



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LOS PROCESOS DE DIVERSIFICACIÓN
BIOLÓGICA EN COPÉPODOS DE LOS LAGOS DE LA
CUENCA ORIENTAL, MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
OMAR ALFREDO BARRERA MORENO

TUTOR PRINCIPAL:
DR. JORGE CIROS PÉREZ
FES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA
FES IZTACALA, UNAM
DR. MARTÍN GARCÍA VARELA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DRA. TANIA ESCALANTE ESPINOSA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. MANUEL ELÍAS GUTIÉRREZ
ECOSUR, CHETUMAL

MÉXICO, CD. MX., AGOSTO, 2023



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.

Para Elisa

“El mapa no es el territorio”

Alfred Korzybski

DEDICATORIAS

A Miri y Elisa, las mejores compañeras de aventuras que la vida pudo poner en mi camino. Monita, hemos recorrido un largo tramo ¡y nos falta lo más divertido! Mi palomita, cada día aprendo algo de ti, gracias por darme la oportunidad de ser tu papá, te amodoro.

A mamá y papá, quienes nunca han dejado de apoyarme, confiando en que puedo lograr mis metas. A Sol y Miguelín, quienes me recibieron en su familia y siempre me han tratado y consentido de la mejor manera.

A Rodrigo, Anthar, Darío, Oscar, Lalo, Efrén, Mike, Erik, Tate, Raúl, Isra, Pablo, Ángel, Vero, Wen, Blan, Yiyis, Carlita, Nayeli, Rosanna, Francia, Karla y Patzy, mis hermanos del alma.

A mis compañeros, amigos y colegas del GILT, que me han aguantado y apoyado más tiempo del esperado: Arturo, Nohemi, Laura, Eli, Mirek, Luis, Alfonso, Rosario, Rosarito, Cristian y Gloria.

A mis amigos profesores, de quienes he aprendido y compartido tanto durante las clases, el campo y la hora de comer: Tania, César, Paco, Tello, Vania, Jacky, Felipe, Howell, Rafa, Laura, Daniel, Fabiola, Víctor, Salomón, Polo, Celia, Gerardo y Alina.

A cada uno de los alumnos a los que he tenido el gusto de darles clase en Ciencias e Iztacala, especialmente a Joselin, mi herpetóloga favorita, a Pablo y Yazmin, dos excelentes ilustradores de la naturaleza y Alan, el mejor taxidermista que conozco. México necesita biólogos talentosos como ustedes, que además son ejemplo de que el esfuerzo por ser mejores al final vale la pena.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me abrió sus puertas hace 25 años y me ha visto crecer personal y profesionalmente dentro de sus aulas y laboratorios. Espero devolverle a la sociedad, que ha pagado mis estudios y sueldo, un poco de lo que he recibido en estos años.

Al Dr. Jorge Ciro, por confiar en mí y en que este trabajo sin duda vería la luz al final del túnel. Jorge, te agradezco la paciencia, apoyo y disposición que siempre me has tenido, así como la amistad sincera. Te pido disculpas por el tiempo extra que nos tomó llegar aquí, pero lo logramos después de todo. Todavía nos faltan algunos pendientes interesantes, espero que podamos continuar trabajando juntos en más proyectos y seguir aprendiendo de ti.

A mi Comité Tutorial, Drs. Manuel Elías Gutiérrez, Elías Piedra Ibarra, Martín García Varela y Tania Escalante Espinosa por las sugerencias, comentarios y correcciones que enriquecieron en gran medida esta tesis.

Al Dr. Eduardo Suárez Morales y a la Dra. Nancy Mercado, por recibirme tan amablemente en Chetumal durante una corta pero fructífera estancia en ECOSUR, ayudándome en la identificación de los copépodos de los lagos de la Cuenca Oriental.

Al Dr. Arturo Alcántara Rodríguez por su apoyo incondicional desde mi primer día en el laboratorio. Arturito, sin tu ayuda en la obtención de las secuencias y en los análisis bioinformáticos este trabajo no existiría. Eres un gran compañero de laboratorio y un mejor amigo. Gracias por todo.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, especialmente a Diana Juárez y a Lupita Godoy, así como a la Dra. Claudia Ponce de León Hill, por todas las facilidades que me dieron para que pudiera terminar este proyecto.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado y sin el cual no hubiera sido posible terminar satisfactoriamente esta tesis.

ÍNDICE

Resumen.....2

Abstract.....3

Capítulo I. Introducción general.....4

Capítulo II. Los copéodos (Calanoida, Cyclopoida) de la Cuenca Oriental, México.....16

Capítulo III. Análisis de la diversidad genética por medio de un marcador mitocondrial.....38

Capítulo IV. From local adaptation to ecological speciation in copepod populations from neighboring lakes.....77

Capítulo V. Análisis de la diversidad genómica (GBS) de las poblaciones de *Leptodiptomus* grupo *sicilis* de la Cuenca Oriental.....103

Capítulo VI. Discusión y conclusiones generales.....126

Literatura citada.....132

Epílogo. Extinción a la vista. Un pretexto para hablar de lagos y copéodos.....145

Apéndices.....161

RESUMEN

A partir de un origen marino y a través de diferentes eventos de adaptación que los han llevado a colonizar todo tipo de cuerpos de agua continentales, los copépodos han diversificado en una gran cantidad de linajes distintos, con patrones de distribución que van desde el microendemismo -restringidos a un cuerpo de agua- hasta especies con poblaciones en ambientes con condiciones heterogéneas entre sí. Se ha estudiado que la salinidad es un factor variable entre cuerpos de agua habitados por una misma especie, por lo que puede actuar como una fuente de selección divergente con un papel importante para mantener o eliminar el flujo génico, así como determinar la estructura genética de las poblaciones y promover la aparición de nuevos linajes mediante especiación. En este trabajo se analizó: 1) la diversidad de especies de copépodos distribuidos en la Cuenca Oriental, México; 2) la diversidad genética de las poblaciones de tres especies (*i.e.* *Leptodiptomus* grupo *sicilis*, *Mastigodiptomus* cf. *albuquerqueensis* y *Acanthocyclops* grupo *robustus-vernalis*) utilizando las divergencias en los haplotipos detectados a partir de secuencias de un gen mitocondrial de mutación lenta (COI); 3) la variación en la salinidad entre los distintos lagos que habita *L.* grupo *sicilis* y su papel como fuente de divergencia a nivel genético, ecofisiológico y reproductivo; y 4) la estructura genética de las poblaciones de *L.* grupo *sicilis* utilizando marcadores altamente polimórficos (GBS) para inferir procesos evolutivamente recientes. Los resultados indican que: 1) en los ocho lagos de la Cuenca Oriental se distribuyen 19 morfoespecies: tres de Diaptomidae, 14 de Cyclopidae y dos de Canthocamptidae; 2) existen variantes genéticas que posiblemente pertenezcan especies todavía no descritas (*i.e.*, *Mastigodiptomus* “Faja”, *Mastigodiptomus* “Oriental” y *Acanthocyclops* “Seco”), las cuales requieren un análisis más detallado a nivel morfológico, así como experimentos de ecofisiología y de compatibilidad reproductiva entre linajes; 3) hay un patrón de divergencia genética, ecofisiológica y reproductiva mediado por la salinidad en las poblaciones de *L.* grupo *sicilis*, lo que ha generado fenotipos adaptados localmente; y 4) estas poblaciones no muestran una estructura genética bien definida, pero las diferencias genéticas entre ellas implican un flujo genético bajo en la actualidad, quizá como consecuencia de las tasas de dispersión bajas y la persistencia de eventos fundadores. La distribución insular y, en especial, la salinidad de cada lago, han generado una selección importante de genotipos en las poblaciones, formando barreras físicas pero sobretudo ecológicas, que impiden actualmente el flujo genético de manera eficiente entre ellas, aislando las distintas variantes a su lago de origen. Se concluye que las poblaciones de *L.* grupo *sicilis* están bajo un claro proceso de especiación ecológica, con cuatro linajes distribuidos en la Cuenca Oriental: uno en Atexcac, otro en El Carmen y dos más, recientemente separados, habitando La Preciosa y Quechulac, por lo que es posible considerar al menos a tres de estas como entidades biológicas separadas.

ABSTRACT

Originated from marine environments and experiencing different events of adaptation, which led them to colonize all types of continental water bodies, copepods have diversified in many lineages that include distribution patterns from micro endemism -restricted to one water body- to species with populations inhabiting heterogeneous environments. Recent research indicates that salinity widely varies among lakes inhabited by a single species, so it may act as a source of divergent selection playing a significant role in preserving or eliminating gene flow to determine the genetic structure of the populations and stimulate the appearance of new lineages through speciation. In this work it was analyzed: 1) the diversity of copepod species distributed in the Cuenca Oriental, Mexico; 2) the genetic diversity of the populations in three species (*i.e.* *Leptodiaptomus* group *sicilis*, *Mastigodiaptomus* cf. *albuquerqueensis* and *Acanthocyclops* group *robustus-vernalis*) by using the divergences of haplotypes detected in a relatively slow mutation mitochondrial gene sequences (COI); 3) the variation of salinity among the different lakes inhabited by *L.* group *sicilis*, and their role as a source of genetic, ecophysiological and reproductive divergences; and 4) the genetic structure of the populations of *L.* group *sicilis*, by using highly polymorphic markers (GBS) to infer recent evolutionary process. Results indicate: 1) 19 morphospecies are distributed in the eight lakes of the Cuenca Oriental: three Diaptomidae, 14 Cyclopidae, and two Canthocamptidae; 2) genetic variations were identified and may belong to species not yet described (*i.e.*, *Mastigodiaptomus* “Faja,” *Mastigodiaptomus* “Oriental” and *Acanthocyclops* “Seco”). A more detailed morphological analysis is required for these variations, besides physiological and reproductive compatibility experiments among lineages; 3) there is a pattern of genetic, ecophysiological, and reproductive divergence influenced by salinity in populations of *L.* group *sicilis*, which has generated locally adapted phenotypes; and 4) populations do not show a well-defined genetic structure. However, genetic differences suggest a weak recent genetic flow, perhaps because of founder events low dispersion rates and persistence. Insular distribution but mostly salinity in each lake have generated a significant selection of genotypes in these populations, creating physical but mainly ecological barriers, which prevent the current genetic flow among them, isolating the different variations inside their lake of origin. It can be concluded that populations of *L.* group *sicilis* are undergoing a process of ecological speciation, with four lineages distributed in the Cuenca Oriental: one in Atexcac, another in El Carmen, and two more, recently separated, inhabiting La Preciosa and Quechulac, making possible to consider at least three of them as separate biological entities.

CAPÍTULO I

Introducción general

La diversidad taxonómica y genética que presentan los copépodos, cladóceros y rotíferos los hace destacarse entre los taxones que conforman el zooplancton epicontinental, es decir, aquellos organismos heterótrofos que han desarrollado distintas adaptaciones para poder habitar en suspensión dentro de la columna de agua sin contar con una capacidad de nado activo suficiente para oponerse al movimiento general de las masas de agua. Estos organismos también han desarrollado -por diferentes vías evolutivas- la capacidad de formar estructuras de resistencia como efipios, huevos diapáusicos y estadios anhidrobióticos (Frisch *et al.*, 2009; Samchyshyna y Santer, 2010), con las que se supone una dispersión pasiva eficaz vía las corrientes de agua o el viento, dentro del tracto digestivo o la piel de algunos animales (Hessen *et al.*, 2019), o depositándose en el sedimento en espera de condiciones óptimas para eclosionar y continuar con su ciclo de vida repoblando la columna de agua. El flujo génico mediante la dispersión activa o pasiva de los individuos representa un componente importante en la dinámica y estructura poblacional, actuando como una fuerza que mantiene integradas a las poblaciones de una especie en caso de presentarse de manera intensa, o haciéndolas divergir en caso de ser bajo, contribuyendo al aislamiento reproductivo y la formación de linajes nuevos (De Meester *et al.*, 2002; Aguirre-Planter, 2007).

Considerando la capacidad potencial de dispersión por medio de estructuras de resistencia que presentan los principales componentes del zooplancton epicontinental (Hessen *et al.*, 2019), se podría esperar una amplia colonización de los taxones en diferentes sistemas cercanos, así como un flujo génico elevado entre las diferentes poblaciones, llevando a la añeja conclusión de que “todo está en todos lados”. Sin embargo, esta situación parece ser la excepción a lo que ocurre normalmente en la naturaleza, como lo detalla la hipótesis de la monopolización, propuesta por De Meester *et al.* (2002), quienes señalan que al momento de la ocupación de un nuevo sistema, existe un crecimiento poblacional acelerado de pocas variantes génicas colonizadoras que acaparan los recursos del medio, seguido de una rápida adaptación local de los organismos a las distintas condiciones presentes en un nuevo ambiente (p. ej., salinidad, presencia de depredadores, competencia, etapas hidrodinámicas del lago, etc.), lo que generaría la

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

persistencia de efectos fundadores y un alto nivel de divergencia entre poblaciones vecinas debido al bajo flujo génico entre sí, así como un patrón de distribución de genotipos en cuerpos de agua relativamente cercanos pero cuyas condiciones bióticas y abióticas difieren de manera significativa, dando como resultado final, a lo largo del tiempo, la formación de linajes distintos mediante un proceso de especiación.

Con los resultados obtenidos del presente estudio, fue posible distinguir la existencia de patrones de diversificación biológica a distintas escalas: a) macroevolutiva, al realizar análisis de morfología comparada, diversidad taxonómica y divergencia genética con marcadores de tasa de mutación lenta, que permitieron determinar posibles procesos de divergencia a nivel histórico, como el reconocimiento de taxones a nivel especie y sus patrones de distribución y relaciones filogenéticas en copépodos, organismos de gran importancia dentro de las redes tróficas de los sistemas acuáticos continentales; y b) microevolutiva, con el análisis de flujo génico potencial y de divergencia de genes de tasa de mutación rápida y altamente polimórficos, dilucidando los procesos de dispersión en periodos de tiempo ecológicos, en donde los patrones actuales probablemente son resultado del posible aislamiento geográfico y reproductivo entre las poblaciones en un área geográfica pequeña como es la Cuenca Oriental, que cuenta con lagos con características bióticas y abióticas particulares, aislados entre sí y con presiones ambientales disímiles para distintas poblaciones de una misma especie.

A pesar de los distintos escenarios posibles, dependiendo del grado de conectividad entre las diferentes poblaciones y comunidades, y dados los antecedentes recientes al respecto, nuestra hipótesis es que el intercambio de organismos entre las poblaciones es bajo por restricciones en la migración y la colonización, por lo que debe existir una fuerte selección de genotipos, especialización a las condiciones ambientales locales y persistencia de eventos fundadores. Con lo anterior, es posible describir por primera vez en México, como un ejemplo de lo que puede ocurrir en otras áreas tropicales, las dinámicas ecológicas y evolutivas que determinan los procesos de diversificación biológica de estos organismos.

De esta manera, con el fin de analizar el papel de diversidad genética y la posible estructura genética en diferentes especies y poblaciones de copépodos, la presente tesis está dividida en seis capítulos. En el Capítulo I, se presenta una introducción general al área de

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

estudio, así como una aproximación a los procesos de dispersión y diversificación involucrados en los posibles eventos de diversificación que podrían presentar los miembros del zooplancton epicontinental. Por otro lado, se mencionan los objetivos generales y particulares, así como análisis y resultados obtenidos en los capítulos posteriores. En el Capítulo II, se describe la diversidad taxonómica de copépodos distribuidos en la Cuenca Oriental, México. En esta área se localiza una serie de lagos de naturaleza endorreica que poseen una historia geológica común (desde el Pleistoceno tardío, ca. ~40,000 años), que muestran una distribución a manera de islas, con lagos cercanos entre sí (<25 km) en una zona geográfica relativamente pequeña, y dentro de una gradiente de salinidad considerable (0.5 – 11 g L⁻¹), con cuerpos de agua temporales (*i.e.*, El Carmen y Tepeyahualco), perennes someros (Tecuitlapa) y perennes profundos (*i.e.*, Atexcac, La Preciosa, Quechulac, Alchichica y Aljojuca). Este conjunto de cuerpos de agua muestra condiciones bióticas y abióticas distintivas entre sí, pero también características comunes como la edad, el tipo y en algunos, casos el origen, por lo que los lagos de la Cuenca Oriental representan el escenario natural ideal para probar hipótesis concretas relativas a los procesos de diversificación biológica entre especies con patrones de distribución discreta y medios de dispersión pasiva como son los copépodos. Para lograr el objetivo, se realizaron salidas al campo durante las diferentes etapas hidrodinámicas de cada cuerpo de agua y se tomaron muestras, tanto de litoral como de columna de agua y sedimento. Posteriormente las muestras se analizaron en el laboratorio para determinar la composición de especies de cada localidad. Los resultados indicaron que 19 morfoespecies se distribuyen en los lagos de la Cuenca Oriental: tres de Diaptomidae, 14 de Cyclopidae y dos de Canthocamptidae.

En el Capítulo III, se aborda el análisis de la diversidad genética de las poblaciones de tres especies de copépodos (*i.e.*, *Leptodiptomus* grupo *sicilis*, *Mastigodiptomus* cf. *albuquerqueensis* y *Acanthocyclops* grupo *robustus*) utilizando las divergencias en los haplotipos detectados a partir de secuencias genéticas de mutación relativamente lenta (*i.e.*, Citocromo oxidasa subunidad I). Estos análisis se han generado gracias al acelerado desarrollo de técnicas moleculares que utilizan diferentes marcadores como son las aloenzimas, microsatélites, secuencias de ADN nuclear y, especialmente, de ADN mitocondrial, las cuales pueden ayudar en la estimación de muchos parámetros de interés para los ecólogos involucrados en la genética de poblaciones, tales como las tasas de migración, tamaño de la población, flujo génico, aislamiento por distancia, cuellos de botella, parentescos, etc. (Selkoe y Toonen, 2006), así como en estudios de tipo

filogeográfico (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009; Mercado-Salas *et al.*, 2018). Los resultados principales de este análisis permitieron identificar haplotipos particulares para las poblaciones de *Leptodiaptomus* grupo *sicilis* y considerar que genéticamente todavía pertenecen a la misma especie. Por otro lado, se encontraron dos variantes genéticas claramente separadas de *Mastigodiaptomus* cf. *albuquerqueensis* y una de *Acanthocyclops* grupo *robustus*. Los valores de divergencia de estas variantes indican que los individuos posiblemente correspondan a especies no descritas.

Posteriormente, en el Capítulo IV se presenta el artículo “From Local Adaptation to Ecological Speciation in Copepod Populations from Neighboring Lakes” (Barrera-Moreno *et al.*, 2015), publicado en la revista PLoS ONE. En el artículo se presentan los resultados obtenidos en esta tesis, en los que se analiza la variación en la salinidad entre los distintos lagos que habita *Leptodiaptomus* grupo *sicilis*, y su papel como fuente de divergencia a distintos niveles. Se conjuntó la información obtenida en los capítulos anteriores (morfología comparada y COI) con experimentos de jardín común en los que se compararon algunos parámetros ecofisiológicos y de eficacia biológica entre las poblaciones de esta especie. Se concluye que, dada la posibilidad de flujo genético interpoblacional, las poblaciones todavía pueden considerarse como una misma especie biológica, sin embargo, divergen ecológicamente en tres fenotipos: dos adaptados localmente, especializados a vivir en las condiciones de salinidad constante de su lago de origen (salino vs. dulceacuícola), y un generalista intermedio que habita en un lago con cambios temporales en la salinidad. Dadas estas diferencias fenotípicas y a que los copépodos de las diferentes poblaciones no tienen la capacidad de migrar y colonizar un lago con condiciones diferentes, los fenotipos especialistas se encuentran aislados, por lo que el flujo génico debe ser reducido o nulo, por lo que, aparentemente, los eventos fundadores han persistido. De esta manera, las condiciones ecológicas disímiles presentadas entre lagos cercanos pueden generar las suficientes divergencias entre linajes dada la inviabilidad de los migrantes, por lo que estas poblaciones pueden considerarse como unidades evolutivas independientes, involucradas en un proceso de especiación mediada por factores ecológicos (salinidad), la denominada especiación ecológica (*sensu*, Rundle y Nosil, 2005; Nosil, 2012).

Considerando el papel del flujo genético restringido entre poblaciones y las diferencias ambientales de cada lago señaladas en el Capítulo anterior, en el Capítulo V se muestran los

resultados del estudio realizado con marcadores altamente polimórficos, los cuales permitieron analizar de manera detallada la estructura genética de las poblaciones de *L. grupo sicilis*, detectando diferentes marcadores neutrales y marcadores sujetos a selección. En el área de la genómica, la cual involucra el estudio integral de la función, organización y la evolución de la información contenida en los genomas, se han desarrollado herramientas de secuenciación de nueva generación o *next-generation sequencing* (NGS, por sus siglas en inglés) que permiten obtener una gran cantidad de información genómica a partir de cada individuo analizado. Esta información es útil para llegar a identificar miles de marcadores genéticos o polimorfismos heredables a lo largo de todo el genoma de un individuo, lo que permite que los estudios de genética de poblaciones, ecología y evolución generen resultados más completos (Davey *et al.*, 2011), y a un costo menor al desarrollo de otros tipos de marcadores altamente polimórficos como los microsatélites. Debido a la gran cantidad de información generada a partir de estas técnicas y a la necesidad de interpretarla, se han desarrollado en el área de la bioinformática una serie de algoritmos y software especializado que permite identificar, comparar y analizar secuencias y determinar las posibles funciones de la información genética contenida en ellas.

Entre las diferentes metodologías utilizadas, la de GBS (*genotyping by sequencing*; Elshire *et al.*, 2011) destaca debido a que su costo es menor en comparación a técnicas similares (p. ej., RAD tags; véase p. ej., Emerson, *et al.*, 2010; Hohenlohe *et al.*, 2010). Sin embargo, todas se basan en la generación de una biblioteca genómica con representaciones reducidas del genoma de cada individuo. Estas bibliotecas son construidas mediante la digestión del ADN por medio de enzimas de restricción y la ligación de adaptadores (*tags*) para la plataforma de secuenciación Illumina®. Con este procedimiento es posible detectar una gran cantidad de SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido o *Single Nucleotide Polymorphism*; véase p. ej., van Tassell *et al.*, 2008) a lo largo del genoma. Los datos obtenidos con este tipo de marcadores permiten inferir procesos evolutivamente recientes en todo tipo de organismos, especialmente en taxones en los que no se cuenta con mucha información o un genoma de referencia. Si bien este tipo de metodologías, en especial la de GBS, llevan algunos años en desarrollo y generación de información para cerca de 300 especies de animales, plantas y hongos, su uso para inferir procesos ecológicos y evolutivos en poblaciones de organismos del zooplancton epicontinental, y de copépodos en especial, no ha sido aprovechado hasta hace muy recientemente (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2022). Por lo que este trabajo es de las primeras aproximaciones con

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

copépodos continentales. En este caso en particular, los resultados indican que las poblaciones analizadas no muestran una estructura definida. Sin embargo, las diferencias genéticas implican que en la actualidad el flujo genético interpoblacional es bajo, quizá como consecuencia de las tasas de dispersión bajas y la persistencia de eventos fundadores. De esta manera, el aislamiento reproductivo y genético interpoblacional es debido a la divergencia fenotípica adaptativa (sobre todo a las condiciones de salinidad particulares) más que a la distancia geográfica entre los cuerpos de agua. Lo anterior ha dado como resultado la diversificación de cuatro linajes a partir de un ancestro en común. Como conclusión, estos linajes deben considerarse especies distintas, cada una habitando un único lago de la Cuenca Oriental.

Predicciones lógicas y supuestos hipotéticos

A pesar de que el zooplancton posee mecanismos de dispersión pasiva eficientes por medio de sus estructuras de resistencia, la heterogeneidad ambiental imperante en lagos vecinos sin conectividad aparente entre ellos, provocan que las poblaciones estén bajo presiones de selección divergente y que la conectividad actual e histórica reales entre poblaciones de la misma especie sea baja, lo que ha propiciado una fuerte selección de genotipos especializados a las condiciones ambientales locales y persistencia de eventos fundadores, conduciendo a que la diversidad regional de los copépodos de la Cuenca Oriental presente un patrón de estructuración de poblaciones y comunidades disímiles con poco intercambio genético entre ellas, por lo que la diversidad genética y taxonómica regional es alta.

Estrategia de investigación

En vista de que este trabajo fundamentalmente es de tipo descriptivo, los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de la investigación se incluyen en distintas vías alternativas de interpretación (predicciones), las cuáles son:

1. Que la diversidad genética regional de los copépodos de los lagos de la Cuenca Oriental es baja debido a que:
 - a. el flujo genético es elevado entre las poblaciones de diversas especies que comparten distribución geográfica (*i.e.*, varios lagos de la cuenca), formando un complejo de metapoblaciones y metacomunidades acorde a un modelo neutral o de efecto de masas (Liebold *et al.*, 2004); o
 - b. el flujo genético es elevado sólo en algunas especies que comparten distribución geográfica, teniendo una dinámica de metapoblaciones y ajustándose a un modelo de metacomunidades con dinámica de parches (Liebold *et al.*, 2004).

2. Que la diversidad genética de las poblaciones de copépodos distribuidas en la Cuenca Oriental es alta debido a que el flujo genético es bajo (o nulo) entre las poblaciones, por lo que:
 - a. la estructura genética de las poblaciones está relacionada con la distancia geográfica; o
 - b. que la estructura genética de las poblaciones no está relacionada con la distancia geográfica, sino con factores ecológicos locales (p. ej., la salinidad, características hidrológicas de los lagos, presencia o no de depredadores visuales, etc.), acorde con un modelo de metacomunidades de ordenamiento de especies (Liebold *et al.*, 2004; Mittelbach y Schemske, 2015); o
 - c. que la divergencia genética entre las poblaciones de una o más especies de copépodos es alta, sin evidencia de flujo genético reciente, y por lo tanto de dinámica metapoblacional, por lo que, a pesar de las similitudes morfológicas y/o ecológicas, se podrían considerar como especies distintas (especies crípticas).

Objetivo General

Analizar la diversidad de copépodos calanoides y ciclopoideos distribuidos en los lagos de la Cuenca Oriental, México, para inferir los procesos que han determinado la diversificación biológica regional y local.

Objetivos particulares

1. Analizar la diversidad taxonómica de los copépodos (Copepoda: Calanoida, Cyclopoida) distribuidos en ocho lagos de la Cuenca Oriental, México, en las temporadas representativas del ciclo anual.
2. Inferir procesos de conectividad histórica (divergencia interespecífica) mediante el análisis de la diversidad genética de las poblaciones de especies de copépodos seleccionadas, distribuidas en al menos tres de los lagos de la Cuenca Oriental, México, utilizando como base las divergencias haplotípicas de las secuencias de genes con tasas de mutación lenta (*i.e.*, el gen COI).
3. Inferir eventos de conectividad reciente (interpoblacional, tales como el grado de flujo genético entre las poblaciones, aislamiento por distancia, persistencia de efectos fundadores, etc.) mediante el análisis de la estructura genética de por lo menos una especie de copépodos de las especies con distribución geográfica más amplia entre los lagos de la Cuenca Oriental por medio de marcadores altamente polimórficos (*i.e.*, GBS).
4. Inferir patrones de diversificación y eventual especiación en el caso de encontrar divergencias genéticas intrapoblacionales elevadas de alguna de las especies analizadas, mediante experimentos de reproducción intra e interpoblacional y análisis de morfología comparada.

Área de estudio

La Cuenca Oriental (Fig. 1) se localiza en una porción de los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz, México, entre las coordenadas $18^{\circ} 57' - 19^{\circ} 44' N$ y $97^{\circ} 10' - 98^{\circ} 05' W$ (Alcocer *et al.*, 2004), dentro del Distrito Este de la Faja Volcánica Transmexicana (Escalante *et al.*, 2007), a una altitud promedio de 2,300 m s.n.m., abarcando un área de 5,250 km² aproximadamente (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007), rodeada por volcanes como La Malinche, el Cofre de Perote y el Pico de Orizaba.

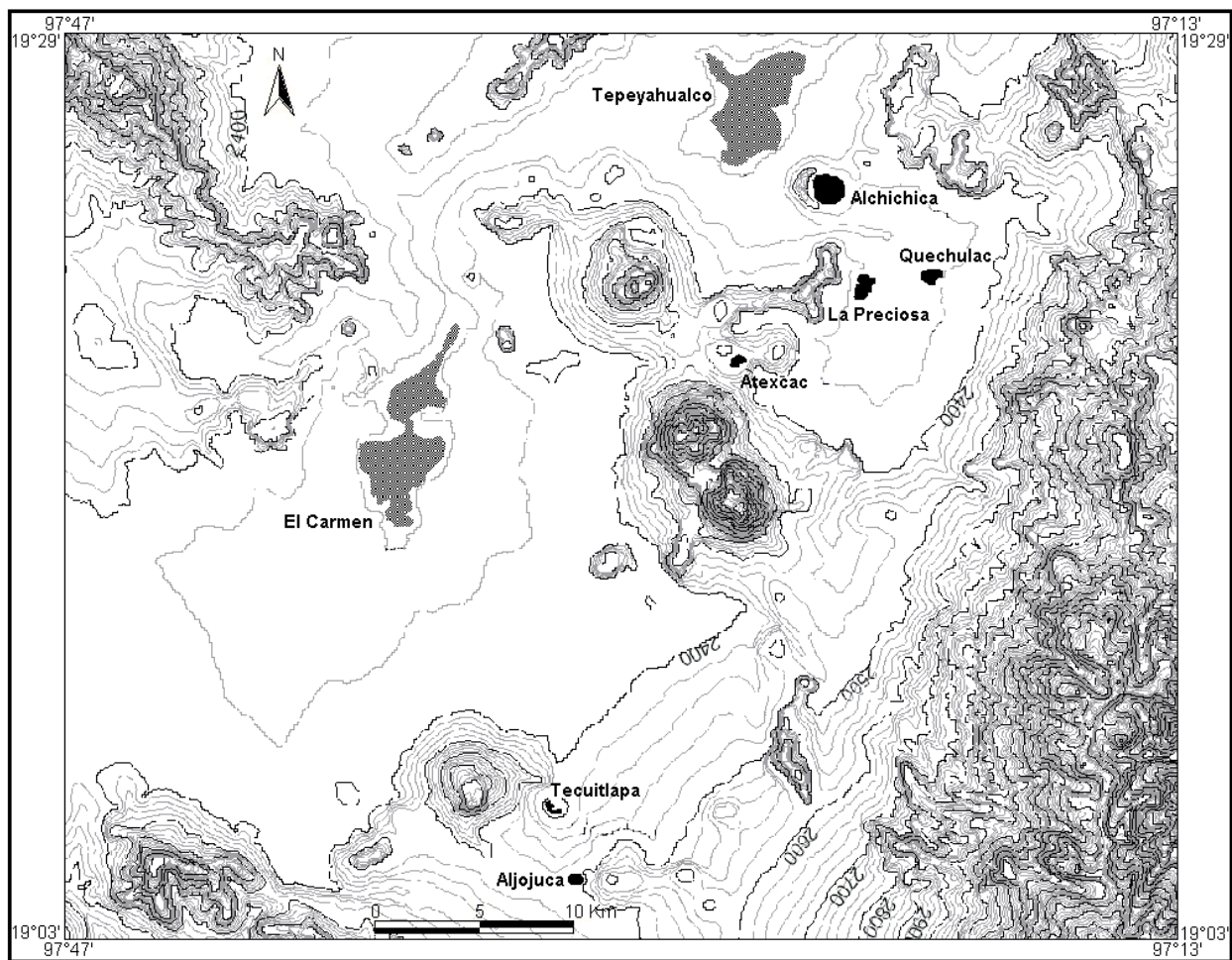


Fig. 1. Localización geográfica de los lagos de la Cuenca Oriental.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Esta cuenca hidrográfica es endorreica, por lo que no tiene una salida en forma de corrientes superficiales como podrían ser ríos o arroyos (Lugo *et al.*, 1994), que no se presentan de manera permanente dentro de la cuenca debido a la alta tasa de filtración de su superficie (Alcocer *et al.*, 2004). El agua que alimenta a sus lagos proviene de la precipitación pluvial directa y de fuentes subterráneas, principalmente (Álvarez, 1950), las cuales se recargan gracias al deshielo de los volcanes que la rodean (Alcocer *et al.*, 2007) y a las precipitaciones en las montañas cercanas que captan la humedad de los vientos alisios que cruzan el Golfo de México (Caballero *et al.*, 2003).

Durante el Pleistoceno, el área correspondiente a la parte central de la Cuenca estaba cubierta por un gran lago (Alcocer *et al.*, 2007), actualmente reducido a dos lagos cercanos de tipo playa que cubren cerca de 290 km²: El Carmen o Totolcingo, al sur, y Tepeyahualco o El Salado, al norte. Entre otras cosas, a causa de la extracción de agua para actividades humanas, ambos han pasado de ser lagos perennes a temporales a partir de los años 1970s (Alcocer *et al.*, 2007), llenándose de manera episódica durante la época de lluvias y permaneciendo casi secos la mayor parte del año (Arredondo, 1995; Caballero *et al.*, 2003). La fuente de agua en estos lagos proviene de la lluvia debido a la acumulación del líquido al quedar retenido sobre una capa arcillosa impermeable y del afloramiento del agua subterránea acumulada durante las lluvias, la cual se encuentra a una profundidad menor a un metro (Alcocer *et al.*, 2004, 2007).

En esta área también se encuentran varios lagos conocidos como axalapascos (“ollas de arena con agua”, en náhuatl), los cuales fueron generados en cráteres basálticos de tipo maar (Carrasco-Núñez y Ort, 2012). Estos cuerpos de agua se formaron hace aproximadamente 0.33 ± 0.08 millones de años durante el Pleistoceno tardío (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007) por medio de explosiones superficiales causadas por la ebullición de agua del subsuelo al entrar en contacto con el magma y en donde, posteriormente, los cráteres generados fueron rellenados con líquido proveniente del manto freático (Alcocer *et al.*, 2004; Armienta *et al.*, 2008; Carrasco-Núñez, 2019). La parte norte de la Cuenca, que comprende el Llano de San Juan, con los lagos Atexcac, La Preciosa, Quechulac y Alchichica, muestra una transición entre los climas semiárido y templado subhúmedo, y una precipitación anual de 656 mm (Arredondo, 1995; Alcocer *et al.*, 2004); mientras que, al sur, donde se localizan Aljojuca y Tecuitlapa, el clima es templado subhúmedo (Caballero *et al.*, 2003). Las características ambientales de estos lagos maar varían

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

desde oligotróficos (p. ej., La Preciosa) a hipereutróficos (p. ej., Tecuitlapa); de someros (p. ej., Tecuitlapa) a profundos (p. ej., Alchichica); y de agua dulce (p. ej., Quechulac) hasta salinos (p. ej., Alchichica); aunque todos ellos son atalasoalinos, con sales de origen no marino (Alcocer y Escobar, 1993), alcalinos, con alta concentración de cloruros, bicarbonatos de sodio y magnesio, y una alta conductividad eléctrica (Davies *et al.*, 2002; Caballero *et al.*, 2003). Por otro lado, hay lagos con presencia de peces que actúan depredando al zooplancton (p. ej., La Preciosa) y cuerpos de agua sin este tipo de presión (p. ej., Atexcac).

Dada la presencia de endemismos de peces y anfibios, la Cuenca Oriental fue catalogada como región hidrológica prioritaria de acuerdo con la Comisión Nacional para la Biodiversidad (Arriaga *et al.*, 2002). Sin embargo, como en gran parte de los cuerpos de agua del país (Lara-Lara *et al.*, 2008), los principales problemas que sufren estos lagos son referentes a la sobreexplotación del recurso, ocasionando una disminución del líquido, la desertificación, contaminación, eutrofización y la introducción de especies exóticas que desplazan a las especies nativas y reducen la diversidad biológica. El conocimiento que se tiene de los lagos de la Cuenca Oriental y del zooplancton que los habita, es muy dispar. Las investigaciones que hasta la fecha se ha desarrollado en el Lago Alchichica lo hacen uno de los cuerpos de agua mexicanos mejor estudiados (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011; Alcocer, 2019), mientras que el conocimiento del resto es aún incipiente, probablemente con la excepción de Atexcac y La Preciosa, los cuales nuestro grupo de trabajo ha estudiado con mayor detalle en tiempos recientes (Macek *et al.* 1994, 2007; Martínez-Chávez, 2010; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Barrera-Moreno *et al.*, 2010; Barrera-Sánchez, 2016; Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2022).

Los lagos localizados en la Cuenca Oriental muestran una distribución insular, abarcando una zona geográfica relativamente pequeña. Esta área contiene cuerpos de agua temporales, perennes someros y perennes profundos; todos dentro de un gradiente de salinidad considerable ($STD = 0.48 - 35 \text{ g L}^{-1}$) (Tabla1), pero con una historia geológica común desde ~40,000 años y presiones de selección distintas. De esta manera, todas las características mencionadas hacen de este lugar el escenario natural ideal para probar hipótesis relacionadas a los procesos de diversificación biológica entre especies zooplanctónicas con patrones de distribución discreta y medios de dispersión pasiva, como es el caso de los copépodos calanoides y ciclopoideos.

Procesos de diversificación biológica en copéodos de la Cuenca Oriental

Tabla 1. Cuadro comparativo de algunas características morfométricas y de salinidad de los lagos de la Cuenca Oriental (modificado de Arredondo, 1995). Q: Quechulac; Al: Aljojuca; Tc: Tecuitlapa; P: La Preciosa; C: El Carmen; Tp: Tepeyahualco; At: Atexcac; A: Alchichica.

	Q	Al	Tc	P	C	Tp	At	A
Longitud máxima (km)	0.98	0.87	0.75	1.34	~14	~10	0.78	1.73
Área superficial (km ²)	0.50	0.44	0.26	0.78	~84	~77	0.29	1.81
Volumen (m ³ × 10 ⁶)	10.97	11.67	0.35	16.20	---	---	6.15	69.92
Profundidad máxima (m)	40	50	2.5	45.5	1.5	1.5	39.1	64
Salinidad (g L ⁻¹)	0.48	0.78	1.06	1.1	1.1-35	1.4	6.5	8.3-9.0

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

“Paradise is an island. So is Hell”

Judith Schalansky

CAPÍTULO II

Los copépodos (Calanoida, Cyclopoida) de la Cuenca Oriental, México

Artículo en preparación para su publicación en la Revista Mexicana de Biodiversidad.

Los copépodos (Calanoida, Cyclopoida) de la Cuenca Oriental, México

Copepods (Calanoida, Cyclopoida) from Oriental Basin, Mexico

Omar Alfredo Barrera-Moreno¹ y Jorge Ciros-Pérez^{2*}.

1. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. omar.barrera@ciencias.unam.mx

2. Grupo de Investigación en Limnología Tropical, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. jorge.ciros@gmail.com*

Resumen. A lo largo de millones de años, los copépodos continentales han colonizado cuerpos de agua salada y dulce, diversificándose ampliamente y teniendo un papel importante en las redes tróficas. En la Cuenca Oriental, México, se localizan dos lagos efímeros y seis lagos perennes tipo cráter. Todos son cercanos geográficamente, con un patrón insular y compartiendo una historia común (Pleistoceno tardío), pero bajo condiciones limnoecológicas contrastes, especialmente la salinidad. Con el objetivo de integrar la información de riqueza específica de copépodos calanoides y ciclopoideos, y su distribución a lo largo del gradiente ambiental existente entre los lagos efímeros (salinidades variables) y los lagos cráter (salinidades constantes), se realizaron muestreos mensuales durante un año. Se identificaron tres especies de calanoides y 14 de ciclopoideos. Ocho especies fueron registradas solo en un lago, mientras nueve habitan varios lagos con condiciones ambientales distintas. Los lagos efímeros comparten una especie no registrada en los lagos cráter y tres que se distribuyen en éstos. Es necesario incorporar los análisis con marcadores moleculares que ayuden a reconocer correctamente la identidad biológica de poblaciones con distribución en lagos ecológicamente contrastantes y que es muy probable que correspondan a complejos de diversidad críptica. La integración de varias herramientas de análisis (morfológico, molecular, ecológico, compatibilidad reproductiva, etc.) permitirá probar mejores las hipótesis evolutivas o entender mejor el papel ecológico que tienen los taxones que habitan esta área, donde la salinidad parece afectar la distribución de especies zooplanctónicas, actuando como una fuerza de selección importante.

Palabras clave: diversidad críptica, microcrustáceos, lagos cráter

Abstract. For millions of years, continental copepods have colonized saline and freshwater bodies, widely diversified and essential in food webs. In the area called Oriental Basin in Central Mexico are located two episodic playa lakes and six deep maar lakes. All of them are geographically nearest, in an insular distribution pattern, and share a common history (since Late Pleistocene), but show contrasting limnoecological conditions, especially salinity. In order to integrate information about species richness from calanoid and cyclopoid copepods and its distribution along the salinity gradient between the episodic (variable salinity) and crater (constant salinity) lakes, monthly sampling was carried out over one year. We identify three calanoids and 14 cyclopoid species. Eight species were recorded only in one lake, while nine inhabit several lakes with different environmental conditions. Episodic lakes share one species not found in the crater lakes and three distributed in these. It required molecular markers analysis that helps to correctly determine the biological identity of some populations and the possible existence of cryptic species complexes. This knowledge will generate better evolutionary and ecological hypotheses about these species and their role in this area, where the salinity appears to affect the distribution of zooplankton species, acting as a strong selective force.

Key words: cryptic diversity, microcrustacea, crater lakes

Introducción

Los elevados valores de biodiversidad registrados en México son resultado de una historia geológica inigualable que ha moldeado su superficie, así como su posición geográfica, una gran variación topográfica y de climas en su territorio (Flores-Villela y Navarro-Sigüenza, 1993; Carrasco-Núñez, 2019). Estas características se han combinado durante millones de años, generando condiciones ambientales heterogéneas y muy diversas, las cuales han permitido no solo la presencia de una gran cantidad de especies, sino una elevada variabilidad genética en muchos grupos taxonómicos y en especial, la generación de un alto número de taxones endémicos (Sarukhán *et al.*, 2009). En conjunto, todo lo anterior posiciona al país como uno de los de mayor riqueza biológica del mundo ya que cuenta con cerca del 12% de las especies descritas hasta ahora (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008).

De las más de 4,400 especies de crustáceos distribuidos en México (García-Madrigal *et al.*, 2012), se calcula que pertenecen a la subclase Copepoda al menos 518 especies marinas y 100 de aguas epicontinentales (Hernández-Trujillo y Esqueda-Escárcega, 2002; Velázquez-Ornelas *et al.*, 2021), lo que corresponde al 4% del total mundial para estos organismos (Boxshall y Defaye, 2008; Bernot *et al.*, 2021). Sin embargo, estima que la riqueza es mucho mayor, cercana a las 400,000 especies en el mundo, muchas de ellas crípticas, razón por la que se les considera los insectos de los mares -y lagos- (Sereda *et al.*, 2016). Para generar tal diversidad biológica, los copépodos han mostrado una gran plasticidad evolutiva, adaptándose a diferentes ambientes y formas de vida, por lo que encontramos copépodos de vida libre, parásitos y simbioses, distribuyéndose en ambientes salobres, marinos, epicontinentales e hipogeos (Suárez-Morales *et al.*, 2000a; Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008), siendo capaces de invadir y sobrevivir con éxito en todos los ambientes continentales (Reid y Williamson, 2010).

La importancia ecológica de los copépodos epicontinentales radica en que, si bien los diferentes órdenes con organismos de vida libre (Calanoida, Cyclopoida, Harpacticoida y Gelyelloida; véase Bernot *et al.*, 2021) cuentan con organismos omnívoros, cada grupo muestra hábitos de captura y alimentación distintos, teniendo un papel importante en las redes tróficas acuáticas. Los copépodos actúan primero como consumidores primarios, alimentándose de microalgas, bacterias, rotíferos, larvas de peces y de otros crustáceos y, posteriormente, sirven de alimento a peces y otros consumidores secundarios como larvas de anfibios e insectos (Turner, 2004; Reid y Williamson, 2010). Debido a lo anterior, algunas especies han sido utilizadas como alimento en la industria piscícola y como control biológico de mosquitos (véase, p. ej., Suárez-Morales *et al.*, 1996). Sin embargo, en la actualidad, los datos sobre la abundancia, la distribución y el papel ecológico que desempeñan los copépodos no han sido tomados en cuenta como herramienta para generar políticas de protección de sus poblaciones o de los cuerpos de agua que habitan, a pesar de la importancia que tienen dentro de sus ambientes.

Aunado a lo anterior, se estima que, en nuestro país, el conocimiento de la diversidad y distribución de las especies de copépodos de agua dulce o epicontinentales se encuentra todavía incompleto y presenta un sesgo de colecta importante (Gutiérrez-Aguirre y Cervantes-Martínez, 2013, Sereda *et al.*, 2016), donde varios Estados cuentan con un registro reducido y muy pocos

especialistas en este tipo de organismos (Suárez-Morales, 2000; Velázquez-Ornelas *et al.*, 2021). De los taxones que habitan cuerpos de agua mexicanos, el orden Cyclopoida está representado en México por 62 especies (Mercado-Salas y Suárez-Morales, 2011, 2012; Velázquez-Ornelas *et al.*, 2021), mientras que dentro del orden Calanoida, la familia Diaptomidae es la más diversa en el país, destacando los géneros *Mastigodiatomus* y *Leptodiatomus*, con 15 y 7 especies respectivamente (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008b; Silva-Briano y Suárez-Morales, 2010; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2020). Algunas especies pertenecientes a ambos órdenes se distribuyen en los cuerpos de agua del centro del país, especialmente en los que se localizan en el área conocida como la Cuenca Oriental.

En conjunto, la naturaleza de los dos lagos playa (remanentes de un lago ancestral que se deterioró en gran medida a causa de las actividades humanas) y los de tipo maar (cráteres originados por explosiones debidas al contacto del agua subterránea con magma y que después se rellenaron con agua del manto freático) de la Cuenca Oriental, México, se caracteriza por mostrar una distribución a manera de islas, con cuerpos de agua cercanos entre sí (de 3 a 38 km) dentro de una zona geográfica relativamente pequeña. En esta cuenca se encuentran lagos temporales, perennes someros y perennes profundos, en un gradiente de salinidad considerable ($STD = 0.48 - 35 \text{ g L}^{-1}$; conductividad = $\sim 6,000 - \sim 45,000 \mu\text{S/cm}^{-1}$), con una historia geológica común al menos de 40,000 años, lo que los hace un escenario natural ideal para probar hipótesis relacionadas a los procesos de diversificación biológica entre especies zooplanctónicas con patrones de distribución discreta y medios de dispersión pasiva, como es el caso de los copépodos, organismos de los que se tiene poca información referente a su composición taxonómica en la zona (véase, Macek *et al.*, 1994; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Barrera-Moreno, 2010; Barrera-Moreno *et al.*, 2015). En este trabajo se realizó un estudio para caracterizar la riqueza y distribución geográfica de las especies de copépodos de la Cuenca Oriental, el cual será de utilidad para análisis posteriores de sistemática molecular.

Materiales y Métodos

Área de estudio. Se analizaron ocho lagos endorréicos localizados en la Cuenca Oriental, México (Fig. 1). Los cuerpos de agua son temporales someros (El Carmen y Tepeyahualco), perennes someros (Tecuitlapa) y perennes profundos (Atexcac, La Preciosa, Quechulac, Alchichica y Aljojuca) y están dentro de un rango de agua dulce a salina. En la Tabla 1 se indican las características físicas y limnológicas de los mismos.

Tabla 1. Cuadro comparativo de algunas características morfométricas y limnológicas de los lagos de la Cuenca Oriental (datos de Arredondo, 1995; Caballero *et al.*, 2003; Armienta *et al.*, 2008). Q: Quechulac; Aj: Aljojuca; Tc: Tecuitlapa; P: La Preciosa; C: El Carmen; Tp: Tepeyahualco; At: Atexcac; Al: Alchichica.

	Q	Aj	Tc	P	C	Tp	At	Al
Longitud máxima (km)	0.98	0.87	0.75	1.34	~13	~10	0.78	1.73
Área superficial (km ²)	0.50	0.44	0.26	0.78	~84	~77	0.29	1.81
Volumen (m ³ × 10 ⁶)	10.97	11.67	0.35	16.20	---	---	6.15	69.92
Profundidad máxima (m)	40	50	2.5	45.5	1.5	1.5	39.1	64
Temperatura superficial promedio (°C)	18.1	20.8	22.7	17.8	20.9	---	18.6	18.7
pH	8.4	8.4	8.5	8.7	9.7	---	8.4	8.9
Salinidad (g L ⁻¹)	0.48	0.78	1.06	1.1	1.1-35	1.4	6.5	8.3-9.0
Iones dominantes	HCO ₃ ⁻ Mg ⁺⁺	HCO ₃ ⁻ Na ⁺⁺	HCO ₃ ⁻ Na ⁺⁺	Cl ⁻ Mg ⁺⁺	---	---	Cl ⁻ Na ⁺⁺	Cl ⁻ Na ⁺⁺

Con el fin de obtener muestras cualitativas y coleccionar organismos zooplanctónicos tanto de litoral como de la columna de agua, se realizaron muestreos en los ocho cuerpos de agua a lo largo de un ciclo anual durante las principales temporadas hidrográficas características de este tipo de lagos (véase, p. ej. Alcocer *et al.*, 2000; Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011; Ciro-Pérez *et al.*, 2015). Las muestras se fijaron en formaldehído al 4% para realizar los análisis de morfología comparada y riqueza. Antes de cada muestreo biológico se midieron a lo largo de la columna de agua: temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad, sólidos disueltos totales (perfilador Hydrolab,

modelo DS5/SVR5). En el caso de los lagos someros, los parámetros anteriores se midieron solamente en la superficie durante la temporada de lluvias.

Para la determinación taxonómica de las especies de copépodos se utilizaron claves de identificación, artículos y bibliografía especializada de la taxonomía de copépodos (p. ej., Wilson y Yeatman, 1959; Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008b; Mercado-Salas y Suárez-Morales, 2011, 2012). Se realizaron disecciones, mediciones y observaciones de varios individuos adultos de ambos sexos de cada población. En este proceso se puso especial atención en aquellas características taxonómicas que definen a cada especie, haciendo énfasis en las estructuras implicadas en el reconocimiento de pareja y apareamiento, debido a la importancia de las mismas para este grupo de organismos (Ting *et al.*, 2000; Dussart y Defaye, 2001; Montiel-Martínez *et al.*, 2008). Se realizaron comparaciones de forma y tamaño, así como una caracterización de las diferentes estructuras anatómicas siguiendo procedimientos estándar utilizados en la taxonomía de copépodos (p. ej., Elías-Gutiérrez *et al.*, 1999; Suárez-Morales *et al.*, 2000b; Mercado *et al.*, 2006; Montiel-Martínez *et al.*, 2008). En particular, para los individuos del género *Mastigodiptomus* se realizó un análisis más detallado de morfología comparada en el que se midieron y compararon estructuras de interés taxonómico señaladas en la literatura para estos organismos (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2013; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2020). En el caso de los organismos pertenecientes a *Acanthocyclops* grupo *robustus-vernalis* (véase Miracle *et al.*, 2013), se consideraron las estructuras indicadas en estudios previos con este complejo de especies (Mirabdullayev y Defaye, 2002; Dodson *et al.*, 2003; Mirabdullayev y Defaye, 2004; Mercado-Salas *et al.*, 2009). Lo anterior se realizó con el propósito de determinar si los organismos pertenecen a alguna especie ya descrita o bien, a un taxón distinto a los reconocidos en la literatura. Finalmente, con la información generada, se elaboró una clave de identificación que incluye a todas las especies identificadas, la cual se puede revisar al final de este Capítulo.

Posteriormente, con el propósito de identificar los cuerpos de agua que comparten una mayor cantidad de especies y determinar si existe un patrón de distribución relacionado a la distancia geográfica y/o a condiciones ecológicas como la salinidad, se aplicó el índice de similitud cualitativo de Jaccard utilizando el software BioDiversity Professional v.2 (McAlece *et*

al., 1997). Con este análisis, se obtuvo el grado de semejanza basado en la composición (presencia-ausencia) de especies entre los lagos y se elaboró un fenograma de áreas que indica qué tanto se parecen estos ambientes de acuerdo a las especies que comparten.

Resultados

A partir de las muestras colectadas en campo provenientes de los diferentes ambientes acuáticos de la Cuenca Oriental, se seleccionaron individuos adultos (machos y hembras) de copépodos ciclopoideos y calanoides distribuidos tanto en la zona litoral como en la columna de agua de cada lago. Las muestras analizadas (Tabla 2) correspondieron a su vez a fechas relacionadas con las distintas etapas hidrodinámicas que presentan los lagos a lo largo del año: mezcla/estratificación en el caso de los lagos profundos y perennes, y lluvias/secas en los lagos someros y efímeros. Lo anterior se realizó con el objetivo de observar patrones de presencia o ausencia de los organismos a lo largo del tiempo.

Tabla 2. Fecha de colecta de las muestras analizadas. Q: Quechulac; Aj: Aljojuca; Tc: Tecuitlapa; P: La Preciosa; C: El Carmen; Tp: Tepeyahualco; At: Atexcac; Al: Alchichica.

Fecha/Lago	Q	Aj	Tc	P	C	Tp	At	Al
Nov 2009	*			*	*	*	*	*
Dic 2009		*	*			*		
Jun 2010	*	*	*	*			*	*
Sep 2010	*	*	*	*	*	*	*	*
Nov 2010	*	*	*	*	*	*	*	*
Feb 2011	*	*	*	*			*	*
Mar 2011	*	*	*	*			*	*

Sobre la base de los datos proporcionados por los distintos caracteres morfológicos analizados, se identificaron un total de 19 especies de copépodos en los ocho lagos de la Cuenca (Tabla 3). Los copépodos calanoides pertenecen a la familia Diaptomidae, representada por los géneros *Mastigodiaptomus* y *Leptodiaptomus*, con una y dos morfoespecies, respectivamente: *M. cf. albuquerqueensis*, *L. grupo sicilis* y *L. garciai*, ésta última señalada como endémica del lago

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Alchichica. Por su parte, los ciclopoideos forman parte de dos subfamilias de Cyclopidae: (1) Eucyclopiniae, con los géneros *Eucyclops* (*E. elegans*, *E. cf. pectinifer*, *E. pseudoensifer*, *E. torresphilipi* y *Eucyclops* sp.), *Macrocyclus* (*M. albidus*), *Paracyclus* (*P. chiltoni*, *P. poppei* y *P. sp.*) y *Tropocyclops* (*T. prasinus aztequei*); (2) Cyclopiniae, con dos géneros, *Acanthocyclops* (*A. grupo robustus-vernalis* sp. 1 y sp. 2) y *Microcyclus* (*M. cf. rubellus* y *Microcyclus* sp.). Por otro lado, en las muestras de litoral fueron identificadas dos especies de copépodos harpacticoides: *Bryocamptus* grupo *minutus* (en La Preciosa) y *Cletocamptus gomezi*, una especie con distribución microareal endémica de Alchichica (Suárez-Morales *et al.*, 2013).

