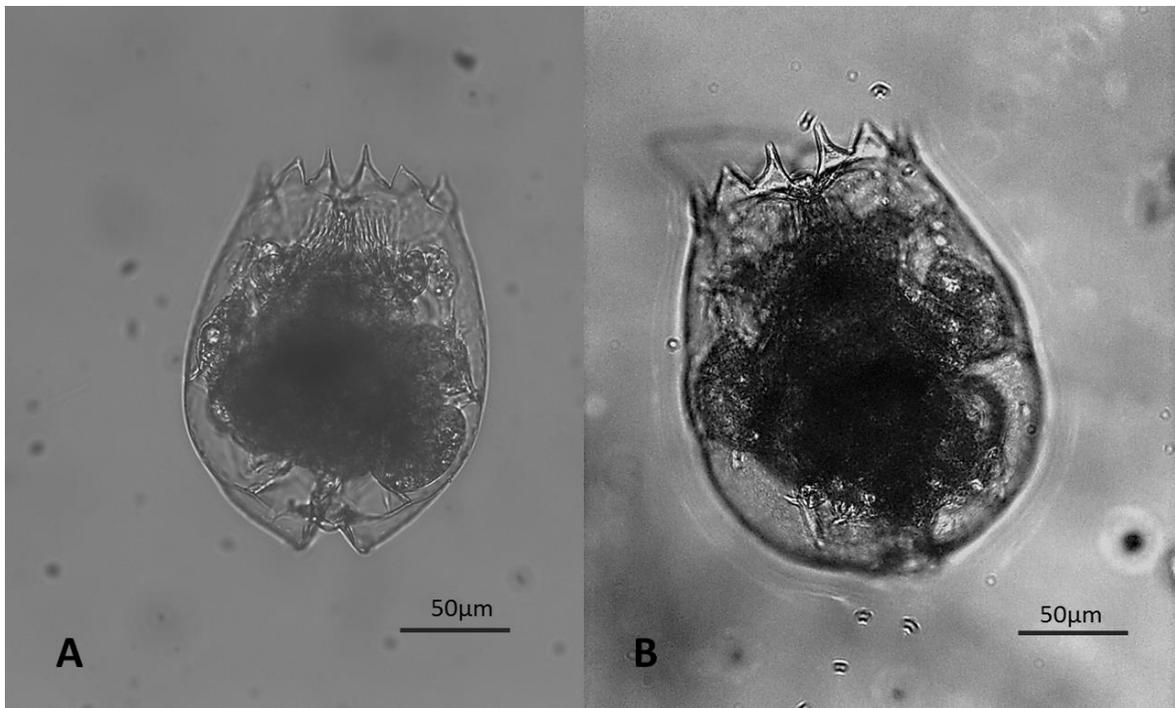


Figura 6. Fotomicrografía de *B. sp.* 'México' del lago Alchichica (20×). (A) individuo representativo de la población activa, y (B) individuo representativo de la población latente. La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

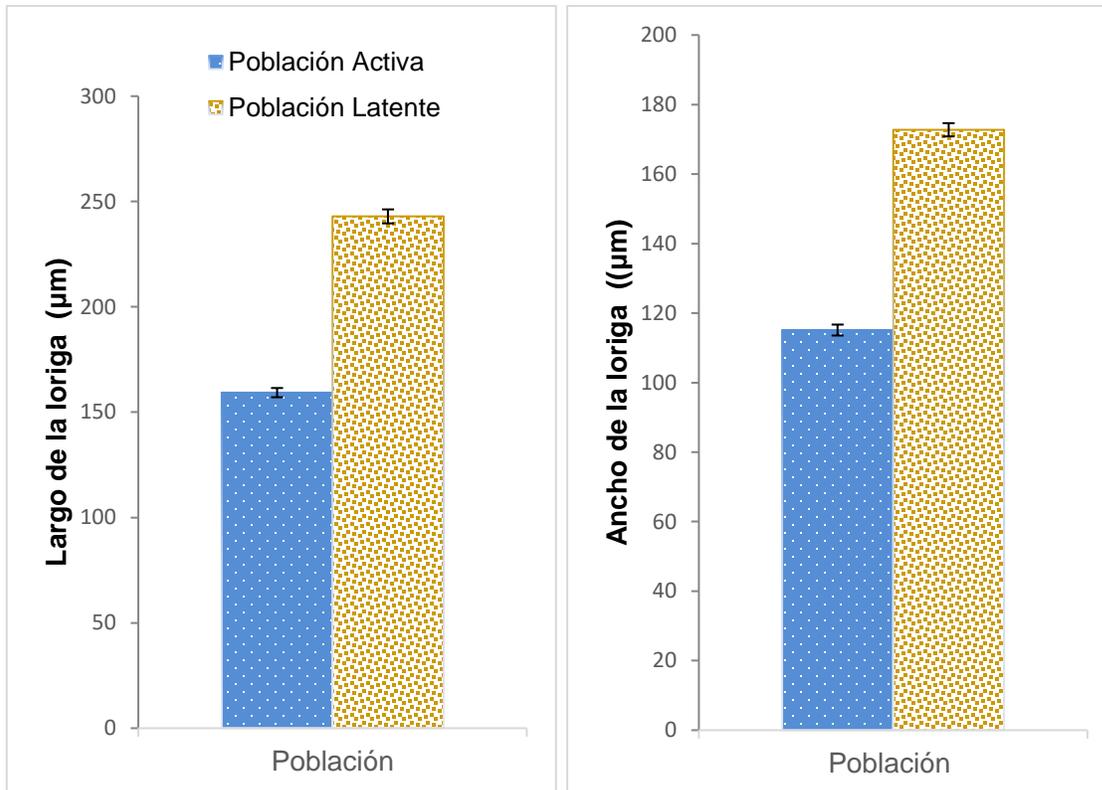


Figura 7. Largo y Ancho de la lorica de los rotíferos analizados para cada población. Se muestran los resultados (media  $\pm$  error estándar) de las mediciones de Largo y Ancho en  $\mu\text{m}$ . Se presentan diferencias significativas para ambas variables según las pruebas U de Mann-Whitney ( $P > 0.05$ ).

