



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
(LIMNOLOGÍA)

Análisis de la variabilidad intrapoblacional e interpoblacional de las especies del género *Asplanchna* (Rotifera) aisladas geográficamente y distribuidas en lagos del centro del país, empleando marcadores morfológicos y moleculares (COX 1)

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
M. EN C. JORGE JIMÉNEZ CONTRERAS

TUTOR PRINCIPAL
DR. S.S.S. SARMA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA UNAM

COMITÉ TUTOR
DR. MANUEL ELÍAS GUTIÉRREZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DR. JORGE CIROS PÉREZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DR. MARCELO SILVA BRIANO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



Análisis de la variabilidad intrapoblacional e interpoblacional de las especies del género *Asplanchna* (Rotifera) aisladas geográficamente y distribuidas en lagos del centro del país, empleando marcadores morfológicos y moleculares (COX 1)

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Doctor en Ciencias
(Limnología)

p r e s e n t a:

M. en C. JORGE JIMÉNEZ CONTRERAS

Director de Tesis: Dr. S. S. S. Sarma

Comité Tutorial: Dr. Manuel Elías Gutiérrez
Dr. Jorge Ciros Pérez
Dr. Elías Piedra Ibarra
Dr. Marcelo Silva Briano

A mi esposa Ariadna Urquieta,

Amor, apoyo, paciencia, compañía, complicidad, motivación...

sólo tú has motivado que sea una mejor persona

A mis padres Alicia y Patricio

por darme todo lo que tengo,

Y a mis nuevos padres Marta y Federico

por su apoyo, confianza y todo lo que me han dado.

Agradecimientos

La realización de este estudio fue posible gracias a la infraestructura, financiamiento y becas de:

La Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Por mi formación académica, el apoyo otorgado para la realización del proyecto y para la impresión de la tesis.

El laboratorio de Zoología Acuática de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Por estos poco más de 10 años apoyando mi formación.

El laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Por el apoyo para la realización de los análisis moleculares y de microscopía electrónica de barrido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el otorgamiento de la beca para estudios de doctorado (59114, CVU:221136).

Al proyecto Código de Barras de Especies Mexicanas de Rotíferos CONABIO (HB008). Y al proyecto PAPCA (2010-1011-25).

Agradecimientos personales

Al Dr. S.S.S. Sarma por mostrarme el fascinante mundo microscópico de los cuerpos de agua dulce. Y ayudarme a descubrir que sé y se sabe tan poco sobre él, al tiempo de dotarme de herramientas, habilidades y conocimiento para entenderlo más.

Al Dr. Elías Piedra Ibarra por mantener durante 4 años su mano extendida y por eliminar los gaps en mi conocimiento, alinear la confianza, replicar los comentarios, traducir las observaciones y polimerizar los consejos de toda índole. Y enseñarme que el sentido de la vida es 5" → 3".

Al Dr. Jorge Ciro Pérez porque simplemente el trabajo no sería el mismo sin sus aportes, comentarios y críticas, que lo robustecieron al igual que mi formación académica. Por influir tan positivamente mi tarea y futura vida científica.

Al Dr. Marcelo Silva Briano por su entusiasmo, su interés, ayuda, sus valiosos comentarios y por estar dispuesto siempre a colaborar.

Al Dr. Manuel Elías Gutiérrez por la ayuda brindada y sus observaciones para mejorar el trabajo.

A la Dra. Nandini por enseñarme a cultivar zooplancton. Pero sobre todo por enseñarme a amar y apreciar de forma diferente el fascinante mundo microscópico de los cuerpos de agua dulce; dándome la confianza de que sé más de lo que creo saber.

Al M. en C. Rafael Emiliano Quintanar Zúñiga del laboratorio de Fisiología Vegetal UBIPRO, por su apoyo en la obtención de las micrografías de microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. Marissa Calderón por todo su conocimiento y apoyo para la estandarización de las técnicas moleculares.

A los compañeros de Fisiología Vegetal por siempre estar dispuestos a brindar su ayuda, conocimientos, secretos y hasta su hielo para que realizara los análisis moleculares Martha, Amanda, Anabel, Elena y Gerardo.

A mis compañeros de Zoología Acuática por su apoyo, ayuda y amistad. Por crear en el laboratorio el mejor espacio para hacer ciencia, Michael, Sergio, Ligia, Gary (Christian), Meetz, Toño, Manuel, Aldo, Auro, Aurorita, Alfredo, Rosa, Cesar y Jesús.

A mi familia por acompañar, ayudar, disfrutar y/o sufrir este proceso Vero, Rebe, Mau, Isaac, Ingrid, Naty, Camy, Tere, Bere...

Por una parte, es necesario cambiar las condiciones sociales para crear un nuevo sistema de enseñanza, por otra parte hace falta un sistema de enseñanza nuevo para poder cambiar las condiciones sociales.

Carlos Marx

Resumen

Los rotíferos son un grupo polimórfico, tradicionalmente considerado con una distribución cosmopolita, sin embargo, desde hace algunas décadas la evidencia indica que existen una gran cantidad de endemismos y que la distribución de muchas especies está limitada a ciertas regiones geográficas. Así mismo, en la actualidad la existencia de especies crípticas o de complejos de especies en el Phylum Rotifera es cada vez más frecuente. Debido a lo anterior nos planteamos analizar la variabilidad de los rotíferos del género *Asplanchna* en cuerpos de agua aislados geográficamente en el centro de México, empleando descriptores morfológicos y moleculares para conocer si existen características divergentes que indiquen la posible existencia de diversidad críptica. Para ello se realizaron colectas en cuerpos de agua del centro del país encontrando en 11 de ellos organismos del género *Asplanchna*. Se desarrollaron y mantuvieron bajo las mismas condiciones 3 cultivos monoclonales de cada sitio, hasta completar los análisis. Con los individuos mantenidos en los cultivos se analizaron la morfometría y morfología corporal y del trophi de las especies (*A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. sieboldii*, *A. silvestrii* y *A. cf. tropica*) y finalmente se realizó la caracterización molecular de cada cultivo empleando el gen mitocondrial COX 1. Los resultados se analizaron intra e interpoblacionalmente. Las tallas de las poblaciones de *A. brightwellii* variaron entre 549 y 1040 μm siendo la de mayor talla Xochimilco y la menor Morelos y en *A. girodi* la variación fue entre 603 y 761 μm . Los análisis de morfometría geométrica indican que existen diferencias significativas entre las 5 poblaciones de *A. brightwellii* y entre *A. girodi* las diferencias son principalmente respecto de las poblaciones de Querétaro y Zempoala. Los análisis moleculares mostraron bajas divergencias intrapoblacionales y divergencias interpoblacionales elevadas ($> 8\%$) en *A. brightwellii*. En *A. girodi* la mayor divergencia intrapoblacional fue en Nevado de Toluca (2.1%), mientras que los valores de divergencia interpoblacional fueron elevadas (6.4%) en relación a Nevado de Toluca. Se concluye que las especies *A. brightwellii* y *A. girodi* están integradas por especies crípticas, por lo que constituyen en realidad complejos de especies.

Abstract

The rotifers, a polymorphic group, are traditionally considered as having a cosmopolitan distribution; however, for during the last few decades evidence indicates that there are a large number of endemic species and the distribution of many species is limited to certain geographic regions. Likewise, today the existence of cryptic species or species complexes in the Phylum Rotifera is increasingly common. Because of this, we aimed at to analyze the variability of the rotifer genus *Asplanchna* from geographically isolated water bodies in central Mexico, using morphological and molecular descriptors to find if there are divergent characteristics that support the possible existence of cryptic diversity. Eleven freshwater bodies were sampled from the Central and South-East Mexico for *Asplanchna*. Three monoclonal cultures for each population of different *Asplanchna* species were maintained under similar conditions. Body and trophi morphology and their morphometry were studied for the following species: *A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. sieboldii*, *A. silvestrii* and *A. cf. tropica*). In addition, we also realized molecular characterization for each culture using the mitochondrial gene COX 1. The results were analyzed for intra- and inter population variations. The body size of *A. brightwellii* varied between 1040 and 549 μm , the largest and the smallest sized individuals were from Xochimilco and Morelos, respectively. For *A. girodi* the body size varied from 603 and 761 μm . The geometrical morphometry analysis indicated that there were significant differences among the five populations of *A. brightwellii* and for *A. girodi* the differences are primarily from the samples collected from Queretaro and Zempoala. Molecular analysis for *A. brightwellii* showed intra-population differences were low (ca. 0%) but the inter-population divergence was high (> 8%). For *A. girodi* the highest intra-population divergence was from the samples of Nevado de Toluca (2.1%); however, with respect to the population from the Nevado de Toluca inter-population divergence was much higher (6.4%). It is concluded that both *A. brightwellii* and *A. girodi* were species complexes containing cryptic species.

Índice

Introducción general	1
Familia Asplanchnidae	6
Descripción género <i>Asplanchna</i>	7
Planteamiento del problema	16
Preguntas de investigación y objetivos.....	20
Objetivo general	20
Objetivos Particulares.....	20
Capítulo I Morfometría de <i>Asplanchna</i>	21
Introducción.....	21
Materiales y métodos.....	24
Resultados.....	27
Discusión	34
Conclusiones.....	39
Capítulo II Morfología de <i>Asplanchna</i>	40
Introducción.....	40
Materiales y métodos.....	43
Resultados.....	45
Discusión	63
Conclusiones.....	68
Capítulo III Análisis moleculares <i>Asplanchna</i>	69
Introducción.....	69
Materiales y métodos.....	71
Resultados.....	74
Discusión	87
Conclusiones.....	91

Discusión general	92
Conclusiones generales.....	95
Literatura citada.....	96
Anexo 1	118

Introducción general

El filo Rotifera, incluye poco más de 2,000 especies, divididas en tres clases: Seisonidea, Bdelloidea y Monogononta (Wallace *et al.*, 2006) cuyas tallas se encuentran entre los 50 y 2000 μm e incluyen especies libres nadadoras, sésiles y algunas coloniales. El cuerpo de estos organismos es saquiforme, relativamente cilíndrico, dividido en tres segmentos principales: una región anterior corta (cabeza), un tronco grueso que integra la mayor parte del cuerpo y un pie terminal (Ruttner-Kolisko, 1974; Wallace *et al.*, 2006; Segers, 2008).

Los rotíferos poseen dos características que los distinguen del resto de los metazoos; una corona ciliar en la parte apical, que se emplea en la locomoción y/o alimentación y una faringe muscular llamada mástax, que posee varias piezas esclerotizadas denominadas trophi (Nogrady *et al.*, 1993). La corona se localiza en la cabeza junto con otras estructuras como la boca, órganos sensoriales y algunos apéndices. Las variaciones en la forma y en la posición de las estructuras y órganos mencionados permiten distinguir siete tipos diferentes de coronas (Koste y Shiel, 1987) (Fig. 1). En general la corona está compuesta de un campo apical central, (el cual no siempre es ciliado), la boca ubicada generalmente en posición ventral rodeada por un campo ciliado y un campo circumapical rodeado por dos anillos ciliados (troco y cíngulo; Fig. 1b) estas estructuras son las responsables de la locomoción y la alimentación (Koste y Shiel, 1987; Wallace *et al.*, 2006).

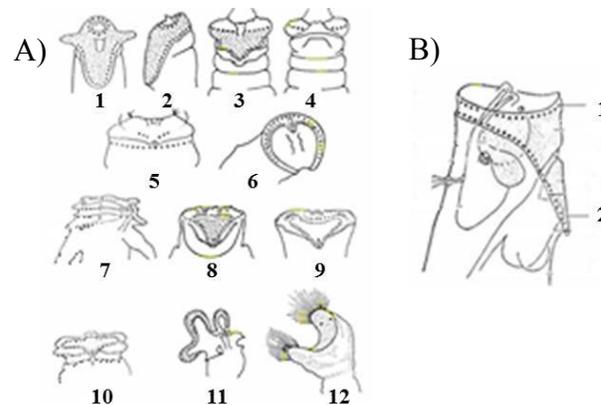


Figura 1. A) Diferentes tipos de corona 1. *Notommata* vista ventral; 2. *Notommata* vista lateral; 3. *Macrotrachela*, Vista ventral (Bdelloidea); 4. *Macrotrachela* vista dorsal; 5. *Asplanchna* vista ventral; 6. *Conochilus* vista ventral; 7. *Hexarthra*, vista lateral; 8. *Euchlanis* vista ventral; 9. *Epiphanes* vista ventral; 10. *Brachionus* vista ventral; 11. *Floscularia*, 12. *Collotheca mutabilis*. **B)** Partes de la corona 1. Cíngulo, 2. Troco (modificado de Koste y Shiel, 1987).

El trophi comprende tres unidades funcionales, un incus y un par de mallei (singular, malleus). El incus está formado por tres piezas, un fulcrum y un par de rami. Esos elementos se mueven como pinzas articuladas en la base por el fulcrum. Cada malleus consiste de dos partes, manubrium y uncus. El manubrium es alargado y se articula con una estructura dentada (el uncus). El número y la forma de los dientes del uncus varía y es característica de cada especie. Existen nueve tipos de trophi (Fig. 2): maleado, maleoramado, ramado, uncinado, virgado, incudado, cardado, forcipado y fulcrado (Segers, 1992; Nogrady *et al.*, 1993). El trophi es muy importante taxonómicamente, ya que sus variaciones permiten determinar y clasificar familias, géneros y especies. (Ruttner-Kolisko, 1974; Koste, 1978; Segers, 1992; Nogrady *et al.*, 1993).

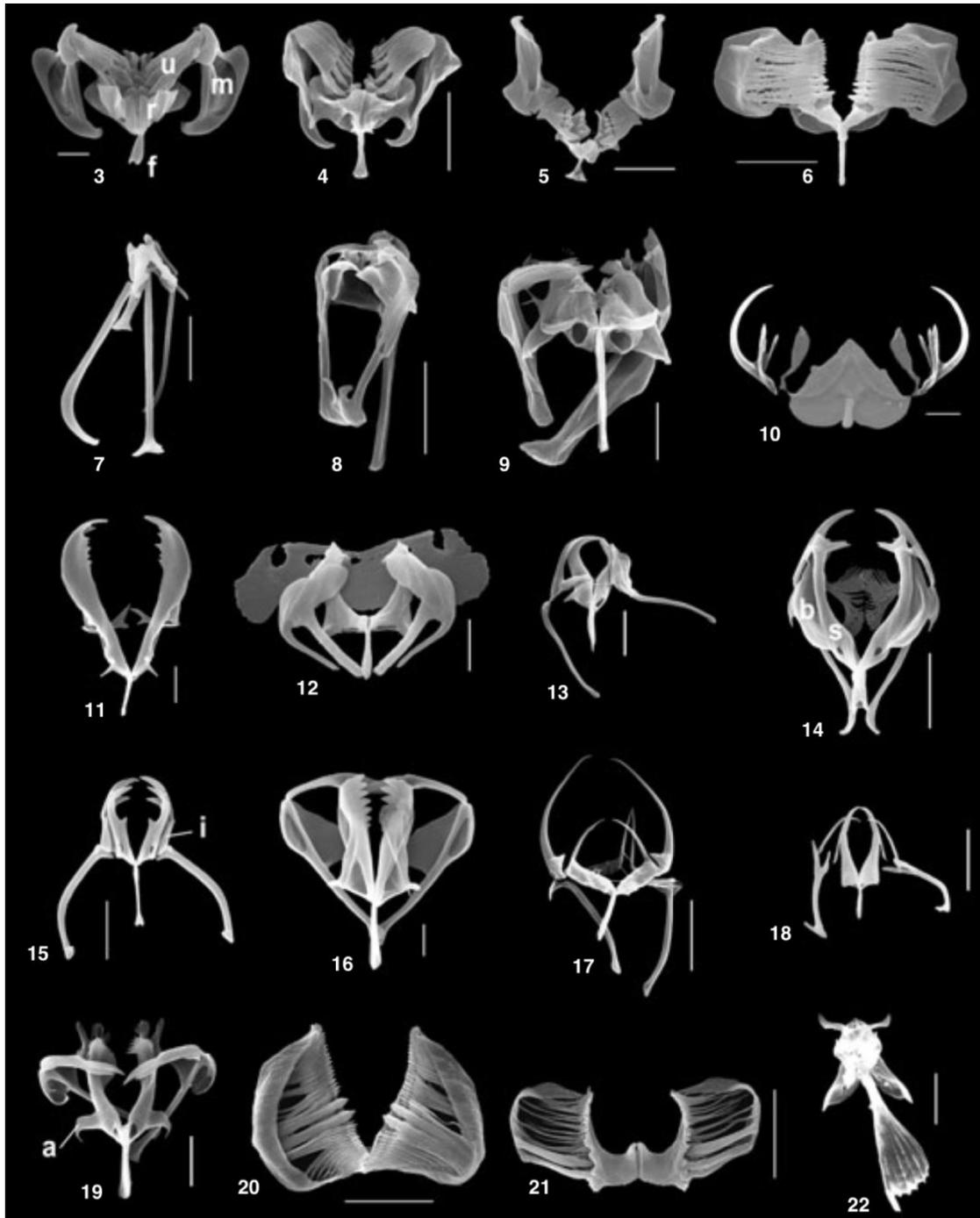


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los tipos de trophi. 3-5. maleado: 3, *Brachionus plicatilis*; 4, *Proales similis*; 5, *Colurella colurus*; 6. maleoramado, *Testudinella clypeata*. 7-9. virgado: 7, *Trichocerca pediculus*; 8, *Cephalodella* sp.; 9, *Pleurotrocha atlantica*. 10. uncinado, *Cupelopagis vorax*; 11. incudado, *Asplanchna priodonta*; 12. cardado, *Lindia tecusa*; 13-19. forcipado: 13, *Aspelta europaea*; 14, *Dicranophoroides caudatus*; 15, *Enentrum algente*; 16, *Dicranophorus forcipatus*; 17, *Erignatha clastopis*; 18, *Myersinella uncodonta*; 19, *Itura myersi*. 20-21. ramado: 20, *Zelinkiella synaptae*; 21, *Philodinavus paradoxus*. 22. fulcrado, *Seison annulatus*. Barras de escala = 10 µm; a, alula; b, cámara basal; f, fulcrum; i, intramalleus; m, manubrium; r, ramus; s, cámara sub basal; u, uncus (Tomado de Fontaneto *et al.*, 2008).

Los rotíferos conservan un integumento sincitial, también denominado lámina intracitoplasmática, que proporciona, dependiendo de su grosor, mayor o menor rigidez al organismo (Clément, 1985; Kleinow, 1993). A los organismos con lámina intracitoplasmática gruesa, y por tanto con mayor rigidez, se les denomina “organismos lorigados” (p. ej. familia Brachionidae y Lecanidae); mientras que a los organismos con integumento delgado y por tanto menos rígidos, se les denomina “ilorigados” (p. ej. Familias Notommatidae y Asplanchnidae). Además de las implicaciones ecológicas, esta característica es fundamental para la identificación de las especies. Los organismos ilorigados modifican su forma al ser fijados, por lo que su identificación se realiza en función de otras características como el trophi (Wallace *et al.*, 2006). En el caso de los organismos lorigados, debido a que conservan su forma, se pueden documentar sus variaciones temporales y espaciales (Ruttner-Kolisko, 1974; Segers, 1992; Wallace *et al.*, 2006). Existen una gran cantidad de trabajos sobre las variaciones morfológicas de los rotíferos en relación con diferentes factores latitudinales, altitudinales y climáticos (Green, 1987; Segers y De Smet, 2008).

El estudio de las variaciones morfológicas está muy ligado al concepto de plasticidad fenotípica que se refiere a la propiedad que tiene un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a condiciones ambientales contrastantes (Pigliucci *et al.*, 2006) y que ocurre en rasgos que van desde la morfología, la biología del desarrollo, la fisiología, hasta el comportamiento (Tollrian, 2002), por lo que se convierte en un mecanismo fundamental para hacer frente a la heterogeneidad ambiental (Via *et al.*, 1995; Pigliucci, 2001). En los rotíferos, la plasticidad fenotípica es reconocida como una de las posibles causas del polimorfismo presente en el grupo (Ge *et al.*, 2012) y que se observa como un cambio en el tamaño de las espinas o de la loriga debido a diversos factores como temperatura, abundancia y calidad del alimento, competencia con cladóceros y depredación por predadores invertebrados como copépodos o *Asplanchna* (Stemberger y Gilbert, 1984; Serra y Miracle, 1987; Conde-Porcuna *et al.*, 1993; Nandini y Rao, 1998; Pavón-Meza *et al.*, 2007; Kennari *et al.*, 2008). Los organismos con una gran plasticidad fenotípica tienen ventajas en los procesos de selección y son capaces de generar variaciones genéticas mucho más rápido que los organismos con baja plasticidad, lo que incrementa su *fitness* (Miner *et al.*, 2005). La plasticidad fenotípica es el mecanismo empleado por los organismos para

hacer frente a las variaciones ambientales a corto plazo, ya que las mutaciones y otros procesos como el efecto Meselson (Welch y Meselson, 2000), no producen la diversidad genética necesaria en la misma escala de tiempo que requieren los organismos, es decir, en la que suceden las variaciones ambientales (Castonaguay y Angers, 2012). Debido a esto es que la plasticidad fenotípica puede ser considerada como un facilitador de la divergencia genética (Price *et al.*, 2003; West-Eberhard 2003) y el polimorfismo favorable para la evolución de los rotíferos (Ge *et al.*, 2012).

La visión de que los rotíferos son un grupo polimórfico ayudó a que tradicionalmente se les considerara cosmopolitas (Rousselet, 1909; Pejler, 1977), sin embargo, desde hace algunas décadas la evidencia indica que existen una gran cantidad de endemismos y que la distribución de muchas especies está limitada a ciertas regiones (Segers, 1996, 2003; Segers y De Smet, 2008). En los primeros intentos por entender la distribución global de los rotíferos, los investigadores consideraban determinantes algunas de las características de su ciclo de vida, como la reproducción partenogenética y la producción de quistes (Ruttner-Kolisko, 1974; Koste, 1978; Wallace y Snell, 2001). La reproducción partenogenética confiere a los rotíferos entre otras características, la capacidad de ocupar nichos vacantes con gran facilidad mientras que los quistes, debido a sus características, pueden ser transportados fácilmente por el aire, lluvia o por animales a otros cuerpos de agua (Wallace y Snell, 2001; Wallace *et al.*, 2006), generando que las especies tengan una elevada dispersión. Sin embargo se han descrito argumentos contrarios a estas ideas como la hipótesis de la monopolización (De Meester *et al.*, 2002). Esta hipótesis indica que tanto la superioridad numérica como la rápida adaptación de los organismos residentes de un sistema a los regímenes de selección locales, anulan la dispersión y obstaculizan fuertemente el flujo de genes, provocando que las poblaciones se aislen. Dicho aislamiento, junto con la existencia de presión por selección divergente en los distintos hábitats y la existencia de una interacción de genotipo por hábitat, propician la adaptación local de los rotíferos (Kawecki y Ebert 2004).

La adaptación local en los rotíferos, una amplia distribución, algunas características intrínsecas como presentar un sistema de reconocimiento de pareja basado en el contacto y quimiorrecepción (Gilbert, 1963; Snell *et al.*, 1995), además de un elevado polimorfismo,

sugieren la especiación críptica como un proceso importante en la evolución del grupo (Knowlton, 1993; Serra *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2002 y 2005; Campillo *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011). La especiación críptica se refiere a que la formación de nuevas especies está desacoplado de la divergencia morfológica, lo que ocasiona que las nuevas especies tengan una morfología similar aunque exista una diferenciación a otro nivel (Campillo *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011). El fenómeno de diversificación críptica se ha observado y estudiado en varios grupos de rotíferos (Gilbert y Walsh, 2005; Walsh *et al.*, 2009), se han analizado algunos de sus mecanismos (Gómez, 2005; Schröder y Walsh, 2010), lo que nos sugiere que las morfoespecies reconocidas en diferentes sistemas acuáticos no necesariamente son la misma especie, aunque tengan características morfológicas semejantes, la taxonomía clásica basada en los caracteres morfológicos no necesariamente puede distinguirlas.