Tabla 3. Taxones de copépodos (Calanoida; Cyclopoida; Harpacticoida) distribuidos en los lagos de la Cuenca Oriental. Q: Quechulac; Aj: Aljojuca; Tc: Tecuitlapa; P: La Preciosa; C: El Carmen; Tp: Tepeyahualco; At: Atexcac; Al: Alchichica.

Familia:	Taxón	Q	Aj	Tc	P	C	Tp	At	Al	
Diaptomidae:	<i>Leptodiaptomus garciai</i>								*	
	<i>Leptodiaptomus</i> grupo <i>sicilis</i>	*			*	*		*		
	<i>Mastigodiaptomus</i> cf. <i>albuquerqueensis</i>	*	*	*		*	*			
Cyclopidae: Eucyclopiniae	<i>Eucyclops elegans</i>		*	*						
	<i>Eucyclops</i> cf. <i>pectinifer</i>		*	*	*				*	
	<i>Eucyclops pseudoensifer</i>	*	*				*	*	*	
	<i>Eucyclops torresphilipi</i>				*			*		
	<i>Eucyclops</i> sp.			*						
	<i>Macrocyclus albidus</i>	*			*			*		
	<i>Paracyclus chiltoni</i>							*		
	<i>Paracyclus poppei</i>		*		*					
	<i>Paracyclus</i> sp.							*		
	<i>Tropocyclops prasinus aztequei</i>	*								
	Cyclopiniae	<i>Acanthocyclops</i> gpo. <i>robustus-vernalis</i> sp.1					*	*		
		<i>A. gpo. robustus-vernalis</i> sp. 2								*
		<i>Microcyclus</i> cf. <i>rubellus</i>		*						
Canthocamptidae:	<i>Microcyclus</i> sp.							*		
	<i>Bryocamptus</i> grupo <i>minutus</i>				*					
	<i>Cletocamptus gomezi</i>								*	

Los datos obtenidos indican que las poblaciones de varias especies muestran una distribución que abarca varios de los lagos de la cuenca (véase, Tabla 3), resultando particularmente interesantes los taxones que habitan en lagos con características muy disímiles entre sí, especialmente en cuanto al parámetro de la salinidad.

El análisis morfológico mostró la presencia de pequeñas diferencias fenotípicas (*i.e.*, presencia/ausencia de espinas o “peine” en el endópodo de la P5 de la hembra, distintas tallas entre los organismos adultos de un mismo sexo) entre algunos individuos de *M. cf. albuquerqueensis* provenientes de El Carmen y Tepeyahualco cuando se compararon con individuos de las mismas poblaciones, así como con aquellos proveniente de los demás lagos que habita (Quechulac, Aljojuca y Tecuitlapa). Sin embargo, los análisis moleculares preliminares realizados hasta ahora (Capítulo 3 de esta tesis) no han mostrado coincidencia con esta variabilidad morfológica, lo que pueda ser útil como evidencia de diversificación críptica entre las poblaciones estudiadas.

En el caso de las poblaciones de copépodos ciclopoideos de *Acanthocyclops* grupo *robustus-vernalis* distribuidos en El Carmen, Tepeyahualco y Alchichica, también se observaron diferencias morfológicas sutiles, pero consistentes entre ellas. En general, los individuos de *Acanthocyclops* provenientes de El Carmen y Tepeyahualco son muy similares morfológicamente entre sí (denominándose *A. gpo. robustus-vernalis* sp. 1), difiriendo significativamente (ANOVA, $P \leq 0.05$) con los individuos de Alchichica (identificada como *A. gpo. robustus-vernalis* sp. 2) en cuanto a las tallas de los individuos machos adultos (Tabla 4). Por otro lado, el tamaño de las diferentes proporciones calculadas en cada uno de los segmentos que conforman las patas torácicas 3 y 4, las cuales se han utilizado como un carácter importante para identificar a este tipo de organismos (Tabla 4; véase p. ej. Mirabdullayev y Defaye, 2004), no muestran valores significativamente diferentes en ambos grupos (El Carmen-Tepeyahualco vs. Alchichica) (ANOVA, $P \geq 0.05$).

Sin embargo, se encontraron diferencias importantes en la ornamentación que presentan estas mismas estructuras. En el Tabla 5 se resumen la distribución y características de estos ornamentos. Las fórmulas espinales de los ejemplares provenientes de la Cuenca Oriental son diferentes cuando se comparan con las de algunas especies afines pertenecientes al género *Acanthocyclops* descritas en la literatura. Los individuos de las poblaciones de El Carmen y Tepeyahualco comparten características en común. Con respecto a los otros taxones comparados utilizando la literatura especializada del grupo (Mirabdullayev y Defaye, 2002; Dodson *et al.*,

2003; Mirabdullayev y Defaye, 2004; Mercado-Salas *et al.*, 2009), no se encontraron coincidencias en la ornamentación (fórmulas o presencia de espinas o setas en los sitios comparados).

Tabla 4. Características morfológicas seleccionadas de *Acanthocyclops* grupo *robustus-vernalis* de la Cuenca Oriental. Talla de los machos adultos (μm). Proporciones (Largo/Ancho) en los distintos segmentos (1 el más proximal, 3 el más distal) en el endópodo (End) o exópodo (Exo) de las patas 3 y 4 (P3 y P4). Se indican los valores medios \pm error estándar. También se indica la proporción entre las espinas interna y externa del segmento final del endopodito (End 3) de la P4. Se midieron 10 ejemplares por población.

Medida (Largo/Ancho)	Alchichica	Tepeyahualco	El Carmen
Talla	644 \pm 3.610	749 \pm 5.624	703 \pm 5.460
P3 End 1	0.96 \pm 0.041	0.88 \pm 0.010	0.95 \pm 0.008
P3 End 2	1.01 \pm 0.030	0.98 \pm 0.020	1.02 \pm 0.008
P3 End 3	1.95 \pm 0.007	1.84 \pm 0.115	1.65 \pm 0.064
P3 Exo 1	1.27 \pm 0.064	1.19 \pm 0.040	1.16 \pm 0.058
P3 Exo 2	0.75 \pm 0.066	0.85 \pm 0.005	0.83 \pm 0.024
P3 Exo 3	1.47 \pm 0.133	1.37 \pm 0.090	1.52 \pm 0.082
P4 End 1	1.15 \pm 0.039	1.03 \pm 0.090	1.19 \pm 0.055
P4 End 2	1.19 \pm 0.013	1.09 \pm 0.010	1.10 \pm 0.050
P4 End 3	2.38 \pm 0.138	2.27 \pm 0.100	2.25 \pm 0.095
P4 Exo 1	1.34 \pm 0.074	1.22 \pm 0.080	1.32 \pm 0.090
P4 Exo 2	1.02 \pm 0.047	0.96 \pm 0.060	0.97 \pm 0.035
P4 Exo 3	1.98 \pm 0.090	1.69 \pm 0.010	1.98 \pm 0.082
P4 End 3 espinas int./ext.	1.14 \pm 0.023	1.14 \pm 0.030	1.11 \pm 0.030

De acuerdo con lo anterior y dada la constancia en estos caracteres entre individuos de cada población, se podría suponer, de manera preliminar, que las poblaciones de El Carmen y Tepeyahualco corresponden a un mismo taxón, distinto al que forma la población de Alchichica y ambos a su vez, diferentes a las especies descritas en la literatura, por lo que en este manuscrito los nombramos preliminarmente como *A. gpo. robustus-vernalis* sp. 1 y *A. gpo. robustus-vernalis* sp. 2, respectivamente. Sin embargo, es necesario comparar una mayor cantidad de estructuras, así como realizar otro tipo de aproximaciones como es el uso de marcadores moleculares, análisis

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

de las características ecológicas y de compatibilidad reproductiva entre estos organismos, para poder validar esta hipótesis y llegar a una conclusión más robusta.

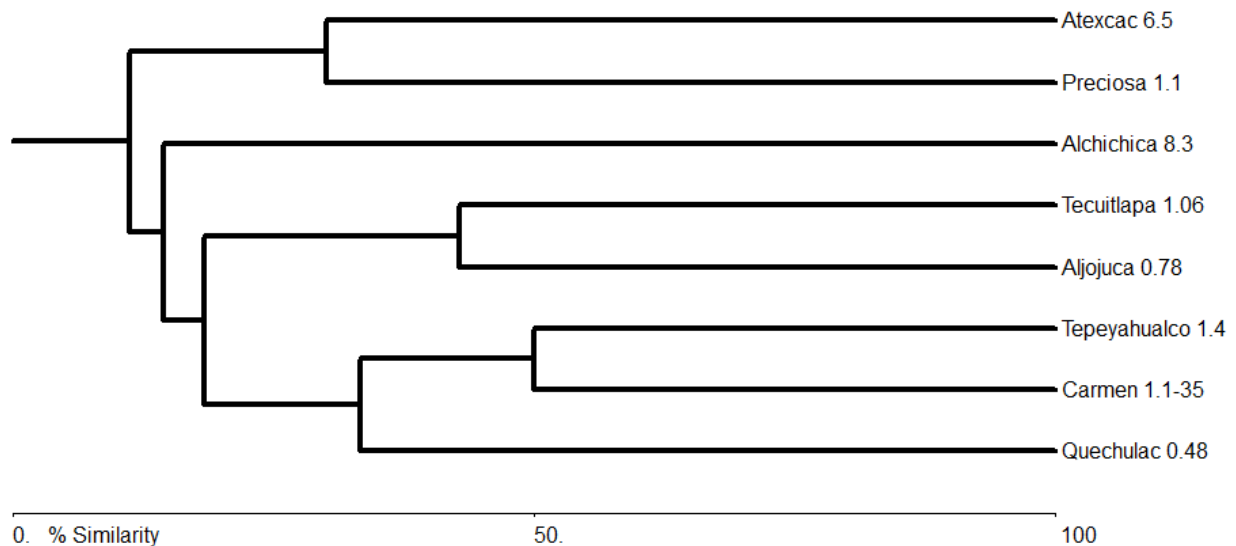
Tabla 5. Características morfológicas seleccionadas de los copépodos *Acanthocyclops* grupo *robustus-vernalis* de la Cuenca Oriental y otras especies del mismo género (¹Dahms y Fernando, 1997; ²Dodson, 1994; ³Fiers *et al.*, 2000; ⁴Mercado-Salas *et al.*, 2006; ⁵Mercado-Salas *et al.*, 2009; ⁶Mercado-Salas y Álvarez-Silva, 2013; ⁷Miracle *et al.*, 2013; ⁸Mirabdullayev y Defaye, 2002; ⁹Mirabdullayev y Defaye, 2004; ¹⁰Reid y Suárez-Morales, 1999). Fórmula espinal de las patas P3 y P4 (espinas en romanos, setas en arábigos); distribución de espinas en la Placa intercoxal y en la coxa de la P4; basipodito de la antena: presencia de espinas en el margen externo (ME) y en la base de la espina interna (BEI). S = sí; N = no; P = proximal; D = distal.

Población	P3	P3	P4	P4	Espinass placas		Basipodito	
	Endópodo	Exópodo	Endópodo	Exópodo	Intercoxa	Coxa	ME	BEI
Tepeyahualco	0-1;0-2;1,I,4	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;1,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S = 9	P=4-8; D=7-10	S	N
El Carmen	0-1;0-2;1,I,4	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;1,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S = 14	P=4-9; D=8-10	S	N
Alchichica	0-1;0-2; I,I,4	I-1;I-1;III,I,3	0-1;0-2;I,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S = 9-15	P=4-7; D=9-10	S	N
<i>A. robustus</i> ⁸	0-1;0-2; I,I,4	I-1;I-1;II,I,4	0-1;0-2;I,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S	S	S	S
<i>A. einslei</i> ⁹	0-1;0-2; I,II,3	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;I,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S = 11	P=6; D=9	S	N
<i>A. vernalis</i> ²	0-1;0-2;1,I,4	I-1;I-1;II,I,4	0-1;0-2;1,II,2	I,1;I-1;II,I,4	S = 10	P=5; D=12	S	N
<i>A. trajani</i> ⁸	0-1;0-2; 1,II,3	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;1,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S = 15	P=8; D=10	N	N
<i>A. americanus</i> ⁷	0-1;0-2; I,II,3	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;I,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S = 14	P=8; D=10	S	N
<i>A. caesariatus</i> ⁵	0-1;0-2; 1,I,4	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;1,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S = 10-15	N	S	N
<i>A. marceloi</i> ⁵	0-1;0-2; 1,I,4	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;1,II,2	I-1;I-1;II,I,4	S = 11	P=4-5; D=8-9	S	N
<i>A. eduardoi</i> ⁶	0-1;0-2;1-I,4	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;1-II,2	I-1;I-1;III,I,4	S = 11	P=5; D=10	S	N
<i>A. rebecca</i> ³	0-1;0-2;1,I,4	I-1;I-1;II,I,4	0-1;0-2;1,II,2	I-1;I-1;II,I,4	S 2 hileras	S	S	N
<i>A. smithae</i> ¹⁰	0-1;0-2;I,II,3	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;I,II,2	I-1;I-1;III,I,4	S	S	S	N
<i>A. dodsoni</i> ⁴	0-1;0-2;2,I,3	I-1;I-1;III,I,4	0-1;0-2;1,II,2	I,1;I,1;III,I,4	S	S	S	N
<i>A. brevispinosus</i> ^{1,2}	0-1;0-2;I,II,3	I,1;I,1;II,II,4	0-1;0-2;I,II,2	I-1;I-1;II,II,4	S = 10	P=3-6; D=10	S	N

Finalmente, en cuanto a la similitud en la composición taxonómica de copépodos de los lagos de la Cuenca, el fenograma de áreas obtenido mediante el índice de Jaccard (Fig. 1) considerando las 19 morfoespecies enlistadas en la Tabla 3, indica una mayor similitud entre las faunas que se distribuyen en los lagos playa (El Carmen y Tepeyahualco), aunque con valores del

50%, por lo que el número de especies compartidas entre ambas áreas es baja. Además, no se encontró un patrón de agrupamiento asociado a la salinidad de los cuerpos de agua perennes o a la distancia geográfica entre los lagos maar, lo que sugiere que la riqueza específica de los lagos debe de ser explicada por otros factores ambientales locales (p. ej., presencia de depredadores, estabilidad de la columna de agua, recursos, etc.).

Figura 1. Fenograma de áreas obtenido con el índice de Jaccard. Se indican los valores de salinidad de cada lago (g L^{-1}).



Discusión

Históricamente se ha pensado que la dispersión y la tasa de inmigración de muchas especies del zooplancton es elevada (Dodson, 1992; De Meester *et al.*, 2002) y efectiva hasta trayectos mayores a los 100 km entre distintos cuerpos de agua (Shurin *et al.*, 2000). Sin embargo, aun cuando la distancia geográfica entre los lagos de la Cuenca Oriental parece ser una barrera relativamente fácil de superar por medio de la supuesta dispersión pasiva de estructuras de resistencia vía el viento o las aves acuáticas, la distribución de las especies de copépodos no muestra un patrón general en común. Los taxones de ambos órdenes parecen estar restringidos a uno o pocos lagos con condiciones diferentes de salinidad, dinámica hidrológica, competencia y la presencia de depredadores, lo que indicaría que una buena capacidad de dispersarse no es un

rasgo suficiente al momento de colonizar nuevos ambientes con factores bióticos y abióticos que afectan la eficacia de los migrantes (Barrera-Moreno *et al.*, 2015).

En el caso de las especies que muestran una distribución más amplia, estudios previos con individuos adultos de *L. grupo sicilis* (Barrera-Moreno, 2010) y con huevos de resistencia de *M. cf. albuquerquensis* (Alcántara-Rodríguez, com. pers.), indican la existencia de procesos de adaptación local en poblaciones de los lagos perennes y una mayor plasticidad fenotípica en las que habitan también los lagos efímeros. Ambos patrones parecen haber sido generados por el efecto de la salinidad sobre la ecofisiología de los organismos (Barrera-Moreno, 2010), lo que ha ocasionado con el tiempo una reducción del flujo génico natural entre las poblaciones y la presencia de haplotipos característicos en algunas de ellas (Barrera-Moreno *et al.*, 2015). Lo anterior sucede a pesar de que los organismos con mayor plasticidad tienen la capacidad potencial de transportarse a otros lagos cercanos geográficamente. Sin embargo, en este tipo de cuerpos de agua, las condiciones físicas y las interacciones bióticas locales juegan un papel importante en la distribución y exclusión de las variantes génicas colonizadoras (Shurin *et al.*, 2000). De esta manera, y aludiendo a la teoría de la monopolización propuesta por De Meester *et al.* (2002), si a los procesos señalados se les suma la adaptación rápida de cada población a las condiciones particulares de cada lago, así como la persistencia de los eventos fundadores fijados en las poblaciones desde su establecimiento, ocurrido en algún momento de la historia de los lagos, la cual se calcula en ~40,000 años (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007; G. Vilaclara, com. pers.), se podría explicar en general, la colonización de los copépodos con amplia distribución.

Analizando la similitud en la composición comunitaria de los lagos de la Cuenca, el fenograma generado con el índice de Jaccard, indica una mayor relación entre la composición de especies de los lagos playa El Carmen y Tepeyahualco, lo cual puede ser explicado por el origen común de ambos cuerpos de agua, resultado de la reducción de un lago ancestral y con ello, la fragmentación de poblaciones de las especies que se encuentran actualmente en ambos lagos. Por su parte, en el fenograma se observa que los lagos maar Aljojuca y Tecuitlapa también tienen una relación cercana. Estos dos lagos se encuentran geográficamente cercanos entre sí al sur de la cuenca y presentan una salinidad similar, lo que posiblemente ha permitido el establecimiento de *Eucyclops elegans* en ambos, así como la presencia de otras especies cuya distribución abarca

más lagos de la Cuenca. A pesar de lo anterior, en análisis no muestra un patrón de agrupamiento definido claramente por factores ambientales como la salinidad o la distancia geográfica, resultando así en una distribución heterogénea de la riqueza específica. Lo anterior puede observarse en taxones como *M. cf. albuquerqueensis*, *L. grupo sicilis*, *E. cf. pectinifer*, *E. pseudoensifer* y *M. albidus*, cuya distribución abarca varios lagos de la cuenca con características limnológicas muy disimiles entre sí. Lo anterior sugiere, por un lado, que las poblaciones de estas especies presentan características plásticas que les han permitido establecerse en distintas condiciones ambientales; o, por el contrario, que son poblaciones que han divergido, las cuales han generado procesos de adaptación local a cada lago donde habitan, lo que permitiría con el tiempo y el flujo genético restringido entre sí, su diferenciación en linajes distintos y, eventualmente, conducir a un especiación guiada principalmente por factores ecológicos y no tanto por la distancia o las barreras geográficas entre los cuerpos de agua (Rundle y Nosil, 2005). Por su parte, entre los lagos cráter se muestra que la composición de especies compartida es menor y tampoco muestra un patrón particular de distribución.

Como se muestra en la Tabla 3, se identificaron varios taxones que posiblemente pertenezcan a especies todavía no descritas (*i.e.*, *M. cf. albuquerqueensis*, *Eucyclops* sp., *Paracyclops* sp., *Microcyclops* sp. y entidades afines a *Acanthocyclops* del grupo *robustus-vernalis*). En estas y en las demás especies de copépodos que habitan la Cuenca Oriental, es de esperarse una situación similar de divergencia adaptativa asociada a las condiciones de salinidad o debido a otros factores bióticos. Sin embargo, a pesar de que la hipótesis parece plausible, es necesario realizar análisis más detallados a nivel morfológico (p. ej., con microscopía electrónica de barrido) complementado con información genética (p. ej., por medio de marcadores moleculares como COI) y, en algunos casos, con datos de ecofisiología, para determinar la estructura genética de cada población, las tolerancias ambientales y revelar los patrones de colonización, flujo génico y, eventualmente, de su divergencia. Además, es importante generar estudios que permitan comparar las características de las poblaciones de la Cuenca Oriental con individuos de las localidades tipo y determinar correctamente su identidad taxonómica. Como se ha detallado en algunos casos con copépodos, cladóceros y rotíferos (véase, p. ej., Lee, 2000; Elías-Gutiérrez 2008a; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), los análisis minuciosos con aproximaciones morfológicas apoyadas en caracteres moleculares y

ecológicos han permitido resolver algunos casos de taxones supuestamente cosmopolitas o con una distribución más amplia de la que presentan (Elías-Gutiérrez y Varela, 2009) y que, en realidad, forman grupos de especies crípticas (Knowlton, 1993), corroborando que la tasa de endemismos en copépodos epicontinentales es mayor de lo estimado tradicionalmente (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008a), considerando además la constante descripción de nuevas especies gracias al incremento en el esfuerzo de muestreo en nuevas localidades y los análisis taxonómicos detallados con este grupo de estudio (Velázquez-Ornelas *et al.*, 2021).

Es importante señalar que tanto los taxones señalados con amplia distribución, así como los posibles endémicos de la Cuenca Oriental tienen centros de origen y de radiación distintas. Esto se debe a que el centro del país se encuentra en la zona de transición entre las regiones Neártica y Neotropical, situación que ha generado condiciones ambientales particulares que propician endemismos y el contacto entre biotas de afinidades diferentes. Por ejemplo, el género *Leptodiptomus* tuvo su origen en Norteamérica, donde diversificó y expandió su área de distribución hacia el sur, además de llegar también al Este de Asia (Elías_Gutiérrez *et al.*, 1999). Por su parte, el género *Mastigodiptomus* diversificó en la región Neotropical, llegando a distribuirse hasta latitudes mayores del continente americano (Suárez-Morales *et al.*, 2005). Ambos géneros al igual que otros calanoides, tienen patrones de distribución más restringidos en comparación con los que presentan los ciclopoideos, los cuales se ha comprobado que tienen una capacidad de dispersión más elevada y cuentan con especies con áreas de distribución más amplias (Mercado-Salas y Suárez-Morales, 2012). Lo anterior se observa en los géneros *Eucyclops*, *Paracyclops*, *Mesocyclops*, *Microcyclops* y *Tropocyclops*, que se encuentran distribuidos por todo el neotrópico contando con algunas especies consideradas de amplia distribución. En el caso del género *Macrocyclops*, durante mucho tiempo se consideró que *M. albidus* era cosmopolita (Silva, 2008), sin embargo, se ha demostrado que si bien esta especie cuenta con poblaciones en diferentes partes del mundo –algunas de ellas dispersadas por la actividad humana-, en realidad forma parte de un complejo de especies crípticas que se han reconocido mediante el análisis de microcaracteres morfológicos y el uso de marcadores moleculares (Karanovik y Krajicek, 2012).

Por otro lado, entre los taxones pertenecientes al género *Eucyclops*, el más diverso de la subfamilia Eucyclopinae, la variabilidad morfológica entre las poblaciones de una misma especie es muy elevada, lo que ha dificultado descripciones adecuadas de los taxones de este género (Suárez-Morales, 2004), por lo que el uso de marcadores moleculares y otros análisis comparados podría generar una mayor certeza que permita identificar mejor a las especies que lo conforman. Además de esto, entre los ciclopoideos es importante señalar el caso del género *Acanthocyclops* y algunas de sus especies, las cuales se han considerado de amplia distribución, pero que en la actualidad se sabe que son un conjunto de taxones muy parecidos en su morfología pero distintos biológicamente, formando complejos de especies crípticas con distribuciones relativamente restringidas, como es el caso de las especies que forman el complejo *A. robustus-vernalis* (Mirabdullayev y Defaye, 2004; Mercado-Salas *et al.*, 2009), con 7 especies registradas en nuestro país (Mercado-Salas *et al.*, 2013). Con lo anterior, podemos pensar que el número de taxones endémicos de copépodos en la región Neotropical todavía está subestimado y por lo tanto se requieren análisis morfológicos más detallados utilizando una serie de caracteres nuevos y estudios que complementen la taxonomía clásica, así como un mayor esfuerzo de colecta para delinear el área de distribución correcta de los distintos taxones, sus afinidades biogeográficas y la identificación de especies endémicas (Silva, 2008; Mercado-Salas y Suárez-Morales, 2012).

En los lagos estudiados hay una riqueza de especies considerable, su origen, incluyendo el de los taxones endémicos, no es muy probable que se haya dado dentro de la Cuenca Oriental. Esto se debe a que a pesar de la estructura genética existente entre las poblaciones de algunas especies (Barrera-Moreno *et al.*, 2015), el periodo que ha pasado desde su colonización por medio de uno o varios eventos a través del tiempo, todavía no ha sido suficiente para suponer que dieron origen a nuevas especies a partir de los organismos ancestrales que llegaron a esta área a lo largo de ~40,000 años, tiempo en que se calcula se dio la formación de los lagos cráter actuales (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007; G. Vilaclara, com. pers.). Con base en que la tasa de mutación del gen utilizado para identificar especies (COI) se ha calculado en 1.4% de variación por millón de años (Knowlton y Weigt, 1998), se puede pensar que, por ejemplo, las distancias genéticas (0.23-0.43 %) encontradas en un estudio con poblaciones de *L. grupo sicilis* (Barrera-Moreno *et al.*, 2015) no se generaron en la Cuenca Oriental, de ser así, la tasa de mutación debería ser mucho mayor a la señalada, por lo que las divergencias genéticas existentes y la presencia de haplotipos

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

característicos de cada población de este y otros copépodos de la cuenca Oriental pueden explicarse mejor como resultado de distintas colonizaciones (de diferentes lagos en cada ocasión), eventos de oportunidad y por la persistencia de esos eventos fundadores, seguido de un proceso de adaptación relativamente rápida a las condiciones locales, como resultado de un proceso de monopolización y adaptación al ambiente, así como la formación de un banco de estructuras de resistencia que evitarían, en conjunto, que nuevos genotipos o especies colonizaran nuevamente, reduciendo con el tiempo el flujo génico natural entre poblaciones (De Meester *et al.*, 2002) aun cuando todavía se tiene el potencial de mantenerlo en condiciones de laboratorio (Barrera-Moreno *et al.*, 2015).

Por otro lado, como en gran parte de los cuerpos de agua del país (Lara-Lara *et al.*, 2008), los principales problemas que sufren los lagos de la Cuenca Oriental están ligados a diferentes actividades humanas. La sobreexplotación del recurso para la agricultura ha ocasionado una disminución del líquido, así como contaminación por agroquímicos y eutrofización, que aunado a la aridez de la zona y la filtración del agua, hacen que la cuenca sea muy susceptible a la desertificación (Galindo-Leal, 2019). Además, la introducción deliberada de especies exóticas (como bagre, carpa, trucha arcoíris y lobina) en lagos como La Preciosa, Quechulac y Alchichica, desplazan por competencia a los taxones nativos, generando con esto una reducción de la diversidad biológica local y alteraciones a las redes tróficas.

En cuanto a la conservación, tanto la abundancia, la distribución y el papel ecológico que desempeñan los copépodos y otros grupos de invertebrados del zooplancton todavía no han sido tomados en cuenta como herramienta para generar políticas de protección de sus poblaciones o de los cuerpos de agua que habitan, por lo que ninguna especie de copépodos de la Cuenca Oriental ha sido contemplada dentro de las categorías de riesgo propuestas por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) o por el Libro rojo (IUCN, 2023), en las que podrían situarse taxones endémicos de los lagos de la Cuenca, como *L. garciai* y *C. gomezi*.

Agradecimientos

Agradecemos a M. Martínez y A. Alcántara por su colaboración en el trabajo de campo. Este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIIT IN-222709 y IN-217513); así como del Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación – FES Iztacala, UNAM (PAPCA 2007–2008); O. Barrera-Moreno agradece la beca 316376 otorgada por el CONACYT para realizar sus estudios de Doctorado.

Clave de identificación para especies distribuidas en la Cuenca Oriental (modificada de Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008b y de Reid y Williamson, 2011)

1a. Tagmosis tipo Gymnoplea (división entre cefalotórax y abdomen pasa del quinto somita torácico); anténulas largas, de 21 a 25 segmentos; con un saco ovífero ventral; ramas caudales con setas de longitud similar; quinta pata simétrica en hembras y asimétrica en machos; endópodos de la quinta pata en ambos sexos reducidos y con uno o dos segmentos; hábitos principalmente planctónicos... Calanoida: Diaptomidae (2)

1b. Tagmosis tipo Podoplea (división entre cefalotórax y abdomen entre el cuarto y quinto somita torácico); anténulas cortas, de 6 a 17 segmentos; palpo mandibular ausente o reducido a una protuberancia redondeada, armada con 2-3 setas; con dos sacos ovíferos laterales; quinta pata pequeña, con 1 a 3 segmentos y simétrica en ambos sexos; hábitos bénticos, litorales, a veces planctónicos... Cyclopoida: Cyclopidae (4)

2a. Talla menor a 2.0 mm excluyendo ramas caudales; anténula derecha del macho con procesos espiniformes en segmentos 10, 11, 13, 14 y 15; segundo basipodito de la quinta pata derecha del macho con proceso esclerotizado en forma de mariposa en el margen interno; endopoditos de la quinta pata de la hembra dividido en dos segmentos y con una longitud cercana a la mitad del primer segmento del exópodo; somita genital de la hembra no alargado, casi tan largo como ancho, quinto segmento metasomal de la hembra con un proceso dorsal... *Mastigodiaptomus cf. albuquerquensis*

2b. Talla menor a 1.4 mm excluyendo ramas caudales; anténula derecha del macho con procesos espiniformes en segmentos 10, 11 y 13; endopodito de la quinta pata de la hembra compuesto por solo un segmento y casi tan largo como el margen interno del primer segmento del exópodo... *Leptodiaptomus* (2)

3a. Antepenúltimo segmento de la anténula derecha del macho con proceso en forma de perilla y sin llegar a la mitad de largo que el siguiente segmento; hembra con alas metasomales asimétricas; proceso poco desarrollado en el margen posterior derecho del somita genital de la hembra... *L. garciai*

3b. Antepenúltimo segmento de la anténula derecha del macho con proceso redondeado en la punta y más tan largo que el siguiente segmento; primer exópodo derecho del macho con un

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

proceso hialino en el margen interno; hembra con alas metasomales simétricas y triangulares... *L.*
grupo *sicilis*

4a. Segmento terminal de la quinta pata con 3 setas o espinas... Eucyclopinæ (5)

4b. Segmento terminal o único de la quinta pata con 1 o 2 setas o espinas... Cyclopinæ (14)

5a. Quinta pata formada por un solo segmento, con una espina interna y dos setas externas; anténula con menos de 17 segmentos... (6)

5b. Quinta pata formada por dos segmentos; segmento distal con dos espinas laterales y una seta central; anténula con 17 segmentos; margen interno de las ramas caudales sin setas pilosas; seta distal interna muy corta en el segmento terminal del endópodo de la pata 4... *Macrocyclops albidus*

6a. Anténula con 12 segmentos... (9)

6b. Anténula con 11 o menos segmentos, usualmente 8... *Paracyclops* (7)

7a. Parte dorsal de la rama caudal con una hilera transversal de espínulas a nivel de la seta lateral... (8)

7b. Parte dorsal de la rama caudal con una hilera longitudinal de espínulas... *P. poppei*

8a. Rama caudal con margen interno liso, sin pelos... *P. chiltoni*

8b. Rama caudal con margen interno peludo... *P. sp.*

9a. Rama caudal de la hembra lisa, sin espínulas en el margen externo; rama caudal al menos 3 veces más ancho en ambos sexos; proporción largo:ancho de las furcas caudales = 2.6-3.1; proporción seta dorsal:furca caudal = 1; proporción de longitud espina apical interna:externa del tercer segmento endopodal de la pata 4 = 1.8-2.1; últimos dos segmentos de la anténula en hembras 3 veces más largo que ancho... *Tropocyclops prasinus aztequei*

9b. Rama caudal de la hembra con espínulas en el margen externo; rama caudal cerca de 4 veces más ancho en ambos sexos; anténulas con 12 segmentos en hembras y 16 en machos... *Eucyclops* (10)

10a. Ramas caudales menos de 5 veces más largas que anchas... (11)

10b. Ramas caudales más de 6 veces más largas que anchas; membrana antenular lisa o con aserraciones finas... *E. elegans*

11a. Tercer segmento endopodal de la cuarta pata menos de 3 veces más largo que ancho; segmento distal del exopodito de la cuarta pata con setas normales, no esclerotizadas... (12)

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

11b. Tercer segmento endopodal de la cuarta pata por lo menos 3 veces más largo que ancho... *E. cf. pectinifer*

12a. Quinta pata con setas externas iguales o más largas que la seta espiniforme interna... (13)

12b. Quinta pata con setas externas más cortas que la seta espiniforme interna; quinta pata con proporción de longitud de seta espiniforme interna:seta externa = 1.25; placa intercoxal de la cuarta pata con pelos; placa intercoxal de la segunda pata sin hileras de espinas...*E. pseudoensifer*

13a. Quinta pata con proporción de seta espiniforme interna:seta externa = 0.8, ambas insertas en el mismo nivel del segmento; longitud de la seta caudal dorsal:rama caudal = 0.85; placa intercoxal de la cuarta pata con espinas; placa intercoxal de la tercer pata con tres hileras de espinas... *E. torresphilipi*

13b. Quinta pata con proporción de seta espiniforme interna:seta externa = 0.5; placa intercoxal de la tercer pata con una hilera de espinas... *Eucyclops* sp.

14a. Quinta pata con dos segmentos; todas o algunas patas natatorias triarticuladas; anténula con 11,12 o 17 segmentos.... *Acanthocyclops* (15)

14b. Quinta pata reducida a un segmento; todas las patas natatorias biarticuladas; anténulas con 11 o 12 segmentos... *Microcyclops* (16)

15a. Segmento terminal del endópodo de la tercera y cuarta pata con una seta en el margen interno; una hilera de espínulas en el margen externo de la coxa de la cuarta pata... *A. grupo robustus-vernalis* sp1 (El Carmen y Tepeyahualco)

15b. Segmento terminal del endópodo de la tercera y cuarta pata con una espina en el margen interno; dos hileras de espínulas en el margen externo de la coxa de la cuarta pata... *A. grupo robustus-vernalis* sp2 (Alchichica)

16a. Anténula con 12 segmentos; segmento terminal de la quinta pata sin una espina media interna; esclerito intercoxal de la cuarta pata liso, sin hileras de espínulas... *M. cf. rubellus*

16b. Anténula con 11 segmentos; placa coxal de la cuarta pata con una hilera de espinas... *Microcyclops* sp.

“Nor shall I here discuss the various definitions which have been given of the term species. No one definition has as yet satisfied all naturalists; yet every naturalist knows vaguely what he means when he speaks of a species”

Charles Darwin

CAPÍTULO III

Análisis de la diversidad genética por medio de un marcador mitocondrial

Introducción

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular contenida en las mitocondrias y heredado exclusivamente por vía materna a los descendientes. Una de sus características principales es la ausencia de recombinación, por lo que los cambios observados entre diferentes secuencias se deben a mutaciones. Por otro lado, tiene una tasa de mutación más rápida (de 10 a 20 veces) que el ADN nuclear, probablemente como consecuencia de la carencia de mecanismos de reparación de las mutaciones tras la replicación (Ruíz-Pérez, 2008). Los cambios acumulados (mutaciones) nos permiten descubrir diferencias genotípicas y abordar relaciones filogenéticas entre organismos, por lo que con este propósito se han desarrollado técnicas para identificar taxones y haplotipos a partir del análisis de las diferencias en genes localizados en el ADNmt, como es el caso de los genes 18S rRNA, 16S rRNA y COI (citocromo oxidasa subunidad I), principalmente.

En diferentes trabajos, se ha descrito que la información obtenida utilizando como marcador el gen 18S parece ser fiable solo para resolver relaciones entre géneros (Thum, 2004), mientras que el gen 16S rRNA, parece ser útil al momento de inferir relaciones filogenéticas entre géneros y especies, así como entre poblaciones del mismo taxón, identificando haplotipos característicos como lo reportan Botello y Álvarez (2010) con macrocrustáceos y Bucklin *et al.* (2000) con copépodos. Asimismo, de Rojas *et al.* (2007) señalan que el gen 16S rRNA puede ofrecer buenos resultados al tratar de resolver cuestiones taxonómicas y filogenéticas de especies muy cercanas, disminuyendo su efectividad al comparar taxones distantes. Por su parte, una región de ~655 pares de bases del gen COI es, actualmente, considerada como una herramienta taxonómica conocida como el Código de Barras (Ratnasingham y Hebert, 2007; Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008), y ha sido probada como un buen indicador para la identificación de organismos a nivel de especie (Ratnasingham y Hebert, 2007) y, particularmente, para análisis filogenéticos y/o de riqueza de especies de crustáceos y zooplancton (Botello y Álvarez, 2010; Watson *et al.*, 2014), particularmente en copépodos (Lee, 2000; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Thum y Derry, 2008; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014, 2016, 2020).

Los marcadores anteriores, en especial COI, han permitido aclarar las relaciones entre distintas entidades biológicas, sobre todo en grupos de organismos en los que los análisis de morfología comparada, históricamente utilizados como la herramienta principal para identificar especies no son suficientes (Padial y de la Riva, 2009). Este tipo de entidades forman complejos de especies crípticas, prácticamente idénticas en su morfología, pero resultado de diferentes trayectorias evolutivas (Struck *et al.*, 2018), por lo que genética y reproductivamente están separadas entre sí. En particular, parece ser que este proceso de diversificación es común en organismos acuáticos (Knowlton, 1993). Dada esta situación, el uso de análisis moleculares en la identificación de taxones zooplanctónicos ha permitido reconocer una subestimación en la riqueza específica, así como ajustar los datos de áreas de distribución (pasando de cosmopolitas a restringidas, y hasta endémicas), así como los rangos de supuesta tolerancia a diferentes condiciones ecológicas presentados por cada miembro del complejo críptico (Lee, 2000; Montiel-Martínez *et al.* 2008; Elías-Gutiérrez y Varela, 2009). En los copépodos, la existencia de especies crípticas puede ser explicada, entre otros factores, por los mecanismos de reconocimiento sexual. En estos organismos dioicos, el reconocimiento de pareja está ligado a procesos químicos como la segregación de feromonas (Seuront y Stanley, 2014), debido a su visión reducida, generándose un proceso de estasis morfológico con fenotipos conservativos (Mercado-Salas *et al.*, 2018) donde las especies del complejo retienen un estado de carácter durante periodos prologados de tiempo (Struck *et al.*, 2018). Sin embargo, de presentarse, los cambios en las estructuras anatómicas podrían ser debidos al azar, pero sin descartar totalmente mecanismos de selección sexual asociados a caracteres sexuales secundarios.

De esta manera, después de identificar la diversidad taxonómica de copépodos que habitan la Cuenca Oriental, se seleccionaron tres taxones (*i.e.*, *Leptodiptomus* grupo *sicilis*, *Mastigodiptomus* cf. *albuquerqueensis* y *Acanthocyclops* grupo *robustus-vernalis*) cuyas distribuciones son amplias, esto es, que cuentan con poblaciones en más de dos lagos con condiciones limnológicas distintas con el objetivo de analizar, en este Capítulo, la divergencia genética de cada especie, utilizando los haplotipos identificados a partir de secuencias provenientes de un gen con tasa de mutación relativamente lenta, ampliamente utilizada en trabajos sistemáticos y filogenéticos, como es el caso del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI). Consideramos que, con estas herramientas es posible determinar las

divergencias entre las poblacionales de cada especie, lo que permitió explorar si los organismos de las distintas poblaciones pertenecen a una misma especie genética o han pasado por un proceso de diversificación críptica que dió como resultado un complejo de especies crípticas, con taxones distribuidos de manera discreta y posiblemente adaptados a las condiciones particulares de sus lagos de origen, pero sin mostrar cambios importantes en sus morfologías externas. Por lo que esto último tendría repercusiones en la diversidad taxonómica analizada en el capítulo anterior.

Material y Métodos

Se identificaron y aislaron individuos adultos provenientes de las muestras colectadas en campo y fijadas en etanol absoluto (véase, Capítulo II). A partir de cada uno de los individuos aislados en tubos de 0.2 ml, se extrajo el ADN total mediante la técnica HotSHOT (Montero-Pau *et al.*, 2008). Se retiró el etanol del tubo, el organismo se enjuagó dos veces con agua destilada y se dejó secar; posteriormente, se agregaron 20 μ l de solución de lisis (25 mM NaOH; 0.2 mM Na₂EDTA), se maceró a cada organismo dentro de su tubo y se incubó la muestra a 95 °C durante 30 min. Después, cada tubo fue colocado en hielo 5 min, se le agregaron 20 μ l de solución neutralizadora (40 mM Tris-HCl) y fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 3 min; finalmente, cada tubo con ADN fue almacenado a -20 °C para su preservación.

Del ADN extraído de cada copépodo, se secuenció una región de ~700 pares de bases correspondientes al gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI). Para amplificar el fragmento del gen COI se utilizaron los oligonucleótidos LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Se utilizó la técnica de ciclos de perfiles de temperatura para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por Botello y Álvarez (2010), para detalles de la técnica ver Lodish *et al.* (1996) y Ruíz-Pérez (2008). Cada reacción de PCR tuvo un volumen de 12.5 μ l, resultado de la mezcla de 10.5 μ l de la solución Amplicon MasterMix® (Tris-HCl pH 8.5, (NH₄)₂SO₄, 2.2 mM MgCl₂, 0.11% Tween® 20, 0.22 mM de cada dNTP y 0.11 unidades/ μ l Ampliqon Taq ADN polimerasa), 0.25 μ l de cada oligonucleótido y 1.5 μ l de ADN. Posteriormente, 4 μ l de cada producto de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con Midori Green® dentro un medio buffer TAE a 50 \times y visualizado bajo luz UV en un

transiluminador. Los detalles de cada proceso y las técnicas utilizadas se encuentran en el Apéndice 1. Los productos de PCR que generaron una banda única e intensa fueron enviados para su secuenciación. Estos productos se alinearon utilizando el editor BigDye© Terminator v.3.1 como se describe en Hajibabaei *et al.* (2006) y fueron secuenciados bidireccionalmente utilizando un secuenciador capilar ABI 3730 siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación en ambas direcciones fueron analizados y editados con el software Chromas[®] 2.13 (Technelysium Pty Ltd., 2001), donde se cotejaron los polimorfismos encontrados. Después, todas las secuencias del gen COI se alinearon usando el algoritmo ClustalW, incluido en el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). En los casos que fue posible y con el fin de delimitar la identidad taxonómica o explorar las relaciones filogenéticas, se agregaron al análisis secuencias de individuos de las especies estudiadas provenientes de otros cuerpos de agua y/o de las localidades donde fueron descritos los taxones, así como de especies relacionadas para ser utilizadas como grupo(s) externo(s). En este punto, se utilizaron las secuencias depositadas en la base de datos del Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems, 2017; <http://www.boldsystems.org>) y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Las divergencias genéticas se calcularon utilizando el modelo de distancia de dos parámetros de Kimura o K2P (Kimura, 1980). Con los árboles de vecinos cercanos generados con las distancias K2P (Saitou y Nei, 1987) se obtuvo una representación gráfica de las relaciones entre las poblaciones de cada especie y entre taxones. Posteriormente, con MEGA X se elaboró un árbol simplificado de todas las poblaciones/especies. Utilizando el software Collapse1.2 (Posada, 2006) se identificaron los diferentes haplotipos entre las poblaciones, la diversidad de estos fue obtenida con DnaSP 5 (Librado y Rozas, 2009), localizando los sitios polimórficos y calculando la diversidad nucleotídica (π), la proporción de sitios variables y la diversidad haplotípica (H_d).

Para estimar el grado de divergencia entre las poblaciones, se calculó con el software ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2006) la frecuencia nucleotídica entre las diferentes secuencias. Para calcular la variación dentro y entre poblaciones, se realizó un análisis de AMOVA (análisis de varianza molecular) calculando el coeficiente de diferenciación haplotípica (F_{st}) utilizando el software antes descrito. Para realizar el análisis de redes de haplotipos y clados

anidados se utilizó el software ANeCA (Panchal, 2007), el cual incluye los programas TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) y GeoDis 2.5 (Posada *et al.*, 2000). Con TCS 1.21 se construyó una red de haplotipos usando el método de parsimonia estadística. Para identificar un haplotipo ancestral y polarizar la red se utilizó una secuencia genética depositada en la base de datos del Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems, 2017) correspondiente a otra especie cercana y relacionada filogenéticamente (véanse, Resultados). Los clados se anidaron de acuerdo con el criterio propuesto por Templeton *et al.* (1987). Por último, utilizando GeoDis 2.5 se analizó el cladograma anidado según su distribución geográfica, considerando las frecuencias de cada uno de los haplotipos en las distintas poblaciones; se calcularon las diferencias promedio entre las distancias de cada clado (D_c) y las distancias de los clados anidados (D_n). Para los clados terminales *vs.* los clados internos, y se determinó su significancia estadística con pruebas de permutación aleatoria (Lanteri y Confalonieri, 2003). Con la clave de inferencia de Posada y Templeton (2008; disponible en <http://darwin.uvigo.es>), las distancias y los valores de importancia se utilizaron para definir los diferentes patrones de divergencia entre los haplotipos (p. ej., fragmentación alopátrica y aislamiento por distancia).

Por otro lado, se realizó una reconstrucción filogenética utilizando métodos bayesianos con el programa BEAST (Suchard *et al.*, 2018). La interfase BEAUti se utilizó para ordenar los datos y los parámetros requeridos en el análisis (MCMC = 10,000,000; muestreando cada 1,000 árboles). Los árboles generados se visualizaron en el software DensiTree v.2.2.5 (Bouckaert y Heled, 2014), y posteriormente fueron resumidos en un árbol de máxima credibilidad con los programas TreeAnnotator v1.10 (Rambaut y Drummond, 2017) y FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

En los casos donde se encontraron divergencias genéticas importantes, se puso a prueba la existencia de especies pertenecientes a un complejo críptico. Para delimitar a estas posibles especies a través de inferir la presencia de Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares (MOTUs, por sus siglas en inglés, *i.e.*, *Molecular Operational Taxonomic Units*; Blaxter *et al.*, 2005), se realizó un análisis de Descubrimiento Automático de Diferencias para Código de Barras (AGBD, por sus siglas en inglés, *i.e.*, *Automatic Barcode Gap Discovery*; Puillandre *et al.*,

2012) utilizando las secuencias del gen COI. Este análisis se realizó utilizando la aplicación en línea (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>).

Resultados

Leptodiptomus grupo *sicilis*

Las poblaciones mexicanas de esta especie se distribuyen en cuatro lagos de la Cuenca Oriental: El Carmen, La Preciosa, Atexcac y Quechulac. De cada población se identificaron y aislaron 15 individuos adultos, a los que se les extrajo el ADN total. Se obtuvieron un total de 48 secuencias (F + R) de las cuatro poblaciones (*i.e.*, El Carmen = 13; La Preciosa 12; Atexcac = 12; Quechulac = 11), correspondientes al gen COI. Todas las secuencias tuvieron una longitud ≥ 652 pb. Se agregó una secuencia de *L. sicilis* (Gen Bank: KM611610) proveniente del Lago Patricia en Canadá, así como cuatro secuencias del taxón *Leptodiptomus siciloides* del Lago Ontario, Canadá (Bold Systems ID: CAISN05-12, CAISN075-12, CAISN086-12, CAISN091-12) como grupo externo. Los valores medios de las distancias genéticas generados por el modelo K2P (Tabla 1) indican valores menores al 1% entre las poblaciones estudiadas de la Cuenca Oriental, con una mayor divergencia entre los copépodos provenientes de El Carmen y Atexcac (0.44%) y la menor entre organismos de El Carmen y La Preciosa (0.23%). Por su parte, la única secuencia proveniente de Canadá tiene una divergencia cercana al 2% con respecto a las poblaciones mexicanas. Estos datos indican que, bajo el criterio de la divergencia genética, las poblaciones todavía pertenecen a la misma especie (Matzen da Silva *et al.*, 2011).

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Tabla 1. Porcentaje promedio \pm error estándar de la distancia genética entre las poblaciones según el modelo de dos parámetros de Kimura (K2P).

	1. El Carmen	2. La Preciosa	3. Atexcac	4. Quechulac	5. Patricia	6. <i>L. siciloides</i>
1	0.25 \pm 0.1					
2	0.23 \pm 0.1	0.13 \pm 0.1				
3	0.44 \pm 0.2	0.38 \pm 0.2	0.10 \pm 0.0			
4	0.29 \pm 0.1	0.24 \pm 0.1	0.35 \pm 0.2	0.26 \pm 0.1		
5	2.14 \pm 0.5	2.06 \pm 0.5	2.12 \pm 0.5	2.04 \pm 0.5	-	
6	21.7 \pm 2.1	21.7 \pm 2.1	21.7 \pm 2.1	21.7 \pm 2.1	21.4 \pm 2.1	0.26 \pm 0.15

Después, se elaboró un árbol de identidad (*neighbor joining*) basado en las distancias genéticas del modelo K2P, usando una secuencia de arranque (*i.e.*, *bootstrap*) de 1000 réplicas (Fig. 1). El árbol generado al colapsar las ramas con un valor de probabilidad menor al 50% muestra que los organismos provenientes de Atexcac se agrupan en un clado, mientras que las diferencias entre los individuos de El Carmen, Quechulac y La Preciosa no son suficientes para colocarlos en clados distintos. También se observa que la secuencia del lago Patricia queda separada de las poblaciones de la Cuenca Oriental.

Con el fin de comparar a las poblaciones mexicanas de *L.* grupo *sicilis* y explorar sus afinidades filogenéticas se incluyeron en el análisis secuencias de otras especies de copépodos del mismo género (*L. siciloides*, *L. minutus*, *L. garciai* y *L. novamexicanus*), además de una especie de otro género de copépodo calanoide (*Mastigodiptomus albuquerquensis*) que sirvió como grupo externo. Las secuencias señaladas fueron obtenidas de la base de datos Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems, 2017) y sus número de identificación se muestran en el Apéndice 2. El árbol simplificado de identidad (vecino más cercano) generado con las distancias genéticas obtenidas con el modelo K2P (Fig. 2) indica que las poblaciones de *L.* grupo *sicilis* se agrupan entre sí en un clado distinto y están separadas de manera clara (> 20%) de las otras especies.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

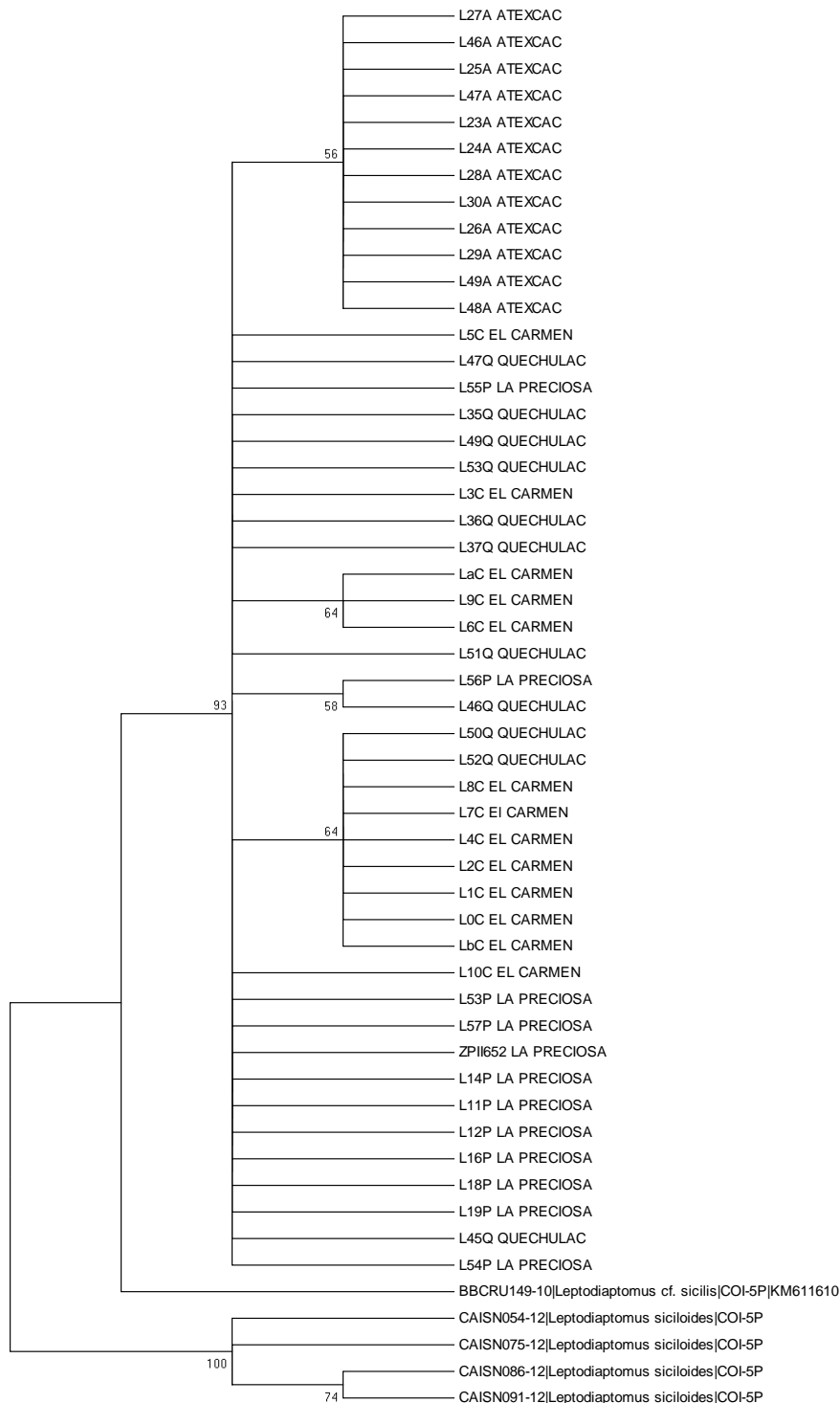


Fig. 1. Árbol de divergencia genética generado mediante el método de vecino más cercano (*neighbor-joining*) de las secuencias del gen COI de individuos de las 4 poblaciones de *L. grupo sicilis* provenientes de la Cuenca Oriental, según el modelo de K2P. Los valores mostrados en cada clado corresponden al valor de probabilidad (*bootstrap* de 1000 réplicas).