El análisis de morfología geométrica mostró que las variables canónicas que presentaron mayor correlación fueron la VC1, con un valor propio (*eigen values*) de 0.635 y un porcentaje de varianza explicada del 49.32%. Esta variable canónica resume principalmente la varianza morfológica en las espinas de la lorica de los rotíferos analizados. Seguida de VC2, que representa la varianza de la forma general de la lorica, la cual presentó un valor propio de 0.364 y un porcentaje de varianza explicado del 28.28%, con un valor porcentual acumulativo entre las dos de 77.6% (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis de correlación canónica de las marcas realizadas en los individuos de *B. sp.* ‘México’. Se observa que la varianza se encuentra explicada por 5 variables canónicas (VC). Se muestran los valores propios y la varianza explicada por cada variable canónica, así como el porcentaje acumulado de esta.

<b>VC</b>	<b>Valor propio (eigen valores)</b>	<b>% varianza</b>	<b>% acumulado</b>
<b>1</b>	0.635	49.32	49.32
<b>2</b>	0.364	28.28	77.60
<b>3</b>	0.181	14.11	91.71
<b>4</b>	0.076	5.93	97.65
<b>5</b>	0.030	2.34	100.00

Por lo tanto, para poder describir gráficamente los patrones de variación entre las dos poblaciones comparando a todos los individuos analizados entre sí, sólo se consideraron las variables canónicas VC1 y VC2. Además, para elaborar una representación tridimensional, se incluyó como tercer eje el largo de la loriga. El resultado de este análisis de Procrustes se muestra en la Figura 8. Se observa que la población activa y la población latente presentan diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) entre sí en su forma (véase el eje VC1) y en el tamaño de los organismos definidos por un centroide y aglomeración de datos bien definidos.

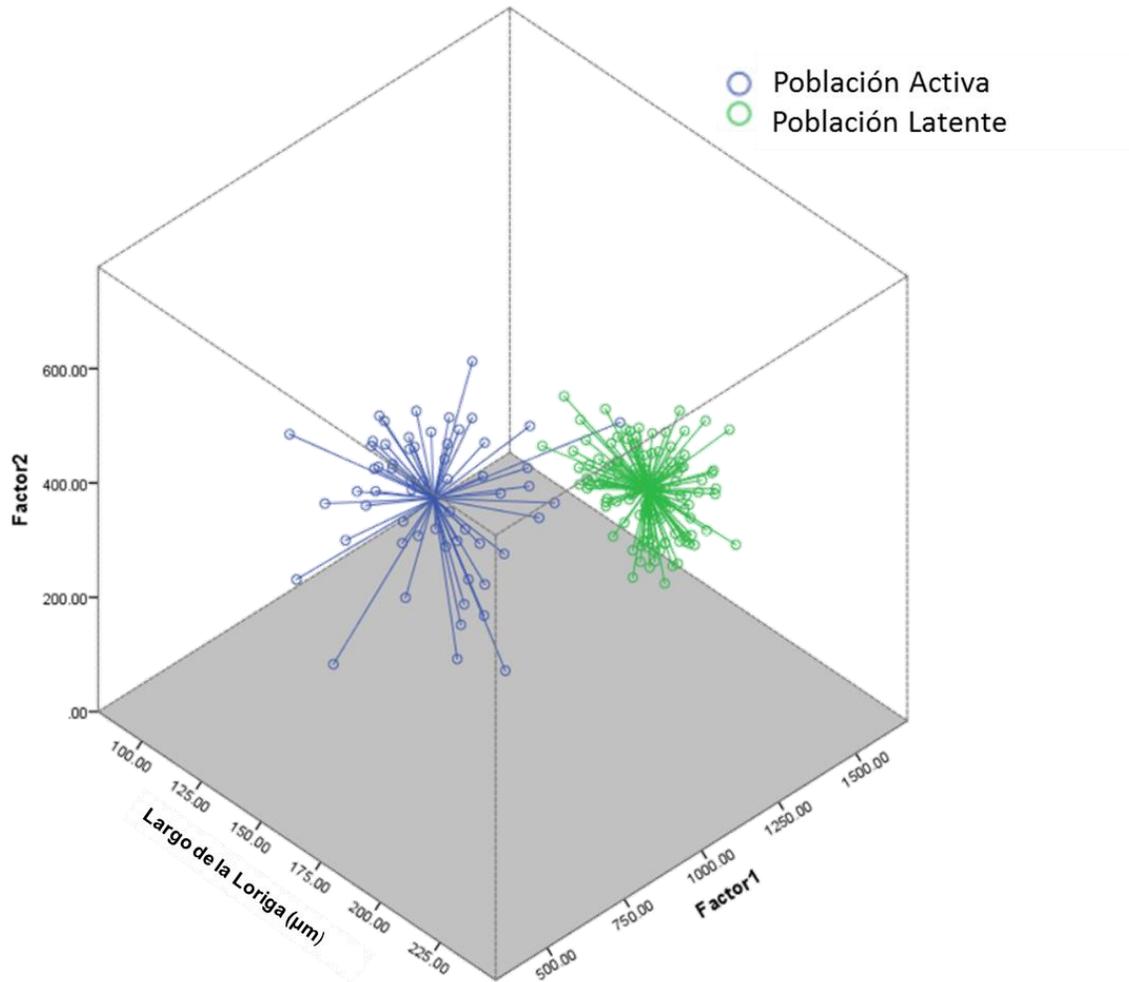


Figura 8. Comparación morfológica de las dos poblaciones (activa vs. latente) del rotífero *B. sp.* 'México' provenientes del lago Alchichica. Se incluyen la Variable Canónica 1 (VC1; Factor 1) y VC2 (Factor 2), resultado del análisis de morfología geométrica así como el largo de la loriga como tercer eje. Cada círculo representa un individuo analizado y las líneas se dirigen al centroide que representa significativamente a cada una de las poblaciones ( $P < 0.01$ ) generando por el análisis de Procrustes.