Otros aspectos que son fuertemente influenciados por la diversidad críptica en los rotíferos, son sus patrones de distribución. En nuestro país no ha sido bien estudiada la distribución de los rotíferos (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2001), la mayor parte de los estudios se han realizado en el centro y sureste del país y existen algunos estados de la República Mexicana aún sin estudiarse (García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013). En México se tienen registradas 27 de las 33 familias conocidas, lo que representa cerca del 82%, se han registrado 67 de los 119 géneros descritos, lo que significa que el país tiene el 56% de este nivel taxonómico, finalmente en México se han registrado 288 de las 2048 especies conocidas a nivel mundial, lo que representa apenas el 14% (Sarma *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, resulta de suma importancia que se realicen estudios taxonómicos que documenten los diferentes taxones de rotíferos en el país.

Familia Asplanchnidae

La familia Asplanchnidae comprende por lo menos 15 especies de tres géneros: *Harringia*, que incluye organismos litorales que poseen un pie bien desarrollado; *Asplanchnopus*, donde se encuentran organismos semiplanctónicos con el pie reducido, y finalmente el género planctónico *Asplanchna*, que son organismos sin pie (Walsh *et al.*, 2005). En esta familia se encuentran algunas especies de rotíferos depredadores; de las cuales, las pertenecientes al género *Asplanchna* destacan por ser de las más estudiadas. En el género

Asplanchna se encuentran 9 especies que se distribuyen desde zonas templadas hasta regiones tropicales (Segers, 2007). En nuestro país se tiene registro de por lo menos 6 de las 9 especies descritas (Sarma, 1999) y se han observado variaciones morfológicas en los distintos cuerpos de agua donde han sido colectadas.

Descripción género *Asplanchna*

Las especies del género *Asplanchna*, como todos los miembros de la familia, son organismos ilorigados, con cuerpo saquiforme, polimórfico en muchas especies y con gran variación intrapoblacional en la forma y talla de las hembras (Birky, 1964; Gilbert, 1968; Hampton, 1998). Debido a la similitud en la forma del cuerpo y a las variaciones morfológicas (Tabla 1), la identificación basada en estos caracteres resulta muy problemática, por lo que se requiere la extracción y observación del trophi (Ruttner-Kolisko, 1974; Wallace *et al.*, 2006). Lo anterior representa una labor difícil, demandante de tiempo y requiere de experiencia dado que las características que los diferencian se basan en criterios subjetivos (Altındağ *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010). Los asplánchnidos presentan un trophi denominado incudado (Fig. 2. 11), característico de la familia, que tiene como particularidades los manubria y unci reducidos. Presenta también fulcrum corto y rami largo, curvado, en forma de pinzas. Este tipo de trophi (incudado) se considera una modificación del trophi forcipado (Fig. 2. 13-19), que tiene la función de aferrarse a la presa, como fórceps, para después introducirla en la boca y posteriormente al estómago (Segers, 1992; Wallace *et al.*, 2006).

Tabla 1.- Características taxonómicas de las especies del género *Asplanchna* (*A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. intermedia*, *A. sieboldii* y *A. silvestrii*) reportadas para México. DMI: Diente en el Margen Interno del Ramus. Todas las tallas y el diámetro de los huevos de resistencia mostradas en la tabla están dadas en μm (José de Paggi, 2002).

	<i>A. brightwellii</i>	<i>A. girodi</i>	<i>A. intermedia</i>	<i>A. sieboldii</i>	<i>A. silvestrii</i>	<i>A. tropica</i>
Talla trophi	130-170	93	104-156	80-90 (340 en campanulado)	125-190	66-104
DMI	Presente	No	No	Presente	Presente	No
Apófisis	Presente	No	Presente	Presente	Presente	Presente
Subapófisis	Presente	Reducida	Presente	Presente	Presente	Presente
Glándula gástrica	Redondeada 7-14 nucleí	Redondeada 32 nucleí	Redondeada 16-20 nucleí	Redondeada 16-25 nucleí	Dos glándulas 10-15 nucleí	-
Vitelario	Herradura 21-23 nucleos	Elongado >50 nucleos	Elongado 40 nucleos	Herradura >50 nucleos	Herradura 38-41 nucleos	Saquiforme 24 nucleos
Talla ♀	500-1500	500-700	580-900	500-2500	800-1150	300-900
Talla ♂	160-500	250-397	290-439	300-1200	408	-
Huevo místico	146	-	161	198	195	-
Protonefridio	10-20 vulvos en flama	16 vulvos en flama	>20 vulvos en flama	40-100 vulvos en flama	>30 vulvos en flama	-

En las diferencias morfológicas del trophi de *Asplanchna*; destacan la presencia o ausencia de la apófisis, la forma de la subapófisis y el diente en el margen interno del ramus (DMIR). En algunos casos (p. ej., en *A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. intermedia*, *A. sieboldii* y *A. tropica*; Fig. 3), las diferencias pueden ser tan sutiles o los criterios tan subjetivos que frecuentemente se llega a identificaciones erróneas. Adicionalmente, los rotíferos son considerados como polimórficos (Nogrady *et al.*, 1993). En *Asplanchna* existen estructuras que pueden ayudar a resolver los problemas taxonómicos: la forma del vitellarium y el número de nucleos, sin embargo, estas características pueden ser tan variables que resultan confusas y poco prácticas (Birky, 1966). En la Tabla 1 se muestran las características de cinco de las seis especies de *Asplanchna* presentes en el país; las variaciones en los caracteres que se presentan ahí ejemplifican la problemática taxonómica dentro del grupo. Si bien el trophi tiene una gran importancia taxonómica, también la tiene para los organismos ya que se relaciona directamente con su alimentación. Durante muchos años, se ha considerado que la dieta del género *Asplanchna* está influenciada, entre otros factores,

por el tipo de trophi (Salt *et al.*, 1978; Hampton y Starkweather, 1998). Así, su estructura cobra relevancia también en aspectos fisiológicos y ecológicos.

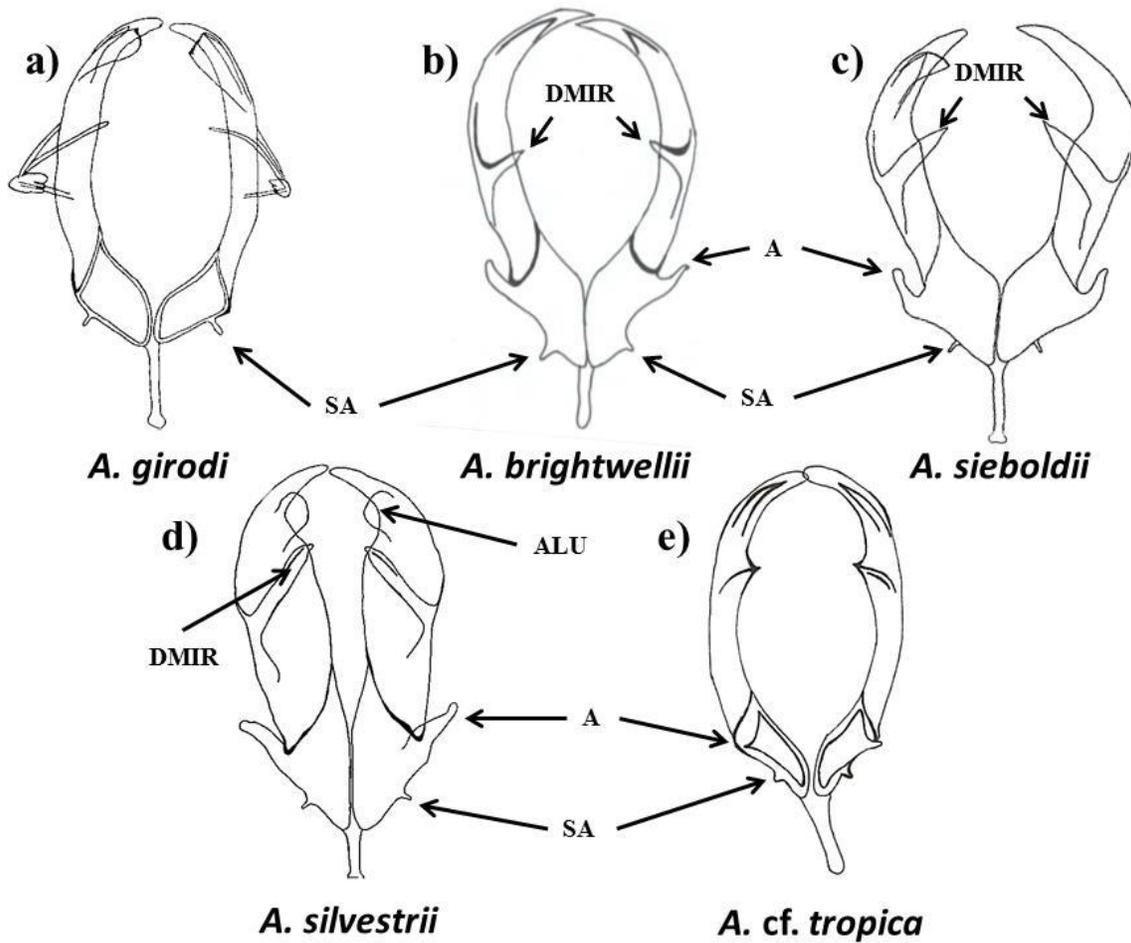


Figura 3. Trophi de 5 especies del género *Asplanchna* observadas en el estudio. a) *A. girodi* Sin dientes en el margen interno de los ramus y ausencia de apófisis, presenta subapófisis b) *A. brightwellii* Presenta dientes en el margen interno de los ramus, además de apófisis y subapófisis bien desarrolladas. c) *A. sieboldii* Presencia de dientes en el margen interno de los ramus muy robustas, así como apófisis y subapófisis. d) *A. silvestrii* Presencia de dientes en el margen interno de los ramus, apófisis y subapófisis, destaca la presencia de dos alulas semicirculares en la parte apical. e) *A. cf. tropica* Sin dientes en el margen interno de los ramus en su lugar tiene prolongaciones de los ramus, pequeñas apófisis y subapófisis. ALU = alula semicircular, A = apófisis, DMIR = Diente en el Margen Interno del Ramus, y SA = Subapófisis.

Los organismos de este género son considerados como un grupo omnívoro debido a que consumen microalgas, protozoos, algunas especies de rotíferos e incluso especies de cladóceros pequeños (Chang *et al.*, 2010), llegando a controlar las poblaciones de algunos de ellos (José de Paggi, 2002). Independientemente de esta clasificación, queda claro que no todos los aspláncnidos tienen los mismos hábitos alimentarios. Se ha observado que *A. herrickii* preferentemente consume materia orgánica particulada, por lo que se le considera detritívoro, más que herbívoro o carnívoro. Un caso diferente es *A. priodonta*, considerado herbívoro más que carnívoro, dado que consume principalmente algas pero incluye algunos protozoos en su dieta, por lo que la dieta de *A. brightwellii*, *A. girodi* y *A. sieboldii* es un caso particular, son especies que consumen rotíferos e incluso cladóceros de talla pequeña (p. ej., *Bosmina*) y por tanto son considerados depredadores (Salt, 1989; Sarma, 1993; Pocięcha y Wilk-Woźniak, 2008; Chang *et al.*, 2010). Los estudios realizados sobre la preferencia y comportamiento alimentario de estos organismos nos muestran la importancia de sus hábitos tróficos, gracias a trabajos de este tipo se han podido describir comportamientos como el gigantismo (Gilbert 1968, 1971b; Salt *et al.*, 1978; José de Paggi, 2002).

En algunas especies (p. ej., *A. brightwellii*, *A. intermedia*, *A. priodonta* y *A. sieboldii*) se han descrito cambios morfológicos (ciclomorfofosis) asociados con su alimentación (Gilbert 1968, 1971b; José de Paggi, 2002). Diversos organismos del zooplancton (p. ej., rotíferos y cladóceros) presentan variaciones morfológicas estacionales denominadas ciclomorfofosis. Estos cambios ocurren en rasgos fácilmente reconocibles como en el tamaño del cuerpo, el largo de las espinas, la pigmentación o las ornamentaciones superficiales (Lampert y Sommer, 2007). La ciclomorfofosis en los rotíferos, a pesar de ocurrir en generaciones sucesivas no significa un cambio genotípico en tanto no ocurra reproducción sexual, debido a que pueden reproducirse partenogénicamente. Por otro lado, en los rotíferos existen fenómenos como la sucesión estacional de especies hermanas o las sustituciones de genotipos clonales (Serra *et al.*, 1998), que no se pueden considerar ciclomorfofosis debido a que involucran cambios genotípicos. La ciclomorfofosis es más fácil de observar en los organismos lorigados (p. ej., *Bracionus*: Gilbert, 1966; *Keratella*: Hofman, 1980). Factores ambientales (físicos, químicos y biológicos) han sido relacionados con la ciclomorfofosis, sin embargo, no se ha encontrado un factor que por sí solo explique el fenómeno (Lampert y

Sommer, 2007). En rotíferos, los factores que han sido asociados con la ciclomorfosis son diversos; la temperatura, la concentración y tipo de alimento, así como las sustancias producidas por los depredadores (kairomonas) (Gilbert, 1999, 2011; Pavón-Meza *et al.*, 2007).

A finales de la década de los sesenta y principios de los setenta del siglo pasado (Birky, 1964, 1967, 1968, 1969; Gilbert, 1968, 1971a, 1972; Birky y Power, 1969; Gilbert y Birky, 1971; Birky y Gilbert, 1972) se dio a conocer que alimentos, ricos en α -tocoferol (vitamina E), tienen efecto en el control de la sexualidad y del polimorfismo del rotífero *A. sieboldii*. A partir de ese momento se reconocen tres morfotipos de *A. sieboldii*: saquiiforme, cruciforme y campanulado o campaniforme. El primero, corresponde con hembras relativamente pequeñas que se reproducen siempre de forma partenogenética, es decir, son los organismos que emergen de las estructuras de resistencia. El segundo morfotipo o cruciforme se produce cuando las hembras saquiiformes consumen altas cantidades de α -tocoferol lo que origina hembras con talla intermedia que poseen 4 prolongaciones o jorobas en el cuerpo, dos laterales, una posterior y una posterodorsal. La fuente del α -tocoferol es el fitoplancton acumulado en sus presas. Este morfotipo se puede reproducir sexual o partenogenéticamente y presentan comúnmente canibalismo. A partir del momento en que la población presenta una mayor incidencia de canibalismo junto con altas concentraciones de α -tocoferol se produce el último morfotipo el campanulado o campaniforme. Las hembras campanuladas son de mayor talla, pueden reproducirse sexual y partenogenéticamente y tienen tendencia al canibalismo. En ausencia de concentraciones elevadas de α -tocoferol y de canibalismo, las hembras de este morfotipo pueden revertir hacia el morfotipo cruciforme. Cabe aclarar que los cambios entre morfotipos se producen a través de por lo menos dos generaciones por lo que formas intermedias son muy comunes (Gilbert, 1976a; 1976b, 1976c, 1980).

El fenómeno de ciclomorfosis en *Asplanchna*, ha sido estudiado ampliamente en *A. sieboldii*, también se ha reportado en especies como *A. silvestrii*, *A. intermedia* (Gilbert *et al.*, 1979; Hamton, 1998;), *A. brightwellii* y *A. priodonta*. En *A. brightwellii* se presenta únicamente una prolongación de la parte posterior del organismo reconociéndose las formas α y β , quedando excluidas las formas cruciformes, al igual que en *A. priodonta*, en

este caso las prolongaciones del organismo serán prolongaciones corporales que marcarán importantes diferencias en las tallas (José de Paggi, 2002).

Tanto las concentraciones de α -tocoferol, como los morfotipos resultantes influyen en el proceso reproductivo de los aspláncidos. La reproducción en *Asplanchna*, como en todos los rotíferos monogonontos, es por partenogénesis cíclica, aunque con algunas variaciones (Gilbert, 1974). La primera particularidad de *Asplanchna*, es que estos organismos son vivíparos (José de Paggi, 2002), es decir, el desarrollo de embriones y de huevos de resistencia tiene lugar en el útero materno. Otra variante es que en *A. sieboldii* y *A. silvestrii* existen, como ya se mencionó, cambios morfológicos en hembras amícticas y míticas, que repercute en el tipo de reproducción (Birky, 1968; Gilbert, 1968, 1971a, 1972; Birky y Power, 1969; Gilbert y Birky, 1971; Birky y Gilbert, 1972). La reproducción mítica involucra la presencia de machos, con marcado dimorfismo sexual. Como ya se dijo, la talla de las hembras del género va de 250 μm hasta 2500 μm y los machos presentan talla mucho menor (de 160 a 1200 μm) (José de Paggi, 2002). Los machos, cuyo propósito primario es la cópula, poseen únicamente glándulas y estómago rudimentario, carecen de trophi y presentan un órgano copulatorio prominente (Birky, 1964; Aloia y Moretti, 1973), por lo que algunos autores humorísticamente se refieren a los machos como “bolsas ambulatorias de esperma” (Koehler, 1965). Los machos pueden presentar prolongaciones laterales en sus cutículas o jorobas que disminuyen el riesgo de la depredación (Gilbert, 1977), sin embargo, lo importante de los machos es que intervienen en el proceso de recombinación de información genética, es decir su función reproductiva. Otra particularidad del ciclo de vida de *Asplanchna* es que en algunas especies del género, por ejemplo *A. herrickii* (Mrazek, 1897) *A. priodonta* (Sudzuki 1955), y en otros géneros como *Sinantherina* (Bogoslavsky, 1958) y *Conochiloides* (Bogoslavsky 1960) se ha descrito la existencia de un tercer tipo de hembras. Comúnmente se consideran en el ciclo de vida de los rotíferos las hembras: las amfotéricas (Bogoslavsky, 1960), adicionalmente a las amícticas y míticas. Este tipo tiene la capacidad de producir tanto huevos míticos como huevos amícticos por lo que quizá se trate de hembras que ayudan a disminuir el tiempo de desfase entre las hembra amícticas y las míticas (Gilbert, 1974).

La reproducción sexual en *Asplanchna* ha sido utilizada para conocer, mediante experimentos de entrecruzamiento o apareamiento cruzado (*cross-mating*, en inglés) el grado de divergencia entre miembros de un grupo. Esta clase de experimentos emplean el concepto biológico de especie que reconoce a una especie como una población (o grupo de poblaciones) natural de individuos de fenotipo variable que se reproducen o tienen el potencial para reproducirse entre sí, y que están aislados reproductivamente de otros grupos similares (Mayr, 1942; Levin, 2009) para tratar de distinguir entre diferentes especies. Mediante experimentos de entrecruzamiento se analiza la existencia y tipos de aislamiento reproductivo: aislamiento precigótico o aislamiento postcigótico. El aislamiento precigótico puede surgir cuando las poblaciones están separadas en espacio o tiempo o cuando se presentan diferencias en las señales de apareamiento y preferencias de las poblaciones, por otro lado el aislamiento postcigótico se presenta como consecuencia de las incompatibilidades genéticas entre genomas divergentes (Levin, 2009). Con trabajos de entrecruzamientos se ha observado que existe aislamiento reproductivo entre *A. brightwellii*, *A. intermedia* y *A. sieboldii* (Gilbert *et al.*, 1979). En otro trabajo realizado por Birky (1967), se observaron fuertes barreras que impiden el apareamiento (precigóticas) o que limitan el desarrollo embrionario (postcigóticas) entre especies que coexisten en un cuerpo de agua (*A. brightwellii* y *A. girodi*). Cuando no existen barreras para el apareamiento, por ejemplo en *Brachionus urceolaris* y *B. quadridentatus* (Ruttner-Kolisko, 1969) se producen quistes, sin embargo, estos no logran eclosionar. En el trabajo realizado por Gilbert *et al.* (1979) se observó que *A. brightwellii*, *A. intermedia* y *A. sieboldii* podían aparearse y generar huevos de resistencia normales en apariencia pero que no eclosionan, lo que deja de manifiesto que existe un tipo de aislamiento o barrera postcigótica.

Un aspecto importante en la reproducción sexual es, como se dijo, la producción de huevos de resistencia o quistes. Los quistes son de las características más notables de la reproducción sexual en rotíferos monogonontos, se trata de quistes que contienen embriones y que tienen la capacidad de extender los periodos de dormancia (Pourriot y Snell, 1983). Estas estructuras de resistencia son producidas por las hembras míticas, dichas hembras producen huevos que cuando no son fertilizados darán lugar a machos y si son fertilizados se generarán quistes (Gilbert, 1974). Los quistes, son estructuras diploides que se originan a través de la reproducción sexual a partir de diferentes estímulos que

pueden ser de tipo ambiental, poblacional o resultado de las interacciones biológicas como depredación, alelopatía, etc. (Gilbert, 1974; Pourriot y Snell, 1983). En general los quistes de rotíferos tienen forma ovoide o esférica y se caracterizan por una cubierta gruesa, oscura y opaca, que puede terminar en espinas, botones o un sinfín de estructuras esculpidas en su superficie (Gilbert, 1974; Wurdak *et al.*, 1978). Las características externas de los quistes como tamaño, forma, color y ornamentación son reconocidas como especie específicas (Gilbert, 1974), por lo que han sido empleadas para resolver algunos problemas taxonómicos, por ejemplo, en los individuos del género *Asplanchna* (Gilbert y Wurdak, 1978). Sin embargo, también se han observado importantes variaciones entre poblaciones o incluso entre los producidos por un mismo individuo (Bogoslavsky, 1963; Pourriot y Snell, 1983). En el caso de *Asplanchna* estas estructuras tienen una talla que ronda entre los 120 y 200 μm (José de Paggi, 2002) y se ha caracterizado su ornamentación en *A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. intermedia* y *A. sieboldii* (Gilbert y Wurdak, 1978), son esféricos y presentan una ornamentación especie específica y se consideran la principal estructura de dispersión de estos organismos (Pourriot y Snell, 1983; Jenkins y Underwood, 1998).

Planteamiento del problema

Luego de una revisión de 178 artículos publicados desde hace 70 años e integrados en la base de datos *Zoological Record* (Web of Science, ISI, Philadelphia, 2010), fue posible conocer la tendencia en el estudio del género *Asplanchna*. Los trabajos se agruparon en 6 categorías Taxonomía, Ecología de Campo, Ecología Experimental, Morfología, Biología (que incluye trabajos sobre reproducción, morfología y función) y Ecotoxicología. La mayor parte de los trabajos (42%) se encuentran dentro de la categoría de ecología de campo, seguidos por los estudios realizados sobre la biología del grupo (26%) y finalmente los que tratan la ecología experimental con 17 %. Resalta el hecho de que la taxonomía del grupo ha sido poco estudiada (Fig. 4).

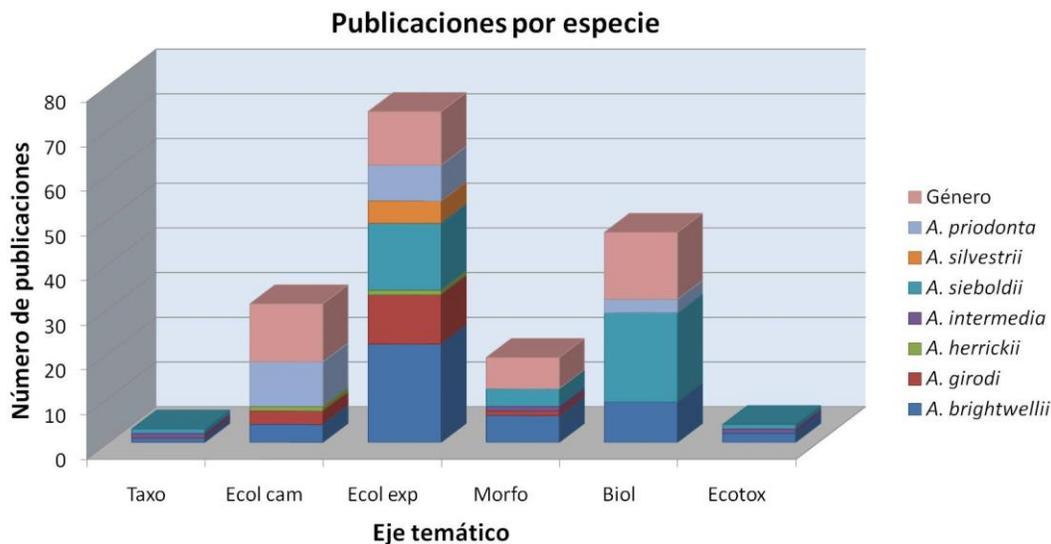


Figura 4. Tendencia en las publicaciones de las especies del género *Asplanchna* en diferentes ejes temáticos (1936-2013). Género se refiere a aquellos trabajos donde los individuos no se identificaron hasta nivel de especie o simplemente se trabaja con varias especies.