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

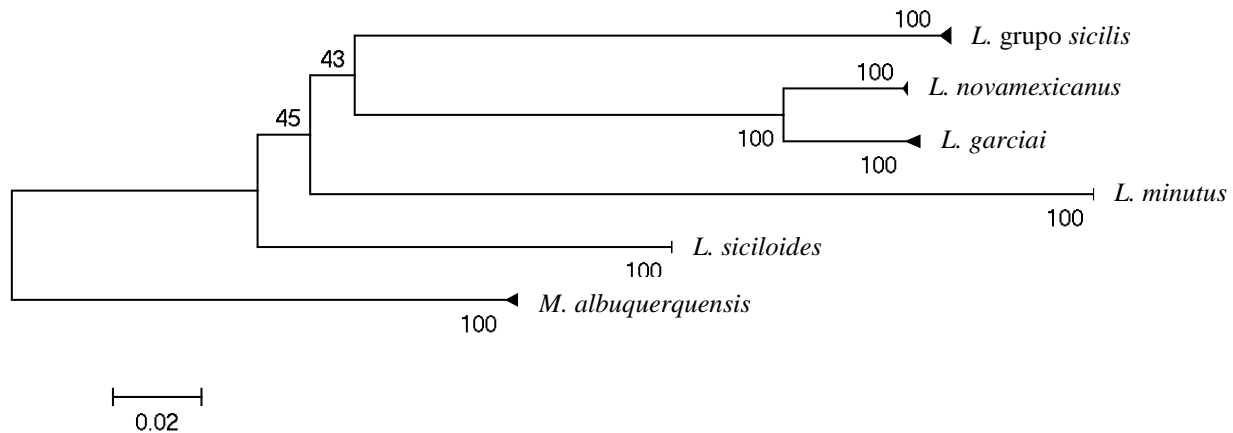


Fig. 2. Árbol simplificado de divergencia genética (vecino más cercano) de los individuos de las 4 poblaciones de *L. grupo sicilis* provenientes de la Cuenca Oriental en relación a *L. siciloides*, *L. novamexicanus*, *L. minutus*, *L. garciai* y *M. albuquerquensis*, según el modelo de 2 parámetros de Kimura. Los valores mostrados en cada clado corresponden al valor de probabilidad (*bootstrap*; 1,000 réplicas).

Posteriormente, se realizó un alineamiento de las secuencias de *L. grupo sicilis* de la Cuenca Oriental para determinar los haplotipos presentados dentro de cada población, este alineamiento contó con 652 pb y reveló 16 sitios polimórficos ($\pi = 0.0028$). Se encontraron 15 haplotipos entre las 48 secuencias ($Hd = 0.875$) de las cuatro poblaciones analizadas (Tabla 2). Un solo haplotipo (E) se compartió entre las poblaciones de El Carmen, La Preciosa y Atexcac; por su parte, los haplotipos C y D se comparten entre las poblaciones de copépodos de El Carmen y Quechulac, y El Carmen y La Preciosa, respectivamente. La población de Atexcac fue la única cuya totalidad haplotipos no son compartidos con los individuos de otros lagos.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Tabla 2. Haplotipos del gen COI presentes en las poblaciones de *L. grupo sicilis* de la Cuenca Oriental. C = El Carmen; P = La Preciosa; A = Atexcac; Q = Quechulac.

Haplotipo	Frec.	Individuos
A	3	LaC, L6C, L0C,
B	1	L5C
C	9	LbC, L0C, L1C, L2C, L4C, L7C, L8C, L50Q, L52Q
D	10	L10C, ZPII652P, L11P, L12P, L14P, L16P, L18P, L19P, L53P, L57P,
E	7	L3C, L55P, L35Q, L36Q, L37Q, L47Q, L53Q
F	1	L56P
G	1	L54P
H	1	L49A
I	9	L23A, L24A, L25A, L26A, L28A, L29A, L30A, L46A, L47A
J	1	L48A
K	1	L27A
L	1	L45Q
M	1	L46Q
N	1	L49A
O	1	L51Q

En el análisis dentro de cada población (Tabla 3) se encontró que la población de Quechulac cuenta con la diversidad haplotípica más alta ($H_d = 0.80$) y los mayores valores de diversidad nucleotídica ($\pi = 0.0026$).

Tabla 3. Número de haplotipos, sitios de segregación, valores de diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (π) entre los individuos de *L. grupo sicilis* de la Cuenca Oriental.

Población	secuencias (n)	sitios polimórficos	haplotipos	H_d	π
El Carmen	13	4	5	0.6923	0.00244
La Preciosa	12	4	4	0.4545	0.00123
Atexcac	12	4	4	0.4545	0.00102
Quechulac	11	7	6	0.8000	0.00257
TOTAL	48	16	15	0.8750	0.00285

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

En cuanto a los análisis de distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones, se obtuvieron los valores del coeficiente de diferenciación haplotípica (F_{st}) más bajos entre los individuos de El Carmen y Quechulac (0.113), lo que indica una diferenciación baja pero significativa estadísticamente ($P < 0.05$), lo que indica la existencia de diferentes estructuras genéticas entre ambas poblaciones, con un patrón similar en todas las poblaciones estudiadas (Tabla 4). Finalmente, el valor total de F_{st} (0.42) y de N_m (0.68) sugiere una estructura genética alta entre las poblaciones y una nula dispersión de alelos entre las mismas.

Tabla 4. Valores de diferenciación haplotípica (F_{st}) entre las poblaciones analizadas de *L. grupo sicilis* en los lagos de la Cuenca Oriental. Se indican (*) diferencias significativas entre las poblaciones ($P < 0.05$).

	1. El Carmen	2. La Preciosa	3. Atexcac	4. Quechulac
1				
2	0.2125 *			
3	0.5963 *	0.6959 *		
4	0.113 *	0.187 *	0.4783 *	

El valor del índice F_{st} entre los diferentes haplotipos (0.1130 – 0.6959; $P \leq 0.05$) sugiere la ausencia de flujo génico interpoblacional. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), con el cual se estimó la diferenciación genética de las distintas poblaciones, determinando que existe un porcentaje de variación mayor entre poblaciones (57.2 %; $P \leq 0.05$), mientras que la variación de tipo intrapoblacional es menor (42.8 %).

Por último, el análisis de red de haplotipos y clados anidados (Fig. 3) mostró 5 clados de primer nivel y 2 de segundo nivel, donde uno de éstos últimos correspondió exclusivamente a los individuos provenientes de la población de Atexcac. La clave de inferencia indicó un patrón de flujo génico restringido por aislamiento por distancia en el clado que agrupó a las poblaciones de El Carmen, La Preciosa y Atexcac, y un patrón de fragmentación alopátrica entre los clados de segundo nivel.

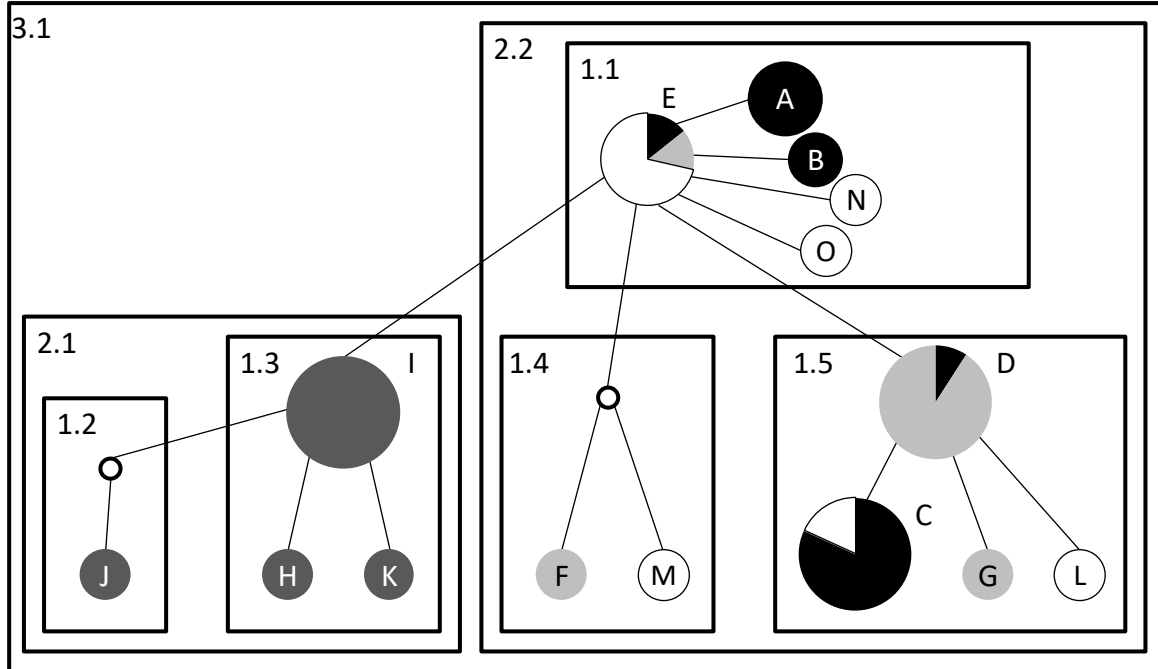


Fig. 3. Red de haplotipos y diseño de clados anidados construidos con secuencias del gen COI de *L. grupo sicilis* de la Cuenca Oriental.

Para generar la reconstrucción de las relaciones filogenéticas mediante modelos bayesianos (Fig. 4) se utilizó el modelo evolutivo HKY+G (Bic = 4,109.437), el modelo más cercano fue el HKY (Bic = 4,114.179). Este análisis indica la existencia de un clado en el cual se agrupan los individuos de las cuatro poblaciones mexicanas. Las topologías condensadas muestran ramas cruzadas entre los distintos clados internos. Sin embargo, la secuencia del lago Patricia en Canadá, se sitúa nuevamente de manera clara en una rama separada del resto.

Por su parte, el árbol de consenso o de máxima credibilidad (Fig. 5) generado a partir de las topologías anteriores, relaciona, a diferencia del árbol generado con las distancias genéticas (Fig. 1), a la población de Atexcac con algunos individuos provenientes de La Preciosa y Quechulac, aunque también, todos los individuos de Atexcac pertenecen al mismo clado. Los copépodos de El Carmen, Quechulac, La Preciosa y Atexcac no muestran un patrón de distribución geográfica de sus genotipos, en cada clado se encuentran relacionados ejemplares de estas poblaciones.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

L. siculoïdes
L. siculoïdes
L. siculoïdes
L. siculoïdes
PATRICIA
L56Preciosa
L46Quechulac
L48Atexcac
L27Atexcac
L25Atexcac
L46Atexcac
L47Atexcac
L29Atexcac
L23Atexcac
L30Atexcac
L26Atexcac
L49Atexcac
L28Atexcac
L24Atexcac
L4Carmen
LbCarmen
L1Carmen
L8Carmen
L52Quechulac
L0Carmen
L2Carmen
L7Carmen
L50Quechulac
L14Preciosa
L19Preciosa
L11Preciosa
L57Preciosa
L18Preciosa
L53Preciosa
L10Carmen
L45Quechulac
L12Preciosa
L54Preciosa
ZP11652Preciosa
L16Preciosa
L5Carmen
LaCarmen
L9Carmen
L6Carmen
L47Quechulac
L3Carmen
L55Preciosa
L37Quechulac
L35Quechulac
L53Quechulac
L51Quechulac
L49Quechulac
L36Quechulac

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

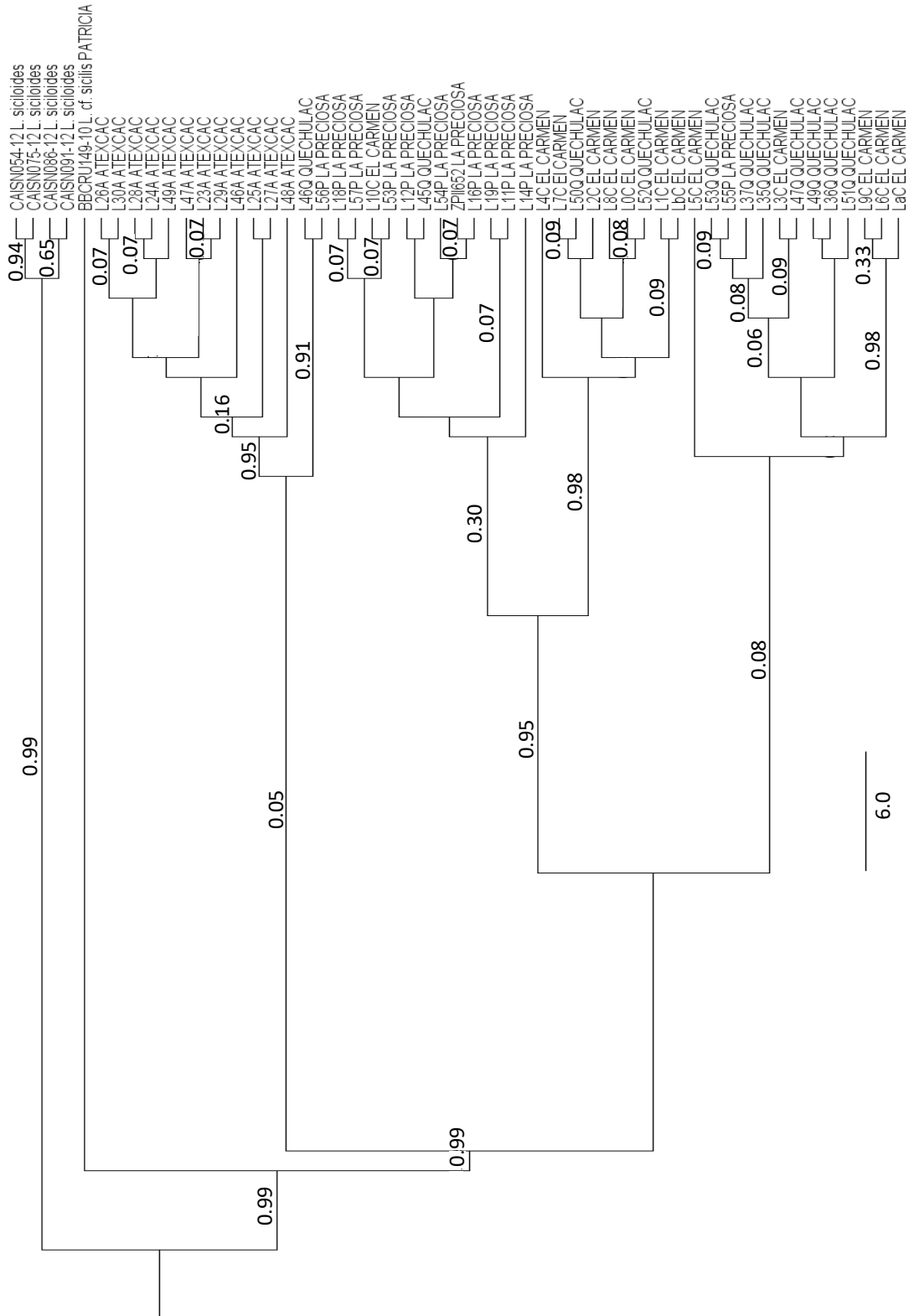


Fig. 5. Árbol de máxima credibilidad de las relaciones de *L.* grupo *sicilis*. Los clados terminales señalan el lago de procedencia de los organismos. Se indica el valor de las probabilidades posteriores en cada nodo (valores ≥ 0.05). La barra de escala indica las sustituciones por sitio.

Mastigodiptomus cf. *albuquerqueensis*

Este taxón se encuentra distribuido en cinco lagos de la Cuenca Oriental: El Carmen, Tepeyahualco, Aljojuca, Quechulac y Tecuitlapa. De cada población se identificaron y aislaron al menos 15 hembras adultas, a las que se les extrajo el ADN siguiendo la misma metodología usada en la especie anterior. Se obtuvieron un total de 59 secuencias (F + R) de las cinco poblaciones estudiadas (*i.e.*, El Carmen = 17; Tepeyahualco = 14; Aljojuca = 12; Quechulac = 4; Tecuitlapa = 12). En este análisis también se incluyeron secuencias pertenecientes a individuos provenientes de otras tres localidades e identificados morfológicamente como *Mastigodiptomus albuquerqueensis* sensu stricto (*i.e.*, Papasquiario, Durango = 2; El Salvador, Durango = 2; Rancho Grande, Zacatecas = 2), así como secuencias de poblaciones de otras localidades mexicanas donde se han registrado organismos identificados como *M. patzcuarensis* (Cuitzeo, Michoacán = 2) y *M. cf. albuquerqueensis* (*i.e.*, Cuitzeo, Michoacán = 5; La Cruz, Guanajuato = 4; La Goleta, Edo. Méx. = 2). Las secuencias señaladas anteriormente fueron obtenidas de la base de datos Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems, 2017). Por último, también se incluyeron 5 secuencias de Tecocomulco, Hildago y 9 de Cuitzeo, Michoacán (Omar-Barrera, datos no publicados) pertenecientes a individuos del mismo grupo.

Todas las secuencias analizadas tuvieron una longitud de 630 pb. Los valores medios de las distancias genéticas obtenidos con el modelo K2P indican valores mayores al 7 % entre los individuos identificados como *M. albuquerqueensis* s.s. (véase Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014) y todas las poblaciones pertenecientes a *M. cf. albuquerqueensis* de los lagos de Oriental, por lo que se puede suponer *a priori* que pertenecen a especies distintas. El árbol de identidad (vecino más cercano) generado con las distancias genéticas obtenidas con el modelo K2P usando una secuencia de arranque de 1,000 réplicas (Fig. 6) indica que las poblaciones de *M. cf. albuquerqueensis* se agrupan entre sí en tres clados principales, genéticamente distintos: A (que incluye a las secuencias de *M. patzcuarensis*); así como B y C, con representantes viviendo en simpatria dentro un mismo lago (El Carmen y Tepeyahualco); y D, con las las poblaciones de *M. albuquerqueensis* s.s. Los dos linajes correspondientes a los clados B y C serán denominadas, en adelante, como *Mastigodiptomus* “Faja” y *Mastigodiptomus* “Oriental”, respectivamente.

Se observa que los lagos de El Carmen, Tepexahualco y Cuitzeo cuentan con, por lo menos, dos variantes génicas que se localizan en clados distintos del árbol de identidad, lo que significaría la presencia de dos especies crípticas en simpatria dentro de cada uno de estos lagos.

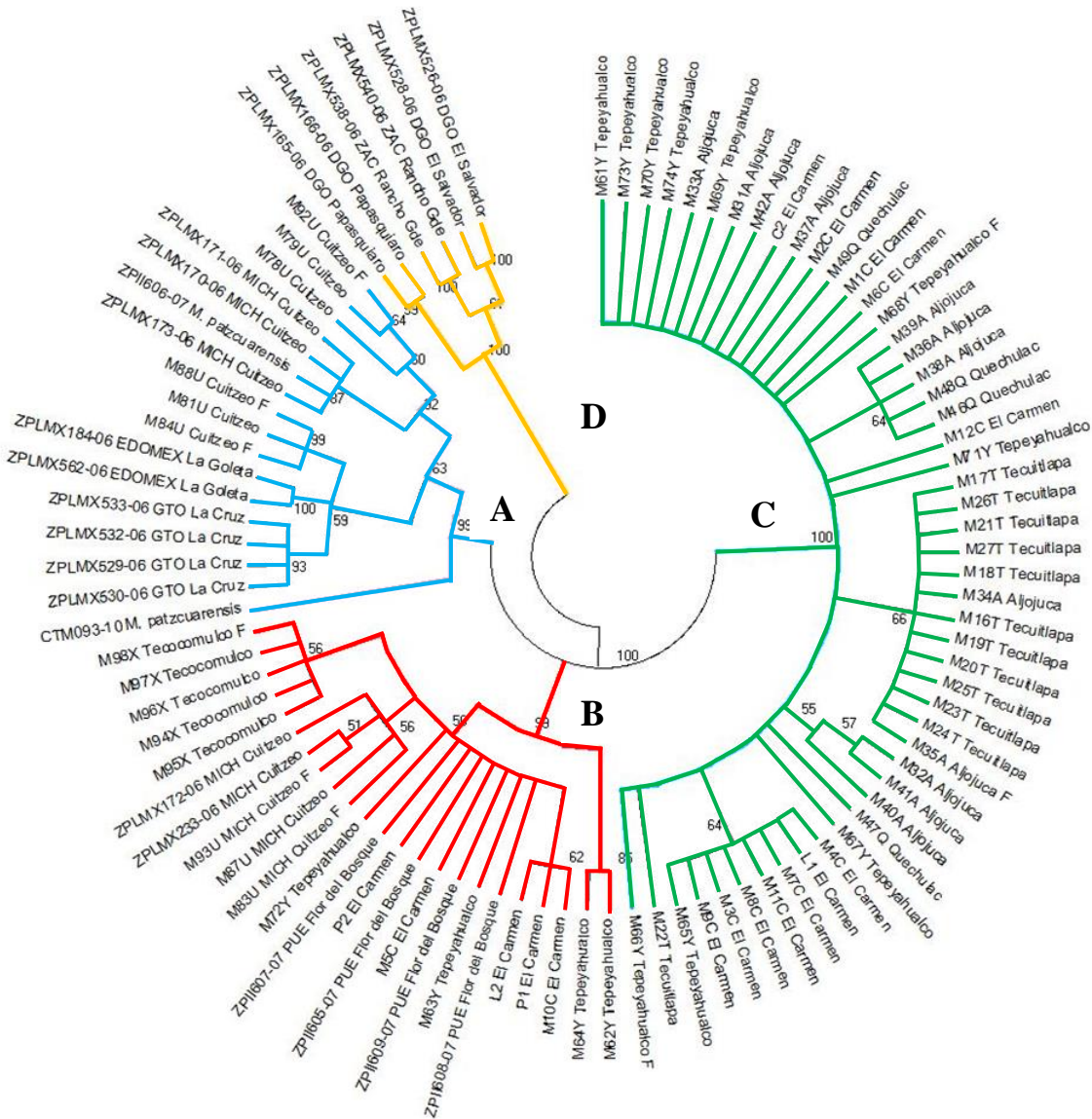


Fig. 6. Árbol de divergencia genética generado mediante el método de vecino más cercano (*neighbor-joining*) de las secuencias del gen COI de individuos de *M. cf. albuquerquensis* provenientes de las poblaciones de la Cuenca Oriental, Cuitzeo (Michoacán), Tecocomulco (Hidalgo) y Flor del Bosque (Puebla), y de *M. albuquerquensis* s.s. según el modelo de K2P. Los valores mostrados en cada clado corresponden al valor de probabilidad (bootstrap; 1,000 réplicas). **A.** *M. patzcuarensis*; **B.** *Mastigodiptomus* “Faja”; **C.** *Mastigodiptomus* “Oriental”; **D.** *M. albuquerquensis* s.s.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

En la reconstrucción de las relaciones filogenéticas utilizando métodos bayesianos (Fig. 7) se utilizó el modelo evolutivo HKY+G (Bic = 5,589), el siguiente modelo más cercano fue el T92+G (Bic = 5,592.481). En el análisis se generaron tres clados. En el primero, se agrupan los individuos de cada población de Tecocomulco, Hgo., Flor del Bosque, Pue., así como una parte de las poblaciones de Cuitzeo, Mich., y de El Carmen y Tepeyahualco, Pue.; estos individuos forman parte del taxón *Mastigodiptomus* “Faja”. En el segundo, se forma un conjunto con los organismos de los lagos de la Cuenca Oriental, contemplado a todas las secuencias de Aljojuca y Tecuitlapa, pero solamente una parte de las provenientes de El Carmen y Tepeyahualco; este clado corresponde a lo que se propone como la especie *Mastigodiptomus* “Oriental”. En el tercer clado, se encuentran los individuos de *M. patzcuarensis*, y las secuencias identificadas como *M. cf. albuquerquensis*, provenientes de La Goleta, Edo. Méx. y La Cruz, Gto., por lo que se puede inferir que estas poblaciones pertenecen al taxón *M. patzcuarensis*. A pesar de lo anterior, las topologías generadas que se resumen en el árbol de densidad muestran ramas cruzadas entre los distintos clados, aunque las secuencias de *M. albuquerquensis* s.s. quedan en una rama separada, como grupo externo.

Por otro lado, el árbol de máxima credibilidad generado con las topologías anteriores (Fig. 8) muestra que las especies *M. patzcuarensis* y *Mastigodiptomus* “Faja” tienen una mayor relación entre sí, mientras que los organismos de *Mastigodiptomus* “Oriental” pertenecen a un linaje separado y ampliamente distribuido en los lagos de la Cuenca Oriental, con variantes genéticas similares localizadas en diferentes lagos.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental



Fig. 7. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas de las poblaciones de copépodos afines a *M. albuquerquensis*. Las topologías condensadas se formaron mediante un análisis bayesiano a partir de 10,000,000 de generaciones, y del muestreo de árboles cada 1,000 árboles.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

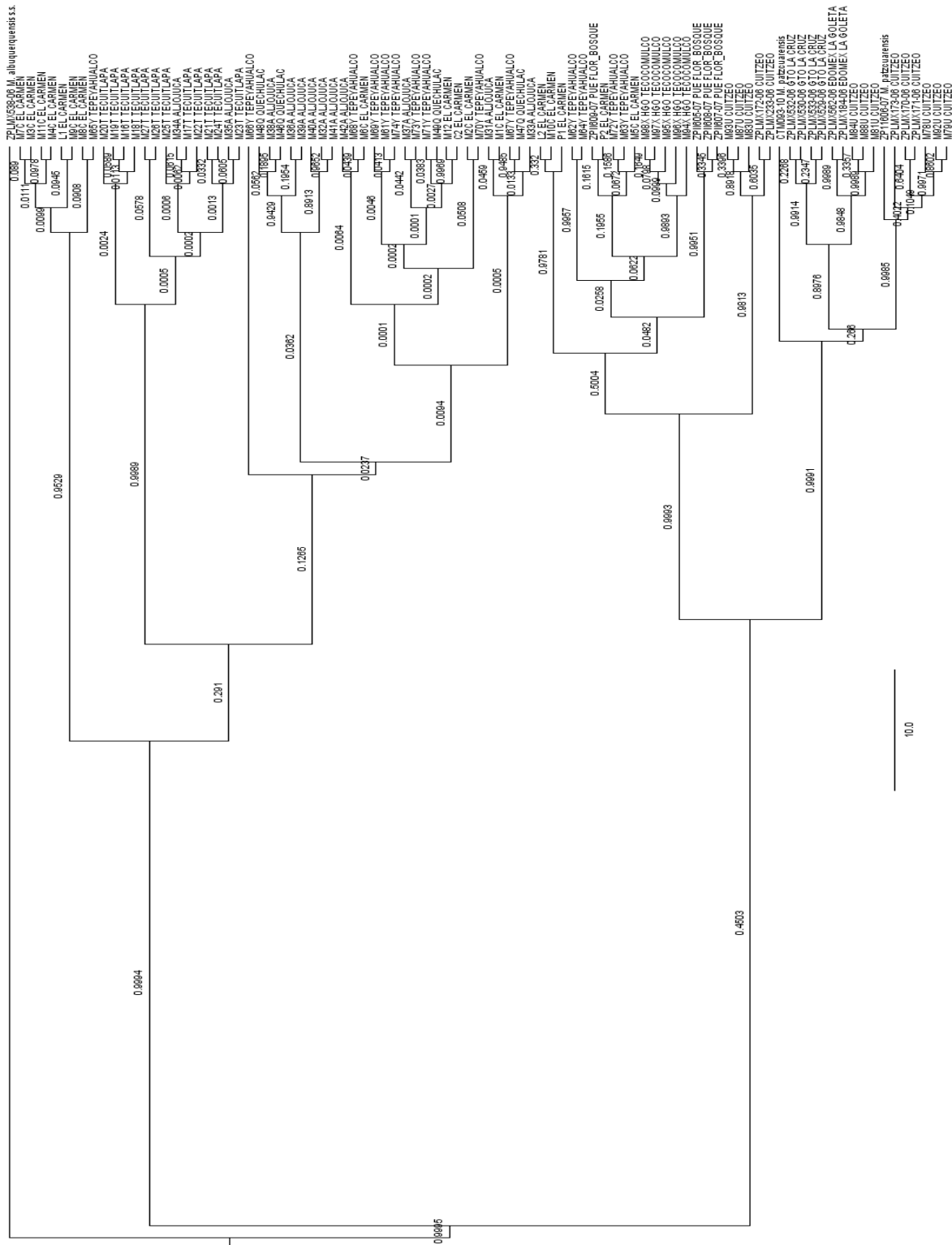


Fig. 8. Árbol de máxima credibilidad de las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *M. cf. albuquerquensis* de los lagos de Oriental. Las ramas terminales señalan el lago de origen de los copépodos. En cada nodo se muestra el valor de las probabilidades posteriores (valores ≥ 0.05). La barra indica las sustituciones por sitio.

Posteriormente, con la partición generada en el análisis ABGD (Fig. 9) se identificaron 3 grupos o MOTUs distintos a *M. albuquerquensis* s.s., lo que corroboran la presencia de un complejo de especies crípticas. La primera ($n = 17$) incluye a las secuencias de *M. patzcuarensis* (Cuitzeo) y a las que provienen de poblaciones de Guanajuato y del Estado de México (identificadas en la base de datos de Bold Systems como *M. cf. albuquerquensis*). La segunda especie ($n = 23$), *Mastigodiaptomus* “Faja”, cuenta con individuos habitando los lagos de Tecocomulco, Cuitzeo, Flor del Bosque, El Carmen y Tepeyahualco. Por su parte, la tercera especie ($n = 50$), *Mastigodiaptomus* “Oriental”, se distribuye solamente en la Cuenca Oriental, en los lagos Aljojuca, Tecuitlapa y Quechulac. Además, esta especie comparte parte de su distribución con *Mastigodiaptomus* “Faja”, ya que ambas se encuentran en El Carmen y Tepeyahualco.

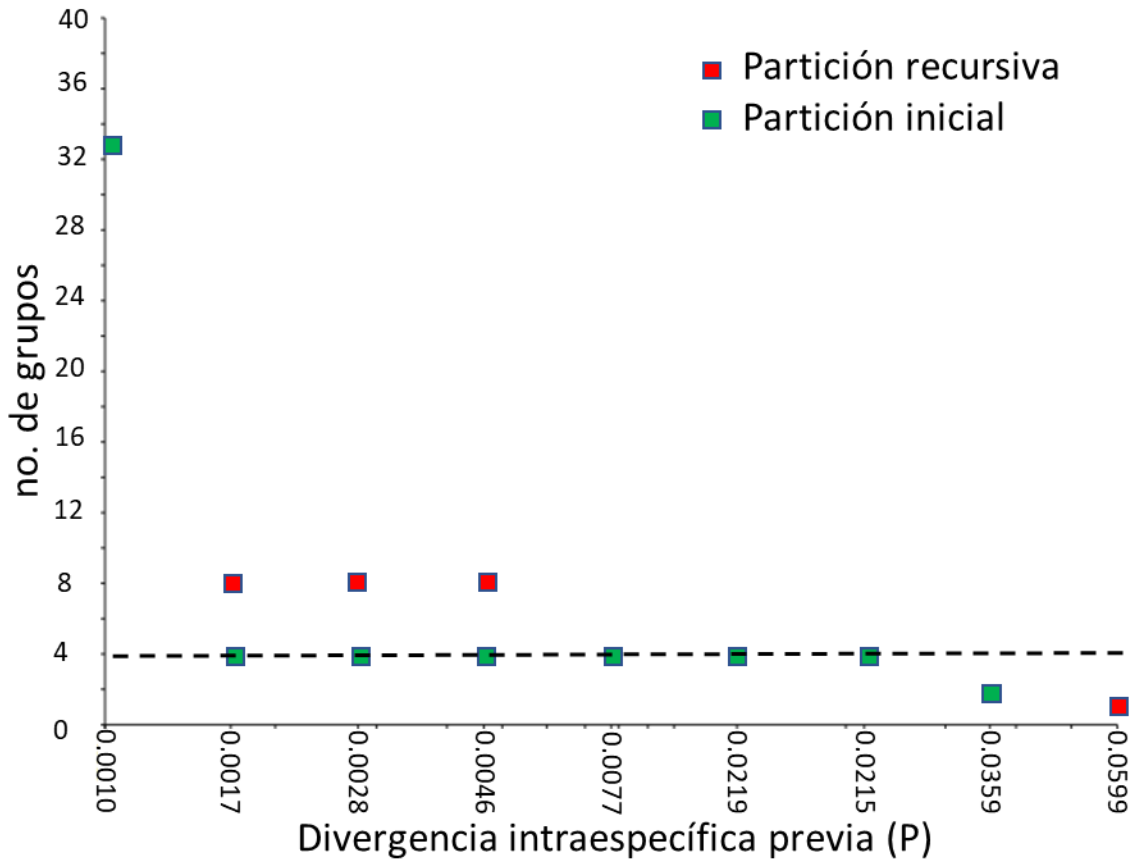


Fig. 9. MOTUs generados a partir del análisis ABGD con secuencias de COI de *Mastigodiaptomus*. Se utilizaron las distancias JC69 Jukes-Cantor. La línea punteada indica el punto de estabilidad y el número más confiable de MOTUs generados.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Con la información obtenida en la división inicial, se reagruparon en cuatro las secuencias analizadas provenientes de la Cuenca Oriental y otras poblaciones, y se calcularon las distancias genéticas entre los nuevos grupos formados (Tabla 5). Se observa que, dentro de cada grupo, la divergencia máxima es cercana al 1%, y entre los distintos grupos es mayor al 3%.

Tabla 5. Proporción \pm error estándar de la distancia genética entre las poblaciones de *Mastigodiptomus* comparadas según el modelo de 2 parámetros de Kimura (K2P). Cada grupo de color indica MOTUs (*i.e.*, especies) diferentes: amarillo = *M. albuquerqueensis* s.s.; azul = *M. patzcuarensis*; rojo = *Mastigodiptomus* “Faja”; verde = *Mastigodiptomus* “Oriental”.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 Zac_Rancho_Gde		0.008	0.008	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	0.013	0.013	0.014	0.013
2 Dgo_Papasquiari	0.041		0.007	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.012	0.012	0.012	0.013	0.012
3 Dgo_El_Salvador	0.039	0.034		0.013	0.013	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
4 Gto_La_Cruz	0.084	0.078	0.092		0.004	0.002	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
5 EdoMex_La_Golet	0.084	0.076	0.094	0.011		0.004	0.009	0.009	0.009	0.009	0.008	0.009	0.009	0.010	0.010	0.009
6 Cuitzeo_2	0.083	0.076	0.089	0.005	0.013		0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
7 Cuitzeo_1	0.078	0.071	0.081	0.038	0.043	0.033		0.002	0.002	0.002	0.002	0.008	0.008	0.008	0.009	0.008
8 Tecocomulco	0.082	0.076	0.086	0.041	0.046	0.034	0.004		0.002	0.002	0.002	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
9 Flor_del_Bosque	0.080	0.074	0.084	0.039	0.044	0.034	0.004	0.002		0.000	0.000	0.008	0.009	0.009	0.009	0.008
10 El_Carmen_1	0.081	0.074	0.085	0.037	0.045	0.033	0.004	0.002	0.000		0.001	0.008	0.008	0.008	0.009	0.008
11 Tepeyahualco_1	0.078	0.072	0.082	0.036	0.041	0.032	0.004	0.002	0.001	0.001		0.008	0.008	0.008	0.009	0.008
12 Tepeyahualco_2	0.093	0.084	0.099	0.049	0.056	0.048	0.042	0.044	0.043	0.041	0.040		0.000	0.000	0.003	0.000
13 Quechulac	0.093	0.084	0.099	0.049	0.055	0.048	0.043	0.046	0.044	0.042	0.041	0.000		0.000	0.003	0.000
14 Aljojuca	0.093	0.084	0.099	0.049	0.056	0.048	0.043	0.046	0.044	0.042	0.041	0.000	0.000		0.002	0.000
15 Tecuitlapa	0.099	0.087	0.105	0.054	0.062	0.053	0.048	0.051	0.049	0.047	0.046	0.005	0.005	0.004		0.003
16 Carmen_2	0.093	0.084	0.099	0.048	0.055	0.047	0.041	0.044	0.042	0.041	0.040	0.000	0.001	0.001	0.005	

Posteriormente, se realizó un análisis para comparar a estas posibles especies con otras del mismo género (*i.e.*, *M. nesus*; *M. montezumae*; *M. reidae*; *M. siankaanensis*; *M. cuneatus*; *M. alexei*; *M. ha*; *M. cihuatlan*). Las secuencias del gen COI de estas últimas también fueron obtenidas de la base de datos Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems, 2017), los números de identificación se incluyen en el Apéndice 2. En este caso, los valores de distancias genéticas obtenidos con el modelo K2P muestran diferencias cercanas al 20 % entre las distintas especies que no pertenecen al grupo “*albuquerqueensis*”, el cual, entre sus miembros (*i.e.*, *M. albuquerqueensis* s.s.; *M. patzcuarensis*; *M. “Faja”* y *M. “Oriental”*), muestra diferencias entre 4-9 % (Tabla 6).

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Tabla 6. Proporción \pm error estándar de la distancia genética entre las especies del género *Mastigodiatomus* comparadas según el modelo de 2 parámetros de Kimura (K2P).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>M. albuquerquensis</i> s.s.		0.012	0.011	0.011	0.019	0.019	0.020	0.020	0.022	0.021	0.021	0.022
2 <i>M. "Oriental"</i>	0.097		0.009	0.009	0.021	0.022	0.023	0.023	0.023	0.022	0.021	0.024
3 <i>M. "Faja"</i>	0.082	0.049		0.008	0.021	0.020	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.025
4 <i>M. patzcuarensis</i>	0.090	0.057	0.044		0.020	0.020	0.022	0.022	0.022	0.021	0.020	0.024
5 <i>M. cuneatus</i>	0.207	0.213	0.216	0.208		0.021	0.021	0.022	0.024	0.024	0.021	0.023
6 <i>M. cihuatlan</i>	0.196	0.215	0.204	0.198	0.203		0.021	0.022	0.023	0.022	0.022	0.023
7 <i>M. siankaanensis</i>	0.207	0.227	0.222	0.213	0.212	0.196		0.020	0.022	0.021	0.022	0.023
8 <i>M. montezumae</i>	0.230	0.252	0.243	0.241	0.219	0.214	0.190		0.023	0.022	0.024	0.023
9 <i>M. alexei</i>	0.244	0.253	0.243	0.240	0.254	0.235	0.217	0.248		0.020	0.023	0.022
10 <i>M. reidae</i>	0.235	0.234	0.234	0.224	0.245	0.217	0.196	0.251	0.211		0.023	0.022
11 <i>M. ha</i>	0.207	0.207	0.211	0.196	0.194	0.214	0.200	0.235	0.213	0.215		0.021
12 <i>M. nesus</i>	0.246	0.248	0.268	0.259	0.252	0.238	0.225	0.257	0.240	0.231	0.191	

Por su parte, en el árbol simplificado de identidad (Fig. 10) generado con las distancias genéticas obtenidas con el modelo K2P, se observa que las poblaciones analizadas previamente se agrupan entre sí y se separan de manera clara en clados distintos (*M. patzcuarensis*, *Mastigodiatomus* “Faja” y *Mastigodiatomus* “Oriental”) de las otras especies.

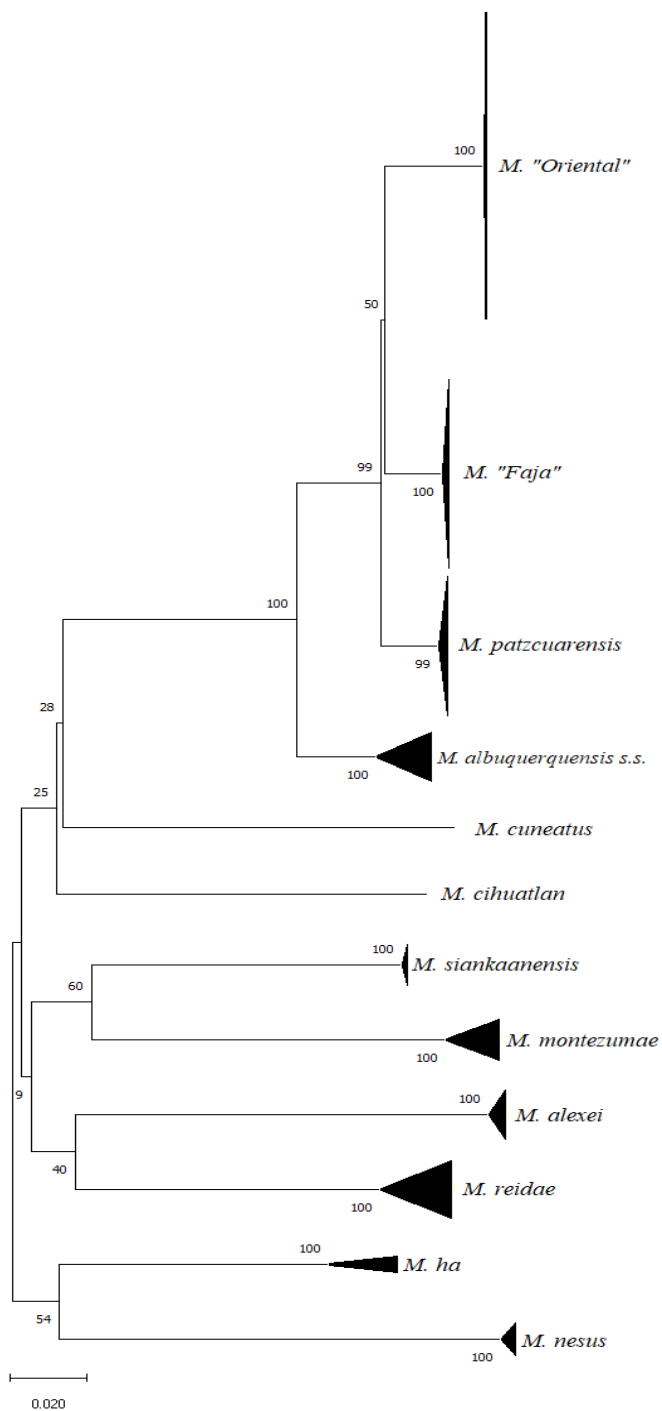


Fig. 10. Árbol simplificado de divergencia genética (*neighbor joining*) de las especies analizadas del género *Mastigodiptomus*, según el modelo de 2 parámetros de Kimura. Los valores mostrados corresponden al valor de probabilidad (*bootstrap*: 1,000 réplicas).

Acanthocyclops grupo *robustus-vernalis*

Los individuos identificados como parte de este taxón cuentan con poblaciones en tres lagos de la Cuenca Oriental: El Carmen, Tepeyahualco y Alchichica. De cada una de estas, se aislaron hembras 10 adultas a las que se les extrajo el ADN total, a partir del cual se obtuvieron productos de PCR siguiendo las técnicas descritas anteriormente. Se generaron, editaron y alinearon 17 secuencias del gen mitocondrial COI (*i.e.*, El Carmen = 4; Tepeyahualco = 6; Alchichica = 7). No se consideraron secuencias con un tamaño menor a 601 pb. Con el fin de identificar las relaciones de las poblaciones de la Cuenca Oriental con otros taxones cercanos, en nuestro análisis se agregaron 83 secuencias del mismo gen provenientes de otras especies del mismo género (*i.e.*, *A. americanus* = 60; *A. vernalis* = 6; *A. robustus* = 7; *A. capillatus* = 1; *Acanthocyclops* sp. = 9). Tales secuencias fueron obtenidas de la base de datos Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems, 2017) y sus número de identificación se señalan en el Apéndice 2.

Los resultados muestran que las divergencias genéticas generadas con el modelo de 2 parámetros de Kimura (K2P) son elevadas (mayores al 16%) entre las especies nominales. Después se elaboró un árbol de identidad (vecino más cercano) basado en las distancias genéticas del modelo K2P, usando un arranque de 1,000 réplicas (Fig. 11). Se agregaron secuencias del ciclopoide *Macrocyclus albidus* para conformar el grupo externo. En el árbol generado al colapsar las ramas con un valor de probabilidad menor al 50%, se observa que algunas secuencias provenientes de Tepeyahualco están relacionadas con las identificadas como *A. americanus* en la base de datos de Bold Systems. Además, otra parte de los organismos de este lago, así como todos ejemplares, los colectados en El Carmen, forman un clado separado de las demás especies. Por otro lado, los individuos de Alchichica forman un mismo clado con las secuencias de *A. robustus* provenientes de los lagos Maridalen, Noruega y Ontario, Canadá.

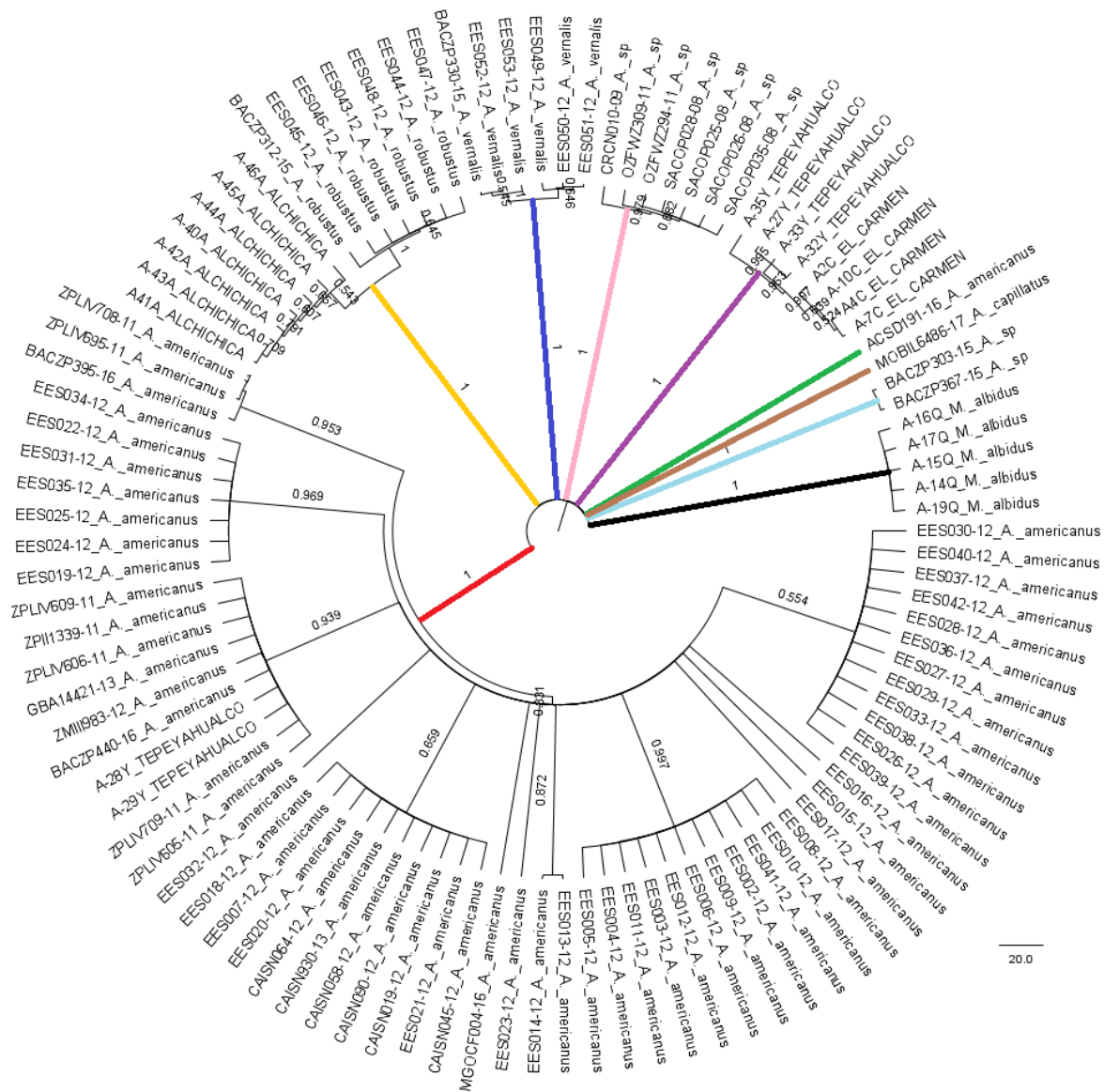


Fig. 11. Árbol de divergencia genética generado mediante el método de vecino más cercano de las secuencias del gen COI de individuos del género *Acanthocyclops*, según el modelo de K2P. Los valores mostrados en cada clado corresponden al valor de probabilidad (1,000 réplicas). El color en las ramas indica diferentes linajes.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Para generar una reconstrucción de las relaciones filogenéticas mediante modelos bayesianos (Fig. 12), se utilizó el modelo evolutivo HKY+G+I (Bic = 10,396.765) el más cercano fue el modelo TN93+G+I (Bic = 10,398.257). A diferencia del análisis de distancia genética, donde los individuos de las poblaciones estudiadas se agrupan claramente en ramas distintas, en este análisis filogenético se indica la existencia de diferentes clados. Si bien, cada clado está conformado por secuencias identificadas como parte de un mismo linaje, las topologías condensadas muestran una gran cantidad de ramas cruzadas entre los clados propuestos indicando que la señal filogenética no es consistente.

Por su parte, el árbol de máxima credibilidad (Fig. 13) generado a partir de 10 millones de topologías anteriores muestra una mayor relación entre *A. americanus* con el linaje distribuido en El Carmen y Tepeyahualco y con *A. vernalis*. Una secuencia identificada como *A. americanus* no tiene relaciones filogenéticas cercanas con el clado formado por los individuos de esta especie, por lo que, se puede especular que el individuo del que se obtuvo está mal identificado. Los copépodos de Alchichica se agrupan claramente con las secuencias identificadas como *A. robustus* (provenientes de Canadá y Noruega) y se relacionan con uno de los dos linajes etiquetados como *Acanthocyclops* sp.

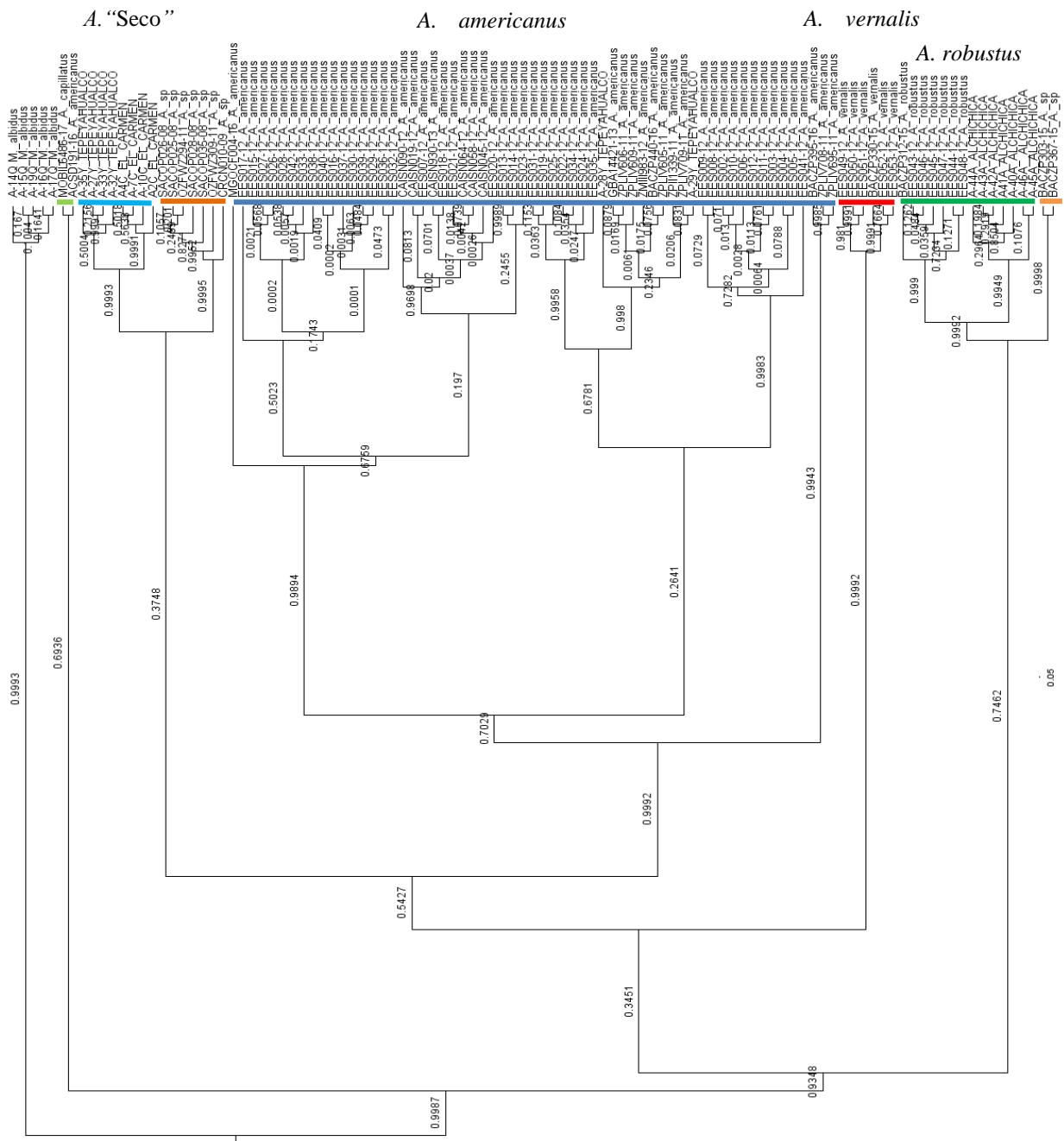


Fig. 13. Árbol de máxima credibilidad de las relaciones filogenéticas de *Acanthocyclops*. En las ramas terminales se señala el origen de cada organismo de la Cuenca Oriental y la especie a la que pertenecen las secuencias comparadas. Se indica el valor de las probabilidades posteriores en cada nodo. La barra de escala indica la cantidad de sustituciones esperadas por sitio. Las barras de color indican distintos clados.

Para evaluar la existencia de especies formando parte de un complejo críptico, se analizaron todas las secuencias anteriores con el análisis ABGD. En la partición generada (distancias JC69, Jukes-Cantor) se identificaron 8 grupos o MOTUs distintos, que coinciden con los clados generados en el análisis anterior (Fig. 14).

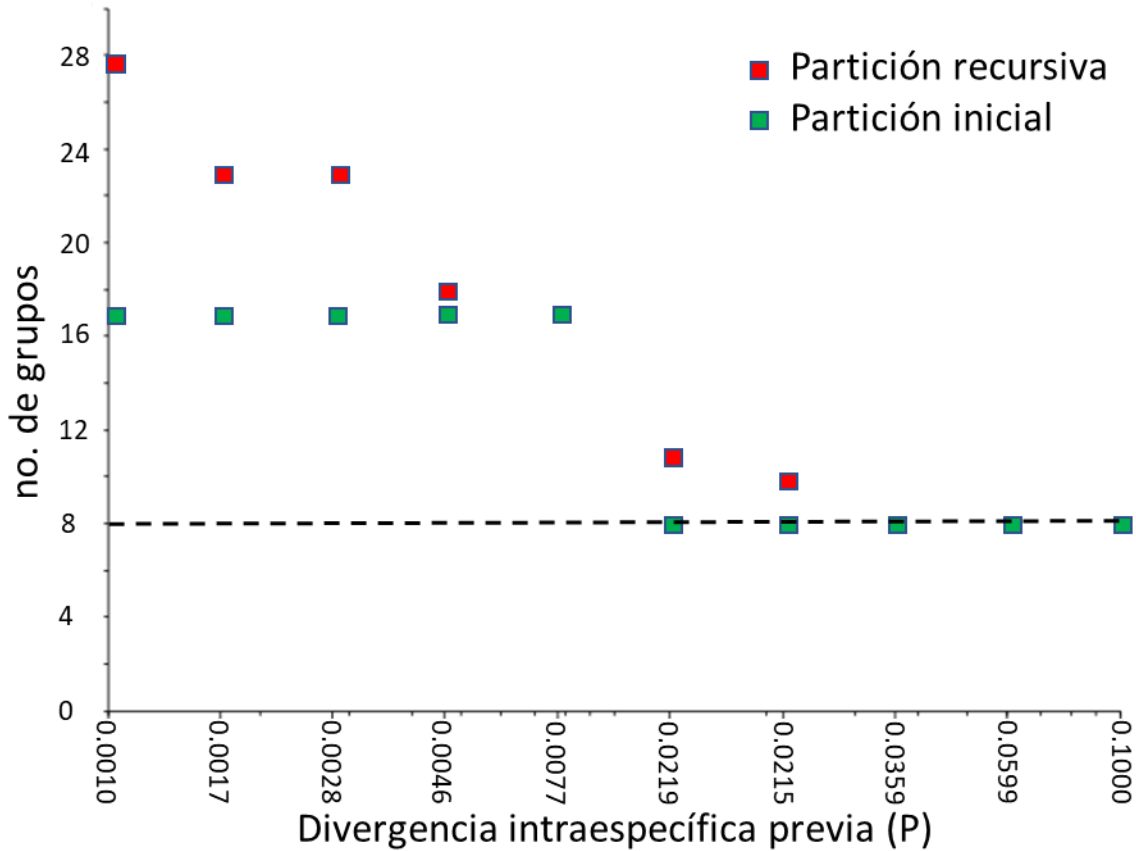


Fig. 14. Análisis ABGD con secuencias del gen COI de *Acanthocyclops*. La línea punteada indica el punto de estabilidad y el número más confiable de MOTUs generados a partir de las distancias JC69, Jukes-Cantor.