## Análisis de divergencia genética

Las secuencias obtenidas para los 4 marcadores analizados mostraron que el par de oligos 16227 y 8727 no fue útil, ya que en estos no se encontraron polimorfismos entre los genotipos de ambas poblaciones, sin embargo, el par 8927 y 1985 si mostraron diferencias entre los genotipos de los organismos analizados.

Con los dos oligos seleccionados se secuenciaron 20 individuos, de estas secuencias se encontraron 8 SNPs (Tabla 3). Los números del 1 al 10 en la Tabla 3 representan a los clones pertenecientes a la población latente, mientras que los números de 11-20 son clones de la población activa. Se observa que la mayoría de los individuos analizados comparten SNPs, sin embargo, se encontró que existen genotipos particulares para cada una de las poblaciones.

La prueba de asignación poblacional encontró una mayor probabilidad de formación de tres grupos ( $k = 3$ ), sin embargo, dada la poca información con la que se contaba y la similitud alta entre genotipos de los dos grupos de ambas poblaciones (Fig. 9), el análisis no fue capaz de separar claramente entre las dos poblaciones nominales, por lo que en la Fig. 9 no se aprecia una tendencia clara de diferenciación y por lo tanto una estructura genética.

Tabla 3. SNPs encontrados para la población activa y la población latente, con diferentes colores se representan las bases nitrogenadas.

Población Latente																
1	A	A	G	G	G	G	A	G	A	A	A	A	T	T	T	T
2	A	A	A	A	A	A	A	G	A	G	C	C	A	A	T	T
3	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	C	C	A	A	T	T
4	A	A	A	A	A	A	A	G	A	G	C	C	T	T	C	C
5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	T	T	T	T
6	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	C	C	A	A	T	C
7	A	A	A	A	A	A	A	G	A	G	C	C	T	T	T	C
8	C	C	A	A	A	A	G	G	G	G	C	C	A	A	T	T
9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	T	T	T	T
10	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	C	C	A	A	T	C
Población Activa																
11	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	C	C	A	A	T	T
12	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	C	C	T	T	T	T
13	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	C	C	A	T	T	C
14	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	C	C	A	T	T	C
15	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	C	C	A	A	T	C
16	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	C	C	A	T	T	C
17	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	C	C	A	A	C	C
18	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	C	C	A	T	T	C
19	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	C	C	A	A	C	C
20	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	C	C	A	A	C	C

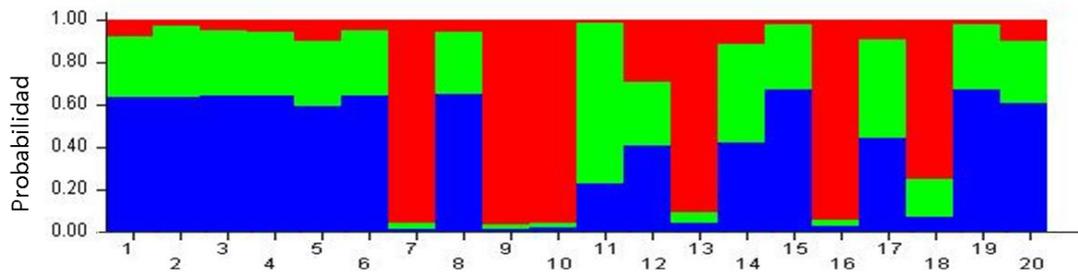


Figura 9. Diferenciación poblacional (STRUCTURE) para  $k = 3$  grupos (representados como colores diferentes). Los números del 1-10 son individuos (cada uno representado por una barra) pertenecientes a la población activa y del 11-20 son individuos pertenecientes a la población latente.

## **Discusión**

Los resultados encontrados en esta investigación muestran que los dos grupos de individuos de rotíferos provenientes de las poblaciones activa (obtenidos de la columna de agua) vs. latente (eclosionados a partir de huevos de resistencia) tienen historias de vida diferenciales. Además, se encontraron diferencias importantes en la morfología de las dos poblaciones nominales. Sin embargo, no se encontró evidencia suficiente para documentar sus diferencias a nivel genético.

### **Crecimiento poblacional e inversión reproductiva**

La población activa mostró un crecimiento logístico, donde después de una fase exponencial el crecimiento tiende a estabilizarse, es decir la población alcanzó su capacidad de carga, la inversión reproductiva (porcentaje de población mítica) incrementó de manera similar a como lo hizo la densidad, también esta comenzó a estabilizarse a densidades intermedias. Serra & King (1999) mencionan que este es un comportamiento de las poblaciones en ambientes estables y recursos o espacio limitados, donde las tasas intermedias de mixis favorecen la máxima conversión de recursos en huevos de resistencia. Las poblaciones que crecen en estos ambientes pueden tener ventajas si se reproducen partenogenéticamente ya que pueden alcanzar su máximo poblacional y luego invertir en una tasa de mixis intermedia.

Por el contrario, la población latente mostró un inicio de mixis significativamente más temprano, con un crecimiento poblacional exponencial a la par que iba ocurriendo

inversión en reproducción sexual. Sin embargo, este comportamiento parece paradójico, pues de acuerdo con Schröder (2005), la selección de la reproducción sexual temprana ocurre de manera más intensa en poblaciones de estanques temporales a diferencia de las poblaciones estacionales de lagos profundos.

