



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE IZTACALA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**DIVERGENCIA GENÓMICA INTERPOBLACIONAL EN UN ROTÍFERO  
PARTENOGENÉTICO CÍCLICO EN SISTEMAS ECOLÓGICAMENTE ESTABLES**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biol. Ana Gabriela Cruz Cruz**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Jorgeiros Pérez**  
FES IZTACALA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Servando Núñez Farfán**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM  
**Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras**  
FES IZTACALA, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, marzo, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE IZTACALA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**DIVERGENCIA GENÓMICA INTERPOBLACIONAL EN UN ROTÍFERO PARTENOGENÉTICO  
CÍCLICO EN SISTEMAS ECOLÓGICAMENTE ESTABLES**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biol. Ana Gabriela Cruz Cruz**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Jorge Ciros Pérez**  
FES IZTACALA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Servando Núñez Farfán**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras**  
FES IZTACALA, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, marzo, 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
OFICIO: CGEP/CPCB/ FESI /0199/2023  
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **02 de octubre de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** de la estudiante **CRUZ CRUZ ANA GABRIELA** con número de cuenta **413041698** con la tesis titulada **"Divergencia genómica interpoblacional en un rotífero partenogenético cíclico en sistemas ecológicamente estables"**, realizada bajo la dirección del **DR. JORGE CIROS PÉREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA  
Vocal: DRA. ELIZABETH ORTEGA MAYAGOITIA  
Vocal: DRA. DULCE ALEJANDRA ROUGON CARDOSO  
Vocal: DR. ROBERTO EDMUNDO MUNGUÍA STEYER  
Secretario: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFAN

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 22 de febrero de 2024

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**

c. c. p. Expediente del alumno  
AGNS/GGM/EARR/ggm



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de crecer académicamente y abrirme sus puertas por segunda ocasión para emprender este nuevo reto.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme realizar mis estudios de Maestría y desarrollarme profesionalmente. A su planta docente, por compartir sus conocimientos e impulsar nuestro deseo por retribuir a la sociedad. A su área administrativa por mostrar la disponibilidad y compromiso para realizar todo lo necesario para lograr concluir esta meta.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), por el apoyo otorgado mediante la beca de posgrado (CVU: 959512). Al proyecto 255788 “Evolución adaptativa en ambientes divergentes organismos zooplanctónicos lacustres como modelo ecogenómico”.

A mi tutor de tesis, el Dr. Jorge Ciro Pérez, por permitirme realizar mis estudios de posgrado en su laboratorio, por brindarme su tiempo, asesoría, apoyo, orientación, y compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Juan Servando Núñez Farfán, Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras por sus valiosos comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto de tesis.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

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

A mi hermana, por abrirme camino, y darme un propósito para mejorar constantemente, por ayudarme tantas veces e impulsarme a continuar.

Agradezco al Dr. Jorge Ciro, por compartirme su experiencia y conocimientos en ciencia, por brindarme su apoyo académico y personal durante estos años. Por haberme ofrecido múltiples oportunidades para conocerme, y eso es lo que más valoro. Lo que pueda expresar queda corto para todo lo que me ha aportado, en términos personales primero y profesionales también.

A Arturo por esas enriquecidas discusiones que me mostraron a un científico y un amigo. Gracias por el apoyo en los procesos bioinformáticos, tu disposición y amabilidad, y por compartir conmigo tus conocimientos.

A Noemi, porque aparte de ser un gran apoyo, has sido una amiga imprescindible. Sin duda gente como tú nos hace a muchos la vida mejor.

A mis compañeros del lab, todos formaron una etapa inolvidable en mi vida. Aprendí mucho de ustedes y lo que aún me queda. En especial a: Genio, Javier y Chinos que fueron testigos en esta aventura del posgrado. A Omar, por tu ayuda desinteresada, gracias por los consejos y sugerencias.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	3
Diversidad genética y su distribución	3
Diferenciación genética entre poblaciones	4
Los lagos para estudiar la diversificación	5
<b>2. ANTECEDENTES</b>	7
<b>3. OBJETIVOS</b>	10
<b>4. METODOLOGÍA</b>	11
Zona de estudio	11
Muestras	14
Mantenimiento de los cultivos	15
Variación genómica	15
Extracción de ADN y construcción de la biblioteca de secuenciación de ADN	15
Genotipificación basada en secuenciación	15
Procesamiento de datos genómicos	16
Filtrado de SNPs	16
Análisis genómicos de población	17
Análisis estadístico	17
Estructura genética poblacional	17
Diversidad genética	18
Análisis filogenéticos	19
Divergencia poblacional de loci individuales	19
Identificación de SNPs atípicos	19
Contextos genómicos de SNPs candidatos	20
<b>5. RESULTADOS</b>	20
Relaciones genéticas poblacionales	20
Estructura genética poblacional	22
Relaciones filogenéticas poblacionales	24
Diversidad genética	26
Divergencia poblacional de loci individuales	27

<b>6. DISCUSIÓN</b>	29
Estructura poblacional	29
Variación genómica	30
Análisis filogenético	33
Genes y SNPs putativos bajo selección	34
<b>7. CONCLUSIONES</b>	40
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	41
<b>ANEXO</b>	56
Anexo 1	56
Anexo 2	60
Anexo 3	61

## Índice de figuras, tablas y anexos

### Figuras

**Figura 1.** Cuenca Oriental; los cuadros rojos indican los lagos donde habitan las poblaciones de *Brachionus* sp. 'México'.

**Figura 2.** Análisis de componentes principales (PC) realizado con dos componentes para todos los loci (1,790 SNPs) de 74 clones pertenecientes a las tres poblaciones de *Brachionus* sp. 'México'. Los dos primeros componentes explicaron el 10.9% de la variación genética (PC1= 6.3 %, PC2= 4.6 %)

**Figura 3.** Análisis de discriminantes de componentes principales basado en los dos primeros componentes para calcular la probabilidad de pertenencia de cada individuo a alguna de las tres poblaciones de *Brachionus* sp. 'México'.

**Figura 4.** Análisis de probabilidad de pertenencia proporcionada por DAPC. En el eje  $\chi$  están representados los organismos de cada una de las poblaciones (cada barra vertical representa un individuo), el eje  $y$  muestra con color el nivel de probabilidad de pertenencia a un grupo genético particular. Análisis realizado con marcadores neutrales (1,653 SNP; panel superior) y con todos los marcadores (1,790 SNPs; panel inferior).

**Figura 5.** Red de expansión mínima, para todos los loci, que muestra los 74 genotipos multilocus (MLG) de las tres poblaciones de rotíferos. Todos los MLG muestran una probabilidad del 100% para una sola población. La barra de escala gris muestra la distancia genética (porcentaje de disimilitud) entre MLG; cuanto mayor sea la distancia genética, más delgada la línea. El MSN muestra que cada lago alberga un solo grupo genético.

**Figura 6.** Árbol filogenético bayesiano sin raíz construido con loci neutros. El color de la rama y nodo indica la probabilidad posterior de cada clado, siguiendo la escala vertical izquierda. La barra horizontal muestra la distancia genética.

**Figura 7.** Árbol filogenético bayesiano sin raíz construido con loci atípicos (outliers). El color de la rama y nodo indica la probabilidad posterior de cada clado, siguiendo la escala vertical izquierda. La barra horizontal muestra la distancia genética.

**Figura 8.** Diagrama de Venn que representa las relaciones de variación bajo selección entre poblaciones. Cada círculo con un color definido representa cada una de las poblaciones y los números contenidos muestran la cantidad de genes "exclusivos" o compartidos.

### Tablas

**Tabla 1.** Diferenciación genética neutral por pares entre sitios de muestreo  $F_{ST}$ . El gradiente de color representa el rango de valores.

**Tabla 2.** Diferenciación genética de valores atípicos por pares entre sitios de muestreo  $F_{ST}$ . El gradiente de color representa el rango de valores.

**Tabla 3.** Clasificación de genes en donde se encuentran los SNPs con los  $F_{ST}$  más altos. Se representa de izquierda a derecha, el porcentaje de la población que presentó el alelo alternativo, la anotación funcional del gen, su valor de diferenciación poblacional y la clasificación funcional a la que pertenece cada gen

### Anexo

**Anexo 1.** SNPs presentes en genes con anotación funcional. Se muestra la posición, el nombre de la proteína que codifica, el valor de  $F_{ST}$ , el sentido de la lectura del gen, (+) sentido, y (-) antisentido, el tipo de cambio

generado, y una descripción del cambio: el codon original y el aminoácido que codifica (*aa*), y el codón con cambio, señalando en negritas el nucleótido que cambia y el aminoácido que codifica.

**Anexo 2.** SNPs presentes en genes como proteínas hipotéticas, se muestra la posición, el valor de  $F_{ST}$ , el sentido de la lectura del gen, el tipo de cambio generado, y una descripción del cambio: el codón original el aminoácido que codifica y el codón con cambio señalado en negritas el nucleótido que cambio y el aminoácido que codifica.

**Anexo 3.** SNPs presentes en regiones intrónicas, se muestra la posición, la anotación funcional del gen sobre el que se encuentra y el valor de  $F_{ST}$ .

## RESUMEN

En el estudio de la variación y la variabilidad genética en rotíferos se ha documentado la importancia de las divergencias ecológicas y las respuestas adaptativas sobre la estructura de las poblaciones, así como los patrones de flujo genético restringido entre las poblaciones de una misma unidad geográfica. Los lagos cráter de la Cuenca Oriental, México, son profundos, permanentes y notablemente disímiles en sus condiciones ecológicas que, a pesar de su cercanía geográfica ( $\leq 15$  km), han dado lugar a patrones de adaptación local divergente en las poblaciones de rotíferos *Brachionus* sp. 'México'. En esta tesis, utilizamos un enfoque de 'escaneo' del genoma por medio de genotipificación basada en secuenciación (SBG) en 74 clones de tres poblaciones (25 de Alchichica, 28 de La Preciosa y 21 de Atexcac). Como resultado se identificaron y genotiparon 1,790 SNPs de alta calidad. Se encontró que 137 SNPs están bajo selección con firmas de selección diversificadora. Se ubicaron 52 SNPs dentro de genes con anotación funcional y se analizaron 14 SNPs con las medidas de diferenciación poblacional más elevadas para proporcionar una visión general de las categorías funcionales sobre las que está actuando la selección. El estudio demostró la existencia de una estructura poblacional moderada, con una diferenciación genética promedio entre loci y sitios de muestreo de  $F_{ST} = 0.068$ ; sin embargo, las poblaciones muestran altos niveles de variación genética ( $H_e = 0.364$ ), y existe una mayor diversidad genética dentro de las poblaciones que entre poblaciones (AMOVA;  $p \leq 0.05$ ), lo cual indica que las tres poblaciones locales comparten una gran proporción de la diversidad total. Los análisis de agrupamiento (MSN, DAPC, STRUCTURE) identifican tres conjuntos de genotipos independientes que corresponden a cada lago. Los análisis filogenéticos bayesianos no son concluyentes, sugieren que entre poblaciones existen tasas de flujo genético histórico. Estos hallazgos proporcionan evidencia de selección divergente, como lo muestra el conjunto de regiones candidatas a selección diversificadora. Los SNPs que se encontraron fuera del patrón de neutralidad esperado poseen una  $F_{ST}$  media de  $0.389 \pm 0.230$  y, se ubican dentro de genes que mostraron una variedad de ontologías genéticas, que podrían estar relacionados con la reproducción sexual, con genes relacionados a la meiosis, la compensación frente a la osmoregulación, además de genes implicados en hacer frente al daño que pueda estar causado el enfrentamiento al estrés osmótico. Sin embargo, estas inferencias deben tomarse con precaución ya que, están limitadas por la falta de conocimiento preciso de la función de los genes. Los resultados muestran cómo las condiciones ecológicas divergentes propician respuestas adaptativas genómicas a las condiciones locales en poblaciones naturales de rotíferos que habitan lagos profundos, además de mostrar el alto potencial evolutivo de las poblaciones locales, lo cual es relevante para comprender la dinámica de los cambios de rasgos en las poblaciones naturales de organismos zooplanctónicos lacustres.

## ABSTRACT

The study of genetic variation and variability in rotifers has documented the importance of ecological and adaptative responses on populations structure, as well as patterns of restricted gene flow between populations within a single geographic unit. The crater lakes in the Oriental Basin, Mexico, which are deep, permanent and remarkably dissimilar in their ecological conditions, despite their geographic proximity ( $\leq 15$  km), have led to divergent local adaptation patterns in populations of the rotifer *Brachionus* sp. 'México'. In this thesis, we used a genome scanning approach by sequencing-based genotyping (GBS) on 74 clones from three populations (25 from Alchichica, 28 from La Preciosa and 21 from Atexcac). As a result, 1,790 high-quality SNPs were identified and genotyped. A total of 137 SNPs were found to be under selection with diversifying selection signatures. Fifty-two SNPs were located within functionally annotated genes, and 14 SNPs with the highest measures of population differentiation were analyzed to provide an overview of the functional categories on which selection is acting. This study demonstrated the existence of a moderate population structure, with average genetic differentiation between loci and sampling sites of  $F_{ST} = 0.068$ ; however, populations show high levels of genetic variation (AMOVA;  $p \leq 0.05$ ), indicating that the three local populations share a large proportion of the total diversity. Clustering analyses (MSN, DAPC, STRUCTURE) identify three independent sets of genotypes corresponding to each lake. Bayesian phylogenetic analyses are inconclusive, suggesting historical rates of gene flow between populations. These findings provide evidence of divergent selection, as shown by the set of candidate regions for diversifying selection. SNPs that were found outside the expected neutrality pattern have an average  $F_{ST} = 0.389 \pm 0.230$ , that belong to genes that showed a variety of gene ontologies, which could be related to sexual reproduction, genes related to meiosis, compensation against osmoregulation, as well as genes involved in addressing the harm that may be caused by osmotic stress. However, these inferences should be taken with caution since they are limited by the lack of precise knowledge of gene function. Our results show how divergent ecological conditions lead to genomic adaptive responses to local conditions in natural populations of rotifers inhabiting deep lakes, as well as showing the high evolutionary potential of local populations, which is relevant to understand the dynamics of trait changes in natural populations of lake zooplankton organisms.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los individuos de una población o especie determinada no son genéticamente idénticos. Sus secuencias de ADN difieren entre sí y estas diferencias determinan la diversidad genética, es decir, para un locus dentro de una población es posible reconocer distintas variantes alélicas en los individuos que, en general, conforman lo que se conocen como polimorfismos genéticos (Nei, 2000). La naturaleza variable de los genes y las secuencias del genoma se han identificado como un aspecto clave de la evolución biológica dado que la diversidad genética es la base de la capacidad de una especie para responder a los cambios ambientales. Por ello, conocer su origen y distribución se ha convertido en un tema central para la biología evolutiva (Hedrick, 2011).

El polimorfismo genético de cualquier población particular ha sido moldeado por su historia demográfica. Las poblaciones naturales a menudo tienen historias complejas que consisten en fases de expansión y contracción del tamaño poblacional, fluctuaciones debidas a cambios ambientales bióticos o abióticos, que probablemente afectan a la mayoría de las especies vivas (Bjornstad & Grenfell, 2001; Sun *et al.*, 2015). Los factores ecológicos responsables de tales fluctuaciones ocasionan que una población esté parcialmente aislada y las fuerzas estocásticas y/o selectivas moldean la variación genética de manera diferencial lo que, a su vez, afecta los patrones de flujo genético y apareamiento.

La diversidad genética es la base de la adaptación de las especies a ambientes divergentes. La combinación de diversidad genética nueva, a través de la mutación, y la diversidad genética existente, producto de mutaciones previas, es necesaria para que ocurra la adaptación de las especies a cambios ambientales. Desde un punto de vista teórico, se puede pensar que la diversidad genética refleja el equilibrio entre la aparición y desaparición de variantes genéticas (alelos). El análisis de los polimorfismos genéticos mediante distintas herramientas moleculares (Putman & Carbone, 2014; Kagale *et al.*, 2016) y estadísticas, permite realizar inferencias respecto a los procesos microevolutivos y los factores ambientales que afectan la diversidad genética y su distribución en las poblaciones (Sunnucks, 2000).

### **Diversidad genética y su distribución**

Las especies se distribuyen en poblaciones que no son infinitas ni continuas (Holsinger & Weir, 2009). La interacción histórica y reciente entre la dinámica geológica, climática y las demandas ecológicas y fisiológicas de los organismos, ha dado lugar a patrones de distribución discontinuos, donde las poblaciones se mantienen aisladas por combinaciones de variables ambientales y/o barreras físicas que restringen el intercambio genético (Orsini *et al.*, 2012; Gavin *et al.*, 2014). Dichas poblaciones pueden representarse como grupos entre los cuales la variación genética difiere claramente, existiendo una estructura genética poblacional (Corander *et al.*, 2008).

Podemos pensar que las especies están conformadas por una serie de poblaciones conectadas por flujo génico y el conjunto de todas las poblaciones entre las que hay flujo génico constituye a una especie ya que el nivel de flujo genético determina hasta qué grado cada población de una especie constituye una unidad evolutivamente independiente (Slatkin, 1993;

Munshi-South, 2012). Los conjuntos de hábitats locales que están conectados por dispersión, y las poblaciones en cada hábitat local interactúan entre ellas, y responden a las características ambientales las cuales pueden influir en la diversificación adaptativa (Olivier *et al.*, 2016). Las poblaciones pueden desarrollar características favorables para su ambiente local, a pesar de que dichas características pudieran ser desfavorables en otros ambientes (Nosil & Feder, 2012). Por lo tanto, las variantes genéticas favorecidas en dicho ambiente tendrán, en promedio, una mayor eficacia biológica que los genotipos inmigrantes (Via & Hawthorne, 2002). Es de esperarse que la divergencia genética entre dichas poblaciones sea proporcional a las diferencias genéticas y fenotípicas originadas por las diferencias ambientales (Crispo *et al.*, 2006; Lee & Mitchell-Olds, 2011), por lo tanto, mientras más diferencias ambientales (mayor número de variables divergentes) haya entre dos poblaciones, menor será el flujo genético entre ellas y habrá una mayor divergencia genética (Nosil & Feder, 2012).

Durante el proceso de diversificación adaptativa, surge la diferenciación genética en genes neutrales y adaptativos entre poblaciones (Nosil *et al.*, 2008; Funk *et al.*, 2011). Cuando las poblaciones habitan en localidades con diferencias ambientales, la selección natural tiende a producir un cambio evolutivo a través de un favorecimiento diferencial de la reproducción de ciertos individuos con ciertos genes. La selección natural no produce cambios genéticos, sino que una vez que el cambio ha ocurrido actúa favoreciendo a unos alelos sobre otros (Räsänen & Hendry, 2008). Así, la selección disruptiva de un tipo ancestral común impulsa la creación de ecotipos diversificados a través de una serie de cambios genéticos adaptativos (Dieckmann & Doebeli, 1999) y no adaptativos (Funk *et al.*, 2011; Orsini *et al.*, 2013).

### **Diferenciación genética entre poblaciones**

Los conocimientos sobre los procesos genéticos que sustentan la adaptación de las poblaciones naturales a los cambios ambientales son cruciales, sin embargo, existe información limitada del genoma en especies genéticas no modelo y, por el otro lado, una falta de un contexto ecológico en las especies modelo (Stapley *et al.*, 2010).

Los métodos *next-gen* permiten secuenciar múltiples partes del genoma, por lo que es posible estudiar genomas de organismos no modelo (Ekblom & Galindo, 2011), por ejemplo, la *genotipificación basada en secuenciación* (SBG), mediante el uso de enzimas de restricción toma una muestra reducida del genoma, de esta forma es posible identificar la fuente más común de variación genética en los genomas, mutaciones puntuales de la línea germinal que ocurren de forma natural en el curso de la evolución (Bostein & Risch, 2003), llamados polimorfismos de base única SNP o polimorfismos de un solo nucleótido. Mediante la secuenciación *next-gen* es posible secuenciar miles de loci para cientos de individuos, independientemente del tamaño y conocimiento previo del genoma. Asimismo, permite identificar regiones genómicas específicas que pueden haber experimentado la selección natural y mejorar la precisión de las inferencias demográficas al aumentar en gran medida el número de marcadores putativamente neutrales analizados (Mastreta-Yanes *et al.*, 2015); es decir, se obtiene un análisis detallado de la estructura genética de las poblaciones (ver cómo cambian las frecuencias de los alelos en el espacio), analizar la historia demográfica y proponer *genes candidatos* para adaptaciones ambientales específicas (Flaxman *et al.*, 2012; Feder *et al.*, 2014).

La detección de genes candidatos es posible debido a que presentan frecuencias alélicas altamente diferenciadas. La gran mayoría del genoma, que es neutral, evolucionará de acuerdo con un equilibrio migración/deriva debido a eventos de recombinación. Mientras que la probabilidad de que un gen bajo selección aumente en frecuencia depende de la interacción entre el flujo genético y la selección natural que homogeniza o hace que diverjan las frecuencias alélicas, respectivamente (Hedrick, 2011). La selección actúa sobre aquellos loci involucrados en procesos adaptativos, y también puede presentarse en un vínculo físico con un locus debido al ligamiento físico (Meirmans & Hedrick, 2010).

La detección de señales de selección en el genoma y posteriormente la identificación de los rasgos que están determinados por esos genes, es especialmente útil cuando no se dispone de un conocimiento *a priori* de la divergencia genética en rasgos cuantitativos entre poblaciones (enfoque QTL) o de los genes involucrados en los procesos de selección (enfoque de genes candidatos) (Luikart *et al.*, 2003; Storz, 2005). También es posible identificar loci candidatos sin tener una hipótesis ambiental *a priori*. Aquellos marcadores que tengan un componente local significativo podrían estar bajo selección diferencial (si la diferenciación es elevada) o balanceadora (si la diferenciación es baja) (Excoffier *et al.*, 2009).

Para cuantificar las diferencias entre y dentro de las poblaciones naturales, los estadísticos  $F$  de Wright funcionan como una herramienta (Hedrick, 2011). Estas diferencias en las frecuencias alélicas se relacionan de manera predecible con las tasas de ciertos procesos evolutivos (Holsinger & Weir, 2009). El estadístico de fijación  $F_{ST}$ , es una medida con un rango de 0, si tienen exactamente los mismos alelos en las mismas frecuencias, hasta 1, si no comparten ningún alelo (Wright, 1951). Sin embargo, resulta complicado distinguir la distribución de  $F_{ST}$  real de genes neutrales (De Mita *et al.*, 2013). Esto genera que muchos de los genes que se detectan como atípicos puedan ser *falsos positivos*, y que su alta diferenciación genética se deba a procesos no adaptativos, como el desequilibrio de ligamiento, donde los genes adyacentes a los genes bajo selección también son arrastrados por la selección natural, los cambios en las tasas de mutación, o los mismos procesos demográficos, ya que los procesos demográficos afectan a todo el genoma (Meirmans & Hedrick, 2010), por lo que es conveniente tener muchas poblaciones y estimar mejor los parámetros de diferenciación (De Mita *et al.*, 2013).

Sin embargo, asignar sin ambigüedades las causas de la selección natural dentro de los regímenes de selección multidimensional en la naturaleza es un desafío (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2010). Con el uso de métodos de secuenciación masiva y estadísticos, por un lado, y de información ecológica detallada, por otro, es posible avanzar en estudios que aborden la adaptación local y la divergencia ecológica (Martins *et al.*, 2017).