Al separar y agrupar a distintas secuencias en los conjuntos identificados en el análisis previo, se observa que, de manera interna, en cada grupo los valores generados son menores al 4 % (Tabla 7). En esta situación, se observa que los individuos de El Carmen y una parte de la población de Tepeyahualco forman un grupo, denominado en adelante *Acanthocyclops* “Seco”; así como otros organismos de Tepeyahualco que son cercanos a *A. americanus*. Los ejemplares

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

de Alchichica se agrupan, a su vez, con los identificados en la base de datos utilizada como *A. robustus*.

Tabla 7. Proporción \pm error estándar de la distancia genética dentro de los grupos formados con las secuencias de *Acanthocyclops*. Valores según el modelo de K2P con una secuencia de arranque de 1000 réplicas. *n/c = el dato no pudo ser calculado debido a que solo hay una secuencia.

	Dentro de grupo
1 <i>Acanthocyclops</i> “Seco”	0.012 \pm 0.003
2 <i>A. americanus</i> 1 + Tepeyahualco 2	0.014 \pm 0.003
3 <i>A. robustus</i> + Alchichica	0.016 \pm 0.003
4 <i>A. americanus</i> sp. 2	n/c*
5 <i>A. sp.</i> 1	0.002 \pm 0.002
6 <i>A. vernalis</i>	0.050 \pm 0.007
7 <i>A. sp.</i> 2	0.006 \pm 0.002
8 <i>A. capillatus</i>	n/c*

Este análisis de distancias también separó a las secuencias identificadas inicialmente como parte de una misma especie en distintos grupos con divergencias mayores al 15 % entre sí (Tabla 8). En esta situación se encuentran los individuos identificados como *A. americanus*, cuyas secuencias fueron separadas en dos grupos distintos, uno de ellos más relacionado a algunos individuos de Tepeyahualco como ya se mencionó. Además, las secuencias identificadas como *Acanthocyclops* sp. también se separaron en dos grupos que nombramos en adelante como *Acanthocyclops* sp. 1 y *Acanthocyclops* sp. 2.

Tabla 8. Proporción \pm error estándar de la distancia genética entre las secuencias de *Acanthocyclops* comparadas según el modelo de K2P y un valor de probabilidad de 1,000 réplicas.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>A. “Seco”</i>		0.018	0.019	0.022	0.019	0.019	0.018	0.022
2 <i>A. americanus</i> 1 + Tepeyahualco 2	0.179		0.018	0.020	0.021	0.017	0.018	0.021
3 <i>A. robustus</i> + Alchichica	0.185	0.178		0.021	0.019	0.017	0.019	0.023
4 <i>A. americanus</i> sp. 2	0.221	0.219	0.217		0.022	0.021	0.021	0.022
5 <i>A. sp.</i> 1	0.192	0.221	0.189	0.218		0.019	0.023	0.023
6 <i>A. vernalis</i>	0.214	0.175	0.189	0.234	0.209		0.018	0.023
7 <i>A. sp.</i> 2	0.182	0.196	0.202	0.224	0.252	0.192		0.024
8 <i>A. capillatus</i>	0.221	0.221	0.244	0.234	0.236	0.250	0.252	

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Finalmente, el árbol simplificado de identidad (vecino más cercano) generado a partir de las distancias anteriores (modelo K2P, secuencia de arranque de 1,000 réplicas), resume adecuadamente los resultados y muestra distintos clados agrupando a las poblaciones analizadas (Fig. 15). Como se señaló anteriormente, algunos individuos de Tepeyahualco pueden considerarse parte de lo que denominamos *Acanthocyclops americanus* 1. Por su parte, *Acanthocyclops* “Seco” forma un clado separado, agrupando a otro conjunto de individuos de Tepeyahualco junto a la población de El Carmen. Los copépodos de Alchichica se agrupan de manera clara con los identificados como *A. robustus*. De esta manera, el lago Tepeyahualco cuenta con dos linajes del género, uno de ellos posiblemente se trate de un taxón no descrito.

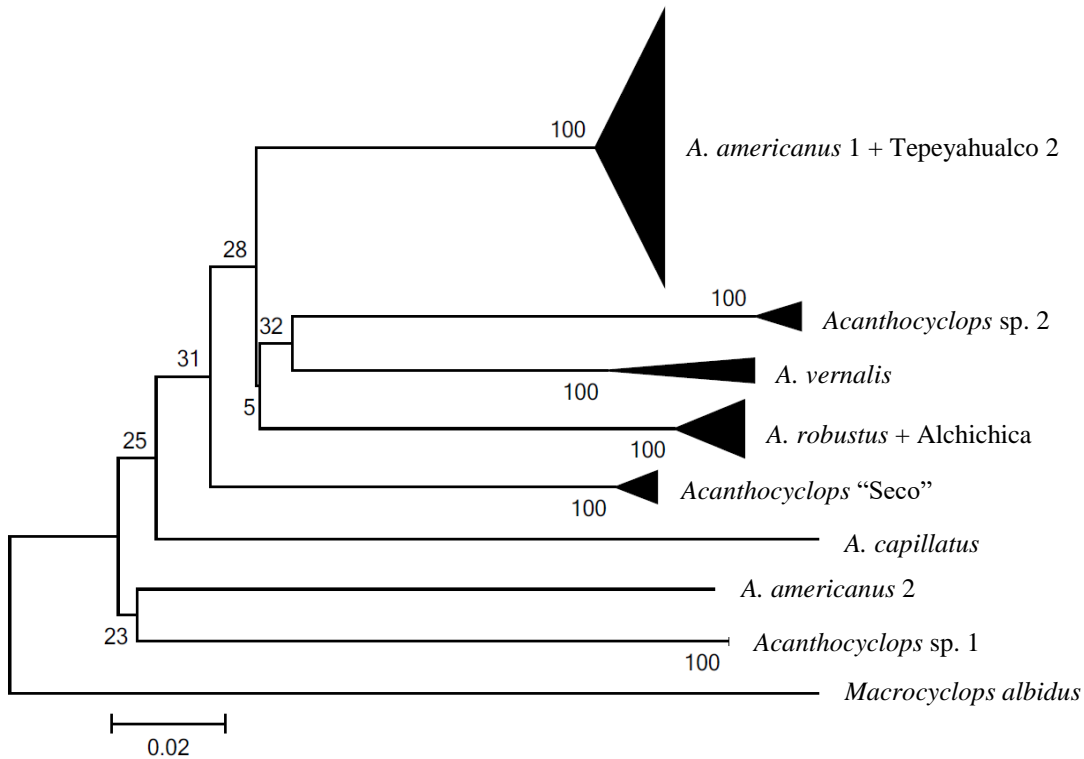


Fig. 15. Árbol simplificado de divergencia genética (vecino más cercano) de las secuencias del gen COI de individuos de *Acanthocyclops*, según el modelo de K2P. Los valores mostrados en cada clado corresponden al valor de la secuencia de arranque (1,000 réplicas).

Discusión

La especie es la unidad básica en los estudios filogenéticos, biogeográficos, ecológicos y de conservación. Se calcula que en el mundo existen todavía millones de especies por describir, nombrar y clasificar (Mora *et al.*, 2011). A pesar de ser el tipo de estudio más utilizado históricamente, se ha demostrado que, en varios casos, el análisis mediante caracteres exclusivamente morfológicos no ha logrado resolver de manera correcta las relaciones entre distintas entidades biológicas, y por lo tanto hay una subestimación de la riqueza real a nuestro alrededor, debido a que, en algunos casos, como en la formación de complejos crípticos, el proceso de especiación no va ligado a un cambio morfológico necesariamente (Bickford *et al.*, 2006; Struck *et al.*, 2018). Aunado a esto, es importante señalar que los cambios constantes en la taxonomía de algunos grupos, la presencia de nombres sinónimos y la identificación de complejos de especies crípticas, causan errores en la cuantificación correcta de la biodiversidad. De las cerca de 18,000 especies descritas al año, el 75% corresponden a invertebrados y alrededor de 7% a vertebrados, un grupo en el que el esfuerzo taxonómico parece estar casi completado, y que, sin embargo, tiene todavía un gran interés de investigadores y del público en general pues comprende a organismos generalmente de talla grande, visibles y en muchos casos de importancia económica (Chapman, 2009). Por otro lado, las personas especializadas en organismos poco carismáticos, pequeños o difíciles de coleccionar como los copépodos, son relativamente escasas, así como los apoyos económicos para los estudios taxonómicos tradicionales (Pires y Marinoni, 2010). En particular, otro sesgo que presentan los copépodos es que existen pocos estudios que aclaren sus relaciones evolutivas, por una parte, debido a la gran diversidad morfológica que muestran los diferentes grupos y la falta de taxónomos, y por otra, hay pocos análisis que combinen también herramientas moleculares en la reconstrucción filogenética (Bernot *et al.*, 2021).

En la Cuenca Oriental se identificaron variantes genéticas que posiblemente pertenezcan a organismos de especies no descritas (*i.e.*, *Mastigodiatomus* “Faja” y *Mastigodiatomus* “Oriental”, y una especie de *Acanthocyclops* del grupo *robustus-vernalis* denominada *Acanthocyclops* “Seco”), las cuales requieren un análisis más detallado a nivel morfológico (p. ej., con microscopía electrónica de barrido) complementado con información generada con

experimentos enfocados a analizar las respuestas ecofisiológicas y la compatibilidad reproductiva entre linajes. Lo anterior permitirá comparar las características de las poblaciones de la Cuenca Oriental con poblaciones donde se localicen variantes genéticas muy cercanas (p. ej., lago Ontario, Canadá y lago Maridalen, Noruega donde se distribuye *A. robustus*, al igual que en Alchichica) y determinar correctamente su identidad biológica y taxonómica, como ha ocurrido con otras especies de copépodos calanoides (Goetze y Ohman, 2010; Lee, 2000), ciclopoideas (Dodson *et al.*, 2003; Grishanin *et al.*, 2006) y de la Cuenca Oriental como *Leptodiptomus garciai* (Montiel-Martínez *et al.*, 2008) y en especial, *L.* grupo *sicilis*, cuyas diferencias reproductivas muestran barreras postcigóticas asimétricas (Barrera-Sánchez, 2016) y adaptaciones fisiológicas a cada lago donde se distribuye, lo que ha propiciado un proceso de diversificación ligado a factores ecológicos, caso que se describe y discute ampliamente en el capítulo siguiente.

Como han ejemplificado nuestros resultados mostrados en esta tesis, desde su implementación, los datos obtenidos con caracteres moleculares han tenido un papel importante en la revelación de nuevos taxones y de relaciones filogenéticas entre los organismos (Bickford *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2009; Goetze, 2010). Con esto, se ha llegado a generar la percepción errónea de que el uso de marcadores moleculares como el gen COI puede reemplazar a la taxonomía clásica, ya que este tipo de marcadores ha generado resultados satisfactorios para identificar taxones a nivel de especie sin necesidad de realizar un laborioso análisis morfológico (Will *et al.*, 2005), así como detectar nuevas especies que forman parte de complejos crípticos (Bickford *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2010).

Con el fin de solucionar este problema, se han propuesto el concepto de “taxonomía integrativa”, bajo el cual, distintas disciplinas pueden combinarse y complementarse para establecer límites de especies (Schlick-Steiner *et al.*, 2010), que estén sustentados por varios resultados y den lugar a una hipótesis filogenética más cercana a la realidad, lo que también puede permitir describir, diagnosticar y nombrar adecuadamente a las nuevas especies (Pante *et al.*, 2015). Es evidente que la idea de que una técnica debe reemplazar totalmente a otra es equivocada, pues tanto la morfología como los análisis moleculares son herramientas que pueden trabajar en conjunto (Elías-Gutiérrez y Valdez-Moreno, 2008) y combinarse con análisis

ecológicos, etológicos y experimentos de aislamiento reproductivo que ayuden a revelar barreras pre o post-cigóticas (p. ej., Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Barrera-Moreno, 2010; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Barrera-Moreno *et al.*, 2015). De esta manera, cada análisis independiente proporcionaría su parte correspondiente en la solución de los problemas taxonómicos, como se ha demostrado en varios casos con plantas (Nicolalde-Morejón *et al.*, 2011; Damasco *et al.*, 2019), vertebrados (Padial y De la Riva, 2009; Glaw *et al.*, 2010; Kiourtsoglou *et al.*, 2021) e invertebrados (Tan *et al.*, 2010; Mercado-Salas *et al.*, 2018). Por otro lado, en el caso de los análisis moleculares, el uso de un solo marcador para definir especies o relaciones de parentesco es una crítica constante, por lo que es recomendable utilizar más de uno, así como una cantidad mínima de individuos que representen la diversidad genética de las poblaciones, lo que proporcionará mejores hipótesis filogenéticas (Cardoso *et al.*, 2009; Goetze, 2010; Pires y Marinoni, 2010; Chen *et al.*, 2018).

Otro de los factores a tomar en cuenta cuando se emplean diferentes aproximaciones metodológicas, es definir el concepto de especie que se utilizará en el estudio (véase, p. ej., Lee, 2003), pues es posible que organismos que bajo un concepto o análisis pertenezcan a especies distintas, mientras que con otro se consideren como parte del mismo taxón (Schlick-Steiner *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010). Además de contar con un concepto de especie claramente definido, en cada caso es necesario conocer las características ecológicas del grupo de estudio para delimitar cuáles son los análisis que generarán información más útil y acorde a las características biológicas de los organismos, por ejemplo, en los copépodos calanoides, el sentido de la vista no es tan desarrollado comparado a su gran capacidad “olfativa” o quimiorreceptora que les permite encontrar pareja (Bickford *et al.*, 2006; Seuront y Stanley, 2014), por lo que se reconoce que muchos caracteres importantes utilizados en el trabajo taxonómico de estos animales (p. ej., caracteres sexuales) están muy conservados y carecen de una fuerte diferenciación morfológica entre especies (Goetze, 2010). Lo anterior dificulta una identificación correcta y sustenta la evidencia que las especies crípticas suelen ser comunes en este tipo de organismos (Knowlton, 1993). Así, los análisis con caracteres moleculares, sumados a los experimentos de reproducción y ecofisiología, y a los estudios morfológicos, son de gran utilidad para delimitar de manera correcta especies de copépodos, sobre todo en el caso de pertenecer a complejos de especies

crípticas como parece ocurrir con los organismos de los géneros *Mastigodiatomus* y *Acanthocyclops* analizados a continuación.

Mastigodiatomus

A partir de su origen en la región Neotropical, *Mastigodiatomus* ha diversificado hacia el norte y sur de México, llegando a ser el género de diatómido más común desde el sur de Estados Unidos hasta el Caribe (Mercado-Salas *et al.*, 2018). Actualmente, se reconocen varias especies endémicas a algunos cuerpos de agua de nuestro país, así como otras consideradas de amplia distribución, como *M. albuquerquensis*. Debido a la alta variedad de condiciones limnológicas que presentan los cuerpos de agua donde este género de copépodos se ha registrado, es posible pensar en la existencia de un complejo de especies crípticas conformado por entidades biológicas distintas y con una distribución restringida o endémica. Con esta premisa, el análisis de biología molecular utilizando el gen COI nos ha permitido reconocer que algunas secuencias provenientes de Cuitzeo pertenecen a *M. patzcuarensis*, una especie descrita recientemente y separada de *M. albuquerquensis* (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014; 2020). Estos organismos están estrechamente relacionados con organismos cuyas secuencias se encuentran depositadas en la base de datos consultada (BOLD Systems, 2017) con el nombre de *M. cf. albuquerquensis*, por lo que se recomienda corregir esa información en esta base de datos, como señalan Gutiérrez-Aguirre *et al.* (2020). Así, este conjunto de organismos es parte de un mismo taxón que también está distribuido en La Cruz, Guanajuato y en La Goleta, Edo. Méx. En la descripción de esta especie, Gutiérrez-Aguirre *et al.* (2020) señalan que en Cuitzeo hay otro linaje genético que no pudo ser separado con herramientas morfológicas y no fue nombrado, permaneciendo como *M. patzcuarensis* para los autores. Nuestro análisis coincide con lo anterior, hallando este segundo linaje no solo en Cuitzeo sino distribuido en un área geográfica amplia, abarcando otros lagos relativamente alejados, como Tecocomulco, Hidalgo. Esta segunda especie la hemos denominado como *Mastigodiatomus* “Faja” haciendo referencia a su distribución a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana, y creemos que puede ser formalmente descrita y nombrada en breve. Las distancias genéticas generadas también indican que existe otro grupo de poblaciones lo suficientemente separadas de la anterior (distancias genéticas >4 %) para considerarlas un taxón distinto, el cual habita solamente los lagos de la Cuenca Oriental, y que identificamos como

Mastigodiatomus “Oriental”. De esta manera, con la descripción formal de ambas especies se aumentaría la riqueza de este género en 16 especies distribuidas en nuestro país.

Un punto importante es que nuestros resultados han evidenciado de manera clara la presencia de este par de especies crípticas coexistiendo al menos en El Carmen y Tepeyahualco. Con lo anterior se podría comprobar que, a pesar de que estas dos especies son muy similares y, en principio, poseen nichos ecológicos también muy parecidos, lo que ocasionaría interacciones competitivas muy intensas (véase, p. ej., Ciros-Pérez *et al.*, 2001; Gabaldón *et al.*, 2015). Es interesante ver que en este género son comunes los registros de dos o más especies coexistiendo en un mismo cuerpo de agua, a pesar de que esto comúnmente se ha reportado en especies de linajes más alejados entre sí, como sucede con especies de *Mastigodiatomus* y *Leptodiatomus* conviviendo en algunos lagos estudiados en este trabajo. En nuestro caso, es posible que las diferencias en capacidades ecofisiológicas, conductas reproductivas generadas a partir de un proceso de selección sexual (Sereda *et al.*, 2016), la talla y los hábitos tróficos diferentes derivados de esta última característica (Wilson, 1975), sean los factores que disminuyen la competencia interespecífica, como lo señalan Suárez-Morales y Elías-Gutiérrez (2000).

Acanthocyclops

Con respecto a los copépodos ciclopoideos, un conjunto de análisis interdisciplinario ayudaría a aclarar el estatus taxonómico de las poblaciones de *Acanthocyclops* localizadas en El Carmen, Tepeyahualco y Alchichica, las cuales pertenecen a un género que durante años ha sido objeto de discusión, constantes revisiones, confusiones, descripciones y redescriptiones de especies con criterios morfológicos basados en la comparación de caracteres altamente variables (véase, Mirabdullayev y Defaye, 2004, Dodson *et al.*, 2003; Mercado-Salas *et al.*, 2009; Mercado-Salas y Álvarez-Silva, 2013) y moleculares (Miracle *et al.*, 2013), que todavía no resuelven de manera satisfactoria las relaciones entre los miembros de este complejo críptico. Es importante señalar que *A. americanus* es considerada una especie invasora originaria de Norte América y ampliamente distribuida en Eurasia gracias al agua de lastre de los barcos, donde ha competido con las poblaciones nativas de *A. robustus* y *A. vernalis*, ocasionando a su vez conflictos taxonómicos entre los copepodólogos desde hace cerca de 100 años (Alekseev y Sukhikh, 2022). Por su parte, con criterios moleculares, Miracle *et al.* (2013) proponen que tanto *A. americanus*,

A. robustus y *A. vernalis* son especies independientes y diferenciadas genéticamente, lo cual coincide con nuestros resultados. Sin embargo, como se discute en el Capítulo II, las descripciones morfológicas no concuerdan totalmente entre la literatura y nuestros datos, especialmente en el caso de los organismos ligados genéticamente a *A. robustus* provenientes de Alchichica, por lo que consideramos que son necesarios estudios de morfología más detallados entre ambos linajes, así como experimentos de ecofisiología y reproducción, como se ha mencionado anteriormente. Por otro lado, también es necesario contar con secuencias de ejemplares identificados como *A. trajani* para poder compararlos con los individuos de *A. americanus* (considerada sinónimo por Miracle *et al.*, 2013), en especial con los provenientes de la población de Tepeyahualco que, en principio, forma parte de esta entidad biológica. Por su parte, los organismos de El Carmen y Tepeyahualco que no están ligados a ningún otro taxón ya descrito, requieren también de un trabajo de morfología fina para ser descritos formalmente como una especie nueva del complejo *A. robustus-vernalis*, que cuenta hasta el momento con ocho especies descritas (*i.e.*, *A. robustus*, *A. vernalis*, *A. americanus*, *A. brevispinosus*, *A. marceloi*, *A. dodsoni*, *A. caesariatus* y *A. eduardoi*). De las especies anteriores, solo las tres primeras cuentan con secuencias del gen COI disponibles en la base de datos consultada, por lo que no fue posible determinar las relaciones filogenéticas de todas las especies del complejo con las provenientes de los lagos de la Cuenca Oriental. Por lo que se reafirma la importancia de trabajos moleculares que complementen los estudios morfológicos en estos organismos.

Al observar los resultados obtenidos en nuestro análisis, podemos confirmar la presencia de complejos de especies crípticas distribuidas dentro de la Cuenca Oriental. Como se ha dicho, esta información modificaría los resultados de distribución geográfica y riqueza específica en estos géneros, así como las hipótesis evolutivas que expliquen los procesos de diversificación que los propiciaron y generaron las relaciones filogenéticas presentes entre las diferentes poblaciones y especies. Tomando en cuenta otros criterios que complementen a la morfología (Capítulo II) y a la biología molecular (este Capítulo), se podrían generar posibles estrategias de conservación y estudios sobre el papel ecológico que tienen las especies que habitan esta cuenca. También podríamos suponer que, a pesar de la percepción histórica sobre la capacidad potencial de los pequeños organismos que conforman el zooplancton para invadir y colonizar eficientemente nuevos ambientes por medio de la dispersión pasiva de individuos adultos (Allen, 2007) o de

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

estructuras de resistencia (Hessen *et al.*, 2019), permitiéndoles distribuirse de manera amplia (véase, Foissner, 2006; Alekseev y Sukhikh, 2022), en realidad la distribución y composición de especies en un lago se rigen por el aislamiento geográfico, pero sobre todo por los factores ambientales locales (*i.e.* salinidad, temperatura o vegetación), y variables espaciales (*i.e.* como altitud y latitud), más que por la capacidad de dispersión (de Mendoza *et al.*, 2015). Estos factores ambientales, en especial la salinidad, pueden actuar como presiones de selección importante interviniendo en la diversificación de los copépodos y otros grupos del zooplancton epicontinental que habitan áreas relativamente cercanas geográficamente (Lee, 2000), como se puede comprobar en el Capítulo siguiente.

“Science is not a heartless pursuit of objective information. It is a creative human activity, its geniuses acting more as artists than as information processors”

Stephen Jay Gould

CAPÍTULO IV

From local adaptation to ecological speciation in copepod populations from neighboring lakes

Artículo publicado en la revista *PLoS ONE*

RESEARCH ARTICLE


From Local Adaptation to Ecological Speciation in Copepod Populations from Neighboring Lakes

Omar Alfredo Barrera-Moreno¹, Jorge Ciros-Pérez^{2*}, Elizabeth Ortega-Mayagoitia², José Arturo Alcántara-Rodríguez³, Elías Piedra-Ibarra⁴

1 Programa de Doctorado en Ciencias del Mar y Limnología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México, **2** Proyecto de Investigación en Limnología Tropical, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México, **3** Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México, **4** Laboratorio de Fisiología Vegetal, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México

* jorge.ciros@gmail.com



 OPEN ACCESS

Citation: Barrera-Moreno OA, Ciros-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Alcántara-Rodríguez JA, Piedra-Ibarra E (2015) From Local Adaptation to Ecological Speciation in Copepod Populations from Neighboring Lakes. PLoS ONE 10(4): e0125524. doi:10.1371/journal.pone.0125524

Academic Editor: William J. Etges, University of Arkansas, UNITED STATES

Received: December 5, 2014

Accepted: March 14, 2015

Published: April 27, 2015

Copyright: © 2015 Barrera-Moreno et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IN-222709 and IN-217513; <http://dgapa.unam.mx/html/papiit/papit.html>) to JCP and EOM, Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación – FES Iztacala, UNAM (PAPCA 2007–2008; <http://www.iztacala.unam.mx/spcc/spcc>)

Abstract

Continental copepods have been derived from several independent invasive events from the sea, but the subsequent evolutionary processes that account for the current diversity in lacustrine environments are virtually unknown. Salinity is highly variable among lakes and constitutes a source of divergent selection driving potential reproductive isolation. We studied four populations of the calanoid copepod *Leptodiptomus* cf. *sicilis* inhabiting four neighboring lakes with a common history (since the Late Pleistocene) located in the Oriental Basin, Mexico; one lake is shallow and varies in salinity periodically (1.4–10 g L⁻¹), while three are deep and permanent, with constant salinity (0.5, 1.1 and 6.5 g L⁻¹, respectively). We hypothesized that (1) these populations belong to a different species than *L. sicilis* sensu stricto and (2) are experiencing ecologically based divergence due to salinity differences. We assessed morphological and molecular (mtDNA) COI variation, as well as fitness differences and tests of reproductive isolation. Although relationships of the Mexican populations with *L. sicilis* s.s. could not be elucidated, we identified a clear pattern of divergent selection driven by salinity conditions. The four populations can still be considered a single biological species (sexual recognition and hybridization are still possible in laboratory conditions), but they have diverged into at least three different phenotypes: two locally adapted, specialized in the lakes of constant salinity (saline vs. freshwater), and an intermediate generalist phenotype inhabiting the temporary lake with fluctuating salinity. The specialized phenotypes are poorly suited as migrants, so prezygotic isolation due to immigrant inviability is highly probable. This implication was supported by molecular evidence that showed restricted gene flow, persistence of founder events, and a pattern of allopatric fragmentation. This study showed how ecologically based divergent selection may explain diversification patterns in lacustrine copepods.

[papca.php](#)) to EOM and JCP. OABM thanks the scholarship granted by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; <http://www.conacyt.mx/>) to support his PhD research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Invasion of inland freshwater environments by marine species resulting in adaptive radiation is one of the “most dramatic evolutionary transitions in the history of life” [1]. A remarkable example of this is the invasion of copepods into continental waters. Continental lineages of copepods originated from 22 independent invasive waves from the sea that were followed by subsequent speciation events [2]. The result of these invasion-radiation events accounts for ~ 2800 freshwater species currently recognized. While the adaptation of marine copepods to brackish and freshwater conditions and genetic and physiological divergence among populations has been studied recently [1,3], study of evolutionary processes and patterns of diversification in lacustrine copepods remain scarce. Moreover, these investigations are usually linked to unraveling the cryptic diversity in this group and focus on genetic and morphological data [4–6]. Such evidence has been used to hypothesize that trophic specialization within a lake [7] and adaptation to different physicochemical and environmental settings among lakes [6] may promote divergence and speciation in pelagic copepods. Thus, divergence and reproductive isolation in this group may be a case of ecological speciation.

Lakes are environments where diversification rates are expected to be higher than in marine systems because each body of water is the result of a combination of unique factors including climatic regimes, regional geology, and tectonic activity. Thus, adaptation to different environments and the limited connectivity between lakes can result in frequent allopatric speciation [8]. Salinity is one of the most influential aquatic features, acting directly and indirectly on the growth, life history, distribution, and molecular evolution of aquatic organisms [9]. However, not all lakes possess salinities that qualify them as freshwater; the continuum of salinities ranges from < 0.1 to 350 g L⁻¹ and beyond [10], constituting a potential source of divergent selection where ecological speciation can proceed [11].

Populations subjected to divergent natural selection can produce one or more specialized genotypes, adapted to alternative local conditions (disruptive selection) or generalist genotypes adapted to a wide range of conditions, exhibiting either uniform or plastic phenotypes [12]. When the effects of the environmental factor that promotes local adaptation are strong, immigrant individuals usually have a lower fitness compared to the local population and may be eliminated (i.e., immigrant inviability) thus reducing gene flow and thus constituting an effective reproductive barrier (pre-mating isolation). This is the second step (of three) for complete ecological speciation [11]. Divergent adaptation to salinity could explain why many lacustrine species that were considered to be cosmopolitan with wide tolerances to salinity (generalists) are actually composed of a number of cryptic species adapted to narrower ranges and restricted distributions [9,13], even though generalist euryhaline species [14,15] truly exist. Moreover, some recent papers note the role of salinity as a source of divergent selection in continental aquatic habitats, promoting diversification and speciation in rotifers [16], gammarids [17], and fish [18–20].

We have studied a cluster of eight endorheic lakes located in the Oriental Basin (Cuenca Oriental) in central Mexico. This region is characterized by shallow, ephemeral, playa lakes (El Carmen, Tepeyahualco) and permanent/deep lakes (Quechulac, La Preciosa, Atexcac, Alchichica), ranging from freshwater to saline. Several microendemic species have been found including the following: a diatom, *Cyclotella alchichicana* [21], a rotifer, *Brachionus* sp. ‘Mexico’ [9], copepods *Leptodiaptomus garciai* [13] and *Cletocampus gomezi* [22], an amphipod, *Caecidotea williamsi* [23], an ostracod, *Limnocytherina axalapasco* [24], a salamander, *Ambystoma taylori*, and silverside fish, *Poblana*, including at least two species [25]. Local adaptation to salinity has been described for the rotifer *Brachionus* sp. ‘Mexico’ [9].

Four of these lakes (two deep, freshwater; one deep, saline; one shallow, ephemeral, and highly variable salinity) contain populations of a calanoid copepod that morphologically resembles *Leptodiaptomus sicilis* (Forbes 1886) [26,27]. This species has not been reported elsewhere in Mexico but seems to be widely distributed in the Laurentian Great Lakes and other regions within the United States of America and Canada, from freshwater up to 40 g L⁻¹ [28]. It has been reported to be the dominant species in the zooplankton of both freshwater [29] and saline lakes (10–13 g L⁻¹) [30,31]. However, there are several reasons that lead us to posit that *L. sicilis* may represent a complex of cryptic species, and that populations that inhabit Cuenca Oriental may belong to a different biological species from the populations described by Forbes. First, salinity differences promote high rates of divergence among aquatic organisms, as stated above. Second, given that the body plan of pelagic copepods is so successful and often dominates open waters [32], speciation events may produce minor morphological divergence between closely allied species [33]. Third, there is increasing evidence that the apparent distribution of copepod species across broad salinity ranges can be the outcome of the aggregated distribution of different genotypes or of distinct cryptic species [13,34]. Finally, more than 90% of freshwater copepod species are endemic to a single zoogeographic region [35]; in particular, the family Diaptomidae is characterized by species of very restricted distribution [33], and the diaptomid fauna of Mexico is no exception [36]. Moreover, given the environmental divergence among the four Mexican lakes in terms of salinity and habitat permanence, we also hypothesized that irrespective of their taxonomic identity, these populations are undergoing ecological speciation: We hypothesized that populations may have either locally adapted to deep permanent lakes or are generalist phenotypes inhabiting ephemeral playa lakes. If local adaptation has occurred, immigrants are expected to have lower fitness than local individuals and locally adapted genotypes also will be poorly adapted to foreign environments. Both circumstances will impair their capacity of effective dispersal and decrease the probability of gene flow, reinforcing the process of ecological speciation leading to reproductive incompatibility.

To test our hypotheses, we took an integrative approach to assess the degree of divergence among populations at several levels: phenotypic, genotypic and molecular clustering, lineage sorting and reproductive isolation [11]. Thus, we analyzed the following: (1) morphological divergence implicated in reproduction among *L. sicilis* from the Great Lakes and the Mexican populations; (2) sequence divergence in mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) compared with other species to elucidate patterns of genetic structuring among Mexican populations; (3) life history differences including patterns of resting egg hatching, survivorship, development, and intrapopulation reproduction in reciprocal transplant experiments in order to reveal locally adapted/generalist genotypes and selection against immigrants (immigrant inviability); and (4) results of mating trials among three of the Mexican populations in a common garden experiment to evaluate the degree of reproductive compatibility.

Materials and Methods

Ethics statement

We collected copepods from four lakes in Mexico that are not under protection by Mexican laws. Further, Mexican zooplankton is not under protection laws as well; thus, no specific permissions were required to collect samples.

Study area

The lakes studied are located in the Oriental Basin, Mexico, in the Transmexican Volcanic Belt, ≈ 2,300 m above sea level [37]. While they have some limnological differences, they are highly comparable because they are all endorheic, are located close to each other (< 20 km), and are

influenced by similar climatic and edaphic conditions. Six of them are maar lakes, known as *axalapascos* (meaning bowls of sand filled with water) and were formed by different explosive eruptions caused by the contact between the ground water and magma during the Late Pleistocene, about 40,000 y.a. [38]. The other two are large, episodic playa lakes that fill during the rainy summer season (June–September). The *L. cf. sicilis* populations inhabit three maar lakes: Quechulac (19°22' N, 97°21' W), La Preciosa (19°22' N, 97°23' W) and Atexcac (19°20' N, 97°27' W), which are permanent, deep (maximum depth, Z_{max} = 40, 45, and 39 m, respectively), warm monomictic (mixing occurs in winter), alkaline (pH 8.4–8.7), and oligotrophic lakes. Owing to the chemical composition of rocks and soil, they have distinct ionic compositions [37], but constant salinities along the annual cycle. Quechulac and La Preciosa are freshwater (Total Dissolved Solids, TDS = 0.42 ± 0.05 g L⁻¹, specific conductivity at 25°C, $K_{25-} = 810 \pm 25$ μ S cm⁻¹, and TDS = 1.18 ± 0.09 g L⁻¹, $K_{25-} = 2,220 \pm 10$ μ S cm⁻¹, respectively), while Atexcac is hyposaline (TDS = 6.54 ± 0.29 g L⁻¹, $K_{25-} = 11,880 \pm 62$ μ S cm⁻¹). In addition, this copepod is also present in the playa lake El Carmen, also known as Laguna de Totolcingo (19°09' to 19°26' N, 97°33' to 97°47' W [39], which is shallow (< 30 cm), turbid, with variable salinity (TDS = 1.4–10 g L⁻¹, $K_{25-} = 2,600$ –14,800 μ S cm⁻¹). In parenthesis are the average \pm SD of 12 vertical profiles, measured monthly in 2009 at a fixed station located at the deepest part of each lake, except for El Carmen, where data are the range of 6 measures performed from September 2009 to February 2010, using a Hydrolab DataSonde 3/Surveyor 3 Multiparameter water quality logging systems (Hydrolab). A detailed description of the lakes can be found elsewhere [9,13,37,40–42].

Sampling of copepods and culture conditions

Copepods were collected from all four lakes for morphological and molecular analyses, but fitness and reproductive tests were performed only with organisms from La Preciosa, Atexcac, and El Carmen. These lakes represent a freshwater stable environment, a brackish stable environment, and a variable ephemeral environment, respectively. Copepods were collected on September 2008 through vertical hauls with a conical zooplankton net (80 μ m mesh size) in the crater lakes, or pouring water obtained with a bucket through the same net, in the playa lake. Fractions of the sample were fixed with formalin (4% final concentration) or with 100% ethanol, for the morphological and the molecular analyses. Some organisms were kept alive and transported to the laboratory. Adult ovigerous females were isolated and cultured in 4 L glass jars at the salinity recorded at the time of collection (La Preciosa: 1.1 g L⁻¹, Atexcac: 6.5 g L⁻¹ and El Carmen: 3.8 g L⁻¹). Cultures were maintained at $18 \pm 1^\circ$ C in a photoperiod (12:12, light:dark) and fed with the microalgae *Tetraselmis suecica* and *Chlorella vulgaris* (1:1; >20 mg C L⁻¹) during at least 2 months before starting the experiments (approx. two acclimation generations). The culture medium was prepared with commercial salt (Seachem Reef Salt, Seachem Laboratories, U.S.A.) dissolved in electrodeionized (Millipore, Elix-5) that had been previously autoclaved at 121°C for 15 min. *T. suecica* was cultured in saline medium (18 g L⁻¹), while *C. vulgaris* was cultured in EPA medium [43], both enriched with *f/2* modified medium [44].

Morphological analysis

Our analysis involved whole and dissected adult organisms of both sexes, using standard procedures in the taxonomy of the genus *Leptodiaptomus* [45,46]. A Leica DMLB2 compound microscope with a drawing tube was used for observations, measurements and drawings of dissected specimens at 1000 \times . Other individuals were observed with scanning electron microscopy (SEM) using a Hitachi S-400 and a JEOL JSM6360LV microscopes. We analyzed in detail those characteristics that define *L. sicilis* s.s. [26] as a taxonomic species, with emphasis on the structures involved in sexual recognition and mating [47,48]. Additionally, we examined body

size (total length excluding the caudal ramus), color (pigmentation), and clutch size (number of eggs per sac). To describe differences in the size of referred structures between populations, a one-way ANOVA was performed and a Student-Newman-Keuls *post hoc* test (SNK) [49] was carried out if significant differences were found ($P < 0.05$). Also, to determine differences between relative body sizes in both males and females from each population, data were analyzed using the non-parametric test of Kruskal Wallis [50]. If differences among lakes were found, pairwise Mann-Whitney U tests were carried out ($P > 0.05$). All statistical analyses were made with SPSS 17.0 software (SPSS Inc., Chicago).

To compare individuals from Mexican populations to individuals from areas near the type locality (Lake Michigan, U.S.A.) where *L. sicilis* was described, we analyzed zooplankton samples collected and donated by Dr. Manuel Elías-Gutiérrez (El Colegio de la Frontera Sur, Mexico) from lakes Erie (Collected at Erie, Pennsylvania, 29-Jun-10, Lorain, Ohio, 2-Jul-10 and Toledo, Ohio, 10-Jul-10), Huron (Warden, Ontario, 25-Jul-10; Warton, Ontario 2, 25-Jul-10) and Detroit River (Windsor, Ontario, 30-Jul-10). Unfortunately, we did not find any *L. sicilis* individuals, because they were either scarce or absent at the sampling locations/dates, and sampling was not exhaustive.

COI sequencing and genetic divergence analyses

Sequence variation in mtDNA COI was assessed in the four populations of *L. cf. sicilis* by isolating adult copepods from the ethanol-fixed samples. DNA was extracted by the HotSHOT method, after which COI was amplified using PCR methods described by Montero-Pau *et al.* [51]. Each PCR reaction had a total volume of 50 μ L and contained 35.2 μ L of ultrapure water, 5.0 μ L of 10x PCR Buffer, 1.5 μ L of $MgCl_2$, 1.0 μ L of each LCO1490 and HCO2198 primers [52], 1.0 μ L of dNTP's, 0.3 μ L of *Taq* polymerase (1.5U) and 5.0 μ L of DNA template. 4 μ L of PCR product were separated by electrophoresis in 50x TAE buffer in a 1% agarose gel and visualized with UV-light fluorescence. PCR products were sequenced bidirectionally using an ABI 3130 capillary sequencer with BigDye Terminator v.3.1 [53]. Electropherograms were analyzed and edited with Chromas 2.13 (Technelysium Pty Ltd., Queensland). Sequences of closely related copepod species obtained from the Barcode of LifeData Systems (www.boldsystems.org) were also included for comparison. The species were (accession numbers): *L. siciloides* (ZPLMX814-06, ZPLMX816-06 and ZPLMX817-06), *L. minutus* (EU825134, EU825137 and EU825188), *L. novamexicanus* (ZPLMX182-06, ZPLMX921-06 and ZPLMX922-06), *L. garciai* (ZPII068-07, ZPII074-07, and ZPII076-07) and *L. cuauhtemoci* (ZPII1346-11, ZPII1360-11 and ZPII196-11). *Mastigodiptomus albuquerquensis* (ZPLMX248-06, ZPLMX526-06 and ZPLMX528-06) was the external group. *L. sicilis* s.s. sequences were not included because they are not available from BOLD Systems or GenBank.

For phylogenetic analysis, sequences were aligned using ClustalW in MEGA 5 software [54]. Genetic distances were calculated using the Kimura two-parameter (K2P) distance model [55,56]. Neighbor-joining trees using K2P distances [57] generated a graphical representation of divergence pattern between the Oriental Basin populations and related species. Using MEGA 5 we identified the degree of variation between sequences, nucleotide diversity and the proportion of variable sites (P distance). Different haplotypes in populations, polymorphic sites, nucleotide (π) and haplotype (H_D) diversities were detected with DNASP 4.1 [58]. Fixation indices (F_{ST}) were calculated with ARLEQUIN 3.11 [59] to estimate the degree of differentiation between populations; AMOVA was performed to calculate intra and inter-population variation. A haplotype network was constructed using the statistical parsimony method with ANeCA v.1.2 [60], which includes TCS 1.21 [61] and GeoDis 2.5 [62]. Clades were nested according to Templeton *et al.* [63] criteria. Finally, the relationship between genetic variation and

geographic location was tested with GeoDis 2.5 while the different haplotype patterns (allopatric fragmentation, range expansion or isolation by distance) were analyzed using the inference key of Posada and Templeton [64].

Life history variation in reciprocal transplant experiments

Hatching of resting eggs from lake sediments. To estimate the viability of resting stages of *L. cf. sicilis* as effective dispersal agents among lakes (passively dispersed by wind or waterfowl), we analyzed the hatching of resting eggs at three salinities comprising the range of salinity recorded in the lakes: Eggs from La Preciosa, Quechulac and Atexcac were tested at 1.1 g L⁻¹, 6.5 g L⁻¹ and 9 g L⁻¹, eggs from El Carmen were tested at 1.1 g L⁻¹, 3.8 g L⁻¹ and 9 g L⁻¹. Quantitative samples of superficial sediment (top 3 cm) were collected from the deepest part of Atexcac, La Preciosa and Quechulac with an Eckman dredge (area = 0.0625 m²), and a sample of mixed sediments obtained from several places at the shore of El Carmen. Sampling of the eggs contained in the superficial sediment layer allowed us to obtain a representative sample of genotypes produced during several years (at least 20 y at each lake if calculated on the sedimentation rate of 0.16 cm yr⁻¹ measured in the neighboring Lake Alchichica [65]). Sediments were transported to the laboratory in total darkness at 4° C [66]. Experimental units consisted of glass flasks with 3 cm³ of sediment and 20 ml of culture medium, placed inside an environmental chamber at constant conditions of temperature, photoperiod, and light intensity (18 ± 1° C, 13 hours light, and 280 mol quanta m⁻² s⁻¹). Six replicates were performed for a total of 54 experimental units (3 populations × 3 salinities × 6 replicates). Daily observations and counts of hatched eggs were made for 25 days. As the density of resting eggs in the sediments was unknown, we calculated the accumulated hatchings as the percentage of the mean value of the highest numbers of individuals hatched from a replicate of the six performed for each salinity treatment per studied lake ($n = 3$). We compared the accumulated hatching during the last 5 days of the experiment using Generalized Linear Models (GLM) [67] with a binomial distribution and a link logit function carried out using R [68]; salinity and population were considered as fixed factors.

Survivorship and development. A reciprocal transplant experiment was performed to analyze the survivorship and development of La Preciosa, Atexcac and El Carmen populations at the salinities recorded in the wild at the time of collections (1.1, 3.8 and 6.5 g L⁻¹), according to the methods proposed by Montiel-Martínez *et al.* [13]. To reduce the risk of osmotic shock, all copepods were gradually acclimated to the experimental salinities before starting the experiment, transferring them every 24 h along a gradient of increasing or decreasing salinities during five days (e.g., 1.1–2.5–3.8–5.1–6.5 g L⁻¹ in La Preciosa copepods). CIII copepods were chosen as experimental subjects because in pre-experimental cultures, mortality rates at earlier developmental stages were highly variable among populations, even at their native salinity conditions. Copepods were individually placed into wells of polystyrene plates (six wells each) containing 8 mL of medium and abundant food (*T. suecica* and *C. vulgaris* at 1:1; >20 mg C L⁻¹); 8 replicates (i.e., a plate with six individuals) were performed per salinity treatment and population (6 individuals × 8 plates × 3 salinities = 144 individuals per population). Experimental units were examined daily under a stereomicroscope Leica MZ95 to record survival and molting, and then copepods were transferred to new plates with fresh medium and food. Survival curves obtained after at least 15 days of observations were analyzed using the Kaplan-Meier method [69], and pairwise comparisons ($P \leq 0.05$) using Log-rank tests [70]. Time (in days) to molt from CIII to adult was analyzed to determine the effect of salinity and population using two-way ANOVAs [49]. If significant differences were found ($P \leq 0.05$), *post hoc* SNK tests were carried out.

Intrapopulation mating success. Mating trials were conducted to evaluate the effect of salinity (1.1, 3.8 and 6.5 g L⁻¹) on the reproduction of La Preciosa, El Carmen, and Atexcac populations. Males and females were used in a 2:1 ratio to increase the possibility of a successful mating [13]. The organisms were selected from the pre-experimental cultures, choosing pre-adult females (CV stage) to ensure they were unmated. Twelve triads from each lake were placed separately in 50 ml flasks with medium at the three different salinities, plus food (3 populations × 12 triads × 3 salinities). Observations and medium renewal were performed daily for at least 15 days. Dead males were removed and replaced. Females that had copulated (identified by the presence of at least one spermatophore) were individually transferred to fresh medium and maintained in the experimental conditions until the appearance of the egg sac and the hatching of larvae. For each combination of population and salinity we calculated the percentage of females that copulated, the egg ratio (number of eggs produced/ total number of females), hatching success (hatched larvae/eggs), and the relative hatching (hatched larvae/ total number of females) [13,71,72]. The effect of salinity and population were analyzed using non-parametric Scheirer-Ray-Hare tests (SRH) [50].

We interpreted the ANOVA, GLM and SRH results considering that (1) a significant effect of salinity is evidence for overall plasticity, (2) a significant effect of population is evidence for genetic clustering, and (3) a significant interaction between the two factors is evidence of genetic differentiation among populations in plasticity [9,73]. Accordingly, local adaptation occurs if the interaction between salinity and population is significant and a population shows higher resting egg hatching, faster development or a better reproductive success in its local salinity than populations from the other lakes (the 'local versus foreign' criterion [74]). Thus, this criterion was useful in identifying selection against migrants, namely, when the environment disfavors migrants relative to natives [75], the quotient fitness of migrants/fitness of residents < 1. We also calculated the relative fitness of organisms in the two alternate salinities (fitness in alternate salinity/fitness in native condition) as a measure of the cost for dispersal to environments of different salinity.

Interpopulation mating success

This analysis was performed to test for pre-mating and post-mating barriers among the populations from the Oriental Basin. We compared mating success between males and females from different lakes and compared them with those obtained in the intrapopulation breeding experiment. The experimental salinity for the common garden experiment was 3.8 g L⁻¹ because that was the condition at which the three populations showed similar copulation rates (the extreme salinities reduced considerably the fitness of La Preciosa and Atexcac populations). Copepods were taken from pre-experimental cultures and were acclimated gradually to achieve the final experimental condition. We used 'no choice' mate tests [76], where males within each triad belonged to one population while the females were from another. Each experimental unit consisted of a female plus two males in a flask with 50 ml of medium with abundant food and controlled abiotic conditions. We performed all the crosses (Table 1) excepting Atexcac

Table 1. Mating trials performed for fitness and reproductive compatibility assessment.

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

Sex of individuals and lake of origin are shown. *i*: intra-population crosses; ×: inter-population crosses; NO: not performed (consult the text for details).

doi:10.1371/journal.pone.0125524.t001

females × El Carmen males because pre-experimental organisms from El Carmen died prior to obtaining the experimental males. Overall, we performed 5 inter-population trials (10 replicates each) and used the intrapopulation crosses at 3.8 g L⁻¹ as controls. If inter-population copulation occurred, females were individually isolated to observe egg production and larvae hatching as in intra-population trials. Results were analyzed for the effect of the origin of male and female using non-parametric SRH tests in order to determine significant differences among crosses.

Results

Morphological divergence

After comparing individuals from the four populations with the original description of Forbes [26], and with other identification keys and specialized literature [77–82], we found that all specimens corresponded well with the diagnostic description of *Leptodiaptomus sicilis*. Detailed analysis based on dissections, drawings, photographs, and direct observations of numerous individuals with compound and scanning electron microscopes revealed no significant differences in the morphology of structures involved in mate recognition or in the presence or absence of spines, processes or membranes used for taxonomic purposes. Nevertheless, there were significant differences in body length in both males and females (Kruskal-Wallis; $P \leq 0.05$); each population constituted a distinct group with minimal overlap: El Carmen > Quechulac > La Preciosa > Atexcac (Table 2A). Males were about 10% smaller than females in the four populations. Contrasting pigmentation among populations was also observed: red color in El Carmen and Atexcac, and colorless in Quechulac and La Preciosa. The characteristic pigmentation observed in field populations was persistent in the laboratory cultures maintained for several months.

Table 2. Adult body size (mm) of individuals from *Leptodiaptomus sicilis* and *L. cf. sicilis*.

	Lake	Sex	Range (mm)	Mean ± S.E.	Relative size ♂ / ♀
A	Atexcac	♀	0.86–0.90	0.88 ± 0.003 ^a	0.88
		♂	0.75–0.81	0.78 ± 0.003 ^w	
	La Preciosa	♀	1.03–1.13	1.10 ± 0.006 ^b	0.85
		♂	0.89–0.99	0.94 ± 0.006 ^x	
	Quechulac	♀	1.21–1.37	1.27 ± 0.012 ^c	0.83
		♂	1.01–1.12	1.27 ± 0.007 ^y	
	El Carmen	♀	1.29–1.39	1.34 ± 0.007 ^d	0.89
		♂	1.16–1.26	1.20 ± 0.008 ^{c^z}	
B	Michigan	♀	1.2–1.3	1.25	0.88
		♂	1.0–1.2	1.10	
	Erie	♀	1.2–1.9	1.55	0.84
		♂	1.1–1.5	1.30	
	Superior	♀	1.5–1.8	1.66	0.83
		♂	1.3–1.4	1.38	
	Oriental Basin	♀	0.9–1.4	1.14	0.87
		♂	0.8–1.3	0.99	

(A) Populations of *L. cf. sicilis* from Oriental Basin, Mexico. Different letters indicate significant differences among females (^{a, b, c, d}) and males (^{w, x, y, z}) of the four populations, according to Mann-Whitney U tests ($P < 0.05$; $n = 20$, for each sex and population); (B) Populations from the Great Lakes, USA (see text for references) and Oriental Basin, Mexico (average, this study).

doi:10.1371/journal.pone.0125524.t002

Table 3. Genetic divergence (mean ± SE) between distinct clades of *L. cf. sicilis* populations and other *Leptodiaptomus* species.

	Car	Pre	Ate	Que	Ls	Ln	Lm	Lg	Lc	Ma
Car	0.24 ± 0.1									
Pre	0.23 ± 0.1	0.12 ± 0.1								
Ate	0.43 ± 0.2	0.37 ± 0.2	0.10 ± 0.0							
Que	0.28 ± 0.1	0.23 ± 0.1	0.35 ± 0.2	0.26 ± 0.1						
Ls	22.5 ± 2.2	22.5 ± 2.3	22.5 ± 2.3	22.5 ± 2.3	0.0 ± 0.0					
Ln	22.1 ± 2.3	22.0 ± 2.3	22.0 ± 2.3	22.0 ± 2.3	20.1 ± 2.2	0.13 ± 0.1				
Lm	26.8 ± 2.6	26.8 ± 2.6	26.8 ± 2.6	26.9 ± 2.6	23.4 ± 2.3	25.2 ± 2.5	0.0 ± 0.0			
Lg	22.7 ± 2.4	22.6 ± 2.4	22.6 ± 2.3	22.7 ± 2.4	20.3 ± 2.1	5.90 ± 1.1	25.5 ± 2.5	0.77 ± 0.3		
Lc	19.4 ± 2.1	19.3 ± 2.1	19.4 ± 2.1	19.4 ± 2.0	19.9 ± 2.1	19.1 ± 2.0	25.0 ± 2.5	20.4 ± 2.2	0.39 ± 0.2	
Ma	25.3 ± 2.5	25.4 ± 2.4	25.4 ± 2.5	25.3 ± 2.4	22.6 ± 2.3	27.0 ± 2.6	28.9 ± 2.8	27.3 ± 2.6	27.4 ± 2.6	1.0 ± 0.4

Distances are Kimura-2-parameter distance (%), with diagonal values indicating intra-clade genetic variation. Clades are shown in Fig 1. Car: El Carmen; Pre: La Preciosa; Ate: Atexcac; Que: Quechulac; Ls: *L. siciloides*; Ln: *L. novamexicanus*; Lm: *L. minutus*; Lg: *L. garciai*; Lc: *L. cuauhtemoci*; Ma: *M. albuquerquensis*.

doi:10.1371/journal.pone.0125524.t003

COI sequencing and genetic divergence

We obtained a total of 48 COI sequences from the four populations studied (Atexcac = 12; La Preciosa = 12; El Carmen = 13; Quechulac = 11). The GenBank accession numbers are KP213127–KP213174. The alignment included 652 bp; other sequences were too short for comparison (<550 bp). The mean values of genetic distances generated by the K2P model are summarized in Table 3, the greatest divergences were found between Atexcac and the other populations: 0.43% with El Carmen, 0.37% with La Preciosa, and 0.35% with Quechulac. A clear divergence with respect to the other *Leptodiaptomus* species included in the comparison (> 20%) was revealed in the simplified consensus identity NJ tree based in the K2P genetic distances (Fig 1). The sequence alignment revealed 16 polymorphic sites (nucleotide diversity

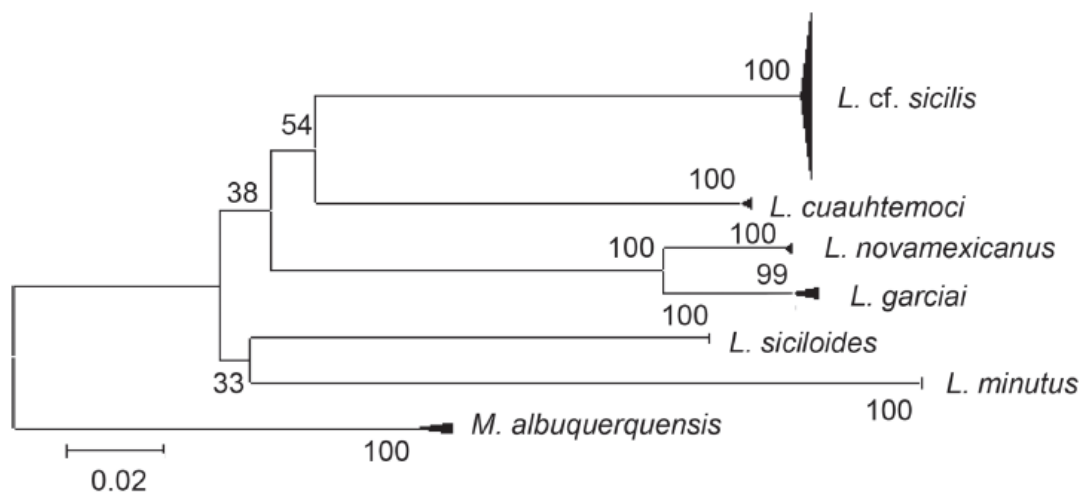


Fig 1. Simplified neighbor-joining tree of COI sequences. The branch of *Leptodiaptomus cf. sicilis* comprises individuals from Atexcac, La Preciosa, El Carmen and Quechulac lakes (Oriental Basin) and is compared to congeneric species using K2P genetic distances. *Mastigodiptomus albuquerquensis* was used as outgroup species. Numbers over branches indicate percent bootstrap support (1000 replicates).