En principio, las poblaciones que habitan los lagos temporales deberían de tener tasas relativamente altas de mixis resultado de la selección impuesta por la alta variabilidad ambiental. Si el hábitat es impredecible, la mixis debería comenzar a una densidad poblacional relativamente baja, tan pronto como se tengan las condiciones suficientes para producir huevos de resistencia. De modo que los efectos críticos que tienen los años malos reduciendo la temporada de crecimiento poblacional a periodos cortos, pueden verse mitigados, con la producción de al menos algunos huevos de resistencia que se mantengan hasta el restablecimiento de las condiciones adecuadas (Serra, 1999). Sin embargo, por el contrario, las variantes genéticas que habitan ambientes estables, deberían tener una menor propensión a la reproducción sexual, invirtiendo más en crecimiento poblacional partenogenético; de manera que la inducción de la mixis solo debería ocurrir en condiciones de densidades poblacionales relativamente altas. Por lo que el comportamiento diferente de los individuos de la población latente resulta paradójico.

Se espera que la selección optimice la reproducción sexual en los rotíferos a partir del compromiso de los costos debido a la iniciación de la reproducción sexual demasiado temprano o demasiado tarde (Serra & Carmona, 1993). Si la inversión en la reproducción sexual es temprana, la densidad poblacional puede ser baja y, en consecuencia, la

producción de huevos diapáusicos también puede ser baja, por lo tanto, se desaprovecharía la oportunidad de lograr un tamaño de población mayor mediante el uso de los recursos disponibles. Por el contrario, si la inversión en reproducción sexual es tardía, también puede dar como resultado tanto un tamaño de la población bajo como una inversión sexual baja si en este momento la tasa de crecimiento se ha vuelto negativa debido al deterioro ambiental y al colapso poblacional (Serra *et al.*, 2003). Ya sea por el crecimiento dependiente de la densidad o por la incertidumbre ambiental, la selección favorece la inversión intermedia en reproducción sexual.

Para la población activa, la producción de descendencia mítica comienza más tarde, aproximadamente a partir de los días 6-7, y con una densidad poblacional relativamente alta ( $1.4 \text{ org. mL}^{-1}$ ). Por el contrario, la población latente comienza la producción de descendencia mítica a densidades poblacionales menores ( $<1 \text{ org. mL}^{-1}$ ) y más temprano, al cuarto día del inicio del experimento. Sin embargo, en cualquiera de los dos casos, la inducción de mixis comienza a densidades poblacionales relativamente altas cuando los comparamos con otros experimentos realizados en poblaciones estáticas en el laboratorio.

El límite que activa el cambio de reproducción en *B. plicatilis* oscila alrededor de  $0.07 \text{ org mL}^{-1}$  ( $70 \text{ org/L}$ ) (Snell *et al.*, 2006), mientras que para *B. sp.* 'México' población latente se activa con  $0.91 \text{ org mL}^{-1}$ , que es 13 veces mayor que el umbral de mixis reportado para la especie *B. plicatilis*, pero que es 20 veces mayor en la población activa de Alchichica. Sin embargo, en otras especies del complejo *B. plicatilis*, como por ejemplo *B. manjavacas*, la reproducción sexual tiene lugar desde el tercer día, con una densidad del rotífero de  $0.15$

hembras mL<sup>-1</sup> (Snell, 2017), con un umbral de mixis 6 veces menor que el observado en la población latente y 9 veces menor que en la población activa de Alchichica. De manera similar que para *B. calyciflorus* donde la mixis comienza con una densidad de 0.067 hembras mL<sup>-1</sup> (Gilbert, 2003), el cual es 13 veces menor que el umbral de mixis para la población latente y 21 veces menor para la población activa de Alchichica. Estos resultados resultan interesantes, pues refuerzan la idea que se discutió previamente que, dadas las condiciones particulares del lago Alchichica, es plausible suponer que se ha seleccionado en *B. sp.* 'México' una disminución de la inversión reproductiva en favor de la reproducción partenogenética.

Para *B. manjavacas* en los días 4-8, la MIP comienza a aparecer en el medio (Snell, 2017). Este intervalo de tiempo de la aparición de las proteínas coincide con lo que se observó para los individuos de la población activa (>60 día) y la población latente (~40 día) de Alchichica. En teoría, las proteínas continúan acumulándose en el medio a partir de la actividad metabólica del rotífero alcanzando su máximo el sexto día y disminuyendo hacia el noveno día (Snell, 2017), lo que provoca una disminución en la razón de mixis. Sin embargo, en nuestras poblaciones solo se observó la fase de incremento y la de estabilización de la mixis, pero nunca se observó la disminución posterior. Este resultado posiblemente se debe a que los cultivos eran estáticos y no continuos como en el caso de *B. manjavacas*, además, nuestro experimento se dio por terminado cuando las poblaciones aún se encontraban en la fase estacionaria, por lo que nunca hubo dilución experimental de la MIP, ni se alcanzó la fase de decaimiento, lo que sugiere que la MIP se encontraba también en una concentración de saturación más o menos constante.

Por otra parte, es importante considerar que el momento de inicio de la mixis no solo afecta al número de huevos diapáusicos producidos, también afecta la cantidad de diversidad genética retenida en el banco de huevos diapáusicos (King, 1980), que, dados los resultados de esta investigación, se esperaría que en los sedimentos se encuentren mejor representadas aquellas variantes con propensión a invertir relativamente más en mixis.