### **Los lagos para estudiar la diversificación**

Los lagos son entornos donde se espera que las tasas de diversificación sean más altas que en otros sistemas marinos o terrestres, porque cada cuerpo de agua es el resultado de una combinación de factores abióticos que incluyen regímenes climáticos, geología regional, actividad tectónica y factores biológicos los cuales construyen una estructura comunitaria y por lo tanto interacciones bióticas únicas. El conjunto de varios lagos aislados geográficamente constituye un tipo de sistema insular integrado por elementos independientes (Wilson & Bossert, 1971), por lo

tanto, la adaptación a diferentes entornos puede resultar en adaptación local; esto es debido a que cada cuerpo de agua continental posee una salinidad y composición iónica única (Libes, 2009).

En los hábitats acuáticos continentales, el zooplancton muestra una alta capacidad de dispersión y colonización (Louette & De Meester, 2005). Sin embargo, el flujo génico entre las poblaciones que habitan en sistemas vecinos es relativamente bajo, es decir, la diferenciación genética puede ser elevada (Gómez *et al.*, 2002). La estructura poblacional frecuentemente observada en estas poblaciones es debida a la interacción de las fuerzas evolutivas especialmente durante la colonización (Badosa *et al.*, 2017). La persistencia de eventos fundadores, resultado de la colonización por unos pocos individuos, las altas tasas de crecimiento, que generan una ventaja numérica de los primeros colonos (Gómez *et al.*, 2002), rápida adaptación genética a las condiciones locales (Orsini *et al.*, 2013), y la acumulación de grandes bancos de *huevos de resistencia* (Brendonck & De Meester, 2003), puede conducir a la monopolización de recursos por genotipos descendientes de los fundadores iniciales (De Meester *et al.*, 2002).

Estos procesos se conocen como la ‘hipótesis de la monopolización’ (De Meester *et al.*, 2002), que es especialmente relevante para los organismos zooplanctónicos partenogenéticos cíclicos, como los rotíferos monogonontes y los cladóceros. Estos organismos combinan la proliferación clonal con episodios ocasionales de reproducción sexual que dan como resultado la producción de huevos diapáusicos. Estos huevos son de vida larga y pueden persistir en los sedimentos de los lagos cuando las condiciones ambientales son adversas (Serra & King, 2003). En poblaciones de rotíferos *Brachionus* y la pulga de agua *Daphnia*, los eventos fundadores persistentes dan como resultado niveles bajos de flujo de genes entre estanques cercanos y una diferenciación genética alta (Gómez *et al.*, 2002; Haag *et al.*, 2006). Además, las poblaciones de estos organismos muestran signos de adaptación local a la salinidad y la temperatura en rasgos de historia de vida (Campillo *et al.*, 2011; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

En esta tesis, se identificó la variación genética poblacional y exploramos además la variación que subyace a la adaptación local en *Brachionus* sp. ‘México’ (Mills *et al.*, 2017), un rotífero que habita tres lagos en la Cuenca Oriental con características limnológicas diferentes. Se ha sugerido una subdivisión de las poblaciones de acuerdo con las evidencias ecofisiológicas, ecológicas y genéticas hasta ahora reportadas (Alcántara-Rodríguez, 2018). Si se parte de la base que la limitación de flujo génico, en conjunto con la acumulación de mutaciones y la adaptación a condiciones locales resultan en la divergencia genética entre poblaciones, entonces, en esta investigación aprovechamos un sistema de estudio de poblaciones ya caracterizado ecológicamente para estudiar su variación a una escala más fina, mediante el uso de la genotipificación basada en secuenciación (SBG) y la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). De esta forma, se busca inferir los mecanismos evolutivos a los que han estado sujetas estas poblaciones.

## 2. ANTECEDENTES

Estudios previos han evaluado la variación genética inherente en diversos organismos zooplanctónicos de aguas continentales. Como se describió anteriormente, la dispersión y la adaptación local son impulsores clave de la distribución de especies y la estructura de las comunidades, por lo tanto, son fundamentales para comprender la biodiversidad acuática. Por ejemplo, analizando al crustáceo anóstraco *Artemia franciscana*, que ha colonizado diversos ambientes a través de la dispersión por aves acuáticas, Frisch *et al.* (2021) determinaron la importancia relativa del aislamiento por distancia y por el ambiente utilizando el gen COI y cinco marcadores de microsatélites nucleares en la estructuración genética espacial en 15 poblaciones provenientes de lagos salinos del centro de Canadá. Encontraron una estructura genética significativa entre las poblaciones, el 30% de la variación en la estructura genética se explica por aislamiento por ambiente. Sin embargo, no está relacionada con la distribución geográfica. Describen una fuerte relación entre el patrón de divergencia observado y el entorno hidroquímico de los lagos. Esto sugiere que la geoquímica es importante en la radiación adaptativa de estos crustáceos anóstracos, afectando también a la variación genética intraespecífica entre poblaciones, promoviendo el aislamiento por ambiente, ocasionando que la dispersión sea ineficaz cuando las aves mueven los quistes entre lagos con diferente hidroquímica.

En busca de señales de las respuestas adaptativas en poblaciones provenientes de ambiente natural, Orsini *et al.* (2012) han identificado genes candidatos responsables de la adaptación a múltiples estresores naturales y antropogénicos en poblaciones naturales del cladóceros *Daphnia magna*. Estos investigadores evaluaron 19 poblaciones de *D. magna* que habitan estanques poco profundos distribuidos a lo largo de fuertes gradientes ambientales en Bélgica, que han sido identificados como inductores de respuestas microevolutivas en esta especie, como la presión a la depredación por peces, la infección del endoparásito *Pasteurina ramosa* y la intensidad del uso de suelo. Estas poblaciones fueron genotipadas por microsatélites y SNPs en busca de vincular la diversidad genómica con la variabilidad ambiental, encontrando evidencia de selección a nivel de genoma e identificando genes candidatos vinculados a los tres factores ambientales estresantes, lo que proporciona evidencia de patrones repetibles de adaptación local en un mosaico geográfico de factores estresantes ambientales. Estos resultados implican un alto potencial evolutivo de las poblaciones locales, lo cual es relevante para comprender la dinámica de los cambios en los rasgos de las poblaciones naturales y su impacto en las respuestas de la comunidad y el ecosistema a través de una retroalimentación eco-evolutiva.

Las fluctuaciones ambientales son omnipresentes y, por lo tanto, esenciales para el estudio de la adaptación. Los lagos salinos de la región mediterránea son notablemente diversos en sus condiciones ecológicas, dando lugar a patrones de adaptación locales divergentes en los organismos acuáticos que los habitan. Franch-Gras *et al.* (2018) estudiaron los patrones de variabilidad genética y diferenciación del genoma del rotífero facultativamente sexual *Brachionus plicatilis* en respuesta a la predictibilidad ambiental usando SBG. Analizaron clones de *B. plicatilis* de nueve lagos salados españoles que difieren en las condiciones de predictibilidad ambiental y, a la cual, se ha demostrado que las poblaciones que los habitan presentan patrones de adaptación local. Los patrones de variación genética de todo el genoma no revelaron una estructura de población con base geográfica (la diferenciación general de la población  $F_{ST} = 0.18$ ), sin embargo, se identificaron regiones candidatas con presencia de selección diversificadora, algunas de ellas

están correlacionadas con la predictibilidad ambiental y otras con rasgos de historia de vida y otros factores ecológicos. Además, encontraron un gran conjunto de genes que muestran firmas de selección equilibradora proporcionando evidencia genómica de adaptación a las condiciones locales en las poblaciones naturales de rotíferos. Estos resultados proporcionan evidencia de respuestas adaptativas genómicas a las condiciones locales en poblaciones naturales de rotíferos, asociadas al grado de predictibilidad ambiental.

En la Cuenca Oriental Mexicana, el copépodo *Leptodiptomus* grupo *sicilis* que habita cuatro lagos con características limnológicas contrastantes, muestra diferenciación ecológica (Barrera-Moreno *et al.*, 2015) y de aislamiento reproductivo precigótico por inviabilidad de los migrantes, además de aislamiento reproductivo postcigótico por inviabilidad del híbrido entre al menos dos de estas poblaciones (Barrera-Sánchez, 2016). También poseen un patrón de diversificación, con diferencias en la diversidad genética, se identificaron un conjunto de marcadores atípicos que revelaron una estructura particular para cada población han divergido en cuatro clados independientes, perfectamente definidos asociados a divergencia de hábitat, lo que sugiere que son resultado de historias evolutivas independientes promovidas principalmente por la selección natural divergente y nichos ecológicos contrastantes (Urban-Olivares, 2019; Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2022).

El rotífero *Brachionus* sp. 'México', presente en tres ambientes heterogéneos, desde una salinidad relativamente alta de 9 g L<sup>-1</sup> (lago Alchichica), pasando por una salinidad de 6.5 g L<sup>-1</sup> (lago Atexcac), hasta un hábitat dulceacuícola 1.1 g L<sup>-1</sup> (lago La Preciosa). Comparten un haplotipo del gen COI y la ausencia de divergencia importante entre las secuencias sugiere que la adaptación se ha originado después de la colonización de los lagos y que las tasas de inmigración de otros haplotipos han sido muy limitadas o ausentes. Además, se sugiere que la población que habita en el lago dulceacuícola de esta especie halófila se ha adaptado a las condiciones del lago (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Los análisis sugieren un efecto fundador a partir de un solo evento de colonización relativamente reciente y, posterior a este evento, se dio una dispersión hacia los demás lagos, aunado a una tasa de migración muy restringida (Alcántara-Rodríguez, 2018). Sin embargo, los estudios genómicos previos en *B.* sp 'México' están limitados por el tamaño de la muestra y el número de loci genéticos (Alcántara-Rodríguez, 2018), lo que requiere más estudio, pero proporciona la base para la comparación de la historia natural de la especie.

Así, en esta tesis, generamos un gran conjunto de datos de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) utilizando genotipificación basada en secuenciación (SBG) de muestras recolectadas de los diferentes ambientes donde habita *Brachionus* 'México' para: 1) identificar la variación genética existente entre las poblaciones, 2) descubrir loci candidatos potencialmente involucrados en la adaptación local, basándonos en la premisa de que los loci bajo selección divergente muestran una mayor variación en las frecuencias alélicas entre las poblaciones que las regiones genómicas neutras (valores atípicos; Lewontin y Krakauer, 1973). Por lo tanto, los SNP que muestran una mayor diferenciación de población ( $F_{ST}$ ) que las expectativas neutras pueden ser indicativos de una adaptación local. Y, 3) finalmente asociar los loci putativos bajo selección a genes anotados, utilizando un genoma de referencia de una especie filogenéticamente cercana (*B. plicatilis*).

Los resultados en este trabajo permitirán analizar la estructura genética y las “firmas de selección”, lo que permitirá la identificación de patrones adaptativos y, en un futuro, su relación con aspectos fisiológicos, morfológicos y ecológicos, generando una explicación a las adaptaciones particulares que poseen las poblaciones en cada uno de sus ambientes.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Analizar la divergencia interpoblacional genética del rotífero partenogenético cíclico *Brachionus* sp. 'México' que habita los lagos cráter, profundos, monomícticos cálidos de la Cuenca Oriental (Alchichica, La Preciosa y Atexcac).

#### Objetivos particulares

- Identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) por medio de genotipificación basada en secuenciación (SBG).
- Analizar los niveles de variación genómica, la estructura genética y el flujo génico entre las poblaciones de los tres lagos de la Cuenca Oriental.
- Relacionar la divergencia genómica interpoblacional con regiones genómicas conocidas comparando con un genoma de referencia.

## 4. METODOLOGÍA

### Zona de estudio

La Cuenca Oriental abarca las zonas limítrofes de los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz, entre los 18°57' y los 19°44' de latitud Norte, es decir, en la zona tropical del país (Fig. 1). Presenta altitudes que van desde los 2,300 m s.n.m. en la mayor parte de la superficie de la cuenca, hasta los 4,461 m s.n.m. La planicie presenta un clima que está influido principalmente por la altitud, la exposición de vientos secos y la sombra orográfica que producen las montañas cercanas (Ramírez & Novelo, 1984), que ayudan a detener los vientos húmedos (alisios) provenientes del Golfo de México, confiriéndole, así, un clima templado semiárido con lluvias en invierno, pero en latitudes tropicales (García, 1988; Vilaclara *et al.*, 1993). Su precipitación total anual es de 500 mm y mantiene un rango de temperatura media anual entre 16 y 23°C (Armienta *et al.*, 2008).

En esta cuenca existen seis lagos-cráter (*maars*), los cuales reciben el nombre local de *axalapascos* (término compuesto derivado del náhuatl, que significa “olla de arena y agua”). Tecuitlapa, Alchichica, Quechulac, La Preciosa, Atexcac y Aljojuca se originaron por actividad magmática, explosiones freáticas o freatomagmáticas (Chako-Tchamabe *et al.*, 2020). Estos elementos fisiográficos se encuentran inmersos en una amplia planicie aluvial. La principal fuente de agua es aportada por la infiltración del manto freático a través del suelo de la zona muy permeable. Las características del agua de estos lagos evidencian el origen subterráneo de ésta, ya que, por su interrelación con las rocas y sedimentos subterráneos, el agua presenta diversos grados de salinidad y composición química que varían de un lago a otro. La alimentación del lago depende directamente de los mantos acuíferos, los que a su vez se recargan con agua pluvial (Arredondo-Figueroa, 2002; Caballero *et al.*, 2003; Alcocer-Durand *et al.*, 2004).

El comportamiento termodinámico típico de los lagos profundos de México es de tipo monomítico cálido, con circulación en el invierno y estratificación el resto del año (Lewis, 2000). La columna de agua se rige por períodos de mezcla y estratificación térmica que generan fluctuaciones temporales y espaciales en las variables físicas y químicas, determinando la sucesión de las comunidades biológicas al influenciar su composición y densidad (Oliva *et al.*, 2001).

En tres de estos lagos habita el rotífero monogononte denominado *Brachionus* sp. ‘México’, estos lagos se encuentran a una altura de 2,340 m s.n.m., son endorreicos, cercanos entre sí (<20 Km) y son influenciados por condiciones climáticas y edáficas similares.

#### – Lago Alchichica

El lago Alchichica se localiza en las coordenadas 19°24'N, 97°24'W, en la planicie “Llanos de San Juan”. Según una prospección batimétrica realizada en el 2002, el lago tenía una profundidad máxima de 62 m, una profundidad media de 40.9 m, una superficie de 2.3 km<sup>2</sup>, un volumen de 94,214,080 m<sup>3</sup>, una longitud máxima 1.7 km y una anchura máxima de 1.4 km (Filonov *et al.*, 2006). El agua del lago se considera salina (9 g L<sup>-1</sup>) y alcalina (pH = 9.0).

#### – Lago La Preciosa

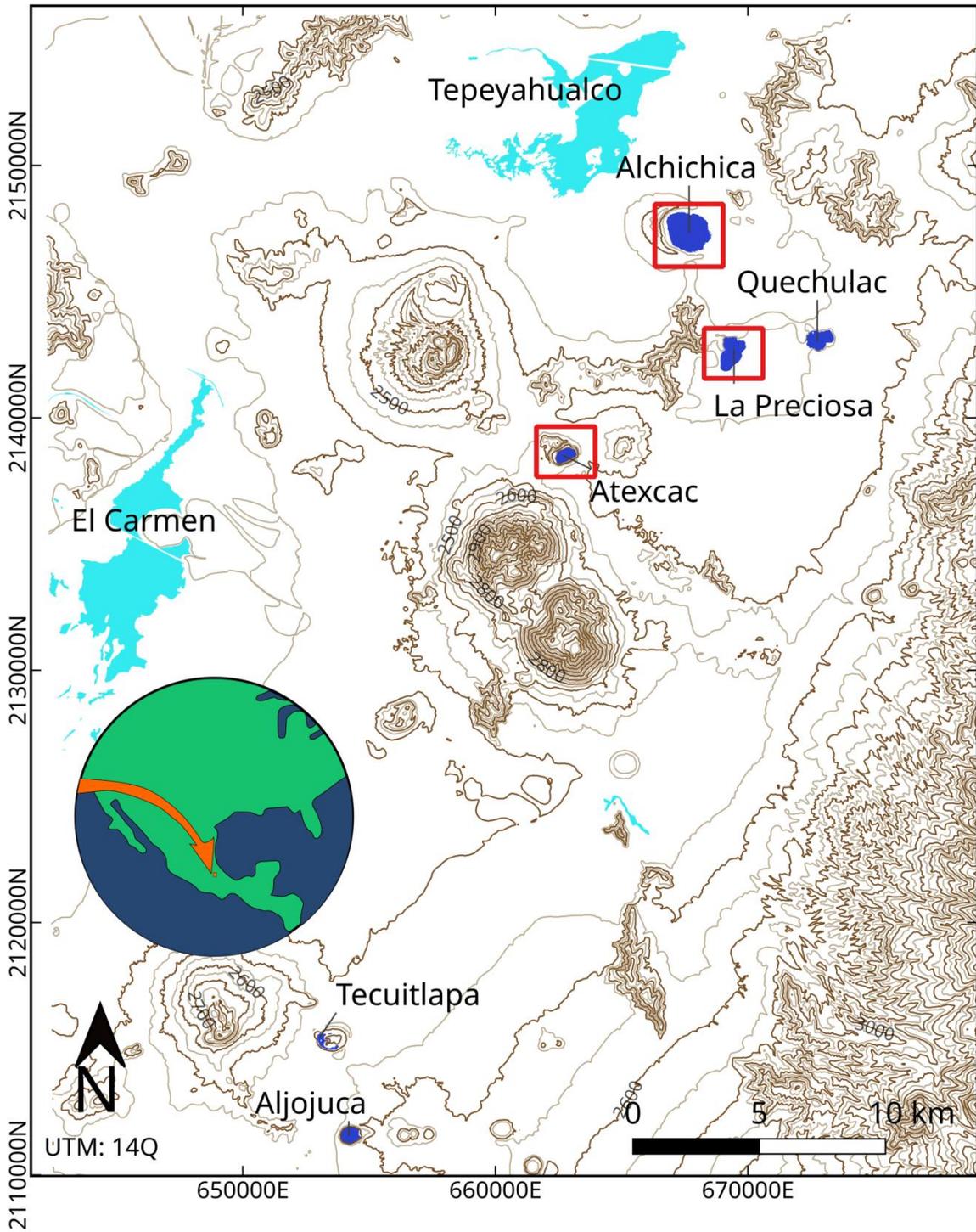
Se encuentra entre las coordenadas 19°22' N y 97°23' W, su forma es aproximadamente triangular tiene una profundidad máxima de 45 m, un área superficial de 0.78 km<sup>2</sup>, una longitud máxima de

1.34 km con orientación noreste-suroeste. (Arredondo-Figueroa, 2002). Posee una salinidad de 1.1 g L<sup>-1</sup>, lo cual no se considera como un lago salino desde el punto de vista biológico (Williams, 1964), pero tampoco lo podemos considerar estrictamente dulceacuícola pues tiene un pH alcalino (8.7).

– Lago Atexcac

Se encuentra entre las coordenadas 19°20' N y 97°27' W, su forma es aproximadamente elíptica y presenta una zona litoral muy reducida, con una longitud máxima de 0.780 km con orientación suroeste-noreste y tiene un área 0.29 km<sup>2</sup> (Carrasco-Nuñez *et al.*, 2006) con una profundidad media de 25.7 m y una profundidad máxima reportada de 35 m. Se considera un lago hiposalino debido a su concentración de salinidad 6.086 mg L<sup>-1</sup> (Armienta *et al.*, 2008). El pH varía entre 8.1 y 8.3.

# Cuenca Oriental



**Figura. 1.** Cuenca Oriental, se marca en cuadros rojos los lagos donde habitan las poblaciones de *Brachionus* sp. 'México'.

## Obtención de muestras

Se tomaron muestras de la capa superficial de los bancos de huevos inactivos de cada uno de los tres lagos por medio de una draga tipo Eckman de 25×25 cm, para capturar la diversidad genética de las poblaciones naturales sin que se vea afectada por la erosión clonal que ocurre típicamente en las poblaciones activas de especies partenogenéticas cíclicas (Vanoverbeke & De Meester, 2010), como es el caso de *Brachionus* sp. 'México'. Se colectaron los sedimentos de los 3 cm más superficiales, los cuales fueron transportados al laboratorio a una temperatura de 4°C (Hagiwara & Hino, 1989). En el laboratorio las muestras se almacenaron a 4°C y se mantuvieron en oscuridad por lo menos durante 30 días como periodo refractario (Cáceres, 1997).

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

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

A partir de los rotíferos eclosionados se establecieron 94 cultivos monoclonales (32 organismos para Alchichica, 31 La Preciosa, 31 Atexcac), las hembras neonatas se transfirieron individualmente a placas multipocillos que contenían 1 ml de medio de cultivo a 9 g L<sup>-1</sup> de salinidad, debidamente alimentados y se dejaron proliferar partenogenéticamente bajo las mismas condiciones de luz y temperatura descritos previamente.

Los cultivos de las diferentes poblaciones se traspasaron y mantuvieron en tubos de ensayo con 15 ml del medio de cultivo y estuvieron en observación y recambio constante para prevenir la reproducción sexual, hasta que fueron utilizados.

## **Mantenimiento de los cultivos**

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

## **Variación genómica**

### **Extracción de ADN y construcción de la biblioteca de secuenciación de ADN**

Se seleccionaron 10 individuos adultos (hembras sin huevo) de cada uno de los 94 clones de *B. sp.* 'México' para realizar la extracción de ADN utilizando el protocolo de extracción Hot-SHOT (Montero-Pau *et al.*, 2008), modificado. Se utilizaron 10  $\mu\text{l}$  de solución lítica, además de macerar mecánicamente, posteriormente, el producto se mantuvo en incubación a  $95^\circ\text{C}$  durante 30 min y, finalmente, se le agregó 10  $\mu\text{l}$  de neutralizador. Como la cantidad de ADN obtenida mediante esta extracción no era suficiente para poder realizar los análisis posteriores se decidió amplificar las muestras mediante el kit REPLI-g single cell (Qiagen™) obteniendo un volumen final de 12.5  $\mu\text{l}$  por muestra, llevando a cabo el procedimiento del fabricante:  $30^\circ\text{C}$  por 10 h, inactivando la reacción a  $65^\circ\text{C}$  por 3 min. La purificación del ADN amplificado se realizó mediante la precipitación del ADN con acetato de sodio 3 M y lavados con etanol al 100% y 70%, retirando el sobrenadante y el ADN se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de buffer EB (Qiagen™). La pureza se evaluó utilizando un equipo BioTek™ Epoch 2 (Agilent Technologies) y la cantidad se evaluó con Qubit™ (Fluorómetro 2.0, Invitrogen).