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g001

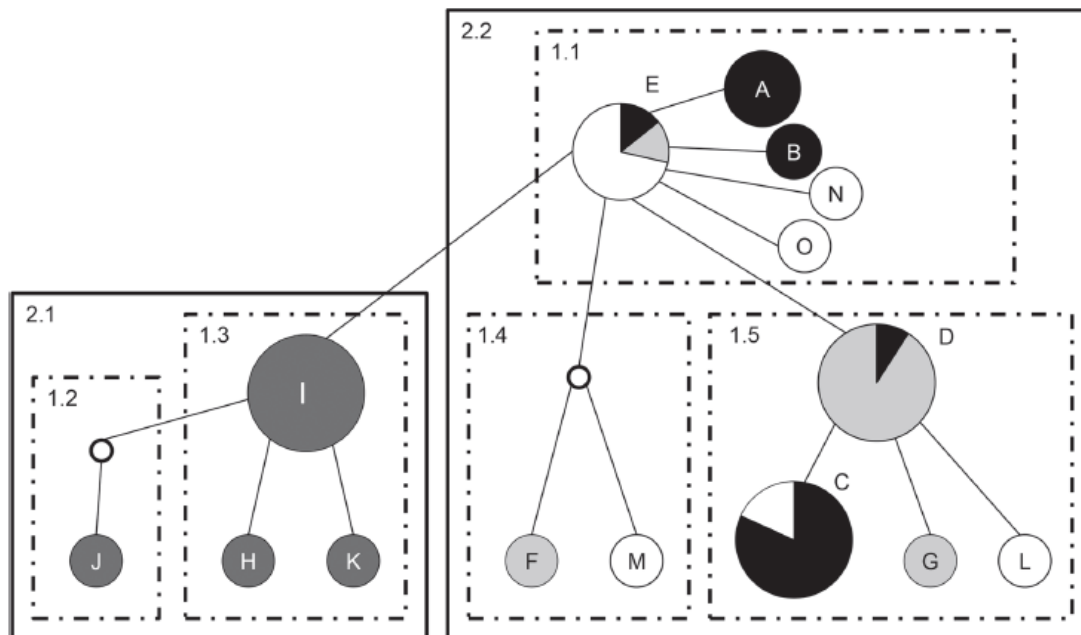


Fig 2. Nested clade design for the haplotype network of COI sequences of *Leptodiaptomus cf. sicilis* populations. A–O: Haplotypes found. Circle size represents haplotype frequency; color indicates the lake where haplotypes are distributed. Black: El Carmen; dark gray: Atexcac; light gray: La Preciosa; white: Quechulac. Haplotype (E) corresponding to the most extended and probably ancient one. White, unlabeled circles represent inferred haplotypes. Informative clades are indicated with numbers (x.y).

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g002

$\pi = 0.0028$). 15 different haplotypes were obtained from the four populations with a haplotype diversity $H_D = 0.875$. Only three haplotypes were present in more than one lake: Haplotype E (Fig 2) is shared among El Carmen, La Preciosa and Quechulac, haplotype C is shared between El Carmen and Quechulac, and haplotype D was found in copepods from El Carmen and La Preciosa. Contrastingly, in each lake there were 2–4 unshared haplotypes, and the set of four present in Atexcac were absent in the other lakes. The fixation index F_{ST} between populations (0.113–0.697; $P \leq 0.05$) indicated the absence of recent gene flow among the four populations. The AMOVA revealed significant intrapopulation variation (57.2%; $P \leq 0.05$). The nested clades of the haplotype network showed five first-level and two second-level clades, one of which (2.1) correspond to the Atexcac population. Finally, the inference key [64] indicated a pattern of restricted gene flow/dispersal with some long-distance dispersal within the clade 2.2 (haplotypes from El Carmen, La Preciosa and Quechulac), and a pattern of allopatric fragmentation among 2.1 and 2.2 clades.

Comparison of performance at different salinities

Hatching from resting eggs. No resting eggs of *Leptodiaptomus* were found or hatched from sediments of Quechulac. The reaction norms and statistical analyses of the maximum hatching attained (Fig 3 and S1 Table) indicate that salinity had a significant effect on resting egg hatching, as well as a significant salinity \times population interaction (GLM test; $P < 0.05$). The absolute highest hatching percentage was attained by eggs from La Preciosa at their native salinity (1.1 g L^{-1}); this was significantly higher than hatching of other populations at that

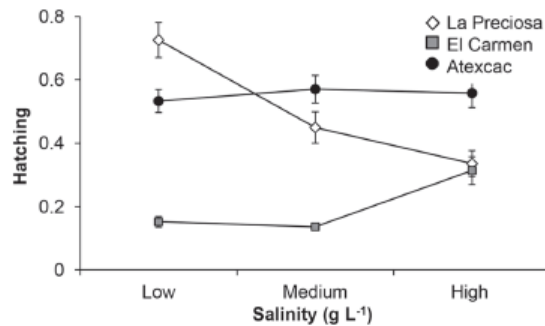


Fig 3. Reaction norms for the proportion of hatching in resting eggs from three *L. cf. sicilis* populations at several salinities. Low: 1.1 g L⁻¹; Medium: 6.5 g L⁻¹ for La Preciosa and Atexcac, 3.8 g L⁻¹ for El Carmen; High: 9.0 g L⁻¹.

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g003

salinity. The response of eggs from Atexcac did not change significantly at the tested salinities, but the performance of this population was the best (compared to La Preciosa) at its local salinity (6.5 g L⁻¹). Resting eggs from La Preciosa decreased significantly in their performance in the two higher salinities, whereas eggs from El Carmen were negatively affected by freshwater.

Survivorship and development. We observed that the three populations had differential responses to salinity, with general effects of salinity and population as individual factors (Figs 4 and 5). Copepods from La Preciosa and Atexcac had the highest survival rate at their native salinity (1.1 g L⁻¹ and 6.5 g L⁻¹, respectively) and were negatively affected by increased or decreased salinity. Performance of individuals from El Carmen was statistically similar at the three salinities, comparable to La Preciosa at 1.1 and 3.8 g L⁻¹, and to Atexcac at 6.5 g L⁻¹ (Log-rank tests; $P < 0.05$). Thus, the clearest divergence in survival was between La Preciosa and Atexcac.

Salinity and population showed significant effects on development time of individuals from CIII to adult stage; in addition, the salinity \times population interaction was also significant (two-way ANOVA, $P < 0.001$; Fig 5). The mean development time was longest at the lowest salinity. Copepods from La Preciosa and Atexcac reached the adult stage faster than El Carmen. Individuals from La Preciosa and (to a lesser degree) Atexcac developed more rapidly at their native salinities compared to the other populations. When transplanted to fresh water, the development of individuals from El Carmen and Atexcac was slower.

Intra-population mating. The proportion of copulated females was on average higher in El Carmen (64%) and La Preciosa (58%) and lower in Atexcac (44%). Salinity had important effects on the number of copulated females in La Preciosa and Atexcac populations, whereas the effect was minor in El Carmen (Fig 6A). Animals from La Preciosa reached the highest number of copulated females at their native salinity (1.1 g L⁻¹), and decreased noticeably at increased salinities. Contrastingly, the lowest salinity had an important negative effect on the number of copulated females (Fig 6A) in copepods from Atexcac; these attained their highest copulation rate at the salinity of their natural habitat (6.5 g L⁻¹).

Among mated females, mean clutch size (eggs per egg sac) at the native salinity was different for each population: El Carmen (11.9 ± 6.6 SD) $>$ La Preciosa (6.2 ± 2.0 SD) $>$ Atexcac (2.3 ± 0.7 SD). Correspondingly, only the effect of population and salinity \times population (S \times P) interaction were significant on egg ratio and relative hatching. On the other hand, only S \times P interaction was significant on hatching success (SRH tests, $P < 0.001$; S2 Table). The decreasing order in clutch size from El Carmen to Atexcac was also mirrored in egg ratio and relative

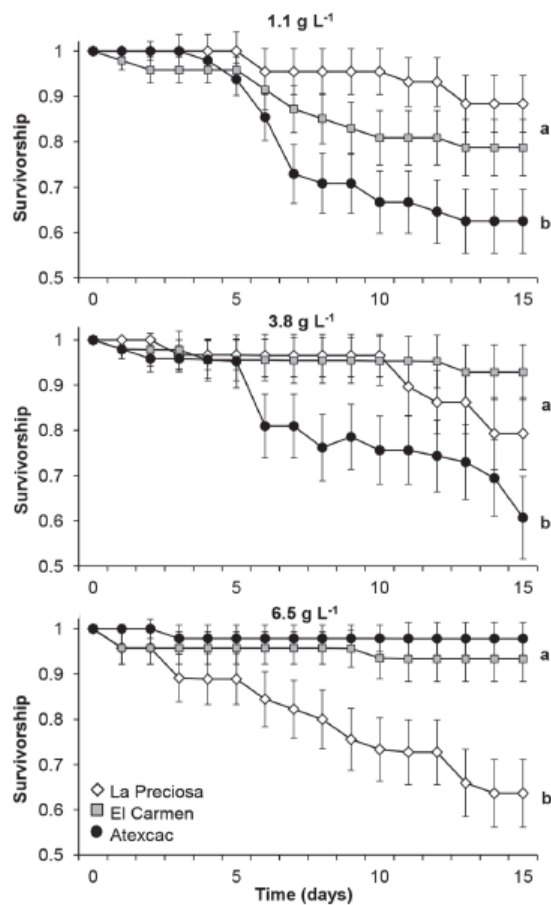


Fig 4. Survivorship curves of three populations of *L. cf. sicilis* at home and alternative salinities. Values are means \pm SE; letters indicate significant differences among populations according to the log-rank tests ($P \leq 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g004

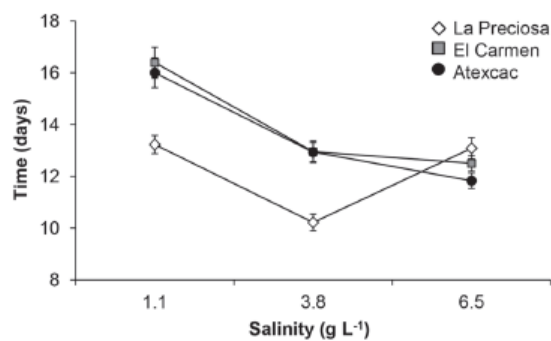


Fig 5. Development (time to molting from CIII to adult stage) of the three studied populations of *L. cf. sicilis* at home and alternate salinities. Values are means \pm SE.

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g005

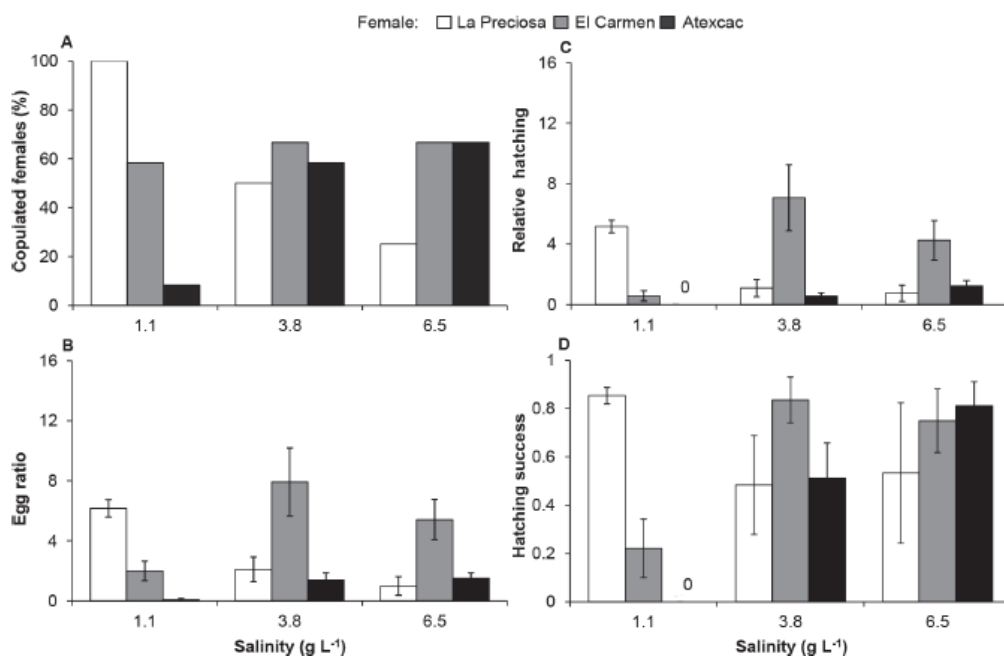


Fig 6. Intra-population mating at home and alternative salinities. (A) Percentage of copulated females (spermatophore attached to the genital pore). (B) Egg ratio (number of eggs/number of females); (C) Relative hatching (number of nauplii/number of females); (D) Hatching success (nauplii/eggs). Values are mean \pm SE.

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g006

hatching, with the best performance of El Carmen at 3.8 g L⁻¹ (Fig 6B, 6C and 6D). In their native conditions, females from La Preciosa and El Carmen (1.1 and 3.8 g L⁻¹, respectively) performed better than the other populations in all parameters (Fig 6A–6D), but their performance declined throughout the salinity gradient. Animals from Atexcac were negatively affected by alternative salinities and their performance at native salinity was not the best compared to foreign organisms.

Overall, relative fitness of organisms from La Preciosa decreased at the higher salinities of the other lakes, most remarkably in the egg ratio, copulation, and hatching of diapausing eggs, and to a lesser degree on survival (Fig 7). Alternate environments also negatively affected individuals from Atexcac, with dramatic effects of freshwater on egg ratio, hatching of subitaneous eggs (eggs that develop immediately without a period of dormancy), and copulation, although development and survival decreased too. Only the hatching of resting eggs was unaltered. Regarding the population from El Carmen, fresh water had a pronounced negative impact on the six variables considered (except for the resting egg hatching), but the highest salinity also decreased the egg ratio and the hatching of subitaneous eggs.

In the test for selection against migrants (Fig 8), we found a decreased fitness of immigrants from El Carmen and Atexcac at Lake La Preciosa (1.1 g L⁻¹) compared to the resident population. The negative effects were more dramatic on copulation, egg ratio, and hatching of subitaneous eggs from Atexcac. At the salinity of lake El Carmen (3.8 g L⁻¹), the performance of immigrants from the other two lakes was inferior to the resident population except in development rate, with La Preciosa performing better than the local population. Finally, at the salinity of Lake Atexcac (6.5 g L⁻¹), fitness of immigrants from La Preciosa was lower than the resident

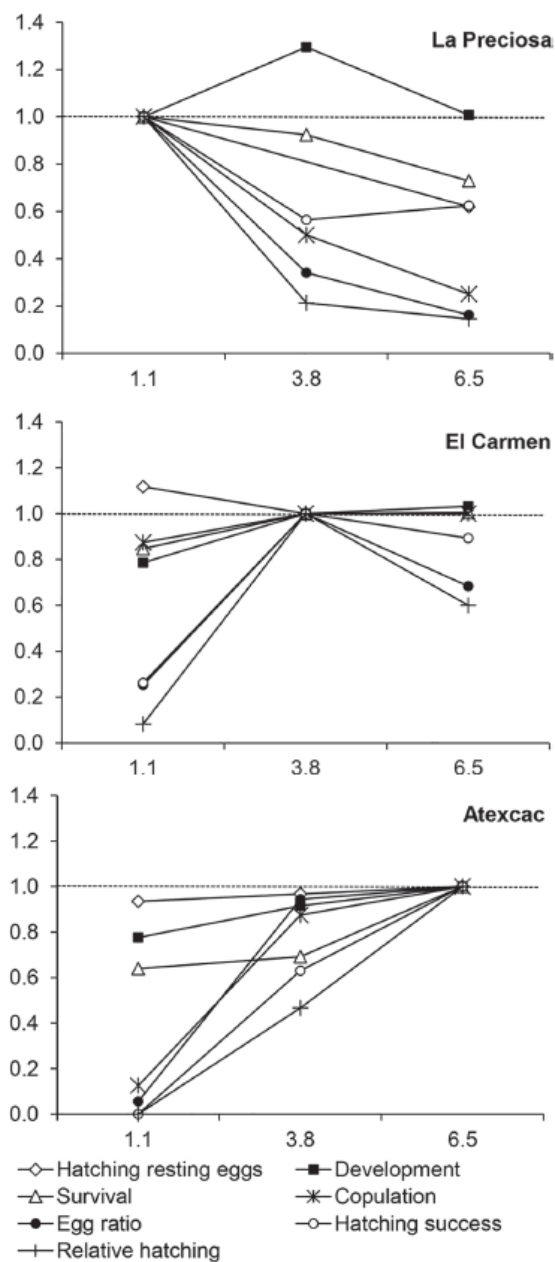


Fig 7. Performance of populations of *L. cf. sicilis* at alternate salinities relative to home conditions. Fitness at home conditions = 1, pointed line.

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g007

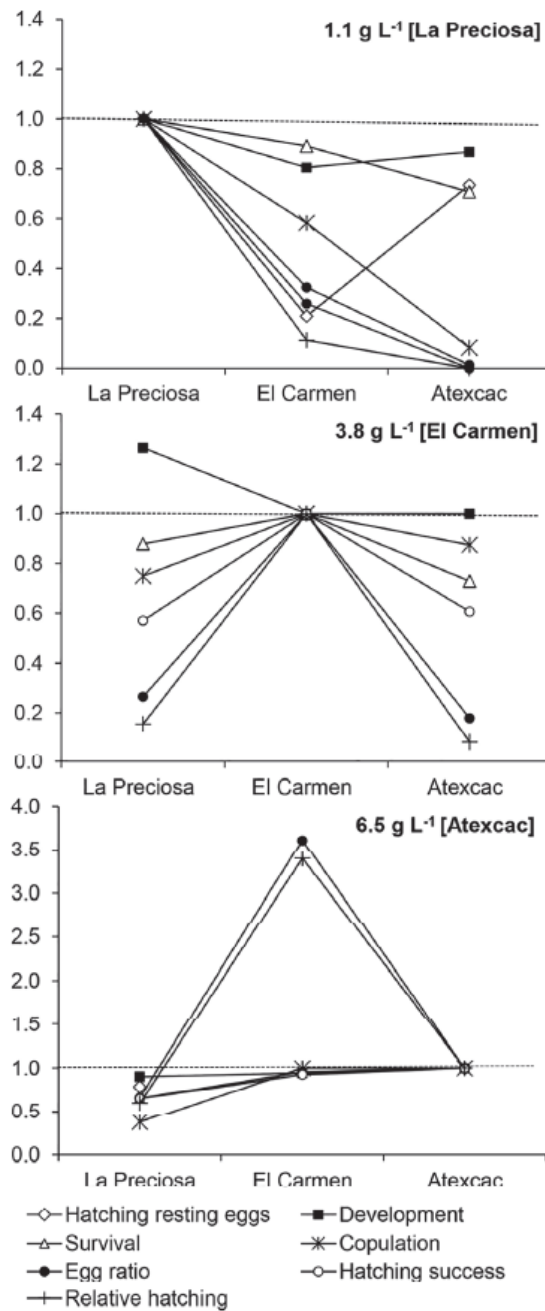


Fig 8. Selection against immigrants. Performance of immigrants from populations of *L. cf. sicilis* in different salinities relative to resident populations. Resident population between brackets. Fitness of resident populations = 1, pointed line.

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g008

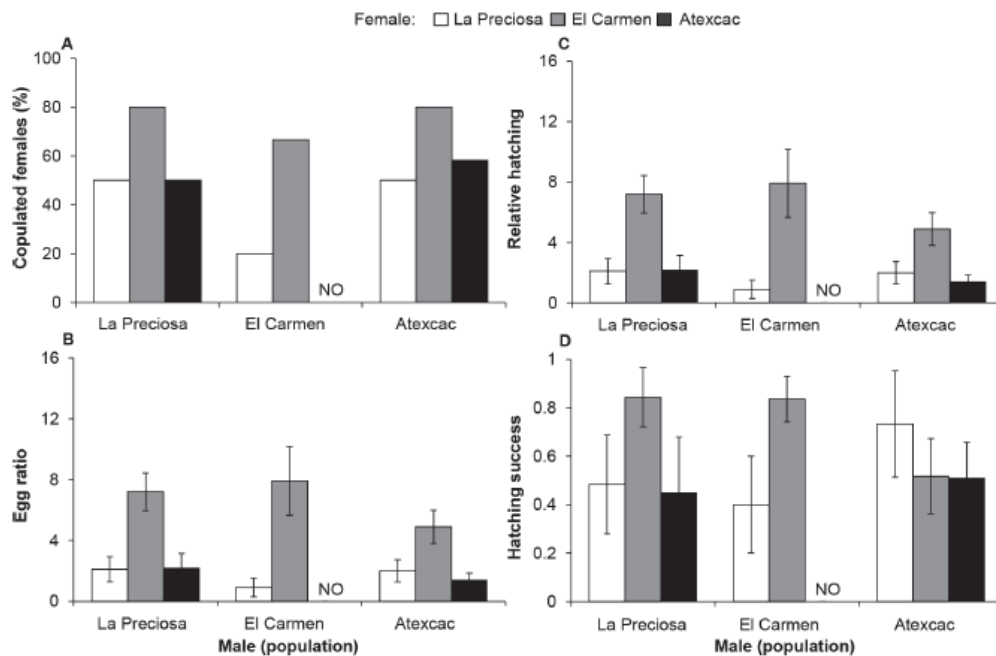


Fig 9. Reproductive compatibility among populations in a common garden experiment (3.8 g L⁻¹). (A) Percentage of copulated females (spermatophore attached to the genital pore). (B) Egg ratio (number of eggs/number of females); (C) Relative hatching (number of nauplii/number of females); (D) Hatching success (nauplii/eggs). Values are mean ± SE.

doi:10.1371/journal.pone.0125524.g009

population, but hatching success and development were only slightly inferior (0.90 of the local population for both variables). The performance of individuals from El Carmen was very similar to the resident population, and even the egg ratio and relative hatching exceeded almost 4 times the observed on local females.

Reproductive compatibility

Inter-population breeding. Recognition of mates, attachment of spermatophores by males to females (Fig 9A), egg formation (Fig 9B), and hatching of nauplii (Fig 9C and 9D) occurred in all interpopulation crosses performed at an intermediate salinity (3.8 g L⁻¹), although significant differences existed due to female origin in egg ratio and relative hatching (S3 Table; $P < 0.005$). Females from El Carmen were more frequently copulated by males from the three populations, at percentages even higher (80%) than in interpopulation crosses (65%) (Fig 6). Also, females from El Carmen showed higher egg ratio and relative hatching than the other two populations, which had similar performances.

Discussion

Morphological and genetic divergence

Copepods from our four study lakes showed significant differences among populations in body size and pigmentation. However, no differences were observed in the size or shape of the characters analyzed, particularly those involved in the reproduction, e.g., geniculate antennule, claw in P5 of males, or structure of P5 in both sexes. Thus, body size could be the only factor that

interferes in sexual recognition or compatibility during interpopulation mating and constitute a barrier to gene flow (but see [results](#) on interbreeding trials below).

Because the animals used for morphological analyses were obtained from field samples, the observed differences in size could be attributed to environmental factors such as water temperature (larger sizes in cooler waters [83]), food availability (increased body size with abundant resources [84]), salinity (higher salinities generate smaller sizes [85]), or the presence of vertebrate predators (removal of larger and/or pigmented copepods [86,87]). However, we observed that differences in size and color persisted even after culturing at common laboratory conditions for several months. When we compared the size of the Mexican populations with those reported for *L. sicilis* from the Great Lakes [78,82,84,88,89] the latter were larger (Table 2B), but this information is not enough to attribute such differences to environmental conditions (lower temperature and salinity) or to species differences.

However, differences in pigmentation (i.e., reddish in Atexcac and El Carmen, colorless in Quechulac and La Preciosa) observed in field and laboratory animals could be interpreted as the seasonal changes recognized within this species by Forbes [26]. These color variations could result from the foods they consumed [84]. So, we could not eliminate the possibility that phenotypic plasticity may occur in wild Mexican populations owing to temporal changes in available food resources. However, all four populations were cultured under the same illumination and feeding regimes (i.e., common garden experiment), and they produced distinctive pigmentation patterns, suggesting geographic variation among populations. Further research is needed to elucidate if this pattern is related to a trade-off between protection from ultraviolet radiation and avoidance from visual predators [90,91], which are only present in Quechulac and La Preciosa.

Genetic divergence in mtDNA COI sequences among populations differed by <0.5%, which was lower than the congeneric average distance of 8.38% [92] and 17.84% [93] found among lacustrine copepods from Mexico, or the threshold of 0.16 subst./site proposed for species delimitation within Crustacea [94]; thus these differences were not large enough to warrant separating populations from the Oriental Basin lakes into several species. Nonetheless, according to the same criteria the group is clearly separated (average distances >20%) from the other species included in the analysis. The lack of material of *L. sicilis* from the Great Lakes precluded morphological and genetic comparisons, so we cannot conclude if populations from Oriental Basin belong to the same species or not.

A current paradigm states that the passive dispersal of resting structures of zooplankters among closely located lakes is high enough to maintain a significant gene flow among populations [95]. However, our results show that each population has a distinct genetic structure characterized by presence of particular, unshared mtDNA COI haplotypes and absence or restriction of gene flow, with limited dispersal. Moreover, there was a remarkable pattern of allopatric fragmentation between the population from Atexcac and the other three populations, as haplotypes found in Atexcac were completely idiosyncratic. From a geological point of view, Oriental Basin lakes are relatively recent (~40,000 ybp) [38]; thus, considering that the rate of COI divergence (as a molecular clock) has been calculated at ~1.4% per My [96], it is unlikely that the genetic divergence we found among populations (0.23–0.43%) originated within these lakes. Thus, the genetic clustering may be the result of three processes leading to reduced gene flow: 1) differential colonization events associated with priority effects, 2) a build-up of local adaptation to environmental conditions in each lake by genetic variants that do not allow the entry of new genotypes, and 3) the (related) reduced fitness of migrants in habitats to which they are poorly adapted. This may have resulted in further differentiation among nearby populations as they adapted to different environments [9,97–99], as we will discuss further here below.

Similar patterns of genetic differentiation among local populations of freshwater invertebrates have been detected [97,100,101], involving weak gene flow as a consequence of low dispersal rates even at small spatial scales in cladocerans [e.g., 102]. Some others indicate the existence of microgeographic heterogeneity, the persistence of founder events and the development of microendemism in copepods [13,22], patterns that occur especially in taxa inhabiting waterbodies with different salinities. Thus, salinity is associated with increased rates of molecular evolution, promoting local genetic divergence in halophilic plankton [16,103], as it seems to be occurring in these Oriental Basin copepods.

Ecological divergence: Specialization, local adaptation and selection against immigrants

Results from transplant experiments showed a consistent pattern of adaptive divergence among three populations inhabiting three distinct environments. Though there were significant effects of salinity and population on several variables (indicating overall plasticity to salinity or genetic clustering of populations, respectively), and the interaction term was always significant implying existence of genetic differentiation among populations in plasticity [73], i.e., each population responded differently to each salinity scenario. Populations of copepods from the deep, permanent lakes of relatively constant salinity (La Preciosa, Atexcac) are highly specialized genotypes because they performed best at their native salinities and experienced more or less dramatic decreases at foreign conditions. On the other hand, because El Carmen is a temporary playa lake that experiences wide salinity fluctuations, we expected to find a generalist genotype adapted to a wide range of conditions. Interestingly, the performance of several indicators of fitness was severely impaired at the lowest salinity; but at the other extreme (relatively high salinity; $\geq 6.5 \text{ g L}^{-1}$) the negative effects on some variables were not significant. Thus, at least the genotypes collected when salinity at El Carmen was 3.8 g L^{-1} exhibited a less specialized, but not completely generalist, profile that overlaps partially with the performance of organisms from Atexcac but not from La Preciosa.

Thus, according to the 'local vs. foreign' criterion [74] the population inhabiting La Preciosa has developed a strong local adaptation to the lowest salinity, as evidenced by the performance of genotypes from El Carmen and Atexcac which was always inferior at that salinity. In contrast, although copepods from Atexcac apparently inhabit the best environment available for them, their performance at their local salinity was only slightly better or even surpassed by individuals from El Carmen, giving a weak pattern of local adaptation. Moreover, as La Preciosa and Atexcac genotypes are strongly adapted to their native conditions, performance of individuals from El Carmen was usually the best at the intermediate salinity, satisfying also the criterion for local adaptation in reproductive variables.

Finally, in accordance with the observed pattern of divergent adaptation, we confirmed that potential immigrants from locally specialized populations (La Preciosa, Atexcac) are poorly adapted to alternate environments [11], greatly reducing the probability of gene flow between them and with organisms migrating to El Carmen. In contrast, we found that organisms from El Carmen migrating to Atexcac would not experience significant negative selection and thus the potential of gene flow could still be considered. However, there is no evidence of such gene flow, as reflected by the differential distribution of COI haplotypes discussed before, a result that deserves further investigation. Overall, ecophysiological data show that the pattern of lack of gene flow among populations revealed by the haplotype analyses is explained at least partially by the inability of migrants to cope with alternate salinity conditions. This comprises an effective prezygotic barrier to reproduction. However, though the chances for reproduction between populations in natural conditions are scarce, the question of whether speciation has

proceeded sufficiently to disrupt reproductive compatibility to any small degree among populations still remains. We consider that question below.

Reproductive compatibility

Variation in body size among the populations was not an impediment to interpopulation mating, resulting in successful interbreeding in the intermediate salinity, even though copepods from La Preciosa and Atexcac were cultured in suboptimal conditions. Thus, divergent adaptation of populations has not produced reproductive incompatibility and according to the biological species concept [104–106] they constitute the same species and not a complex of cryptic species [13,34]. However, further analysis is needed to determine the long-term success of interpopulation offspring. To do this we would need to follow survivorship, development, and fertility of the resulting hybrids beyond the F1 generation [34,107]. This may reveal postzygotic barriers [108], such as physiological deficiencies, morphological malformations or infertility [109].

Concurrently, our results on biological fitness and reproductive compatibility are consistent with the pattern outlined by the molecular analyses. Although these populations may still be considered a single species, they have diverged somewhat as a consequence of disruptive selection (differential salinity conditions). The separation of the populations has resulted in unique local adaptations that now limit their ability to disperse to neighbor lakes.

Speciation along the salinity gradient?

Salinity affected fitness characters throughout the life history, and more so in copepods inhabiting perennial lakes than ephemeral lakes. Three different phenotypes have evolved: two specialized phenotypes in the lakes of constant salinity, each adapted to divergent local conditions, and one intermediate generalist phenotype in a temporary lake where salinity fluctuates throughout the season. The invasion of diverse environments involves challenging physiological trials and high energetic costs to migrant copepods coming from saline to fresh water or vice versa [14]. Thus, osmoregulatory capacity should be under strong adaptive selection [110]. Individuals that are capable of surviving in salinity-fluctuating environments like El Carmen increase their probability of successful colonization into other lakes. On the other hand, if salinity is constant, the ability to osmoregulate over a wide interval of conditions is not advantageous, and the variants that perform better at the local salinity would be selected over the generations, reducing or eliminating plasticity [100]. This may account for the narrow tolerance observed in copepods from La Preciosa and Atexcac.

Passive dispersal of resting eggs of copepods among lakes by wind or waterfowl (as *Fulica americana* and some species of Anatidae that inhabit these lakes) [95] even if frequent, is not enough to allow a noticeable migration of individuals among divergent patches. For a successful colonization event, immigrants should withstand both biotic (e.g., interactions with predators and/or competitors) and abiotic conditions (e.g., different salinity, hydrodynamic regime, etc.) throughout its entire life cycle, from hatching to the production of viable offspring and the long-term population establishment. However, our results demonstrate that specialized phenotypes are poorly suited as migrants, with quite reduced probabilities of mating in alternate environments. This explains the molecular evidence for restricted gene flow among lakes over the years and the persistence of founder events, as well as the pattern of allopatric fragmentation we found [9,97,111], and supports the assertion that natural selection against immigrants is an effective reproductive barrier between populations evolving in divergent environments [112].

In summary, the four neighbor populations of copepods analyzed, although with low divergence, are genetically structured, indicating ineffective dispersal and restricted gene flow

reinforced by an ecologically based divergent selection. Moreover, the prezygotic isolation among populations due to immigrant inviability is indicative of an advanced stage within the “speciation continuum” [11, 108, 113]. Preliminary results of ongoing experiments indicate that although hybrids from La Preciosa and Atexcac survive to sexual maturity, the F2 generation is no longer viable. If the current conditions persist for a longer time, ecological speciation may reach completion, generating perhaps three different biological entities, one inhabiting Atexcac lake, another distributed in Quechulac and La Preciosa and the other at El Carmen.

This study showed how ecologically based divergent selection may explain diversification patterns in lacustrine copepods. Our next step is to perform a finer-level molecular analysis using neutral markers and genomic methods [114,115]. This will allow us to relate variation in genomes to environmental adaptation [116] to better understand the processes underlying adaptive divergence in lacustrine organisms.

Supporting Information

S1 Table. Generalized linear model on the accumulated hatching of the three resting egg banks of *L. cf. sicilis*. Analysis was performed averaging the last five days of the experiment. Binomial distribution and a logit link function were assumed. *p* value means *p* Chi-square distribution values.
(DOCX)

S2 Table. Effects of salinity, population and their interaction on reproductive variables in intrapopulation mating. Data were analyzed by means of non-parametric Scheirer-Ray-Hare tests.
(DOCX)

S3 Table. Effects of the origin of male, origin of female and their interaction on reproductive compatibility in interpopulation mating trials. Egg ratio data were analyzed by mean of a two-way ANOVA, while relative hatching and hatching success by non-parametric Scheirer-Ray-Hare tests.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank M. Martínez, N. Lomelí, O. Hernández and L. Peralta for their field and laboratory assistance. We are deeply grateful to Prof. Robert Lee Wallace (Ripon College, WI) for his comments on the manuscript and generous help correcting the English. William J. Etges, Ken Spitze and two anonymous reviewers provided thoughtful comments for improving the manuscript. We are indebted to Manuel Elías-Gutiérrez (El Colegio de la Frontera Sur, Mexico) for providing us with zooplankton samples from the Great Lakes. This manuscript constitutes a partial fulfillment of the requirements for the PhD of O. A. Barrera-Moreno in the Doctorado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OABM JCP EOM. Performed the experiments: OABM JCP JAAR. Analyzed the data: OABM JCP EOM JAAR EPI. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCP EOM EPI. Wrote the paper: OABM JCP EOM.

References

1. Lee CE, Posavi M, Charmantier G. Rapid evolution of body fluid regulation following independent invasions into freshwater habitats. *J Evol Biol.* 2012; 25:625–33. doi: [10.1111/j.1420-9101.2012.02459.x](https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02459.x) PMID: [22296332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22296332/)
2. Boxshall GA, Jaume D. Making waves: The repeated colonization of fresh water by copepod crustaceans. *Adv Ecol Res.* 2000; 31:61–79.
3. Lee CE, Petersen CH. Genotype-by-environment interaction for salinity tolerance in the freshwater-invading copepod *Eurytemora affinis*. *Physiol Biochem Zool.* 2002; 75:335–44. PMID: [12324889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12324889/)
4. Adamowicz SJ, Menu-Marque S, Hebert PDN, Purvis A. Molecular systematics and patterns of morphological evolution in the Centropagidae (Copepoda: Calanoida) of Argentina. *Biol J Linn Soc.* 2007; 90:279–92.
5. Karanovic T, Cooper SJB. Explosive radiation of the genus *Schizopera* on a small subterranean island in Western Australia (Copepoda: Harpacticoida): unravelling the cases of cryptic speciation, size and differentiation and multiple invasions. *Invertebr Syst.* 2012; 26:115–92.
6. Vaillant JJ, Bock DG, Haffner GD, Cristescu ME. Speciation patterns and processes in the zooplankton of the ancient lakes of Sulawesi Island, Indonesia. *Ecol Evol.* 2013; 3:3083–94. doi: [10.1002/ece3.697](https://doi.org/10.1002/ece3.697) PMID: [24101996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24101996/)
7. Boxshall GA, Evstigneeva TD. The evolution of species flocks of copepods in Lake Baikal. A preliminary analysis. *Ergebnisse der Limnol.* 1994; 44:235–45.
8. Bloom DD, Weir JT, Piller KR, Lovejoy NR. Do freshwater fishes diversify faster than marine fishes? A test using state-dependent diversification analyses and molecular phylogenetics of new world silver-sides (Atherinopsidae). *Evolution.* 2013; 67:2040–57. doi: [10.1111/evo.12074](https://doi.org/10.1111/evo.12074) PMID: [23815658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23815658/)
9. Alcántara-Rodríguez JA, Ciroso-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Serranía-Soto CR, Piedra-Ibarra E. Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshw Biol.* 2012; 57:728–40. doi: [10.1016/j.archorabio.2011.12.007](https://doi.org/10.1016/j.archorabio.2011.12.007) PMID: [22251575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22251575/)
10. Williams WD. Salinity as a determinant of the structure of biological communities in salt lakes. *Hydrobiologia.* 1998; 381:191–201.
11. Nosil P. *Ecological speciation.* 1st ed. Oxford: Oxford University Press; 2012.
12. Tobler M, Dewitt TJ, Schlupp I, García de León FJ, Herrmann R, Feulner PGD, et al. Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecilia mexicana*. *Evolution.* 2008; 62:2643–59. doi: [10.1111/j.1558-5646.2008.00466.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00466.x) PMID: [18637957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18637957/)
13. Montiel-Martínez A, Ciroso-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Elías-Gutiérrez M. Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiaptomus garciai* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species. *J Plankton Res.* 2008; 30:1079–93.
14. Lowe CD, Kemp SJ, Bates AD, Montagnes DJS. Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Mar Biol.* 2004; 146:923–29.
15. Dexter D. Salinity tolerance of the copepod *Apocyclops dengizicus* (Lepeschkin, 1900), a key food chain organism in the Salton Sea, California. *Hydrobiologia* 1993; 267:203–9.
16. Derry AM, Hebert PDN, Prepas EE. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: A molecular phylogenetic approach. *Limnol Oceanogr.* 2003; 48:675–85.
17. Seidel RA, Lang BK, Berg DJ. Salinity tolerance as a potential driver of ecological speciation in amphipods (*Gammarus* spp.) from the northern Chihuahuan Desert. *J North Am Benthol Soc.* 2010; 29:1161–9.
18. Purcell KM, Hitch A, Martin S, Klerks PL, Leberg PL. The role of genetic structure in the adaptive divergence of populations experiencing saltwater intrusion due to relative sea-level rise. *J Evol Biol.* 2012; 25:2623–32. doi: [10.1111/jeb.12016](https://doi.org/10.1111/jeb.12016) PMID: [23116362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23116362/)
19. Berdan EL, Fuller RC. Interspecific divergence of ionoregulatory physiology in killifish: insight into adaptation and speciation. *J Zool.* 2012; 287:283–91.
20. Fuller RC, McGhee KE, Schrader M. Speciation in killifish and the role of salt tolerance. *J Evol Biol.* 2007; 20:1962–75. PMID: [17714313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17714313/)
21. Oliva MG, Lugo A, Alcocer J, Cantoral-Uriza EA. *Cyclotella alchichicana* sp. nov. from a saline Mexican lake. *Diatom Res.* 2006; 21:81–9.
22. Suarez Morales E, Barrera-Moreno O, Ciroso-Pérez J. A new species of *Cletocamptus* Schmanke-witsch, 1875 (Crustacea, Copepoda, Harpacticoida) from a high altitude saline lake in Central Mexico. *J Limnol.* 2013; 72:313–25.

23. Escobar-Briones E, Alcocer J. *Caecidotea williamsi* (Crustacea: Isopoda: Asellidae), a new species from a saline crater-lake in the eastern Mexican Plateau. *Hydrobiologia*. 2002; 477:93–105.
24. Cohuo-Durán S, Pérez L, Karanovic I. On *Limnocytherina axalapasco*, a new freshwater ostracod (Podocopida: Limnocytheridae) from Mexican crater lakes. *Rev Biol Trop*. 2014; 62:15–32. PMID: [24912340](#)
25. Bloom DD, Piller KR, Lyons J, Mercado-Silva N, Medina-Nava M. Systematics and Biogeography of the Silverside Tribe Menidiini (Teleostomi: Atherinopsidae) Based on the Mitochondrial ND2 Gene. *Copeia*. 2009; 2:408–17.
26. Forbes SA. On some Entomostraca of Lake Michigan and adjacent waters. *Am Nat*. 1882; 16:537–42.
27. Macek M, Vilaclara Fatjó G, Lugo Vázquez A, Alcocer Durand J, Lago de Atexcac. In: De la Lanza-Espino G, García-Calderón JL, editors. *Lagos y presas de México*. México: AGT; 2002. p. 199–212.
28. Galat DL, Lider EL, Vigg S, Robertson SR. Limnology of a large, deep, North American terminal lake, Pyramid Lake, Nevada. *Hydrobiologia*. 1981; 82:281–317.
29. Herzig A, Anderson RS, Mayhood DW. Production and population dynamics of *Leptodaptomus sicilis* in a mountain lake in Alberta, Canada. *Holarctic Ecol*. 1980; 3:50–63.
30. Cooper JJ, Koch DL. Limnology of a desertic terminal lake, Walker Lake, Nevada, U. S. A. *Hydrobiologia*. 1984; 118:275–92.
31. Beutel MW, Horne AJ, Roth JC, Barratt NJ. Limnological effects of anthropogenic desiccation of a large, saline lake, Walker Lake, Nevada. *Hydrobiologia*. 2001; 466:91–105.
32. Kierboe T. What makes pelagic copepods so successful? *J Plankton Res*. 2011; 33:677–85.
33. Marrone F, Lo Brutto S, Hundsdoerfer AK, Arculeo M. Overlooked cryptic endemism in copepods: Systematics and natural history of the calanoid subgenus *Occidodaptomus* Borutzky 1991 (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae). *Mol Phylogenet Evol*. 2013; 66:190–202. doi: [10.1016/j.ympev.2012.09.016](#) PMID: [23026809](#)
34. Lee CE. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate “populations”. *Evolution*. 2000; 54:2014–27. PMID: [11209778](#)
35. Boxshall GA, Defaye D. Global diversity of copepods (Crustacea: Copepoda) in freshwater. *Hydrobiologia*. 2008; 595:195–207.
36. Suárez-Morales E, Reid JW, Elías-Gutiérrez M. Diversity and Distributional Patterns of Neotropical Freshwater Copepods (Calanoida: Diaptomidae). *Int Rev Hydrobiol*. 2005; 90:71–83.
37. Armienta MA, Vilaclara G, De la Cruz-Reyna S, Ramos S, Cenicerros N, Cruz O, et al. Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *J Volcanol Geotherm Res*. 2008; 178:249–58.
38. Carrasco-Núñez G, Ort MH, Romero C. Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *J Volcanol Geotherm Res*. 2007; 159:179–97.
39. Alcocer J, Hammer UT. Saline lake ecosystems of Mexico. *Aquat Ecosyst Heal Manag*. 1998; 1:291–315.
40. Oliva MG, Lugo A, Alcocer J, Peralta L, Sánchez M del R. Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia*. 2001; 466:299–306.
41. Peralta L, Escobar E, Alcocer J, Lugo A. Oligochaetes from six tropical crater lakes in Central Mexico: species composition, density and biomass. *Hydrobiologia*. 2002; 467:109–16.
42. Ortega-Mayagoitia E, Ciro-Pérez J, Sánchez-Martínez M. A story of famine in the pelagic realm: temporal and spatial patterns of food limitation in rotifers from an oligotrophic tropical lake. *J Plankton Res*. 2011; 33:1574–85.
43. USEPA. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5th ed. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency; 2002.
44. Andersen RA. *Algal culturing techniques*. Amsterdam: Academic Press; 2005.
45. Suárez-Morales E, Silva-Briano M, Elías-Gutiérrez M. Redescription and taxonomic validity of *Leptodaptomus cuauhtemoci* (Osorio-Tafall, 1941) (Copepoda, Calanoida), with notes on its known distribution. *J Limnol*. 2000; 59:5–14.
46. Elías-Gutiérrez M, Suárez-Morales E, Romano-Márquez B. A new species of *Leptodaptomus* (Copepoda, Diaptomidae) from Northwestern Mexico with comments on the distribution of the genus. *J Plankton Res*. 1999; 21:603–14.
47. Ting JH, Kelly LS, Snell TW. Identification of sex, age and species-specific proteins on the surface of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Mar Biol*. 2000; 137:31–7.
48. Dussart B, Defaye D. *Introduction to Copepoda*. 2nd ed. Leiden: Backhuys Publishers; 2001.

49. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. 4th ed. New York: WH Freeman; 2011.
50. Dytham C. *Choosing and using statistics: a biologist's guide*. 3th ed. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2011.
51. Montero-Pau J, Gómez A, Muñoz J. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnol Oceanogr Methods*. 2008; 6:218–22.
52. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994; 3:294–9. PMID: [7881515](#)
53. Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PD. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes*. 2006; 6:959–64.
54. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28:2731–9. doi: [10.1093/molbev/msr121](#) PMID: [21546353](#)
55. Kimura M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci*. 1981; 78:454–8. PMID: [6165991](#)
56. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980; 16:111–20. PMID: [7463489](#)
57. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4:406–25. PMID: [3447015](#)
58. Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003; 19:2496–7. PMID: [14668244](#)
59. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2005; 1:47–50.
60. Panchal M. The automation of nested clade phylogeographic analysis. *Bioinformatics*. 2007; 23:509–10. PMID: [17142814](#)
61. Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol*. 2000; 9:1657–9. PMID: [11050560](#)
62. Posada D, Crandall KA, Templeton AR. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol Ecol*. 2000; 9:487–8. PMID: [10736051](#)
63. Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*. 1987; 117:343–51. PMID: [2822535](#)
64. Posada D, Templeton AR. GeoDis inference key [Internet]. University of Vigo (Spain): David Posada and Alan Templeton. c1999–2009 [updated 2011 Jan 6]. Available from: <http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>. Accessed 11 March 2015.
65. Alcocer J, Ruiz-Fernández AC, Escobar E, Pérez-Bernal LH, Oseguera LA, Ardiles-Gloria V. Deposition, burial and sequestration of carbon in an oligotrophic, tropical lake. *J Limnol*. 2014; 73:223–35.
66. Hagiwara A, Hino A. Effect of incubation and preservation on resting eggs hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*. 1989; 186/187:415–21.
67. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2nd ed. London: Chapman and Hall/CRC; 1989.
68. Team R Core. R: A Language and Environment for Statistical Computing (version 3.1.1). Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. doi: [10.3758/s13428-013-0330-5](#) PMID: [23519455](#)
69. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958; 53:457–81.
70. Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *J R Stat Soc Ser A*. 1972; 135:185–207.
71. Runge JA, Roff JC. The measurement of growth and reproductive strategies. In: Harris RP, Wiebe PH, Lenz J, Skjoldal HR, Huntley M, editors. *ICES Zooplankton methodology manual*. London: Elsevier Academic Press; 2000. p. 401–54.
72. Santer B, van den Bosch F. Herbivorous nutrition of *Cyclops vicinus*: the effect of a pure algal diet on feeding, development, reproduction and life cycle. *J Plankton Res*. 1994; 16:171–95.
73. Conner JK, Hartl DL. *A primer of ecological genetics*. 1st ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2004.
74. Kawecki TJ, Ebert D. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol Lett*. 2004; 7:1225–41.

75. Via S, Bouck AC, Skillman S. Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. II. Selection against migrants and hybrids in the parental environments. *Evolution*. 2000; 54:1626–37. PMID: [11108590](#)
76. Ridgway MS, McPhail JD. Ecology and evolution of sympatric sticklebacks (*Gasterosteus*): mate choice and reproductive isolation in the Enos Lake species pair. *Can J Zool*. 1984; 62:1813–8.
77. Herrick CL. A final report on the Crustacea of Minnesota included in the orders Cladocera and Copepoda. Minneapolis: Johnson, Smith & Harrison; 1884.
78. Schacht FW. North American Species of *Diaptomus*. *Bull Illinois State Lab Nat Hist*. 1897; 5:97–224.
79. Marsh CD. A revision of the North American species of *Diaptomus*. *Trans Wisconsin Acad Sci Arts Lett*. 1907; 15:381–516.
80. Lesko LT, Hudson PL, Chriscinske MA. Calanoid copepods of the Laurentian Great Lakes. Great Lakes Science Center Home Page. 2003. Available from: <http://www.glsc.usgs.gov/greatlakescopepods/Key.php?GROUP=Calanoid>. Accessed 1st April 2015.
81. Aliberti MA, Allan E, Allard S, Bauer DJ, Beagen W, Shane R, et al. An image-based key to the zooplankton of North America (version 5.0). University of New Hampshire Center for Freshwater Biology. 2013. Available from: <http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/>. Accessed 1st April 2015.
82. Wilson MS, Yeatman HC. Free-living Copepoda. In: Edmonson W, editor. *Freshwater Biology*. New York: John Wiley & Sons; 1959. p. 735–861.
83. Williamson CE, Reid JW. Copepoda. In: Thorp JH, Covich JP, editors. *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. San Diego: Academic Press; 2001. p. 915–54.
84. Balcer MD, Korda NL, Dodson SI. *Zooplankton of the Great Lakes*. Wisconsin: The University of Wisconsin Press; 1984.
85. De los Rios-Escalante P. Morphological variations in *Boeckella poopoenis* (Marsh, 1906) (Copepoda, Calanoida) in two shallow saline ponds (Chile) and potential relation to salinity gradient. *Int J Aquat Sci*. 2011; 2:80–7.
86. Byron ER. The adaptive significance of calanoid copepod pigmentation: a comparative and experimental analysis. *Ecology*. 1982; 63:1871–86.
87. Lampert W, Sommer U. *Limnology*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
88. Robertson A, Gannon JE. Annotated checklist of the free-living copepods of the Great Lakes. *J Gt Lakes Res*. 1981; 7:382–93.
89. Torke B. The distribution of calanoid copepods in the plankton of Wisconsin Lakes. *Hydrobiologia*. 2001; 453/425:351–65.
90. Hansson LA. Plasticity in pigmentation induced by conflicting threats from predation and UV radiation. *Ecology*. 2004; 85:1005–16.
91. Rhode SC, Pawlowski M, Tollrian R. The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature*. 2001; 412:69–72. PMID: [11452307](#)
92. Gutiérrez-Aguirre MA, Cervantes-Martínez A, Elías-Gutiérrez M. An example of how barcodes can clarify cryptic species: the case of the calanoid copepod *Mastigodiatomus albuquerqueensis* (Herrick). *PLoS One*. 2014; 9:e85019. doi: [10.1371/journal.pone.0085019](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085019) PMID: [24465470](#)
93. Elías-Gutiérrez M, Jerónimo FM, Ivanova N V, Valdez-Moreno M, Hebert PDN. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*. 2008; 1839:1–42.
94. Lefebvre T, Douady CJ, Gouy M, Gibert J. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Mol Phylogenet Evol*. 2006; 40:435–47. PMID: [16647275](#)
95. Bohonak AJ, Jenkins DG. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecol Lett*. 2003; 6:783–96.
96. Knowlton N, Weigt LA. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc R Soc London B* 1998; 265:2257–63.
97. De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K. The Monopolization Hypothesis and the dispersal—gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecol*. 2002; 23:121–35.
98. Campillo S, García-Roger EM, Carmona MJ, Gómez A, Serra M. Selection on life-history traits and genetic population divergence in rotifers. *J Evol Biol*. 2009; 22:2542–53. doi: [10.1111/j.1420-9101.2009.01871.x](https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01871.x) PMID: [19878499](#)
99. Matute DR. The role of founder effects on the evolution of reproductive isolation. *J Evol Biol*. 2013; 26:2299–311. doi: [10.1111/jeb.12246](https://doi.org/10.1111/jeb.12246) PMID: [24118666](#)

100. Sereda SV, Wilke T, Schultheiß R. Changes in selection regime cause loss of phenotypic plasticity in planktonic freshwater copepods. *PLoS One*. 2014; 9:e90010. doi: [10.1371/journal.pone.0090010](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090010) PMID: [24587186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24587186/)
101. Haag CR, Riek M, Hottinger JW, Pajunen VI, Ebert D. Founder events as determinants of within-island and among-island genetic structure of *Daphnia* metapopulations. *Heredity*. 2006; 96:150–8. PMID: [16369578](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16369578/)
102. Declerck S, Cousyn C, De Meester L. Evidence for local adaptation in neighbouring *Daphnia* populations: a laboratory transplant experiment. *Freshw Biol*. 2001; 46:187–98.
103. Ebert PDN, Remigio EA, Colbourne JK, Taylor DJ, Wilson CC. Accelerated molecular evolution in halophilic crustaceans. *Evolution*. 2002; 56:909–26. PMID: [12093027](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12093027/)
104. Lee MSY. Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *J Evol Biol*. 2003; 16:179–88. PMID: [14635856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14635856/)
105. Dobzhansky T. A critique of the species concept in biology. *Philos Sci*. 1935; 2:344–55.
106. Mayr E. *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. New York: Columbia University Press; 1942. PMID: [15851666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15851666/)
107. Ellison CK, Burton RS. Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution*. 2008; 62:631–8. PMID: [18081717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18081717/)
108. Rundle HD, Nosil P. Ecological speciation. *Ecol Lett*. 2005; 8:336–52.
109. Wu C-I, Davis AW. Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's Rule and its genetic bases. *Am Nat*. 1993; 142:187–212. doi: [10.1086/285534](https://doi.org/10.1086/285534) PMID: [19425975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19425975/)
110. Lee CE, Kiergaard M, Gelembiuk GW, Eads BD, Posavi M. Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution*. 2011; 65:2229–44. doi: [10.1111/j.1558-5646.2011.01308.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01308.x) PMID: [21790571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21790571/)
111. Kingsolver JG, Pfennig DW, Servedio MR. Migration, local adaptation and the evolution of plasticity. *Trends Ecol Evol*. 2002; 17:540–1.
112. Nosil P, Vines TH, Funk DJ. Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution*. 2005; 59:705–19. PMID: [15926683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15926683/)
113. Nosil P, Harmon LJ, Seehausen O. Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends Ecol Evol*. 2009; 24:145–56. doi: [10.1016/j.tree.2008.10.011](https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.011) PMID: [19185951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19185951/)
114. Hohenlohe PA, Bassham S, Etter PD, Stiffler N, Johnson EA, Cresko WA. Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS Genet*. 2010; 6:e1000862. doi: [10.1371/journal.pgen.1000862](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000862) PMID: [20195501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20195501/)
115. Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One*. 2011; 6:e19379. doi: [10.1371/journal.pone.0019379](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379) PMID: [21573248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21573248/)
116. Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Thomas WK, Tucker A, Oakley TH, et al. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*. 2011; 331:555–61. doi: [10.1126/science.1197761](https://doi.org/10.1126/science.1197761) PMID: [21292972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292972/)

“How a person masters his fate is more important than
what that fate is”

Wilhelm von Humboldt

CAPÍTULO V

Análisis de la diversidad genómica de las poblaciones de *Leptodiptomus* grupo *sicilis* de la Cuenca Oriental

Introducción

La diversidad de las condiciones ecológicas, sobre todo de la salinidad entre los lagos de la Cuenca Oriental, son una fuente de selección divergente capaz de generar un aislamiento reproductivo entre las poblaciones de *Leptodiptomus* grupo *sicilis*, así como una respuesta diferencial sobre otros parámetros ecofisiológicos en los organismos de cada lago. Lo anterior se discutió ampliamente en el Capítulo IV. Por otro lado, las divergencias estimadas del gen mitocondrial COI indican que las poblaciones estudiadas todavía pueden considerarse una misma especie biológica, aunque hay genotipos particulares a algunas poblaciones, los cuáles han sido aislados por el flujo genético restringido entre poblaciones, así como la persistencia de eventos fundadores y un patrón de fragmentación alopátrida, dando como resultado fenotipos generalistas (en el lago somero con variaciones periódicas de salinidad) y especialistas (en los lagos profundos y sin variaciones ambientales) como señalan Barrera *et al.* (2015).