El compromiso entre el crecimiento de la población partenogenética y la reproducción sexual de los huevos de diapausa es universal en los rotíferos monogonontes (Serra & King, 1999). Por lo que la producción de huevos de resistencia involucra el compromiso entre la reproducción mítica y amítica, así que es de esperarse que existan diferentes patrones de mixis entre las poblaciones de la misma especie y entre los genotipos de una población, y que, dependiendo de las condiciones específicas del hábitat, se seleccionen diferentes historias de vida (Schröder, 2005). Esto es lo que se observó en los experimentos realizados, los dos grupos de genotipos mostraron potenciales bióticos diferentes, que se ajustan a un escenario de evolución divergente.

Gilbert (2002) demostró que la respuesta de mixis varía significativamente entre diferentes clones de *B. calyciflorus*. Algunos clones consistentemente producen menor descendencia mítica que otros. Esto puede ser importante ecológicamente porque los clones con baja propensión a la reproducción sexual pueden correr el riesgo de extinción local antes de producir nuevos huevos de diapausa, pero pueden alcanzar densidades de población elevadas, mientras que los clones con una alta propensión producirán al menos

algunos huevos diapáusicos a costa de una población reducida. Así que, dependiendo del escenario ambiental, una u otra estrategia puede verse favorecida.

En cuanto a los clones con baja propensión a la reproducción sexual, de acuerdo con el esquema de selección direccional para la pérdida de sexo (véase, p.e., García-Roger *et al.*, 2016; Franch-Gras *et al.*, 2017), el acoplamiento inevitable entre la latencia y la reproducción sexual promueve el mantenimiento del sexo a través de la selección a corto plazo que favorece la diapausa. Este estrecho vínculo reduce las desventajas energéticas del sexo (i.e., el denominado costo doble del sexo) al proporcionar una ventaja ecológica de evasión temporal correlacionada (la latencia). El enlace no necesita ser absoluto, solo no debe romperse (Serra & Snell, 2009). Sin embargo, esta ventaja podría verse desfavorecida si, por una parte, las condiciones ambientales de preservación de los huevos diapáusicos y/o las señales de eclosión no son favorecidas y si hay otras presiones que favorecen genotipos con bajos requerimientos alimenticios y bajas tasas de depredación, como ocurre con los rotíferos de Alchichica (Ciros Pérez *et al.*, 2015).

En este sentido, un resultado que llama la atención es que los individuos de la población latente alcanzaron una densidad poblacional más alta que la población activa, esto se observa en la capacidad de carga, para la población activa ( $K = 7.8 \text{ org ml}^{-1}$ ) y para la población latente ( $K = 12.84 \text{ org ml}^{-1}$ ) que es casi el doble. Además en la tasa de mixis para a población activa (7.21 %) y para la población latente (17.28 %). Por lo que, es evidente que a pesar de que estas variantes genéticas invierten más en reproducción sexual parece no haber un costo importante en crecimiento poblacional. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados se obtuvieron en condiciones ambientales muy

particulares de laboratorio, donde cada genotipo crecía de manera aislada y sin limitación de recursos alimenticios. Por lo que se puede descartar la competencia interclonal que, en condiciones naturales, se sabe, tienden a erosionar la diversidad genética (Ortells *et al.*, 2006), seleccionando a los genotipos con mejores capacidades competitivas.

En un ciclo anual dentro del lago Alchichica, la abundancia de *B. sp* 'México' va de densidades generales  $< 20 \text{ org L}^{-1}$ , alcanzando hasta  $420 \text{ org L}^{-1}$ , donde la población de *Brachionus* alcanzó su mayor tamaño de población debido tanto al aumento repentino en la disponibilidad de alimento y la disminución de la competencia por recursos (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011). Los valores de estas densidades *in situ* nos dan un indicio de qué poco probable podría darse la mixis en condiciones naturales. Por lo tanto, al comparar los umbrales de densidad nominal medidos en condiciones de laboratorio y campo, los primeros son altos, ya que las poblaciones de rotíferos suelen comenzar a crecer rápidamente en laboratorio comparado a las condiciones naturales. Hay que considerar que la degradación de MIP en la naturaleza podría ser más alta debido a la alta diversidad microbiana (Carmona *et. al*, 2011).

Además, no hay que olvidar las características de Alchichica, el cual es profundo, la mayor parte del tiempo es oligotrófico, con recursos alimenticios limitantes y con sedimentos en permanente oscuridad y anoxia, donde la posibilidad de eclosión de los huevos de resistencia es baja (Ayala, 2006), por lo que a pesar del alto potencial de crecimiento que tienen estas variantes genéticas, la probabilidad de dominar la columna de agua parece poco factible, pues los individuos que entran en diapausa demasiado pronto mientras continúan las condiciones relativamente favorables, pueden experimentar una desventaja

selectiva, porque cesan de reproducirse y sus frecuencias genéticas en la población disminuirán (Gilbert 2002, 2003). Además, ya que los recursos en este ambiente son limitantes (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011), y la producción de estas estructuras diapáusicas es energéticamente muy costosa, es poco probable que las características de estos genotipos (i.e., crecimiento poblacional alto y producción de huevos de resistencia alta) sean ventajosas en estas condiciones ambientales tan adversas.

### Divergencia morfológica y genética

En lo que respecta a la morfología, se observa que el largo y el ancho de la loriga son significativamente diferentes entre estos dos grupos de rotíferos. Además, el análisis de morfometría geométrica también muestra la existencia de diferencias significativas en la forma general del cuerpo entre las dos poblaciones nominales de Alchichica. En el análisis se muestra que las principales diferencias se encuentran en la posición espacial de las espinas (VC1) y del ancho de los individuos (VC2), que en conjunto explican el 77.6% de la varianza de la forma, y si a estas diferencias se añade el largo de la loriga, se observa una clara separación morfológicas entre ellas (véase Fig. 8; se observan dos grupos con centroides significativamente bien diferenciados). Dado que todos los clones analizados se mantuvieron en condiciones estables de cultivo en laboratorio por varios meses y que todos tenían aproximadamente la misma edad, se puede descartar el posible efecto materno (Gilbert, 2007), por lo tanto, se puede concluir que los rotíferos provenientes de la población activa y la población latente presentan diferencias morfológicas entre ellos.