### **Genotipificación basada en secuenciación**

Se enviaron alícuotas de ADN de alto peso molecular, con una relación 260/280 nm que oscilaban entre 1.8-2.2 QC, a las instalaciones de secuenciación del Centro Genómico de la Universidad de Minnesota (CGUM, EUA), donde obtuvimos una representación reducida del genoma utilizando genotipificación basada en secuenciación (SBG) para el descubrimiento de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). SBG es una técnica de secuenciación en la que el ADN genómico se digiere con una o más enzimas de restricción, los adaptadores complementarios se ligan a los fragmentos que luego se amplifican y secuencian (Elshire, 2011). Como primer paso, se enviaron muestras que representarán a las diferentes poblaciones (Alchichica: 3 muestras, Atexcac: 2 muestras, La Preciosa: 3 muestras) para poder evaluar con un panel de enzimas de restricción cuál de estas generaba un mayor número de sitios de corte, lo que representa una mayor cantidad de información al generar las bibliotecas, y con las que se obtiene la mayor cobertura del genoma. Se seleccionaron las enzimas Ape KI y Mbol, para el proceso de digestión del ADN genómico. Posteriormente, se enviaron 94 muestras, 32 de Alchichica, 31 de La Preciosa y 31 de Atexcac. Los adaptadores de secuenciación de Illumina y los códigos de barras específicos de la muestra se ligaron luego a los extremos adhesivos de los fragmentos resultantes y las muestras se

combinaron en proporciones equimolares para su multiplexación. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la construcción de la biblioteca y se utilizó la tecnología de un solo extremo (150 pb) de Illumina NextSeq 550.

### Procesamiento de datos genómicos

Las lecturas de Illumina se capturaron, se ordenaron por similitud y se almacenaron en un archivo FASTQ para generar etiquetas únicas, las cuales se filtraron y demultiplexaron con calidad para eliminar la secuencia del adaptador, recuperar los códigos de barras, eliminar cualquier lectura con base no llamada, descartar las lecturas de baja calidad. Para ello, se utilizaron los programas Illumina bcl2fastq y Trimmomatic, la calidad de las secuencias se evaluó con el programa FastQC. El archivo se alineó con el genoma de referencia de *Brachionus plicatilis* (NCBI, Accession GCA\_003710015.1, disponible en [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_003710015.1/#/st](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_003710015.1/#/st); (Franch-Gras *et al.*, 2018) usando Burrows-Wheeler Aligner (BWA, versión 0.7.8-r455), establecido en la configuración predeterminada. Las etiquetas de secuencias alineadas se almacenaron en un archivo *TOMP* (TagsOnPhysicalMap; formato SAM/BAM). A continuación, se realizó un análisis de ensamble e identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), los SNPs de baja calidad se filtraron por la frecuencia mínima de alelos menores ( $mnMAF < 0.01$ ) y los datos faltantes por sitio (MDps > 10 %) con el programa Freebayes. Finalmente, se generó un archivo con las variantes identificadas entre las secuencias y entre los individuos *Variant Call Format* (VCF).

### Filtrado de SNPs

Se aplicó un conjunto de filtros para retener SNPs altamente informativos, de alta calidad y que no representan regiones repetidas, cada muestra producida tuvo una puntuación media de calidad de lectura (phred) > 30. Las lecturas se mapearon con bases de datos genómicas (humanos, ratón, *Escherichia coli*, levadura, virus PhiX y cloroplasto) para detectar la contaminación del ADN. Posteriormente, se aplicó un filtro de calidad utilizando una secuencia de comandos desarrollados a medida y *VCFTOOLS*. Para obtener genotipos asignados con confianza, se excluyeron aquellos individuos en cada muestra con > 20 % de genotipos faltantes, y variantes con llamadas faltantes en más del 5 % de las muestras, así como variantes con frecuencia mínima de alelos menores ( $mnMAF < 0.01$ ). Con estos criterios, sólo 74 individuos pasaron el filtro. Después, se aplicaron una segunda serie de filtros para conservar sólo variantes sin llamadas faltantes y eliminar sitios no informativos (MDps < 0.05), dejando las variantes presentes en al menos 4 individuos, con sólo dos alelos presentes; los marcadores con una cobertura superior a la media más dos desviaciones estándar se eliminaron y se permitió un máximo de heterocigosidad de 0.75. Por último, para reducir la influencia potencial del desequilibrio de ligamiento, se mantuvo sólo un SNP de cada fragmento de 150 pb (la longitud de las lecturas en bruto), lo que resulta en un conjunto de datos de 1,790 SNPs guardados en un archivo de variantes *VCF* (*Variant Call Format*) para análisis posteriores.

## Análisis genómicos de población

### Análisis estadístico

Todos los paquetes de R utilizados para los análisis de datos descritos en esta sección se ejecutaron en la versión 3.6.2 (R Core Team, 2015). Como primer paso, el archivo *VCF* resultante de la llamada de SNPs fue sometido a una transformación en un archivo *genlight* con el paquete *adegenet* (versión 2.1.1).

### Estructura genética poblacional

#### *Análisis de componentes principales (PCA)*

El análisis inicial de la estructura de la población se llevó a cabo mediante el análisis de componentes principales (PCA) utilizando el paquete *adegenet* (versión 2.1.1) y los resultados se representaron gráficamente utilizando el paquete *ggplot2* (versión 2.2.1). El objetivo es tratar los datos compuestos por numerosas variables y reducir su dimensionalidad identificando componentes principales (CPs) (Peres-Neto *et al.*, 2005), para poder lograrlo se generan valores propios llamados eigenvalores, los que determinan la variación de los datos de las nuevas características y vectores propios llamados eigenvectores o componentes principales que determinan las características del espacio a partir de una matriz de correlación (Ringner, 2008). Se graficaron los eigenvalores para identificar el número de PCAs que era necesario retener y explicar de mejor forma la varianza de los datos, de esta forma se seleccionaron los primeros tres componentes principales con los valores más altos y se graficaron en el PCA.

#### *Análisis discriminante de componentes principales (DPCA)*

Para comprender y describir mejor la estructura de la población sugerida por la distancia de la población por pares, utilizamos el análisis discriminante de componentes principales (DAPC) implementado en el paquete *adegenet* 2.1.3 (Jombart, 2008). Una cualidad de este análisis es que puede realizarse en ausencia de cualquier suposición sobre el modelo genético de la población subyacente, en particular con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg o el equilibrio de ligamiento, y usa el número de componentes principales y ejes discriminantes que maximizan la varianza entre poblaciones, de forma que identifica los grupos de individuos genéticamente relacionados.

El flujo de trabajo de DPCA consistió en transformar el conjunto de datos basado en PCA y luego realizar un análisis discriminante en los componentes principales (PCs) retenidos utilizando un método de validación cruzada, usamos la función *xvalDapc* para encontrar la cantidad óptima de PCs que se deben retener antes de su uso en el análisis discriminante fino. Para seleccionar el número óptimo de PCs a retener, se utilizaron 1,000 repeticiones y el 90% de los datos de entrenamiento, más las funciones de análisis discriminante (DA) para retener y, por último, se calculó y graficó el DPCA utilizando *ggplot2* (versión 2.2.1). Posteriormente, para analizar la probabilidad de pertenencia de cada muestra a cada una de las poblaciones predeterminadas, se determinó el número óptimo de grupos por el criterio de información bayesiano (BIC) y, para calcular las asignaciones de población ( $k$ ), se realizaron 1,000 repeticiones y 100 partidas elegidas al azar, tomando un rango de  $k = 1-4$ , se procedió a la selección de  $k$  con el BIC más bajo como número óptimo de clústers. Para visualizar las asignaciones posteriores de cada muestra, se utilizó *compplot*, el cual genera una gráfica compuesta que ilustra la probabilidad de pertenencia a la

población en el eje *y*, obteniendo un gráfico de barras apiladas con grupos o poblaciones en colores diferentes.

#### *Red de expansión mínima*

Además, se realizó una red de expansión mínima (MSN) que agrupa genotipos multilocus (MLG), basado en las distancias genéticas existentes entre ellos. Cada MLG es un nodo, que están conectados por la distancia mínima entre muestras y la distancia genética está representada por los bordes. Estos análisis se realizaron con el paquete *Poppr* (versión 2.7.1) a partir de las distancias de disimilitud de Hamming usando la función *bitwise.dist* y *poppr.msn*. Para poder generar la gráfica de expansión mínima, se realizaron tres pasos: 1) se creó una matriz de distancias con los datos, 2) se creó una red de expansión mínima de los datos de la matriz y, finalmente, 3) se visualizó la red de expansión mínima con la función *plot\_poppr\_msn*.

### **Diversidad genética**

#### *Diversidad y diferenciación poblacional*

Para calcular los estadísticos de diversidad y diferenciación poblacional, se obtuvieron los genotipos individuales para cada población y se conformaron matrices de datos utilizando únicamente los marcadores neutros (ver detalles en la siguiente sección). Se estimó la variación y diferenciación genética en la población con los siguientes parámetros: heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ),  $D$  de Tajima, diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y diversidad poblacional ( $\Theta$ ). Además, se calcularon los estadísticos  $F$  de Wright, coeficiente de endogamia entre individuos de una población local ( $F_{IS}$ ) y, para explorar si el flujo genético restringido influye en la estructura genética de nuestras poblaciones, se estimó la diferenciación poblacional por pares usando  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham, 1984). Estos análisis se realizaron usando el paquete *hierfstat* y el programa TASSEL\_GBS (versión 5.0; Glaubitz *et al.*, 2014).

El coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ , es una medida de la desviación de las frecuencias genotípicas de las esperadas por panmixia en términos de deficiencia o exceso de heterocigotos, valores cercanos a uno indican que hay un exceso de homocigotos y valores cercanos a 0 indican que las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg, mientras que el coeficiente de coancestría  $F_{ST}$ , compara el nivel de variación genética que existe dentro de dos o más poblaciones. Se define como la probabilidad de asociación de gametos idénticos dentro de las subpoblaciones con respecto al sorteo aleatorio de gametos de toda la población (Wright, 1943).

También se examinó la partición de la variación dentro y entre poblaciones con un análisis de la varianza molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés; Meirmans, 2012). El análisis de AMOVA es un método estadístico que permite cuantificar la diversidad genética mediante pruebas estadísticas  $F$  en diferentes niveles jerárquicos, de manera que la diversidad dentro del grupo se minimiza, mientras que la diversidad entre los grupos se maximiza. Este análisis también puede ayudar a detectar posible diferenciación en un conjunto de datos genéticos. El AMOVA se realizó con el paquete *PopGenome*. Se probaron desviaciones significativas de la estructura poblacional aleatoria en AMOVA utilizando la función *randtest* del paquete *ade4* con 9,999 repeticiones con el método de remuestreo *bootstrap*.

## **Análisis filogenéticos**

Este análisis involucró 74 secuencias nucleotídicas y se realizó con dos conjuntos de datos diferentes, el primero basado en loci neutros (1,653 SNPs) concatenados y el segundo con aquellos loci que se encuentran fuera del patrón de neutralidad esperado (137 SNPs). Se usó el software BEAST (Drummond & Rambaut, 2007) para realizar una inferencia filogenética bayesiana, este paquete implementa el algoritmo Monte Carlo de la cadena de Markov (MCMC) para estimar la distribución posterior de parámetros de un modelo que captura la historia evolutiva (filogenia) de los taxones y su modo de evolución (Meyer, 2021). Se utilizó el modelo de sustitución HKY (Hasegawa *et al.*, 1985), y se analizaron los datos con 2 000 000 de generaciones, muestreando cada 200 generaciones. La filogenia se desarraigó debido a la falta de datos equivalentes de un grupo externo. Los árboles resultantes se resumieron como un árbol de máxima credibilidad de clado usando TreeAnnotator v1.10.0 y se visualizaron usando FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2012).

## **Divergencia poblacional de loci individuales**

### **Identificación de SNPs atípicos**

Para identificar los SNP que probablemente se han diferenciado como resultado de la selección, es decir, buscar los loci candidatos, potencialmente involucrados en la adaptación local, se basó en la premisa de que los loci bajo selección divergente muestran una mayor variación en las frecuencias de los alelos entre las poblaciones que las regiones genómicas neutras (valores atípicos; Lewontin & Krakauer, 1973). Por lo tanto, los SNPs que muestran una diferenciación poblacional mayor que las expectativas neutras pueden ser indicativos de adaptación local.

Se utilizó BayeScan 2.1 (Foll & Gaggiotti, 2008) para estimar la probabilidad posterior de que un SNP determinado se vea afectado por la selección basada en las frecuencias alélicas en cada población. Empleando las opciones predeterminadas: probabilidades anteriores de 10 para identificar los SNPs candidatos principales bajo selección con una tasa de descubrimiento falso (FDR) de 0.05, 5,000 iteraciones de salida, *burn-in* de 50,000, intervalo de adelgazamiento de 10. Bajo un modelo de evolución neutral se identificaron aquellos SNPs con una diferenciación significativa ( $F_{ST}$ ) con respecto de los valores neutros del genoma. El último paso para definir el conjunto de loci atípicos fue elegir un valor  $q = 0.05$  (el análogo de valor  $p$  de tasa de detección falsa en el contexto de varias pruebas).

Los estudios de simulación han demostrado que BayeScan tiene el mejor rendimiento al alejarse del modelo de isla en comparación con otros métodos de diferenciación de poblaciones (Narum & Hess, 2011; De Mita *et al.*, 2013). Dados los antecedentes ecológicos (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), es probable que esta especie de estudio tenga un patrón débil de aislamiento por distancia, estos análisis de valores atípicos proporcionan SNPs candidatos creíbles que resultan de presiones de selección espacialmente divergentes en las poblaciones de esta especie de *Brachionus*. Si los valores obtenidos para estos SNPs atípicos son más altos que el resto del genoma sugiere que estos se encuentran en selección diversificadora, mientras que, si se encuentran por debajo del resto del genoma, están en selección estabilizadora o balanceadora entre poblaciones (Benestan *et al.*, 2016; Luikart *et al.*, 2019).

### Contextos genómicos de SNPs candidatos

Se utilizó el software Geneious R9 (<https://www.geneious.com>) para identificar las posiciones de los SNPs candidatos con respecto a los modelos de genes predichos en el genoma de *B. plicatilis*. La anotación estructural de este rotífero contiene un conjunto predicho de 54,725 modelos de genes, de los cuales alrededor del 30% podrían ser funcionalmente anotados (Franch-Gras *et al.*, 2018). El procedimiento consistió en mapear las lecturas del archivo de variantes atípicas sobre el genoma de referencia, obteniendo un archivo *BAM*, posteriormente se montó el archivo de características generales de genes anotados en el genoma de *B. plicatilis* (archivo *gff3*), de esta manera se pudo visualizar en qué regiones genéticas están presentes los SNPs candidatos.

Una vez identificadas las regiones genéticas asociadas, se realizaron tablas de información donde se enumeran los genes en los que se encuentran los SNPs candidatos, además de los SNPs que se encuentran en regiones intrónicas e intergénicas, con sus distancias a los genes más cercanos de manera ascendente o descendente, y también aquellos SNPs que caen en zonas codificantes pero que todavía carecen de una anotación funcional, llamados proteínas hipotéticas. Todas las tablas generadas de los SNPs candidatos están relacionados con su valor de diferenciación poblacional  $F_{ST}$ .

## 5. RESULTADOS

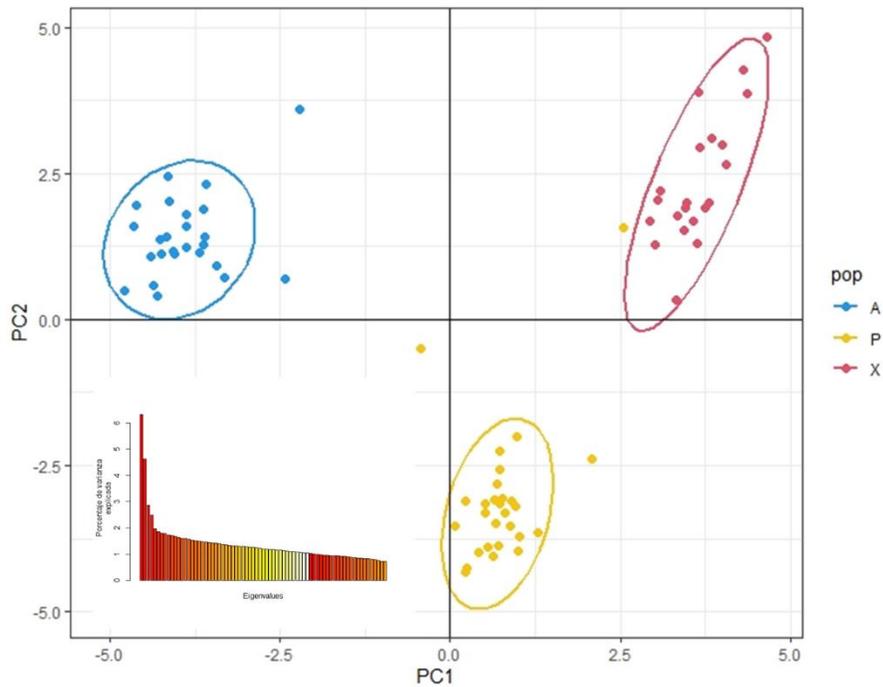
El conjunto de datos final incluyó 74 individuos de las tres poblaciones (25 de Alchichica, 28 de La Preciosa y 21 de Atexcac) y 1,790 SNPs. Sólo el 40% de las secuencias se alinean de forma única con el genoma de referencia, considerablemente menos que las que no se alinean.

### Relaciones genéticas poblacionales

Para poder diferenciarlos a cada población se le asignó un color y, una letra de la siguiente manera: A + color azul para referirse a los organismos de la población de Alchichica, P + color amarillo para los de La Preciosa y X + magenta para la población de Atexcac; de esta forma es como se referirá a las poblaciones en los siguientes análisis a lo largo de esta tesis. El conjunto de 1,790 SNPs se utilizó para el análisis de PCA. Los dos primeros componentes principales (PC) representaron el 6.3 % y el 4.6 % de la variabilidad total, respectivamente. A pesar de que el porcentaje que explican es relativamente pequeño se pueden observar tres grupos diferentes, cada uno de ellos está asociado a la población de su lago de origen (Fig. 2). El primer PC (PC1) separó a los organismos por grupos. De esta manera, los organismos agrupados en la población A mostraron valores negativos para el PC1 mientras que los grupos de las poblaciones P y X mostraron valores positivos. El segundo PC (PC2) coloca a la población A y X con valores positivos y a la población P con valores negativos.

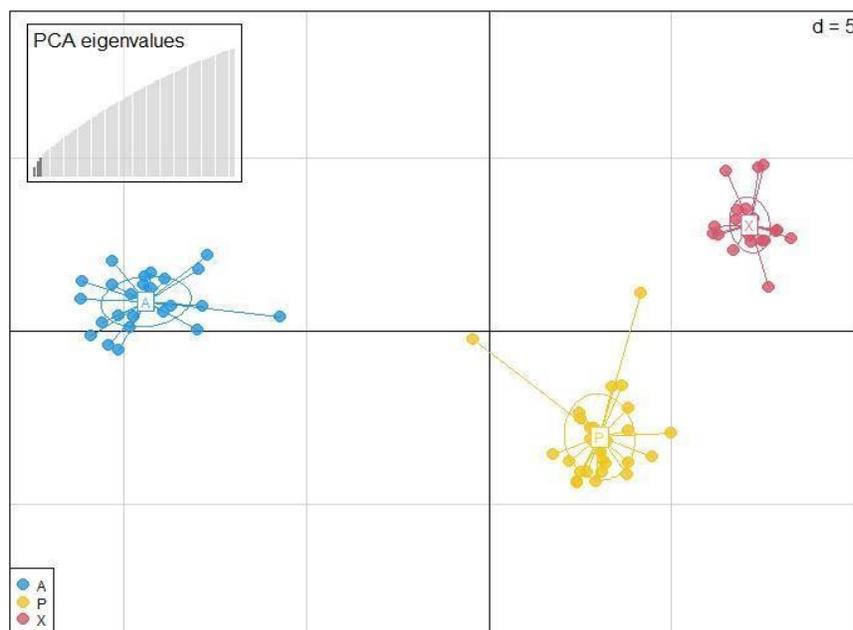
Las elipses trazadas en el PCA representan un isocontorno de la distribución gaussiana y permite visualizar un intervalo de confianza de dos dimensiones. Cada una de las elipses define la región que contiene el 95% de todas las muestras que se pueden extraer de la distribución. El tamaño de cada elipse dice qué tan similares o diferentes son las muestras dentro de los grupos en el plano de ordenación. Los grupos formados están delimitados por elipses las cuales no se

superponen y están bien definidas en el espacio del PCA, sin embargo, podemos observar que no



todos los puntos (organismos) caen dentro de un grupo (población).

**Figura 2.** Análisis de componentes principales (PC) realizado con dos componentes para todos los loci (1,790 SNPs) de 74 clones pertenecientes a las tres poblaciones de *Brachionus* sp. 'México', los dos primeros componentes explicaron el 10.9 % de la variación genética (PC1 = 6.3 %, PC2 = 4.6 %). Alchichica (A + azul), La Preciosa (P + amarillo), Atexcac (X + magenta).

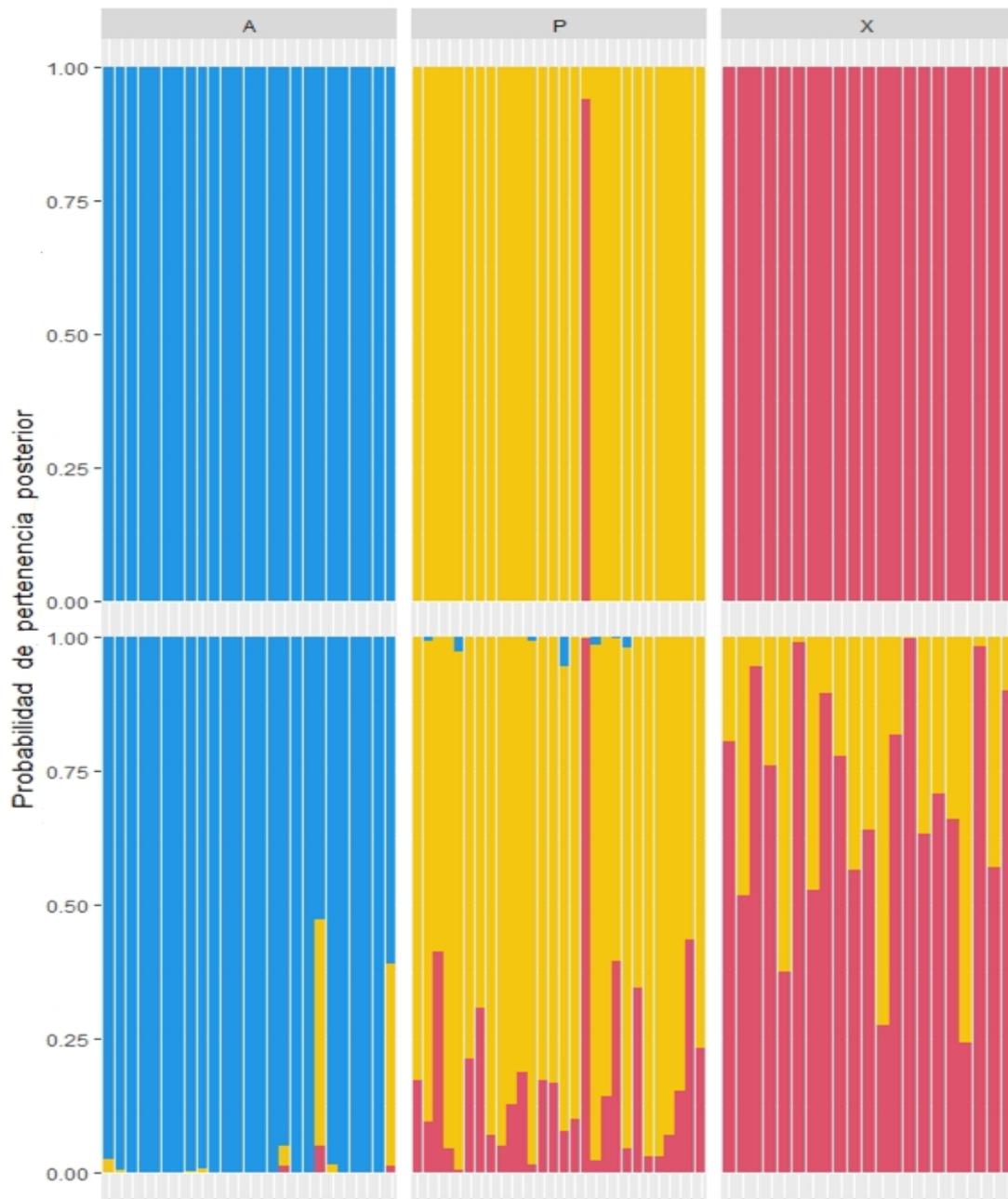


**Figura 3.** Análisis de discriminantes de componentes principales basado en los dos primeros componentes para calcular la probabilidad de pertenencia de cada individuo a alguna de las tres poblaciones de *B. sp.* 'México'.