De esta manera, las presiones ambientales a las que cada lago de la Cuenca Oriental somete a sus habitantes zooplanctónicos, en especial rotíferos (véase, Alcántara-Rodríguez, 2018) y copépodos, mantienen una combinación de variantes genéticas y fenotipos particulares entre las distintas poblaciones de una misma especie. Lo anterior ocurre a pesar de la gran capacidad de dispersión pasiva que históricamente se ha señalado en este tipo de organismos gracias a la presencia de estadios anhidrobióticos y a la formación de estructuras de resistencia o diapausa capaces de sobrevivir durante años (Hairston, 1996; Hessen *et al.*, 2019), lo que les permitiría a estos organismos mantener un flujo genético estable en el tiempo y espacio, homogeneizando las frecuencias genotípicas entre las poblaciones (Declerk *et al.*, 2001). Sin embargo, como se ha señalado, en el caso de *L. grupo sicilis*, el aislamiento reproductivo es debido a factores ambientales entre sus poblaciones, dando soporte a la hipótesis de que se encuentran inmersos en un proceso de especiación ecológica.

Como se analizó en el Capítulo IV, el análisis basado en la comparación de fragmentos de secuencias de un solo gen (p. ej., COI) no es suficiente para dilucidar de manera clara la estructura genética presente en cada población, la cual puede ser derivada del bajo flujo genético entre sí a causa de factores ambientales locales y no necesariamente de la distancia entre cuerpos

de agua. Un ejemplo de lo anterior es descrito por Declerk *et al.* (2001) utilizando aloenzimas como marcadores moleculares, comprobado que, a pesar de su gran capacidad de dispersión, existen especies de cladóceros del género *Daphnia* que muestran diferenciación genética dentro y entre poblaciones separadas aun a pocos metros de distancia. En este caso, es importante señalar que estos organismos, al igual que otros componentes del zooplancton como los rotíferos, son partenogenéticos, por lo que en una parte de su ciclo de vida las hembras no requieren de machos para reproducirse y aumentar el tamaño poblacional, siendo así, en teoría, relativamente más fácil colonizar un nuevo ambiente. Sin embargo, en el caso de los copépodos, cuya reproducción es estrictamente sexual, la dispersión de un estadio anhidrobiótico o de una estructura de resistencia debe ir acompañada -además de la capacidad de eclosionar y desarrollarse bajo condiciones distintas a las propias- de la habilidad para reconocer y reproducirse de manera exitosa con un individuo nativo, mejor adaptado a ese nuevo ambiente (De Meester *et al.*, 2002).

Es probable que, gracias a procesos de adaptación local y la persistencia de eventos fundadores que limitan el flujo genético interpoblacional, se desarrollen con mayor facilidad patrones de diferenciación genética entre poblaciones de una misma especie de copépodos (Barrera-Moreno *et al.*, 2015), de la misma manera que se ha reportado para otros componentes del zooplacton con hábitos reproductivos diferentes (*i.e.*, partenogenéticas), donde por ejemplo, se han descrito especies de rotíferos con una estructura genética marcada entre sus poblaciones (Alcántara-Rodríguez, 2018; Gras *et al.*, 2018).

Ligado al uso de marcadores moleculares para encontrar patrones de diversificación entre invertebrados dulceacuícolas, Bohonak y Jenkins (2003) refieren que los estudios que han utilizado técnicas moleculares a menudo encuentran que poblaciones locales de este tipo de organismos muestran divergencias genéticas, lo que implicaría tasas de dispersión bajas incluso a escalas espaciales pequeñas o flujo génico bajo, indicando la existencia de patrones de heterogeneidad microgeográfica, persistencia del efecto fundador, posibles endemismos y una profunda estructura filogeográfica; por lo que analizar la diversidad genética de las poblaciones de copépodos en una cuenca endorreica pequeña y con cuerpos de agua cercanos pero aislados como se tienen en la Cuenca Oriental, tiene sentido para inferir los procesos que han determinado la diversificación biológica de estos organismos y otros taxones con características similares.

En la actualidad, el rápido desarrollo generado en los análisis genéticos, aunado a los avances en los métodos de genotipificación han propiciado el uso de distintos marcadores moleculares con utilidad en estudios ecológicos (Selkoe *et al.*, 2006). Estos métodos, por ejemplo, son de gran utilidad para comprender la evolución y ecología de organismos con una alta movilidad, como las aves marinas, así como proponer estrategias de conservación (Taylor y Friesen, 2012). Una situación similar puede ocurrir en otras especies que también se consideran con una gran capacidad de dispersión, como son los copépodos. En el caso de estos organismos del zooplancton, la identificación de los polimorfismos -mutaciones en un gen que se transmiten a la descendencia y que coexisten con el gen original en una población (Lemey *et al.*, 2009)- generados en marcadores neutros como los microsatélites, son de utilidad para calcular los efectos de la hibridación entre linajes divergentes provenientes de distintas poblaciones (Harrison *et al.*, 2004), determinar el tamaño efectivo de una población (Zeller *et al.*, 2008) así como los patrones de variación genética dentro y entre poblaciones (Edmans y Harrison, 2003), los cuales son debidos, en algunos casos, al aislamiento por distancia y/o a eventos fundadores (véase Zeller *et al.*, 2006). De esta manera, los estudios con marcadores neutros son importantes para conocer el papel de la dispersión y del flujo genético entre poblaciones (Provan *et al.*, 2007), en especial en este tipo de organismos, en los que no se puede medir fácilmente el movimiento de un individuo particular entre una población y otra (Zeller *et al.*, 2006).

Debido a la distribución geográfica de estas poblaciones y a la alta probabilidad de dispersión por medio del viento (en el caso de los huevos de resistencia depositados en el sedimento de los lagos someros), o de las aves que pueden ir de un lago a otro con relativa facilidad (pudiendo transportar consigo organismos vivos), se podría esperar un flujo genético significativo entre las distintas poblaciones de una misma especie, situación que parece no ocurrir en la naturaleza con estos copépodos. Los análisis previos, utilizando el gen COI indican la presencia de variantes genéticas particulares, especialmente en el lago Atexcac, y un flujo genético restringido entre todas las poblaciones de la Cuenca Oriental. Por lo tanto, el uso de marcadores altamente polimórficos podría ayudar a determinar con una mejor resolución las relaciones filogenéticas dentro y entre las poblaciones estudiadas.

De esta manera, el objetivo del presente capítulo es analizar la estructura genética de las poblaciones de *L.* grupo *sicilis* localizadas en la Cuenca Oriental, utilizando marcadores altamente polimórficos con el fin de detectar marcadores neutrales y marcadores sujetos a selección (atípicos). La hipótesis por probar establece que, debido al flujo genético restringido entre poblaciones vecinas y a las diferencias ambientales entre los cuerpos de agua donde habitan, el taxón *L.* grupo *sicilis* presentará un patrón de estructura genética poblacional particular a cada lago. Este análisis nos permitirá identificar agrupamientos genéticos, relaciones filogenéticas y posibles eventos de intercambio reciente.

Para realizar nuestro estudio, se utilizaron herramientas de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) que permiten analizar una gran cantidad de información proveniente de miles de regiones del genoma de cada individuo proporcionando una resolución suficiente para llevar a cabo análisis de diversidad genética y diferenciación de poblaciones (Hohenlohe *et al.*, 2010), así como de filogeografía, especialmente en organismos que no suelen ser utilizados como modelos de estudio (Emerson, *et al.*, 2010). Otra ventaja de estas metodologías es que permiten estudiar a organismos que no cuentan con información genómica previa o con otros marcadores moleculares con alta tasa de mutación (*i.e.*, microsatélites) (Alcántara-Rodríguez, 2018). Si bien mediante la secuenciación de nueva generación y el uso de enzimas de restricción se han desarrollado diferentes metodologías que permiten el descubrimiento y evaluación de marcadores moleculares (véase, Davey *et al.*, 2011), en cuanto a la cantidad de sitios polimórficos que se pueden identificar, se ha calculado que la técnica de Genotipificación por Secuenciación o GBS por sus siglas en inglés (Elshire *et al.*, 2011) es más eficiente que la de RAD Tags (Emerson, *et al.*, 2010), así como menos costosa.

Con estas metodologías se genera una biblioteca genómica con representaciones reducidas del genoma de cada individuo, lo que ha ocasionado una revolución en la biología y a la vez, una gran cantidad de datos que requieren programas informáticos especiales para su análisis (Glaubitz *et al.*, 2014). Estas bibliotecas son construidas mediante la digestión del ADN por medio de enzimas de restricción y la ligación de adaptadores (tags) para la plataforma de secuenciación Illumina®, los cuales asocian una secuencia con un individuo en particular, dando como resultado una mayor cantidad de información en menor tiempo (Elshire *et al.*, 2011). Con este

procedimiento es posible detectar un alto grado de polimorfismo por la presencia de SNPs a lo largo de miles de regiones del genoma (Emerson *et al.*, 2010) de una manera económica y eficiente (Van Tassell *et al.*, 2008), así como localizar mutaciones específicas para cada población e inferir los patrones de diversificación biológica. Los resultados obtenidos con este tipo de marcadores permiten inferir procesos evolutivamente recientes en todo tipo de organismos, especialmente en taxones en los que no se cuenta con mucha información o un genoma de referencia como es el caso de los copépodos epicontinentales.

De esta manera, en este estudio se utilizó la técnica de GBS con la finalidad de generar una gran cantidad de sitios polimórficos provenientes del genoma de los individuos de *Leptodiptomus* grupo *sicilis* y utilizarlos como marcadores moleculares con una alta tasa de mutación. Con esta información, es posible inferir eventos evolutivos recientes (*i.e.*, flujo genético interpoblacional) y analizar la estructura genética a nivel poblacional bajo una escala de tiempo ecológico.

Métodos

Adicionalmente a los individuos de cada población obtenidos por medio de los arrastres en columna de agua y litoral de cada lago (como se describió en el Capítulo 2), se colectaron muestras de sedimento con el fin de aislar sus estructuras de resistencia (huevos diapáusicos en el caso de calanoides y estadios juveniles anhidrobióticos en el caso de ciclopoideos; véase, p. ej., Frisch *et al.*, 2009; Samchyshyna y Santer, 2010).

Después de revisar la distribución geográfica de cada especie de copépodos de la Cuenca Oriental y debido a la poca cantidad de material genético obtenido a partir de los huevos de resistencia colectados, se decidió realizar el estudio con organismos adultos de *L.* grupo *sicilis* pertenecientes a sus distintas poblaciones (*i.e.*, El Carmen, Atexcac, La Preciosa y Quechulac). El taxón seleccionado ha sido poco estudiado con este tipo de técnicas (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2022) ni cuenta con un genoma secuenciado, por lo que una muestra de ADN (obtenida a partir de 1,000 individuos del lago El Carmen y con una concentración de ADN ≥ 50 ng/ μ l) fue enviada

al IGD para realizar pruebas de digestión con diferentes enzimas de restricción (*i.e.*, ApeKI, EcoRI y PstI) con el fin de estandarizar los parámetros y garantizar la obtención de resultados.

Se realizó la estandarización de la extracción de ADN utilizando el método de la Proteinasa K (Hoelzel y Green, 1992) y la purificación del mismo con el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen ©). Posteriormente, el ADN de cada muestra fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y SbfI. Finalmente, el material genético fue cuantificado mediante espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific ®). Para comprobar la obtención de valores correctos también se realizó la cuantificación del ADN desde los geles de agarosa mediante el programa Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a partir de la imagen obtenida en un equipo transiluminador UV.

Para determinar la estructura genética de estas poblaciones, se realizó un análisis de GBS, utilizando el servicio proporcionado por el Instituto de Diversidad Genómica (IGD, por sus siglas en inglés) de la Universidad de Cornell en Ithaca, Nueva York, E. U. Para la identificación de SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido o *single nucleotide polymorphism*) se siguió el protocolo descrito por Elshire *et al.* (2011).

Al ADN digerido se le ligaron adaptadores para la plataforma de secuenciación Illumina® HiSeq 2000/2500, así como un marcador de 4-8 pb para identificar cada muestra. Posteriormente, se llevaron a cabo reacciones de PCR con los oligonucleótidos complementarios a los adaptadores para amplificar todas las regiones cortadas con la enzima de restricción siguiendo la metodología de Elshire *et al.* (2011). Los productos de PCR fueron purificados y separados por tamaños con la finalidad de obtener solamente fragmentos de 64 pb los cuales fueron secuenciados. La información obtenida fue filtrada bioinformáticamente utilizando el programa Tassel (Bradbury *et al.*, 2007) para separarla por población y posteriormente alineada para determinar la presencia de loci polimórficos (SNPs). Para el análisis de los datos se utilizó el paquete VCFtools (Danecek, 2011) con los siguientes filtros: se eliminaron sitios con una frecuencia de alelo menor a 0.05; se incluyeron solamente sitios bialélicos; se excluyeron sitios con más del 10% de datos faltantes; se excluyeron sitios con inserciones o deleciones; y se

excluyeron sitios con valores mayores al 75% de heterocigocidad (Benestan *et al.*, 2016). Los detalles de cada proceso y la descripción de cada archivo generado se indican en el Apéndice 3.

A continuación, se llevó a cabo el análisis de la estructura genética de las poblaciones. Con el paquete VCFtools (Danecek, 2011) se obtuvieron los valores del índice F_{ST} , así como el cálculo de la heterocigocidad (H_o) y de la diversidad nucleotídica (π). Para detectar los SNPs putativamente sujetos a selección natural (atípicos) y las mutaciones neutrales fijadas por población (sujetas a procesos aleatorios como deriva génica), se utilizó el programa Bayescan (Foll, 2008). Para cada locus, el programa estimó los valores de F_{ST} de la población. En este análisis, se considera que valores altos (entre 0.2-1) permiten diferenciar entre poblaciones debido a que indican flujo genético restringido entre ellas. Con este programa también se calcularon los valores de q (q value) para todas las poblaciones y entre pares, de esta manera se detectaron los marcadores sujetos a selección, identificados con valores <0.001 . Los marcadores neutrales y sujetos a selección se analizaron con el paquete Poppr (Kamvar *et al.*, 2014), el cual tiene la capacidad de inferir distintas poblaciones, asignar individuos a una población y estimar frecuencias alélicas. Con este software se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) para ambos tipos de marcadores, el análisis discriminante de componentes principales (DAPC) y probabilidad de pertenencia, además se generó un dendograma de las distancias genéticas mediante el método de vecino más cercano con una secuencia de arranque de 10,000 réplicas. Con el software BEAST (Suchard *et al.*, 2018) se reconstruyeron las relaciones filogenéticas entre los genotipos de cada población. La interfase BEAUti se utilizó para ordenar los datos y los parámetros del análisis (Modelo evolutivo HKG+G; MCMC = 10,000,000; muestreando cada 1,000 árboles). Los árboles generados y los valores de probabilidades posteriores se visualizaron en el software DensiTree v.2.2.5 (Bouckaert y Heled, 2014), fueron resumidos en un árbol de máxima credibilidad con el programa TreeAnnotator v1.10 (Rambaut y Drummond, 2017) y, finalmente, editados con FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2016).

Resultados

Debido a la poca cantidad de material genético obtenido a partir de los huevos de resistencia aislados, el estudio se realizó con organismos adultos pertenecientes a cada población de *L. grupo sicilis* (*i.e.*, Quechulac, La Preciosa, Atexcac, El Carmen). El volumen total de cada extracción individual de ADN fue de 40 μl , de los cuáles se tomaron 3 μl para ser digeridos por la enzima EcoR1 e identificar el ADN digerido en un gel de agarosa. Además, 1 μl de cada extracción fue utilizado para cuantificar la cantidad de ADN por individuo.

La concentración de ADN obtenido a partir de un copépodo adulto fue de 1.2 ng/ μl en promedio, sin embargo, la metodología de GBS requiere una cantidad mínima de ADN de 10 ng/ μl de muestra, la cual no fue posible obtener directamente a partir de un individuo, por lo que se colocaron 20 individuos en cada muestra para realizar la extracción del ADN total. Cada muestra contenía individuos del mismo lago y fecha de colecta con el fin de determinar diferencias genéticas entre distintas temporadas de cada lago (estratificación o mezcla; lluvias o secas) y punto de colecta (columna de agua o litoral). Dadas las características de los lagos y la estrategia de muestreo, se asume que cada conjunto de copépodos habitando un lago representa una unidad reproductiva local (*i.e.*, una población local; Hartl, 2020), que eventualmente podría cambiar temporal o espacialmente dentro de cada lago, pero no entre los diferentes lagos. En total, se realizaron 54 extracciones de ADN con una concentración entre 17 y 84 ng/ μl en un volumen de 32 μl (Tabla 1).

Cada extracción fue depositada en una placa de 96 pocillos para su envío al IGD, donde el ADN extraído fue digerido exitosamente con la enzima de restricción ApeK1. Al no contar con un genoma de referencia de copépodos para alinear las secuencias generadas e identificar adecuadamente los SNPs, se utilizó el algoritmo UNEAK (Lu *et al.*, 2013), el cual es una extensión del programa Tassel (Bradbury *et al.*, 2007). La secuencia (*pipeline*) de comandos y procesos bioinformáticos requeridos para la obtención de los SNPs se realizó siguiendo el procedimiento que se muestra en la Figura 1, el cual fue desarrollado por la Dra. Katie Hyma (Genomic Diversity Facility-Universidad de Cornell).

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Tabla 1: Concentración de ADN (ng/μl) de cada muestra enviada para el análisis de GBS.

Fecha	Muestra	Población	[ADN ng/μl]	Volumen muestra (μl)	ADN total muestra (ng)
04-Sep-10	A1	Atexcac	17	32	555
04-Sep-10	A4	Atexcac	21	32	667
04-Sep-10	A5	Atexcac	21	32	661
04-Sep-10	A6	Atexcac	21	32	672
04-Sep-10	A10	Atexcac	25	32	811
09-Ago-11	A11	Atexcac	19	32	603
09-Ago-11	A13	Atexcac	19	32	592
02-Sep-14	A15	Atexcac	18	32	565
02-Sep-14	A16	Atexcac	21	32	656
02-Sep-14	A17	Atexcac	19	32	603
02-Sep-14	A18	Atexcac	23	32	747
02-Sep-14	A19	Atexcac	20	32	651
02-Sep-14	A20	Atexcac	26	32	837
02-Sep-14	A22	Atexcac	26	32	837
02-Sep-14	A24	Atexcac	17	32	539
04-Sep-10	A26	Atexcac	18	32	576
04-Sep-10	A28	Atexcac	42	32	1344
04-Sep-10	A29	Atexcac	24	32	779
09-Ago-11	A30	Atexcac	27	32	859
09-Ago-11	A31	Atexcac	28	32	901
14-Nov-14	C1	El Carmen	26	32	837
14-Nov-14	C2	El Carmen	24	32	763
14-Nov-14	C3	El Carmen	22	32	709
14-Nov-14	C4	El Carmen	84	32	2672
14-Nov-14	C5	El Carmen	51	32	1616
14-Nov-14	C6	El Carmen	49	32	1557
14-Nov-14	C7	El Carmen	50	32	1584
14-Nov-14	C8	El Carmen	65	32	2069
14-Nov-14	C9	El Carmen	53	32	1685
14-Nov-14	C10	El Carmen	64	32	2059
05-Sep-10	C11	El Carmen	28	32	901
05-Sep-10	C12	El Carmen	16	32	496
05-Sep-10	C13	El Carmen	30	32	949
21-Sep-14	P1	La Preciosa	22	32	715
21-Sep-14	P2	La Preciosa	20	32	629
21-Sep-14	P3	La Preciosa	22	32	704
21-Sep-14	P6	La Preciosa	27	32	864
21-Sep-14	P8	La Preciosa	28	32	885
21-Sep-14	P9	La Preciosa	17	32	533
03-Mar-14	P11	La Preciosa	22	32	699
03-Mar-14	P13	La Preciosa	19	32	597
21-Feb-12	Q1	Quechulac	19	32	613
21-Feb-12	Q2	Quechulac	27	32	859
21-Feb-12	Q4	Quechulac	22	32	699
02-Sep-14	Q5	Quechulac	33	32	1056
02-Sep-14	Q6	Quechulac	47	32	1509

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

02-Sep-14	Q7	Quechulac	36	32	1147
02-Sep-14	Q8	Quechulac	26	32	827
02-Sep-14	Q9	Quechulac	54	32	1712
02-Sep-14	Q10	Quechulac	47	32	1509
02-Sep-14	Q11	Quechulac	42	32	1339
02-Sep-14	Q12	Quechulac	53	32	1707
02-Sep-14	Q13	Quechulac	51	32	1637
02-Sep-14	Q14	Quechulac	50	32	1611

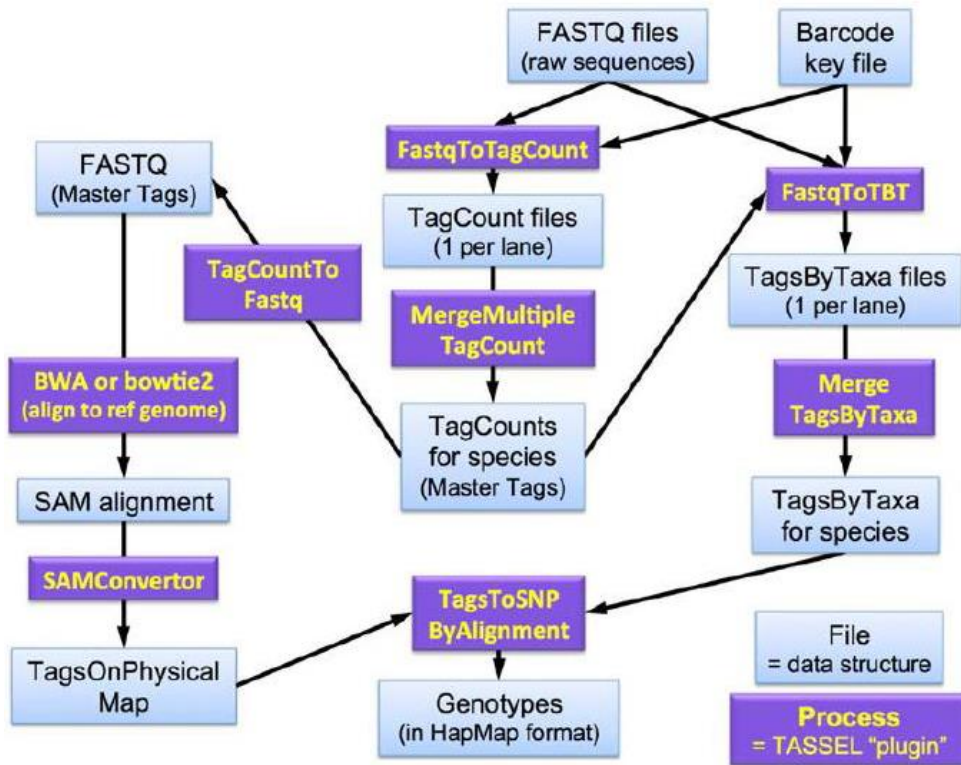


Figura 1. Diagrama de flujo del análisis de GBS (elaborado por la Dra. Katie Hyma).

Se localizó la cantidad de 220,092,014 sitios o tags a lo largo de los sitios que fueron cortados por la enzima de restricción. A partir de estos sitios se generaron lecturas de secuencias de 64 pb. De la información filtrada se obtuvieron 1,915 SNPs correspondientes a 53 “individuos” de cuatro poblaciones (*i.e.* Atexcac = 20; El Carmen = 13; La Preciosa = 8; Quechulac = 12). Del total anterior, se identificaron 42 SNPs sujetos a selección o atípicos y 1,873 neutrales. Los valores de Heterocigocidad observada (H_o) y diversidad nucleotídica (π) para los 1,915 SNPs se indican en la Tabla 2.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Tabla 2. Valores de Heterocigidad observada (H_o) y diversidad nucleotídica (π) obtenidos de los 1,915 SNPs de individuos de *L. grupo sicilis* de la Cuenca Oriental.

Población	H_o	π
Atexcac	0.4061	0.3610
El Carmen	0.3300	0.3250
La Preciosa	0.3053	0.3297
Quechulac	0.3689	0.3551

En la figura 2 se muestra graficada la Heterocigidad observada (H_o) para cada población.

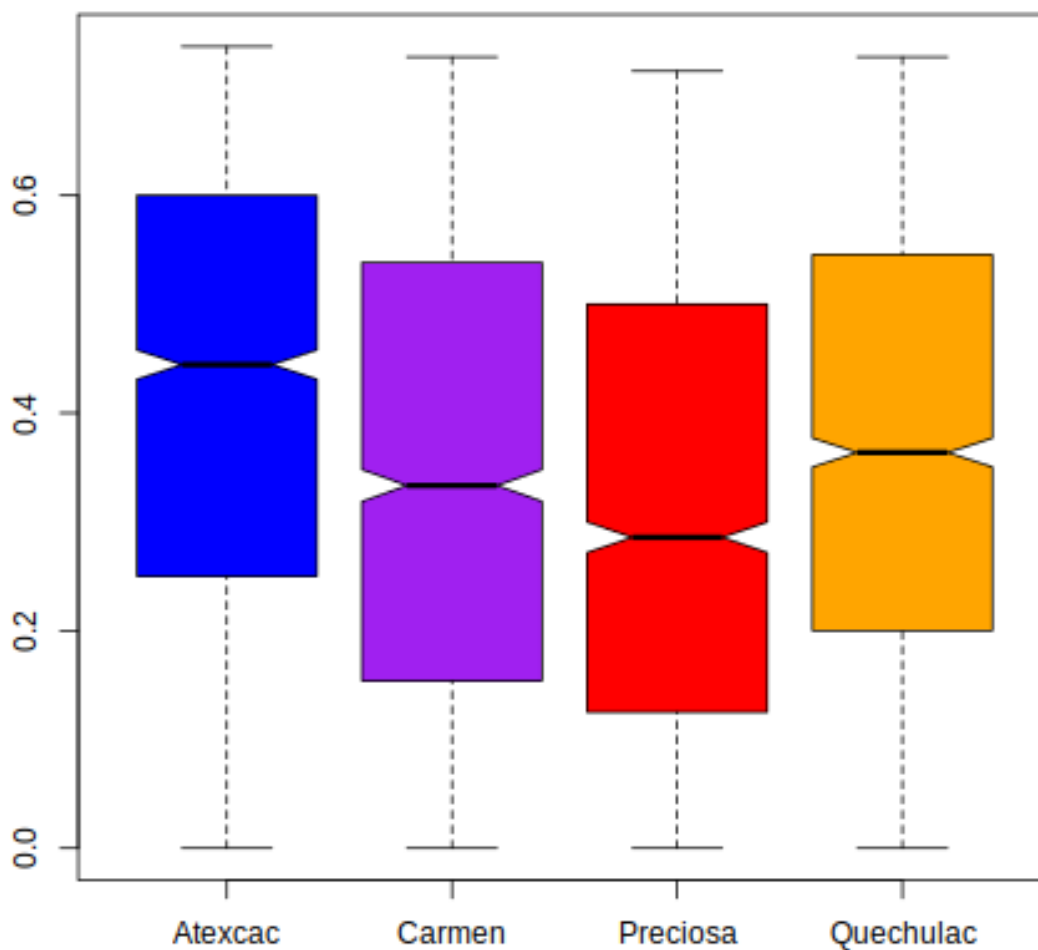


Fig 2. Diagrama de cajas y bigotes de la Heterocigidad observada (H_o) entre las poblaciones de *L. grupo sicilis* de la Cuenca Oriental. Se analizaron los 1,915 obtenidos. La línea gruesa indica el valor de la media.

Por su parte, considerando los SNPs totales, así como los neutrales y atípicos, los valores del índice F_{ST} general para cada cruce posible (Tabla 3) indican una mayor diferenciación entre las poblaciones de Atexcac y El Carmen ($F_{ST} = 0.0947$) y un valor menor entre La Preciosa y Quechulac ($F_{ST} = 0.0185$). Valores mayores a 0.2 indican un flujo genético altamente restringido entre poblaciones, como se observa en los resultados de los F_{ST} atípicos, mientras que los datos de F_{ST} de marcadores neutrales son menores.

Tabla 3. Valores de divergencia genética (F_{ST}) entre los 1,915 SNPs obtenidos a partir de individuos de *L. sicilis* de la Cuenca Oriental.

Cruce	# Atípicos	F_{ST}	F_{ST} Neutrales	F_{ST} Atípicos
# Total de individuos	42	0.0603	0.0562	0.2407
Atexcac vs. El Carmen	10	0.0947	0.0932	0.3738
Atexcac vs. Preciosa	5	0.0430	0.0425	0.2488
Atexcac vs. Quechulac	11	0.0467	0.0457	0.2104
El Carmen vs. Preciosa	9	0.0677	0.0664	0.3262
El Carmen vs. Quechulac	5	0.0587	0.0582	0.2353
Preciosa vs. Quechulac	0	0.0185	0.0185	NA

El AMOVA generada con los SNPs neutrales mostró una mayor variación dentro de las poblaciones (86.77%) y un valor menor entre las mismas (13.23%). El *p value* simulado fue de 0.00099. En el caso de los marcadores atípicos, los valores tuvieron un patrón contrario, con una menor variación dentro de las poblaciones (77.75%) y un valor mayor entre ellas (22.26%). Se realizó una prueba Montecarlo con 14.43614 observaciones, basada en 1,000 réplicas. Por su parte, para los marcadores neutrales, el análisis discriminante de componentes principales (DAPC) señala un número óptimo de cuatro componentes, determinando que las muestras forman cuatro grupos (Fig. 3a). En el caso de los marcadores atípicos, el análisis indica un valor óptimo de dos componentes (Fig. 3b). En la Figura 4 se observa la probabilidad, por separado (4a marcadores neutrales; 4b marcadores atípicos), de pertenencia a cada uno población. Finalmente, en la Figura 5 se muestra un gráfico de dispersión del DACP con la información de cada tipo de marcador. Las tres figuras anteriores se generaron con la información de los 1,873 SNPs neutrales y los 42 marcadores sujetos a selección.

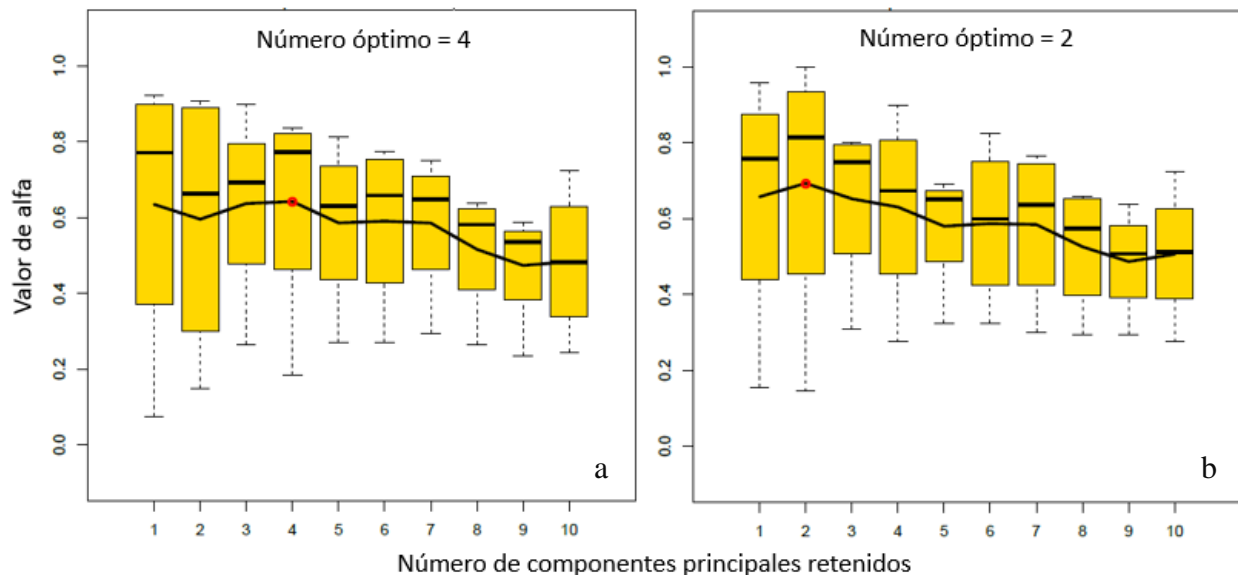


Figura 3. Análisis discriminante de componentes principales (DACP) para a) marcadores neutrales y b) marcadores atípicos. El punto rojo en la curva señala el número óptimo de componentes o grupos.

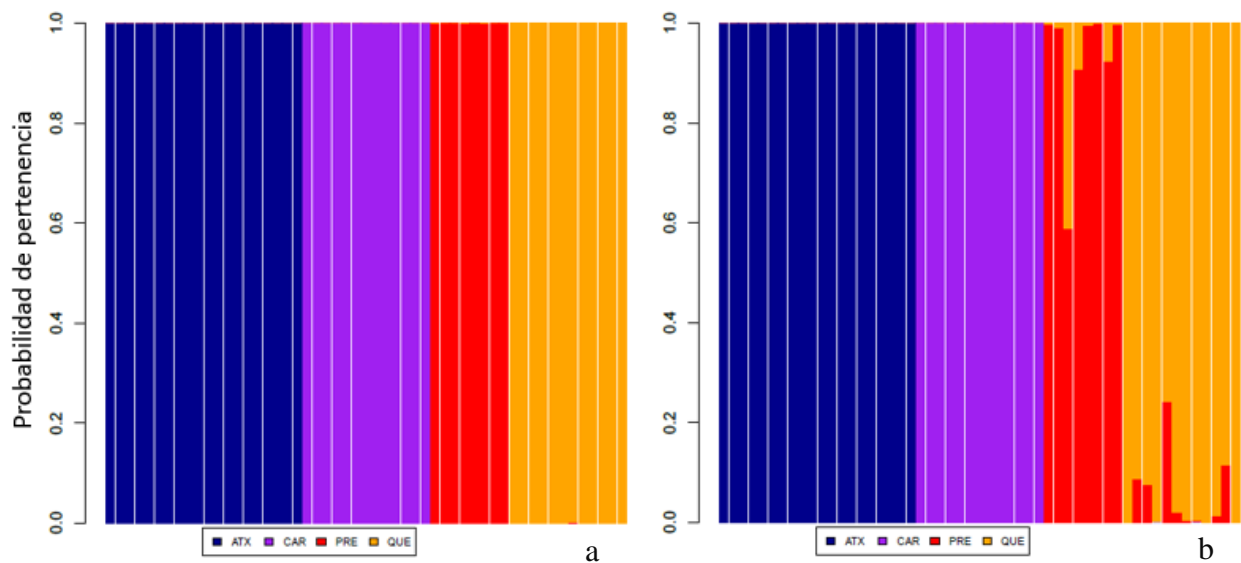


Figura 4. Probabilidad de pertenencia a un grupo (población) de acuerdo a los marcadores neutrales (a) y atípicos (b). Cada barra corresponde a un individuo. Los colores representan una población diferente: azul = Atexcac; morado = El Carmen; rojo = La Preciosa; amarillo = Quechulac.

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

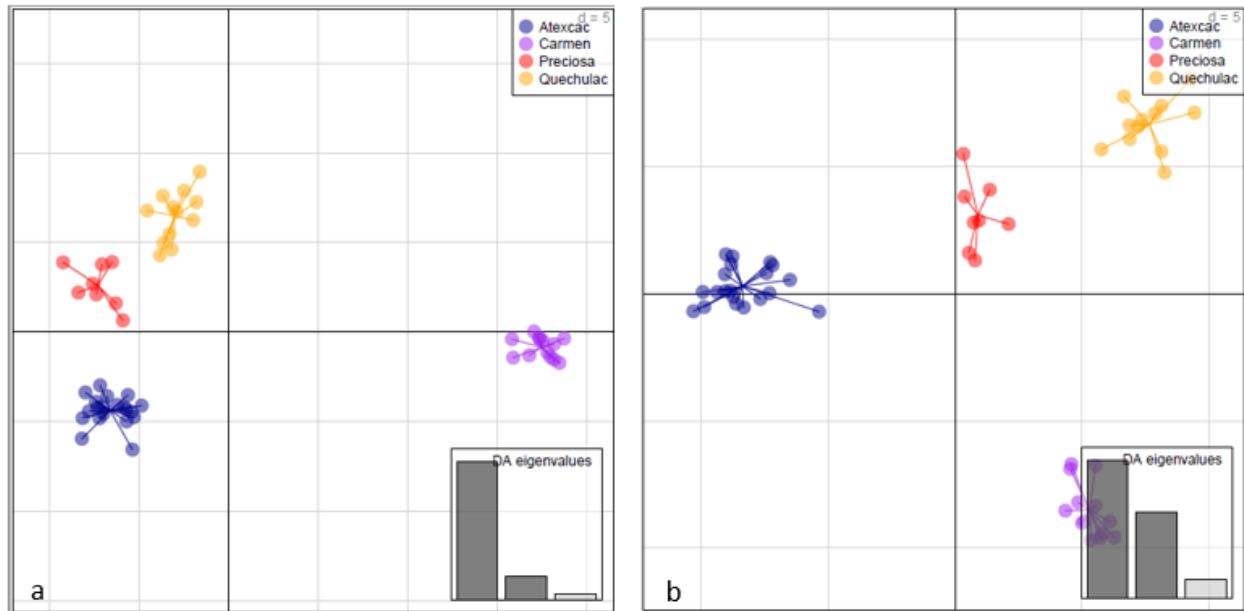


Figura 5. Gráfico de dispersión del análisis discriminante de componentes principales (DACP) para ambos tipos de marcadores: a) neutrales; b) atípicos. Los puntos representan a cada individuo. Las líneas representan la probabilidad de pertenencia a cada población predeterminada: azul = Atexcac; morado = El Carmen; rojo = La Preciosa; amarillo = Quechulac.

Por su parte, los árboles de divergencias genéticas generados también con ambos tipos de marcadores (Fig. 6), muestran patrones diferentes. En el caso de los marcadores neutrales, se observa una distancia más cercana entre los individuos de La Preciosa y Quechulac, los cuales forman parte de un mismo clado, aunque con algunos organismos de Atexcac dentro del clado mencionado. En el caso del árbol generado con los marcadores sujetos a selección, se muestra una separación entre cada clado (población), sobre todo, se observa que los copépodos de Atexcac forman un grupo monofilético separado de las otras poblaciones, en las que se mantiene una estrecha relación entre La Preciosa y Quechulac.

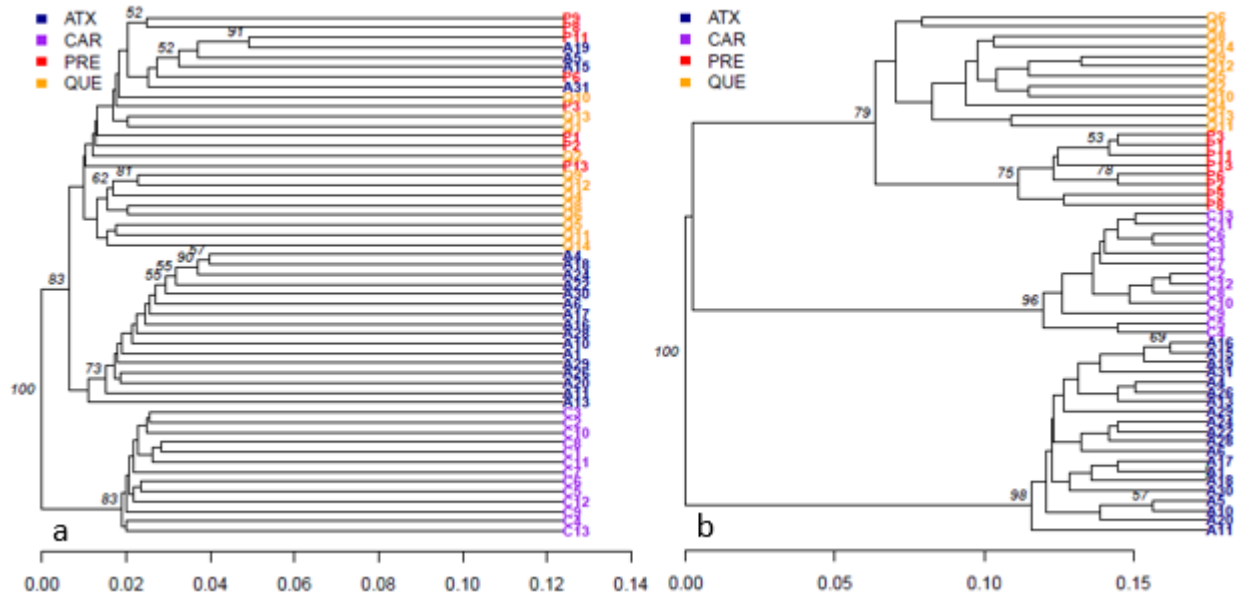


Figura 6. Árboles de distancias genéticas (proporción de sitios distintos) generados mediante el método de vecino más cercano. Se indican los resultados para: a) marcadores neutrales; b) marcadores atípicos. Los valores mostrados en cada clado corresponden al valor de probabilidad (10,000 réplicas) para las secuencias de individuos de *Leptodiptomus* grupo *sicilis* de la Cuenca Oriental. La barra horizontal indica la distancia genética (porporción de loci diferentes). Los colores indican la población a la que pertenece cada individuo: azul = Atexcac; morado = El Carmen; rojo = La Preciosa; amarillo = Quechulac.

Por último, para la reconstrucción filogenética con inferencia bayesiana (Fig. 7) utilizando los 1915 SNPs, se eliminaron los datos pertenecientes a cinco muestras (A5, A15, A19, C1, P11) las cuales aportaban información confusa para el algoritmo utilizado ya que contenían una cantidad de Ns mayor al 10% en su secuencia. En el cladograma obtenido no se observa una estructura clara entre los diferentes clados formados.

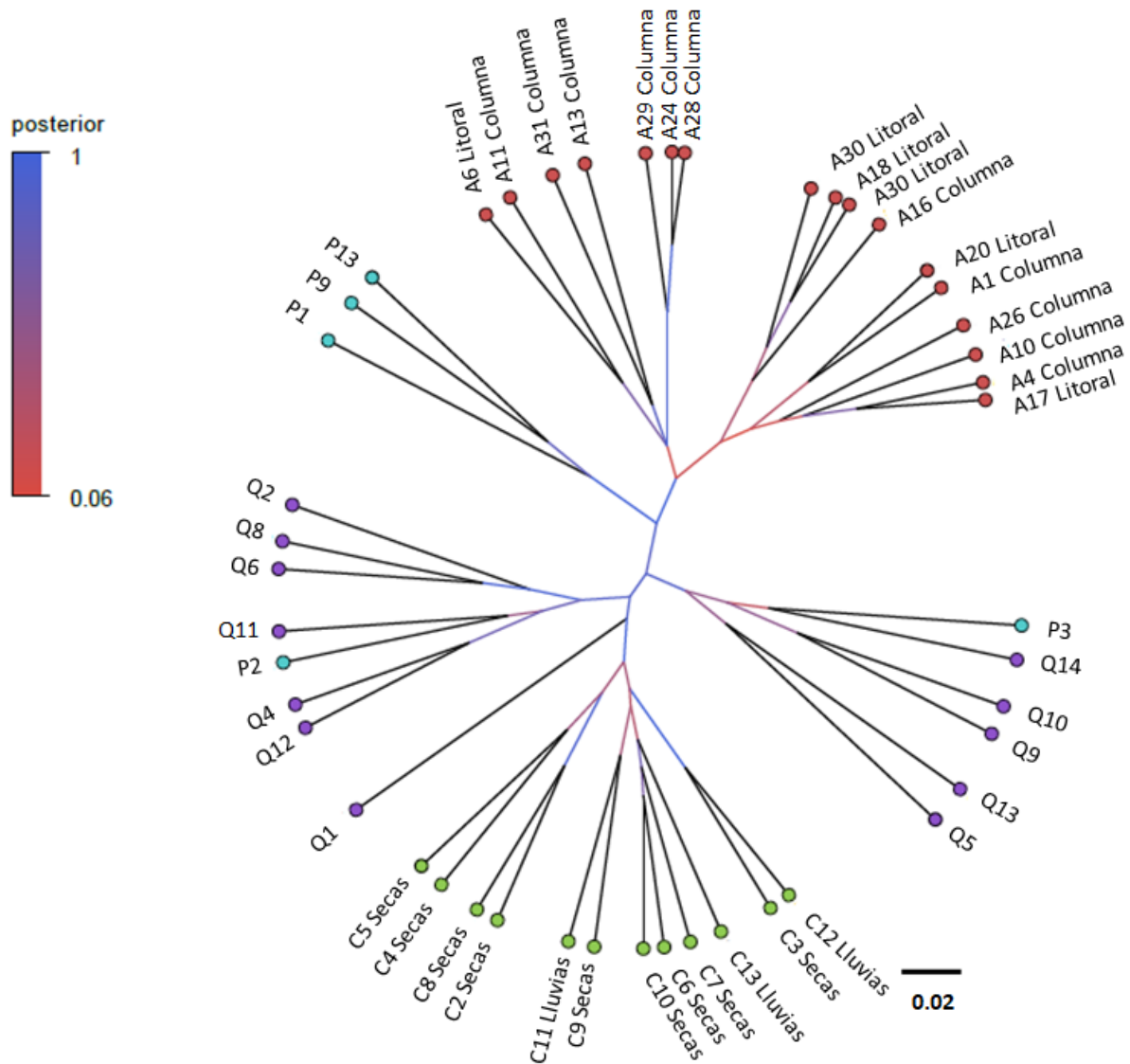


Figura 7. Árbol de máxima credibilidad de las relaciones filogenéticas de los copépodos *L. grupo sicilis* generado a partir de los 1,915 marcadores identificados. Los colores en las ramas terminales indican la población de cada secuencia: rojo = Atexcac; morado = Quechulac; azul = La Preciosa; verde = Quechulac. El color de la rama y nodo indican el valor de la probabilidad posterior (MCMC) considerando la escala izquierda. La barra de escala horizontal indica la cantidad de sustituciones esperadas por sitio.

Discusión

El desarrollo acelerado de nuevas técnicas de secuenciación y herramientas bioinformáticas, capaces de identificar un conjunto cada vez mayor de marcadores genéticos o polimorfismos a lo largo del genoma de un individuo, y entre individuos de las poblaciones, ha permitido que preguntas sobre genética de poblaciones, ecología genética y procesos evolutivos, que hasta hace un par de décadas parecían imposibles de resolver o aclarar, ahora puedan analizarse casi con cualquier especie, en especial con aquellas que no cuentan con datos genómicos previos (Davey *et al.*, 2011). En especial, la metodología de GBS permite la genotipificación de un gran número de individuos de diferentes poblaciones y la detección de una gran cantidad de SNPs de una manera relativamente sencilla y a un costo más accesible que otras técnicas por lo que ha sido utilizada en diferentes especies (Glaubitz *et al.*, 2014; Tarazona *et al.*, 2019).

En nuestro caso, la obtención de un gran número de SNPs a partir del genoma fragmentado de cada conjunto de individuos y el análisis de su patrón de distribución dentro y entre las distintas poblaciones, nos permitió determinar la estructura genética de las mismas y obtener información acerca del flujo genético. En otros taxones analizados con GBS -plantas en su mayoría-, los resultados han facilitado el estudio de especies con altos índices de diversidad genética o genomas muy grandes, con lo que se pueden tomar decisiones en cuanto a la selección genómica (en plantas) para programas de mejoramiento (Lu *et al.*, 2013), reconstruir la historia filogeográfica de un linaje o la conservación de especies altamente diversas y con estructura de sus poblaciones (Elshire *et al.*, 2011), así como la determinación del grado de migración o aislamiento genético entre poblaciones (Tabima *et al.*, 2018) o la variación fenotípica en respuesta a diferentes ambientes (Tarazona *et al.*, 2019). De la misma manera, los copépodos de la Cuenca Oriental, en especial *L.* grupo *sicilis*, pueden ser un buen modelo de estudio para generar propuestas de conservación de los lagos que habitan, considerando la diversidad genética que existe entre sus poblaciones y los procesos de diversificación recientes que la han generado.

Considerando las diferentes condiciones ambientales (*i.e.*, conductividad, presencia/ausencia de depredadores, radiación UV, etc.) en las que se encuentran las poblaciones analizadas en cada lago que habitan, los loci teóricamente sujetos a selección podrían dar información acerca de los genes ligados a alguna característica ambiental. Sin embargo, el

tamaño de los fragmentos donde se localizan (65 pb), así como la falta de información para comparar esas secuencias con un genoma de referencia o con organismos similares, impidieron utilizarlos en la reconstrucción filogenética. De manera ideal, la técnica de GBS requiere que cada muestra secuenciada pertenezca a un solo individuo. En nuestro caso, al no contar con el material genético por organismo en la cantidad suficiente, se generaron muestras a partir de la extracción de ADN de veinte copépodos, lo que debió tener una repercusión en la cantidad de sitios de corte que no fueron detectados por la enzima de restricción, la calidad de las secuencias obtenidas y en el número de SNPs detectados, impidiendo de esta manera, la posibilidad de contar con información detallada sobre las diferencias individuales que tendría cada organismo incluido en la muestra. Si bien hay herramientas que permiten trabajar con especies que no cuentan con un genoma de referencia (*i.e.*, UNEAK, véase Lu *et al.*, 2013) y programas que capaces de procesar de manera eficiente los datos e identificar los polimorfismos (*i.e.*, Tassel, véase Glaubitz *et al.*, 2014), es posible que esta situación haya generado pérdida de información a nivel fino, con una gran cantidad de SNPs útiles como marcadores tanto neutrales como sujetos a selección que no fueron detectados, en especial estos últimos. Es importante señalar que una limitación en este tipo de estudios es la de contar con un muestreo suficiente de individuos (y de su material genómico) que represente la variación genómica dentro y entre las poblaciones (De la Harpe *et al.*, 2017), como ocurrió con nuestro análisis.

El análisis de la estructura poblacional en cada lago, descrita en términos de su divergencia genética con el estadístico F_{ST} , indica que, considerando solamente los marcadores neutrales, entre las poblaciones persiste la posibilidad de intercambio genético de manera natural (F_{ST} : 0.01-0.09); sin embargo, al tomar en cuenta los marcadores atípicos, los valores mostrados son mayores (F_{ST} : 0.21-0.37), lo que coincide con los resultados obtenidos con el gen COI para estas mismas poblaciones como se señala en el Capítulo 3 (Barrera *et al.*, 2015), donde se sugiere que no existe flujo genético reciente. Hay que recordar que, un valor de F_{ST} cercano a 0 significa que las frecuencias alélicas entre las poblaciones son similares y se asume que no hay diferenciación; por su parte, un valor de 1 indica que en cada población se fijaron diferentes alelos. Como se observa en los resultados, entre cada par de poblaciones existen diferencias, observándose que los copépodos de Quechulac y La Preciosa son genéticamente más relacionados, habitando además lagos geográficamente cercanos y con características ecológicas

similares (*i.e.*, baja salinidad, presencia de depredadores, disponibilidad de alimento). Por su parte, el análisis molecular de varianza (AMOVA), utilizado para cuantificar la diversidad genética, revela una variación intrapoblacional mayor en el caso de los marcadores neutrales, como se observó también con el gen COI (Capítulo 4), pero con un resultado contrario (mayor varianza intrapoblacional) en los marcadores atípicos. Los elevados niveles de varianza intrapoblacional en los marcadores neutrales indican que las poblaciones no muestran estructura poblacional y que dentro de cada población hay una gran diversidad. Por su parte, los valores mayores de varianza interpoblacional mostrados por los marcadores atípicos indican que en la Cuenca Oriental tenemos un conjunto de poblaciones que no son panmícticas, con una marcada estructura genética entre ellas. Sin embargo, como se observa en el agrupamiento generado por el DAPC para ambos tipos de marcadores, cada uno de los individuos analizados tiene una gran probabilidad de pertenecer a su población nativa por lo que, si bien las poblaciones no muestran una estructura genética (en el caso de los marcadores neutrales), hay diferencias que permiten distinguir a los individuos de cada lago y establecer relaciones entre las poblaciones.