Sin embargo, a pesar de que esta investigación documenta claramente diferencias en la historia de vida y la morfología de estos dos linajes de rotíferos, el análisis molecular preliminar que se realizó no permitió revelar diferencias a nivel genético. Aunque los marcadores utilizados revelaron polimorfismos y la presencia de genotipos particulares para cada una de las poblaciones, el análisis poblacional generó tres grupos que no se asociaron claramente a ninguno de los dos grupos de clones analizados y por lo tanto no indican una estructura poblacional divergente.

Así, lo más importante que revela nuestro análisis genético es que el tamaño de la muestra (número de clones analizados) fue muy baja y/o que los marcadores utilizados nos son suficientes para concluir adecuadamente, o bien, que estamos observando un momento de transición y no ha pasado el tiempo suficiente para que se observe fácilmente la divergencia genética entre estas poblaciones. Así, dadas estas limitaciones, es importante utilizar en investigaciones futuras otro tipo de metodología que exploren de manera más profunda las diferencias genéticas en todo el genoma, como, por ejemplo, con genotipificación por secuenciación (Davey *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2014; Alcántara-Rodríguez, 2018).

### Consideraciones finales

La teoría predice la selección de un genotipo que produce descendencia con fenotipos alternativos variables en hábitats impredecibles. Dicha estrategia de incrementar las apuestas puede mejorar la eficacia de un linaje a largo plazo al aumentar la probabilidad

de que al menos un subconjunto de individuos de la descendencia tenga un fenotipo ventajoso en un ambiente futuro incierto. En el caso de los rotíferos que habitan en hábitats impredecibles, los genotipos pueden dispersar el riesgo de extinción al producir descendientes que varían en diferentes rasgos como, por ejemplo, el momento de eclosión y reclutamiento en la población a partir de los huevos diapáusicos (García-Roger *et al.*, 2014).

Sin embargo, este patrón de diversificación cambia si el escenario tiende a la estabilidad en el largo plazo, como ocurre con el lago Alchichica (Alcocer *et al.*, 2000), por lo que es de esperarse que en este tipo de ambientes se seleccionen genotipos especialistas, lo que reduciría la apuesta de una variabilidad fenética alta (Serra & Snell, 2009; García-Roger *et al.*, 2014). A pesar de esto, en base a la evidencia experimentalmente obtenida en esta tesis, en Alchichica existen por lo menos dos fenotipos con estrategias de historia de vida diferentes, pero ambas con potenciales aparentemente eficaces. El problema, es que no sabemos si estos organismos se encuentran en una dinámica compleja de sustitución variando en sus óptimos de aparición y desarrollo en la columna de agua, según van variando las características particulares del lago a lo largo del ciclo anual, en el que los genotipos “poco sexuales” se desempeñen de manera más adecuada en los momentos de mayor limitación de recursos, que prácticamente es todo el año (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011), mientras que los genotipos más sexuales se desempeñen mejor en los momentos de oportunidad cuando la competencia se relaja debido a la disminución de las densidades que sufren los copépodos por depredación (véase, Ciro-Pérez *et al.*, 2015), o

bien que estos últimos se encuentre castigados y en una constante selección en contra dadas las condiciones ambientales particulares de Alchichica.

Hasta ahora, el conjunto de evidencias recabadas sugiere que tanto los genotipos de la población activa como aquellos de la población latente han acumulado divergencias entre ellas, por lo cual aquellas que se denominaron como “población latente y “población activa” (también “poblaciones nominales”) realmente se comportan como subpoblaciones con dinámicas relativamente independientes producto de presiones de selección divergentes (véase, p.e., Bamshad *et al.*, 2004; García-Roger *et al.*, 2014).

## **Conclusiones**

- Al comparar los patrones de inducción de mixis asociados a la densidad poblacional en diversas variantes clonales del rotífero *B. grupo plicatilis* que habitan el lago Alchichica, se encontraron diferencias significativas entre las denominadas población activa y población latente, la primera a densidades más altas y de manera más tardía, mientras que la segunda indujo la mixis a densidades más bajas y de manera temprana, es decir presentan potenciales bióticos diferentes.
- Se observó que los clones pertenecientes a la población activa inducen la reproducción sexual a densidades relativamente altas de rotíferos, un comportamiento esperado para organismos que habitan ambientes estables.

Mientras que los clones de la población latente presentaron una inducción de mixis mayor y temprana, comportamiento que recuerda a los rotíferos que habitan en ambientes variables.

- Se encontró una divergencia morfológica interclonal entre las dos poblaciones nominales, la población activa con fenotipos más pequeños que aquellos de la población latente (largo y ancho), así como en la morfología general del cuerpo con las principales diferencias en la posición espacial de las espinas y del ancho del cuerpo (revelada por morfometría geométrica).
- El análisis de divergencia genética interclonal por medio de marcadores neutrales específicos no fue suficiente para evidenciar diferencias significativas entre las variantes clonales de ambas poblaciones.
- Sobre la base de la toda la evidencia, podemos concluir que la mixis no representa una buena alternativa para evadir las condiciones desfavorables en un ambiente poco variable como Alchichica, respaldado con una reducción en la inversión sexual y el incremento de la fase asexual, lo cual se evidencia con los altas densidades poblacionales que deben de alcanzarse para que ocurra el cambio reproductivo.