### **Estructura genética poblacional**

En el análisis discriminante de componentes principales (DPCA), también se utilizaron los primeros dos componentes principales para maximizar la varianza entre poblaciones, ya que como se observó en el PCA este número de componentes delimitaron eficientemente los grupos de individuos genéticamente relacionados. Los primeros tres PC y las dos primeras funciones DA se conservaron para el análisis, lo que representa más del 12% de la variabilidad (Fig. 3).

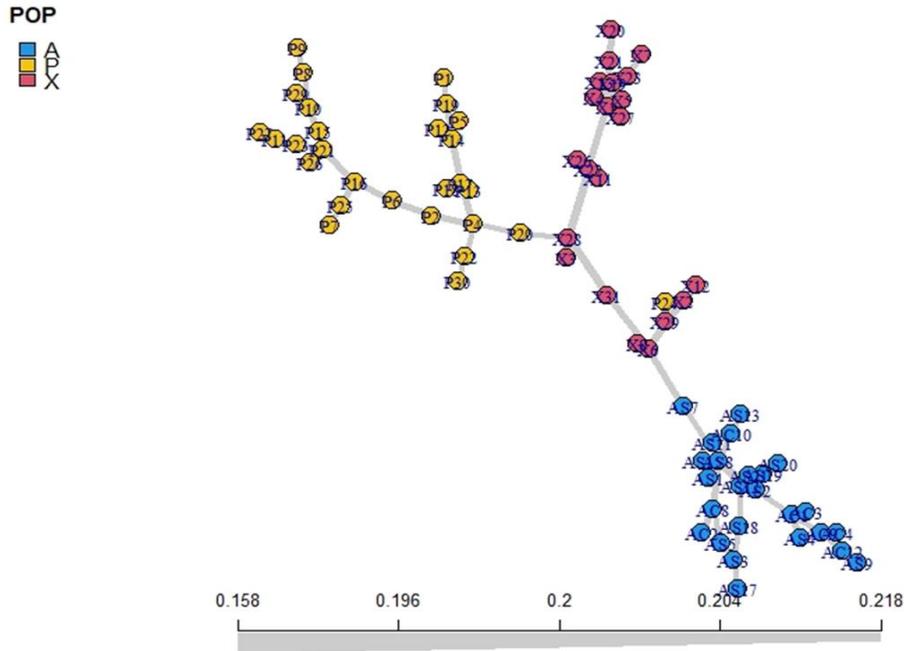
La probabilidad de pertenencia de la población se predeterminó utilizando la función *find.clusters*. Se obtuvo que  $k = 3$  era el número más probable según lo indicado por el valor BIC. Se puede observar que nuestras poblaciones de *B. sp.* 'México' están separadas en tres grupos (Fig. 4), tal como se observa en el PCA, por lo que, en general, los organismos muestreados se parecen más a aquellos que habitan su lago de origen que a aquellos que habitan los lagos vecinos. Sin embargo, hay un individuo en la población P (Preciosa) que se parece más genéticamente a la población X (Atexcac), por lo tanto, para esclarecer si este organismo es producto de contaminación de las muestras o si realmente pertenece a su grupo, se realizó otro análisis de probabilidad de pertenencia también usando la función *find.clusters* pero esta vez incluyendo a aquellos SNPs neutrales; en la Figura 4 se observa que la población P y X comparten la variabilidad neutral mientras que la población A parece tener una huella genética particular que la diferencia del resto de las poblaciones.



**Figura 4.** Análisis de probabilidad de pertenencia proporcionada por DAPC. En el eje X están representados los individuos de cada una de las poblaciones (cada barra vertical representa a un individuo), el eje Y muestra con color el nivel de probabilidad de pertenencia a un grupo genético particular. Análisis realizado con marcadores neutrales (1,653 SNP; panel superior) y todos los marcadores (1,790 SNPs; panel inferior).

En el análisis de red de expansión mínima (Fig. 5), donde se optimizó la visualización de las relaciones entre los individuos basadas en las distancias genéticas, no se identificaron individuos clonales. La barra horizontal muestra la distancia genética a lo largo del árbol. La población A se

agrupa por separado del resto de las poblaciones. Esto está de acuerdo con los resultados anteriores. La población P presenta un rango de distancias genéticas más amplio, además de que también, aquí se presenta un organismo con una asociación muy cercana a la población Atexcac.

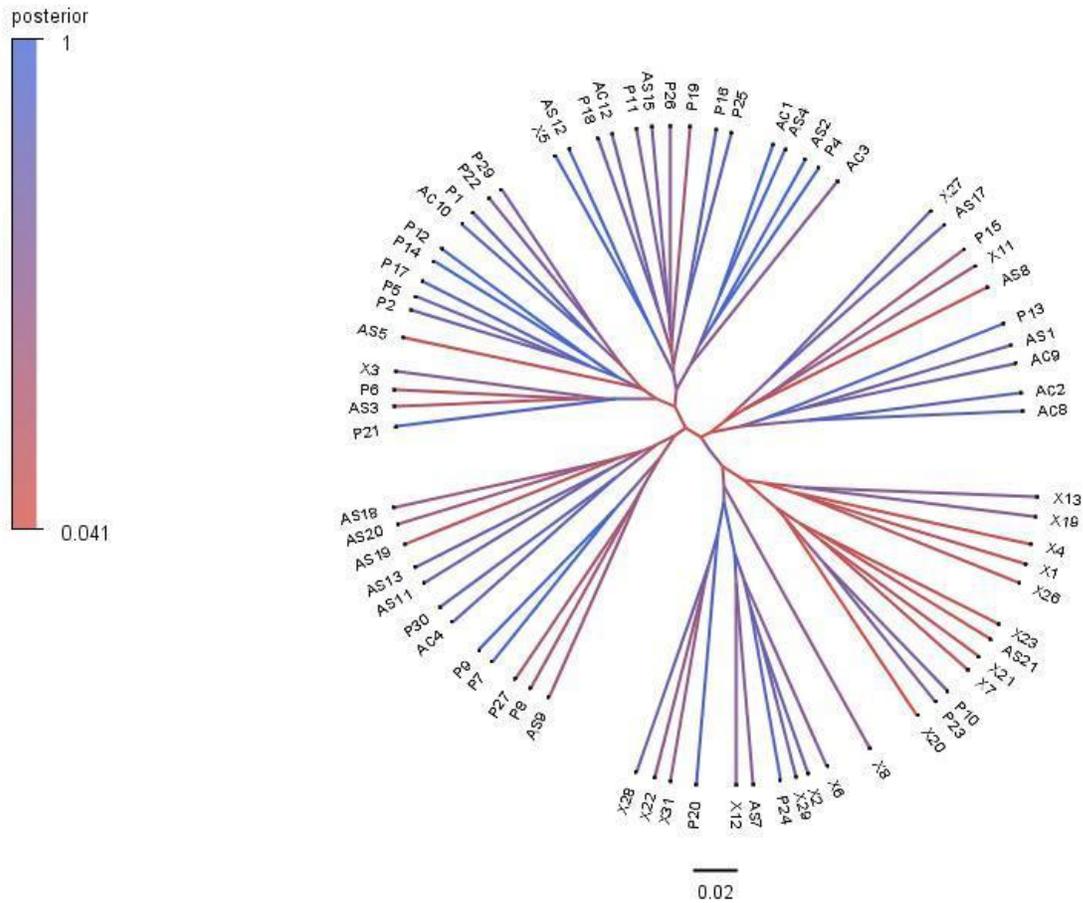


**Figura 5.** Red de expansión mínima, para todos los loci, que muestra los 74 genotipos multilocus (MLG) de las tres poblaciones de rotíferos. Todos los MLG muestran una probabilidad del 100 % para una sola población. La barra de escala gris muestra la distancia genética (porcentaje de disimilitud) entre MLG; cuanto mayor sea la distancia genética, más delgada la línea.

Los métodos utilizados fueron capaces de detectar, aunque con diferentes niveles de detalle, las relaciones complejas entre las poblaciones; lo más interesante es que son coherentes entre sí. Se observó una separación entre las poblaciones A, P, X, tanto en PCA (Fig. 2) y DAPC (Fig. 3) se ofrece una idea similar de la estructura genética, así como el árbol de distancia y la red de expansión mínima (Figs. 4-6) permitieron tener un mayor nivel de detalles sobre las relaciones entre las distintas poblaciones e incluso entre organismos estrechamente relacionados.

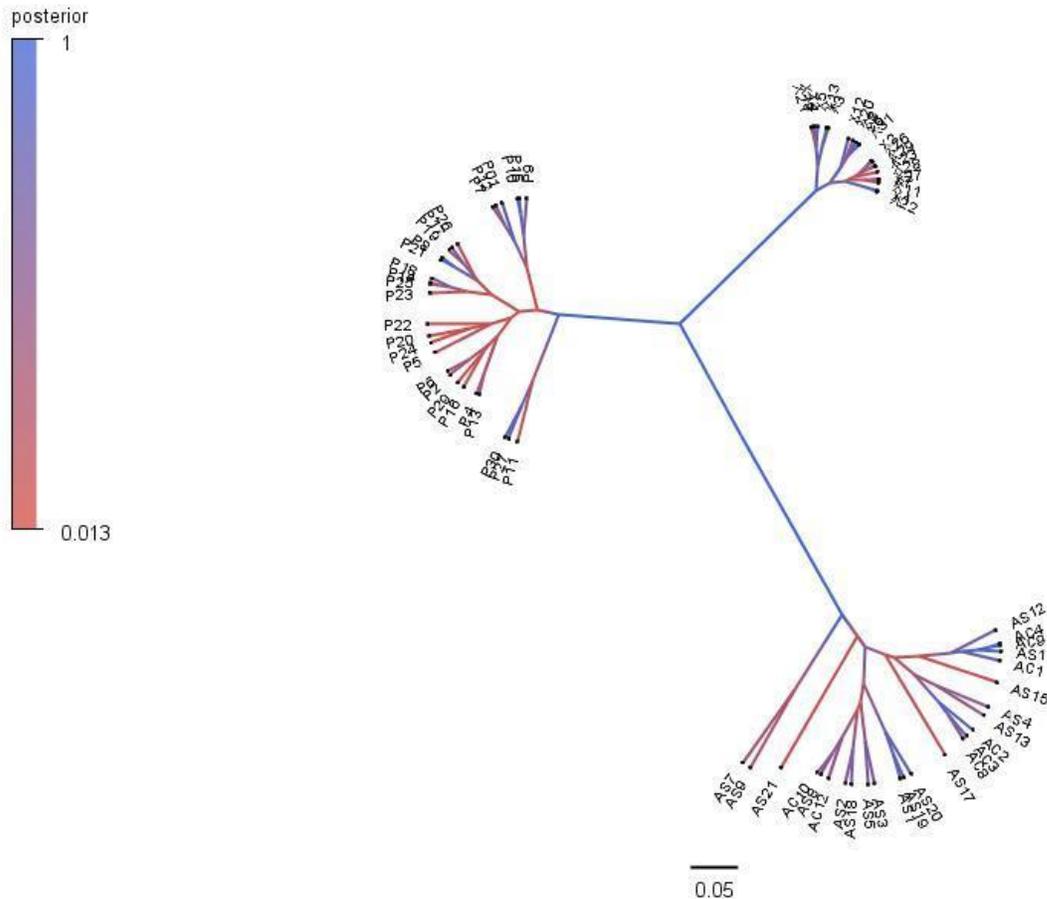
### Relaciones filogenéticas poblacionales

Se construyó un árbol filogenético bayesiano sin raíz, construido con los loci neutrales (1,653 SNPs). No se identificaron grupos monofiléticos. Las distancias genéticas que los relacionan son muy pequeñas por lo que tienden a agruparse indistintamente (Fig. 6). Esta filogenia muestra una alta probabilidad de flujo genético reciente.



**Figura 6.** Árbol filogenético bayesiano sin raíz construido con loci neutros. El color de la rama y nodo indica la probabilidad posterior de cada clado, siguiendo la escala vertical izquierda. La barra horizontal muestra la distancia genética. Cada rama es un individuo y en la punta de las ramas el código de identificación A: Alchichica, P: Preciosa, X: Atexcac.

Se consideró evaluar las relaciones filogenéticas para el conjunto de datos de valores atípicos (137 SNPs). Puesto que los valores significativos de  $F_{ST}$  proporcionan un conjunto creíble de SNP candidatos debido a las presiones de selección divergentes y la adaptación local en estas poblaciones (Fig. 7). El árbol filogenético resultante identificó tres grupos monofiléticos respaldados, cada uno de los cuales consiste sólo de organismos que habitan el mismo lago. Además, se observa a las poblaciones de La Preciosa y Atexcac, que derivan aparentemente de la población de Alchichica.



**Figura 7.** Árbol filogenético bayesiano sin raíz construido con loci atípicos. El color de la rama y nodo indica la probabilidad posterior de cada clado, siguiendo la escala vertical izquierda. La barra horizontal muestra la distancia genética.

### Diversidad genética

Los niveles de heterocigosidad observados para los 1,790 SNPs promediaron 0.364. La población X, mostró el valor más bajo ( $H_e = 0.247$ ), la población P ( $H_e = 0.277$ ), mientras que la población A tuvo el valor más alto ( $H_e = 0.568$ ). La diferenciación genética promedio por pares entre loci y sitios de muestreo fue  $F_{ST} = 0.068$ . El valor más alto de diferenciación poblacional se observó entre la población A y la X ( $F_{ST} = 0.087$ ) (Tabla 1). Los valores bajos indican una diferencia genética mayor entre organismos dentro de la misma población que entre poblaciones, lo que sugiere la existencia de un flujo genético entre poblaciones o una separación reciente. Esto también se confirma al observar los valores del AMOVA, donde se observa que la mayor parte de la diversidad genética (97 % de la varianza) se encuentra dentro de las poblaciones, sin embargo, hay poca diversidad genética entre las poblaciones (3 % de la varianza), lo cual indica que las tres poblaciones locales comparten una gran proporción de la diversidad total. El promedio  $F_{IS}$  fue de 0.2235 y fue significativamente diferente de cero, indicando que existe endogamia entre individuos dentro de las poblaciones locales.

**Tabla 1.** Diferenciación genética neutral por pares entre sitios de muestreo  $F_{ST}$  El gradiente de color representa el rango de valores.

	Alchichica	La Preciosa	Atexcac
Alchichica	0	0.0597	0.0871
La Preciosa		0	0.0598
Atexcac			0

La estadística  $D$  de Tajima se utilizó para evaluar posibles cambios asociados con la selección para cada grupo formado, que está basado en la detección de las diferencias entre los estimadores de diversidad nucleotídica de  $\pi = 0.3138$  y diversidad nucleotídica poblacional  $\Theta = 0.2088$ . Las regiones genómicas con valores  $D$  de Tajima bajos o negativos indican un número inusualmente alto de variantes de alta frecuencia debido a una selección equilibrada, los valores positivos de  $D$  de Tajima indican que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva, como es el caso de nuestras poblaciones que muestran un valor de  $D = 1.781$ .

### Divergencia poblacional de loci individuales

Bayescan identificó 137 SNPs atípicos (7.6 % de los 1,790 SNPs), los valores de diferenciación genética promedio por pares entre loci y sitios de muestreo fue  $F_{ST} = 0.509$ . El valor más alto de diferenciación poblacional está presente entre la población A y la X ( $F_{ST} = 0.590$ ) y el más bajo entre A y P (Tabla 2), como lo observado anteriormente con los marcadores neutrales. La  $F_{ST}$  media de estos SNP atípicos fue 0.389 ( $SD = 0.230$ ), y el rango fue de 0.165 a 1. No detectamos valores atípicos significativamente bajos de  $F_{ST}$ . Para poder dar a estos marcadores (SNPs) una posible identidad funcional se utilizó el transcriptoma de *Brachionus plicatilis* (Franch-Gras *et al.*, 2018), lo que mostró 28 SNPs en proteínas hipotéticas (Anexo 2), 40 SNPs en regiones intergénicas, 24 SNPs sobre regiones intrónicas (Anexo 3) y 52 SNPs en regiones con una anotación funcional (Anexo 1).

**Tabla 2.** Diferenciación genética de valores atípicos por pares entre sitios de muestreo  $F_{ST}$  El gradiente de color representa el rango de valores.

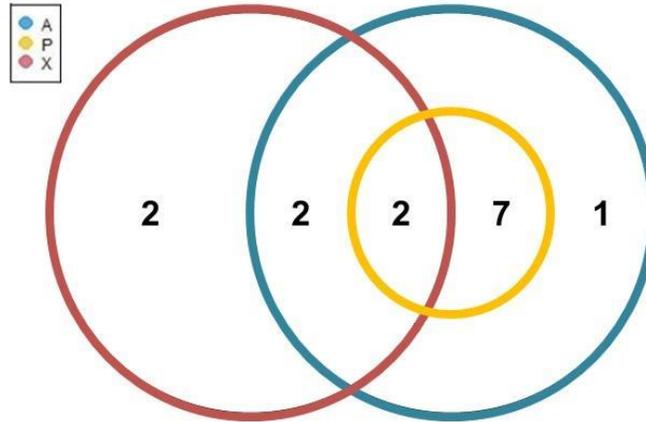
	Alchichica	La Preciosa	Atexcac
Alchichica	0	0.4406	0.5905
La Preciosa		0	0.4959
Atexcac			0

Definir sobre cuáles genes recaen estos marcadores proporciona una visión general para identificar los patrones de variación genética adaptativa. Así, tomamos el 25 % de los SNPs con las medidas de diferenciación poblacional más altas ( $F_{ST} \geq 0.5$ ), con la finalidad de indagar sobre que genes esta actuando la selección (14 SNPs; Tabla 3), lo cuales se encontraron dentro de diferentes ontologías genéticas y se agruparon en cuatro categorías funcionales basadas en la anotación de los genes del genoma de *B. plicatilis* (Franch-Gras *et al.*, 2018) correspondientes a estructura celular, meiosis, metabolismo y procesamiento de ácidos nucleicos o proteínas y señalización celular.

**Tabla 3.** Clasificación de genes en donde se encuentran los SNPs con los  $F_{ST}$  más altos. Se representa de izquierda a derecha, el porcentaje de la población que presentó el alelo alternativo, la anotación funcional del gen, su valor de diferenciación poblacional y la clasificación funcional a la que pertenece cada gen.

Nº	Porcentaje poblacional con alelo alternativo			Anotación <i>B. plicatilis</i> (Franch-Gras <i>et al.</i> , 2018)	$F_{ST}$	Clasificación de genes
	Alchichica	La Preciosa	Atexcac			
1	64		100	Cadena pesada de dineína, axonemal	0.678	Estructura celular
2	92	4		Cadena beta de dineína, ciliar	0.720	
3	92			Cadena beta de dineína, ciliar	0.847	
4	96	4		Fibrocinastina-L, isoforma X1	0.600	
5	36	100		Proteína activadora de rho GTPasa 39, isoforma X2	0.725	Meiosis
6	100	4		Proteína 2 de unión a la secuencia de inserción de selenocisteína	0.973	
7	28	96		Complejo de condensina, subunidad 1	0.542	
8			100	Quinasa 4 regulada por fosforilación de tirosina de especificidad dual, isoforma X1	1	Metabolismo y procesamiento de ácidos nucleicos o proteínas
9	88	4		Ubiquitina carboxiterminal hidrolasa 31	0.607	
10	8	50	100	Elemento móvil jokey de ADN polimerasa dirigida por ARN	0.591	
11	4	54		Endonucleasa/ transcriptasa inversa	0.510	
12	20	79	5	Sintasa 1 bifuncional 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato	0.501	Señalización celular
13			100	Agitador de proteínas de canal dependiente de voltaje de potasio, isoforma X8	1	
14	32		100	Receptor de glutamato ionotrópico, kainato 2	0.808	

Los genes seleccionados se encontraron con diferentes frecuencias dentro de cada una de las poblaciones (Tabla 3), en algunos casos están seleccionados “genes exclusivos por población”, p. ej., como se observa para el caso de la población de Atexcac, donde la frecuencia alélica sólo se presenta en esa población (gen 8 y 13 ;Tabla 3), sin embargo, hay genes que se ven seleccionados en más de una población, es decir, dentro de la variación de la población existe una fracción que presenta modificación. Para obtener una mejor visualización de la presencia de variación bajo selección se desarrolló un diagrama de relaciones lógicas entre las poblaciones (Fig. 8). La población de Alchichica contiene 12 genes con variación, de los cuales uno es “exclusivo”, dos comparte con la población de Atexcac y dos con la población de La Preciosa. La Población de Atexcac posee dos genes “exclusivos”, dos que comparte con Alchichica y dos con Atexcac, mientras que la población de La Preciosa contiene nueve genes los cuales también están presentes en Alchichica y dos comparte con Atexcac. Son dos genes que están presentes en la intersección, es decir, todos los comparten.



**Figura 8.** Diagrama de Venn que representa las relaciones de variación bajo selección entre poblaciones. Cada círculo con un color definido representa cada una de las poblaciones, y los números contenidos muestran la cantidad de genes “exclusivos” o compartidos.

## 6. DISCUSIÓN

Nuestro estudio de la variación genómica en las poblaciones de *Brachionus* sp. ‘México’, la especie SM7 *sensu* Mills *et al.* (2017), revela evidencia de variación genética adaptativa distribuida en cada uno de los lagos. Se identificaron regiones genómicas bajo selección diversificadora, algunas de ellas están asociadas con la reproducción sexual y estructura celular. Los resultados evidencian, que después del efecto fundador inicial, las condiciones ecológicas seleccionaron entre la variación genética permanente, donde la presencia de ciertas variantes genéticas aceleró la adaptación local.