Al observar las publicaciones encontramos que las décadas de los 70''s y 80''s fueron más prolíficas, lo que coincide con el descubrimiento del factor causante del trimorfismo en *A. sieboldii*, originando un incremento en su experimentación. Una de las especies más estudiadas es *A. sieboldii* seguida de *A. brightwellii*. Un factor importante que explica el mayor número de trabajos con estas especies es que los *Asplanchna* distribuidos más ampliamente son *A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. priodonta* y *A. sieboldii*.

De acuerdo con esta revisión, los estudios taxonómicos del género *Asplanchna* son escasos y sólo uno analiza más de dos especies. No se encontró ninguna publicación reciente que combine taxonomía clásica con taxonomía molecular.

El estudio de las especies del género *Asplanchna* se basaba en descripciones taxonómicas del grupo (Gosse, 1850, 1887; Daday, 1891; Wierzejski, 1892). Esta tendencia continuó con diversos autores (Beauchamp, 1951; Salt *et al.*, 1978; Gilbert *et al.*, 1979; Pourriot *et al.*, 1984; Shield y Koste, 1993). En fechas más recientes, José de Paggi (2002) reúne el conocimiento taxonómico y ecológico en una publicación que incluye la descripción de las diferentes especies del género *Asplanchna*.

Por otra parte, las especies de *Asplanchna* están incluidas en las aproximadamente 2000 especies descritas del grupo de rotíferos, estos organismos se pueden encontrar en ambientes muy diversos, comúnmente se encuentran en ambientes dulceacuícolas (fundamentalmente lagos) donde son uno de los tres principales grupos del zooplancton (Nogrady *et al.*, 1993). Los lagos son sistemas que presentan una fuerte variación temporal, lo cual se traduce en modificaciones de las condiciones ambientales. Esta heterogeneidad temporal y local puede incidir en los ciclos de vida de las especies sobre todo aquellas que presentan ciclos muy cortos y que combinan la reproducción sexual y asexual, como los rotíferos (Wallace *et al.*, 2006). Así mismo, los sistemas dulceacuícolas son sistemas relativamente aislados, al grado de asemejarlos con islas, que establecen límites para el flujo de genes a través de las poblaciones con lo cual generan oportunidades para la diferenciación genética local (Slatkin, 1985; Serra *et al.*, 1997).

Las variaciones morfológicas inducidas por ciclomorfosis, son parte de la plasticidad fenotípica de los individuos (Black y Slobodkin, 1987), aunque también pueden estar determinadas por factores genéticos intraespecíficos o bien pueden ser el resultado de la sucesión estacional de especies filogenéticamente muy cercanas con morfologías muy similares (especies crípticas) (Serra *et al.*, 1997). Si los análisis morfológicos de las especies se realizan con individuos colectados en campo, expuestos a ambientes diferentes, se requiere realizar pruebas de laboratorio en condiciones controladas (pruebas en jardín común) (Black, 1980; Lampert y Sommer, 2007).

Tradicionalmente, los rotíferos han sido considerados como especies cosmopolitas, sin embargo, desde hace dos o tres décadas este supuesto está en debate. Para ciertos autores como Dumont (1983) los rotíferos presentan evidencia de endemismos y de vicarianza mientras que para otros (Segers, 1996) estos fenómenos han sido eliminados por la amplia capacidad de dispersión de las especies. En la actualidad la existencia de especies crípticas o de complejos de especies crípticas es cada vez más frecuente (Ciros-Pérez *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002; Gilbert y Walsh, 2005; Walsh *et al.*, 2009; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013), lo cual, contradice la idea de la existencia de especies con amplia distribución geográfica o cosmopolitas. La existencia de especies crípticas en rotíferos obedece en buena medida a las características de su apareamiento y reconocimiento de pareja sexual. El reconocimiento de los rotíferos durante su apareamiento no involucra la vista, únicamente se realiza por contacto y quimiorrecepción (Gilbert, 1963; Snell *et al.*, 1995), lo que trae como consecuencia un cierto estatismo morfológico y, por tanto, se presente la especiación críptica con relativa frecuencia en el grupo (Knowlton, 1993; Serra *et al.*, 1997). Adicionalmente, este sistema de reconocimiento de pareja puede verse afectado durante la etapa de reproducción partenogenética (King y Serra, 1998), ocasionando que cuando los rotíferos se reproducen partenogenéticamente las diferencias entre genotipos pueden derivar ampliamente y, dado que las diferencias que se presentan en el sistema de reconocimiento reproductivo son cuasi-neutrales, se incrementa la probabilidad de que éstas se fijen en la población lo que traerá consigo mayores probabilidades de observar la especiación críptica (King, 1980; Gómez *et al.*, 2002).

En México, país con gran variedad de cuerpos de agua dulce en su mayoría dominados por rotíferos, es común observar variaciones morfológicas en las especies de diferentes localidades. Un ejemplo es el trabajo realizado por Alcántara-Rodríguez *et al.* (2012) sobre la adaptación local de una especie del complejo *B. plicatilis* en tres lagos cráter del centro de México. De forma más amplia García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013) realizaron el primer estudio de código de barras genético en rotíferos monogonontos en el país y encuentran evidencia de especiación críptica, además de una distribución geográfica limitada. En otros países se ha observado que los rotíferos del género *Asplanchna* considerados de la misma especie de acuerdo con la taxonomía clásica, presentan barreras

reproductivas con poblaciones de otras localidades, como en es el caso de *A. brightwellii* (Birky, 1967). En *A. girodi* se observa que las barreras reproductivas aparecen incluso entre los clones de diferentes épocas en un mismo cuerpo de agua, lo que sugiere que lo que para los criterios de taxonomía clásica es una especie debería ser considerado, en principio, como un complejo de especies (King y Serra, 1998). Tomando en cuenta las evidencias presentadas y considerando las variaciones en los organismos del género que habitan en los cuerpos de agua de nuestro país, en esta investigación se ha hecho el siguiente planteamiento.

Preguntas de investigación y objetivos

¿Las variaciones morfológicas interpoblacionales observadas en los rotíferos del género *Asplanchna* obedecen a divergencia críptica a nivel interespecífico o se trata de divergencia a nivel intrapoblacional acompañada de plasticidad fenotípica?

Objetivo general

Analizar la variabilidad de las especies de rotíferos del género *Asplanchna* en cuerpos de agua aislados geográficamente y distribuidos en el centro de México, empleando descriptores morfológicos y moleculares para conocer si existen características divergentes que indiquen la posible existencia de diversidad críptica.

Objetivos Particulares

- Analizar la divergencia morfológica y morfométrica intra e interpoblacional de rotíferos del género *Asplanchna* aislados geográficamente.
- Analizar la divergencia genética de poblaciones alopátricas de rotíferos del género *Asplanchna* mediante un marcador molecular mitocondrial que permita discernir a nivel de especie (principalmente la subunidad 1 del gen citocromo oxidasa, COX I).
- Establecer la identidad taxonómica de las poblaciones seleccionadas de rotíferos del género *Asplanchna* mediante la evidencia de agrupamientos basada en caracteres morfológicos y moleculares.

Capítulo I Morfometría de *Asplanchna*

Introducción

El tamaño del cuerpo es el parámetro más importante que determina algunas características ecológicas y fisiológicas de un organismo ya que afecta su capacidad de flotación, su mortalidad a través de la selectividad por talla, sus habilidades competitivas e interviene en la selección de nicho y en la coexistencia con especies similares (Lampert y Sommer, 2007). Se ha observado que factores como la temperatura, la concentración de alimento y sustancias producidas por los depredadores (kairomonas) pueden inducir cambios en la talla de los rotíferos (Gilbert, 1999, 2011; Pavón-Meza *et al.*, 2007). La disminución en la temperatura se ha asociado con aumento en el largo de la loriga y de las espinas, y el aumento de este parámetro se ha relacionado con disminución en el largo de las estructuras de organismos como *Brachionus calyciflorus* (Gilbert, 1967; Gilbert y Waage, 1967; Halbach, 1970; Pourriot, 1973), *B. havanaensis* (Pavón-Meza *et al.*, 2007), *Keratella cochlearis* (Lindstrom y Pejler, 1975; Conde-Porcuna *et al.*, 1993) y *K. tropica* (Green, 1960; Gilbert, 2011), por lo que se asume una relación inversa entre ambos descriptores. La trascendencia ecológica de este patrón no ha sido esclarecida por completo, sin embargo, se han propuesto algunas ideas al respecto (Pejler, 1980). Carlin (1943) propone que la disminución de la temperatura se relaciona con un fuerte incremento en la viscosidad, esto a su vez puede inducir una disminución en la turbulencia por lo que los organismos responden produciendo en su cuerpo espinas y estructuras de la loriga más largas para evitar el hundimiento. Por otro lado Pejler (1962) argumenta que la disminución de la temperatura está asociada al incremento en la talla de los organismos, un mayor tamaño producirá un incremento en la velocidad de hundimiento, por lo que el incremento de talla y el aumento de las espinas evolucionaron paralelamente para ayudar a contrarrestar la velocidad de hundimiento. Otros autores (Lampert y Sommer, 2007) sugieren que la temperatura funciona como un *zeitgeber* (i.e., sincronizador) y que los cambios morfológicos inducidos por esta, por ejemplo en los cladóceros, obedecen a cambios en la estacionalidad que a su vez les anuncian un incremento en el número de depredadores en el medio.

El segundo factor con un fuerte efecto en la talla de los rotíferos es la disponibilidad de alimento (Wallace *et al.*, 2006). Este efecto ha sido descrito en varias especies como: *Brachionus angularis* (Hu y Geng, 2002), *B. calyciflorus* (Kennari *et al.*, 2008), *B. plicatilis* (Snell y Carrillo, 1984), *B. rubens* (Geng y Hu, 2003), *Euchlanis dilatata* (King, 1967) y *Plationus patulus* (Sarma y Rao, 1987), observándose una relación directa, un incremento en la disponibilidad de alimento, se traduce en mayor talla del organismo. Lo anterior tiene una fuerte implicación en su ecología ya que los organismos de tallas pequeñas requieren de menos alimento para mantener su crecimiento poblacional (Nandini *et al.*, 2007). La talla de los rotíferos no sólo es afectada por la cantidad de alimento, también por su calidad (Nandini y Rao, 1998). Finalmente, el tercer factor relacionado con variaciones en la talla de los rotíferos es la presencia de kairomonas. Los rotíferos detectan a los depredadores (p. ej., rotíferos del género *Asplanchna*) o posibles competidores (p. ej. cladóceros del género *Daphnia*) a través de moléculas denominadas kairomonas, estas son liberadas por los organismos y al ser reconocidas por los rotíferos les inducen el incremento de talla y del tamaño de las espinas (Gilbert, 1967, 1999, Halbach, 1970). En diversos trabajos (Stemberger y Gilbert, 1987; Gilbert, 1988, 1999, 2011) se ha documentado que en *Keratella tropica* organismos del género *Asplanchna* (depredador) y *Daphnia* (competidor por interferencia) pueden causar variaciones de hasta 400% el largo de las espinas y entre 5 y 10% del largo de la loriga. Se ha observado también que el efecto de la temperatura y de las kairomonas son aditivos, es decir que las espinas de los organismos crecen más cuando se exponen a ambos factores (Pavón-Meza *et al.*, 2007; Gilbert, 2011).

Independientemente del factor que origine el incremento en la talla de los rotíferos varios temas relacionados que deben ser abordados y discutidos detalladamente. En muchos organismos se presenta el crecimiento alométrico es decir que los organismos crecen de forma desigual en diferentes estructuras de su cuerpo. En rotíferos, se presenta este tipo de desarrollo (Ruttner-Kolisko, 1974), sin embargo, no se ha definido si existe una relación positiva entre el crecimiento del cuerpo y su trophi. Para algunos autores como Sarma y Dumont (1993) en rotíferos puede observarse una relación directa entre la talla de la loriga y el trophi, por lo que sugieren la existencia de una relación entre el tamaño del trophi y la edad de los organismos. Por otro lado, Fontaneto *et al.* (2003) y Fontaneto y Melone (2005) han demostrado que el trophi no cambia de tamaño con la edad postembriónica para

diferentes especies. Estos mismos autores en (2006) confirman empleando *B. plicatilis* que el trophi no crece después de que el organismo eclosionó y no encuentran una relación entre la talla de los rotíferos y el tamaño del trophi, además, observan que la existencia de cambios en el tamaño del trophi pueden deberse a otros factores pero no a la edad de los organismos. Finalmente los autores destacan la importancia de emplear la morfometría para los análisis taxonómicos en rotíferos, lo cual puede ayudarnos a conocer cuál es la causa de la variabilidad morfométrica en los organismos, si se debe a cambios relacionados al desarrollo, la edad u otros factores ambientales.

Materiales y métodos

Colecta de muestras

Las muestras biológicas se colectaron en 16 cuerpos de agua, principalmente del centro del país (Tabla 2), mediante el filtrado de 100 L de agua de la zona litoral a través de una malla con una apertura de 50 μm . El agua filtrada se concentró en un volumen final de 1 L y se colocó en recipientes plásticos para transportarla al laboratorio. Se realizó únicamente una colecta en cada cuerpo de agua.

Desarrollo de cultivos monoclonales

Una vez en el laboratorio, con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ600), se aislaron hembras adultas de la familia Asplanchnidae. En todos los casos se aislaron las primeras 10 hembras adultas amícticas, el criterio empleado para distinguirlas fue el que presentaran en su interior el desarrollo de un huevo amíctico en su útero. Cada hembra se colocó individualmente en un vaso de precipitado con capacidad de 100 ml, el vaso contenía 50 ml de medio EPA, se utilizó el rotífero *Anuraeopsis fissa* en una densidad de 10 ind. ml^{-1} como presa y *Chlorella vulgaris* en una densidad de 0.5×10^6 células por ml^{-1} como alimento para las presas, cada vaso fue considerado como un cultivo monoclonal por lo que en lo sucesivo se le denominará de esta forma o clon. Por cada cuerpo de agua se iniciaron 10 cultivos monoclonales, con excepción de algunas localidades (ver tabla 2), del resto de los cuerpos de agua se lograron mantener al menos 3 cultivos monoclonales. Dependiendo del crecimiento poblacional observado en cada uno de los cultivos al tercer o quinto día se realizó su identificación taxonómica empleando las claves especializadas de Koste (1978), Salt *et al.*, (1978), Nogrady *et al.* (1993) y Nogrady y Segers (2002) para conocer a que especie pertenecían los cultivos. Finalmente, para evitar contaminación entre los cultivos monoclonales, se mantuvieron en espacios separados y el material (mallas, pipetas, etc.) empleado en su mantenimiento fue exclusivo para cada uno.

Análisis morfométricos

Los cultivos monoclonales de cada localidad, se emplearon para extraer de cada uno 15 hembras adultas y analizar su morfometría (15 hembras \times 3 cultivos monoclonales = 45 individuos analizados por localidad). Para el análisis de morfometría cada hembra aislada se colocó viva en un portaobjetos, se midió su talla, largo y ancho del organismo,

empleando un microscopio Nikon E600 con tubo de dibujo. Inmediatamente después se colocó individualmente en tubos Ependorf con capacidad de 1.5 ml donde fue fijada con formol hasta llegar al 4%. Posteriormente, cada hembra fue colocada en un portaobjetos con cubreobjetos y se le agregó por un costado hipoclorito de sodio (solución comercial), hasta liberar el trophi. Una vez liberado el trophi se orientó en posición ventral y se dibujó empleando un microscopio Nikon E600 con tubo de dibujo a una ampliación de 100×. En los trophis se determinaron las siguientes mediciones: margen externo e interno del ramus y el promedio de ambas medidas fue empleado como la medida del ramus; lo mismo se realizó con la bulla y con la apófisis como se observa en la Figura 5. En el caso del Diente en el Margen Interno del Ramus (DMIR) y de la subapófisis sólo se realizó una medida, de la parte distal del mismo hasta la región que intersecta con el ramus (Fig. 5). Debido a que estos organismos presentan simetría bilateral en sus estructuras, las mediciones se realizaron en ambos lados de las estructuras pareadas (ramus, bulla, apófisis, subapófisis y DMIR) obteniéndose un promedio, el cual se empleó en los análisis estadísticos, y en el caso de las estructuras no pareadas (fulcrum) únicamente se realizó una medición.

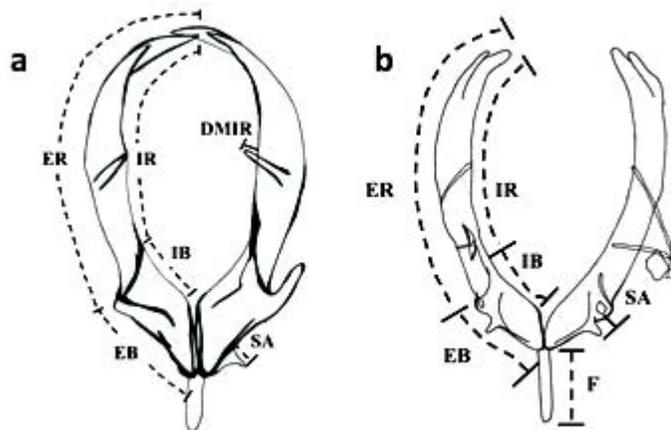


Figura. 5. Detalle de las medidas realizadas al trophi de los diferentes individuos de a) *A. brightwellii* y b) *A. girodi*. ER = margen externo del ramus, IR = margen interno del ramus, EB = margen externo de bulla, IB = margen interno de bulla, SA = subapófisis, DMIR = diente en el margen interno del ramus, F = Fulcrum. Algunas estructuras del trophi fueron eliminadas de los esquemas con la finalidad de que los puntos de medición fueran más claros.

En algunos casos, después de haber obtenido los organismos necesarios para los diferentes análisis, se presentó reproducción sexual en los cultivos monoclonales y, por ende, la generación de huevos de resistencia. En aquellos cultivos en los que no se produjeron

huevos de resistencia, se trató de inducir su producción incrementando la densidad poblacional, cambiando el tipo de presas o incluso empleando infoquímicos de organismos que pueden depredar a *Asplanchna* (p. ej., copépodos Cyclopoidea, *Stenostomum* sp.). De este modo, los quistes producidos en los cultivos monoclonales de cada sitio fueron colectados, almacenados en tubos eppendorf y fijados con formol hasta llegar al 4% para ser analizados. Únicamente se lograron obtener quistes en cantidad suficiente para su análisis de las cinco poblaciones de *A. brightwellii*. Para el análisis del diámetro se midieron 15 quistes de cada cultivo monoclonal (15 quistes \times 3 cultivos monoclonales = 45 quistes analizados por localidad), los cuales fueron colocados en un portaobjetos para observarlos en un microscopio con cámara clara y determinar su diámetro.

Análisis estadísticos

Para evaluar la existencia de diferencias significativas intra e interpoblacionales se realizaron análisis de varianza (ANOVA, de dos vías) para cada variable morfológica considerada, empleando un análisis *post hoc* de Tukey para conocer entre que poblaciones se presentan dichas diferencias.

Resultados

Se realizaron muestreos en más de 20 cuerpos de agua del centro del país, en 16 se encontraron organismos de la familia Asplanchnidae y en 14 se registraron cinco especies del género *Asplanchna* (Tabla 2). Las especies con mayor frecuencia en los cuerpos de agua del centro del país son *Asplanchna brightwellii* y *A. girodi*, ya que se registraron en el 69% de los sistemas acuáticos considerados en el estudio. El resto de las especies de la familia Asplanchnidae observadas en los sistemas acuáticos (*A. sieboldii*, *A. silvestrii*, *A. cf. tropica* y *Asplanchnopus multiceps*) sólo se pudieron localizar en un cuerpo de agua cada una. En un gran número de cuerpos de agua (12) se detectó la presencia de *A. priodonta* por lo que puede ser considerado como una especie común en estos cuerpos de agua, sin embargo, como no pudo cultivarse en el laboratorio no se consideró en el análisis con las otras especies.

Tabla 2. Sitios de colecta y especies colectadas en cada uno de ellos. La columna referente a siglas empleadas se refiere a la nomenclatura empleada para distinguir a cada cultivo monoclonal en las poblaciones de los aspláncnidos y que se utilizaron en los análisis.

Sitio de colecta	Fecha	Clones	Especie	Latitud	Longitud
Ciudad de México, Xochimilco	Nov-2010	(X1, X2 y X3)	<i>A. brightwellii</i>	19° 17' 10.16" N	99° 06' 06.93" O
Edo. de Méx., Zumpango	Dic-2010	(Z1, Z2 y Z3)	<i>A. brightwellii</i>	19° 46' 56.00" N	99° 08' 18.30" O
Guerrero, Valerio Trujano	Ene-2011	(G1, G2 y G3)	<i>A. brightwellii</i>	18° 18' 20.00" N	99° 27' 26.55" O
Morelos, Jagüey	Abr-2011	(M1, M2 y M3)	<i>A. brightwellii</i>	18° 52' 45.00" N	98° 59' 00.23" O
Tabasco, Las Ilusiones	Jul-2011	(T1, T2 y T3)	<i>A. brightwellii</i>	18° 00' 55.50" N	92° 55' 48.65" O
Ciudad de México, Azcapotzalco	Abr-2013	(A1, A2 y A3)	<i>A. girodi</i>	19° 28' 14.33" N	99° 11' 40.04" O
Ciudad de México, Xochimilco	Nov-2010	(CN1, CN2 y CN3)	<i>A. girodi</i>	19° 17' 07.00" N	99° 06' 06.86" O
Edo. de Méx., Lago del Sol	Feb-2011	(NT1, NT2 y NT3)	<i>A. girodi</i>	19° 06' 41.00" N	99° 45' 27.32" O
Edo. de Méx., Zempoala	May-2011	(Ze1, Ze2 y Ze3)	<i>A. girodi</i>	19° 03' 02.14" N	99° 18' 50.63" O
Edo. de Méx., Zumpango	Dic-2010	(Zu1, Zu2 y Zu3)	<i>A. girodi</i>	19° 46' 56.00" N	99° 08' 18.30" O
Querétaro, Sn. Juan del Rio	Mar-2011	(Q1)	<i>A. girodi</i>	20° 28' 10.00" N	100° 00' 48.13" O
Ciudad de México, Xochimilco	Nov-2010	(Cue1)	<i>A. sieboldii</i>	19° 17' 07.00" N	99° 06' 06.86" O
Edo de Méx., Texcoco	Abr-2013	(Tx1, Tx2, Tx3)	<i>A. silvestrii</i>	19° 27' 50.00" N	98° 58' 06.10" O
Chiapas, Chicoasen	Jul-2011	(Ch1)	<i>A. cf. tropica</i>	16° 55' 00.00" N	93° 05' 33.72" O
Edo. de Méx., Molinos	Ago-2011	(Am1)	<i>Asplanchnopus multiceps</i>	20° 06' 56.00" N	99° 44' 15.25" O

Morfometría de *A. brightwellii*

En cuanto a las variaciones intrapoblacionales de *A. brightwellii*, se observó que la talla de los organismos (largo y ancho) fue más variable que las estructuras del trophi (Tabla 3). Los análisis estadísticos (ANOVA) indican que las tallas de las poblaciones de Zumpango, Xochimilco y Tabasco presentaron diferencias significativas (ANOVA, Tukey, $p < 0.001$), respecto al resto de caracteres morfológicos (Trophi: ramus, bulla y DMIR) no hay diferencias significativas entre los clones de las poblaciones.

Tabla 3. Datos morfométricos obtenidos de los cultivos monoclonales de *A. brightwellii* en los sitios de estudio. Todas las medidas están dadas en μm . Las letras diferentes colocadas después de cada dato indican que existen diferencias significativas entre los clones de la localidad (ANOVA, Tukey, $p > 0.05$).