- Con la finalidad de evaluar la posible divergencia interpoblacional, se encontró evidencia en los potenciales bióticos (eficacia) y la morfología, sin embargo, se debe de estudiar a detalle la historia de vida para ambas poblaciones, estudiar la dinámica consumidor-recurso, así como identificar si las diferencias de tamaño entre los organismos no son un carácter plástico. No se encontraron diferencias genéticas, con los marcadores que se utilizaron, por lo tanto, se debe buscar más marcadores que permitan explicar esas pequeñas diferencias entre las poblaciones que se documentan en este trabajo, o utilizar otros marcadores altamente polimórficos como GBS.

## **Literatura citada**

Alcántara-Rodríguez, J. A. (2010). Lagos-cráter de la Cuenca de Oriental como modelo de diversificación biológica en sistemas de distribución insular: análisis de las poblaciones del rotífero *Brachionus* grupo *plicatilis*. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Alcántara-Rodríguez, J. A. (2018). 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 doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

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 Mexico. *Freshwater Biology* 57: 728-740.

Alcocer, J., Chiappa-Carrara, X., Arce, E., Zambrano, L. (2009). Threatened fishes of the world: *Poblana alchichicana* (de Buen, 1945) (Artheriniformes: Atherinopsidae). *Environmental Biology of Fishes*, DOI 10.1007/s10641-009-9505-4.

Alcocer, J., Escobar, A., Lugo, A., Lozano, L. M. Osegura, L. A. (2001). Benthos of a seasonally-astatic, saline soda lake in Mexico, *Hydrobiologia* 466: 291-297.

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, México. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 27:3166-3169.

Andersen, R. A. (2005). Algal Culturing Techniques. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press, ME USA. p. 578.

Balompapueng, M. D., Hagiwara, A., Nozaki, Y., Hirayama, K. (1997). Preservation of resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller by canning. *Hydrobiologia* 358: 163-166.

Bamshad, M., Wooding, S., Salisbury, B. A., Claiborne Stephens, J. (2004). Deconstructing the relationship between genetics and race. *Nature Reviews Genetics* 5: 598-609.

Boraas, M. E. (1993). Semicontinuous culture methods. *En: N. Walz (ed.). Plankton regulation dynamics*. Ecological Studies 98. Springer-Verlag, Berlin pp.13-20.

Cáceres, C. E. (1997). Dormancy in invertebrates. *Invertebrate Biology* 166: 371-383.

Carmona, M. J., Dimas-Flores, N., Montero-Pau, J., Serra, M. (2011). Effect of experimental methodology on estimation of density at sex initiation in cyclically parthenogenetic rotifers. *Hydrobiologia* 662:131-139.

Carmona, M. J., Gómez, A., Serra, M. (1995). Mictic patterns of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786 in small ponds. *Hydrobiologia* 313/314: 365-371.

Carmona, M. J., Serra, M., Miracle, M. R. (1993). Relationships between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. *Hydrobiologia* 255/256: 145-152.

Ciros-Pérez, J., Carmona, M. J., Serra, M. (2001a). Resource competition between sympatric sibling rotifer species. *Limnology and Oceanography* 46 (6) 1511-1523.

Ciros-Pérez, J., Carmona, M. J., Serra, M. (2002). Resource competition and patterns of sexual reproduction in sympatric sibling rotifer species. *Oecologia* 131: 35-42.

Ciros-Pérez, J., Gómez, A. S. M. (2001b). 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., Ortega-Mayagoitia, E., Alcocer, J. (2015). The role of ecophysiological and behavioral traits in structuring the zooplankton assemblage in a deep, oligotrophic, tropical lake. *Limnology and Oceanography* 60(6):2158-2172.

Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. A., Boone, J. Q., Catchen, J. M., Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature reviews Genetics* 12: 499-510.

Filonov, A., Tereshchenko, I., Alcocer, J. (2006). Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophysical Research Letters*. 33. L07404.

Franch-Gras, L., García-Roger, E. M., Serra, M., Carmona, M. J. (2017). Adaptation in response to environmental unpredictability. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 284: 20170427.

García-Roger, E. M. (2006). Análisis demográfico de bancos de huevos diapáusicos de rotíferos. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, Valencia, España.

García-Roger, E. M., Carmona, M, J, Serra, M. (2016). Modes, mechanisms and evidence of bet hedging in rotifer diapause traits. *Hydrobiologia* 796: 223-233.

- García-Roger, E. M., Serra, M., Carmona, M. J. (2014). Bet-hedging in diapausing egg hatching of temporary rotifer populations: A review of models and new insights. *International Review of Hydrobiology* 99: 96-106.
- Gilbert, J. J. (1977). Mictic-female production in monogonont rotifers. *Archiv für Hydrobiologie-BeiheftErgebnisse der Limnologie* 8: 142-155.
- Gilbert, J. J. (1980). Female polymorphism and sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna*: Evolution of their relationship and control by dietary tocopherol. *The American Naturalist* 116: 409-431.
- Gilbert, J. J. (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: a multigenerational parental effect induced by fertilization. *Freshwater Biology* 47: 1633-1641.
- Gilbert, J. J. (2003). Specificity of crowding response that induces sexuality in the rotifer *Brachionus*. *Limnology and Oceanography* 48: 1297-1303.
- Gilbert, J. J. (2007). Induction of mictic females in the rotifer *Brachionus*: oocytes of amictic females respond individually to population-density signal only during oogenesis shortly before oviposition. *Freshwater Biology* 52: 1417-1426.
- Gilbert, J. J., Schröder, T. (2004). Rotifers from diapausing, fertilized eggs: Unique features and emergence. *Limnology and Oceanography* 49: 1341- 1354.
- Gómez, A., Adcock, G. J., Lunt, D. H., Carvalho, G. R. (2002). The interplay between colonization history and gene flow in passively dispersing zooplankton: microsatellite analysis of rotifer resting egg Banks. *Journal of Evolution Biology* 15: 158-171.
- Gómez, A., Carvalho, G. R. (2000). Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. *Molecular Ecology* 9: 203-214.