### Estructura poblacional

La información del genoma completo confirmó que existe diferenciación neutral significativa, mostrando valores bajos ( $F_{ST} = 0.059-0.087$ ) ya que, esta estimación es inferior a la previamente obtenida por Alcántara-Rodríguez (2018)  $F_{ST} = 0.284$  también con SNPs; estas diferencias pueden deberse al menor tamaño de muestra y menor número de loci genéticos obtenidos en ese estudio. Además, consideramos que al utilizar un genoma de referencia que, aunque cercano (véase, Blommaert *et al.*, 2019), probablemente subestima la diferenciación genética. Debido a que los cambios de tamaño de genoma entre especies son considerables: *B. plicatilis* HYR-1 = 115.77 Mb (Franch-Grass *et al.*, 2018), *B. sp* ‘México’ ~ 79 Mb (Cruz-Cruz *et al.*, datos no publicados).

Los valores de diferenciación poblacional obtenidos son similares a otros sistemas poblacionales con adaptación local, como el rotífero *B. plicatilis* en estanques salinos aislados (SNP,  $F_{ST} = 0.07-0.18$ ; Franch-Gras *et al.*, 2018). Los análisis de agrupamiento (MSN, DAPC, STRUCTURE) muestran un patrón de estructuración genética de las poblaciones, asumiendo un número de grupos independientes de tres que corresponden a los lagos de los que se tomaron las muestras de los organismos, además se observa que entre las poblaciones de La Preciosa y Atexcac existe una menor distancia genética, es decir, comparten una mayor variación genética neutral que con respecto de la población de Alchichica. Los resultados de AMOVA indican que la

mayor parte de la variación genética (97 %) se dividió entre los tres grupos definidos por BAPS. El resto de la variación genética se distribuyó dentro (3 %) de las ubicaciones de cada grupo, es decir, existe una mayor diversidad dentro de cada lago que entre lagos.

Dentro de la región en donde habita *B. sp.* México, las poblaciones muestran patrones de aislamiento, lo que sugiere que la estructura genética de la población probablemente fue el resultado de la historia de colonización pasada, aunado a una limitación de su dispersión. En primera instancia los valores bajos de  $F_{ST}$  entre los sitios de muestreo (Tabla 1), los valores de AMOVA y la variación genética (heterocigosidad), evidencian la historia de colonización de las poblaciones. En el evento fundador es de esperarse que alguna de estas poblaciones perdiera variación genética, es decir, algunos de los alelos raros y poco comunes de la población original no llegaron a la nueva población. Posteriormente se pudo haber generado una expansión rápida de la población como consecuencia de su sistema de reproducción (partenogenético cíclico), influyendo en la diversidad de las generaciones subsecuentes. Sin embargo, no afectó su potencial adaptativo por lo que, es de esperarse que las poblaciones de estos lagos tiendan a compartir un nivel similar de diversidad genética, independientemente de su historia específica (p. ej., Haag *et al.*, 2006; Fiorini *et al.*, 2022).

Existe una limitación en la dispersión de esta especie debida a su historia natural, ya que, la capacidad de desplazamiento de los organismos es dependiente de vectores, de los hábitats ecológicamente contrastantes, además de la existencia de otras especies zooplanctónicas con capacidades competitivas altas (Ciros-Pérez *et al.*, 2015). Se ha observado que en estas poblaciones existe la selección contra los inmigrantes (Orsini *et al.*, 2012), los inmigrantes han mostrado desventajas en términos del éxito de la supervivencia y la reproducción, por lo que pueden estar menos adaptados para sobrevivir bajo condiciones ambientales alternativas (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Entonces, la migración es muy poco probable que sea determinante en la distribución de la variación genética entre las poblaciones, por lo que, estas barreras fuertes al flujo de genes son consecuencia de la adaptación genética local, lo que puede llevar a efectos prioritarios mediados por evolución adaptativa (De Meester *et al.*, 2016).

### **Variación genómica**

Los resultados del análisis de variación genómica muestran una diversidad genética alta ( $H_e = 0.364$ ). El nivel de heterocigosidad de la población de Alchichica ( $H_e = 0.568$ ) es comparable al de La Preciosa (0.277), mientras que la población de Atexcac (0.247) muestra los valores más bajos, por lo tanto, esta disminución de la diversidad alélica en las poblaciones posiblemente fue un efecto del cuello de botella que sería la señal restante de la pérdida de alelos raros de la población de origen. Sin embargo, las características ecológicas particulares de los hábitats, como: el área del lago, permanencia del agua o adversidad de los sedimentos u otros factores abióticos diferentes, así también como la influencia de los factores bióticos como la competencia o depredación, etc., definen la prevalencia de los genotipos presentes en un ambiente, por lo tanto, deberían poder explicar la diversidad genética (Reche *et al.*, 2005; Gilbert, 2017).

Estos niveles de diversidad genética son esperados en este tipo de especies, ya que guardan relación con la estrategia reproductiva de los organismos (Taylor *et al.*, 1990). Al poseer un ciclo de vida partenogenético-cíclico, durante la fase de propagación clonal, las poblaciones de

rotíferos presentan altas tasas de crecimiento poblacional lo que les permite colonizar rápidamente el hábitat y como respuesta a cambios que eventualmente ocurren en determinadas condiciones ambientales se induce la fase sexual o mixis (Stelzer & Snell, 2003), resultando en huevos diapáusicos generando reservorios de variación genética tanto neutral como adaptativa (Cousyn *et al.*, 2001; Brendonck & De Meester, 2003). Al ser los tamaños poblacionales muy grandes son intrínsecamente más estables, sujetos a una menor estocasticidad demográfica y ambiental y menores tasas de extinción (Lande, 1988; Frankham, 2005), generando una muy baja probabilidad de erosión de genotipos por azar una vez que las poblaciones están establecidas (Lynch *et al.*, 2016).

Además, se ha observado que en poblaciones de estanques temporales el tamaño del lago está relacionado significativamente con la diversidad genética a escala genómica (medida como heterocigosidad estimada) creando un indicador confiable del tamaño efectivo de la población (Franch-Gras *et al.*, 2018). En estos ambientes ocurre la reproducción sexual de manera más intensa resultado de la selección impuesta por la alta variabilidad ambiental y la probabilidad de eclosión es alta durante largos periodos de tiempo. Esto conduce a una diversidad clonal muy alta y contribuye sustancialmente al crecimiento de la población (incremento de variabilidad genética). En estos ambientes temporales los huevos podrían haber sido producidos recientemente o permanecer inactivos en sedimentos durante periodos de tiempo variables (Gómez & Carvalho, 2000; Gilbert, 2017), por lo tanto, al existir una mayor área de depósito se ve un incremento de la variabilidad genética.

Para las poblaciones que habitan lagos profundos, se espera que el tamaño (área) del cuerpo de agua puede no estar relacionado con la diversidad genética, porque el reclutamiento de la población (eclosión de huevos diapáusicos) puede ocurrir de manera más intensa en la zona litoral poco profunda que en las zonas más profundas (Gilbert, 2017), y estas zonas tienden a ocupar un pequeño porcentaje del área del lago. Sin embargo, para *B. sp.* 'México', el tamaño del lago, no consideramos que sea un factor determinante para la existencia de estos valores altos de diversidad genética, ya que, presentan una zona litoral muy reducida. Además de otras características ecológicas importantes que delimitan el desarrollo de las poblaciones en lagos profundos y estables.

Las poblaciones en lagos estables, se espera una menor propensión a la reproducción sexual, con una diversidad clonal baja e invirtiendo más en crecimiento poblacional partenogenético; ya que los huevos en diapausa en sedimentos profundos probablemente se encuentran en condiciones ambientales que inhiben la eclosión (p. ej., poco oxígeno, baja temperatura y oscuridad; Gilbert, 2017). Por lo tanto, pueden eclosionar solo cuando se liberan de esta inhibición durante la mezcla de la columna de agua. La turbulencia puede ser débil, de modo que los huevos en reposo de sedimentos depositados recientemente logren resuspenderse y transportarse a la columna de agua. Entonces la probabilidad de eclosión de sedimentos profundos puede ser baja y limitada a períodos breves durante el año. Ocasionando tasas de eclosión más bajas en lagos más profundos, generalmente más permanentes, por lo que es de esperarse que en este tipo de ambientes se seleccionen genotipos especialistas, es decir, una menor variabilidad genética en el banco de huevos (Serra & Snell, 2009; García-Roger *et al.*, 2014).

En el caso de la población *B. sp.* 'México' que habita en el lago Alchichica el cual tiene el mayor tamaño y profundidad de los lagos aquí estudiados, representa un escenario inhóspito, y los posibles estímulos de eclosión para los huevos diapáusicos ocurren con muy poca probabilidad (Dimas-Flores *et al.*, manuscrito en preparación). A causa de una zona litoral reducida, oligótrofico, con sedimentos en permanente oscuridad y anoxia (alta acumulación de materia orgánica, resultado de la microalga *Cyclotella alchichicana*, que no es consumida; Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011). Además, la columna de agua es casi permanente (cuando ocurre la mezcla, se captura el poco oxígeno que llega al fondo de manera muy rápida), presenta una temperatura similar a lo largo del año (la temperatura en el fondo es muy similar en mezcla que en estratificación). En consecuencia, se esperaría una reducción o estabilidad en las variantes genéticas y una disminución en inversión reproductiva sexual en favor de la reproducción partenogenética.

Los resultados obtenidos nos muestran que la población Alchichica, guarda una gran cantidad de variación genética, por lo tanto, esta población posee mecanismos que han facilitado estas características, pese a las condiciones que el entorno pueda provocar. Se ha observado que para esta población existen dos grandes grupos de fenotipos, que se diferencian en la respuesta de mixis y esta variación es notable entre diferentes clones de *B. sp.* 'México'. Están presentes clones con densidades de población elevadas, pero baja propensión a la reproducción sexual, es decir, producen menor descendencia mítica (huevos diapáusicos), esto es ecológicamente importante porque los clones pueden correr el riesgo de extinción local antes de producir nuevos huevos diapáusicos, lo cual generaría la erosión en la variabilidad genética. Pero también están presentes clones con una alta propensión a la reproducción sexual, produciendo, al menos, algunos huevos diapáusicos a costa de una población reducida (Cruz-Cruz, 2018), lo que genera la introducción de nuevos genotipos a la población en un momento en que la selección estacional (proliferación del otro genotipo) puede haber reducido la diversidad clonal (Gilbert, 2017), este pulso de nueva variación genética podría contener genotipos particularmente aptos para la reproducción partenogenética continua.

Por lo tanto, posiblemente los huevos diapáusicos posean características que aumenten la probabilidad de depósito en la zona litoral y así aumentar la probabilidad de eclosión. Tales características podrían implicar una mayor flotabilidad debido al contenido de lípidos y vacuolas de aire (García-Roger & Ortells, 2018), o también, es probable que haya una variación en el tiempo que tardan en eclosionar los huevos diapáusicos viables después de la exposición a condiciones que pueden romper la diapausa. Esto podría deberse a la edad del huevo o podría deberse a la edad y clon de la madre que los produce, debido a la cantidad y calidad de los productos de almacenamiento (p. ej., Martínez-Ruiz & García-Roger, 2015). Alternativamente, se ha planteado la hipótesis de que los huevos en diapausa de poblaciones con una baja probabilidad de sobrevivir en el sedimento a corto plazo también pueden ser propensos a eclosionar antes de tiempo. De lo contrario, en ausencia de señales de eclosión, se espera que estos huevos se deterioren rápidamente (García-Roger *et al.*, 2006). Un estudio de las características particulares de los huevos diapáusicos para lagos profundos permanece abierto para realizar estudios adicionales.

Los resultados obtenidos son consistentes con la hipótesis de monopolización de partenogenéticos cíclicos (De Meester *et al.*, 2002) que predice una alta diferenciación poblacional debido al rápido crecimiento de la población, el potencial de adaptación local y la monopolización de los recursos (efecto de prioridad). La explicación alternativa, de que el patrón de fuerte

diferenciación genética entre poblaciones es causado únicamente por altos niveles de deriva genética, es poco probable dados los altos niveles de variación genética observados dentro de las poblaciones.

### **Análisis filogenético**

La filogenia molecular obtenida con marcadores neutrales no es concluyente, sugiere que entre poblaciones existen tasas de flujo genético histórico (Fig. 6), sin embargo, no es lo que comúnmente se ha observado en especies de zooplancton que habitan en ambientes divergentes (De Meester *et al.*, 2002), como es el caso de *B. sp.* 'México'. Además, el gran número de valores significativos de diferenciación poblacional (valores atípicos) proporciona un conjunto creíble de SNPs que probablemente representen una variación genética localmente adaptativa. Una posible explicación a la baja señal filogenética obtenida con marcadores neutrales es debido al conjunto de datos inicial, donde se permitieron una proporción pequeña de datos faltantes, esto no fue un problema para los demás análisis realizados, pero si en la realización de esta prueba. Por lo cual, para análisis futuros se planea ser más restrictivos en las características de los datos a analizar, así como utilizar como genoma de referencia de esta especie de rotífero.

El éxito de colonización en nuevas condiciones ecológicas debió verse facilitado por la rápida expansión generada por las características intrínsecas de la especie (organismos sexuales facultativos, tiempos cortos de generación y crecimiento poblacional rápido), las cuales les confieron una gran amplitud de nicho, lo que los hace buenos monopolizadores y en consecuencia se contrarresta la pérdida de diversidad (Birzu *et al.*, 2019). A medida que la población se expandió, la mutación puede generar nuevas variantes que pudieron ser ventajosas en los nuevos entornos, reforzando las diferencias adaptativas iniciales entre las poblaciones vecinas y, por lo tanto, promovieron la adaptación microgeográfica a escala fina (De Meester *et al.*, 2016).

La estrecha relación que muestra la filogenia entre las poblaciones de La Preciosa y Atexcac, sugiere un acervo genético común. Para esta especie de *Brachionus* se ha sugerido una posible divergencia debido a la salinidad, en la que se ha demostrado que, aunque los individuos originarios del lago La Preciosa tienen el potencial para colonizar ambientes con agua más salinas como el lago Atexcac ( $6.5 \text{ g L}^{-1}$ ), para los individuos de Atexcac, la salinidad baja ( $1.1 \text{ g L}^{-1}$ ) del lago La Preciosa (cuya población está adaptada localmente a agua dulce) representa una barrera ecofisiológica (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). De modo que los fuertes regímenes de selección pudieron promover una rápida adaptación en los nuevos entornos, y la divergencia adaptativa sugerida redujo la eficacia biológica de los migrantes entre ambientes, por lo que el aumento de divergencia adaptativa debió favorecer la evolución de una menor dispersión (Räsänen & Hendry, 2008) asociado a un incremento de la divergencia neutral (Funk *et al.*, 2011; Orsini *et al.*, 2013).

Durante las fases de crecimiento de la población, se producen efectos demográficos diferenciales en las poblaciones que interactúan (es decir, asimetrías en el tamaño de la población), una población mejor adaptada a su entorno crece más rápido en abundancia que otra, esto ocasiona que las poblaciones relativamente más grandes experimenten tasas de inmigración relativamente más bajas y como resultado hay una disminución en el flujo génico y un aumento en divergencia adaptativa (Räsänen & Hendry, 2008). La aparición de *B. sp.* 'México' muestra mayores abundancias relativas en la temporada invernal, sin embargo, a pesar del patrón hidrodinámico

regular que presentan, normalmente no se observan las mismas abundancias poblacionales entre lagos (Ciros-Pérez; datos no publicados). El surgimiento de la población en Alchichica se ha explicado por los eventos estocásticos que conducen a pulsos del fitoplacton de tamaño pequeño, la disponibilidad de alimento (oligotrofia) y las interacciones bióticas (competencia y depredación; Cirós-Pérez *et al.*, 2015), sin embargo, no se presenta un patrón anual regular (Fernández *et al.*, 2022). Mientras que la aparición de rotíferos en La Preciosa se presenta en un breve periodo del año limitado por la presencia de competidores más eficientes (Martínez-Chávez, 2010), en tanto que en Atexcac, también su aparición es esporádica (Ciros-Pérez, datos no publicados). Por lo tanto, se podría generar un flujo génico bajo, dando paso a una mayor divergencia adaptativa y a su vez puede favorecer la disminución en el potencial de dispersión y colonización (Räsänen & Hendry, 2008).

En la Cuenca Oriental han sido reportadas para otras especies divergencias entre poblaciones. Como se mencionó, el copépodo calanoideo, *Leptodiptomus* grupo *sicilis* que habita los lagos El Carmen, La Preciosa, Quechulac, y Atexcac, donde las condiciones ecológicas divergentes, como la salinidad y el régimen hídrico (lagos permanentes vs. efímeros), fomentan la acumulación de diferenciación genómica, allanando el camino para su diversificación y especiación. Además, la población de Atexcac muestra una restricción en flujo de genes anterior a las otras poblaciones (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2022). Las salamandras, *Ambystoma velasci* está presente en varios lagos de la zona (Tecuitlapa, Atexcac, Quechulac y La Preciosa), la cual se cree que ha diversificado en *Ambystoma taylori*, endémica de Alchichica. En Atexcac, *Ambystoma velasci* muestra algunas adaptaciones a las condiciones del lago, pero aún no se ha diferenciado por completo en una nueva especie (Percino-Daniel *et al.*, 2016).

Las condiciones particulares del lago Atexcac, junto con factores demográficos como un tamaño poblacional efectivo pequeño, como el que se ha observado en estos rotíferos, posiblemente esté favoreciendo el aislamiento de las poblaciones circundantes, como lo reportado para otras especies. Sin embargo, el efecto de la dispersión, el flujo génico y el tamaño de la población entre lagos puede conducir a un equilibrio asimétrico en el que la adaptación es principalmente a uno solo de los dos entornos (Kawecki, 2000; Räsänen & Hendry, 2008). Por lo tanto, para la población de Atexcac, posiblemente, su recuperación después del evento fundador ha sido más lenta, como lo muestra su menor diversidad genética, o bien, ha pasado por un cuello de botella reciente, y por consiguiente, se espera que tenga una eficacia biológica general más baja en todos los entornos. Mientras que la población del lago La Preciosa, posee una mayor diversidad genética resultado de la adaptación local (véase, p. ej., Hofmeister *et al.*, 2021), parece ser que esta población fue lo suficientemente grande como para superar las limitaciones demográficas, en consecuencia, retuvo cantidades significativas de variación para hacer frente al entorno.

### **Genes y SNPs putativos bajo selección**

Los SNPs atípicos encontrados fuera del patrón de neutralidad esperado, identificados mediante los valores de diferenciación genética  $F_{ST}$ , pueden ser candidatos para mostrar señales de selección diversificadora (Narum & Hess, 2011). Para cada SNP en las tres poblaciones de rotíferos estudiadas, se obtuvieron valores con un rango amplio de diferenciación ( $F_{ST} = 0.16 - 1$ ). Además, mostraron una proporción 5:3 en las mutaciones puntuales de tipo transición y con respecto a las

de tipo transversión. Diversos autores han reportado que las primeras tienden a presentarse en mayor proporción que las segundas y, que los cambios entre purinas y pirimidinas (transversiones), pueden afectar la expresión génica (Yang, 1996). Estos resultados indican que dentro de las muestras reducidas del genoma SBG existen firmas de adaptación a las condiciones locales, que coinciden con la información que se tiene de la especie en *B. sp.* 'México'.

La identificación de rasgos importantes está limitada por el conocimiento de la función de los genes. Generalmente, la información funcional de los genes es obtenida por especies modelo en entornos de laboratorio. Así, los genes que subyacen a la variación en los fenotipos que no han sido objeto de análisis genéticos funcionales se perderán o se anotarán incorrectamente (Tiffin & Ross-Ibarra, 2014). Por lo tanto, el conocimiento incompleto de la función de los genes, sirve para reforzar injustificadamente las ideas preconcebidas de los rasgos y las fuerzas selectivas que impulsan la adaptación local (Pavlidis *et al.*, 2012). Sin embargo, los enfoques que investigan la señal de selección agregada a través de loci son prometedores para identificar la selección en rasgos utilizando datos genómicos (Martins *et al.*, 2017).

Hay pocos estudios que consideren la base genética de la adaptación local en invertebrados acuáticos. En poblaciones de *Daphnia magna* con un conjunto de factores estresantes naturales y antropogénicos utilizando un enfoque de evolución experimental, identificaron un gen de la misma especie asociado a un fotorreceptor que induce una respuesta plástica de diapausa que está involucrada en patrones de adaptación local (Orsini *et al.*, 2012). Mientras que, con poblaciones naturales del rotífero *Brachionus plicatilis* se han revelado asociaciones entre la variación genómica y el grado de predictibilidad ambiental. Entre los genes involucrados, están factores de transcripción correlacionados con diapausa, así como un gen asociado a la salinidad, además de genes relacionados a la propensión al sexo, y un receptor de estrógenos asociados al hidropérido. Los cuales proporcionan evidencia genómica de adaptación a las condiciones locales (Franch-Gras *et al.*, 2018).

Es importante señalar que, la mayoría de los rasgos ecológicamente importantes son cuantitativos, con fenotipos determinados por muchos loci (Rockman, 2012). Se espera que la evidencia molecular de la selección que actúa sobre los rasgos cuantitativos sea débil porque la señal de selección se distribuye a través de muchos loci (Le Corre & Kremer, 2012). Las correlaciones realizadas en estos estudios entre la variación genética y las variables ambientales mostraron muy pocos SNPs asociados a las condiciones ecológicas o rasgos de historia de vida, lo que sugiere que existen diversos factores que no son considerados y sobre los cuales deben también estar actuando las presiones selectivas (Coop *et al.*, 2010). Además, parece obvio que no toda la variabilidad genética asociada a los componentes de eficacia biológica se obtengan de manera exhaustiva con esta metodología de SBG dado que, se asume que, sólo es una representación reducida de la variabilidad genómica y, por lo tanto, hay una alta probabilidad de no encontrar las señales que den cuenta de las otras presiones selectivas que podrían estar actuando (Tiffin & Ross-Ibarra, 2014).

En los 14 SNPs candidatos a revelar selección diversificadora, que poseen los valores de  $F_{ST}$  más altos ( $F_{ST} \geq 0.5$ ), se encontró que se relacionan con varios procesos biológicos relevantes de los organismos. Después de examinar las funciones putativas de los genes individuales, a continuación, se analizan algunos aspectos funcionales interesantes de estos genes (Tabla 3).