Sitio	Talla		Trophi			Huevos de resistencia	n
	Largo	Ancho	Ramus	Bulla	DMIR		
Xochimilco							
X1	1038 \pm 41 ^a	480 \pm 21 ^a	92 \pm 3 ^a	28 \pm 1 ^a	3.4 \pm 0.2 ^a	159 \pm 2 ^a	12
X2	993 \pm 47 ^a	447 \pm 16 ^a	93 \pm 3 ^a	28 \pm 1 ^a	3.6 \pm 0.2 ^a	150 \pm 2 ^b	15
X3	1040 \pm 44 ^a	476 \pm 20 ^a	92 \pm 2 ^a	28 \pm 1 ^a	3.7 \pm 0.2 ^a	157 \pm 2 ^{a,b}	15
Zumpango							
Z1	817 \pm 33 ^a	357 \pm 26 ^a	82 \pm 1 ^a	24 \pm 0.5 ^a	3.2 \pm 0.1 ^a	153 \pm 2 ^a	15
Z2	847 \pm 28 ^a	417 \pm 11 ^b	83 \pm 1 ^a	24 \pm 0.4 ^a	3.0 \pm 0.1 ^a	149 \pm 2 ^a	15
Z3	861 \pm 25 ^a	408 \pm 8 ^b	86 \pm 2 ^a	25 \pm 1.0 ^a	3.3 \pm 0.2 ^a	152 \pm 2 ^a	15
Guerrero							
G1	692 \pm 28 ^{a,b}	313 \pm 13 ^{a,b}	77 \pm 1 ^a	24 \pm 0.6 ^a	3.6 \pm 0.1 ^a	138 \pm 2 ^a	15
G2	783 \pm 36 ^a	351 \pm 14 ^a	76 \pm 1 ^a	23 \pm 0.4 ^a	3.8 \pm 0.1 ^a	148 \pm 1 ^b	15
G3	648 \pm 18 ^b	291 \pm 11 ^b	74 \pm 2 ^a	21 \pm 0.7 ^a	3.4 \pm 0.1 ^a	142 \pm 2 ^{a,b}	15
Morelos							
M1	573 \pm 20 ^a	252 \pm 10 ^a	58 \pm 1.0 ^a	17 \pm 0.5 ^a	2.3 \pm 0.2 ^a	115 \pm 1 ^a	15
M2	561 \pm 22 ^a	237 \pm 10 ^a	57 \pm 1.0 ^a	17 \pm 0.4 ^a	2.1 \pm 0.2 ^a	118 \pm 2 ^a	15
M3	549 \pm 21 ^a	227 \pm 6 ^a	59 \pm 0.8 ^a	18 \pm 0.3 ^a	1.9 \pm 0.2 ^a	118 \pm 1 ^a	15
Tabasco							
T1	709 \pm 24 ^a	307 \pm 8 ^a	62 \pm 0.8 ^a	20 \pm 0.3 ^a	3.2 \pm 0.1 ^a	102 \pm 2 ^a	15
T2	560 \pm 20 ^b	267 \pm 9 ^a	62 \pm 0.7 ^a	20 \pm 0.4 ^a	3.0 \pm 0.3 ^a	111 \pm 2 ^b	15
T3	568 \pm 24 ^b	265 \pm 11 ^a	63 \pm 0.3 ^a	20 \pm 0.3 ^a	2.7 \pm 0.2 ^a	111 \pm 2 ^b	15

Se obtuvieron 5 poblaciones de *A. brightwellii*: Xochimilco, Guerrero, Zumpango, Morelos y Tabasco. En la población de Xochimilco, se observaron los organismos de mayor talla ($1023 \pm 26 \mu\text{m}$) y en Morelos se registraron los de la menor talla ($561 \pm 12 \mu\text{m}$), las otras poblaciones mostraron valores intermedios (Guerrero $708 \pm 18 \mu\text{m}$, Zumpango $842 \pm 16 \mu\text{m}$ y Tabasco $612 \pm 17 \mu\text{m}$), con excepción de las poblaciones de Morelos y Tabasco, las tallas de las poblaciones de *A. brightwellii* mostraron diferencias significativas (ANOVA 2 vías, Tukey, $p < 0.001$) interpoblacionalmente. El tamaño de las estructuras del trophi (ramus, bulla y DMIR) presentó un patrón similar de la talla, en la población de Xochimilco se registraron los mayores (92 ± 1 , 28 ± 1 y $4 \pm 0.1 \mu\text{m}$, respectivamente) y en Morelos los más bajos (58 ± 1 , 17 ± 0.3 , $2 \pm 0.1 \mu\text{m}$, respectivamente), existen diferencias de hasta $34 \mu\text{m}$ en el trophi de ambas poblaciones (Fig. 6).

Los análisis estadísticos (ANOVA 2 vías, Tukey) mostraron que (Fig. 6), el ancho del cuerpo y tamaño de ramus, exhibieron diferencias significativas entre las cinco localidades de *A. brightwellii* (ANOVA 2 vías, Tukey, $p < 0.001$), el tamaño de la bulla diferencias significativas entre las poblaciones de Xochimilco, Morelos y Tabasco (ANOVA 2 vías, Tukey, $p < 0.001$), las poblaciones de Guerrero y Zumpango no muestran diferencias. Finalmente el tamaño del DMIR nos indica la existencia de tres grupos uno de Guerrero y Xochimilco, otro formado por Zumpango y Tabasco y finalmente Morelos.

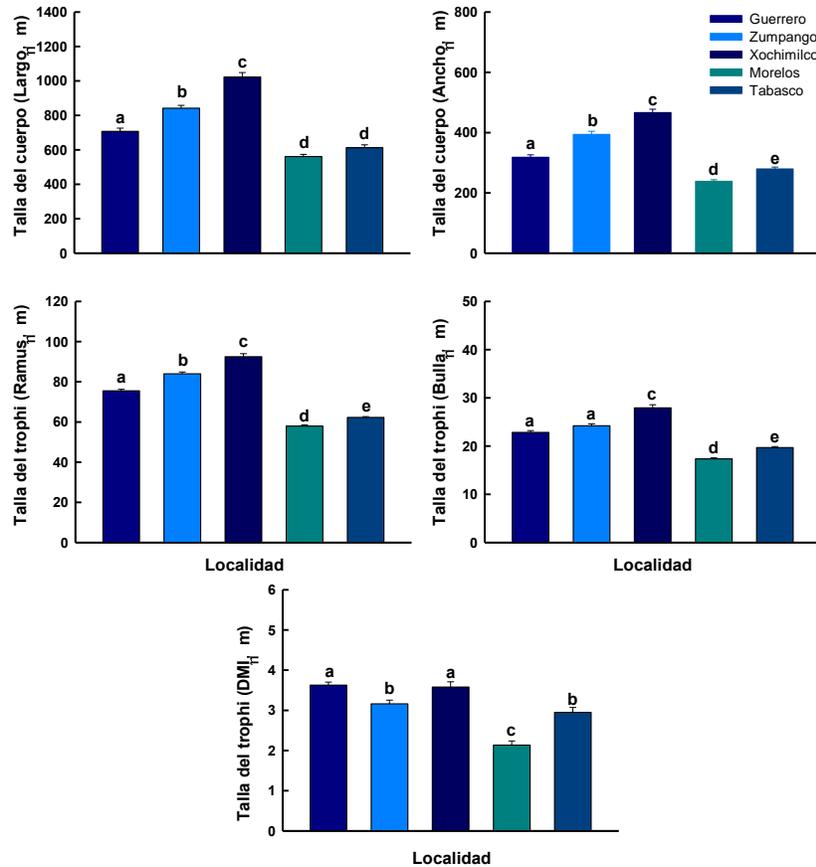


Figura 6. Marcadores morfométricos de las poblaciones de *A. brightwellii*, basados en el promedio de 45 individuos por localidad. Para cada una de las variables, las letras diferentes colocadas sobre las barras indican que existen diferencias significativas entre las poblaciones (Tukey, $p > 0.05$).

Morfometría *A. girodi*

Los análisis intrapoblacionales de *A. girodi* mostraron que en la población de Nevado de Toluca fue la que presentó mayor variabilidad, ya que se observaron diferencias significativas (ANOVA 2 vías, $p < 0.05$) en tres marcadores morfométricos (largo, bulla y subapófisis). Así mismo las poblaciones de Xochimilco y Zempoala mostraron diferencias significativas (ANOVA 2 vías, Tukey, $p < 0.05$) intrapoblacionales respecto de los marcadores de ramus y talla (largo y ancho) respectivamente. En el resto de las poblaciones no se registraron diferencias significativas a nivel intrapoblacional (Tabla 4).

Tabla 4.- Datos morfométricos obtenidos de los cultivos monoclonales de *A. girodi* en los sitios de estudio. Todas las medidas están dadas en μm . Las letras diferentes colocadas después de cada dato indican que existen diferencias significativas entre los clones de la localidad (ANOVA, Tukey, $p > 0.05$).

Sitio	Talla			Tropho		n
	Azcapotzalco	Largo	Ancho	Ramus	Bulla	
A1	603 \pm 25 ^a	283 \pm 9 ^a	61 \pm 0.8 ^a	16 \pm 0.4 ^a	3.5 \pm 0.1 ^a	15
A2	677 \pm 28 ^a	324 \pm 16 ^a	62 \pm 0.7 ^a	17 \pm 0.5 ^a	3.3 \pm 0.1 ^a	15
A3	641 \pm 29 ^a	316 \pm 16 ^a	62 \pm 0.8 ^a	17 \pm 0.5 ^a	3.3 \pm 0.1 ^a	15
Xochimilco						
CN1	689 \pm 21 ^a	284 \pm 11 ^a	54 \pm 1.2 ^a	16 \pm 0.4 ^a	3.9 \pm 0.1 ^a	15
CN2	700 \pm 17 ^a	288 \pm 7 ^a	55 \pm 1 ^a	15 \pm 0.4 ^a	3.6 \pm 0.1 ^a	15
CN3	731 \pm 12 ^a	301 \pm 3 ^a	66 \pm 8 ^b	17 \pm 0.4 ^a	3.9 \pm 0.1 ^a	15
Nevado						
NT1	761 \pm 25 ^a	352 \pm 12 ^a	67 \pm 1 ^a	18 \pm 0.3 ^{a,b}	4.3 \pm 0.1 ^a	15
NT2	644 \pm 15 ^b	345 \pm 12 ^a	64 \pm 0.8 ^a	18 \pm 0.5 ^a	4.3 \pm 0.1 ^{a,b}	15
NT3	689 \pm 26 ^{a,b}	347 \pm 18 ^a	64 \pm 0.9 ^a	20 \pm 0.5 ^b	3.8 \pm 0.1 ^b	15
Zempoala						
Ze1	627 \pm 22 ^a	287 \pm 16 ^a	71 \pm 0.7 ^a	19 \pm 0.4 ^a	4.2 \pm 0.2 ^a	15
Ze2	677 \pm 15 ^{a,b}	297 \pm 6 ^{a,b}	73 \pm 0.9 ^a	20 \pm 0.7 ^a	4.5 \pm 0.1 ^a	15
Ze3	709 \pm 21 ^b	331 \pm 11 ^b	73 \pm 0.5 ^a	19 \pm 0.6 ^a	4.2 \pm 0.2 ^a	15
Zumpango						
Zu1	641 \pm 24 ^a	329 \pm 13 ^a	72 \pm 0.7 ^a	19 \pm 0.3 ^a	4.2 \pm 0.2 ^a	15
Zu2	660 \pm 30 ^a	337 \pm 14 ^a	73 \pm 0.9 ^a	20 \pm 0.7 ^a	4.5 \pm 0.1 ^a	15
Zu3	641 \pm 25 ^a	327 \pm 15 ^a	73 \pm 0.5 ^a	19 \pm 0.5 ^a	4.2 \pm 0.2 ^a	15
Querétaro						
Q1	714 \pm 22	355 \pm 15	76 \pm 0.7	21 \pm 0.4	4.2 \pm 0.1	15

Las variaciones interpoblacionales de *A. girodi* se muestran en la figura (7), en dicha figura se observa que la población con mayor talla promedio fue Xochimilco con $707 \pm 10 \mu\text{m}$ y la de menor talla fue Azcapotzalco con $640 \pm 16 \mu\text{m}$, por lo que entre ellas se observaron diferencias significativas (ANOVA 2 vías, Tukey, $p < 0.05$), en las otras localidades los organismos estuvieron dentro de este rango (Nevado de Toluca 698 ± 15 , Zempoala 671 ± 12 y Zumpango 648 ± 15) y las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El tamaño del trophi específicamente del ramus de *A. girodi* no se relacionó con las tallas observadas en las poblaciones ya que el mayor tamaño de esta estructura se presentó en las poblaciones de Zempoala y Zumpango (73 ± 0.4 en ambos casos). El menor tamaño se presentó en Xochimilco (61 ± 0.4) que a su vez fue la población de mayor talla.

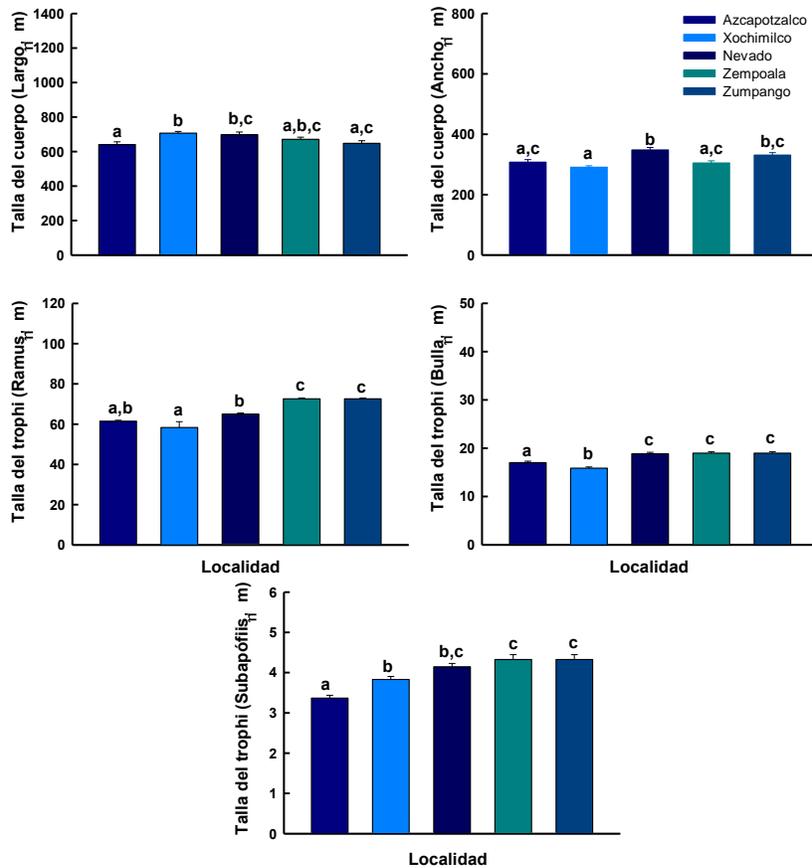


Figura 7. Marcadores morfométricos de las poblaciones de *A. girodi* de las diferentes localidades, basados en el promedio de 45 individuos por localidad. Para cada una de las variables, las letras diferentes colocadas sobre las barras indican que existen diferencias significativas entre las poblaciones Tukey, $p > 0.05$).

Morfometría *A. sieboldii*, *A. silvestrii* y *A. cf. tropica*

En algunas de las poblaciones de *A. silvestrii* y *A. cf. tropica* colectadas no fue posible tener éxito en la generación de cultivos monoclonales por lo que sólo se obtuvo un cultivo monoclonal que es imposible de comparar intrapoblacionalmente (Tabla 5). En *A. brightwellii* se observó mayor constancia en los marcadores morfológicos del trophi que en su talla, este comportamiento se presentó también en *A. silvestrii* (Tabla 5), en esta especie, las tallas de los organismos indicaron, la existencia de diferencias estadísticamente significativas (ANOVA 2 vías, Tukey, $p < 0.05$) en al menos dos de los clones de la población, sin embargo esto no se reflejó en los marcadores morfológicos del trophi donde no se observaron diferencias. Finalmente, debido a que los organismos colectados en la

presa Chicoasen en el estado de Chiapas provienen de un solo clon, no se realizaron comparaciones intrapoblacionales (Tabla 5).

Tabla 5.- Datos morfométricos obtenidos de los cultivos monoclonales de *A. sieboldii*, *A. silvestrii* y *A. cf. tropica* en los sitios de estudio. Todas las medidas están dadas en μm . Las letras diferentes colocadas después de cada dato indican que existen diferencias significativas entre los clones de la localidad (ANOVA, Tukey, $p > 0.05$).

Sitio	Talla			Ramus	Tropi Bulla	DMIR	n
	Xochimilco	Largo	Ancho				
Cue1		1009 \pm 29	451 \pm 17	111 \pm 1.4	35 \pm 0.8	15 \pm 0.5	15
Texcoco							
Tx1		1375 \pm 30 ^a	589 \pm 9 ^a	92 \pm 1.3 ^a	44 \pm 0.8 ^a	1.7 \pm 0.2 ^a	15
Tx2		1291 \pm 44 ^{a,b}	516 \pm 23 ^b	89 \pm 3.2 ^a	45 \pm 0.9 ^a	1.7 \pm 0.2 ^a	15
Tx3		1197 \pm 38 ^b	477 \pm 20 ^b	91 \pm 2.6 ^a	43 \pm 1.1 ^a	1.8 \pm 0.2 ^a	15
Chiapas							
Ch1		535 \pm 11	281 \pm 7	61 \pm 0.4	16 \pm 0.2	10 \pm 0.1	45

Discusión

De acuerdo con José de Paggi (2002), *Asplanchna* tiene una amplia distribución en los cuerpos de agua dulceacuícolas y, por ende, pueden encontrarse frecuentemente las especies: *A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. sieboldii* y *A. priodonta*. En este trabajo se localizaron 5 especies de este género, de las cuales *A. brightwellii*, *A. girodi* y *A. priodonta* fueron las más frecuentes en los cuerpos de agua considerados. Como se señaló, únicamente *A. sieboldii* no se encontró con tanta frecuencia como las otras especies reportadas por José de Paggi (2002). Lo cual coincide con lo reportado por diversos autores (Sarma y Elías-Gutiérrez, 1997, Sarma y Elías-Gutiérrez, 2000; Serranía-Soto, 2006), los cuales mencionan que en nuestro país, particularmente en la parte central, las especies del género *Asplanchna* que se localizan comúnmente son *A. brightwellii*, *A. girodi* y *A. priodonta*. Por otro lado, si bien fue frecuente la presencia de *A. priodonta* en los cuerpos de agua contemplados en este trabajo (≈ 12), también fue complicado realizar cultivos en laboratorio con esta especie ya que consume principalmente dinoflagelados (p. ej. *Ceratium*), euglenas y ciliados en general (Chang *et al.*, 2010), por lo que la dieta compuesta por *Anuraeopsis fissa* y el alga *Scenedesmus acutus* (0.5×10^6 cel ml^{-1}) ofrecida a este organismo resultó no adecuada para su crecimiento, a pesar de que Koste (1978) indica que *A. fissa* es uno de los rotíferos que tienen la menor talla (80 - 120 μm), la cual es muy similar a la observada en muchas euglenas y dinoflagelados (Kennet *et al.*, 1982; Sommer, 1988). Del mismo modo, la dieta ofrecida a *A. sieboldii* pudo determinar el poco éxito obtenido en sus cultivos. En este caso, no se lograron conservar los cultivos para realizar los análisis de cada población ya que este organismo es uno de los más voraces del género (Chang *et al.*, 2010) y requiere grandes concentraciones de *A. fissa* (500 ind ml^{-1}) para su mantenimiento (Sarma *et al.*, 1998).

Las tallas de los aspláncnidos colectados en las localidades se encontraron dentro del rango reportado por José de Paggi (2002). La talla de los rotíferos en los sistemas lacustres puede ser fuertemente afectada por diversos factores como: la disponibilidad y calidad del alimento (Nandini y Rao, 1998; Hu y Geng, 2002; Geng y Hu, 2003), la temperatura (Carlin, 1943; Pejler, 1962), la depredación (Gilbert, 1967; Halbach, 1970; Pourriot, 1973), la competencia interespecífica (Gilbert, 1988, 1999) y el genotipo (Xi *et al.*, 2002) por lo que al analizar organismos tomados directamente del campo es complicado definir el factor

que causa las variaciones. En este trabajo los organismos colectados se cultivaron por separado en laboratorio, formando cultivos monoclonales, reduciendo los factores que pueden causar la variación a la cantidad, la calidad de alimento, la temperatura, la fase de crecimiento poblacional y al genotipo (Sarma y Rao 1987; Xi *et al.*, 2002). Los cultivos monoclonales, se desarrollaron, bajo las mismas condiciones y manteniendo una densidad poblacional máxima de 2 ind ml^{-1} (Sarma *et al.*, 1998) para evitar la reproducción sexual y posible decaimiento de las poblaciones, por lo que podemos reducir la lista de factores que afectan la talla de los organismos a las variaciones genéticas.

Al realizar el análisis intrapoblacional de los rotíferos del género *Asplanchna*, lo primero que destaca es que los resultados varían dependiendo de qué marcador se considere. Empleando las tallas de los organismos (largo y ancho), los análisis estadísticos sugieren que las diferencias intrapoblacionales son significativas; pero si elegimos el tamaño del trophi (ramus, bulla, DMIR o subapófisis), nos sugiere que no existen diferencias significativas. Primero, debemos tomar en cuenta que, tanto la talla de los organismos como el tamaño del trophi tienen una fuerte influencia en las características alimentarias de los rotíferos (Dumont, 1977; Pourriot, 1977) y, segundo, que algunos autores han encontrado una relación directa entre la talla de los organismos y el tamaño del trophi (Sarma y Dumont, 1993), por lo que podríamos pensar que resultados con ambos marcadores serían similares. Sin embargo, en una gran cantidad de organismos se ha descrito el crecimiento de tipo alométrico, lo que quiere decir que existe un crecimiento desigual entre las diferentes estructuras del cuerpo (Calder, 1984). Este comportamiento alométrico de crecimiento se presenta en varias especies de rotíferos cuya relación entre talla de la loriga y tamaño del trophi no es estadísticamente significativa (Fontaneto y Melone, 2006). Los rotíferos presentan a lo largo de su vida un incremento en el tamaño de su loriga que puede ser de hasta 85% (p. ej. en *B. plicatilis*, Snell y Carrillo, 1984) y de acuerdo con Fontaneto y Melone (2005) el trophi no crece después de la eclosión por lo que sería poco probable que existiera una relación positiva entre estos marcadores.

La segunda cuestión que destaca de los análisis intrapoblacionales es que, con pocas excepciones, los análisis estadísticos muestran diferencias entre los tres cultivos monoclonales de cada localidad, es decir que la variación fenotípica intrapoblacional es

escasa en los marcadores morfológicos utilizados. Sin embargo, aunque sean escasas las diferencias intrapoblacionales y muy probablemente de naturaleza genética, deben ser explicadas. Los rotíferos monogonontos presentan una fase asexual (partenogénesis) y una fase sexual, mientras las condiciones del medio sean favorables los rotíferos llevarán a cabo la reproducción partenogénica (Wallace *et al.*, 2006). Dado que este tipo de reproducción es muy rápida puede ocurrir que todos los individuos de una muestra pertenezcan a un mismo clon. De ser así, sería poco probable que se presentaran variaciones intrapoblacionales. Sin embargo, de acuerdo con King y Serra (1998) quienes analizaron los patrones de cambio genético de una población de rotíferos y propusieron dos modelos para explicarlo, al presentarse las condiciones favorables en un cuerpo de agua eclosionan diferentes huevos de resistencia y se pueden presentar dos escenarios: 1) en el que, de los clones recién eclosionados domine uno, o 2) en el que de la variedad de clones eclosionados se estructure la población con diferentes porcentajes de los mismos y que lo que varíe con el tiempo sean los porcentajes en que contribuye cada clon al total de la población. Considerando este segundo escenario, es factible la existencia de más de un clon en el sistema y la frecuencia o porcentaje en el que se encuentran varía con la estación (King y Serra, 1998). De acuerdo a lo anterior, los clones coexistentes provienen de huevos de resistencia diferentes, que son producto de la recombinación sexual (Gilbert, 1974; King y Snell 1977), cada uno de los clones representa combinaciones alélicas diferentes (King, 1977; King y Snell, 1980). Por otro lado, los cambios intrapoblacionales obedecen a la plasticidad fenotípica del grupo, teniendo como antecedente que esta es reconocida como una de las principales causas del polimorfismo en los rotíferos (Ge *et al.*, 2012). Sin embargo, sabemos que la plasticidad fenotípica es la propiedad que tiene un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a condiciones ambientales contrastantes (Pigliucci *et al.*, 2006) y que estos cambios pueden presentarse en la morfología de los organismos (Tollrian, 2002), pero debido a que en este caso los cultivos fueron colocados en las mismas condiciones, los cambios no se deben a los factores ambientales y si al grado de divergencia que existe entre los clones, ya que en algunos casos se ha demostrado que las variaciones morfológicas se relacionan con variaciones genéticas hasta presentar barreras precigóticas o postcigóticas entre los clones presentes en un sistema (Walsh y Zhang, 1992; Wlsh, 1995; King *et al.*, 1998).