Hagiwara, A., Hino, A. (1989). Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 186-187: 415-421.

King, C. E. (1980). The genetic structure of zooplankton populations. In: Kerfoot WC (ed). Evolution and ecology of zooplankton communities. University Press of New England, Hanover, pp. 315-329.

Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11:353-357.

Kumar, A., Rajendran, V., Sethumadhavan, R., Shukla, P., Tiwari, S., Purohit. (2014). Computational SNP analysis: current approaches and future prospects. *Cellular Biophysics* 68 (2): 233-239.

Lugo, A., González, M. E., Sánchez, M. R., Alcocer, J. (1999). Distribution of *Leptodiptomus novamexicanus* (Copepoda: Calanoidea) in a Mexican hyposaline lake. *Revista de Biología Tropical* 17: 145-152.

Macek, M., Alcocer, J., Lugo, A., Martínez-Pérez, M. E., Peralta-Soriano, L., Vilaclara-Fatjó, G. (2009). Long term picoplankton dynamics in a warm-monomictic, tropical high altitude lake. *Journal of Limnology* 68: 183-192.

McCauley, E. (1984). The estimation of the abundance and biomass of zooplankton in samples. In Downing, J.A. and Rigler, F.H. (eds.). *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. IBP Handbook 17. Blackwell Sci. Pub., Oxford, pp. 228—265.

McCullagh, P., Nelder, J. A. (1989). Generalized linear models. 2<sup>nd</sup> ed. London: Chapman and Hall/CRC.

Montero-Pau, J., Gómez, A., Muñoz, J. (2008). Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 218-222.

Onbé, T. (1978). Sugar flotation method for sorting the resting eggs of marine cladocerans and copepods from sea-bottom sediment. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fisheries* 44: 1411.

Ortega-Mayagoitia, E., Ciro-Pérez, J., Sánchez-Martínez, M. (2011). A story of famine in the pelagic realm: temporal and spatial patterns of food limitation in rotifers from an oligotrophic tropical lake. *Journal of Plankton Research* 33(10): 1574-1585.

Ortells, R. (2002). *Diversidad genética y ecológica en especies cripticas de rotíferos: patrones y procesos*. PhD Dissertation. Universidad de Valencia. Valencia. España.

Ortells, R., Gómez, A., Serra, M. (2006). Effects of duration of the planktonic phase on rotifer genetic diversity. *Archiv fur Hydrobiologie* 167: 203-216.

Peralta, L., Escobar, E., Alcocer, J., Lugo, A. (2002). Oligochaetes from six tropical crater lakes in Central Mexico: species composition, density and biomass. *Hydrobiologia* 467: 109-116.

Porriot, R., Rougier, C. (1999). Temperature, demographe et mixis chez un rotifère heleoplanctinique, *Epiphanes brachionus* (Ehrb.). *Annales de Limnologie* 35: 167-172.

Pourriot, R., Snell, T. W. (1983). Resting eggs in rotifers. *Hydrobiologia* 104: 213-224.

Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.

Schröder, T. (2005). Diapause in monogonont rotifers. *Hydrobiologia* 546: 291-306.

Schröder, T., Gilbert, J. J. (2004). Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapause in the life cycle of monogonont rotifers: Intraclonal, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Functional Ecology* 18: 458-66.

Seal, A., Gupta, A., Mahalaxmi, M., Aykkal, R., Singh, T. R., Arunachalam, V. (2014). Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. *International Journal of Bioinformatics Research and Applications* 10 (3): 264-296.

Serra, M., Carmona, M. J. (1993). Mixis strategies and resting egg production of rotifers living in temporally-varying habitats. *Hydrobiologia* 255-256: 117-126.

Serra, M., King, C. E. (1999). Optimal rates of bisexual reproduction in cyclical parthenogens with density-dependent growth. *Journal of Evolutionary Biology*. 12: 263-271.

Serra, M., King, C. E. (2003) The timing of sex in cyclically parthenogenetic rotifers. *En: Moya A., Font E. (eds.). Evolution: from molecules to ecosystems*. Oxford University Press, New York, pp. 135-146.

Snell, T. W. (1998). Chemical ecology rotifers. *Hydrobiologia* 387/388: 267-276.

Snell, T. W. (2011). A review of the molecular mechanisms of rotifer reproduction. *Hydrobiologia* 662: 89-97.

Snell, T. W. (2017). Analysis of proteins in conditioned medium that trigger monogonont rotifer mictic reproduction. *Hydrobiologia* 796: 245–253.

Snell, T. W., Boyer, E. M. (1988). Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Journal of Marine Biology and Ecology* 24: 73-85.

Snell, T. W., Kubanek, J., Carter, W., Payne, A. B., Kim, J., Hicks, K. M., Stelzer, C. P. (2006). A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Marine Biology* 149: 763- 773.

Stelzer, C. P., Snell, T. W. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnology and Oceanography* 48(2): 939-943.

Team R Core. (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing (version 3.1.1). Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Doi: 10.3758/s13428-013-0330-5 PMID: 23519455

Tobler, M., DeWitt, T. J., Schlupp, I., García de León, F. J., Herrmann, R., Feulner, P. G. D. Tiedemann, R., Plath, M. (2008). Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecilia mexicana*. *Evolution* 62: 2643-2659.

Verdú del Campo, M. (1997). *Ecología Evolutiva; Aspectos Básicos*. Universidad Nacional Autónoma de México. México p. 39.

Visconsi, V., Cardini, A. (2011). Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: A simplified protocol for beginners. PLoS ONE 6: 10:e25630.

Wurdak, E., Gilbert, J. J., Jagels, R. (1977). Resting egg ultrastructure and formation of the Shell in *Asplanchna sieboldi* and *Brachionus calyciflorus*. *Archiv für Hydrobiologie (Beiheft Ergebnisse der Limnologie)* 8: 298-302.