Los genes asociados a la estructura celular, descritos como *cadena beta* y *cadena pesada de dineína*, *axonemal*, son esenciales en eucariotas para el batido adecuado de los cilios/flagelos en muchas especies entre ellas *Chlamydomonas*, *Paramecium*, *Trypanosoma*, *Tetrahymena* (Baron *et al.*, 2007; Furuta *et al.*, 2009). La expresión de formas anormales está asociadas a una natación más lenta, dada la atenuación de la frecuencia de los latidos y falla en el ensamblaje del complejo del brazo externo de dineína (OAD) (Baron *et al.*, 2007; Patel-King & King, 2009; Rompolas *et al.*, 2010; Kutomi *et al.*, 2012). Además, la *Proteína activadora de Rho GTPasa 39* es un regulador clave de la actina y el citoesqueleto de los microtúbulos, por lo que controlan diferentes pasos de la migración celular, la adhesión y la polaridad, la progresión del ciclo celular y la diferenciación (Jaffe & Hall, 2005). Mientras que el gen descrito como *Fibrocistina-L*, al presentarse una mutación se vincula con un defecto a la señalización de adhesión y la contractilidad de las células epiteliales, generando una ciliopatía conocida como enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ARPKD) en humanos (Ziegler *et al.*, 2020). Por lo tanto, para el caso de *B. sp.* 'México' alguna mutación en estos genes podría modificar la natación de estos organismos, así como la detección de los estímulos extracelulares. Una posible relación con su desempeño en el ambiente estaría dada por las condiciones oligotróficas que se presentan en estos lagos profundos, ya que al encontrar poca disponibilidad de alimento tenderían a tener un metabolismo relativamente bajo, lo que incluiría la disminución de la movilidad como ahorro energético.

Los genes asociados a la meiosis, descritos como *complejo de condensina subunidad I*, juega un papel importante al promover la unión estable de la cohesina a los cromosomas, la interrupción de la función o por mutación de una subunidad esencial en la condensina I que provoca defectos en el emparejamiento y la sinapsis, por lo tanto, la condensina I promueve la unión estable de la cohesina a los cromosomas durante la gametogénesis (Hernández *et al.*, 2018). La *quinasa 4 regulada por fosforilación de tirosina de especificidad dual isoforma X1 (DYRK4)* está relacionada con la meiosis reproductiva específica de testículos en ratones (Sacher *et al.*, 2007). Además, se ha identificado la quinasa ser/thr específica de testículos en rotíferos (Xu *et al.*, 2008) en las cepas de partenogenético obligado y partenogenético cíclico (Hanson *et al.*, 2013) y, en un estudio previo, en *B. plicatilis* se encontró que los genes con funciones supuestamente específicas de machos también se expresaron en hembras (Denekamp *et al.*, 2010). Además, se sabe que, en el gen de la *proteína de unión a secuencia de inserción de selenocisteína 2 (SBP2)* presenta diferencias entre los dos sexos de ratones frente al impacto de la eliminación de *Sbp2* en la transcripción de selenoproteína, sugiriendo la existencia de mecanismos jerárquicos específicos del sexo en la expresión de selenoproteína que pueden influir en la biología de los islotes pancreáticos (Chellan *et al.*, 2020).

Se ha observado que la inducción de la mixis (inducción de la meiosis) en *B. sp.* 'México' comienza a densidades poblacionales relativamente altas ( $1.4 \text{ org. mL}^{-1}$ ) cuando se comparan con otros experimentos realizados en poblaciones estáticas en el laboratorio, p. ej., *B. plicatilis* ( $0.07 \text{ org. mL}^{-1}$ ), *B. manjavacas* ( $0.15 \text{ org. mL}^{-1}$ ), *B. calyciflorus* ( $0.06 \text{ org. mL}^{-1}$ ) (Cruz-Cruz, 2018). Entonces muy probablemente, los genes que están siendo seleccionados generan una menor sensibilidad a los estímulos de cambio a la fase sexual en estas poblaciones. Estos resultados refuerzan la idea que, dadas las condiciones desfavorables de los lagos profundos para generar un estímulo de eclosión adecuado, se disminuya la inversión reproductiva y se vea favorecida la reproducción partenogenética. Además, para *B. sp.* 'México', la entrada a la fase sexual es muy

costosa, porque la hembra mítica sólo tiene la capacidad de generar un huevo diapáusico el cual no puede liberar al medio, permaneciendo dentro de ella hasta su muerte (Dimas-Flores *et al.*, manuscrito en preparación).

Los genes asociados al metabolismo y procesamiento de ácidos nucleicos y proteínas, descritos como *endonucleasa/ transcriptasa inversa* y *elemento móvil jokey de ADN polimerasa dirigida por ARN* están involucrados en la elongación cromosómica por adición de nucleótidos (Nakamura *et al.*, 1997), o bien, mediante retrotransposones los cuales presentan una relación conservada a largo plazo entre un genoma huésped y sus retrotransposones domesticados, pero aún móviles como se observa en *Drosophila melanogaster* (Saint-Leandre *et al.*, 2019). Mientras que la proteína descrita como *sintasa bifuncional 3'-fosfoadenosina y 5'-fosfosulfato*, está involucrada en la reparación del ADN, ya que la expresión baja o silenciamiento de PAPSS1 se asocia con el deterioro de mecanismos de reparación de ADN (Leung *et al.*, 2015). Finalmente, la *ubiquitina carboxiterminal hidrolasa 1*, responsable de la degradación de proteínas intracelulares (Jin *et al.*, 2009), desempeña un papel importante en la eliminación de proteínas (Sankiewicz *et al.*, 2015).

Los genes relacionados a señalización celular, sensibles a cambios con el medio extracelular, descritos como *proteína canal de potasio dependiente de voltaje* participan en la apertura y el cierre de estos canales que no sólo están controlados de forma sensible por los potenciales de membrana, en general, sino que también responden a las condiciones intracelulares y extracelulares como los productos químicos (Paulsen *et al.*, 2015; Baronas *et al.*, 2017), la presión mecánica (Clausen *et al.*, 2017), la temperatura (Grandl *et al.*, 2010) y las concentraciones de protones (Hu *et al.*, 2018). También, se ha observado que, dependiendo de la condición de pH ambiental, la permeabilidad del ion potasio (K<sup>+</sup>) se ve afectada (Ishii *et al.*, 2001), ante una condición ácida el poro se cierra (Lee *et al.*, 2020). El gen denominado *receptor ionotrópico de glutamato que contiene receptores de Kainato (GluK2-KAR)* participa en la regulación del aumento de Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> y activa a un medidor sensible como la calmodulina (Song *et al.*, 2004), la cual participa en muchos procesos celulares fisiológicamente importantes (Westerlund & Delemotte, 2018), como la osmoregulación (Reichow & Gonen, 2008).

Se ha sugerido ecológicamente la osmoregulación como factor de selección para estos tres ambientes heterogéneos, desde una salinidad relativamente alta de 9 g L<sup>-1</sup> (Alchichica), pasando por una salinidad de 6.5 g L<sup>-1</sup> (Atexcac), hasta un hábitat dulceacuícola 1.1 g L<sup>-1</sup> (La Preciosa). Además, se sugiere que la población que habita en el lago dulceacuícola de esta especie halófila se ha adaptado a las condiciones del lago (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Por lo tanto, los genes relacionados con la señalización celular posiblemente estén involucrados en la compensación de la osmoregulación. Como se ha demostrado con la expresión génica de *Brachionus* sp. 'México', donde se compararon los mecanismos osmorreguladores y de respuesta al estrés (Jiménez-López, 2021), se identificaron transportadores iónicos como los canales de potasio, los cuales están asociados a la regulación en disminución del volumen celular (Jentsch, 2016) y genes asociados a las acuaporinas, las cuales son las encargadas de permitir el flujo de agua a través de la membrana celular (Willmer *et al.*, 2005; Jentsch, 2016), activadas por receptores que permiten la entrada de Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>. Estos genes se expresaron en condiciones de salinidad óptima (6.5 g L<sup>-1</sup>).

Además, se encontró la expresión génica de la ubiquitina L40 involucrada en la proteólisis que es una parte del procesado de la información genética, y en la mitofagia englobada dentro de los procesos celulares. También se encontró a la proteína similar a la ADN polimerasa dirigida por ARN de elemento móvil, es decir, el metabolismo y procesamiento de ácidos nucleicos y proteínas (categoría de la que forman parte) posiblemente esté generando una compensación ante el daño que pueda estar causado el enfrentamiento al estrés osmótico. Por lo tanto, al observar que estos genes están siendo seleccionados en el presente estudio, nos sugiere que existen firmas adaptativas en el genoma debidas a la presión de selección ejercida por las características limnológicas de los lagos (p. ej., la salinidad del agua), en genes relacionados a la osmoregulación.

Posiblemente existan compensaciones genéticas frente a la adaptación local propuesta en esta especie, es decir, cuando un genotipo determinado muestra un aumento en eficacia biológica, como consecuencia de un cambio en un carácter, se asocia a una disminución en otro carácter, debido a la necesidad de asignar los recursos disponibles entre varias funciones vitales (Lailvaux & Husak, 2014). Sin embargo, no está claro si esas compensaciones existen o no a nivel de locus genético. La adaptación local podría surgir de compensaciones alélicas en loci individuales (pleiotropía antagónica), con alelos en su hábitat nativo que tienen una mayor eficacia biológica que los alelos extraños (Hall *et al.*, 2010). Sin embargo, los cambios en el rango de alelos en genes individuales no son necesarios para que ocurra la adaptación local a nivel de población, también puede ocurrir cuando la eficacia biológica de los alelos difiere en magnitud, pero no en dirección a través de los entornos (Mitchell-Olds *et al.*, 2007). En nuestro estudio, podemos observar (Fig. 8) que la mayoría de las firmas de selección (genes bajo selección) están presentes en más de una población, pero con diferente frecuencia, esto es, los alelos difieren en magnitud entre entornos, pero no en dirección. Por consiguiente, la identificación de firmas de selección repetidas en las poblaciones proporciona un apoyo fuerte para revelar un papel adaptativo de los loci identificados (Nosil *et al.*, 2009; Tiffin & Ross-Ibarra, 2014).

El patrón descrito con mayor frecuencia en los estudios de campo es la neutralidad condicional (Mitchell-Olds *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2013; Tiffin & Ross-Ibarra, 2014). La diferenciación poblacional de *Daphnia magna* se asocia con la tolerancia al calor, los genotipos del norte de Europa muestran la tolerancia al calor más baja, y los de la región Mediterránea y el Cercano Oriente muestran la más alta. La pérdida de tolerancia al calor no esta acompañada por la pérdida general de eficacia biológica en algún rasgo de historia de vida, es decir, las compensaciones no juegan un papel importante en la génesis de la variación hereditaria en *D. magna* europea. Se sugiere que las diferencias genéticas parecen ser originadas por la cantidad diferencial de la carga genética. La pérdida de tolerancia al calor en los genotipos de Europa ocurrió de manera neutral y, por lo tanto, representa un caso de neutralidad condicional (Coggins *et al.*, 2021). Si múltiples loci determinan la eficacia biológica, los alelos de diferentes entornos son condicionalmente beneficiosos en distintos loci y el flujo de genes entre poblaciones es limitado, entonces la neutralidad condicional puede contribuir a la adaptación local (Anderson *et al.*, 2013).

Las firmas de selección encontradas para *B. sp.* 'México' representadas en más de una población sugieren que la variación alélica está presente en la población de origen, segregándose de forma neutra (Hermisson & Pennings, 2005; Przeworski *et al.*, 2005), posteriormente, los inmigrantes que eran portadores de la variación genética pudieron facilitar una respuesta al régimen de selección local (Barret & Schluter, 2008). Por ejemplo, los espinosos (*Gasterosteus*

*aculeatus*), que migraron de ambientes marinos a continentales en los últimos 20,000 años, muestran evidencia de que la selección reduce las placas óseas en las poblaciones de agua dulce en comparación con las poblaciones marinas ancestrales que tienen placas abundantes. Sin embargo, los análisis genéticos de estas poblaciones mostraron que están presentes morfos de placas reducidas en una frecuencia baja (2-3.8 %), quienes portan el gen de la ectodisplasia (responsable de la reducción de placas; véase p, ej., Jones *et al.*, 2012). Por lo tanto, la selección direccional parece haber actuado sobre la variación permanente. Lo que podría sugerir que se encuentra en un equilibrio entre mutación y selección. La migración desde el entorno marino puede servir como una fuente importante de variación para los barridos selectivos locales de condiciones de agua dulce.

Las tres poblaciones de rotíferos en este estudio presentan firmas de selección dentro de tres categorías funcionales descritas. Por lo tanto, existen factores comunes de presión de selección que actúan sobre los organismos a pesar de las diferencias entre los ambientes. 1) la reproducción sexual, con genes relacionados a la meiosis, muy posiblemente existe una compensación de la disminución de la entrada de la mixis debido a que los lagos son profundos y a las características particulares del ciclo de vida para *B. sp. 'México'*, el cual solo puede generar un huevo partenogenético. 2) la estructura celular, con un compromiso directo entre la movilidad (natación) y la cantidad de recursos disponibles, porque, estos ambientes son oligotróficos y una baja en el metabolismo (menor consumo de energía) puede ser útil para llevar a cabo otros procesos fisiológicos y soportar mejor la baja disponibilidad de recursos, a través de mecanismos como la acumulación de recursos y un mejor uso de ellos durante los periodos de inanición frecuentes en estos lagos (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011; Ciro-Pérez *et al.*, 2015). O una relación del citoesqueleto frente a la osmoregulación, ya que, se encontró la expresión de cadena ligera de dineína en los tratamientos de estrés osmótico en baja salinidad ( $1.1 \text{ g L}^{-1}$ ) (Jiménez-López, 2021) el cual hace interacción con vesículas asociadas a la acuaporina 2 (Noda & Sasaki, 2006). Es decir, las características de variación en la salinidad de los lagos pueden estar modelando la estructura celular, además, ante esta variación en la salinidad, es probable que también actúe 3) la reparación de ADN y degradación de proteínas.

Mientras que para la población de Atexcac se suman firmas de selección para la categoría funcional de señalización celular, es decir, esta población posee firmas para las cuatro categorías funcionales descritas. Los genes involucrados están relacionados a la osmoregulación, con la apertura de canales y complejos de señalización. Además estos muestran los valores más altos de  $F_{ST}$ . Posiblemente el tamaño de población efectivo pequeño (contribución de la deriva) aunado a un flujo de genes reducido entre poblaciones, puede llevar a la fijación de alelos nocivos, o en contraparte, estos alelos generan un beneficio a la población y se propagan por selección direccional. La aparición repentina del alelo beneficioso puede deberse a una mutación, o a un alelo muy raro presente en la variación permanente después de un cambio ambiental (Stephan *et al.*, 1992). Sin duda alguna, estas observaciones reflejan una carga mutacional fija para esta población, sin embargo, las otras poblaciones pueden contener diferentes cantidades de alelos nocivos, ya sea debido a diferencias en el ambiente o debido a diferencias en la historia de la población (Reznick *et al.*, 2000).

A pesar de que estas funciones putativas de las regiones genéticas que tentativamente están sujetas a selección muestran información interesante, se debe tener cuidado al considerar

estos supuestos, ya que la complejidad de los entornos ecológicos en que viven estos organismos hace que sea probable que intervengan muchos factores en la diversificación adaptativa, además que la interacción entre varios de ellos también es muy probable (Poisot *et al.*, 2011; Laughlin & Messier, 2015). Los genes candidatos juegan un papel vital en la evaluación de la pleiotropía antagónica, la pleiotropía pseudoantagonista y la neutralidad condicional, es por ello que se debe estimar la existencia de posibles compensaciones en eficacia biológica entre los rasgos bajo selección, para los distintos fenotipos a través o dentro de los entornos (Coggins *et al.*, 2021).

Nuestros resultados muestran una variedad de genes candidatos, relacionados a diferentes ontologías genéticas, dado que utilizamos una técnica de representación reducida del genoma (SBG), que no analiza todos los SNPs en el genoma, es probable que este estudio no presente una lista exhaustiva de loci involucrados en la adaptación local, por lo cual, es evidente que es necesario hacer más exploraciones de la diversidad genómica de *B. sp.* 'México' para descubrir más regiones genéticas involucradas en la adaptación a las condiciones locales, además de poder correlacionar esta variabilidad molecular con caracteres de historia de vida y condiciones ambientales en las diferentes poblaciones. Sin embargo, es importante, analizar qué genes o regiones candidatas indican realmente qué rasgos son relevantes para explicar la eficacia biológica dentro de cada población es un desafío muy grande. La validación funcional sigue siendo el estándar de oro para confirmar el papel de un gen o región genética responsable del control de un proceso o rasgo biológico específico (véase, p. ej., Snell *et al.*, 2011).

## 7. CONCLUSIONES

- Nuestros datos muestreados a lo largo de todo el genoma revelan estructura poblacional dentro de *Brachionus sp.* 'México', la especie SM7 *sensu* (Mills *et al.*, 2017), que se pueden asignar a tres grupos genéticos, aunque con una diferenciación poblacional débil y diversidad genética alta que sugieren flujo genético histórico.
- Las evidencias encontradas sugieren que hubo un efecto fundador asociado a un evento de colonización en el lago Alchichica y, posteriormente, a los lagos La Preciosa y Atexcac; después del efecto fundador inicial, las condiciones ecológicas seleccionaron entre la variación genética permanente, donde la acumulación de variantes genéticas neutras aceleró la adaptación local.
- La adaptación de la variación genética permanente sugiere que las poblaciones de *B. sp.* 'México' tienen la capacidad de responder a los cambios ambientales en un tiempo relativamente corto a través de cambios en la composición genética de las poblaciones locales.
- Nuestros hallazgos proporcionan evidencia convincente de selección divergente y adaptación local, la base genética de estas características se asocia con genes involucrados en funciones de osmoregulación, natación, sensibilidad a los estímulos de cambio a la fase sexual, estrés.

Finalmente, a partir de los datos generados en esta investigación como punto de partida, se puede vislumbrar la necesidad de realizar en investigaciones futuras el análisis de correlación con los factores ecológicos y el estudio de la evolución de la historia de vida de los organismos de estas poblaciones, ya que, esta aproximación ha mostrado ser una herramienta muy poderosa en la

identificación de la variación genética de la evolución adaptativa. Posteriormente, es importante analizar los dos conjuntos de datos, diferenciación genética y correlación para elegir genes bajo selección para condiciones locales y realizar una validación funcional. A partir de lo cual, nos permitiría explicar mejor el proceso de diversificación y sugerir la base genética de la adaptación local que ha sufrido esta especie microendémica de rotífero partenogenético cíclico que habita en sistema con distribución insular y, eventualmente, hacer uso de esta especie como un modelo ecogenómico en sistemas lacustres.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Alcántara-Rodríguez J.A., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Serranía-Soto, C.R., & Piedra-Ibarra, E. (2012). Local adaptation in populations of *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in central Mexico. *Freshwater Biology* 4(57): 728-740. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2012.02738.x
- Alcocer-Durand J., Escolero-Fuentes, O.A., & Marín-Stillman, L.E. (2004). Problemática del agua de la Cuenca Oriental, estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. En B. Jiménez, L. Marín (Ed.), El agua en México vista desde la academia. Academia Mexicana de Ciencias.
- Andersen R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press.
- Anderson J.T., Lee, C.R., Rushworth, C.A., Colautti, R.I., & Mitchell-Olds, T. (2013). Genetic trade-offs and conditional neutrality contribute to local adaptation. *Molecular Ecology* 3(22): 699-708. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05522.x
- Armienta M.A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerós, N., Cruz, O., & Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 2(178): 249-258. DOI: 10.1016/j.jvolgeores.2008.06.019
- Arredondo-Figueroa J.L. (2002). Los axalapas de la Cuenca Oriental, Puebla. En G. Lanza-Espino & J. L. García-Calderón (Ed.), Lagos y presas de México. Centro de Ecología y Desarrollo.
- Badosa A., Frisch, D., Green, A.J., Rico, C., & Gómez, A. (2017). Isolation mediates persistent founder effects on zooplankton colonization in new temporary ponds. *Scientific Reports* 1(7): 43983. DOI: 10.1038/srep43983
- Balompapueng M.D., Hagiwara, A., Nozaki, Y., & Hirayama, K. (1997). Preservation of resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Muller by canning. *Hydrobiologia* 358: 163-166. DOI: 10.1023/A:1003197222440

- Baron D.M., Kabututu, Z.P., & Hill, K.L. (2007). Stuck in reverse: Loss of LC1 in *Trypanosoma brucei* disrupts outer dynein arms and leads to reverse flagellar beat and backward movement. *Journal of Cell Science* 9(120): 1513-1520. DOI: 10.1242/jcs.004846
- Baronas V.A., Yang, R.Y., & Kurata, H.T. (2017). Extracellular redox sensitivity of Kv1.2 potassium channels. *Scientific Reports* 1(7): 9142. DOI: 10.1038/s41598-017-08718-z
- Barrera-Moreno O.A., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Alcántara-Rodríguez, J.A., & Piedra-Ibarra, E. (2015). From local adaptation to ecological speciation in copepod populations from neighboring lakes. *PLoS One* 4(10): e0125524. DOI: 10.1371/journal.pone.0125524
- Barrera-Sánchez E. (2016). Diversificación críptica en ambientes ecológicos contrastantes: Análisis de la posible especiación ecológica en poblaciones del copépodo *Leptodiaptomus cf. sicilis*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Barret R.D.H., & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* 1(23):38-44. DOI: 10.1016/j.tree.2007.09.008
- Benestan L.M., Ferchaud, A.L., Hohenlohe, P.A., Garner, B.A., Naylor, G.J.P., Baums, I.B., Schwartz, M.K., Kelley, J.L., & Luikart, G. (2016). Conservation genomics of natural and managed populations: building a conceptual and practical framework. *Molecular Ecology* 13(25): 2967-2977. DOI: 10.1111/mec.13647
- Birzu G., Matin, S., Hallatschek, O., & Korolev, K.S. (2019). Genetic drift in range expansions is very sensitive to density dependence in dispersal and growth. *Ecology Letters* 11(22): 1817-1827. DOI: 10.1111/ele.13364
- Bjornstad O. N., & Grenfell, B. T. (2001). Noisy clockwork: Time series analysis of population fluctuations in animals. *Science* 5530(293): 638-643. DOI: 10.1126/science.1062226
- Blommaert J., Riss S., Hecox-Lea B., Welch, D. B. M., & Stelzer C. P. (2019). Small, but surprisingly repetitive genomes: Transposon expansion and not polyploidy has driven a doubling in genome size in a metazoan species complex. *BMC Genomics* 20: 446. DOI: 10.1186/s12864-019-5859-y
- Boraas M.E. (1993). Semicontinuous culture methods. En N. Walz (Ed.), *Plankton regulation dynamics, Ecological Studies*. Springer-Verlag.
- Bostein D., & Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: Past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature Genetics*. S(33): 228-237. DOI: 10.1038/ng1090
- Brendonck L., & De Meester, L. (2003). Egg banks in freshwater zooplankton: Evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia* 491: 65-84. DOI: 10.1023/A:1024454905119
- Caballero M., Vilaclara, G., Rodríguez, A., & Juárez, D. (2003). Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional* 3(42):529-538