Además, la posibilidad de flujo genético interpoblacional según los valores bajos de F_{ST} en los marcadores neutrales, parece estar restringida actualmente en la naturaleza gracias a los factores ecológicos presentes en cada cuerpo de agua, los cuales actúan como una barrera efectiva contra el establecimiento de posibles nuevos migrantes a un lago ajeno al que no están adaptados, sobre todo los copépodos provenientes de lagos profundos y estables. Lo anterior se puede comprobar con los resultados de F_{st} (<0.2) que muestran los marcadores atípicos, que puede ser explicado por la inviabilidad de los migrantes y la posterior adaptación local en las poblaciones de cada lago. De esta manera, los análisis anteriores nos permiten considerar al flujo genético interpoblacional como un mecanismo que permitiría generar barreras reproductivo de tipo precigóticas, que serían eficaces para separar linajes relacionados ancestralmente y establecer variantes diferentes en cada lago, así como una estructura genética bien definida.

Por su parte, en el análisis de las distancias genéticas, la longitud de cada rama indica qué tan similares son dos secuencias tomando en cuenta el número de sustituciones por sitio. Así, una rama larga representa un número mayor de sustituciones y, por lo tanto, una distancia genética mayor entre dos secuencias (Tabima *et al.*, 2017). De esta manera, en el árbol generado se

observa que los organismos de La Preciosa y Quechulac son más cercanos y a su vez se relacionan en mayor medida con los provenientes de Atexcac, mientras que los copépodos de El Carmen, el lago somero, conforman una población genéticamente más alejada que conforma un conjunto bien separado. Hablando sobre los procesos de colonización y dispersión que han ocurrido en estas poblaciones, es posible considerar que, tomando en cuenta que los organismos de El Carmen muestran un fenotipo generalista capaz de sobrevivir bajo presiones ambientales diferentes (Barrera *et al.*, 2015), se puede hipotetizar que este lago sea la población ancestral (dentro de la Cuenca Oriental) de la que derivaron las demás. Las poblaciones de los lagos profundos, catalogadas como especialistas por su poca tolerancia a los cambios ambientales (en especial la salinidad) y baja capacidad de migrar, pudieron originarse cuando diferentes variedades genéticas colonizaron estos lagos en eventos posteriores, los cuales incluyeron procesos de adaptación local y como indican nuestros resultados, una disminución del flujo genético interpoblacional y la fijación de algunas variantes genéticas particulares a cada lago.

Es importante señalar que los resultados obtenidos mediante el análisis de las distancias genéticas con el método del vecino más cercano no deben ser utilizados para inferir una filogenia pues el dendograma obtenido no refleja relaciones evolutivas sino solamente el grado de similitud entre las secuencias (Peña, 2011). A diferencia de este, la reconstrucción filogenética utilizando inferencia bayesiana permite manejar grandes conjuntos de datos, elegir diferentes modelos evolutivos y detectar la huella de la selección natural en las secuencias de ADN (Huelsenbeck *et al.*, 2001). En nuestro caso, el análisis con este método con los 1,915 marcadores obtenidos, tanto neutrales como sujetos a selección, produjo un cladograma de consenso que no muestra un agrupamiento claro entre los diferentes clados observados. A partir de este análisis, se puede decir que las poblaciones de *L. grupo sicilis* no tienen una estructura poblacional relacionada con el lago al que pertenecen o la salinidad a la que se desarrollan. A pesar de esto, se observa que las cuatro poblaciones tienen un grado bajo de mezcla entre ellas, especialmente las poblaciones de El Carmen y Atexcac. Por su parte, hay una mayor cantidad de genotipos compartidos entre los copépodos de los lagos La Preciosa y Quechulac, los cuales, como ya se ha mencionado, presentan condiciones ambientales similares, como es la presencia de peces-depredadores y sobre todo, una baja salinidad (1.1 gL^{-1} y 0.5 gL^{-1} , respectivamente), por lo que es posible que ambas poblaciones se hayan mantenido durante más tiempo cohesionadas, sin

embargo, como se ha comentado, nuestros resultados indican que en la actualidad el flujo genético no se presenta y cada población ha llevado su historia evolutiva por separado.

Por otra parte, tampoco se observa un patrón de agrupamiento espacial entre individuos de litoral/columna de agua (p. ej., en Atexcac) o en el caso del lago somero, un patrón temporal entre genotipos provenientes de la temporada de lluvias o de secas, por lo que no se identificaron variantes genéticas características a las diferentes condiciones ambientales. Si bien los resultados indican una alta probabilidad de pertenencia de los individuos a su respectiva población, es posible que, debido a que las muestras de las que se extrajo el ADN no pertenecían a un solo individuo sino a veinte, exista información útil que no se pudo obtener, lo que afectó en cierta medida la calidad de las secuencias así como la cantidad de SNPs detectados y, por supuesto, la reconstrucción filogenética a un nivel más fino. Sin embargo, el uso de nuevas técnicas para amplificar el ADN de este tipo de organismos pequeños, así como el ensamblaje de un genoma de referencia generado partir del material genético de individuos del taxón estudiado, han permitido resolver en parte esta problemática, generando resultados de una mejor calidad que concuerdan en gran parte con los de este trabajo (véase, Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2022).

Podemos concluir que el uso de los marcadores altamente polimórficos obtenidos a partir de la técnica de GBS permite inferir procesos evolutivamente recientes, especialmente en taxones sin un genoma de referencia como ocurre con estos copépodos epicontinentales. Al contar con diferentes especies de copépodos -tanto calanoides como ciclopoideas- en el mismo conjunto de lagos, es ideal generar un genoma de referencia que sirva para identificar aún mejor los sitios polimórficos en individuos de la misma especie y de taxones cercanos. En el caso estudiado, se observa que las poblaciones de *L.* grupo *sicilis* no muestran una estructura genética bien definida, lo cual puede explicarse en parte por la calidad del material genético y las secuencias obtenidas a partir de muestras provenientes de diferentes organismos y no de manera individual. Sin embargo, las diferencias genéticas entre las poblaciones implican un flujo genético débil en la actualidad, quizá como consecuencia de las tasas de dispersión bajas y la persistencia de eventos fundadores como se ha podido comprobar con estudios más recientes utilizando a individuos de las mismas poblaciones y una mayor cantidad de información genómica (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2022). De esta manera, como se ha señalado en los capítulos anteriores, la distribución insular

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

y en especial la salinidad particular de cada lago, han generado una selección importante de genotipos en las poblaciones, formando barreras geográficas y sobre todo ecológicas que impiden actualmente el flujo genético de manera natural entre ellas, aislando las distintas variantes a su lago de origen, en especial las que se distribuyen en los lagos profundos y poco variables.

Es importante señalar que la reconstrucción de las relaciones de parentesco y flujo genético entre estos organismos, obtenida en nuestro caso a partir del genoma y la gran cantidad de polimorfismos detectados en él, tiene la capacidad de combinarse y beneficiarse mutuamente con otras aproximaciones más clásicas como la morfología, etología o fisiología (Taylor y Friesen, 2012), con el fin de comprender de una manera completa los mecanismos evolutivos y ecológicos que han ocurrido en estos copépodos y otros habitantes del zooplancton epicontinental con patrones de diversificación similares. En el caso de *L. grupo sicilis*, los resultados obtenidos con GBS sumados a las diferentes aproximaciones desarrolladas en el Capítulo 3, permiten corroborar que el aislamiento reproductivo y genético es debido a la divergencia fenotípica adaptativa y no necesariamente a la distancia geográfica (Seeholzen y Brumfield, 2018). Así, se puede concluir que las poblaciones estudiadas están bajo un claro proceso de especiación ecológica en el que se cuenta con cuatro linajes dentro de la Cuenca Oriental: uno en el lago salino Atexcac, otro en el lago episódico El Carmen, y dos más habitando por separado La Preciosa y Quechulac, ambos lagos con condiciones de baja salinidad.

CAPÍTULO VI

Discusión y Conclusiones generales

La Cuenca Oriental cuenta con una serie de cuerpos de agua con características históricas en común, especialmente los lagos playa. En general, los lagos de la cuenca muestran condiciones ecológicas particulares y un conjunto único de taxones del zooplancton que nos han permitido estudiar las repercusiones de algunos procesos de diversificación sobre estos organismos microscópicos. El análisis *in situ* y en laboratorio de la capacidad de dispersión mediante estructuras de resistencia u organismos juveniles o adultos, de la presencia de barreras geográficas y ecológicas, del flujo génico inter e intrapoblacional y la identificación de la estructura genética de las poblaciones, así como la evidencia de procesos de diversificación biológica, parecen comprobar que estos ambientes con distribución insular es un escenario ideal con el potencial de responder preguntas a patrones generales de cómo ocurre la diversificación de los seres vivos, como ha sucedido con otras islas como las Galápagos o el archipiélago hawaiano. Lo mismo ocurre con los copépodos, organismos poco carismáticos que podrían estar al mismo nivel de *Drosophila melanogaster*, la rata de laboratorio y otras especies utilizadas en infinidad de experimentos que han abierto muchas puertas del conocimiento biológico.

Los copépodos, al igual que todos los individuos que forman parte de una especie biológica, se distribuyen espacial y temporalmente formando poblaciones, definidas como conjuntos que habitan áreas geográficas particulares y que se mantienen aislados hasta cierto grado entre sí (Morrone y Escalante, 2009). Si un conjunto de poblaciones de la misma especie muestra un aislamiento mínimo, manteniéndose interconectadas por procesos de flujo génico mediante la migración de algunos de sus individuos, se comportarán como una metapoblación. De esta manera, se tendrían diferentes posibilidades en cuanto al arreglo de cada especie: a) sus poblaciones locales se agrupan en metapoblaciones; b) solo existe una población de la especie, posiblemente endémica a la Cuenca Oriental; o c) sus poblaciones se mantienen aisladas completamente entre sí, presentando procesos de diferenciación o extinción independientes (López-Pérez y Becerril-Morales, 1999).

Por su parte, en un nivel de interacción interespecífico, se encuentran las comunidades, caracterizadas por los individuos de todas las poblaciones (*i.e.*, especies) que interactúan dentro de una localidad (Leibold *et al.* 2004; Mejía-Domínguez *et al.*, 2020). Si la capacidad de dispersión de al menos un grupo de individuos es significativa entre comunidades locales (*i.e.*, lagos), se podría aplicar el concepto de metacomunidad, que se refiere al conjunto de comunidades locales conectadas como una gran red espacial a través de la dispersión de algunas especies que las componen y que cuentan con el potencial de interactuar entre sí (Leibold *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2022). Para entender los procesos que ocurren en un sistema con tales características, se han descrito cuatro patrones generales de funcionamiento de las metacomunidades: (1) ordenamiento de especies, (2) dinámica de parches, (3) efecto de masa y (4) dinámica neutral; con estos patrones se pretenden dilucidar las posibles interacciones entre los taxones y el funcionamiento de los sistemas a nivel local y regional, haciendo énfasis en la capacidad de dispersión y colonización de los organismos (Leibold y Geddes, 2005, Mejía-Domínguez *et al.*, 2020).

En el sistema conformado por los lagos de la Cuenca Oriental, es posible introducir los conceptos de metapoblación y metacomunidad para tratar de dilucidar los patrones existentes entre las poblaciones de copépodos. En nuestro caso, los calanoides y ciclopoideos cuentan con diferentes especies distribuidas en el área de estudio, cada una de ellas con características (*i.e.*, talla, color, hábitos, capacidad de dispersión) particulares. Al utilizar algunas especies de estos organismos zooplantónicos como un modelo de estudio, podemos dilucidar si sus poblaciones: 1) se comportan como unidades separadas tanto geográfica como genéticamente entre sí, con una baja o mala dispersión por medio de las estructuras de resistencia e incapaces de colonizar lagos con condiciones abióticas distintas y sujetos a patrones de adaptación local a su lago de origen, como ocurre con las poblaciones de *Leptodiptomus* grupo *sicilis*; o bien, 2) si alguna o algunas de las especies se estructuran como metapoblaciones, reflejo de que sus estructuras de resistencia son capaces de dispersarse adecuadamente e invadir eventualmente otros cuerpos de agua y que el flujo génico interpoblacional se mantiene entre los lagos; situación en la que podrían encontrarse las poblaciones de ambos linajes de *Mastigodiptomus* o 3) que diversos taxones distribuidos en la Cuenca Oriental presentan flujo genético importante entre diversos lagos, situación que parece no ocurrir en la zona de estudio, como se describe a continuación.

En cuanto al posible patrón de metacomunidades, parece ser que los habitantes de los lagos profundos se ajustarían a un funcionamiento más cercano al denominado “ordenamiento de especies” (*species sorting*; Liebold *et al.*, 2004), en el que el flujo genético entre poblaciones vecinas de las especies clave está restringido, en gran medida por la baja capacidad de dispersión y la divergencia en las condiciones ecológicas entre cuerpos de agua relativamente cercanos, lo que ocasionaría la persistencia de efectos fundadores y el establecimiento de genotipos particulares a cada lago. De esta manera, la dinámica de las comunidades locales (parches; Mejía-Domínguez *et al.*, 2020) presentes en los lagos profundos -con una variación notable en la salinidad entre ellos-, se ve influenciada en mayor medida por procesos locales como las interacciones ecológicas que por factores que actúan a escala regional, como de dispersión de los organismos independientemente de su talla o estrategia (pasiva o activa) para trasladarse (Gálvez *et al.*, 2022). Sin embargo, es notorio que el mayor flujo genético que pudiera ocurrir en la Cuenca Oriental sería entre las comunidades que habitan los lagos playa de El Carmen y Tepeyahualco, ambos de características ambientales muy similares, pues son efímeros, someros y estuvieron conectados formando un lago ancestral hace algunos miles de años. Lo anterior sugiere un patrón de “dinámica neutral”, con una riqueza de especies en cada parche (lago) resultado del balance estocástico entre colonización y extinción. Con esto se explicaría la presencia de varias especies compartiendo esa distribución, pues cada una de ellas se mantiene en equilibrio ecológico común, así como una capacidad de dispersión, adecuación y habilidad competitiva similares (Mejía-Domínguez *et al.*, 2020).

Después de revisar cada uno de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos, es posible determinar que, en el caso de las 19 especies identificadas, 12 se distribuyen en uno o dos lagos de la Cuenca. Por su parte, *Mastigodiptomus* cf. *albuquerqueensis* es el taxón con la distribución más amplia, encontrándose en El Carmen, Tepeyahualco, Aljojuca, Quechulac y Tecuitlapa. Si bien nuestros análisis determinaron la presencia de al menos dos linajes diferentes, que habitan en simpatria en El Carmen y Tepeyahualco. En el caso del linaje denominado *Mastigodiptomus* “Oriental”, el cual se encuentra en los cinco lagos señalados, es posible pensar que forma una metapoblación mediada por el flujo genético constante entre sus poblaciones pues se tiene la presencia de varios haplotipos compartidos entre lagos. Lo mismo ocurre con el linaje

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Mastigodiptomus denominado “Faja”, que además de encontrarse en los dos lagos señalados, también se distribuye en otros cuerpos de agua del centro del país, formando, en principio, una metapoblación con alta capacidad de dispersarse y mantener flujo genético entre sus poblaciones, especialmente entre El Carmen, Tepeyahualco y Flor del Bosque, Puebla. Este linaje también se distribuye en el lago de Tecocomulco, Hidalgo y en Cuitzeo, Michoacán, teniendo evidencia de que en este último sitio se encuentra en simpatría con *M. patzcuarensis*.

Para *Acanthocyclops*, los resultados de divergencia genética indican que la población de Alchichica pertenece a la especie *A. robustus*. Por otro lado, una parte de la población de Tepeyahualco coincide genéticamente con *A. americanus*, una especie distribuida ampliamente y originaria de Norte América la cual es considerada como invasora en Europa y Asia (Alekseev y Sukhikh, 2022). Caso contrario al otro conjunto de ejemplares que se también se encuentran en Tepeyahualco y en El Carmen, cuyas divergencias genéticas nos han permitido separarlo de las otras especies del mismo género y aquí se ha denominado como *Acanthocyclops* “Cuenca”.

Por su parte, *Leptodiptomus* grupo *sicilis* está formada por poblaciones que genéticamente forman una misma unidad, pero en la práctica, de manera natural muestran una baja capacidad de dispersión, así como un flujo genético limitado en la actualidad, como indican los resultados derivados del análisis con marcadores altamente polimórficos (GBS). Este patrón se observa sobre todo entre los individuos de las poblaciones de lagos profundos con condiciones contrastantes de salinidad (*i.e.* Atexcac vs La Preciosa o Quechulac), lo que nos lleva a considerarlos como entidades distintas (unidades evolutivas independientes; de Queiroz, 2007), derivadas de un proceso de especiación ecológica (Rundle y Nosil, 2005; Nosil, 2012). En el caso de las poblaciones de La Preciosa y Quechulac, que viven bajo condiciones similares de salinidad, la divergencia genética es menor, debido posiblemente a que el tiempo de separación de estos linajes a partir de un ancestro en común es relativamente más reciente. En El Carmen, también se encontraría un linaje separado, pero de tipo generalista, con la capacidad de tolerar cambios ambientales pero, de la misma manera, con flujo genético restringido con las otras poblaciones.

Finalmente, los lagos de la Cuenca Oriental actúan como islas, separadas por la distancia geográfica pero, sobre todo, por las condiciones ecológicas contrastantes, en especial la salinidad de cada lago, lo cual ha permitido el establecimiento de una gran cantidad de especies de copépodos calanoides y ciclopoideas en los distintos cuerpos de agua. Por otro lado, mediante la limitación del flujo genético natural entre poblaciones, estas características ambientales han tenido un papel importante en la colonización y el establecimiento de variantes genéticas particulares en los distintos cuerpos de agua donde se distribuye cada especie. Consideramos que la evidencia obtenida con el uso de marcadores moleculares altamente polimórficos nos permite determinar –a pesar de no contar con un genoma de referencia- procesos evolutivos recientes, a escala ecológica, que han actuado sobre las poblaciones de *L.* grupo *sicilis*, lo que puede permitirnos extrapolar estas explicaciones a otras especies de copépodos en particular y del zooplancton en general.

Conclusiones finales

1. El estudio de la riqueza taxonómica de copépodos (Copepoda: Calanoida, Cyclopoida) distribuidos en ocho lagos de la Cuenca Oriental señala que en esta área se distribuyen 19 morfoespecies: tres de Diaptomidae y 14 de Cyclopidae.
2. El análisis de la diversidad genética de las poblaciones de tres especies de copépodos (*i.e.*, *Leptodiaptomus* grupo *sicilis*, *Mastigodiaptomus* cf. *albuquerqueensis* y *Acanthocyclops* grupo *robustus-vernalis*), utilizando como base las divergencias en las secuencias de un gen de tasa mutacional relativamente lenta (COI) permitió identificar variantes genéticas (*i.e.*, *M.* “Faja”, *M.* “Oriental” y *A.* “Seco”) que correspondan a entidades biológicas no descritas, por lo que es necesario realizar estudios morfológicos detallados, así como reproductivos y ecológicos para comprobarlo.

3. La divergencia fenotípica adaptativa a las condiciones de salinidad en cada lago, más que la separación debida a la distancia geográfica, es el factor más importante para generar diferencias genéticas, reproductivas y ecofisiológicas entre las poblaciones de *L. grupo sicilis*, en las que se han originado variantes fenotípicas adaptadas localmente a los lagos con alta o baja salinidad, principalmente.
4. El análisis de la estructura genética de *Leptodiptomus* grupo *sicilis* por medio de marcadores altamente poliomórficos (GBS) permitió inferir que la baja capacidad de dispersión y la persistencia de efectos fundadores han reducido el flujo génico intrapoblacional, concluyendo que cada una de las cuatro poblaciones corresponden a linajes que han evolucionado de manera independiente inmersas en un proceso de especiación ecológica, por lo que es posible considerarlas como especies distintas.
5. El conjunto de análisis acerca de la diversidad de copépodos calanoides y ciclopoides distribuidos en la Cuenca Oriental, México, con énfasis en algunas especies seleccionadas, nos permitió inferir diferentes procesos (*i.e.*, adaptación local, efectos fundadores, flujo genético reducido a nivel interpoblacional, barreras reproductivas derivadas de adaptaciones a condiciones ecológicas), que han generado, a partir de su colonización, un patrón de diversidad genética y taxonómica alta a nivel regional en estos organismos del zooplancton epicontinental.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Planter, E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología molecular*. SEMARNAT, México. pp. 49-61.
- Alcántara-Rodríguez, J.A., J. Ciros-Pérez, E. Ortega-Mayagoitia, C. Serranía-Soto y E. Piedra-Ibarra. 2012. Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater-lakes in Central Mexico. *Freshwat. Biol.* 57(4):728-740.
- 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 de Doctorado (Ciencias Biológicas). UNAM. 142 pp.
- Alcocer, J., A. Lugo, S. Estrada, M. Ubeda y E. Escobar. 1993. La macrofauna bentónica de los axalapazos mexicanos. *Actas del VI Congreso Español de Limnología*. 33:409-415.
- Alcocer J., A. Lugo, E. Escobar, M.R. Sánchez y G. Vilaclara. 2000. Water column stratification and its implications in the tropical, warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Verhandlungeng Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 27:3166–3169.
- Alcocer, J., O.A. Escolero y L.E. Marín. 2004. Problemática del agua de la Cuenca Oriental, Estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. En B. Jiménez y L. Marín (Eds.), *El agua en México vista desde la academia*. Academia Mexicana de Ciencias, México, D.F. p. 57-77.
- Alcocer, J., A. Lugo, L. A. Oseguera y L. Peralta. 2007. Laguna de Totolcingo, Puebla y Tlaxcala. En G. de la Lanza-Espino (Comp.), *Las aguas interiores de México. Conceptos y casos*. AGT Editor, S.A., México, D.F. p. 185-198.
- Alcocer, J. (ed.). 2019. Lago Alchichica: Una joya de biodiversidad. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 244 p.
- Alekseev, V. y N. Sukhikh. 2022. Copepod cryptic species as aquatic invaders. *Limnol. Freshwat. Biol.* 5(1645-1655).
- Allen, M. R. 2007. Measuring and modeling dispersal of adult zooplankton. *Oecologia* 153:135-143.
- Álvarez, J. 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* VI (1-4): 81-107.
- Armienta, M. A., G. Vilaclara, S. De la Cruz-Reyna, S. Ramos, N. Ceniceros, et al. 2008. Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican Volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178:249-258.
- Arredondo, J.L. 1995. Los axalapazos de la Cuenca Oriental, Puebla. En: De la Lanza-Espino, G. y J. L. García-Calderón. *Lagos y Presas de México*. Centro de Ecología y Desarrollo. México, D. F. pp. 65-87.
- Arriaga, L., V. Aguilar, y J. Alcocer. 2002. *Aguas continentales y diversidad biológica de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

- Barrera-Moreno, O. 2010. *Análisis de las poblaciones de los copépodos Leptodiptomus cf. sicilis (Copepoda: Calanoida) en los lagos de la Cuenca Oriental, México*. Tesis de Maestría (Limnología). Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 66 p.
- Barrera-Moreno, O., J. Ciro-Pérez, E. Ortega-Mayagoitia, A. Alcántara-Rodríguez y E. Piedra-Ibarra. 2015. From local adaptation to ecological speciation in copepod populations from neighboring lakes. *PLoS ONE* 10(4): e0125524.
- Barrera-Sánchez, E. 2016. *Diversificación críptica en ambientes ecológicos contrastantes: Análisis de la posible especiación ecológica en poblaciones del copépodo Leptodiptomus cf. sicilis*. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Benestan, L.M., A.L. Ferchaud, P.A. Hohenlohe, B. A. Garner, G.J.P. Naylor, *et al.* 2016. Conservation genomics of natural and managed populations: building a conceptual and practical framework. *Mol. Ecol.* 25(13), 2967–2977. doi: 10.1111/mec.13647.
- Bernot, J.P., G.A. Boxshall y K.A. Crandall. 2021. A synthesis tree of the Copepoda: integrating phylogenetic and taxonomic data reveals multiple origins of parasitism. *PeerJ* 9e:12034 doi:10.7717/peerj.12034.
- Bickford, D., D.J. Lohman, N.S. Sodhi, P.K.L. Ng, R. Meier, K. Winker, K.K. Ingram e I. Das. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22(3):148-155.
- Blaxter, M., J. Mann, T. Chapman, F. Thomas, *et al.* 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360:935–1943.
- Bohonak, A.J. y D.G. Jenkins. 2003. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecol. Letters.* 6:783-796.
- BOLD Systems. 2017. *Barcode of Data Systems v. 2.5*. www.boldsystems.org.
- Botello, A. y F. Álvarez. 2010. Genetic variation in the stygobitic shrimp *Creaseria morleyi* (Decapoda: Palaemonidae), evidence of bottlenecks and re-invasions in the Yucatan Peninsula. *Biol. J. Linn. Soc.* 99:315–325.
- Bouckaert, R. y J. Heled. 2014. DensiTree 2: Seeing Trees Through the Forest. *bioRxiv*. doi: 10.1101/012401.
- Boxshall, G.A. y D. Defaye. 2008. Global diversity of copepods (Crustacea:Copepoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:195-207.
- Bradbury, P.J. Z. Zhang, D. E. Kroon, T.M. Casstevens, Y. Ramdoss y E.S. Buckler. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23(19): 2633-2635.
- Bucklin, A., S. Kaartvedt, M. Guarnieri y U. Goswami. 2000. Population genetics of drifting (*Calanus* spp.) and resident (*Acartia clausi*) plankton in Norwegian fjords. *J. Plank. Res.* 22 (7):1237–1251.
- Caballero, M., G. Vilaclara, A. Rodríguez y D. Juárez. 2003. Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geof. Int.* 42(3): 529-537.

- Cardoso, A., A. Serrano y A.P. Vogler. 2009. Morphological and molecular variation in tiger beetles of the *Cicindela hybrida* complex: is an “integrative taxonomy” possible? *Mol. Ecol.* 18:648-664.
- Carrasco-Núñez, G., M.H. Ort y C. Romero. 2007. Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *J. Volcanol. Geothermal Res.* 159:179-197.
- Carrasco-Núñez, G. y M.H. Ort. 2012. Rhyolitic and basaltic maar volcanoes, a perspective from Mexican volcanism. *4th IMC Conference*. Nueva Zelanda. p. 21-23.
- Carrasco-Núñez, G. 2019. Origen y formación del cráter. En: Alcocer, J. (ed.). Lago Alchichica: *Una joya de biodiversidad*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp 19-32.
- Chapman, A. D. 2009. *Numbers of living species in Australia and the world*. 2ª ed. Department of the Environment, Australian Government. ©Commonwealth of Australia. 80 pp.
- Chen, Y.Z., W.A. Deng, J.M. Wang, L.L. Lin y S.Y. Zhou. 2018. Phylogenetic relationships of Scelemininae genera (Orthoptera: Tetrigoidea) based on COI, 16S rRNA and 18S rRNA gene sequences. *Zootaxa* 4482(2): 392-400.
- Ciros-Pérez, J., M.J. Carmona y M. Serra. 2001. Resource competition between sympatric sibling rotifer species. *Limnol. Oceanogr.* 46(6):1511-1523.
- Clement M., D. Posada y K.A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9 (10):1657-1660.
- Ciros-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E. y J. Alcocer. 2015. The role of ecophysiological and behavioral traits in structuring the zooplankton assemblage in a deep, oligotrophic, tropical lake. *Limnology and Oceanography* 60:2158-2172.
- Cordero, C. y J. Llorente-Bousquets. 2000. Los Arthropoda de México: algunas comparaciones. En J. Llorente-Bousquets, E. González y N. Papavero (Eds.), *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México*, Vol. II. UNAM, México, D.F. p. 171-190.
- Dahms, H. U. y C. H. Fernando. 1997. Redescription of *Acanthocyclops brevispinosus* (Herrick, 1884) (Copepoda, Cyclopoida) from Ontario. *Crustaceana* 70(2):129-144.
- Damasco, G., D. C. Daly, A. Vicentini, P.V.A. Fine. 2019. Reestablishment of *Protium cordatum* (Burseraceae) based on integrative taxonomy. *Taxon* doi: 10.1002/tax12022.
- Danecek, P., A. Auton, G. Abecasis, C.A. Albers, E. Banks, M.A. DePristo, R. Handsaker, G. Lunter, G. Marth, S.T. Sherry, G. McVean, R. Durbin y 1000 Genomes Project Analysis Group. 2011. The Variant Call Format and VCFtools. *Bioinformatics* 27(15): 2156–2158.
- Davey, J.W., P.A. Hohenlohe, P.D. Etter, J.Q. Boone, J.M. Catchen y M.L. Blaxter. 2011. Genome-wide genetic marker Discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 12: 499–510.
- Davies, S.J., S.E. Metcalfe, M.E. Caballero y S. Juggins. 2002. Developing diatom-based transfer functions for Central Mexican lakes. *Hydrobiologia* 467:199–213.
- Declerck, S., C. Cousyn y L. De Meester. 2001. Evidence for local adaptation in neighbouring *Daphnia* populations: a laboratory transplant experiment. *Freshwat. Biol.* 46:187–198.

- De la Harpe, M., M. Paris, D. N. Karger, J. Rolland, M. Kessler, N. Salamin y C. Lexer. 2017. Molecular ecology studies of species radiations: current research gaps, opportunities and challenges. *Molec. Ecol.* 26: 2608–2622
- De Meester, L., A. Gómez, B. Okamura y K. Schwenk. 2002. The Monopolization Hypothesis and the dispersal gene-flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecol.* 23:121-135.
- De Mendoza, G., M. Ventura y J. Catalan. 2015. Environmental factors prevail over dispersal constraints in determining the distribution and assembly of Trichoptera species in mountain lakes. *Ecol & Evolution* 5(13):1518-2532.
- De Queiroz. 2007. Species Concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56(6):879–886.
- De Rojas, M., J.M. Úbeda, C. Cutillas, M.D. Mora, C. Ariza y D. Guevara. 2007. Utility of ITS1–5.8S–ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the *Rhinonyssus coniventris* species complex (Acari: Rhinonyssidae). *Parasitol. Res.* 100:1041–1046.
- Dodson, S. 1992. Predicting Crustacean Zooplankton Species Richness. *Limnol. Ocean.* 37(4):848-856.
- Dodson, S. 1994. Morphological analysis of Wisconsin (USA) species of *Acanthocyclops vernalis* group (Copepoda: Cyclopoida). *Journal of Crustacean Biology* 14(1):113-131.
- Dodson, S.I., A.K. Grishanin, K. Gross y G.A. Wyngaard. 2003. Morphological analysis of some cryptic species in the *Acanthocyclops vernalis* species complex from North America. *Hydrobiologia* 500:131-143.
- Dussart, B. y D. Defaye. 2001. *Introduction to Copepoda*, 2ª ed. Backhuys Publishers, Leiden, Holanda. 344 p.
- Edmans, S. y J.S. Harrison. 2003. Molecular and quantitative trait variation within and among populations of the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution* 57(10): 2277-2285.
- Elías-Gutiérrez, M., E. Suárez-Morales y B. Romano-Márquez. 1999. A new species of *Leptodiaptomus* (Copepoda, Diaptomidae) from Northwestern Mexico with comments on the distribution of the genus. *J. Plankton Res.* 21:603-614.
- Elías-Gutiérrez, M. y M.E. Valdez-Moreno. 2008. Códigos de barras, una alternativa para estudiar la biodiversidad. *Cienc. Desarro.* Abril: 60-67.
- Elías-Gutiérrez, M., F. Martínez-Jerónimo, N. V. Ivanova, M. Valdez-Moreno y P. D. N. Hebert. 2008a. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa* 1839:1-42.
- Elías-Gutiérrez, M., E. Suárez-Morales, M.A. Gutiérrez-Aguirre, M. Silva-Briano, J.G. Granados-Ramírez y T. Garfias-Espejo. 2008b. *Cladocera y Copepoda de las aguas continentales de México*. UNAM, México, D.F. 322 p.
- Elías-Gutiérrez, M. y C. Varela. 2009. An annotated checklist of the Cladocera of Cuba. *Crustaceana* 82 (11):1353-1364.
- Elshire, R.J., J.C. Glaubitz, Q. Sun, J.A. Poland, K. Kawamoto, E.S. Buckler y S.E. Mitchell. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6(5): e19379.

- Emerson, K.J., C.R. Merz, J.M. Catchen, P.A. Hohenlohe, W.A. Cresko, W.E. Bradshaw y C.M. Holzapfel. 2010. Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *PNAS* 107(37): 16196-16200.
- Escalante, T., G. Rodríguez, N. Gámez, L. León, O. Barrera y V. Sánchez-Cordero. 2007. Biogeografía y conservación de los mamíferos. En: Luna, I., J.J. Morrone y D. Espinosa (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*. UNAM, México. pp. 485-502.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. (2006). *Arlequin v.3.11: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis*. Computational and Molecular Population Genetics Laboratory, University of Berne, Switzerland.
- Fiers, F., V. Ghenne y E. Suárez-Morales. 2000. New species of continental cyclopoid copepods (Crustacea, Cyclopoida) from the Yucatán peninsula, Mexico. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 35(3):209-251.
- Flores-Villela, O. y A. G. Navarro-Sigüenza. 1993. Un Análisis de los Vertebrados Terrestres Endémicos de Mesoamérica en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* XLIV (Especial):387-395.
- Foissner, W. 2006. Biogeography and Dispersal of Micro-organisms: A Review Emphasizing Protists. *Acta Protozool.* 45:111-136.
- Foll, M. y O.E. Gaggiotti. 2008. A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* 180: 977-993.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3:294-299.
- Franch-Gras, L., C. Hahn, E.M. García-Roger, M.J. Carmona, M. Serra y A. Gómez. 2018. Genomic signatures of local adaptation to the degree of environmental predictability in rotifers. *Scientific Reports*, 8(1), 16051. doi: 10.1038/s41598-018-34188-y.
- Frisch, D., A. Arechederra y A.J. Green. 2009. Recolonisation potential of zooplankton propagule banks in natural and agriculturally modified sections of a semiarid temporary stream (Doñana, Southwest Spain). *Hydrobiologia* 624:115-123.
- Gabaldón, C.M. Serra, M.J. Carmona y J. Montero-Pau. 2015. Life-history traits, abiotic environment and coexistence: The case of two cryptic rotifer species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 465:142-152.
- Gálvez, Á., P.R. Peres-Neto, A. Castillo-Escrivà, F. Bonilla, A. Camacho, E.M. García-Roger *et al.* 2023. Inconsistent response of taxonomic groups to space and environment in mediterranean and tropical pond metacommunities. *Ecology* 104(1): e3835.
- Galindo-Leal, C. 2019. El archipiélago de los axalapazcos. En: Alcocer, J. (ed.). *Lago Alchichica: Una joya de biodiversidad*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 244 p.
- García-Madrigal, M. del S., J.L. Villalobos-Hiriart, F. Álvarez y R. Bastida-Zavala. 2012. Estado del conocimiento de los crustáceos de México. *Ciencia y Mar* XVI (46):43-62.

- Glaubitz, J. C., T. M. Casstevens, F. Lu, J. Harriman, R.J. Elshire *et al.* 2014. TASSEL-GBS: A High Capacity Genotyping by Sequencing Analysis Pipeline. *PLoS ONE* 9(2): e90346.
- Glaw, F., J. Köhler, I. De la Riva, D.R. Vieites y M. Vences. 2010. Integrative taxonomy of Malagasy treefrogs: combination of molecular genetics, bioacoustics and comparative morphology reveals 12 additional species of *Boophis*. *Zootaxa* 2383:1-82.
- Goetze, E. 2010. Species discovery in marine plankton invertebrates through global molecular screening. *Mol. Ecol.* 19:952-967.
- Goetze, E. y M.D. Ohman. 2010. Integrated molecular and morphological biogeography of the calanoid copepod family Eucalanidae. *Deep Sea Res. Part 2* 57:2110-2129.
- Grishanin, A.K., E.M. Rasch, S.I. Dodson y G.A. Wyngaard. 2006. Genetic architecture of the cryptic species complex of *acanthocyclops vernalis* (crustacea: copepoda). II. Crossbreeding experiments, cytogenetics, and a model of chromosomal evolution. *Evolution* 60(2):247-256.
- Gutiérrez-Aguirre, M.A. y A. Cervantes-Martínez. 2013. Diversity of freshwater copepods (Maxillopoda:Copepoda:Calanoida,Ciclopoida) from Chiapas, Mexico with description of *Mastigodiptomus suarezmoralesi* sp. nov. *Journal of Natural History* 47:5-12, 479-498.
- Gutiérrez-Aguirre, M., A. Cervantes-Martínez y M. Elías-Gutierrez. 2013. An Example of How Barcodes Can Clarify Cryptic Species: The Case of the Calanoid Copepod *Mastigodiptomus albuquerquensis* (Herrick). *PLoS ONE* 9:e85019.
- Gutiérrez-Aguirre, M., A. Cervantes-Martínez y M. Elías-Gutierrez. 2014. An Example of How Barcodes Can Clarify Cryptic Species: The Case of the Calanoid Copepod *Mastigodiptomus albuquerquensis* (Herrick). *PLoS ONE* 9:e85019.
- Gutiérrez-Aguirre, M. y A. Cervantes-Martínez. 2016. A new species of *Mastigodiptomus* Light, 1939 from Mexico, with notes of species diversity of the genus (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae). *ZooKeys* 637: 61–79. doi: 10.3897/zookeys.637.10276
- Gutiérrez-Aguirre, M., A. Cervantes-Martínez, M. Elías-Gutierrez y A. Lugo Vázquez. 2020. Remarks on *Mastigodiptomus* (Calanoida: Diaptomidae) from Mexico using integrative taxonomy, with a key of identification and three new species. *PeerJ* 8:e8416. doi: 10.7717/peerj.8416.
- Hairston, N.G. 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol Oceanogr.* 41(5): 1087-1092.
- Hajibabaei, M., M.A. Smith, D.H. Janzen, J.J. Rodriguez, J.B. Whitfield y P.D.N. Hebert. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol.* 6(4):959-964.
- Harrison, J.S., D.L. Peterson, J.R. Swain y S. Edmands. 2004. Microsatellite DNA markers for the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. *Mol. Ecol. Notes* 4:736-738.
- Hartl, D.L. 2020. *A primer of population genetics and genomics*. (4th ed.) Oxford, UK. Oxford University Press.
- Hernández-Trujillo, S. y G.M. Esqueda-Escárcega. 2002. La diversidad de copépodos marinos en México. *Océánides* 17(1):57-68.

- Hessen, D.O., T.C. Jensen, B. Walseng. 2019. Zooplankton Diversity and Dispersal by Birds; Insights from Different Geographic Scales. *Front. Ecol. Evol.* 7(74) doi: 10.3389/fevo.2019.00074.
- Hoelzel, A.R., y A. Green. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. En: A.R. Hoelzel, (ed.). *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford Univ. Press. pp. 159–187.
- Hohenlohe, P.A., S. Bassaham, P.D. Etter, N. Stiffler, E.A. Johnson y W. A. Cresko. 2010. Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD Tags. *PLoS Genet.* 6(2): e1000862.
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist, R. Nielsen, J. P. Bollback. 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science* 294(5550): 2310-2314.
- IUCN. 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. V.2014.3. <http://www.iucnredlist.org>; última consulta 13.I.2015.
- Kamvar, Z.N., J.F. Tabima y N.J. Grünwald. 2014. *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2: e281.
- Karanovic, T. y M. Krajicek. 2012. When antropogenic traslocation meets cryptic speciation globalized bouillon originates: molecular variability of the cosmopolitan freshwater cyclopoid *Macrocyclops albidus* (Crustacea: Copepoda). *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* 48(1): 63-80. doi:10.1051/limn/2011061.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16 :111-120.
- Kioutsoglou, A., A. Kaliontzopoulou, D. Poursanidis, D. Jablonski, P. Lumberakis y N. Poulakakis. 2021. Evidence of cryptic diversity in *Podarcis peloponnesiacus* and re-evaluation of its current taxonomy; insights from genetic, morphological, and ecological data. *J. Zool. Syst. & Evol. Res.* 59(8): 2350-2370.
- Knowlton, N. (1993). Sibling species in the sea. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24:189-216.
- Knowlton, N. y L.A. Weigt. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 265:2257-2263.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz y K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 35:1547-1549.
- Lanteri, A.A. y V.A. Confalonieri, 2003. Filogeografía: Objetivos, Métodos y Ejemplos. En: Morrone, J.J. y J. Llorente-Bousquets (eds.). *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. UNAM. México, D.F. pp. 185-193.
- Lara-Lara, J.R., J.A. Arreola-Lizárraga, L.E. Calderón Aguilera, V.F. Camacho-Ibar, G. de la Lanza-Espino, et al. 2008. Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales. En *Capital natural de México, Vol. 1: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO. México, D.F. p. 109-134.
- Lee, C.E. 2000. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate “populations”. *Evolution* 54:2014-2027.
- Lee, M.S.Y. 2003. Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *J. Evol. Biol.*

16(2):179-188.

- Leibold, M.A., M. Holyoak, N. Mouquet, P. Amarasekare, J.M. Chase, M.F. Hoopes, R.D. Holt, J.B. Shurin, R. Law, D. Tilman, M. Loreau y A. González. 2004. The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecol. Lett.* 7:601-613.
- Leibold, M.A. y P. Geddes. 2005. El concepto de nicho en las metacomunidades. *Ecol. Aus.* 15:117-129.
- Lemey, P., M. Salemi y A.M. Vandamme (eds). 2009. The phylogenetic handbook. 2nd ed. Cambridge University Press, New York. 721 pp.
- Librado P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Llorente-Bousquets, J. y S. Ocegueda. 2008. Estado del conocimiento de la biota. En *Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, D.F. p. 283-322.
- Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaria, D. Baltimore y J. Darnell. 1996. *Molecular Cell Biology CD-ROM*. 3^a ed. W.H. Freeman & Co. and Sumanas Inc.
- López-Pérez, R.A. y F. Becerril-Morales. 1999. ¿Meta...qué? ¡Metapoblación!. *Ciencia y Mar*. 9: 29-35.
- Lu, F., A.E. Lipka, J. Glaubitz, R. Elshire, J.H. Cherney *et al.* 2013. Switchgrass Genomic Diversity, Ploidy, and Evolution: Novel Insights from a Network-Based SNP Discovery Protocol. *PLoS Genet.* 9(1): e1003215.
- Macek, M., G. Vilaclara y A. Lugo. 1994. Changes in protozoan assemblage structure and activity in a stratified tropical lake. *Mar. Microb. Food Webs.* 8:235-249.
- Martínez-Chávez, M. 2010. *Efecto de cladóceros y copépodos sobre el fitoplancton del lago la Preciosa, Puebla*. Tesis de Maestría (Limnología). Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. 74 pp.
- Matzen da Silva, J., S. Creer, A. dos Santos, A.C. Costa, M. R. Cunha, F.O. Costa, G.R. Carvalho. 2011. Systematic and Evolutionary Insights Derived from mtDNA COI Barcode Diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). *PLoS ONE* 6(5): e19449. doi:10.1371/journal.pone.0019449.
- McAleece, N., J. D. G. Gage, P. J. D. Lamshead y G. L. J. Paterson. 1997. *BioDiversity Professional statistics software*. <http://www.sams.ac.uk/peter-lamont/biodiversity-pro>.
- Mejía-Domínguez, N.R., L.M. Ochoa-Ochoa y J.A. Velasco. 2020. Dinámica de metacomunidades en sistemas fragmentados. *Ciencia* 71(4):11-17.
- Mercado, N., E. Suárez-Morales y M. Silva-Briano. 2006. A New *Acanthocyclops* KIEFER, 1927 (Copepoda: Cyclopoida) from Central Mexico with Comments on the Distribution of the Genus in Middle America. *International review of hydrobiology* 91(2):148-163.
- Mercado-Salas, N.F., E. Suárez-Morales y M. Silva-Briano. 2009. Two new species of *Acanthocyclops* Kiefer, 1927 (Copepoda:Cyclopoida:Cyclopinae) with pilosa caudal rami from semiarid areas of Mexico. *Zoological studies* 48(3):380-393.
- Mercado-Salas, N.F. y E. Suárez-Morales. 2011. Morfología, diversidad y distribución de los Cyclopoida (Copepoda) de las zonas áridas del centro-norte de México. I. Cyclopinae.

Hidrobiológica 21(1):1-25.

- Mercado-Salas, N. F. y E. Suárez-Morales. 2012. Morfología, diversidad y distribución de los Cyclopoida (Copepoda) de zonas áridas del centro-norte de México. II. Eucyclopinae y análisis biogeográfico. *Hidrobiológica* 22(2):99-124.
- Mercado-Salas, N. F., C. Álvarez-Silva. 2013. A new *Acanthocyclops* Kiefer, 1927 (Cyclopoida, Cyclopinae) from an ecological reserve in Mexico City. *Journal of Natural History* doi:10.1080/00222933.2012.742589.
- Mirabdullayev I.M. y D. Defaye. 2002. On the taxonomy of the *Acanthocyclops robustus* species complex (Copepoda Cyclopidae). 1. *Acanthocyclops robustus* (G. O. Sars, 1863) and *Acanthocyclops trajani* n. sp. *Selevinia* 1(4):7–20.
- Mirabdullayev, I.M. y D. Defaye. 2004. On the taxonomy of the *Acanthocyclops robustus* species complex (Copepoda, Cyclopidae): *Acanthocyclops brevispinus* and *A. einslei* sp. n. *Vestn. Zool.* 38(5):27-37.
- Miracle, M.R., V. Alekseev, V. Monchenko, V. Sentandreu y E. Vicente. 2013. Molecular-genetic-based contribution to the taxonomy of the *Acanthocyclops robustus* group. *J. Nat. Hist.* doi:10.1080/00222933.2012.744432.
- Mittelbach, G.G y D.W. Schemske. 2015. Ecological and evolutionary perspectives on community assembly. *Trends in Ecology and Evolution* 30: 241-247.
- Montero-Pau, J., A. Gómez y J. Muñoz. 2008. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnol. Oceanog.: Methods* 6:218-222.
- Montiel-Martínez, A., J. Ciro-Pérez, E. Ortega-Mayagoitia y M. Elías-Gutiérrez. 2008. Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiptomus garciai* (Osorio-Tafall, 1942) as a valid endemic species. *J. Plankton Res.* 30(10):1079-1093.
- Mora, C., D. P. Titterton, S. Adl, A. G. B. Simpson, B. Worm, 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol.* 9(8): e1001127.
- Morrone, J.J. y T. Escalante. 2009. Diccionario de Biogeografía. UNAM, México, 230 pp.
- Nicolalde-Morejón, F., J. González-Astorga, F. Vergara-Silva y A.P. Vovides. 2011. Perspectivas sistemáticas de *Zamia* (Zamiaceae) en Megaméxico: de la taxonomía alfa a los códigos de barras genéticos. *Rev. Mex. Biodiv.* 82:341-355.
- Nosil, P. 2012. *Ecological Speciation*. Oxford University Press, U.S.A, 279 pp.
- Ortega-Mayagoitia E., J. Ciro-Pérez y M. Sánchez-Martínez. 2011. A story of famine in the pelagic realm: temporal and spatial patterns of food limitation in rotifers an oligotrophic tropical lake. *Journal of Plankton Research* 33(10):1574-1585.
- Ortega-Mayagoitia, E., J.A. Alcántara-Rodríguez, J. Urbán-Olivares, J.E. Campos and J. Ciro-Pérez. 2022. Genomic signatures of adaptive divergence in lacustrine copepods. *Freshwater Biol.* 67(6): 1045-1062. doi: 10.1111/fwb.13900.
- Pachal, M. 2007. The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics* 23: 509-510.
- Padial, J.M. e I. de la Riva. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 155:97-122.

- Pante, E., C. Schoelinck y N. Puillandre. 2015. From Integrative Taxonomy to Species Description: One Step Beyond. *System. Biol.* 64(1): 152-160.
- Peña, C. Métodos de inferencia filogenética. 2011. *Rev. peru. biol.* 18(2): 265 – 267.
- Pires, A.C. y Marinoni, L. 2010. União entre DNA barcoding e taxonomia tradicional através da Taxonomia Integrativa: uma visão que contesta o debate questionando uma ou outra metodologia. *Biota Neotrop.* 10(2):339-346.
- Posada D., K.A. Crandall y A.R. Templeton. (2000). GeoDis: a program for the cladistic analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* 9:487-488.
- Posada, D. 2006. *Collapse: Describing haplotypes from sequence alignments.* v. 1.2. Available at: <http://darwin.uvigo.es/software/collapse.html>.
- Posada, D. y A.R. Templeton. 2008. *Inference key for the nested haplotype tree analysis of geographical distances.* Available at: <http://darwin.uvigo.es/>.
- Provan, J., G.E. Beatty, C.A. Maggs y G. Savidge. 2007. Expressed sequence tag-derived microsatellites for the cool-water marine copepod *Calanus finmarchicus*. *Molec. Ecol. Notes* 7:1369-1371.
- Puillandre, N., A. Lambert, S. Brouillet y G. Achaz. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21(8):1864-77.
- Rambaut, A. 2016. FigTree, Tree Figure Drawing Tool v.1.4.0. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).
- Rambaut, A. y A.J. Drummond. 2017. TreeAnnotator v1.10. (<http://beast.community/treeannotator>).
- Ratnasingham, S. y P. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinelife.org). *Mol. Ecol. Notes.* 10 pp.
- Reid, J. W. y E. Suárez-Morales. 1999. A new, Neotropical species of *Acanthocyclops* (Copepoda: Cyclopoida: Cyclopidae). *Beaufortia* 49(5):37-45.
- Reid, J.W. y C.E. Williamson. 2010. Copepoda. En J. H. Thorp y A. P. Covich (Eds.), *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. 3ª ed. Academic Press, Inc., San Diego. p. 829-899.
- Ruíz-Pérez, O. 2008. *Caracterización de diversas poblaciones de Artemia desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos y de sus patrones moleculares.* Tesis doctoral (Ciencias Biológicas). Universitat de Valencia, España. 232 pp.
- Rundle, H.D. y P. Nosil. 2005. Ecological speciation. *Ecol. Lett.* 8(3): 336-352.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Samchyshyna, L. y B. Santer. 2010. Chorion structure of diapause and subitaneous eggs of four diaptomid copepods (Calanoida, Diaptomidae): SEM observations. *Vestnik zool.* 44(3): e26-e32.
- Sarukhán, J., P. Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, et al. 2009. *Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad.* CONABIO, México, D.F. 100 p.

- Schick-Steriner, B. C., F. M. Steiner, B. Seinfert, C. Stauffer, E. Christian y R.H. Crozier. 2010. Integrative Taxonomy: A multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annu. Rev. Entomol.* 55:421-438.
- Seeholzer, G.F. y R.T. Brumfield. 2018. Isolation by distance, not incipient ecological speciation, explains genetic differentiation in an Andean songbird (Aves: Furnariidae: *Cranioleuca antisiensis*, Line-cheeked Spinetail) despite near threefold body size change across an environmental gradient. *Mol Ecol* 27:279–296.
- Selkoe, K.A. y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9: 615–629.
- SEMARNAT. 2010. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental, Especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, Lista de especies en riesgo*. Diario Oficial de la Federación, México.
- Seuront, L. y H.E. Stanley. 2014. Anomalous diffusion and multifractality enhance mating encounters in the ocean. *PNAS* 111(6):2206-2211.
- Sereda, S.V., P.V. Debes, T. Wilke y R. Schultheiß. 2016. Divergent mating system adaptations in microallopatric populations of *Acanthodiaptomus denticornis* (Copepoda, Calanoida), *J. Plankton Res.* 38: 1255–1268.
- Shurin, J.B., J.E. Havel, M.A. Leibold y B. Pinel-Alloul. 2000. Local and regional zooplankton species richness: a scale-independent test for saturation. *Ecology* 81(11):3062-3073.
- Silva, W.M. 2008. Diversity and distribution of the free-living freshwater Cyclopoida (Copepoda: Crustacea) in the Neotropics. *Brazilian Journal of Biology* 68(4):1099-1106.
- Silva-Briano, M. y E. Suárez-Morales. 2010. Illustrated record of the freshwater copepod *Leptodiaptomus dodsoni* (Calanoida, Diaptomidae) from central Mexico with comments on the distribution of the genus. *Biota Neotropica* 10(2):409-414.
- Struck, T.H., J.L. Feder, M. Bendiksbj, S. Birkeland, J. Cerca, *et al.* 2018. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecol. & Evol.* 33(3): 153-163.
- Suárez-Morales, E., J.W. Reid, T.M. Iliffe y F. Fiers. 1996. Catálogo de los copépodos (Crustacea) continentales de la península de Yucatán, México. CONABIO, El Colegio de la Frontera Sur, México. 296 pp.
- Suárez-Morales, E. 2000. Copépodos, seres ubicuos y poco conocidos. *CONABIO, Biodiversitas* 29:7-11.
- Suárez-Morales, E. y M. Elías-Gutiérrez. 2000: Two new *Mastigodiaptomus* (Copepoda, Diaptomidae) from southeastern Mexico, with a key for the identification of the known species of the genus. *J. Nat. Hist.* 34(5):693-708.
- Suárez-Morales, E., J.W. Reid y R. Gasca. 2000a. Copepoda. En J. Llorente-Bousquets, E. González y N. Papavero (Eds.). *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México, Vol. II*. UNAM, México, D.F. p. 171-190.
- Suárez-Morales, E., M. Silva-Briano, y M. Elías-Gutiérrez. 2000b. Redescription and taxonomic validity of *Leptodiaptomus cuauhquemoci* (Osorio-Tafall, 1941) (Copepoda, Calanoida), with notes on its known distribution. *Journal of Limnology* 59:5-14.

- Suárez-Morales, E., J.W. Reid y M. Elías-Gutiérrez. 2005. Diversity and Distributional Patterns of Neotropical Freshwater Copepods (Calanoida: Diaptomidae). *International Review of Hydrobiology* 90(1):71-83.
- Suárez-Morales, E., O. Barrera-Moreno y J. Ciro-Pérez. 2013. A new species of *Cletocamptus* Schmankewitsch, 1875 (Crustacea, Copepoda, Harpacticoida) from a high-altitude saline lake in central Mexico. *Journal of Limnology* 71(2):313-325.
- Suchard, M.A., P. Lemey, G. Baele, D.L. Ayres, A.J. Drummond y A. Rambaut. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 4(1): vey016.
- Tabima, J.F., B.J. Knaus y N.J. Grünwald. 2017. *GBS analysis*. En: Grünwald, N. J., Z. N. Kamvar, S. E. Everhart, J. F. Tabima y B. J. Knaus ©. *Population genetics and genomics in R*. Corvallis, Oregon, USA.
- Tabima, J.F., M.D. Coffey, I.A. Zazada y N.J. Grünwald. 2018. Populations of *Phytophthora rubi* show little differentiation and high rates of migration among states in the Western United States. *MPMI* 31(6): 614-622.
- Tan, D.S.H., Y. Ang, G.S. Lim, M. Rifqi Bin Ismail y R. Meier. 2010. From “cryptic species” to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae. Diptera). *Zool. Scri.* 39(1):51-61.
- Tarazona, E., C. Hanh, L. Franch-Gras, E.M. García-Roger, M.J. Carmona y A. Gómez. 2019. Ecological genomics of adaptation to unpredictability in experimental rotifer populations. *Sci Rep.* 9:19646. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56100-y>.
- Taylor, S.A. y V.L. Friesen. 2012. Use of molecular genetics for understanding seabird evolution, ecology and conservation. *Mar Ecol Prog Ser* 451: 285–304.
- Technelysium Pty Ltd. 2001. *Chromas 2.13*.
- Templeton A.R, Boerwinkle, E. y Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117: 343–351.
- Thum, R.A. 2004. Using 18S rDNA to resolve diaptomid copepod (Copepoda: Calanoida: Diaptomidae) phylogeny: an example with the North American genera. *Hydrobiologia* 519: 135–141.
- Thum, R.A. y A.M. Derry. 2008. Taxonomic implications for diaptomid copepods based on contrasting patterns of mitochondrial DNA sequence divergences in four morphospecies *Hydrobiologia* 614:197–207.
- Ting, J.H., L.S. Kelly y T.W. Snell. 2000. Identification of sex, age and species-specific protein on the surface of the harpacticoid *Tigriopus japonicus*. *Marine Biology* 137:31-37.
- UICN. 2023. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>.