Entre las poblaciones de *A. brightwellii* cultivados en el laboratorio se registraron variaciones de hasta 500 μm en el largo del organismo, de acuerdo con los análisis estadísticos, las poblaciones de Guerrero, Zumpango y Xochimilco son significativamente diferentes de acuerdo a esta variable y al ancho del organismo las cinco poblaciones (Guerrero, Zumpango, Xochimilco, Morelos y Tabasco) son diferentes. Como los rotíferos se colocaron en las mismas condiciones (jardín común), los factores ambientales no podrían ser los causantes de estas variaciones (Pejler, 1962; Pourriot, 1973; Gilbert, 1999; Xi *et al.*, 2002; Geng y Hu, 2003). Sin embargo, en sus ambientes naturales, las poblaciones estuvieron expuestas a diferentes condiciones (físicoquímicas, climáticas y biológicas), que se deducen desde los diferentes orígenes de los cuerpos de agua, su geoposición y cuencas hidrológicas a las que pertenecen (Alcocer y Bernal-Brooks, 2010). Los lagos se pueden ser considerados como sistemas relativamente cerrados, que impiden el flujo genético entre ellos, propiciando las condiciones para la diferenciación genética (De Meester, 1996). La exposición a diferentes factores ambientales, ecológicos así como la disminución del flujo genético pudieron promover la adaptación local, considerando que las condicionantes para ello son: la existencia de presión de selección divergente en diferentes hábitats, la existencia de interacciones genotipo por hábitat y la consecuente generación de ventajas de genotipos locales sobre los genotipos externos (Kawecki y Ebert, 2004; Campillo *et al.*, 2011). En la literatura son escasos los trabajos sobre las variaciones de la talla de clones de una especie, la mayor parte de estos estudios se ha llevado a cabo con *B. plicatilis* (Hino 1981, Ito *et al.*, 1981, Yufera 1982, Fukusho y Okauchi 1982, Snell y Carrillo 1984, Fu *et al.*, 1991, Hagiwara *et al.*, 1995) y una menor cantidad se ha realizado con otras especies (Lubzens *et al.* 1989, Ricci 1995), sin embargo, en ellos se destaca la importancia de las diferencias genéticas como origen de la variación. En rotíferos hay un gran número ejemplos de divergencia críptica entre clones (Gilbert y Walsh, 2005; Schröder y Walsh, 2007; Fontaneto *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2012) así mismo, en otros trabajos se ha descrito que cuando los organismos son cultivados bajo las mismas condiciones, es posible observar las diferencias morfológicas (Ciros-Pérez *et al.*, 2001), por lo que se destaca la importancia de cultivar los organismos en laboratorio ya que es complicado observar las diferencias morfológicas con especímenes colectados en la naturaleza (Gómez *et al.*, 2002).

Las tallas de los individuos de *A. girodi* localizadas en los sitios de estudio (640–707 μm) corresponden con las reportadas por José de Paggi (2002) para este género (500–700 μm). En esta especie se presentó un claro crecimiento alométrico, los organismos de tallas mayores no presentaron los mayores tamaños de trophi (Fig. 7), como se discutió antes, este comportamiento está descrito en un gran número de organismos (Calder, 1984) en rotíferos (Sarma y Dumont, 1993; Fontaneto y Melone, 2006). Del mismo modo como sucedió en el caso de *A. brightwellii* las diferencias significativas (ANOVA 2 vías, Tukey, $p < 0.05$) encontradas entre las poblaciones de *A. girodi* pueden ser producto de diferencias genéticas entre las poblaciones debido a que estas se han catalogado como uno de los factores determinantes de la talla de los rotíferos, por ejemplo en *B. plicatilis* (Snell y Carrillo, 1984).

Conclusiones

A. brightwellii, *A. girodi* y *A. priodonta* son las especies del género con una mayor ocurrencia en los cuerpos de agua analizados.

Para los organismos del género *Asplanchna* colectados en el país las variaciones morfométricas interpoblacionales son mayores y más frecuentes que las que se pueden encontrar en individuos de un mismo sistema.

Dentro del género *Asplanchna*, la especie *A. brightwellii* es la que presenta una mayor variación interpoblacional en la talla y dimensiones del trophi, lo que la hace una especie con gran plasticidad fenotípica.

La talla de *A. girodi* si bien presenta algunas variaciones estas no son tan marcadas, por lo que estos organismos se mantienen constantes en su morfometría a pesar de encontrarse en diferentes ambientes.

Las diferencias morfométricas en las poblaciones de *A. brightwellii* y *A. girodi*, sugieren la existencia de variabilidad genética.

Capítulo II Morfología de *Asplanchna*

Introducción

La taxonomía es una red artificial, impuesta por los científicos, sobre el flujo continuo de adaptaciones, variaciones y mutaciones, que son características de la naturaleza y tienen como resultado la evolución. Sólo hay un punto en el que esta red artificial tiene un significado biológico; que es el concepto de especie, que se define biológicamente como “un grupo de organismos, que se reproducen para producir descendencia viable” (Ruttner-Kolisko, 1989). Por lo tanto, entendemos que la taxonomía, es una red artificial independientemente de que sea basada en la morfología, en la fisiología, en la genética o en la ecología, no es una propiedad de la naturaleza, sin embargo, sin ella estaríamos perdidos, ya que las categorías taxonómicas y, en general, las jerarquías de los reinos representan una base de la cual partir para entender la siempre cambiante, fascinante y en ocasiones desconcertante diversidad biológica de la cual poco entendemos a cerca de su flujo evolutivo (Simpson, 1967; Ruttner-Kolisko, 1989). Considerando lo anterior, para tratar de conocer o entender la diversidad de los rotíferos del género *Asplanchna* resulta necesario conocer varios aspectos. Uno que cobra gran relevancia es su morfología, debido a que es de las primeras características que se tomaron en cuenta al clasificar a los organismos y también porque es quizá la forma más accesible de hacerlo.

La morfología de los rotíferos del género *Asplanchna* es una característica fundamental en su clasificación. Primeramente, lo que podemos observar de los organismos es su morfología externa, en cuanto a esta característica todos los organismos poseen un cuerpo saquiforme, con una corona ciliar en la región anterior (Ruttner-Kolisko, 1974; Wallace *et al.*, 2006). La morfología del cuerpo de los aspláncnidos es una de las más variables dentro del grupo de los rotíferos, los individuos de varias especies, como se detalla en la introducción general, pueden presentar gigantismo producto del consumo de α -tocoferol en la dieta (*A. brightwellii*, *A. intermedia*, *A. priodonta*, *A. sieboldii* y *A. silvestrii*), este fenómeno es muy marcado en (*A. intermedia*, *A. sieboldii* y *A. silvestrii*) ya que presentan trimorfismo (Gilbert *et al.*, 1976a, 1976b, 1979; Hampton, 1998), el resto de las especies presentan únicamente un significativo incremento de su talla. En segundo lugar, producto de la transparencia de la cutícula de los aspláncnidos, se observan algunos caracteres

internos como el tracto y la glándula digestivos, el estómago y el vitelario, que pueden ayudar en la diferenciación de algunas especies (José de Paggi, 2002). En el año 1964, Sudzuki propuso la separación del género *Asplanchna* en dos géneros *Asplanchna* y *Asplanchnella* basado en la morfología del vitelario: vitelario globular o esférico en el género *Asplanchna*, con las especies *A. herrickii* y *A. priodonta*, y vitelario elongado (que incluye la forma de herradura) para el género *Asplanchnella*, con las especies *A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. intermedia* y *A. sieboldii*. Años más tarde Koste y Tobias (1988) describen un tercer tipo de vitelario dentro del género *Asplanchna*: el saquiforme, el cual fue descrito en la nueva especie *A. tropica*.

Otra característica morfológica de los aspláncnidos es su trophi, sin embargo, debido a su tamaño ($< 200 \mu\text{m}$), para poder observar claramente las estructuras que lo componen es necesario aislarlo. Todos los aspláncnidos presentan un trophi de tipo incudado que tiene un fulcrum y un par de bullas que continúan con un par de ramus bien desarrollados con forma de pinzas, el resto de las estructuras que lo conforman, son a su vez, las estructuras que distinguen a cada una de las especies (Salt *et al.*, 1978). En *A. brightwellii* el trophi presenta las siguientes particularidades: en la bulla posee apófisis, subapófisis y en el ramus un DMIR relativamente pequeño y en la parte apical del ramus una placa triangular delgada llamada lamela. *A. girodi* presenta únicamente subapófisis en la bulla; *A. intermedia* presenta apófisis y subapófisis en la bulla; *A. priodonta* presenta subapófisis en la bulla y de 2 a 3 dientes en la parte apical del ramus; *A. sieboldii* presenta en la bulla apófisis y subapófisis bien desarrolladas, en el ramus un DMIR relativamente grande y el ramus izquierdo bifurcado en la parte apical; *A. silvestrii* presenta apófisis, subapófisis y un DMIR bien desarrollado, el ramus de esta especie es marcadamente recto y presenta un par de alulas en la parte apical (Ruttner-Kolisko, 1974; Salt *et al.*, 1978; Koste, 1978; José de Paggi, 2002) para más detalle ver Tabla (1) y figura (3).

Finalmente, la estructura que también posee gran importancia taxonómica en *Asplanchna* son los quistes (Gilbert y Wurdak, 1978). En *A. brightwellii* los quistes están ornamentados con lóbulos semi-esféricos de aproximadamente $15 \mu\text{m}$ de diámetro que a su vez presentan poros o cráteres, los lóbulos están dispuestos relativamente separados uno del otro (Gilbert *et al.*, 1979; Gilbert y Wurdak, 1978). En *A. girodi* se observa una ornamentación similar

compuesta también por lóbulos, sin embargo, en esta especie su disposición es más estrecha uno del otro y tienen 10 μm de diámetro además que no presentan poros en su superficie (Gilbert *et al.*, 1979; Gilbert y Wurdak, 1978). En *A. intermedia* la ornamentación es plegada a modo de crestas anastomosadas con gran cantidad de poros (Gilbert *et al.*, 1979; Gilbert y Wurdak, 1978). Existe poca literatura disponible sobre la morfología de los huevos de resistencia de *A. priodonta*, sin embargo, de acuerdo con Sudzuki (1964) se observan estructuras circulares aparentemente cóncavas localizadas incluso una sobre otra, sin embargo, no es muy clara la descripción. En *A. sieboldii* se observan discos cóncavos de alrededor de 12 μm de diámetro que están apostados muy cercanos uno de otro y presentan poros en su superficie (Gilbert *et al.*, 1979; Gilbert y Wurdak, 1978).

Los estudios sobre la morfología de los rotíferos se han realizado empleando técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, teniendo cada una de estas ventajas y desventajas. Por una parte la microscopía de luz es un método sencillo, accesible y económico que tiene como limitante una resolución máxima relativamente baja (1000 \times), mientras que con la microscopía electrónica, si bien podemos aumentar la resolución respecto a la de la microscopía óptica, es una técnica que requiere de más experiencia para su realización y tiene un costo más elevado, por lo que no es tan accesible, aunque nos permite conocer con un mayor detalle las estructuras de los individuos.

Materiales y métodos

La colecta de las muestras biológicas y el establecimiento de los cultivos monoclonales se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el capítulo I.

A partir de los cultivos monoclonales se realizaron análisis de microscopía óptica y electrónica para lo cual se fijaron los organismos con formalina al 4% y se colocaron en un portaobjetos donde se observaron, para el caso de microscopía de luz, las características morfológicas como la forma del vitelario y la forma del cuerpo, destacando la presencia ausencia de prolongaciones posteriores o laterales. Después de analizadas, estas características se extrajo el trophi, para lo cual se agregó hipoclorito de sodio (solución comercial). Para la microscopía de luz, previo a la extracción del trophi, se colocó un cubreobjetos y después de liberado el trophi se observaron sus características en un microscopio óptico Nikon E600 empleando el objetivo de 100×. Para microscopía electrónica, tan pronto se liberó el trophi, se removió la solución de hipoclorito, sustituyéndola con agua desionizada, llevando a cabo este proceso unas 5-6 veces. Después de enjuagar el trophi se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se le colocó un recubrimiento delgado de oro (De Smet, 1998) y finalmente se llevó a cabo su análisis. Para cada preparación se emplearon entre 10 y 20 organismos.

Para las comparaciones interpopulacionales de la forma del trophi se emplearon técnicas de morfometría geométrica, que son una aproximación para estudiar la variación en la forma empleando las coordenadas cartesianas de un conjunto de puntos de referencia (en inglés, landmarks) anatómicos topográficamente correspondientes para comparar formas (Bookstein, 1991; Adams *et al.*, 2004). Para lo cual, se utilizaron los dibujos realizados en los análisis de morfometría del trophi, que se obtuvieron como se detalla en el capítulo I. Dichos dibujos fueron escaneados y utilizados para la colocación de los *landmarks*, como se detalla en las figuras (11 y 18). Los landmarks se digitalizaron con ayuda de los programas de la serie Tps (Rohlf, 2002, 2005), mediante dichos programas se colocaron 8 landmarks en el lado derecho del trophi de *A. brightwellii* y 7 en el lado derecho del trophi de *A. girodi*, en las posiciones que se muestran en la Figuras 11 y 18. La forma de la configuración de los landmarks esta descrita de acuerdo a un ajuste completo de Procrustes, que proyecta los datos a una tangente espacial por proyección ortogonal, los datos se

analizaron posteriormente mediante un análisis de variable canónica todo esto empleando el programa MorphoJ 1.06b (Klingenberg, 2011). Para conocer la existencia de variaciones significativas entre los análisis de Procrustes de las poblaciones se realizaron análisis de varianza (ANOVA).

Finalmente, después de haber obtenido los organismos necesarios para los diferentes análisis, en los cultivos monoclonales de las cinco poblaciones de *A. brightwellii* y en dos de *A. girodi* (Azcapotzalco y Nevado de Toluca), se llevó a cabo reproducción sexual y por ende la generación de huevos de resistencia. Los quistes producidos en los cultivos monoclonales de cada sitio fueron colectados y almacenados en tubos eppendorf y fijados con formol hasta llegar al 4% para ser analizados. Los quistes fueron colocados en un portaobjetos para poder observar su ornamentación en microscopía de luz y en microscopía electrónica se empleó la técnica antes descrita.

Para analizar las variaciones en la ornamentación de los quistes se emplearon cinco micrografías de microscopía electrónica de barrido de cada población y en cada una de ellas se trazó un cuadrante de 60 x 60 μm contándose todos los lóbulos que quedaran dentro del mismo. Además de cada micrografía se determinó el diámetro de 15 lóbulos.

Resultados

Morfología A. brightwellii

Los monocultivos de *A. brightwellii* de Guerrero y Xochimilco mostraron un incremento en la región posterodorsal, mientras que las otras poblaciones de esta especie no mostraron estas variaciones. El vitelario de los *A. brightwellii* correspondió al descrito para la especie, un vitelario alargado con forma de herradura (Fig. 8).

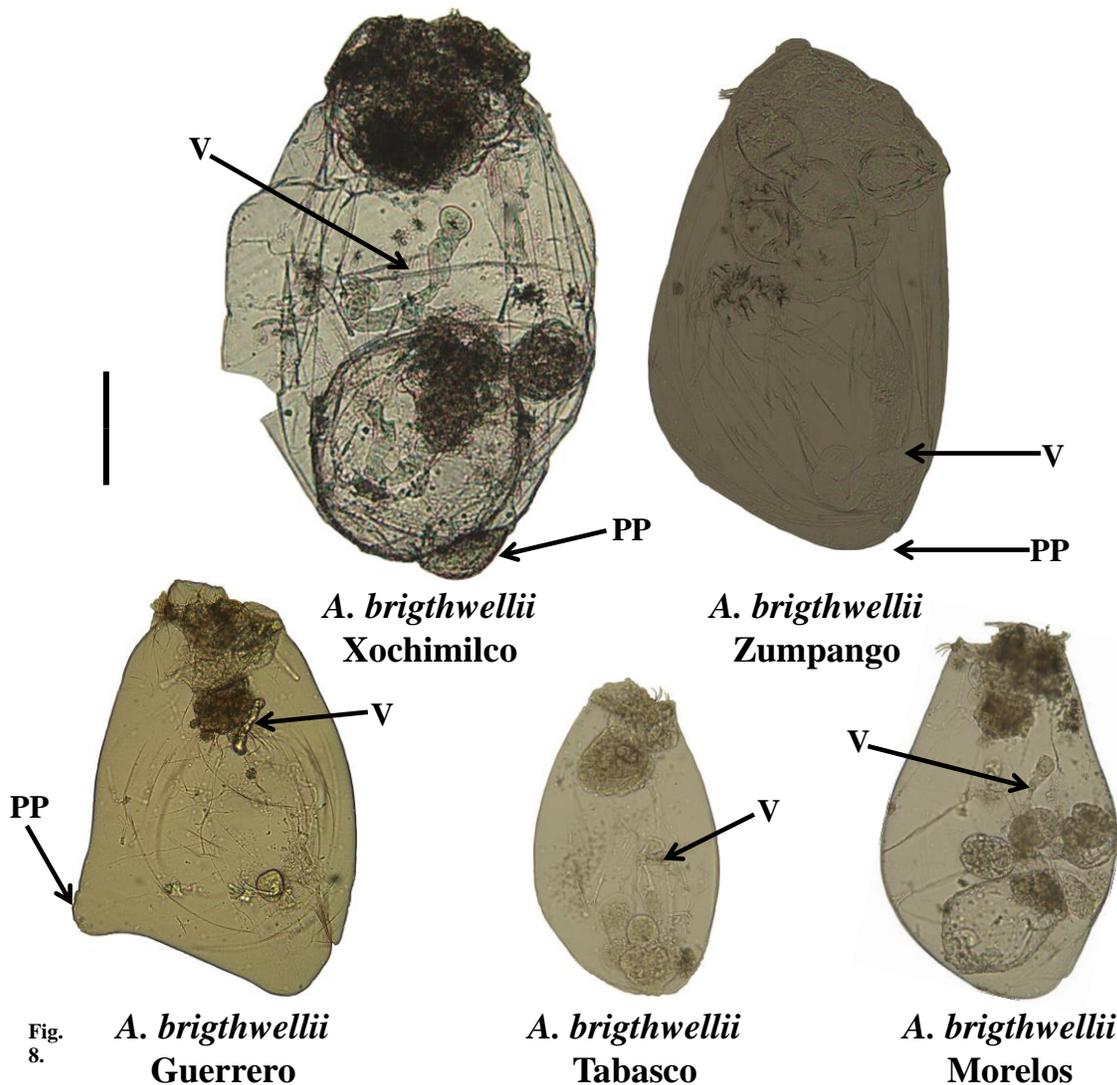


Fig. 8.

Individuos de *A. brightwellii* colectados en las 5 localidades (Guerrero, Xochimilco, Zumpango, Tabasco y Morelos). Las flechas marcan la presencia de algunas de las características morfológicas observadas: V= Vitelario, PP= Prolongación Posterodorsal. La barra de escala equivale a 200 μ m.

La morfología del trophi de *A. brightwellii* usando microscopía de luz así como microscopía electrónica de barrido se presenta en las figuras 9 y 10, respectivamente. Independientemente de la población a la que pertenecieran los individuos, el trophi de *Asplanchna brightwellii* presentó las siguientes estructuras: fulcrum impar al cual se articulan un par de rami en forma de “Y” o pinzas. Cada uno de los rami en su porción distal forman una punta, en el margen interno de cada rami, en la parte media del mismo, se localiza un diente (DMIR). En la parte proximal de cada rami se observa una placa denominada bulla, la cual presenta en su margen externo un par de prolongaciones, la distal y de mayor longitud denominada apófisis y la proximal y menor longitud denominada subapófisis. Finalmente, en la parte apical del ramus colocadas transversalmente al mismo se observaron un par de placas pequeñas ($< 15 \mu\text{m}$); estas observaciones únicamente fue posible hacerlas en las poblaciones de Xochimilco y Guerrero y en las poblaciones de Zumpango, Morelos y Tabasco dichas placas no se pudieron observar, sin que eso signifique que no estuvieran presentes.

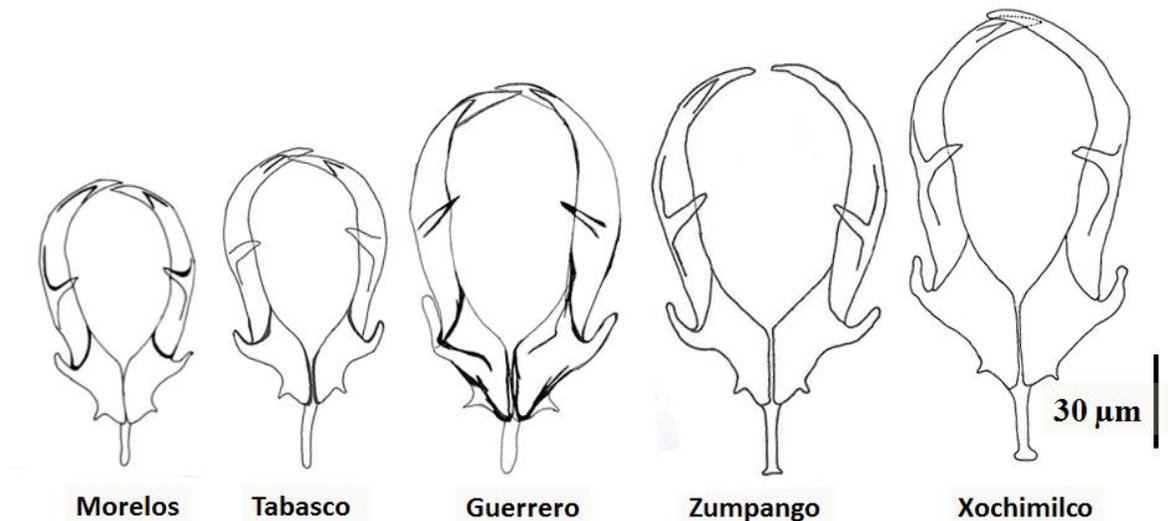


Figura 9. Variaciones interpoplacionales en la longitud y morfología del trophi de *A. brightwellii*.