- Cáceres C.E. (1997). Dormancy in invertebrates. *Invertebrate Biology* 4(116): 371-383. DOI: 10.2307/3226870
- Campillo S., García-Roger, E.M., Carmona, M.J., & Serra, M. (2011). Local adaptation in rotifer populations. *Evolutionary Ecology* 4(25): 933-947. DOI: 10.1007/s10682-010-9447-5
- Carrasco-Nuñez G., Ort, M.H., & Romero, C. (2006). Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 1(159): 179-197. DOI: 10.1016/j.jvolgeores.2006.07.001
- Chako-Tchamabe B., Carrasco-Nuñez, G., Dedzo, M.G., Kshirsagar, P., & Assah, A.N.E. (2020). Geochemical characterization of Alchichica maar volcano, Serdan-Oriental Basin, eastern Trans-Mexican Volcanic Belt: Insights on polymagmatic evolution at monogenetic volcanic clusters. *Journal of South American Earth Sciences* 1(104): 102889. DOI: 10.1016/j.jsames.2020.102889
- Chedeville C., Guilbaud, M.N., & Siebe, C. (2020). Stratigraphy and radiocarbon ages of late-Holocene Las Derrumbadas rhyolitic domes and surrounding vents in the Serdan-Oriental basin (Mexico): Implications for archeology, biology, and hazard assessment. *Holocene* 3(30): 402-419. DOI: 10.1177/0959683619887417
- Chellan B., Zhao, L., Landeche, M., Carmean, C.M., Dumitrescu, A.M., & Sargis, R.M. (2020). Selenocysteine insertion sequence binding protein 2 (sbp2) in the sex-specific regulation of selenoprotein gene expression in mouse pancreatic islets. *Scientific Reports* 1(10): 18568. DOI: 10.1038/s41598-020-75595-4
- Ciros-Pérez J., Carmona, M.J., & Serra, M. (2001). Resource competition between sympatric sibling rotifer species. *Limnology and Oceanography* 6(46): 1511-1523. DOI: 10.4319/lo.2001.46.6.1511
- Ciros-Pérez J., Ortega-Mayagoitia, E., & Alcocer, J. (2015). The role of ecophysiological and behavioral traits in structuring the zooplankton assemblage in a deep, oligotrophic, tropical lake. *Limnology and Oceanography* 6(60):2158-2172. DOI: 10.1002/lno.10157
- Clausen M.V., Jarerattanachat, V., Carpenter, E.P., Sansom, M.S.P., & Tucker, S.J. (2017). Asymmetric mechanosensitivity in a eukaryotic ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 40(114): 8343-8351. DOI:10.1073/pnas.1708990114
- Coggins B.L., Pearson, A.C., & Yampolsky, L.Y. (2021). Does geographic variation in thermal tolerance in *Daphnia* represent trade-offs or conditional neutrality? *Journal of Thermal Biology* 1(98): 102934. DOI: 10.1016/j.therbio.2021.102934
- Coop G., Witonsky, D., Di Rienzo, A., & Pritchard, J.K. (2010). Using environmental correlations to identify loci underlying local adaptation. *Genetics* 4(185): 1411-1423. DOI: 10.1534/genetics.110.114819
- Corander J., Siren, J., & Arjas, E. (2008). Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics* 1(23): 111-129. DOI: 10.1007/s00180-007-0072-x

- Cousyn C., De Meester, L., Colbourne, J.K., Brendonk, L., Verschuren, D., & Volckaert, F. (2001). Rapid, local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 11(98): 6256-6260. DOI: 10.1073/pnas.111606798
- Crispo E., Bentzen, P., Reznick, D.N., Kinison, M.T., & Hendry, A.P. (2006). The relative influence of natural selection and geography on gene flow in guppies. *Molecular Ecology* 1(15): 49-62. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02764.x
- Cruz-Cruz A.G. (2018). Ecología evolutiva de la partenogénesis cíclica en un rotífero en un ambiente poco variable. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- De Meester L., Gómez, A., Okamura, B., & Schwenk, K. (2002). The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica- International Journal of Ecology* 3(23): 121-135. DOI: 10.1016/S1146-609X(02)01145-1
- De Meester L., Vanoverbeke J., Kilsdonk, L.J. & Urban, M. C. (2016). Evolving perspectives on monopolization and priority effects. *Trends in Ecology & Evolution* 2(31): 136-146. DOI: 10.1016/j.tree.2015.12.009
- De Mita S., Thuillet, A.C., Gay, L., Ahmadi, N., Manel, S., Ronfort, J., & Vigoroux, Y. (2013). Detecting selection along environmental gradients: Analysis of eight methods and their effectiveness for outbreeding and selfing populations. *Molecular Ecology* 5(22): 1383-1399. DOI: 10.1111/mec.12182
- Denekamp N.Y., Suga, K., Hagiwara, A., Reinhardt, R., & Lubzens, E. (2010). A role for molecular studies in unveiling the pathways for formation of rotifer resting eggs and their survival during dormancy. En E. Lubzens, J. Cerda, M. Clark, (Ed.), *Dormancy and resistance in harsh environments* (Vol.21). Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-12422-8\_7
- Dieckmann U., & Doebeli, M. (1999). On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 6742(400): 354-357. DOI: 10.1038/22521
- Dieckmann U. Metz, J.A., Doebeli, M., & Tautz, D. (2004). *Introduction to adaptive speciation*. Cambridge University Press. DOI: 10.1017/CBO9781139342179.001
- Doebeli M. (2011). *Adaptive diversification*. Princeton University Press.
- Drummond A.J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214. DOI: 10.1186/1471-2148-7-214
- Eklom R., & Galindo, J. (2011). Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 1(107): 1-15. DOI: 10.1038/hdy.2010.152
- Elshire R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., & Mitchell, S.E. (2011). A robust, simple genotyping by sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 5(6): e19379. DOI: 10.1371/journal.pone.0019379

- Excoffier L., Foll, M., & Petit, R.J. (2009). Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 1(40): 481-501. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173414
- Feder J.L., Nosil, P., Wacholder, A.C., Egan, S.P., Berlocher, S.H., & Flaxman, S.M. (2014). Genome-wide congealing and rapid transitions across the speciation continuum during speciation with gene flow. *Journal of Heredity* 1(105): 810-820. DOI: 10.1093/jhered/esu038
- Fernandez R., Alcocer, J., Lugo, A., Oseguera, L.A., & Guadarrama-Hernandez, S. (2022). Seasonal and interannual dynamics of pelagic rotifers in a tropical, saline, deep lake. *Diversity Basel* 2(14): 113. DOI: 10.3390/d14020113
- Filonov A., Tereshchenko, I., & Alcocer, J. (2006). Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophysical Research Letters* 7(33): L07404. DOI: 10.1029/2006GL025901
- Fiorini V.D., Domínguez, M., Reboreda, J.C., & Swaddle, J. (2022). A recent invasive population of the European starling *Sturnus vulgaris* has lower genetic diversity and higher fluctuating asymmetry than primary invasive and native populations. *Biological Invasions* 1(24): 437-448. DOI: 10.1007/s10530-021-02653-x
- Flaxman S.M., Feder, J.L., & Nosil, P. (2012). Spatially explicit models of divergence and genome hitchhiking. *Journal of Evolutionary Biology* 12(25): 2633-2650. DOI: 10.1111/jeb.12013
- Foll M., & Gaggiotti, O. (2008). A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* 2(180): 977-993. DOI: 10.1534/genetics.108.092221
- Franch-Gras L., Hahn, C., García-Roger, E.M., Carmona, M.J., Serra, M., & Gómez, A. (2018). Genomic signatures of local adaptation to the degree of environmental predictability in rotifers. *Scientific Reports* 1(8): 16051. DOI: 10.1038/s41598-018-34188-y
- Frankham R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation* 2(126): 131-140. DOI: 10.1016/j.biocon.2005.05.002
- Frisch D., Lejeune, C., Hayashi, M., Bidwell, M.T., Sánchez-Fontenla, J., & Green, A.J. (2021). Brine chemistry matters: Isolation by environment and by distance explain population genetic structure of *Artemia franciscana* in saline lakes. *Freshwater Biology* 8(66): 1546-1559. DOI: 10.1111/fwb.13737
- Funk D.J., Egan, S.P., & Nosil, P. (2011). Isolation by adaptation in neochlamisus leaf beetles: Host-related selection promotes neutral genomic divergence. *Molecular Ecology* 22(20): 4671-4682. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05311.x
- Furuta A., Yagi, T., Yanagisawa, H., Higuchi, H., & Kamiya, R. (2009). Systematic comparison in vitro motile properties between chlamydomonas wild-type and mutant outer arm dyneins each lacking one of the three heavy chains. *Journal of Biological Chemistry* 9(284): 5927-5935. DOI: 10.1074/jbc.M807830200

- García E. (1988). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). (4ª ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-Roger E. M., & Ortells, R. (2018). Trade-offs in rotifer diapausing egg traits: survival, hatching and lipid content. *Hydrobiologia* 805: 339-350. DOI: :2443/10.1007/s10750-017-3317-x
- García-Roger E.M., Carmona, M.J., & Serra, M. (2006). Patterns in rotifer diapausing egg banks: Density and viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2(336): 198-210. DOI: 10.1016/j.jembe.2006.05.009
- García-Roger E.M., Serra, M., & Carmona, M.J. (2014). Bet-hedging in diapausing egg hatching of temporary rotifer populations: A review of models and new insights. *International Review of Hydrobiology* 2(99): 96-106. DOI: 10.1002/iroh.201301708
- Gavin D. G., Fitzpatrick, M. C., Gugger, P.F., Heath, K.D., Rodríguez-Sánchez, F., & Dobrowski, S.Z. (2014). Climate refugia: Joint inference from fossil records, species distribution models and phylogeography. *New Phytologist* 1(204): 37-54. DOI: 10.1111/nph.12929
- Gilbert J. J. (2017). Resting-egg hatching and early population development in rotifers: a review and hypothesis for differences between shallow and deep waters. *Hydrobiologia* 796: 235-243. DOI: 2443/10.1007/s10750-016-2867-7
- Glaubitz J.C., Casstevens, T.M., Lu, F., Harriman, J., Elshire, R.J., Sun, Q., & Buckler, E.S. (2014). Tassel-GBS: A high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS ONE* 2(9): e90346. DOI: 10.1371/journal.pone.0090346
- Gómez A., & Carvalho, G.R. (2000). Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: Microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. *Molecular Ecology* 2(9): 203-214. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.00849.x
- Gómez A., Adcock, G. J., Lunt, D.H., & Carvalho, G.R. (2002). The interplay between colonization history and gene flow in passively dispersing zooplankton: Microsatellite analysis of rotifer resting egg banks. *Journal of Evolutionary Biology* 1(15): 158-171. DOI: 10.1046/j.1420-9101.2002.00368.x
- Grandl J., Kim, S.E., Uzzell, V., Bursulaya, B., Petrus, M., & Bandell, M. (2010). Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nature Neuroscience* 6(13): 708-714. DOI:10.1038/nn.2552
- Haag C.R., Riek, M., Hottinger, J.W., Pajunen, V.I., & Ebert, D. (2006). Founder events as determinants of within-island and among-island genetic structure of *Daphnia* metapopulations. *Heredity* 2(96): 150-158. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800774
- Hagiwara A., & Hino, A. (1989). Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 186: 415-421. DOI: 10.1007/BF00048940

- Hall M.C., Lowry, D.B., & Willis, J.H. (2010). Is local adaptation in *Mimulus guttatus* caused by trade-offs at individual loci? *Molecular Ecology* 13(19): 2739-2753. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04680.x
- Hanson S.J., Stelzer, C.P., Welch, D.B.M., & Logsdon, J.M. (2013). Comparative transcriptome analysis of obligately asexual and cyclically sexual rotifers reveals genes with putative functions in sexual reproduction, dormancy, and asexual egg production. *BMC Genomics* 1(14): 412. DOI: 10.1186/1471-2164-14-412
- Hasegawa M., Kishino, H., & Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22(2): 160-174. DOI: 10.1007/BF02101694
- Hedrick P. W. (2011). *Genetics of populations*. (4<sup>a</sup> ed.). Jones and Barlett Publishers.
- Hermisson J., & Pennings, P.S. (2005). Soft sweeps: Molecular population genetics of adaptation from standing genetic variation. *Genetics* 4(169): 2335-2352. DOI: 10.1534/genetics.104.036947
- Hernández M.R., Davis, M.B., Jiang, J.H., Brouhard, E.A., Severson, A.F., & Csankovszki, G. (2018). Condensin I protects meiotic cohesion from WAPL-1 mediated removal. *PLoS Genetics* 5(14): e1007382. DOI:10.1371/journal.pgen.1007382
- Hofmeister N.R., Werner, S.J., & Lovette, I.J. (2021). Environmental correlates of genetic variation in the invasive European starling in North America. *Molecular Ecology* 5(30): 1251-1263. DOI: 10.1111/mec.15806
- Holsinger K. E., & Weir, B. S. (2009). Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting *F<sub>st</sub>*. *Nature Reviews Genetics* 1(10): 639-650. DOI: 10.1038/nrg2611
- Hu H., Ataka, K., Menny, A., Fourati, Z., Sauguet, L., & Corringier P.J. (2018). Electrostatics, proton sensor and networks governing the gating transition in GLIC, a proton-gated pentameric ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 52(115): 12172-12181. DOI: 10.1073/pnas.1813378116
- Ishii K., Nunoki, K., Yamagishi, T., Okada, H., & Taira, N. (2001). Differential sensitivity of Kv1.4, Kv1.2, and their tandem channel to acidic pH: involvement of a histidine residue in high sensitivity to acidic pH. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2(296): 405-411.
- Jaffe A.B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: Biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1(21): 247-269. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- Jentsch T.J. (2016). VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volumen and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(17): 293-307. - DOI: 10.1038/nrm.2016.29

- Jiménez-López M.A. (2021). Análisis transcriptómico de los mecanismos osmorreguladores y de respuesta al estrés en el rotífero *Brachionus* sp 'México'. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jin F.L., Xu, X.X., Yu, X.Q., & Ren, S.X. (2009). High-level expression of active recombinant ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase of *Drosophila melanogaster* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 2(65): 115-121. DOI: 10.1016/j.pep.2008.08.010
- Jombart T. (2008). Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 11(24): 1403-1405. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn129
- Jones F.C., Grabherr, M.G., Chan, Y.F., Russell, P., Mauceli, E., Johnson, J., Swofford, R., Pirun, M., Zody, M.C., White, S., Birney, E., Searle, S., Schmutz, J., Grimwood, J., Dickson, M.C., Myers, R.M., Miller, C.T., Summers, B.R., & Knecht, A.K. (2012). The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks. *Nature* 7392(484): 55-61. DOI: 10.1038/nature10944
- Kagale S., Koh, C., Clarke, W. E., Bollina, V., Parkin, I. A., & Sharpe, A. G. (2016). Analysis of genotyping by sequencing (GBS) data. *Methods in Molecular Biology* 1(1374): 269-284. DOI: 10.1007/978-1-4939-3167-5\_15
- Kawecki T.J. (2000). Adaptation to marginal habitats: contrasting influence of the dispersal rate on the fate alleles with small and large effects. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 450(267): 1315-1320. DOI: 10.1098/rspb.2000.1144
- Kutomi O., Hori, M., Ishida, M., Tominaga, T., Kamachi, H., Koll, F., Cohen, J., Yamada, N., & Noguchi, M. (2012). Outer dynein arm light chain 1 is essential for controlling the ciliary response to cyclic AMP in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryotic Cell* 5(11): 645-653. DOI: 10.1128/EC.05279-11
- Lailvaux S.P., & Husak, J.F. (2014). The life history of whole-organism performance. *Quarterly Review of Biology* 4(89): 258-318. DOI: 10.1086/678567
- Lande R. (1988). Genetics and demography in biological conservation. *Science* 4872(241): 1455-1460. DOI: 10.1126/science.3420403
- Laughlin D.C., & Messier, J. (2015). Fitness of multidimensional phenotypes in dynamic adaptive landscapes. *Trends in Ecology and Evolution* 8(30): 487-496. DOI: 10.1016/j.tree.2015.06.003
- Le Corre V., & Kremer, A. (2012). The genetic differentiation at quantitative trait loci under local adaptation. *Molecular Ecology* 7(21): 1548-1566. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05479.x
- Lee C.R., & Mitchell-Olds, T. (2011). Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. *Molecular Ecology* 22(20): 4631-4642. DOI:10.1111/j.1365-294X.2011.05310.x
- Lee J., Kang, M., Kim, S., & Chang, I. (2020). Structural and molecular insight into the pH-induced low-permeability of the voltage-gated potassium channel Kv1.2 through dewetting of the

- water cavity. *PLoS Computational Biology* 4(16): e1007405. DOI:10.1371/journal.pcbi.1007405
- Leibold M.A., Chase, J.M., & Ernest, S.K.M. (2017). Community assembly and the functioning of ecosystems: How metacommunity processes alter ecosystem attributes. *Ecology* 4(98): 909-919. DOI: 10.1002/ecy.1697
- Leung W.Y., Dragowska, W.H., Ricaurte, D., Kwok, B., Mathew, V., Roosendaal, J., Ahluwalia, A., Warburton, C., Laskin, J.J., Stirling, P.C., Qadir, M.A., & Bally, M.B. (2015). 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1 (PAPSS1) knockdown sensitizes non small cell lung cancer cells to DNA damaging agents. *Oncotarget* 19(10): 17161-17177. DOI: 10.18632/oncotarget.3635
- Lewis W.M. (2000). Basis for the protection and management of tropical lakes. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 1(5): 35-48. DOI: 10.1046/j.1440-1770.2000.00091.x
- Lewontin R.C., & Krakauer, J. (1973). Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics* 1(74): 175-195. DOI: 10.1093/genetics/74.1.175
- Libes S.M. (2009). Introduction to marine biogeochemistry. Elsevier Academic.
- Louette G., & De Meester, L. (2005). High dispersal capacity of cladoceran zooplankton in newly formed communities. *Ecology* 2(86): 353-359. DOI:10.18990/04-0403
- Luikart G., England, P.R., Tallmon, D., Jordan, S., & Taberlet, P. (2003). The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* 12(4): 981-994. DOI: 10.1038/nrg1226
- Luikart G., Kardos, M., Hand, B.K., Rajora, O.P., Aitken S.N., & Hohenlohe, P.A. (2019). Population genomics: Advancing understanding of nature. En O. P. Rajora (Ed.), *Population genomics: Concepts, approaches and applications*. Springer.
- Lynch M., Ackerman, M.S., Gout, J.F., Long, H., Sung, W., Thomas, W.K., & Foster, P.L. (2016). Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate. *Nature Reviews Genetics* 11(17): 704-714. DOI: 10.1038/nrg.2016.104
- Martínez-Chávez M. (2010). Efecto de cladóceros y copépodos sobre el fitoplancton del lago La Preciosa, Puebla. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez-Ruiz C., & García-Roger, E. M. (2015). Being first increases the probability of long diapause in rotifer resting eggs. *Hydrobiologia* 745: 111-121. DOI: 2443/10.1007/s10750-014-2098-8
- Martins K., Gugger, P.F., Llanderal-Mendoza, J., González-Rodríguez, A., Fitz-Gibbon, S.T., Zhao, J.L., Rodríguez-Correa, H., Oyama, K., & Sork, V.L. (2017). Landscape genomics provides

- evidence of climate-associated genetic variation in Mexican populations of *Quercus rugosa*. *Evolutionary Applications* 10(11): 1842-1858. DOI: 10.1111/eva.12684
- Mastreta-Yanes A., Arrigo, N., Álvarez, N., Jorgensen, T.H., Piñero, D., & Emerson, B.C. (2015). Restriction site-associated DNA sequencing, gonotyping error estimation and de novo assembly optimization for population genetic inference. *Molecular Ecology Resources* 1(15): 28-41. DOI: 10.1111/1755-0998.12291
- Meirmans P.G. (2012). AMOVA-based clustering of population genetic data. *Journal of Heredity* 5(103): 744-750. DOI: 10.1093/jhered/ess047
- Meirmans P.G., & Hedrick, P.W. (2010). Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures. *Molecular Ecology* 1(11): 5-18. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x
- Meyer X. (2021). Adaptive tree proposals for bayesian phylogenetic inference. *Systematic Biology* 70(5): 1015-1032. DOI: 10.1093/sysbio/syab004
- Mills S., Alcántara-Rodríguez, J.A., Ciroso-Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Galindo, K.H., Jersabek, C.D., Malekzadeh-Viayeh, R., Leasi, F., Lee, J.S., Welch, D.B.M., Papakostas, S., Riss, S., Segers, H., Serra, M., Shiel, R., Smolak, R., & Snell, T.W. (2017). Fifteen species in one: Deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia* 1(796): 39-58. DOI: 10.1007/s10750-016-2725-7
- Mitchell-Olds T., Willis, J.H., & Goldstein, D.B. (2007). Which evolutionary processes influence natural genetic variation for phenotypic traits? *Nature Reviews Genetics* 11(8): 845-856. DOI: 10.1038/nrg2207
- Montero-Pau J., Gómez, A., & Muñoz, J. (2008). Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods* 1(6): 218-222. DOI: 10.4319/lom.2008.6.218
- Munshi-South J. (2012). Urban landscape genetics: Canopy cover predicts gene flow between white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) population in New York City. *Molecular Ecology* 6(21): 1360-1378. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05476.x
- Nakamura T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., & Cech, T.R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 5328(277): 955-959. DOI: 10.1126/science.277.5328.955
- Narum S.R., & Hess, J.E. (2011). Comparison of  $F_{ST}$  outlier test for SNP loci under selection. *Molecular Ecology Resources* 1(11): 184-194. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.02987.x
- Nei R., & Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Noda Y., & Sasaki, S. (2006). Regulation of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 8(1758): 1117-1125. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.03.004

- Nosil P., & Feder, J.L. (2012). Genomic divergence during speciation: Causes and consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 1587(367): 332-342. DOI: 10.1098/rstb.2011.0263
- Nosil P., Egan, S.P., & Funk, D.J. (2008). Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: Isolation by adaptation and multiple roles for divergent selection. *Evolution* 2(62): 316-336. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2007.00299.x
- Nosil P., Funk, D.J., & Ortiz-Barrientos, D. (2009). Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* 3(18): 375-402. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03946.x
- Oliva M.G., Lugo, A., Alcocer, J., Peralta, L., & Del Rosario-Sanchez, M. (2001). Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia* 1(466): 299-306. DOI: 10.1023/A:1014578024049
- Olivier D., Lannou, C., Monod, H., Papaix, J., & Traore, D. (2016). Adaptive diversification in heterogeneous environments. *Theoretical Population Biology* 1(114) 1-9. DOI: 10.1016/j.tpb.2016.11.003
- Onbé T. (1978). Sugar flotation method for sorting the resting eggs of marine cladocerans and copepods from sea-bottom sediment. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 12(44): 1411.
- Orsini L., Mergeay, J., Vanoverbeke, J., & De Meester, L. (2013). The role of selection in driving landscape genomics structure of the waterflea *Daphnia magna*. *Molecular Ecology* 3(22): 583-601. DOI: 10.1111/mec.12117
- Orsini L., Spanier, K.I., & De Meester, L. (2012). Genomic signature of natural and anthropogenic stress in wild populations of the waterflea *Daphnia magna*: Validation in space, time and experimental evolution. *Molecular Ecology* 9(21): 2160-2175. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05429.x
- Ortega-Mayagoitia E., Alcántara-Rodríguez J. A., Urbán-Olivares J., & Ciroso-Pérez J. (2022). Genomic signatures of adaptive divergence in lacustrine copepods. *Freshwater Biology* 6(67): 1045-1062. DOI: 10.1111/fwb.13900
- Ortega-Mayagoitia E., Ciroso-Pérez, J., & Sánchez-Martínez, M. (2011). A story of famine in the pelagic realm: Temporal and spatial patterns of food limitation in rotifers from an oligotrophic tropical lake. *Journal of Plankton Research* 10(33): 1574-1585. DOI: 10.1093/plankt/fbr045
- Patel-King R.S., & King, S.M. (2009). An outer arm dynein light chain acts in a conformational switch for flagellar motility. *Journal of Cell Biology* 2(186): 283-295. DOI: 10.1083/jcb.200905083
- Paulsen C.E., Armache, J.P., Gao, Y., Cheng, Y.F., & Julius, D. (2015). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 7548(520): 511-517. - DOI: 10.1038/nature14367