- Van Tassel, C., T. Smith, L. Matukumalli, J.F. Taylor, R.D. Schnabel *et al.* 2008. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nat Methods* 5, 247–252.
- Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T. Garrido-Garduño y T.A. Gutiérrez-García. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 82: 277-297.
- Velázquez-Ornelas, K.E., E. Suárez-Morales y M. Ayón-Parente. 2021. *Catálogo de los copépodos (Crustacea: Copepoda: Calanoida y Cyclopoida) de cuerpos de agua temporalis de Jalisco, México. Taxonomía y distribución.* El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, Quintana Roo. 136 pp.
- Watson, N.T.N., I.C. Duggan, G.E. Collins, C.R. Beet, S.M. Woods, *et al.*, 2014. A Molecular-Based Assessment Tool for Characterising New Zealand Freshwater Zooplankton Communities. *ERI report number 39.* Lake Ecosystem Restoration New Zealand.
- Will, K.W., B.D. Misher y Q.D. Wheeler. 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Syst. Biol.* 54(5):844-851.
- Wilson, M.S. y H.C. Yeatman. 1959. Free-Living Copepoda. En W.T. Edmondson. (Ed.), *Freshwater Biology*. 2ª ed. John Wiley and Sons, New York. p. 735-861.
- Wilson, D.S. 1975. The adequacy of body size as a niche difference. *Am. Nat.* 109(970):769-784.
- Zeller, M., T.B.H. Reusch y L. Lampert. 2006. A comparative population genetic study on calanoid freshwater copepods: Investigation of isolation-by-distance in two *Eudiaptomus* species with a different potential for dispersal. *Limnol. Oceanogr.* 51(1): 117–124.
- Zeller, M., T.B.H. Reusch y L. Lampert. 2008. Small effective population sizes in two planktonic freshwater copepod species (*Eudiaptomus*) with apparently large census sizes. *J. Evol. Biol.* 21(1755-1762).

“He [the naturalist] looks upon every species of animal and plant now living as the individual letters which go to make up one of the volumes of our earth's history; and, as a few lost letters may make a sentence unintelligible, so the extinction of the numerous forms of life which the progress of cultivation invariably entails will necessarily render obscure this invaluable record of the past“

Alfred Russel Wallace

EPÍLOGO (un reportaje como colofón)

Para el siguiente texto, se realizó una entrevista con la Dra. Tania Escalante Espinosa, jefa del laboratorio de Biogeografía de la Conservación en la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Extinción a la vista. Un pretexto para hablar de lagos y copépodos

Es día de trabajo en el campo, salimos de la Universidad a las siete de la mañana y, a mediodía, llegamos a una pequeña playa en el lago Atexcac, en Puebla. Comenzamos a inflar la lancha y preparar el equipo de muestreo. El recorrido hasta este punto incluye una caminata de una hora subiendo y bajando algunos kilómetros con veinte kilos a la espalda por la ladera de este volcán muerto. La vista desde la orilla y el color turquesa del agua valen la pena el esfuerzo, aunque pensar en el camino de regreso no es algo que todos aplaudan, sobre todo con esas nubes negras encima. Este y otros lagos cercanos se conocen como axalapascos (“ollas de barro rellenas de agua” en náhuatl), su origen es producto de explosiones ocurridas hace al menos 40 mil años, cuando el líquido del subsuelo y el magma del interior de la Tierra se encontraron violentamente y formaron un cráter que se llenó posteriormente de agua. Imaginar la escena del nacimiento de estos lagos, ahora tan tranquilos y relativamente solitarios, es simplemente espectacular. Cada uno es independiente, esto es, no están conectados por ríos o corrientes subterráneas y, actualmente, muestran condiciones bióticas y abióticas particulares, bajo las cuales viven diferentes especies de peces, anfibios y pequeños invertebrados, estos últimos son la razón de nuestra presencia aquí pues tratamos de saber qué organismos hay en cada sitio y, sobre todo, cómo fue posible que colonizaran estos ambientes: ¿migraron desde otros lugares, se instalaron y adaptaron exitosamente pero continúan siendo parte de una misma especie distribuida en diferentes lagos? ó ¿se originaron aquí a partir de un linaje ancestral que diversificó y dio lugar a nuevas especies distintas a la original?

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

De los 10 millones de especies que se calcula habitan el planeta (arqueas, bacterias, protistas, plantas, hongos y animales), se han descrito poco más de 1.5 millones. Muchas se extinguirán en el anonimato antes de que podamos encontrarlas, describirlas, nombrarlas, clasificarlas y hallar su lugar en el árbol de la vida. Perder algo que todavía no conoces debe considerarse algo bastante triste. Sobre todo, porque gran parte de estas especies desconocidas sucumbirán ante acciones que son nuestra responsabilidad, además ¿cómo tomar medidas si no sabemos qué es lo que hay que conservar? Suena ideal, pero es imposible preservar cada rincón y especie del mundo. En entrevista, la Dra. Tania Escalante, nos dice algunos criterios a tomar en cuenta “las especies tienen una distribución diferencial sobre la superficie terrestre, eso las relaciona con la vulnerabilidad que pueden tener hacia los cambios ambientales, en particular los antropogénicos. Hay especies más vulnerables hacia procesos de extinción y, por lo tanto, las estrategias de conservación van a estar enfocadas o deberían priorizar a especies que son raras: tienen áreas de distribución pequeñas, el número de individuos es reducido, o son muy particulares de ciertos hábitats. Otras especies, las endémicas, se encuentran en un solo lugar del planeta, por lo que una vez que se pierde su área de distribución original, se pierde la especie completamente”.

A veces creemos que algunas especies son tan abundantes que nunca desaparecerán. El caso más extremo de este razonamiento es el de la paloma viajera (*Ectopistes migratorius*), la cual se distribuía en el norte de México y parte de Estados Unidos. Esta especie fue considerada el ave más abundante del mundo hasta inicios del s. XIX, con parvadas de al menos mil millones de individuos ennegreciendo los cielos a su vuelo. Debido a su cantidad, a su carne comestible y al bajo precio de esta, fueron cazadas hasta su extinción en 1900. La anécdota de un tren lleno con 200 mil palomas y descarrilado antes de llegar a su destino deja en claro lo absurdo que puede llegar a ser el final de una especie debido al hombre y su falta de visión a largo plazo. La última paloma viajera, Martha, murió en 1914 en un zoológico, pero de manera práctica su linaje había desaparecido mucho antes, algo similar a lo que sucede ahora con varios murciélagos que necesitan poblaciones grandes para existir (no es lo mismo calentar una cueva entre 50 o 50 mil individuos), o en el caso de organismos sexuales como los rinocerontes, de nada sirve contar con individuos si no tienen pareja para procrear. Además, a pesar de que sobrevivan en zoológicos, la reintroducción de especies es difícil, como lo comenta Tania “las especies tienen una relación muy estrecha con el ambiente en el que evolucionaron. Aunque las intentemos reproducir *ex situ*,

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

en los zoológicos, las condiciones ambientales de los lugares nativos son difíciles de recuperar. También, las poblaciones reintroducidas a veces no tienen éxito porque, igualmente, el ambiente ya cambió. Las acciones que permitan mantener a las poblaciones y sus ambientes *in situ* serán las mejores”.

Cada vez que visito este lugar pienso en cómo ha cambiado desde la primera vez que vine, hace 10 años. En Atexcac, dependiendo de la época del año, el agua tiene cambios de color debido a crecimientos de bacterias y algas. Pero ¿esto está relacionado con la gran extinción de especies que tanta alarma ha causado últimamente en los medios de comunicación? ¿Acabaremos con los recursos naturales definitivamente? Bueno, parece banal, pero es importante recordar que todo en nuestro planeta se relaciona tarde o temprano, desde una bacteria de media micra de largo hasta la ballena azul de 25 m, todos los organismos estamos conectados de una u otra manera en el árbol de la vida, donde cada rama cuenta una historia evolutiva exitosa hasta nuestros días y, por lo tanto, es igual de valiosa. A veces es difícil explicar que el humano, su intelecto y civilización valen lo mismo que una babosa de mar, pero así es la realidad. Y claro, cada especie interactúa con otras y con las condiciones ambientales a su alrededor. De esta manera, podemos ver que, por ejemplo, la agricultura intensa con fertilizantes, los residuos de la industria y el desagüe de aguas negras en mares, ríos y lagos dan como resultado el incremento en los nutrientes y con ello, los crecimientos de microorganismos nocivos, los cuales generan colores y olores desagradables, así como toxinas que influyen en la supervivencia de las especies que ahí se encuentran, desde los invertebrados hasta los peces y, si continuamos la cadena, es fácil pensar que si no hay peces, las aves que los consumen morirán de hambre. Son cosas que no pensamos cuando jalamos la cadena del excusado, utilizamos fertilizantes para el aumento en la producción agrícola o aplaudimos la construcción de fábricas que “traerán” progreso y bienestar con sus productos y empleos.

En otros lagos de la misma cuenca como la Preciosa, Quechulac y Alchichica, o en lugares como los canales Xochimilco, la introducción de peces exóticos para el consumo humano ha generado la pelea por los recursos con los peces endémicos, los cuales son mucho más pequeños y han sido desplazados, afectando así toda la red trófica natural. Un ejemplo de lo grave que puede llegar a ser esta situación se ha estudiado en el lago Victoria en África, donde en un tiempo corto, de unos pocos miles de años, una especie ancestral dio origen a 500 especies distintas de peces cíclidos, cada una con características físicas y ecológicas distintas. Sin

embargo, a mediados del s. XX se introdujo de manera deliberada la perca del Nilo (*Lates niloticus*), un pez de casi dos metros de largo que ha desplazado y llevado -en conjunto con la contaminación del lago, el aumento en nutrientes y disminución del oxígeno como se señaló anteriormente- a la extinción a cerca de 200 de las especies nativas y mermado en gran medida las poblaciones de las restantes ¿el humano ha tenido la culpa de ese proceso de extinción? A simple vista parece ser que sí.

Para las especies invasoras, como es el caso de los peces en estos lagos, el papel del hombre en la expansión de su distribución ha sido realmente catastrófico. De manera natural, luego de varias generaciones de acumular cambios genéticos, conductuales o ecológicos, los mecanismos evolutivos dan lugar a una especie a partir de otra en un lugar particular del globo y desde ahí, ésta se dispersa por su propio pie o alas, con ayuda del viento (el polen puede volar cientos de kilómetros), del agua (aprovechando las corrientes marinas, ríos o la lluvia para llegar a lugares lejanos) o utilizando a otros organismos (como lo hacen las semillas con los murciélagos o los moluscos pegados a las patas de los patos como lo comprobó sádicamente Darwin, usando extremidades de estas aves para comprobar su capacidad para transportar por grandes distancias a organismos adheridos a ellas) hasta llegar a ocupar un área límite. Así, cada especie ocupa un lugar en el mundo, teniendo que algunas se encuentran solo en un área tan pequeña como una hectárea entre la selva chiapaneca (*Lacandonia schismatica*) o el litoral de un lago (*Cletocamptus gomezi*), o tan extendidas como las orcas (*Orcinus orca*) y nosotros (*Homo sapiens*), que habitamos gran parte del mundo marino y terrestre, respectivamente. En cualquier caso, para llegar a tener las distribuciones que vemos actualmente, las especies han necesitado miles de años en los que sus linajes han cruzado barreras y competido por el territorio y los recursos con sus semejantes.

Sin embargo, en un tiempo relativamente corto, la acción humana ha cambiado de manera drástica estos procesos. Al salir del centro de África y colonizar nuevos territorios (de manera natural), el hombre tuvo contacto con especies de plantas y animales que domesticó y aprendió a aprovechar, llevándolas consigo en su peregrinaje, con los cambios obvios en las distribuciones originales o en el efecto de una competencia “leal” entre distintos linajes que la selección natural había tardado generaciones en separar. A su paso y con la explotación de los recursos a su alcance, el humano también modificó el entorno con la construcción de pueblos y ciudades que requieren espacio, madera, metales, agua y alimento para existir. Las hormigas también afectan

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

su entorno al crear colonias y túneles, o los castores al construir presas y cambiar el curso de un río, pero la escala de impacto global del humano no tiene comparación con otra especie, a excepción de las cianobacterias, a quienes les debemos simplemente nuestra existencia ¿o alguien puede vivir sin respirar? Parece ser que organismos de este tipo fueron los responsables de generar desde hace unos 2,400 millones de años el oxígeno que respiramos como desecho de su fotosíntesis.

Con la invención de los medios de transporte como el barco, el automóvil y el avión, se han acelerado procesos que, de existir, deberían tardar milenios. Imaginemos a Colón hace más de 500 años ante Isabel la Católica después de volver de “Las Indias” (dejando de recuerdo ratas europeas en estas tierras) mostrándole la planta del tabaco hasta ese momento desconocida en el Viejo Mundo y que actualmente se cultiva en varias partes del planeta. O un crucero trasatlántico que va de Londres a Nueva York, trayendo además de turistas felices, miles de organismos zooplanctónicos en el agua de lastre, los cuáles competirán con las especies nativas y pueden eliminarlas. El caso de Australia es especial, fue poblada desde hace unos 40 mil años por aborígenes y luego repoblada con presos desterrados de Inglaterra durante parte del s. XIX, en este segundo evento, los barcos llevaron, entre otras especies exóticas, a los gatos domésticos, peces carpa, conejos y hasta camellos, que en muy poco tiempo contribuyeron a la extinción de varias especies endémicas a la isla. De hecho, actualmente los gatos son considerados una plaga y hay programas para exterminarlos.

Otro ejemplo es el dodo de la Isla Mauricio, una paloma gigante incapaz de volar, exterminada en menos de 80 años por los colonos europeos y las especies introducidas. Los aviones también han contribuido a la rápida propagación de algunos patógenos como el VIH (transportando individuos portadores del virus) o el hongo quitridial *Bathachochytrium dendrobatidis*, que ha causado la extinción de varias especies de ranas en América y contabilizando millones de víctimas mortales de estos anfibios en Australia y Europa. Si bien este hongo puede desplazarse por sus propios medios, es claro que la acción humana ha propiciado su expansión desde África o Norteamérica (no se tiene claro su origen) a otras partes del globo. “Las especies introducidas pueden producir enfermedades que extinguen a una población. Además, cada caso es diferente, ese es el problema de la invasión, no sabemos cómo va a reaccionar un grupo de organismos, por lo que es difícil encontrar patrones” menciona Tania. En cuanto a plantas, todos hemos comido un delicioso nopal asado junto a un buen taco de carne y mucha

salsa ¿cierto? Los nopales (género *Opuntia*) son originarios de América y llegaron a España hace tanto tiempo que muchos españoles creen que las chumberas -así les llaman- son endémicas de allá, donde se han convertido en un problema ecológico pues colonizan laderas montañosas eliminando a plantas locales, por lo que actualmente se llevan a cabo medidas para erradicarlas. En un viaje por Taiwán hace muchos años, vi varios jardines con nopales como planta de ornato y ninguno en mi plato de comida, creo que inevitablemente causarían el mismo daño que en Europa, actuando como especie invasora. ¿Podemos calcular el daño de las especies invasoras sobre la fauna y flora endémica? A pesar de su dificultad, parece que se pueden generar respuestas, como lo menciona Tania “el estudio de las especies invasoras y su efecto es algo muy reciente. Estamos en una crisis porque tenemos muy pocos datos de campo para saber exactamente cómo una invasión está cambiando un ecosistema. Debido a esto, se están haciendo modelos a través de algoritmos que nos permiten saber cuáles son los sitios que pudieran ser invadidos con más probabilidad por una especie u otra, y predecir, con cierta confiabilidad el comportamiento geográfico de la invasión. Además, no sabemos bien si están totalmente desplazando a las otras especies (nativas), o que, a pesar de tener todas las capacidades de invadir, podrían no estar haciéndolo porque hay un depredador u otro competidor que está ocupando ese nicho ecológico”.

En algunos lagos que estudiamos, como La Preciosa y Tecuitlapa, ambos de agua dulce, el nivel del líquido ha bajado considerablemente debido a su uso para el riego de los cultivos de maíz y algunas hortalizas de los pueblos vecinos. En el perímetro que recorre La Preciosa, un lago de 36 m de profundidad, se puede ver la mancha de sales a un par de metros sobre el agua. De Tecuitlapa queda solo una pequeña poza remanente del lago original, aferrada a secarse por completo pero que ya no permite que entremos con la lancha inflable como lo hacíamos hace unos años, por lo que ahora solo tomamos muestras desde la orilla. Ejemplos de extracción intensiva de agua y desaparición de grandes lagos -con su biodiversidad incluida- son amargamente comunes, no solo en México. El peor caso es el Mar Aral, situado en Asia Central y considerado uno de los cuatro lagos más grandes del mundo. Las fotografías aéreas que comparan su tamaño en las últimas décadas son escalofriantes. Barcos anclados en la arena y entre capas de sal acumulada por la evaporación son postales actuales del lugar. El aumento en la población aledaña en los últimos 50 años, el desvío del agua proveniente de los ríos que lo abastecían y, sobre todo, el mal manejo de los recursos por parte de la agricultura de arroz y algodón -que

requieren mucho líquido- han provocado un daño irreparable a este sistema, con efectos a la salud (por las tormentas de sal y arena mezclada con pesticidas) y al ambiente (al modificarse las temperaturas por la falta de agua). La crisis del agua es algo real y como en otras situaciones, la falta de empatía empeora cada vez más la situación. Hace un par de años, visité a unos tíos en Los Ángeles y a mi madre en Ensenada. Mientras mi mamá cuidaba cada gota que le llegaba por pipas, reutilizando el agua de la lavadora y el fregadero para regar su jardín, mi tío decía (mientras yo miraba cómo lavaba los trastes bajo el chorro intenso, dejando la llave abierta): “no te preocupes, aquí el agua sobra, no como en México”. El detalle es que olvidamos que el agua es la misma, durante su ciclo no le importan las barreras políticas que cruza, ya sea como líquido, vapor o hielo. El agua es un bien común a todos los seres vivos que la necesitan ¿cuántas especies se han extinto o están en peligro debido a la pérdida de cuerpos de agua por sobreexplotación o contaminación?

Antes de llegar al pueblo de Perote, pasamos a Alchichica, uno de los cuerpos de agua más estudiados del país. Es un lago salino de unos 60 m de profundidad. Es un lugar de fácil acceso para turistas y los lugareños han aprovechado esto para colocar palapas y pequeños negocios en la orilla. Este lago cráter está lleno de leyendas donde se involucran ovnis y una conexión subterránea con el mar, pero para nosotros, parte de su importancia radica en la gran cantidad de especies endémicas que habitan aquí: un charal, microalgas, artrópodos, dos especies de copépodos –una de las cuales tuve la fortuna de nombrar- y los famosos microbialitos (estructuras formadas durante milenios por la interacción de minerales con microorganismos, como cianobacterias), que constituyen algo que podríamos definir como “arrecifes bacterianos”, los cuales años atrás se encontraban sumergidos y no como ahora, bañados por el sol y asomados a manera de paredes blancas cada vez más afuera del agua y en contacto con la actividad humana, como también sucede en Cuatro Ciénegas y Bacalar. El linaje del que son parte los organismos formadores de microbialitos es considerado uno de los primeros que surgieron en nuestro planeta, sobreviviendo hasta ahora a cada una de las grandes extinciones ¿persistirá a este periodo en el que conviven con una especie que está acabando con su hábitat? Otro tipo de arrecife, mucho más famoso por sus colores y estructuras hermosas, es el formado por pequeños animales llamados pólipos, que viven en colonias y secretan -durante generaciones- estructuras de carbonato de calcio que conocemos como corales. Estos pólipos interactúan de manera estrecha con algunos microorganismos llamados zooxantelas, los cuáles reciben refugio del pólipo, alimentándolo en

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

pago, además de ser responsables del color del coral. Para funcionar de manera adecuada y ser parte importante del hábitat de una gran variedad de especies marinas, esta relación necesita de aguas transparentes, así como condiciones químicas y de temperatura muy particulares, las cuáles han cambiado en los últimos años. Bajo esta presión ambiental, causada en parte por el aumento rápido en las temperaturas globales gracias a la actividad humana, se encuentran los corales que forman -a lo largo de 2,500 km- el Arrecife de la Gran Barrera en Australia y los que encontramos en las aguas del Caribe. Para ambos casos, se calcula que, de continuar estas condiciones, la tasa de extinción se incrementará al punto de que en algunas décadas solo podremos ver sus cadáveres en el mar, con un efecto bastante negativo sobre miles de especies que dependen de estos pequeños seres.

Lo único seguro al nacer es que un buen día vamos a encontrarnos con la muerte. Ser rico o pobre, inteligente o imbécil no importa. Esta sentencia irrevocable incluye a cada ser sobre la Tierra y al planeta mismo, dentro de unos pocos miles de millones de años. Pero no se preocupen, para ese momento seguramente los humanos ya seremos cosa del pasado. Se calcula que la vida surgió hace unos 3,500 millones de años, desde entonces, a partir de un ancestro común a todos los organismos actuales, se han originado y perdido millones de especies de distintas formas, tamaños y características. A veces la Tierra está rebosante de vida que va y viene, pero en algunas ocasiones, al menos en cinco según los registros, diferentes acontecimientos la han dejado con bajas realmente considerables. Entonces la vida encuentra de nuevo su camino, los sobrevivientes generan nuevas formas y linajes que se adaptan ante las circunstancias y sobreviven exitosamente, al menos hasta la siguiente gran prueba. De esta manera, si las condiciones en el planeta son relativamente estables en periodos de tiempo largos, una especie - después de originarse- tiene un periodo de vida de algunos miles de años tras los cuales se extingue o evoluciona dando lugar a otras variedades, a menos que un evento catastrófico ocasione una presión ambiental extrema. En la historia de las grandes extinciones, las condiciones ambientales de la Tierra han cambiado de manera rápida y drástica, tanto que no permitieron que gran parte de los organismos pudieran adaptarse, dejando paso a otros que bajo las condiciones anteriores no necesariamente eran los más favorecidos por la selección natural. El azar también juega un papel importante en estos acontecimientos, de otra manera, los grandes dinosaurios seguirían dominando el planeta, a diferencia de sus descendientes que sobrevivieron

y con los que convivimos tranquilamente, como los pericos, tucanes y gallinas, pequeños dinosaurios que no asustan tanto como un fiero *Tyrannosaurus rex*.

Participando como un importante agente de cambio del escenario a su alrededor, parece ser que, a lo largo de 200,000 años y en especial en los últimos 200, el humano ha acelerado el cambio en las condiciones ambientales, así como en las distribuciones, en la competencia y en la tasa de extinción de muchas especies que de manera natural tendrían que seguir entre nosotros, al menos un rato más o no depender de nuestras acciones ¿Hemos causado estragos irreparables en la naturaleza? Hasta cierto punto no podemos negarlo, pero a su favor, la vida seguirá en el planeta después de nosotros, de nuestro egoísmo y malas decisiones. Sin embargo, creo que todavía podemos tomar medidas que permitan que el efecto de nuestra presencia aquí -en este estrecho pedazo de la historia en el que nos ha tocado existir como especie- tenga un impacto menor sobre los procesos naturales y sobre los millones de especies con los que compartimos tiempo y espacio, y que como dije anteriormente, son tan valiosas como nosotros. Por otro lado ¿tiene caso seguir invirtiendo dinero para salvar a la vaquita marina o al lobo mexicano apenas ahora, décadas después de que se sabía que sus poblaciones estaban en peligro? Tania nos responde así: “todas las especies son importantes para ser conservadas, en los casos mencionados y otros más, hay que evaluar la historia natural de la especie, no para saber si vale la pena conservarla o no, más bien para entender cómo operan los procesos evolutivos, así como los factores antropogénicos. En un momento dado, hay que dejar que la naturaleza siga su curso, con esto no quiero decir que no hay que conservar. Sin embargo, se ha demostrado que las acciones encaminadas para conservar una sola especie dejan desprotegidas a otras. Las tendencias actuales en la biogeografía de la conservación intentan proteger los patrones de distribución que presentan muchas especies, la biodiversidad completa de una zona, al igual que tratar de mantener los procesos que las generaron”.

¿Importa más una especie que otra? ¿por qué nos “gustan” más unas en particular? En los lagos que he mencionado, estudio unos pequeños organismos llamados copépodos, nada agraciados ni con cara linda, vaya, apenas tienen un ojo -que ni es un ojo verdadero-, pero cuentan con más de 10 mil especies viviendo en ríos, lagos y el mar, como parásitos o en vida libre. Son muy importantes en las redes tróficas y es interesante su historia evolutiva, pero a pesar de esto no abundamos los copepodólogos en el mundo. Cuando inicia un semestre y le pregunto a mis alumnos a qué tipo de organismos quieren dedicar sus investigaciones, no ha habido uno solo

que los nombre. No son animales que uno se preocuparía por conservar o usarlos como bandera para que salvemos los cuerpos de agua donde se encuentran. Sin embargo, a todos nos encantan los pandas, los osos polares y no hay quien no se preocupe por las últimas diez vaquitas marinas que existen. Todos queremos conocer a los elefantes y leopardos en un safari o nos emocionamos con documentales de tiburones, gorilas, mariposas monarca y ballenas. En general, conocemos la importancia de las abejas, colibríes y murciélagos polinizadores. Nos da ternura la cara feliz de los ajolotes, la risa de los delfines o un koala mamá cuidando a su cría. Los ejemplos anteriores son especies “carismáticas” y en algunos casos funcionan como especies sombrilla, un término bastante útil para las políticas de conservación y sensibilización de la sociedad pues, se piensa que al conservarlas, indirectamente cuidaríamos de otras especies del mismo hábitat que no son tan lindas, como mis copépodos, que claramente también podrían estar en peligro de extinción. Sin embargo, Tania cree que este tipo de estrategias no son suficientes “fueron muy exitosas en los años 1970’s y 1980’s, pero ya están en desuso. Se pensaba que tener a una especie emblemática podría permitir conservar toda la biodiversidad de un sitio al existir relaciones ecológicas muy estrechas entre los seres vivos. Sin embargo, nos hemos dado cuenta de que estas estrategias no permiten conservar a la biodiversidad en sus diferentes niveles o todos los procesos. Sí son útiles para obtener financiamiento. El hecho de tener como emblema a un jaguar o panda llama mucho la atención, pero es muy poco probable que una estrategia desarrollada para una especie nos permita conservar todos los procesos y patrones que pueden ocurrir en un lugar”.

Entonces ¿la siguiente gran extinción es totalmente nuestra culpa? Como ya lo he mencionado, las extinciones a escalas planetarias son procesos naturales, azarosos y relativamente rápidos. Sí, el espacio que ocupamos y las modificaciones a nuestro entorno, el consumo desmedido de recursos, el aumento en las emisiones de CO₂, la tala de bosques, los incendios forestales provocados o descontrolados (los ejemplos recientes de Calakmul o el Amazonas bastan), el cambio de uso de suelo para agricultura o ganadería, la contaminación de cuerpos de agua y políticas ambientales que no ven más allá de sexenios, son causantes de muchas extinciones nada naturales, no lo podemos negar. Ahora, si bien somos culpables del aumento rápido de las temperaturas en los últimos años, también es cierto que estamos en una época en la que las temperaturas son relativamente altas de manera natural, así como hace 18 mil años las condiciones eran particularmente frías, y antes calientes de nuevo, en un ciclo en el que la vida se adapta o se extingue. De esta manera ¿somos responsables del cambio climático

global? “la Tierra siempre ha estado sujeta a estos ciclos de enfriamiento-calentamiento. El problema es que este aumento de temperatura en un corto plazo de tiempo lo estamos sufriendo debido a la acción del hombre. Los científicos suponemos que esto se debe a que las emisiones de dióxido de carbono están generando el efecto invernadero que impide que la radiación solar salga de la Tierra, manteniendo el calor en la superficie terrestre. Hay una parte del calentamiento que es un fenómeno natural, pero hay otra de la que somos totalmente responsables los humanos, sobre todo a partir de la revolución industrial, aunque es un fenómeno multifactorial donde también la deforestación y la eliminación de los grandes pulmones verdes han generado que los ciclos se modifiquen” comenta Tania.

Si bien el calentamiento global parece causarnos problemas, en otras ocasiones hemos aprovechado estos ciclos naturales. Durante la última glaciación, las grandes masas de agua congelada facilitaron la migración de nuestros ancestros y de una gran cantidad de especies de Asia a América que de paso, aprovecharon también un evento sucedido dos millones de años atrás, cuando parte de lo que hoy forma Centroamérica emergió y unió el norte y sur del continente, causando entre otras cosas, el paso de organismos, la competencia y extinción de muchas especies (algunas de ellas con ayuda de la cacería humana, como el mamut y otros grandes mamíferos), y a escala global repercutiendo en el clima de Europa y en los cambios de las corrientes marinas. Sí, en el Viejo Mundo deberían agradecerle a ese pequeño pedazo de tierra que su invierno no sea tan severo como en Canadá a pesar de estar en latitudes similares. Como se puede ver, la Tierra y la vida dentro de ella evolucionan juntas, no se quedan quietas en ningún momento y lo seguirán haciendo de una manera u otra, con o sin nosotros interviniendo. Ahora nos preocupamos por las abejas y qué pasará con todas las plantas que polinizan -muchas de gran importancia para nosotros- si estos insectos llegaran a extinguirse por algo que nosotros provocamos, como la pérdida de hábitats, el uso de fertilizantes y plaguicidas, el aumento en las temperaturas, y las ya mencionadas especies invasoras. Es importante señalar que hay 20 mil especies de abejas en el mundo (gran parte sin clasificar), no solo la melífera, africana y melipona. Se calcula que el 10% de ellas está en peligro de extinción ¡2,000! Si este porcentaje se perdiera en el corto plazo, ¿qué pasará? Las relaciones de planta-polinizador son tan estrechas (la coevolución es un proceso genial) que esperar a que lleguen otros polinizadores o hacerlo nosotros de manera manual parece casi imposible. Además de la pérdida de biodiversidad debemos pensar en los costos económicos de perder cultivos o el aumento en precios de cosas tan

comunes como una cerveza o una camisa de algodón. La vida sigue su camino, sin embargo, lo más sensato es pensar en medidas que permitan preservar a este linaje completo el mayor tiempo posible, nos conviene de muchas maneras.

Pero ¿qué tipo de medidas podemos tomar? De manera individual parece fácil pensar en algunas, pero a otros niveles las cosas no son tan sencillas, Tania nos comenta “Entre mayor número de áreas protegidas se decreten por parte de los gobiernos, así como mayor comunicación entre los sectores del gobierno, de la industria, de la población civil y los científicos, las acciones de conservación podrían ser más adecuadas. No quiero decir que nos tendríamos que salir todos del planeta y dejarlo vacío para mantener los sitios intactos. Podríamos proponer estrategias que nos permitan hacer uso de los recursos, pero de una manera sustentable. Creo que es posible hacer esta mancuerna entre el desarrollo económico con el mantenimiento de los recursos naturales. No es una tarea fácil”. Para los científicos, un problema importante es pasar de las propuestas publicadas en revistas especializadas a la realidad, donde no solo intervienen instituciones que toman decisiones y aportan dinero, sino el factor social. Tania lo ve así “como científicos solamente usamos los aspectos biológicos para priorizar un área de conservación y nos estamos olvidando de la parte social. Esa no es una posición realista, cuando vayamos con nuestra propuesta ante las autoridades y que realmente pueda funcionar e implementarse, necesitamos hacer un análisis multicriterio que nos permita incorporar los aspectos sociales y económicos en las estrategias de conservación, y así tomar las mejores decisiones. Si quisiéramos proponer un área de conservación en un sitio con altas presiones de deforestación, por donde eventualmente va a pasar un camino o que tiene altas probabilidades de ser urbanizado, tampoco estaríamos haciendo bien nuestro trabajo. Necesitamos evaluar todos los factores para poder proponer sitios donde garanticemos el mantenimiento de la biodiversidad a largo plazo”. Y nuestro país ¿qué tan involucrado está en el manejo sustentable de los recursos y en la conservación de las especies? En la Universidad siempre hacemos mofa cuando alguien inicia una tesis con la frase “México es un país megadiverso”, pero por muchas razones somos responsables de buena parte de la biodiversidad mundial y eso no es cosa de risa. Tania nos comenta “afortunadamente en nuestro país, muchos gobiernos se han interesado en la protección y el manejo sustentable de los recursos. México firma en muchos de los tratados internacionales para la protección del medio ambiente y de la biodiversidad, y hay muchos científicos reconocidos trabajando en ello. Sin embargo, hace falta involucrar mucho más a la sociedad,

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

hacer el trabajo de educación en los niños y concientización en el sector industrial. El gobierno tiene en sus manos la bolita, se necesitan más recursos económicos para poder enfrentar estos problemas ambientales. Hay muchas instituciones en el gobierno que han trabajado mucho, pero necesitamos trabajar más, hacer mancuerna entre la educación y los científicos, y tener más financiamiento para producir estas estrategias de conservación. Siempre se necesita dinero”.

A diferencia de los lagos cráter, en la zona se encuentra otro par de lagos con un origen distinto. Hace miles de años, existía un gran lago de varios kilómetros de largo, actualmente fragmentado en El Carmen y Tepeyahualco. Ambos son someros -no alcanzan el metro de profundidad- y efímeros, pues solamente se llenan de líquido en algunas zonas durante la temporada de lluvias, por lo que el resto del año actúan como grandes pastizales que aprovecha el ganado. De estos lagos, los habitantes históricamente han extraído agua y tequesquite, una sal utilizada todavía en la cocina. A veces, desde afuera, yendo una vez al mes, uno podría pensar que esas personas deberían dejar de consumir esa poca agua para proteger a las especies que sorprendentemente todavía viven ahí, pero como hemos visto, no es fácil conservar sin tomar en cuenta a las comunidades. Sin embargo, podemos tomar acciones en conjunto que nos ayuden a manejar de manera adecuada los recursos naturales. Entonces ¿qué necesita la sociedad para participar en conservación a pequeña o gran escala? Tania nos contesta “Es indispensable un cambio en el pensamiento, concientización. Y eso únicamente podrá venir en las nuevas generaciones integrando en los planes de estudio esta forma de pensamiento a través de la sustentabilidad, el respeto, la apropiación de los recursos naturales dentro de nuestra cultura. Posteriormente, comenzar a aprender en la escuela y en el seno familiar estrategias, quizás a escala pequeña pero que permitan aportar algo en el mantenimiento de la biodiversidad. Pueden ser desde pequeñas acciones como el reciclaje, reusar, reducir (las tres R), hasta acciones que tienen que ver con el uso de energías renovables y energías verdes”. En este caso ¿realmente sirve de algo no usar popotes ni bolsas de plástico o es insignificante el aporte del esfuerzo individual ante las acciones de la industria y la política a gran escala, que siguen pensando en extraer recursos naturales de una manera desmedida? Tania tiene más ánimo que muchas personas que conozco: “Cualquier acción que tomemos es importante, sí suma un granito de arena. Las acciones pequeñas nos podrían permitir, al menos a un nivel local, de nuestra comunidad, conservar un poco más la biodiversidad, pero sobre todo aumentar nuestra calidad de vida. El hecho de que no usemos los popotes -que quizá nunca lleguen al mar y no se atragante

una tortuga-, va a mejorar nuestra calidad de vida al no tener tantos residuos. Igual el uso de los autos eléctricos, quizás eso no va a cambiar el problema del calentamiento global porque lo más importante no son los autos sino el consumo de carbono, pero en una escala local, sí puede repercutir”.

A veces, estando en medio del lago, manejando la lancha y colectando organismos que después voy a ver en el microscopio, creo que es muy fácil ser feliz, tengo una familia, amigos, salud, hago lo que me gusta. Pero al volver a la ciudad y sentir la contaminación en el aire, el ruido, la basura y las noticias de asesinatos, guerras, devaluaciones e incendios forestales, la utopía en mi mente se desvanece un poco ¿todavía tenemos oportunidad como humanidad? ¿estamos a tiempo de hacer algo por remediar la situación ambiental que hemos provocado? Parece que aquí también Tania es más optimista que yo “Todavía no es tan tarde. Pero la conservación es una ciencia de crisis. Si no hubiera una crisis ambiental, del agua y de extinción de especies, no habría una ciencia de la conservación. ¿Qué quiere decir esto? Que debemos que actuar ya, con la información que tenemos. No podemos esperar más. No nos queda mucho tiempo si quisiéramos que nuestros hijos y nietos pudieran todavía conocer una selva o un desierto en su estado natural, o conocer a las especies donde viven o cómo viven”. Se ha pronosticado que esta crisis de la que hablamos terminará por afectar de manera irreversible al planeta y su biodiversidad en el año 2050 ¿Cómo se puede proponer una fecha en particular? Tania lo explica “Esto se hace basado en dos cosas: las observaciones presentes y del pasado. En la historia de la Tierra, han ocurrido extinciones masivas en las que hasta el 90% de las especies se han perdido. La extinción es un proceso natural. El problema es que cuando comparamos el número de especies que se extinguen por unidad de tiempo en el presente, respecto al pasado, tenemos que la tasa de extinción (la velocidad a la que ocurre) es mucho más alta ahora. Nosotros hacemos curvas de estimaciones de cuántas especies se van extinguiendo y así podemos extrapolar hacia el futuro. Ahí es donde las predicciones son muy alarmantes, si seguimos la misma tendencia de los últimos años, la tasa de pérdida de especies es muy alta, de ahí se estima que el 2050 será el punto de quiebre. Ahora, no es que ese año ya no vaya a haber especies, pero creo que los patrones van a estar tan modificados que algunos grupos sí se van a perderse completamente. Otros no, quizá los insectos, que han constituido durante millones de años un gran porcentaje de la biodiversidad, probablemente van a seguir existiendo. Pero gran parte de otros grupos taxonómicos como los mamíferos, probablemente se extinguirán”.

Pienso en el año 2082. Un día muy caluroso de julio, el desayuno de mi cumpleaños 100 consiste en una masa grumosa sin sabor y de origen dudoso, pero con los nutrientes necesarios ¿en ese momento extrañaré el sabor del jitomate que tanto odio ahora y que seguramente en esa fecha no existirá debido a que la especie de abeja que lo polinizaba se extinguió hace mucho? Pensar a largo plazo es algo que a los humanos no se nos da de la mejor manera. ¿Cuáles serán las consecuencias de esta sexta extinción? ¿cómo modificará la vida humana? Tania confirma mi sospecha “creo que lo primero que vamos a resentir va a ser la pérdida de diversidad ambiental y de especies, así como de la variabilidad genética, en un proceso que podemos denominar “homogeneización biótica” en el que quizá todos los alimentos y animales van a ser de un mismo tipo, sin variedades, y los ambientes también serán muy similares. Por otro lado, nosotros también nos vamos a volver vulnerables, el hecho de que nuestra alimentación cambie podría volvernos más intolerantes a ciertos tipos de proteínas” finaliza.

Antes de partir de regreso a la ciudad, mientras esperaba sentado a la orilla de La Preciosa, viendo el Pico de Orizaba al fondo y a la lancha acercándose lentamente con los alumnos, rasqué con curiosidad infantil un trozo de pared a un metro de altura sobre el nivel del agua. Ahí, quitando con cuidado la arena, encontré conchas secas de caracoles acuáticos, de medio milímetro de ancho, las observé detenidamente, puse un par sobre mi mano y el viento leve se las llevo sin problema ¿Hace cuánto tiempo vivieron estos organismos bajo el agua antes de secarse y perderse entre kilos de sedimento acumulados durante años? ¿Qué otras especies había en ese momento en el lugar? Los amonites, que dominaron los mares hasta hace unos 60 millones de años y que dejaron un excelente registro fósil que ha permitido datar con precisión periodos geológicos, son sus parientes lejanos. Comparado con la historia de la Tierra y todo lo que ha ocurrido desde su formación, el paso de nuestra especie es casi insignificante pero no por ello pasará desapercibido. En un par de millones de años, nuestra huella podrá ser identificada en unos milímetros de sedimentos llenos de lo que quede de nuestra civilización, todos los libros, edificios, tecnología, basura y huesos quedarán simplemente reducidos a polvo y roca que podrían clasificarse como parte del Antropoceno. Nos guste o no, inevitablemente llegará el momento de extinguirnos como especie, que eso suceda en tres o trescientas generaciones y que en el camino nos “llevemos de corbata” a otras especies depende en gran medida de nosotros, de cambios en los hábitos y políticas de consumo y en un mejor aprovechamiento de los recursos naturales. Tal vez los arqueólogos del futuro o visitantes llegados de mundos lejanos tendrán

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

curiosidad por estudiar tales restos, tratarán de reconstruir el pasado y se preguntarán sobre nuestro papel sobre el entorno, como nosotros hacemos ahora con los amonites o los caracoles secos de La Preciosa, creo que nuestro deber es dejarles una fina capa de tierra que valga la pena analizar.

APÉNDICES

Apéndice 1. Técnicas utilizadas

A) Extracción de ADN (Montero-Pau *et al.*, 2008).

1. Aislar individualmente a los copépodos de cada población en alcohol absoluto dentro de tubos de 0.2 ml.
2. Retirar el alcohol, enjuagar 2 veces con agua destilada y secar.
3. Agregar 20 μ l de buffer alcalino (lisis).
4. Aplastar al individuo contra la pared del tubo e incubar a 95°C durante 30 min.
5. Agregar 20 μ l de buffer neutralizador y agitar ligeramente.
6. Centrifugar 3 min a 10,000 rpm.
7. Colocar el producto en refrigeración.

B) Protocolo para preparar las reacciones de PCR.

REACTIVO	CANTIDAD POR REACCIÓN (total = 12.5 μ l)	# REACCIONES (p. ej. 7)
Master Mix	10.5 μ l	73.5 μ l
Oligo F (LCO1490)	0.25 μ l	1.5 μ l
Oligo R (HCO2198)	0.25 μ l	1.5 μ l
ADN	1.5 μ l	1.5 μ l (por reacción)

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

C) Protocolos para obtener productos de PCR.

GEN COI (COI_T1_Fole)		GEN 16S (Hield_modificado)		Proceso
94°C --- 5 min		94°C --- 5 min		
94°C --- 40 s	x 35 ciclos	94°C --- 45 s	x 35 ciclos	Desnaturalización
41°C --- 40 s		41°C --- 25 s		Alineamiento
72°C --- 1 min		72°C --- 35 s		Extensión
72°C --- 5 min		72°C --- 3 min		
04°C --- 5 min		04°C --- 5 min		

D) Preparación de gel para visualizar amplificación de productos de PCR.

1. Diluir 0.15 gr de agarosa en 15 ml de agua.
2. Calentar 20 s en el microondas.
3. Agregar 0.3 ml de Midori green + buffer TAE 50x.
4. Enfriar y colocar el gel sobre el molde.
5. Colocar el gel en la cámara con buffer TAE 5x.
6. Colocar el Marcador de peso y las muestras de PCR dentro de las celdas correspondientes.
7. Corriente eléctrica de 50 V durante 30 minutos aproximadamente.
8. Revisar el gel bajo luz UV y tomar fotografía en transiluminador

Apéndice 2. Lista de secuencias del gen COI descargadas de la base de datos de BOLD Systems. Se indica el número de identificación y la especie a la que corresponden.

Mastigodiptomus

#	# Identificación	Especie	#	# Identificación	Especie
1	MASKM001-19	<i>M. siankaanensis</i>	28	ZPLMX565-06	<i>M. montezumae</i>
2	MASKM002-19	<i>M. siankaanensis</i>	29	ZPLMX212-06	<i>M. texensis</i>
3	MASKM005-19	<i>M. siankaanensis</i>	30	ZPLMX558-06	<i>M. texensis</i>
4	MASKM006-19	<i>M. siankaanensis</i>	31	ZPLMX561-06	<i>M. texensis</i>
5	MASKM019-19	<i>M. siankaanensis</i>	32	ZPLMX538-06	<i>M. albuquerquensis</i>
6	MCM346-15	<i>M. cuneatus</i>	33	ZPLMX540-06	<i>M. albuquerquensis</i>
7	MCMM004-11	<i>M. ha</i>	34	ZPLMX165-06	<i>M. albuquerquensis</i>
8	MCMM066-11	<i>M. ha</i>	35	ZPLMX166-06	<i>M. albuquerquensis</i>
9	ZPLMX162-06	<i>M. cihuatlan</i>	36	ZPLMX526-06	<i>M. albuquerquensis</i>
10	ZPLMX212-06	<i>M. alexei</i>	37	ZPLMX170-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
11	ZPLMX558-06	<i>M. alexei</i>	38	ZPLMX171-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
12	ZPLMX561-06	<i>M. alexei</i>	39	ZPLMX172-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
13	GBCX0202-06	<i>M. nesus</i>	40	ZPLMX173-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
14	ZPII498-07	<i>M. cf. nesus</i>	41	ZPLMX233-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
15	ZPII078-07	<i>M. cf. nesus</i>	42	ZPLMX530-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
16	ZPII080-07	<i>M. cf. nesus</i>	43	ZPLMX532-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
17	ZPLMX546-06	<i>M. cf. reidae</i>	44	ZPLMX533-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
18	ZPLMX551-06	<i>M. cf. reidae</i>	45	ZPLMX529-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
19	ZPLMX556-06	<i>M. cf. reidae</i>	46	ZPLMX562-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
20	ZPLMX547-06	<i>M. reidae</i>	47	ZPLMX184-06	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
21	ZPLMX548-06	<i>M. reidae</i>	48	ZPII605-07	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
22	ZPLMX552-06	<i>M. reidae</i>	49	ZPII607-07	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
23	ZPLMX553-06	<i>M. reidae</i>	50	ZPII608-07	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
24	ZPLMX175-06	<i>M. montezumae</i>	51	ZPII609-07	<i>M. cf. albuquerquensis</i>
25	ZPLMX177-06	<i>M. montezumae</i>	52	ZPII606-07	<i>M. patzcuarensis</i>
26	ZPLMX563-06	<i>M. montezumae</i>	53	CTM093-10	<i>M. patzcuarensis</i>
27	ZPLMX564-06	<i>M. montezumae</i>	54		

Procesos de diversificación biológica en copépodos de la Cuenca Oriental

Acanthocyclops

#	# Identificación	Especie	#	# Identificación	Especie
1	SACOP025-08	<i>A. sp.</i>	33	ZPLIV709-11	<i>A. americanus</i>
2	SACOP026-08	<i>A. sp.</i>	34	ACSD191-16	<i>A. americanus</i>
3	SACOP028-08	<i>A. sp.</i>	35	BACZP395-16	<i>A. americanus</i>
4	SACOP035-08	<i>A. sp.</i>	36	BACZP440-16	<i>A. americanus</i>
5	OZFWZ294-11	<i>A. sp.</i>	37	CAISN019-12	<i>A. americanus</i>
6	OZFWZ309-11	<i>A. sp.</i>	38	CAISN045-12	<i>A. americanus</i>
7	BACZP303-15	<i>A. sp.</i>	39	CAISN058-12	<i>A. americanus</i>
8	BACZ0367-15	<i>A. sp.</i>	40	CAISN064-12	<i>A. americanus</i>
9	CRCN010-09	<i>A. sp.</i>	41	CAISN090-12	<i>A. americanus</i>
10	MOBIL6486-17	<i>A. capillatus</i>	42	CAISN930-13	<i>A. americanus</i>
11	EES049-12	<i>A. vernalis</i>	43	EES002-12	<i>A. americanus</i>
12	EES050-12	<i>A. vernalis</i>	44	EES003-12	<i>A. americanus</i>
13	EES051-12	<i>A. vernalis</i>	45	EES004-12	<i>A. americanus</i>
14	EES052-12	<i>A. vernalis</i>	46	EES005-12	<i>A. americanus</i>
15	EES053-12	<i>A. vernalis</i>	47	EES006-12	<i>A. americanus</i>
16	BACZP330-15	<i>A. vernalis</i>	48	EES007-12	<i>A. americanus</i>
17	EES053-12	<i>A. robustus</i>	49	EES008-12	<i>A. americanus</i>
18	EES043-12	<i>A. robustus</i>	50	EES009-12	<i>A. americanus</i>
19	EES044-12	<i>A. robustus</i>	51	EES010-12	<i>A. americanus</i>
20	EES045-12	<i>A. robustus</i>	52	EES011-12	<i>A. americanus</i>
21	EES046-12	<i>A. robustus</i>	53	EES012-12	<i>A. americanus</i>
22	EES047-12	<i>A. robustus</i>	54	EES013-12	<i>A. americanus</i>
23	BACZP312-15	<i>A. robustus</i>	55	EES014-12	<i>A. americanus</i>
24	MGOCF004-16	<i>A. americanus</i>	56	EES015-12	<i>A. americanus</i>
25	GBA14421-13	<i>A. americanus</i>	57	EES016-12	<i>A. americanus</i>
26	ZPLII1339-11	<i>A. americanus</i>	58	EES017-12	<i>A. americanus</i>
27	ZMIII983-12	<i>A. americanus</i>	59	EES018-12	<i>A. americanus</i>
28	ZPLIV605-11	<i>A. americanus</i>	60	EES019-12	<i>A. americanus</i>
29	ZPLIV606-11	<i>A. americanus</i>	61	EES020-12	<i>A. americanus</i>
30	ZPLIV609-11	<i>A. americanus</i>	62	EES021-12	<i>A. americanus</i>
31	ZPLIV695-11	<i>A. americanus</i>	63	EES022-12	<i>A. americanus</i>
32	ZPLIV708-11	<i>A. americanus</i>	64	EES023-12	<i>A. americanus</i>

Procesos de diversificación biológica en copéodos de la Cuenca Oriental

#	# Identificación	Especie			
65	EES024-12	<i>A. americanus</i>			
66	EES025-12	<i>A. americanus</i>			
67	EES026-12	<i>A. americanus</i>			
68	EES027-12	<i>A. americanus</i>			
69	EES028-12	<i>A. americanus</i>			
70	EES029-12	<i>A. americanus</i>			
71	EES030-12	<i>A. americanus</i>			
72	EES031-12	<i>A. americanus</i>			
73	EES032-12	<i>A. americanus</i>			
74	EES033-12	<i>A. americanus</i>			
75	EES034-12	<i>A. americanus</i>			
76	EES035-12	<i>A. americanus</i>			
77	EES036-12	<i>A. americanus</i>			
78	EES037-12	<i>A. americanus</i>			
79	EES038-12	<i>A. americanus</i>			
80	EES039-12	<i>A. americanus</i>			
81	EES040-12	<i>A. americanus</i>			
82	EES041-12	<i>A. americanus</i>			
83	EES042-12	<i>A. americanus</i>			

Apéndice 3. Secuencia (*pipeline*) de comandos y filtros bioinformáticos para la obtención de los SNP's desarrollada por la Dra. Katie y modificada por el Dr. Arturo Alcántara Rodríguez.

Tassel UNEAK pipeline

#1 UFastqToTagCountPlugin

```
./run_pipeline.pl -Xms1g -Xmx30g -fork1 -UFastqToTagCountPlugin -w  
/home/hemiptero/genomics/GBS/tesisOmar/uneak -e ApekI -endPlugin -runfork1
```

#2 UMergeTaxaTagCountPlugin

```
./run_pipeline.pl -Xms1g -Xmx30g -fork1 -UMergeTaxaTagCountPlugin -w  
/home/hemiptero/genomics/GBS/tesisOmar/uneak -c 5 -endPlugin -runfork1
```

#3 UTagCountToTagPairPlugin

```
./run_pipeline.pl -Xms1g -Xmx30g -fork1 -UTagCountToTagPairPlugin -w  
/home/hemiptero/genomics/GBS/tesisOmar/uneak -e 0.03 -endPlugin -runfork1
```

#4 UTagPairToTBTPlugin

```
./run_pipeline.pl -Xms1g -Xmx30g -fork1 -UTagPairToTBTPlugin -w  
/home/hemiptero/genomics/GBS/tesisOmar/uneak -endPlugin -runfork1
```

#5 UTBTToMapInfoPlugin

```
./run_pipeline.pl -Xms1g -Xmx30g -fork1 -UTBTToMapInfoPlugin -w  
/home/hemiptero/genomics/GBS/tesisOmar/uneak -endPlugin -runfork1
```

#6 UTBTToMapInfoPlugin

```
./run_pipeline.pl -Xms1g -Xmx30g -fork1 -UMapInfoToHapMapPlugin -w  
/home/hemiptero/genomics/GBS/tesisOmar/uneak -mnMAF 0.05 -mxMAF 0.5 -mnC 0 -mxC 1 -  
endPlug  
in -runfork1
```

VCFtools filters

```
#For more details about the filters please read the vcftools reference manual
vcftools --vcf variants.sorted.vcf --maf 0.05 --max-alleles 2 --min-alleles 2 --max-missing 0.9 -
-remove-indels --recode --out firstfilterset

# Heterozygous filter (max hetrozigosity = 0.75)
vcftools --vcf seconfilterset.recode.vcf --out het --hardy
cut -f1,2,3,4 het.hwe |sed 's/\\/t/g'> obsh
cut -f2,3 -d" " het0.75 > het0.75.txt
vcftools --vcf firstfilterset.recode.vcf --positions het0.75.txt --recode --out finalfilter.vcf
#Cleaning the taxa names
sed 's/_C5DBJACXX_7_....._X4//g' finalfilter.vcf.recode.vcf > snps.vcf
```

R Heterozygous filter

```
#!/usr/bin/R
obsh<-read.table("obsh",header=TRUE)
obsh$h_freq<-obsh$HET/(obsh$HET+obsh$HOM2.+obsh$OBS.HOM1)
het0.75<-obsh[obsh$h_freq<0.75,]
write.table(het0.75,file="het0.75",quote=FALSE)
q()
```

Bayescan

```
Get taxa names for PGDspider geste converter
grep FORMAT snps.vcf | sed 's/\\t\\n/g'|awk 'NR>14'
```

PGDspider convert snps.vcf to geste file (snps.bayescan)

```
BayeScan2.1_linux64bits -threads 26 snps.bayescan
```

```
#in R
outliers<-read.table("outlier.list", header=F)
write.table(x, file="outiers.site.name", quote=F)
```

```
#in bash
for i in $(cat outlier.list);do grep "^$i " ../outiers.site.name;done|cut -f2 -d " ">
outliers.list
```

“The most dangerous worldview is the worldview of
those who have not viewed the world”

Alexander von Humboldt