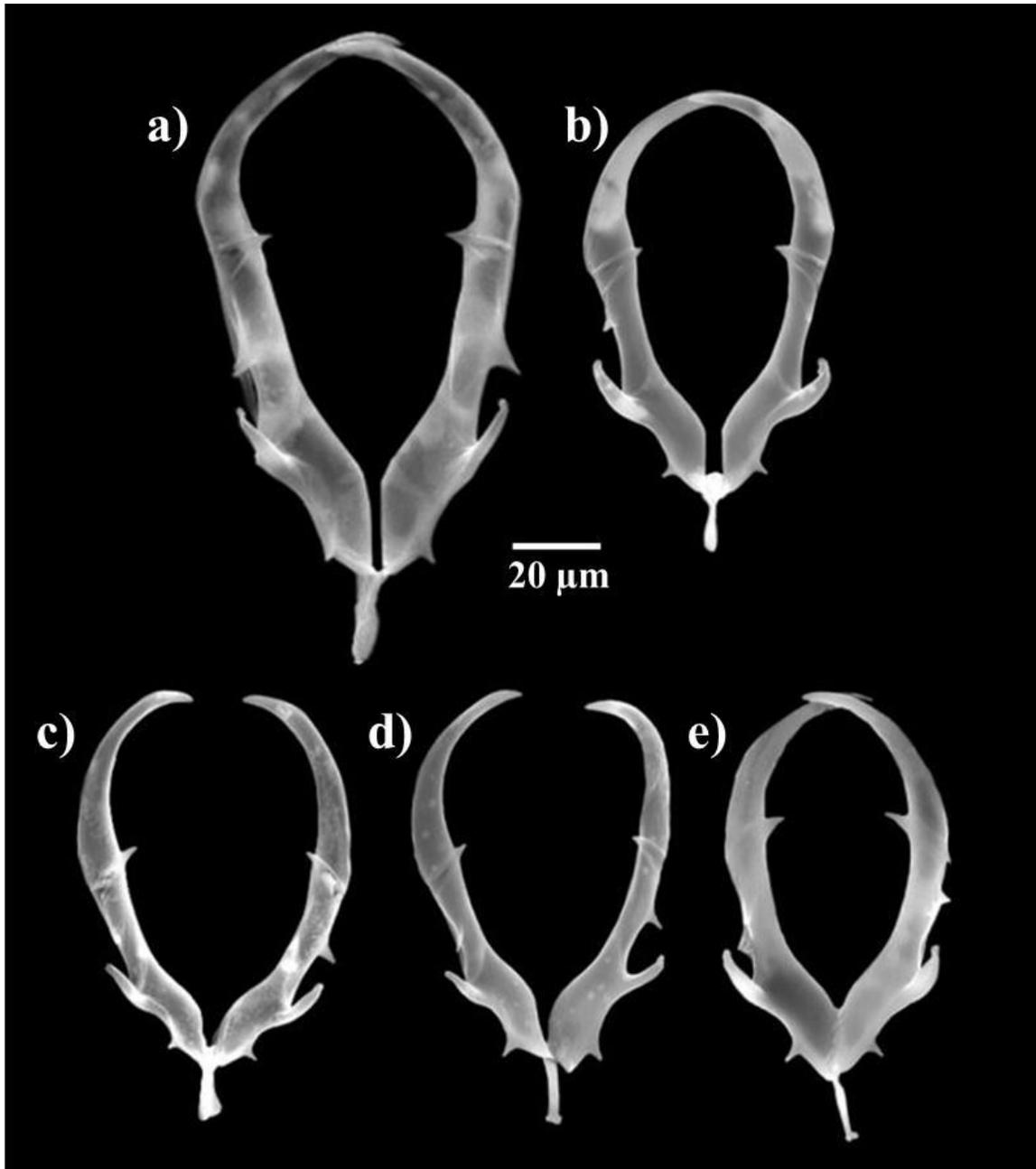


Figura 10. Micrografías de microscopía electrónica de barrido del trophi de los individuos cultivados a partir de *A. brightwellii*. a) Xochimilco, b) Zumpango, c) Guerrero, d) Morelos y e) Tabasco.

Los análisis de forma realizados al trophi de *A. brightwellii* nos muestra de acuerdo con las redes de transformación (Fig. 11), una mayor deformación en las poblaciones de Zumpango, Morelos y Tabasco. Se observa también menor deformación en el diente del margen interno del ramus, así como en la parte apical del mismo, siendo más evidentes las deformaciones en la región de la bulla.

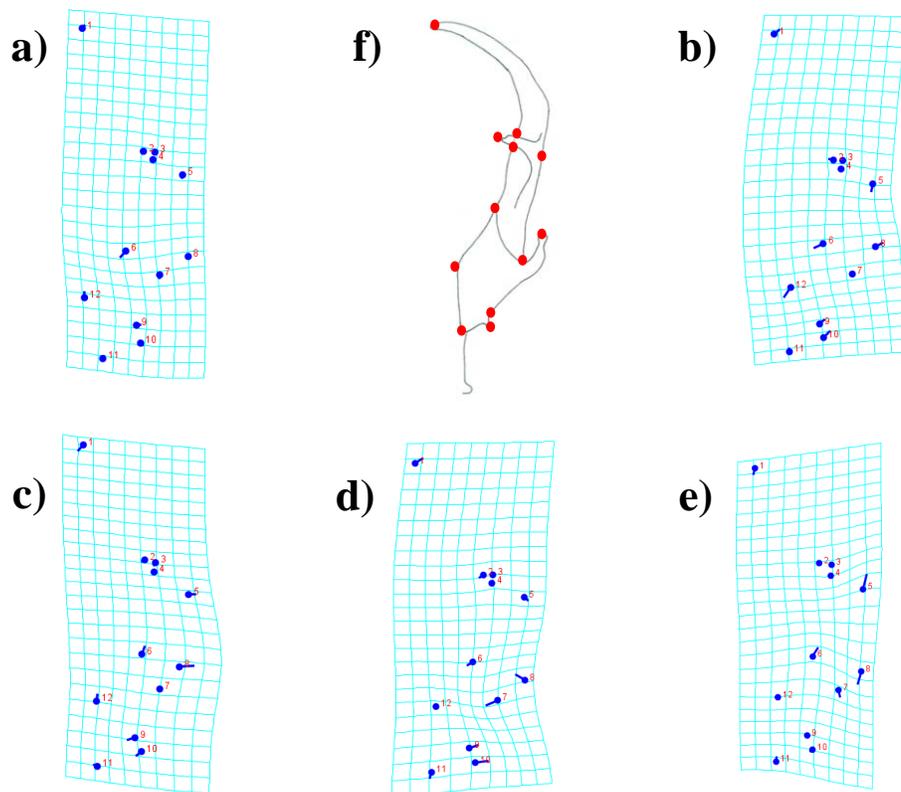


Figura 11. Redes de transformación del trophi de *A. brightwellii* proveniente de: a) Xochimilco, b) Zumpango, c) Guerrero, d) Morelos y e) Tabasco. En el inciso f) se muestran los landmarks empleados para el análisis.

La figura 12 nos muestra la ordenación de los especímenes de *A. brightwellii* a lo largo de los dos principales ejes canónicos (77.8% de la variación de la forma). Así mismo se muestran las redes de deformación correspondientes a los cambios de forma del trophi en cada uno de los ejes (CV1 y CV2). Dicho análisis de variables canónicas, realizado al trophi de *A. brightwellii* muestra que las poblaciones de Xochimilco y Zumpango se separan del resto de las poblaciones formando dos grupos claramente delimitados (Fig. 12), al realizar las pruebas estadísticas, a ambos grupos, se encontró que existen diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en la forma de estos y del resto de las poblaciones. Si

bien en el análisis de variables canónicas las poblaciones de Guerrero, Morelos y Tabasco muestran un solapamiento, los análisis de varianza indicaron que existen diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.001$) en la forma de las tres poblaciones, por lo que este análisis indicó que respecto a la forma del trophi las cinco poblaciones son diferentes.

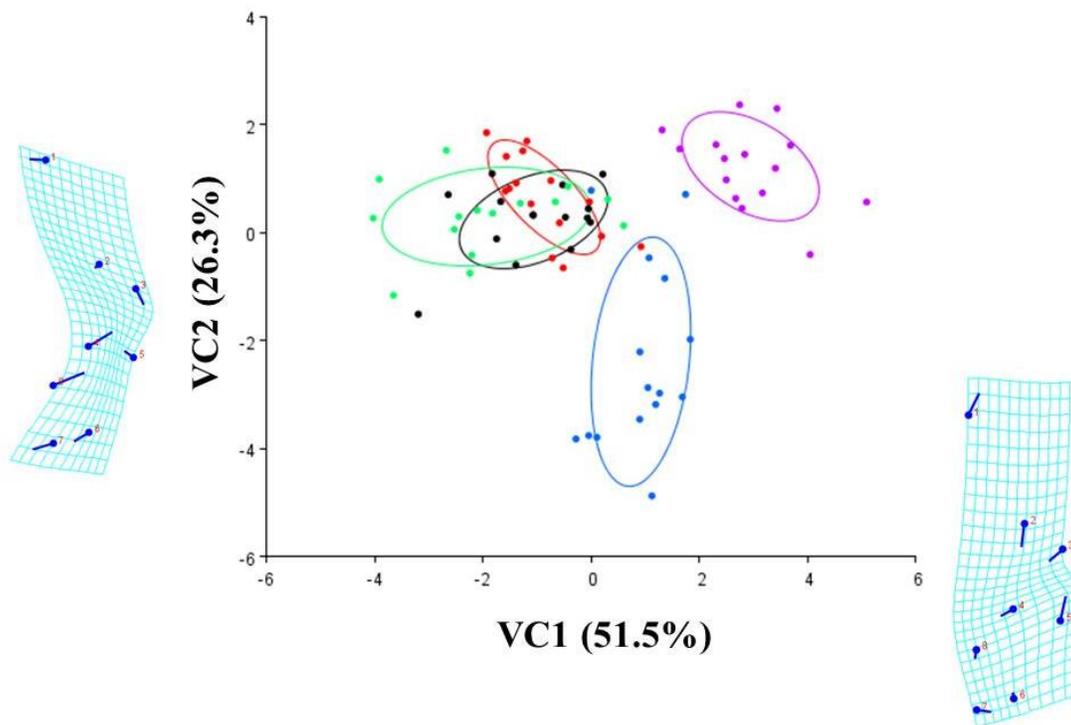


Figura 12. Representación gráfica del Análisis de Variables Canónicas del trophi de *A. brightwellii* de las diferentes localidades. Azul = Xochimilco, morado = Zumpango, rojo = Guerrero, negro = Morelos y verde = Tabasco. Al costado de cada eje se muestran las redes de deformación correspondientes a los cambios de forma en cada uno de los ejes.

La morfología de los quistes de las poblaciones de *A. brightwellii* fue relativamente variable. En microscopía de luz se distingue una superficie irregular en forma de ondas en algunos casos estas ondas fueron muy sutiles como por ejemplo en *A. brightwellii* de Zumpango y Guerrero (Fig. 13. e-f; i-j) y en otros casos como el de Morelos estas ondas fueron muy pronunciadas (Fig. 13. c-d). La parte más externa de los quistes que también es la zona donde se observan dichas ornamentaciones en forma de ondas es una capa delgada ($< 10 \mu\text{m}$) y se caracteriza por tener una mayor transparencia. Después de esa región externa se distinguen hacia dentro del quiste dos partes más: una capa muy delgada ($< 3 \mu\text{m}$) densa y oscura y finalmente toda la parte central del quiste una zona densa y café de cerca de $80\text{-}90 \mu\text{m}$ de diámetro (Fig. 13). Mediante los análisis de microscopía electrónica de barrido fue posible observar de forma más clara la ornamentación de la estructuras de resistencia de los aspláncnidos. La ornamentación de los quistes en *A. brightwellii* consistió principalmente en lóbulos semicirculares interconectados por canales de diversas dimensiones, dichas interconexiones se presentaron entre 2, 3 y hasta con 4 lóbulos (Fig.

14). El diámetro de los lóbulos fue de aproximadamente $8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ y presentan poros distribuidos en su superficie. En el caso de las ornamentaciones de Xochimilco y Zumpango se contabilizaron 27 ± 0.7 y 29 ± 0.9 lóbulos respectivamente, en un cuadrante de $60 \times 60 \mu\text{m}$, mientras que las poblaciones de Guerrero, Morelos y Tabasco presentaron 68 ± 1.5 , 60 ± 1 y 63 ± 1.4 lóbulos respectivamente, en la misma área.

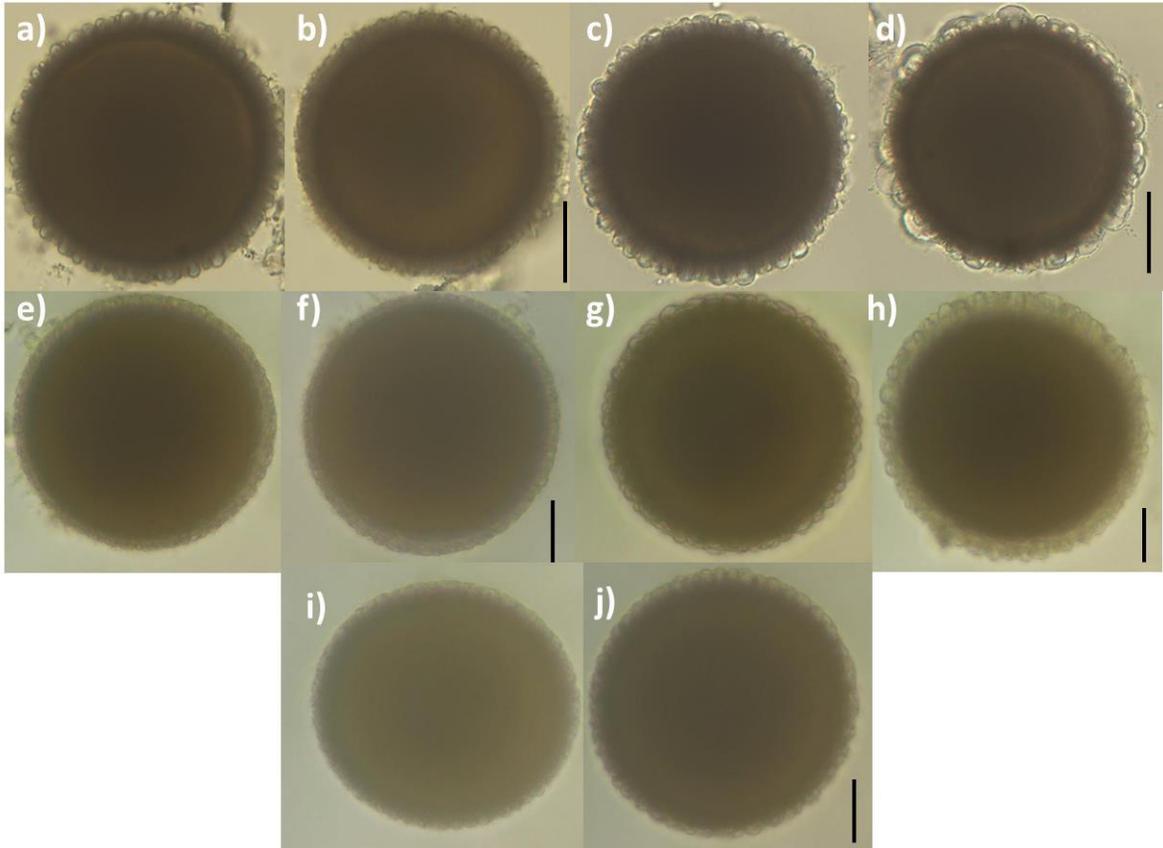


Fig. 13. Quistes de las poblaciones de *Asplanchna brightwellii* colectadas en las 5 localidades a), b) Tabasco, c) d) Morelos, e) f) Guerrero, g) h) Xochimilco y i) j) Zumpango. La barra de escala equivale a 30 μm .

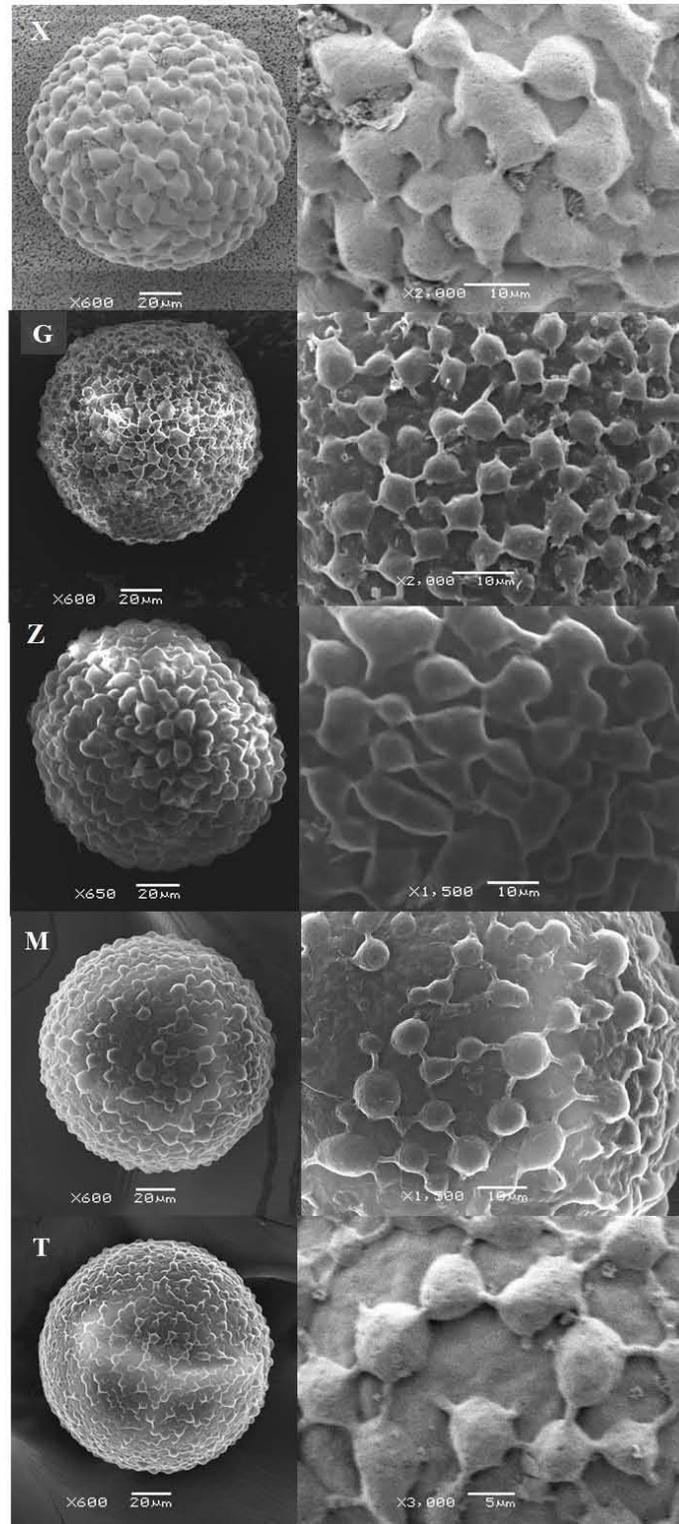


Figura 14. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de los quistes de *A. brightwellii* de las poblaciones estudiadas. X = Xochimilco, G = Guerrero, Z = Zumpango, M = Morelos y T = Tabasco.

Morfología A. girodi

En los monocultivos de *A. girodi* los individuos no presentaron prolongaciones en la loriga, permaneciendo con el cuerpo en forma de saco como se observa en la Figura 15. Los individuos de *A. girodi* presentaron el vitelario elongado, en forma de herradura, y mostraron una baja reproducción sexual, ya que únicamente en dos poblaciones (Azcapotzalco y Nevado de Toluca) se produjeron quistes durante la primer semana.

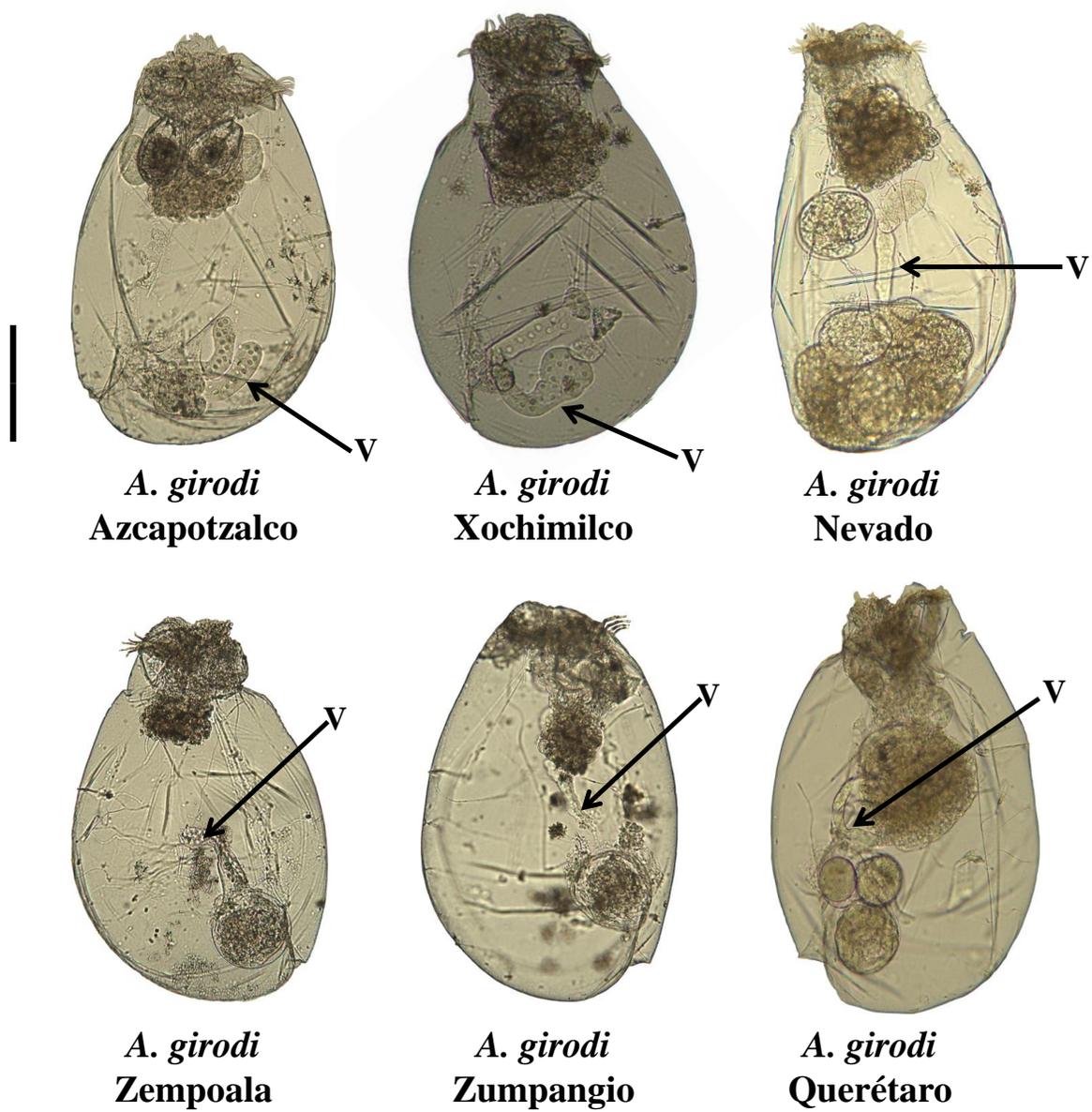


Fig. 15. Individuos de *A. girodi* colectados en las 6 localidades (Azcapotzalco, Xochimilco, Nevado de Toluca, Zempoala, Zumpango y Querétaro). Las flechas marcan la localización del vitelario. La barra de escala equivale a 200 μ m.

En el trophi de *A. girodi* se presentaron las siguientes estructuras: fulcrum, bulla únicamente con subapófisis y ramus, en la parte apical del ramus se llegaron a presentar placas triangulares en algunos individuos. Las diferencias morfológicas en el trophi de *A. girodi* se muestran en las figuras 16 y 17, en este caso las variaciones en las dimensiones del trophi son menos evidentes respecto a las ilustradas en *A. brightwellii*.

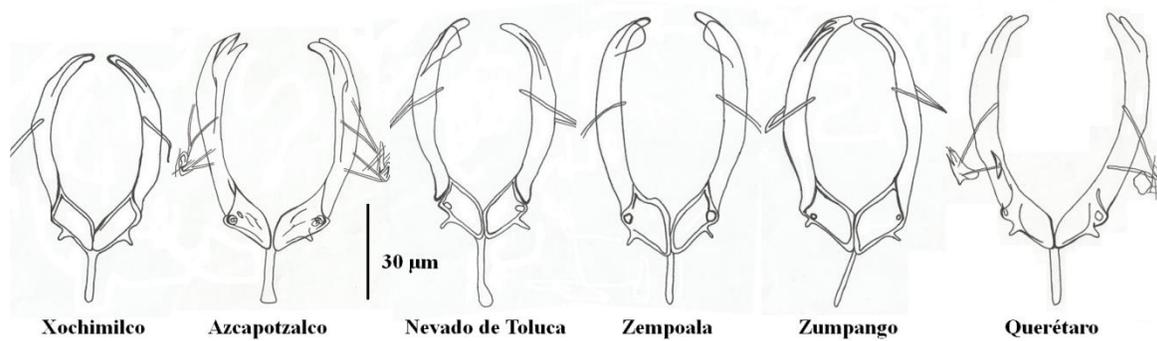


Figura 16. Variaciones interpoblacionales en la longitud y morfología del trophi de *A. girodi*.