- Pavlidis P., Jensen, J.D., Stephan, W., & Stamatakis, A. (2012). A critical of storytelling: Gene ontology categories and the importance of validating genomic scans. *Molecular Biology and Evolution* 10(29): 3237-3248. DOI: 10.1093/molbev/mss136
- Percino-Daniel R., Recuero, E., Vazquez-Dominguez, E., Zamudio, K.R., & Parra-Olea, G. (2016). All grown-up and nowhere to go: Paedomorphosis and local adaptation in *Ambystoma salamanders* in the Cuenca Oriental of Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society* 3(118): 582-597. DOI: 10.1111/bij.12750
- Peres-Neto P.R., Jackson, D.A., & Somers, K.M. (2005). How many principal components? Stopping rules for determining the number of non trivial axes revisited. *Computational Statistics and Data Analysis* 4(49): 974-997. DOI: 10.1016/j.csda.2004.06.015
- Poisot T., Bever, J.D., Nemri, A., Thrall, P.H., & Hochberg, M.E. (2011). A conceptual framework for the evolution of ecological specialisation. *Ecology Letters* 9(14): 841-851. DOI:10.1111/j.1461-0248.2011.01645.x
- Przeworski M., Coop, G., & Wall, J.D. (2005). The signature of positive selection on standing genetic variation. *Evolution* 11(59): 2312-2323. DOI: 10.1554/05-273.1
- Putman A., & Carbone, I. (2014). Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution* 22(4): 4399-4428. DOI: 10.1002/ece3.1305
- Rambaut A. (2012). FigTree v.1.4. Recuperado de [tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/)
- Ramírez G., & Novelo, A. (1984). La vegetación acuática vascular de seis lagos cráter del estado de Puebla. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 1(46): 75-88. DOI: 10.17129/botsci.1320
- Räsänen K., & Hendry, A.P. (2008). Disentangling interactions between adaptive divergence and gene flow when ecology drives diversification. *Ecology Letters* 6(11): 624-636. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2008.01176.x
- R Core Team. (2015). R: A language and environment for statistical computing. Computing, R Foundation for Statistical. Austria.
- Reche I., Pulido-Villena, E., Morales-Baquero, R., & Casamayor, E. O. (2005). Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? *Ecology* 1(86): 1715-1722. DOI: 10.1890/04-15871
- Reichow S.L., & Gonen, T. (2008). Noncanonical binding of calmodulin to aquaporin-0: Implications for channel regulation. *Structure* 9(16): 1389-1398. DOI: 10.1016/j.str.2008.06.011
- Reznick D., Nunney, L., & Tessier, A. (2000). Big houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction. *Trends in Ecology and Evolution* 1(15): 421-425. DOI:10.1016/S0169-5347(00)01941-8
- Ringner M. (2008). What is principal component analysis? *Nature Biotechnology* 3(26): 303-304. DOI: 10.1038/nbt0308-303.
- Rockman M.V. (2012). The QTN program and the alleles that matter for evolution: All that's gold does not glitter. *Evolution* 1(66): 1-17. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2011.01486.x

- Rompolas P., Patel-King, R.S., & King, S.M. (2010). An outer arm dynein conformational switch is required for metachronal synchrony of motile cilia in planaria. *Molecular Biology of the Cell* 12(21): 3669-3679. DOI: 10.1091/mbc.E10-04-0373
- Sacher F., Moller, C., Bone, W., Gottwald, U., & Fritsch, M. (2007). The expression of the testis-specific Dyrk4 kinase is highly restricted to step 8 spermatids but is not required for male fertility in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1(267): 80-88. DOI: 10.1016/j.mce.2006.12.041
- Saint-Leandre B., Nguyen, S.C., & Levine, M.T. (2019). Diversification and collapse of a telomere elongation mechanism. *Genome Research* 6(29): 920-931. DOI: 10.1101/gr.245001.118
- Sankiewicz A., Laudanski, P., Romanowicz, L., Hermanowicz, A., Roszkowska-Jakimiec, W., Debek, W., & Gorodkiewicz, E. (2015). Development of surface plasmon resonance imaging biosensors for detection of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1. *Analytical Biochemistry* 1(469): 4-11. DOI: 10.1016/j.ab.2014.09.021
- Serra M., & King, C.E. (2003). The timing of sex in cyclically parthenogenetic rotifers. En A. Moya, E. Font (Eds.), *Evolution: From molecules to ecosystems*. Oxford University Press.
- Serra M., & Snell, T.W. (2009). Sex loss in monogonont rotifers. En I. Schön, K. Martens, P. VanDijk (Eds.), *Lost sex: The evolutionary biology of parthenogenesis*. Springer. DOI: 10.1007/978-90-481-2770-2\_14
- Slatkin M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 1(47): 264-279. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1993.tb01215.x
- Snell T.W., Shearer, T.L., & Smith, H.A. (2011). Exposure to dsRNA elicits RNA interference in *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *Marine Biotechnology* 2(13): 264-274. DOI: 10.1007/s10126-010-9295-x
- Song T., Hatano, N., Horii, M., Tokumitsu, H., Yamaguchi, F., Tokuda, M., & Watanabe, Y. (2004). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 1(570): 133-137. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.05.083
- Stapley J., Reger, J., Feulner, P.G., Smadja, C., Galindo, J., Ekblom, R., Bennison, C., Ball, A.D., Beckerman, A.P., & Slate, J. (2010). Adaptation genomics: The next generation. *Trends in Ecology and Evolution* 12(25): 705-712. DOI: 10.1016/j.tree.2010.09.002
- Stelzer C.P., & Snell, T.W. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnology and Oceanography* 2(48): 939-943. DOI: 10.4319/lo.2003.48.2.0939
- Stephan W., Wiehe, T., & Lenz, M.W. (1992). The effect of strongly selected substitutions on neutral polymorphism-analytical results based on diffusion-theory. *Theoretical Population Biology* 2(41): 237-254. DOI: 10.1016/0040-5809(92)90045-U
- Storz J.F. (2005). Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology* 3(14): 671-688. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02437.x

- Sun J., Cornelius, S. P., Janssen, J., Gray, K. A., & Motter, A. E. (2015). Regularity underlies erratic population abundances in marine ecosystems. *Journal of the Royal Society Interface* 107(12). DOI:10.1098/rsif.2015.0235
- Sunnucks P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 5(15): 199-203. DOI: 10.1016/s0169-5347
- Taylor D.R., Aarssen, L.W., & Loehle, C. (1990). On the relationship between r/k selection and environmental carrying-capacity a new habitat templet for plant life-history strategies. *Oikos* 2(58): 239-250. DOI: 10.2307/3545432
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. R-project.org/
- Tiffin P., & Ross-Ibarra, J. (2014). Advances and limits of using population genetics to understand local adaptation. *Trends in Ecology and Evolution* 12(29): 673-680. DOI: 10.1016/j.tree.2014.10.004
- Urban-Olivares J. (2019). Genómica de poblaciones y divergencia ecológica: El caso del copépodo *Leptodiptomus* de los lagos de la Cuenca Oriental. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vandenkoornhuysen P., Dufresne, A., & Quaiser, A. (2010). Integration of molecular functions at the ecosystemic level: Breakthroughs and future goals of environmental genomics and post genomics. *Ecology Letters* 6(13): 776-791. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2010.01464.x
- Vanoverbeke J., & De Meester, L. (2010). Clonal erosion and genetic drift in cyclical parthenogens- the interplay between neutral and selective processes. *Journal of Evolutionary Biology* 5(23): 997-1012. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2010.01970.x
- Via S., & Hawthorne, D. J. (2002). The genetic architecture of ecological specialization: Correlated gene effects on host use and habitat choice in pea aphids. *The American Naturalist* 3(159): 76-88. DOI: 10.1086/338374
- Vilaclara G., Chávez, M., Lugo, A., González, H., & Gaytán, M. (1993). Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla state Mexico. *International Association of Theoretical and Applied Limnology-Proceedings* 1(25): 435-440.
- Weir B.S., & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution* 6(38): 1358-1370. DOI: 10.2307/2408641
- Westerlund A.M., & Delemotte, L. (2018). Effect of Ca<sup>2+</sup> on the promiscuous target-protein binding of calmodulin. *PLoS Computational Biology* 4(14): e1006072. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006072
- Willmer P., Stone, G., & Johnston, I. (2005). Environmental physiology of animals (2 ed.). Blackwell Publishing.
- Wilson E.O., & Bossert, W.H. (1971). A primer of population biology. Sinauer Associates.
- Wright S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 2(28): 114-138. DOI: 10.1093/genetics/28.2.114

- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 4(15): 323-354. DOI: 10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x
- Xu B.F., Hao, Z.L., Jha, K.N., Zhang, Z., Urekar, C., Digilio, L., Pulido, S., Strauss, J.F., Flickinger, C.J., & Herr, J.C. (2008). Targeted deletion of Tssk1 and 2 causes male infertility due to haploinsufficiency. *Developmental Biology* 2(319): 211-222. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.03.047
- Yang Z.H. (1996). Among-site variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology and Evolution* 9(11): 367-372. DOI: 10.1016/0169-5347(96)10041-0
- Ziegler W.H., Soetje, B., Marten, L.P., Wiese, J., Burute, M., & Haffner, D. (2020). Fibrocystin is essential to cellular control of adhesion and epithelial morphogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 14(21): 5140. DOI: 10.3390/ijms21145140

## ANEXO

### Anexo 1

SNPs presentes sobre genes con anotación funcional. Se muestra la posición, el nombre de la proteína que codifica, el valor de  $F_{ST}$ , el sentido de la lectura del gen, (+) sentido, y (-) antisentido., el tipo de cambio generado, y una descripción del cambio: el codón original y el aminoácido que codifica (aa), y el codon con cambio, señalando en negritas el nucleótido que cambia y el aminoácido que codifica.

	SNP		Anotación <i>B. plicatilis</i> (Franch-Grass, <i>et al.</i> , 2018)	$F_{ST}$	sentido	Tipo de cambio	<i>B. plicatilis</i>		<i>B. sp.</i> 'México'	
	contig	posición					codon	aa	codon	aa
1	1000055	10777	Amina-oxidasa	0.159	-	sinónima	ACT	Thr	<b>ACA</b>	Thr
2	1000371	30136	Anquirina 2, isoforma X1	0.235	+	sinónima	GGT	Gly	<b>GGA</b>	Gly
3	1000422	2015	Flavina que contiene amina	0.382	-	no-sinónima	CAG	Gln	<b>CAT</b>	His
4	1000443	10700	MAM y receptor de LDL clase A que contiene dominios 2	0.287	+	no-sinónima	ACA	Thr	<b>GCA</b>	Ala
5	1000664	762	Cadena pesada de miosina, isoforma A	0.309	+	no-sinónima	GCT	Ala	<b>ACT</b>	Thr
6	1000664	29364	Cadena pesada de miosina, isoforma A	0.433	+	sinónima	TTA	Leu	<b>TTG</b>	Leu
7	1000870	28940	Agitador de proteínas de canal dependiente de voltaje de potasio, isoforma X8	1	+	no-sinónima	ATA	Ile	<b>ACA</b>	Thr
8	1000969	7817	Homólogo de la proteína de membrana de vesículas sinápticas VAT-1	0.469	-	no-sinónima	GAC	Asp	<b>GAA</b>	Glu
9	1001276	18394	Elemento móvil jokey de ADN polimerasa dirigida por ARN	0.238	-	no-sinónima	AAA	Lys	<b>GAA</b>	Glu

10	1001446	913	Elemento móvil jokey de ADN polimerasa dirigida por ARN	0.313	+	no-sinónima	GAG	Glu	<b>GGG</b>	Gly
11	1001511	1763	Subunidad 2 del complejo de transcripción CCR4-NOT	0.162	+	sinónima	GCC	Ala	<b>GCT</b>	Ala
12	1001511	1847	Subunidad 2 del complejo de transcripción CCR4-NOT	0.162	+	sinónima	AGT	Ser	<b>AGC</b>	Ser
13	1001516	36458	Receptor de dopamina D2	0.242	-	no-sinónima	GTT	Val	<b>TTT</b>	Phe
14	1001555	4069	Endonucleasa/ transcriptasa inversa	0.51	+	sinónima	ACG	Thr	<b>ACA</b>	Thr
15	1001569	2901	Transposon Ty3-G Gag-Pol poli	0.221	-	no-sinónima	ATT	Ile	<b>ATG</b>	Met
16	1001644	26039	Proteína cerebral T-box 1	0.446	+	sinónima	CCA	Pro	<b>CCT</b>	Pro
17	1001744	5270	Proteína 1 que contiene el dominio TLDc	0.344	+	sinónima	TTG	Leu	<b>TTA</b>	Leu
18	1001747	453	Elemento móvil jokey de ADN polimerasa dirigida por ARN	0.184	-	no-sinónima	CGG	Arg	<b>TGG</b>	Trp
19	1001894	38846	Sintasa 1 bifuncional 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato	0.501	-	sinónima	ATA	Ile	<b>ATT</b>	Ile
20	1001964	3995	Transposon Ty3-G Gag-Pol poli	0.162	+	no-sinónima	CCC	Pro	<b>TCC</b>	Ser
21	1002928	84147	Cofactor de molibdeno sulfurasa	0.198	+	sinónima	CCA	Pro	<b>CCT</b>	Pro
22	1003055	20507	Cadena pesada de dineína, axonemal	0.678	-	sinónima	CTC	Leu	<b>CTT</b>	Leu
23	1003202	5893	Serina/ treonina-proteína quinasa	0.247	-	sinónima	GGC	Gly	<b>GGA</b>	Gly
24	1003233	40213	Calmodulina 3	0.435	-	sinónima	TCG	Ser	<b>TCC</b>	Ser
25	1003317	66380	Ubiquitina carboxiterminal hidrolasa 31	0.607	+	sinónima	ACT	Thr	<b>ACA</b>	Thr

26	1003483	790	Cadena pesada de miosina, isoforma A	0.139	-	no-sinónima	GAA	Glu	GAC	Asp
27	1003674	1921	Oxalato: formiato antiportador, isoforma X1	0.688	-	no-sinónima	AGC	Ser	AGA	Arg
28	1003859	11893	Proteína de dominio NACHT y WD40	0.317	+	no-sinónima	ATG	Met	ATA	Ile
29	1004041	4935	Subunidad de translocasas	0.292	-	sinónima	GTG	Val	GTT	Val
30	1004175	3194	Proteína 2 de unión a la secuencia de inserción de selenocisteína	0.973	+	sinónima	ATA	Ile	ATT	Ile
31	1004302	30054	Receptor de glutamato ionotrópico, kainato 2	0.808	+	no-sinónima	AAA	Lys	CAA	Gln
32	1004363	2871	Elemento móvil jokey de ADN polimerasa dirigida por ARN	0.16	-	no-sinónima	TGG	Trp	TGT	Cys
33	1005083	5451	Ral subunidad proteica activadora de GTPasa beta, isoforma X5	0.299	-	sinónima	ACC	Thr	ACT	Thr
34	1005085	1581	Seleno V	0.242	+	no-sinónima	CCT	Pro	CCA	Pro
35	1005133	6728	Subunidad 1 del complejo de condensina	0.542	-	no-sinónima	AAA	Lys	GAA	Glu
36	1005314	3550	Proteína de dedo de zinc	0.322	-	no-sinónima	TAC	Tyr	AAC	Asn
37	1006234	10434	Proteína disulfuro-isomerasa A6	0.219	+	no-sinónima	CCT	Pro	CTT	Leu
38	1006517	2475	SLIT-ROBO Rho proteína activadora 1 de GTPasa, isoforma X7	0.22	+	no-sinónima	AAG	Lys	AAA	Lys
39	1006892	33709	Proteína 13 C-terminal asociado a la clasificación vacuolar	0.241	+	no-sinónima	GCG	Ala	TCG	Ser
40	1006946	8012	Proteína de dedo de zinc	0.275	+	sinónima	GGA	Gly	GGC	Gly
41	1006946	8266	Proteína de dedo de zinc	0.177	+	sinónima	ACC	Thr	ACT	Thr
42	1008053	20267	Cadena beta de dineína, ciliar	0.72	-	sinónima	ATC	Ile	ATA	Ile

43	1008053	20371	Cadena beta de dineína, ciliar	0.847	-	no-sinónima	AGA	Arg	<b>GGA</b>	Gly
44	1008805	342	Elemento móvil jokey de ADN polimerasa dirigida por ARN	0.591	+	no-sinónima	CAC	His	<b>AAC</b>	Asn
45	1010145	3948	Receptor de Fmrfamida	0.169	-	sinónima	ACC	Thr	<b>ACT</b>	Thr
46	1011753	1800	Proteína Musashi-2 de unión a ARN	0.262	-	no-sinónima	CCC	Pro	<b>CAC</b>	His
47	1012193	195	Firbrocistina-L, isoforma X1	0.6	+	sinónima	TAC	Tyr	<b>TAT</b>	Tyr
48	1012340	6982	Transportador de aniones orgánicos multiespecífico canalicular 1	0.352	-	no-sinónima	GTT	Val	<b>ATT</b>	Ile
49	1012564	1251	Quinasa 4 regulada por fosforilación de tirosina de especificidad dual, isoforma X1	1	+	sinónima	CGT	Arg	<b>CGC</b>	Arg
50	1012753	1948	Proteína de interacción terminal desoxinucleotidiltransferasa 1	0.332	+	no-sinónima	CAA	Gln	<b>TAA</b>	STOP
51	1013584	244	Proteína activadora de rho GTPasa 39, isoforma X2	0.725	+	no-sinónima	ACG	Thr	<b>CCG</b>	Pro
52	1014215	550	Subunidad alfa-1 de ATPasa transportadora de sodio/potasio	0.341	-	no-sinónima	GGA	Gly	<b>GTA</b>	Val

## Anexo 2

SNPs presentes sobre genes que codifican proteínas hipotéticas. Se muestra la posición, el valor de  $F_{ST}$ , el sentido de la lectura del gen, el tipo de cambio generado y una descripción del cambio: el codón original, el aminoácido que codifica y el codón con cambio, señalando en negritas el nucleótido que cambia y el aminoácido que codifica.

Proteínas hipotéticas						<i>B. plicatilis</i>		<i>B. sp</i> 'México'	
SNP		$F_{ST}$	sentido	Tipo de cambio	codón	aa	codón	aa	
contig	posición								
1	1000439	34847	0.147	-	no-sinónima	CAA	Gln	TAA	STOP
2	1000443	10700	0.287	-	no-sinónima	TTC	Phe	<b>GTC</b>	Val
3	1000481	5420	0.4	-	sinónima	ACC	Thr	ACA	Thr
4	1000850	1405	0.536	+	no-sinónima	CTC	Leu	<b>GTC</b>	Val
5	1001318	25686	0.721	-	no-sinónima	CTT	Leu	CGT	Arg
6	1001747	453	0.184	+	no-sinónima	CGC	Arg	CTC	Leu
7	1002276	9447	0.204	-	no-sinónima	ACG	Thr	<b>AAG</b>	Lys
8	1002782	1530	1	+	no-sinónima	TGT	Cys	<b>GGT</b>	Gly
9	1003403	2333	0.66	-	sinónima	ATC	Ile	ATA	Ile
10	1003687	1503	0.577	+	no-sinónima	GAA	Glu	<b>AAA</b>	Lys
11	1004041	15722	0.432	-	no-sinónima	AAA	Lys	AAC	Asn
12	1004196	17277	0.482	+	no-sinónima	GAA	Glu	<b>TAA</b>	STOP
13	1004558	22762	0.196	-	no-sinónima	GGA	Gly	<b>TGA</b>	STOP
14	1004681	36250	0.822	-	sinónima	ATT	Ile	ATA	Ile
15	1004784	210	0.178	+	no-sinónima	CCG	Pro	<b>TCG</b>	Ser
16	1004817	2161	0.312	-	no-sinónima	GCA	Ala	<b>GTA</b>	Val
17	1004924	19220	0.23	+	no-sinónima	GCC	Ala	<b>ACC</b>	Thr
18	1005069	7569	0.225	-	sinónima	CTT	Leu	CTA	Leu
19	1006946	8012	0.275	-	no-sinónima	TCC	Ser	<b>CCC</b>	Pro
20	1006946	8266	0.177	-	no-sinónima	TGG	Trp	<b>TTG</b>	Leu
21	1008188	1811	1	+	no-sinónima	AAC	Asn	<b>AAA</b>	Lys
22	1008961	2516	0.2	-	no-sinónima	CTT	Leu	<b>CAT</b>	His
23	1011753	1800	0.262	+	no-sinónima	TGG	Trp	<b>TGA</b>	STOP
24	1011935	4833	0.431	+	no-sinónima	AGA	Arg	<b>AGT</b>	Ser
25	1012347	4158	0.342	-	no-sinónima	CAA	Gln	CTA	Leu
26	1012347	4247	0.166	-	sinónima	CCC	Pro	<b>CCA</b>	Pro
27	1012564	1251	1	-	sinónima	ATA	Ile	<b>ATC</b>	Ile
28	1013534	187	0.671	-	sinónima	ATC	Ile	<b>ATT</b>	Ile

### Anexo 3

SNPs presentes sobre regiones intrónicas. Se muestra la posición, la anotación funcional del gen sobre el que se encuentra y el valor de  $F_{ST}$ .

	SNP		Anotación <i>B. plicatilis</i> (Franch-Grass, <i>et al.</i> , 2018)	$F_{ST}$
	contig	posición		
1	1000055	10777	Proteína hipotética	0.159
2	1000239	24582	Proteína hipotética	0.322
3	1000542	944	beta	0.536
4	1001202	18067	Proteína hipotética	0.382
5	1001519	46387	Proteína hipotética	0.181
6	1001719	36414	Proteína hipotética	0.456
7	1001719	36414	Proteína hipotética	0.456
8	1001719	37403	Proteína hipotética	0.25
9	1002717	4042	Proteína hipotética	0.215
10	1002862	15954	Proteína hipotética	0.854
11	1003348	53304	Proteína hipotética	0.4
12	1003634	58944	Subunidad 11 del complejo de transcripción CCR4-NOT	0.233
13	1004196	17277	Subunidad soluble beta-1 de guanilato ciclasa	0.482
14	1004254	6801	Proteína hipotética	0.11
15	1005314	1105	Proteína de dedo de zinc	0.157
16	1006333	8990	Proteína hipotética	0.243
17	1006371	1562	Proteína hipotética	0.268
18	1006790	10970	ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa)	0.191
19	1006892	33270	13C asociado a clasificación vacuolar	0.29
20	1007550	8083	Proteína quinasa quinasa quinasa quinasa 2 activada por mitógeno	0.215
21	1008321	9181	Proteína hipotética	0.166
22	1009922	1030	Proteína hipotética	0.311
23	1011539	12126	Proteína hipotética	0.458
24	1012467	15816	Proteína hipotética	0.264