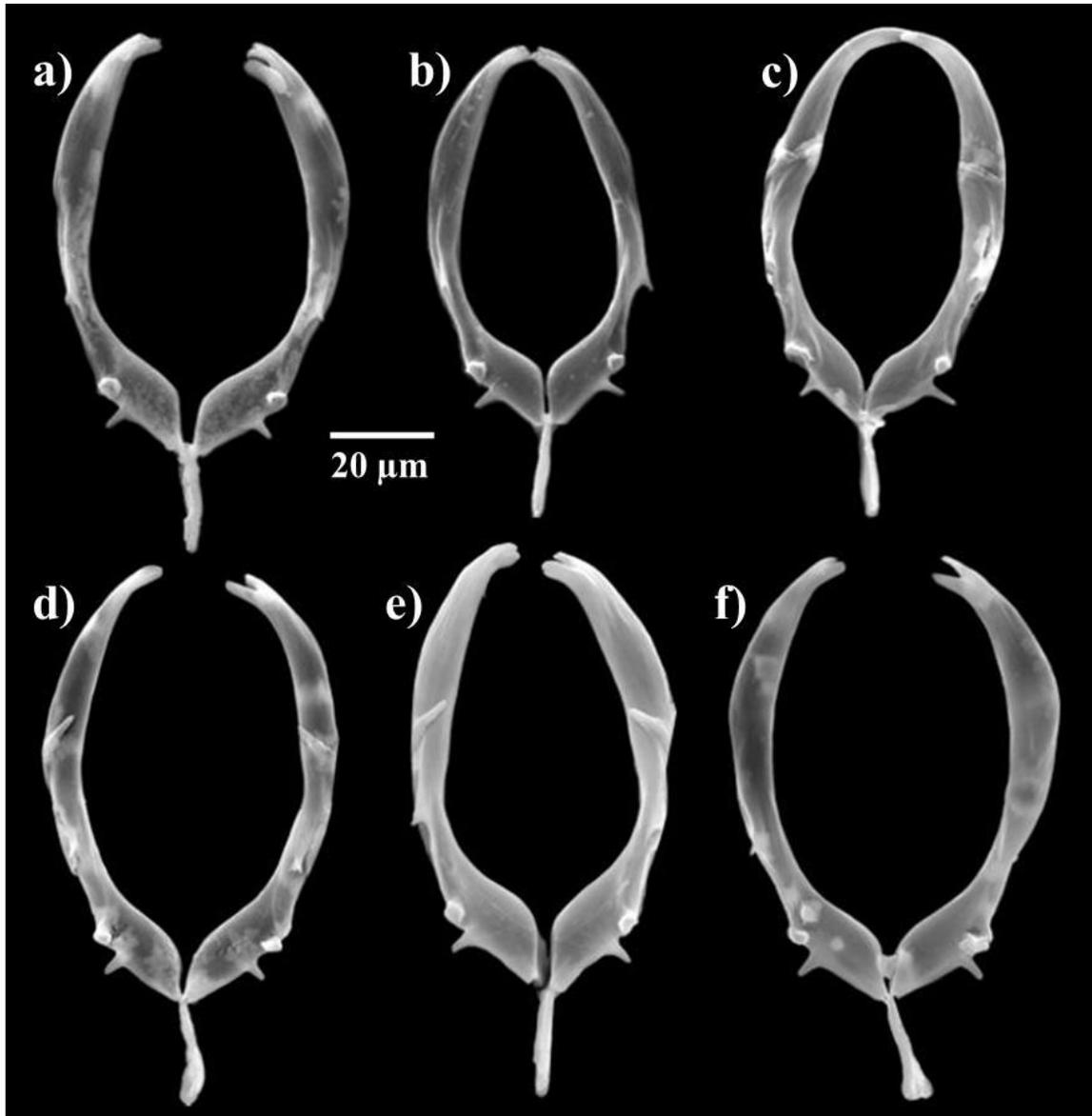


Figura 17. Micrografías de microscopía electrónica de barrido del trophi de los individuos cultivados a partir de *A. girodi*. a) Azcapotzalco, b) Xochimilco, c) Nevado de Toluca, d) Zempoala, e) Zumpango y Querétaro

Los análisis para estudiar las variaciones en la forma de *A. girodi* mostraron de acuerdo con las redes de transformación que las poblaciones de Azcapotzalco y Zempoala fueron las que mostraron deformaciones más fuertes (Fig. 18). Al igual que en el caso de *A. brightwellii* en *A. girodi* se observa que las deformaciones son más fuertes hacia la parte de la bula.

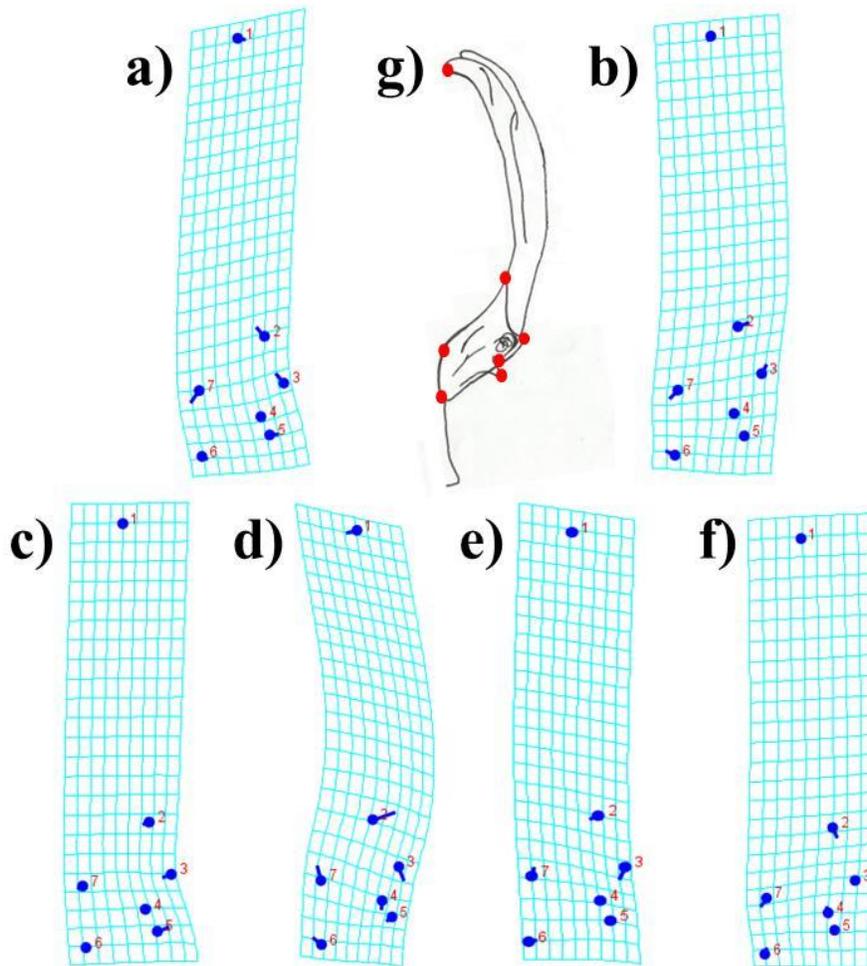


Figura 18. Red de transformación del trophi de *A. girodi* de las diferentes localidades. a) Azcapotzalco, b) Xochimilco, c) Nevado de Toluca, d) Zempoala, e) Zumpango y f) Querétaro. En el inciso g) se muestran los landmarks empleados para el análisis.

En la Figura 19 se observa la ordenación de los especímenes de *A. girodi* a lo largo de los dos principales ejes canónicos (74% de la variación de la forma). Así mismo se muestran las redes de deformación correspondientes a los cambios de forma en cada uno de los ejes (CV1 y CV2). El análisis de variables canónicas a partir de los landmarks establecidos en el trophi de los *A. girodi* nos muestra que la población de Azcapotzalco es la única que se

separa claramente de las demás poblaciones (Fig. 19). Sin embargo, el análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) nos muestra que Azcapotzalco no es la población que tiene más diferencias significativas con las poblaciones, las poblaciones de Zempoala y Querétaro son las que se diferencian con el mayor número de poblaciones (4) que son para el caso de Zempoala: Azcapotzalco, Xochimilco, Nevado de Toluca y Querétaro; y para el caso de Querétaro: Azcapotzalco, Xochimilco, Zempoala y Zumpango.

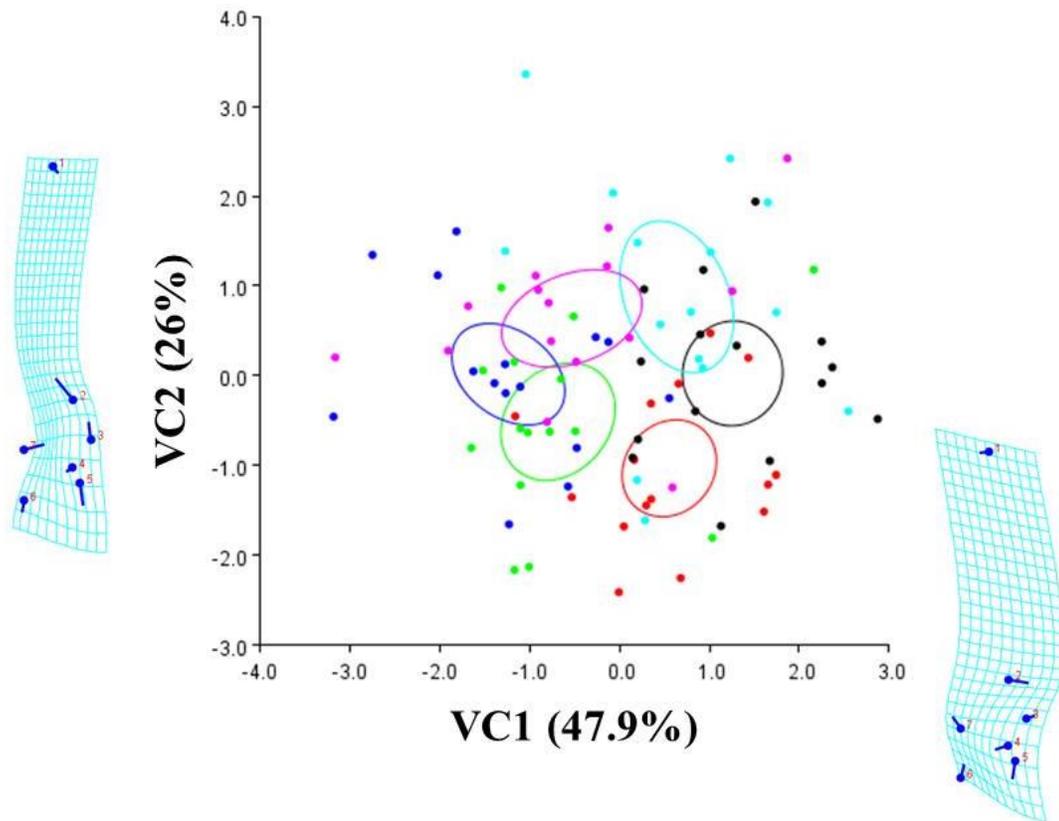


Figura 19. Representación gráfica del Análisis de Variables Canónicas del trophi de *A. girodi* de las diferentes localidades. Rojo = Azcapotzalco, cian = Xochimilco, negro = Nevado de Toluca, azul = Zempoala, morado = Zumpango y verde = Querétaro. Al costado de cada eje se muestran las redes de deformación correspondientes a los cambios de forma en cada uno de los ejes.

En los huevos de resistencia de *A. girodi* se observan también las tres capas descritas en las estructuras de resistencia de *A. brightwellii*, sin embargo en este caso se pueden observar en la superficie un poco los patrones circulares que presenta en su ornamentación, la cual consiste en círculos de diámetro variable (5-10 μm) apostados uno junto del otro sin una separación entre ellos (Fig. 20). Además de que en estos quistes se observaron lóbulos de diferentes diámetros apostados estrechamente uno de otro. Las estructuras no muestran canales ni poros en su superficie.

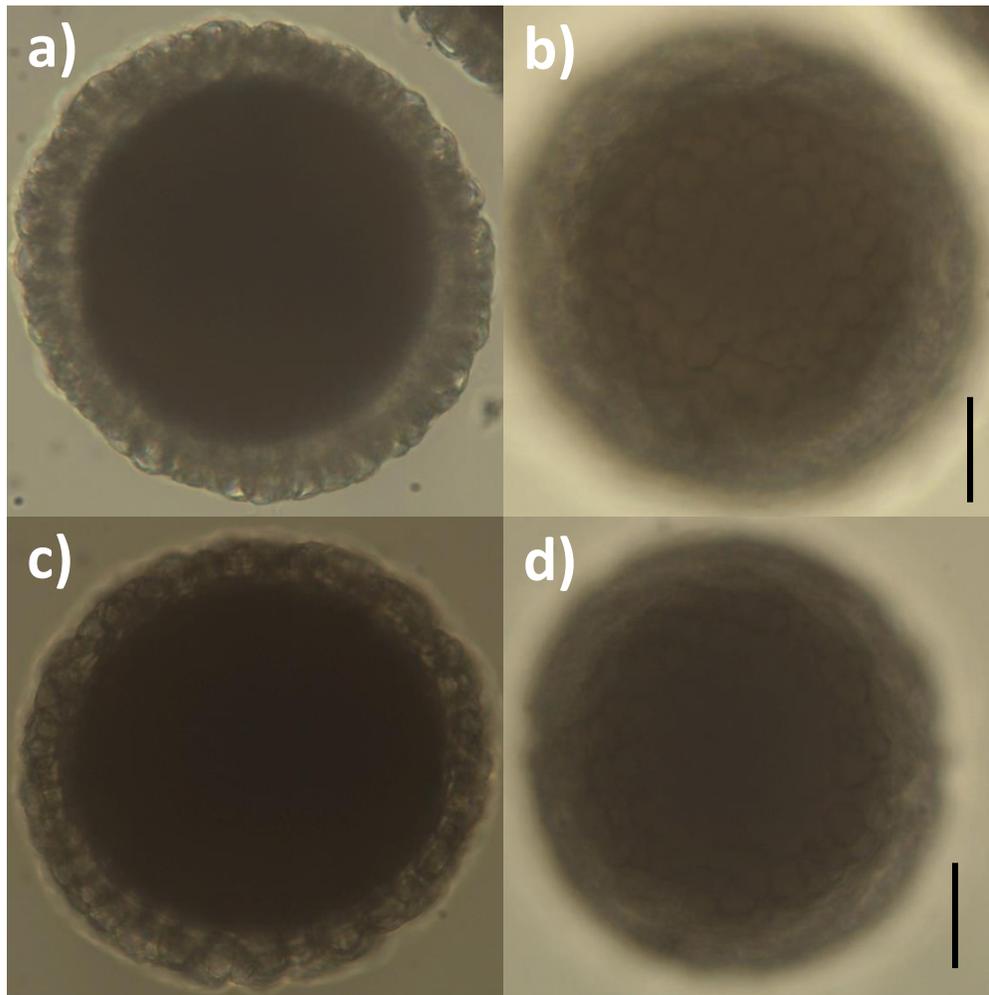


Fig. 20. Quistes de *Asplanchna girodi* de las 2 poblaciones donde se obtuvieron: a), b) Azcapotzalco, c), d) Nevado de Toluca. La barra de escala equivale a 30 μm .

Morfología *A. sieboldii*, *A. silvestrii* y *A. cf. tropica*

En algunos monocultivos de *A. sieboldii* y *A. silvestrii*, aproximadamente una semana después de iniciados, se encontraron tres morfotipos claramente diferenciados: saquiforme, cruciforme y campanulado. En *A. cf. tropica* colectado en la presa Chicoasen en el estado de Chiapas, no se observaron cambios morfológicos durante el tiempo en que se mantuvieron los cultivos de laboratorio (Fig. 21).

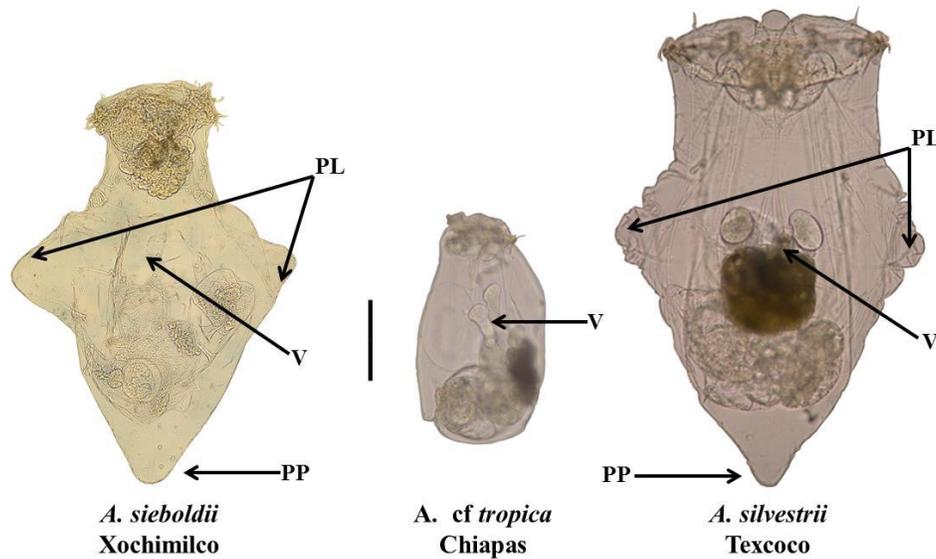


Fig. 21. Individuos de *Asplanchna sieboldii* (cruciforme), *A. cf. tropica* y *A. silvestrii* (cruciforme) colectadas en 3 localidades (Xochimilco, Chiapas y Texcoco, respectivamente). Las flechas marcan la presencia de algunas de las características morfológicas observadas en los individuos: V= Vitelario, PL= Prolongaciones Laterales, PP= Prolongación Posterodorsal. La barra de escala equivale a 200 μ m.

El trophi de *A. sieboldii* presentó: fulcrum, bulla con apófisis y subapófisis, ramus, DMIR y en la parte apical del ramus una placa triangular apostada de manera transversal al ramus (Figs. 22 y 23). El trophi de *A. silvestrii* presentó: fulcrum, bulla con apófisis y subapófisis, ramus recto con una curvatura en la parte apical, DMIR bien desarrollado y un par de placas semicirculares en la parte apical del ramus (Figs. 22 y 23). El trophi de *A. cf. tropica* presentó las siguientes estructuras: fulcrum, bulla con vestigios de apófisis y una subapófisis bien desarrollada, ramus cuyo margen interno tiene una leve curvatura cerca del 50% de su longitud que resulta en una prolongación a modo de espina o diente, en la estructura resultante se observa una línea que la divide por la mitad recorriéndola de la parte más distal hasta cerca del 70% de la misma (Figs. 22 y 23).

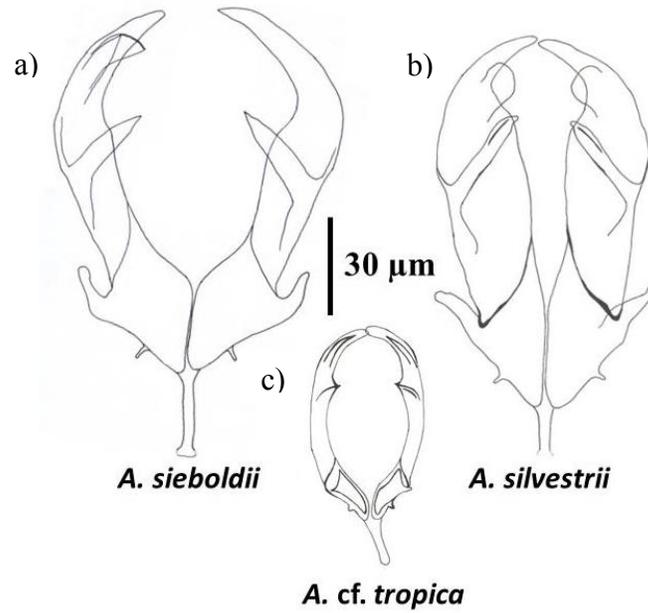


Fig. 22. Trophi de los individuos de a) *Asplanchna sieboldii* (cruciforme), b) *A. silvestrii* (cruciforme) y c) *A. cf. tropica* colectadas en 3 localidades (Xochimilco, Texcoco y Chiapas, respectivamente).

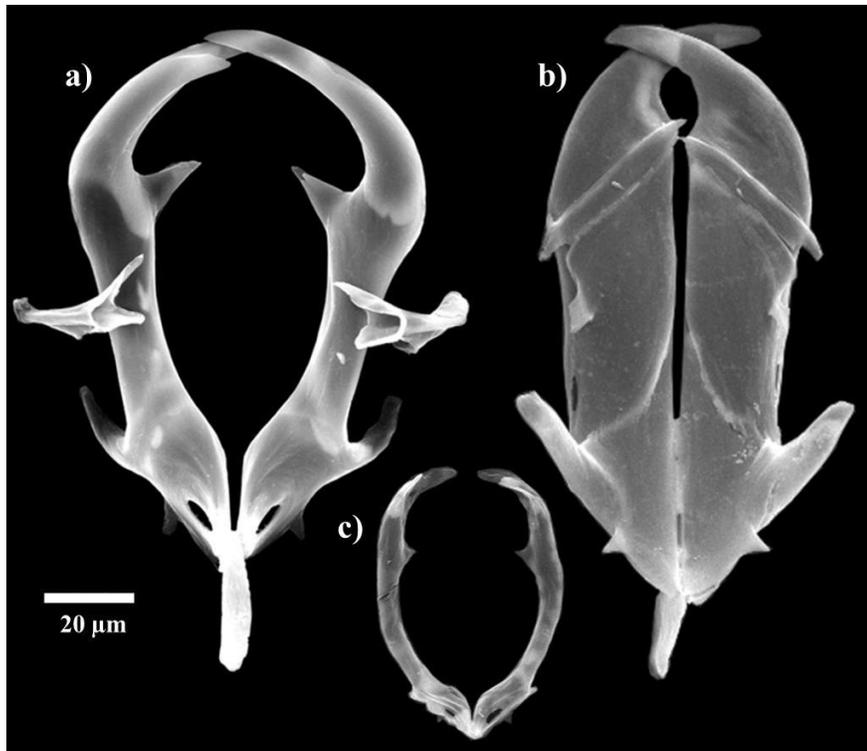


Fig. 23. Micrografía de microscopía electrónica de barrido del trophi de a) *Asplanchna sieboldii* (cruciforme), b) *A. silvestrii* (cruciforme) y c) *A. cf. tropica* colectadas en 3 localidades (Xochimilco, Texcoco y Chiapas, respectivamente).

Discusión

En los cultivos monoclonales de *A. sieboldii* y *A. silvestrii*, al cabo de una semana se presentaron cambios morfológicos, estos cambios consistieron en la presencia de los tres morfotipos: saquiforme, cruciforme y campanulado como lo describen Birky (1964, 1967, 1968, 1969; Birky y Power, 1969; Birky y Gilbert, 1972) y Gilbert (1968, 1971a, 1972, 1976a; 1976b, 1976c; Gilbert y Birky, 1971; Gilbert *et al.*, 1979). Como ya se dijo está relacionado con su dieta, los organismos presas para mantener a los aspláncnidos fueron *Anuraeopsis fissa*, estos se alimentaron con el alga (*Chlorella vulgaris*) que típicamente contiene α tocoferol ya que este último tiene la función de prevenir el deterioro foto-oxidativo de las biomembranas (Fryer, 1992; Estevez *et al.*, 2001). El α -tocoferol contenido en las células pasó a los aspláncnidos por medio de las presas y fue lo que causó importantes cambios en la morfología de los individuos. Por otro lado, *A. brightwellii*, es una especie dimórfica (Gilbert, 1980), ya que al tener una dieta rica en vitamina E puede llegar a presentar una prolongación posterodorsal, sin embargo en los organismos colectados en el centro del país esta prolongación fue menor al 50% del tamaño del cuerpo que mencionan Gilbert *et al.* (1979) y José de Paggi (2002) puede llegar a presentarse con una dieta rica en vitamina E.

En el capítulo I se observaron y discutieron las variaciones morfométricas de las tallas y la longitud de algunas piezas que conforman el trophi de los aspláncnidos. Se concluye que de acuerdo a estos caracteres, existen diferencias significativas entre todas las poblaciones de *A. brightwellii* y entre algunas poblaciones de *A. girodi*, en este segundo capítulo se reafirman estas relaciones empleando otro marcador, que es la forma del trophi. De acuerdo con este marcador las poblaciones de *A. brightwellii* son todas diferentes también en cuanto a la forma de su trophi (Figs. 9 y 10) y en *A. girodi* se encuentran algunas diferencias interpoblacionales (Fig. 16 y 17). Los análisis de variables canónicas que involucran la forma del trophi han sido de gran utilidad para poder discernir entre especies cuyo trophi es tan similar que no puede ser empleado para diferenciar entre especies a través de métodos morfométricos tradicionales, como en el caso de los Bdelloideos (Fontaneto *et al.*, 2004; 2007b) y en otros trabajos con rotíferos monogonontos (Fontaneto *et al.*, 2007a). Giri y José de Paggi (2006) emplean este tipo de análisis para revisar el estatus taxonómico de dos morfotipos de una especie con amplia plasticidad fenotípica, *B. caudatus*, y obtienen

mediante este, evidencia suficiente para considerar a ambos morfotipos como entidades taxonómicas diferentes. Debido a lo anterior, los resultados con las poblaciones de *Asplanchna* sin ser concluyentes pueden estar revelando no solo plasticidad fenotípica en el grupo sino posibles entidades taxonómicas. Sin embargo, el tamaño y la forma muestran diferencias significativas entre las poblaciones de *A. brightwellii* pero no entre todas las poblaciones de *A. girodi*, lo cual no necesariamente se relaciona con ineficacia del método, sino con diferentes estrategias de vida. La forma del trophi se ha relacionado con los hábitos alimentarios de los organismos (Salt *et al.*, 1978; Hampton y Starkweather, 1998) sabemos que las dietas de *A. brightwellii* y *A. girodi* son diferentes (Chang *et al.*, 2010), pero sobre todo sabemos que las poblaciones del primero pueden presentar dimorfismo (formas α y β) mientras que en las del segundo no se ha observado este comportamiento, lo cual indica que para *A. brightwellii* las variaciones morfológicas en los diferentes ambientes pueden ser más marcadas que para *A. girodi*.

Ante la gran importancia que representa el trophi para la identificación de los rotíferos es fundamental encontrar características confiables para este fin. Para diferenciar entre algunas especies de *Asplanchna* (p. ej. *A. brightwellii* y *A. girodi*) basta con observar la presencia ausencia de ciertas estructuras (apófisis, subapófisis y DMIR) en el trophi para poder definir si se trata de una u otra especie (José de Paggi, 2002; Koste *et al.*, 1979), sin embargo cuando se trata de especies que presentan las mismas estructuras como es el caso de *A. brightwellii* y *A. sieboldii* la tarea es más compleja. Ambas especies colectadas en nuestro país presentaron una apófisis, una subapófisis y un DMIR (Figs. 10 y 23), quedando la diferencia entre ambas en función de cuestiones tan relativas como el tamaño de las estructuras. En nuestros cultivos como se mencionó anteriormente se encontraron diferencias en la morfología del cuerpo, considerando que *A. brightwellii* se presentó con dos formas, morfotipos α y β , que han sido descritos en otros trabajos (Birky, 1964; Gilbert *et al.*, 1979; José de Paggi, 2002), mientras que *A. sieboldii* presentó un claro trimorfismo, morfotipos: saquiforme, cruciforme y campanulado que han sido ampliamente estudiados en la literatura (Gilbert, 1968, 1971a, 1972, 1976a; 1976b, 1976c, 1980; Gilbert y Birky, 1971; Gilbert *et al.*, 1979). Sin embargo, este comportamiento no es tan comúnmente observado en muestras colectadas en campo por lo que no sería tan fácil de discernir entre ambas especies empleando esta característica (Gilbert *et al.*, 1979). De tal forma que el

trophi se ha convertido en una de las características más importantes en la diferenciación de estas especies. José de Paggi, 2002 menciona que las diferencias en el trophi de estos aspláncnidos se basan en la presencia de unas delgadas placas triangulares llamadas lamelas en la parte apical del ramus de *A. brightwellii* y en *A. sieboldii*, además de que en este último se presenta una bifurcación en la parte apical del ramus izquierdo. En los individuos cultivados se encontró la presencia de lamelas y bifurcación de la parte apical del ramus en ambas especies, por lo que aparentemente no es una característica confiable que distinga entre ambos taxa. Por otro lado autores como Gilbert *et al.* (1979) basan la clasificación de ambas especies en el tamaño del DMIR y del trophi en general siendo más robusto el de *A. sieboldii* además de que mencionan que la curvatura del ramus es más pronunciada en este organismo que en *A. brightwellii*. En los cultivos monoclonales generados a partir de muestras colectadas en el país fueron evidentes los cambios en la morfología del trophi, se observaron variaciones de hasta 20 μm en el tamaño del trophi (Tablas 3 y 5) además de que las piezas que lo conforman fueron más robustas en *A. sieboldii* (Fig. 11). De acuerdo con Salt *et al.* (1978) las variaciones en el tamaño y la presencia y ausencia de ciertas estructuras en el trophi como por ejemplo la apófisis y el DMIR, están relacionados con las características alimentarias de los aspláncnidos específicamente con el tipo de presas que son capaces de ingerir los individuos. En este trabajo relacionan presencia y mayor tamaño de apófisis y DMIR con la posibilidad de capturar presas de mayor talla debido a que en dichas estructuras se insertan los músculos abductores encargados de abrir y cerrar el trophi por lo que al tener más fuerza pueden hacerse de presas más grandes.

El trophi fue la principal estructura empleada en la identificación de las especies, inclusive ante la dificultad que puede existir entre *A. brightwellii* y *A. sieboldii*; en el resto de las especies las diferencias interespecíficas fueron suficientemente claras para llevar a cabo este fin. En *A. girodi* la ausencia de apófisis y DMIR; y en *A. silvestrii* un ramus recto con una pronunciada curvatura apical además de la presencia de placas o lamelas semicirculares en esta misma región; y finalmente en *A. cf. tropica* la curvatura del margen interno del ramus con la consecuente formación de un diente a la mitad de la distancia total del mismo, fueron caracteres suficientemente claros para diferenciar entre ellas. En torno al análisis del trophi de *A. cf. tropica* la descripción de esta especie indica que el trophi presenta un ramus compuesto por dos segmentos divididos por una partición curvada que a su vez origina la

única dentición en el margen externo y en el margen interno la partición produce la formación de un diente seguido de una sinuosa curvatura (Koste y Tobias, 1988). En el análisis del trophi de *A. cf. tropica* de la presa Chicoasen no se encontró una dentición externa del ramus, solo existe la formación de un pequeño diente en el margen interno con la correspondiente curvatura, sin embargo todo el margen externo del ramus es recto con una curvatura en la región apical sin presentar ninguna indicación de partición y consecuente formación de dos segmentos (Figs. 22 y 23). Adicionalmente, el trophi de *A. cf. tropica* tiene en la región apical del ramus un diente paralelo al mismo y con una lamela triangular que se extiende hacia afuera del ramus.

Continuando con la morfología de los aspláncnidos otra característica de gran relevancia en la taxonomía de estos organismos es la morfología del vitelario. Típicamente se consideraban dos tipos de vitelario en el género *Asplanchna* el globular y el elongado, hasta (1964) Sudzuki intenta dividir al género *Asplanchna* en dos géneros (*Asplanchna* y *Asplanchnella*) en función de esta característica. Dicha propuesta no fue acogida por todos los taxónomos, después Koste y Tobias en (1988) describen una nueva especie llamada *A. tropica* que presenta un tercer tipo de vitelario lo que complica la idea de Zudzuki. Más recientemente los análisis moleculares y morfológicos (Walsh *et al.*, 2005) han llegado a la conclusión de que no existe evidencia sólida que valide esta propuesta por lo que se conserva a *Asplanchna* como un solo género. Si bien la propuesta de Sudzuki (1964) no cuenta con la suficiente evidencia para dividir al género si nos ayuda a entender la importancia de esta estructura y la constancia con la que se presenta en los aspláncnidos: las especies *A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. sieboldii* y *A. silvestrii* poseen un vitelario de tipo elongado, *A. herrickii* y *A. priodonta* de tipo globular y finalmente *A. tropica* de tipo saquiforme. En los individuos colectados en el centro del país independientemente de la localidad a la que pertenecen no se registraron variaciones en cuanto a la morfología del vitelario de las especies *A. brightwellii*, *A. girodi*, *A. sieboldii* y *A. silvestrii*. El caso de *A. cf. tropica* es diferente, si esta especie como ya se mencionó posee un vitelario de tipo saquiforme (Koste y Tobias 1988) y sabemos que al menos la morfología del vitelario es constante en los aspláncnidos (Sudzuki 1964) sin embargo en nuestro trabajo la especie *A. cf. tropica* presenta un vitelario elongado (Fig. 21) que debido a lo anterior puede significarse dos cosas. La primera: una descripción inadecuada de *A. tropica* respecto al

tipo de vitelario que presenta esta especie y por lo tanto se requiera una nueva descripción, la segunda es que la especie registrada en la presa Chicoasen no sea *A. tropica* y se trate de una nueva especie. Para dar una mejor aproximación sobre cuál de estas dos opciones es en la que gobierna a esta especie es necesario considerar varios aspectos de su morfología por lo que se irán discutiendo cada uno de ellos y al final de este apartado se hará una síntesis.

Por otro lado, la morfología de los quistes es complementaria en la determinación de los organismos, además de tener gran importancia e interés para otras disciplinas como la paleolimnología (Gilbert, 1974). En este trabajo, los quistes de los aspláncidos presentaron marcadas diferencias interpoblacionales. Dichas diferencias fueron principalmente en el diámetro y ornamentación (diámetro, morfología y densidad de los lóbulos), considerando que la ornamentación de los quistes es especie-específica (Gilbert, 1974; Pourriot y Snell, 1983; Jenkins y Underwood, 1998), dichas variaciones deben estar relacionadas con la existencia de especiación críptica en el grupo. Sin embargo, se requiere coleccionar un mayor número de muestras en el país y que estas representen una mayor estacionalidad para poder concluir la magnitud del proceso. En la literatura se encuentran ejemplos que tratan sobre su especificidad (Kutikova, 1970; Ruttner-Kolisko, 1972; Voigt, 1956-1957), específicamente de *Asplanchna* (Beauchamp, 1951; Mrazek, 1897; Gilbert y Wurdak, 1978; Wurdak *et al.*, 1978), en ellos se destaca que la ornamentación es especie específica y que se pueden encontrar algunas variaciones intraespecíficas. En *A. brightwellii* se observan grandes variaciones en el diámetro y cantidad de lóbulos que ornamentan sus estructuras de resistencia (Gilbert y Wurdak, 1978). En otros rotíferos como *Brachionus calyciflorus* se han observado variaciones en los quistes de individuos de diferentes localidades y también entre los quistes de un mismo individuo (Bogoslavsky, 1963), estas variaciones se han registrado también en otros brachionidos (Bogoslavsky, 1967, 1969).

Finalmente en *A.cf. tropica*, luego de comparar lo reportado en la literatura y lo observado en nuestros individuos coleccionados tenemos que: el organismo se ajusta al intervalo de la talla presentado por Koste y Tobias (1988) que es de 500 a 900 μm , sin embargo dentro de ese rango se traslapan el resto de las especies del género (José de Paggi, 2002). El tipo de vitelario que presentaron los individuos coleccionados en la presa Chicoasen (tipo elongado) difiere del descrito para *A. tropica* (saquiiforme) por Koste y Tobias (1988) y finalmente el

trophi no presenta una de las principales características mostradas por el trophi de *A. tropica* que es la clara partición del ramus en dos segmentos y una consecuente dentación del margen externo del ramus, por lo que sin ser concluyentes, al no coincidir estas dos características de gran valor taxonómico podemos pensar en que se trate de una especie aún desconocida para la ciencia.

Conclusiones

La elección de los caracteres con valor taxonómico para los aspláncnidos es una tarea delicada, dado que ciertas estructuras presentan variaciones en su estructura y son susceptibles a la alteración mediante los protocolos de extracción del trophi.

La evidencia morfológica del trophi y quistes indican que en *A. brightwellii* y *A. girodi* existe especiación críptica.

Las estructuras más sólidas y constantes en la morfología del trophi de los aspláncnidos fueron el DMIR, la apófisis, la subapófisis así como el grosor y ángulo de inflexión del ramus.

La presencia ausencia del DMIR en el trophi de los aspláncnidos es un carácter de gran valor taxonómico para el discernimiento interespecífico de este grupo sin embargo no posee el mismo valor para tratar de discriminar entre las especies crípticas del complejo.

La presencia y ausencia de las lamellas en la parte apical del ramus y la bifurcación del mismo no son características confiables para la identificación y diferenciación de *A. brightwellii* y *A. sieboldii*.

El tamaño del DMIR y del trophi en general son las características más confiables para discriminar entre *A. brightwellii* y *A. sieboldii*, además del ángulo de inflexión del ramus.

Capítulo III Análisis moleculares *Asplanchna*

Introducción

La taxonomía clásica (basada en caracteres morfológicos) presenta cierta problemática asociada a la existencia de la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética en los caracteres empleados en el reconocimiento de especies, además de que en muchos taxa existe especiación críptica y finalmente a que las claves empleadas en la identificación de los organismos solo son válidas para determinada etapa de vida de los organismos (Hebert *et al.*, 2003). La mayor parte del ciclo de vida los rotíferos monogonontos se reproducen partenogenéticamente. Sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales como alta densidad poblacional, limitación de recursos y cambios en el fotoperiodo, los rotíferos llevan a cabo la reproducción sexual (Wallace *et al.*, 2006).

Los rotíferos, durante la etapa de reproducción sexual emplean un sistema de reconocimiento de pareja basado en el contacto y la quimiorrecepción (Gilbert, 1963; Snell *et al.*, 1995), donde el macho posee receptores ubicados en la corona, con los que recibe una señal química denominada feromona de reconocimiento de pareja (MRP, por sus siglas en inglés *Mate-Recognition Pheromone*) (Gilbert, 1963; Snell *et al.*, 1988). La feromona es una glicoproteína de aproximadamente 20 kD que se concentra en la corona de la hembra y cuya estructura deberá coincidir con los receptores del macho para iniciar el apareamiento (Snell *et al.*, 1988, 1995; Rico-Martínez y Snell, 1997; Rico-Martínez *et al.*, 1998; Snell, 1998). En el caso de que ocurran modificaciones en la estructura de la feromona o en sus receptores, tendrán una influencia directa en el éxito o fracaso del apareamiento de los rotíferos (Gilbert y Walsh, 2005), sin embargo las mutaciones que se lleguen a presentar en este sistema de reconocimiento serán cuasi-neutrales tratándose de la reproducción partenogenética (Serra *et al.*, 1997). Continuando con el ejemplo anterior, debido a que en esta etapa el crecimiento de los rotíferos es exponencial (Wallace *et al.*, 2006) y la mutación cuasi-neutral, se generaran una gran cantidad de clones con la modificación, lo que hace más factible que este tipo de modificaciones genéticas se puedan implantar en la población (King, 1980). El sistema de reconocimiento de pareja en los monogonontos, esta desacoplado de la morfología lo cual incrementa la probabilidad de especiación críptica en el grupo (Knowlton, 1993; Serra *et al.*, 1997).

Por otro lado, el crecimiento durante la etapa partenogenética puede tener otras consecuencias en la genética de las poblaciones, derivado de su rápido crecimiento poblacional y de su carácter clonal como se explicó antes, la etapa partenogenética influirá en la deriva génica y en la selección clonal de las poblaciones (Lynch y Gabriel, 1983; King, 1977, 1993). Finalmente, durante la fase sexual no solo ocurre la recombinación de los gametos con el consecuente intercambio de información genética (Williams, 1975; Maynard-Smith, 1978), también es el momento en que se forman los quistes que son las principales estructuras de dispersión del grupo (Pourriot y Snell, 1983; Jenkins y Underwood, 1998) y debido a que la reproducción sexual siempre ocurre dentro de la misma especie, algunos autores emplearon el entrecruzamiento como una herramienta para distinguirlas (Rico-Martínez y Snell, 1997; Rico-Martínez *et al.*, 1998).

Si bien los análisis de entrecruzamiento continúan vigentes y son muy útiles, no son suficientemente robustos para la separación de especies crípticas, por lo que en décadas recientes se han popularizado por encima de ellos las herramientas moleculares para resolver conflictos taxonómicos entre las especies ya que suelen ser muy prácticos, accesibles y relativamente fáciles de realizar, lo que ha detonado un vertiginoso desarrollo de las mismas (Bickford *et al.*, 2006). Con la finalidad de identificar especies crípticas o inferir filogenias, se han trabajado muchos marcadores moleculares nucleares como el 18s rDNA los Espaciadores Internos Transcritos (ITS, por sus siglas en inglés, *Internal Transcribed Spacer*) (Blaxter, 2004; Birky *et al.*, 2005; Gómez, 2005; Schoch *et al.*, 2012). Se han empleado marcadores moleculares de DNA mitocondrial (mtDNA), de los que quizá el de mayor uso y consenso sea COX 1 (Galtier *et al.*, 2009).

El sistema de código de barras genético basado en COI o COX 1 es un sistema de identificación de especies basado en una región de 640 pb de este gen mitocondrial (Hebert *et al.*, 2003; Birky, 2007). Las razones por las cuales este marcador ha cobrado importancia son diversas: la primera es la relativa facilidad para su extracción y amplificación debido a que se encuentran varias copias en una célula, no presenta intrones y es altamente conservado en los distintos grupos de animales (Gissi *et al.*, 2008; Galtier *et al.*, 2009). Esas razones han permitido el diseño de primers universales. Los primers de Folmer *et al.* (1994) han funcionado muy bien en rotíferos monogonontos, bdelloideos y otros Phyla

(Birky, 2007; García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013). Así, actualmente es posible contrastar un gran número de secuencias de diversos organismos. Algunas propiedades biológicas explican la popularidad del mtDNA y de marcadores como COI: (1) su herencia clonal (vía materna), lo que hace que todo el genoma asemeje a un locus no recombinante; y (2) la evolución casi neutra del mtDNA, debido a que está involucrado en funciones metabólicas básicas y no como otros genes involucrados en procesos adaptativos (Birky *et al.*, 1989; Birky, 2001; Galtier *et al.*, 2009). De esta forma, los marcadores moleculares, particularmente el código de barras genético, han cobrado mucha fuerza en las últimas tres décadas en el estudio de especies crípticas y análisis filogenéticos de rotíferos (Birky, 2007; García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013).

Las estrategias moleculares se han convertido en herramientas fundamentales para el entendimiento de la biología y la ecología de los rotíferos. Ahora se puede conocer la cantidad de clones que componen una población, indagar fenómenos de especiación críptica el o la verdadera existencia de organismos cosmopolitas (Gómez, 2005). Se han descrito alrededor 1500 especies de rotíferos monogonontos, sin embargo, no tenemos la certeza de que ese sea el número definitivo ya que muchas especies pueden ser crípticas y constituir en realidad complejos de especies (Gómez *et al.*, 2002; Suatoni *et al.*, 2006; García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013). En las últimas décadas gran parte de los trabajos taxonómicos en los rotíferos han involucrado análisis moleculares (Gómez, 2005; Birky, 2007), en estos trabajos se han empleado conjuntamente con los marcadores morfológicos marcadores moleculares como COX 1 (Gómez *et al.*, 2002; Gilbert y Walsh, 2005; Derry *et al.*, 2003; Gómez, 2005), e ITS (Derry *et al.* 2003; Gilbert y Walsh, 2005; Ge *et al.*, 2012), que han contribuido en resolver cuestiones filogenéticas y de especiación críptica dentro del phylum Rotifera.

Ante esta problemática la taxonomía molecular se convierte en una herramienta muy útil para dar solución a estos problemas a través de la distancia genética que a su vez representa el grado de disimilitud entre la composición genética de los taxa (Ayala, 1975).

Materiales y métodos

La colecta de los rotíferos así como su establecimiento en cultivos monoclonales y su mantenimiento, se realizó conforme lo descrito en el capítulo I.

Una vez desarrollados los cultivos monoclonales de cada localidad, se emplearon para para realizar los análisis moleculares de la familia Asplanchnidae. De cada monocultivo se extrajeron tantas hembras como fue posible (entre 200 y 400 individuos), fueron aisladas y colocadas en inanición durante 12 h en medio EPA con la finalidad de vaciar su tracto digestivo, para evitar la contaminación con DNA de otros organismos ya que los aspláncnidos son depredadores de otros rotíferos. Posteriormente, se colocaron en grupos de 20 individuos en tubos Eppendorf con capacidad de 1.5 ml donde fueron fijados con etanol al 96%. Con los individuos fijados se realizó la identificación de cada monocultivo empleando herramientas moleculares. El material genético de los individuos se empleará para amplificar un fragmento de 640 pb del gen mitocondrial citocromo c oxidasa 1 (CO1 o COX 1).

Los análisis moleculares se realizaron en dos etapas, en la primera se trabajó con 3 poblaciones de *A. brightwellii* (Xochimilco, Zumpango y Guerrero) para determinar la cantidad de información adicional que aporta el marcador nuclear ITS respecto del código de barras genético COX 1 y definir si es necesario, viable y conveniente continuar empleándolo o si el marcador molecular COX 1 aporta la información suficiente al nivel que requieren los objetivos del trabajo. En la segunda etapa se analizaron el resto de las poblaciones de *A. brightwellii* y de *A. girodi* con el marcador mitocondrial COX 1

La extracción de ADN se realizó de acuerdo a una modificación del protocolo *HotSHOT* (Truett *et al.*, 2000). Se colocaron 10 individuos de *Asplanchna* en un tubo Eppendorf con capacidad para 200 µl con 30 µl de una solución alcalina de NaOH 10 N con pH 11 donde se maceraron ligeramente. Posteriormente el tubo con los organismos macerados se llevó a 94 °C durante 30 minutos. Después de transcurrido este tiempo el tubo se transfirió inmediatamente a hielo y se le colocaron 30 µl de una solución de neutralización Tris-HCl 1 M pH 7 y se almacenó a -20 °C.

Para la amplificación del gen nuclear ITS se emplearon los primers ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC e ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (White *et al.*, 1990). La reacción de PCR se realizó con Ampliqon® Taq DNA Polymerase Master Mix RED 1.1x (82.5 mM Tris-HCl pH 8.5, 22 mM (NH₄)₂SO₄ 1.65, 11% Tween 20®; 0.22 mM dNTPs; 0.11 unidades/µl Ampliqon Taq polimerasa; colorante inerte rojo y

estabilizador) siguiendo las especificaciones del fabricante, de la cual se colocaron 45 µl con 0.5 µl de cada primer y 4 µl de ADN molde para tener un volumen final de 50 µl. Las condiciones de los ciclos fueron 94 °C de desnaturalización 2 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 s de desnaturalización, 57 °C por 30 s temperatura de alineamiento, 72 °C por 1 min extensión y un paso final de extensión a 72 °C por 5 min.

Para la amplificación del fragmento de COI se emplearon los primers HCO2198_t1 (5" CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3") y LCO1490_t1 (5" TGTA AAAACGACGGCCAGTGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3") (Floyd; Folmer *et al.* 1994; Messing, 1983) debido a que los cebadores originales no fueron adecuados para estas especies. La reacción de PCR se realizó con Ampliqon® Taq DNA Polymerase Master Mix RED 1.1x (82.5 mM Tris-HCl pH 8.5, 22 mM (NH₄)₂SO₄ 1.65, 11% Tween 20®; 0.22 mM dNTPs; 0.11 unidades/µl Ampliqon Taq polimerasa; colorante inerte rojo y estabilizador) de la cual se colocaron 45 µl con 0.5 µl de cada primer y 4 µl de ADN molde para tener un volumen final de 50 µl. Las condiciones de los ciclos fueron 94 °C de desnaturalización 3 m, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 40 s de desnaturalización, 45 °C por 40 s temperatura de alineamiento, 72 °C por 40 s extensión y un paso final de extensión a 72 °C por 2 m.

Una alícuota del producto de la amplificación se utilizó para corroborar que se trataba del fragmento correcto por medio de electroforesis en gel de agarosa y marcadores de peso molecular Invitrogen. Cuando la prueba fue positiva el producto se ligó en vectores de clonación (PCR II topo invitrogen) y se usó para transformar células de *E. coli* competentes (DH5 alpha). Las bacterias candidatas positivas fueron cultivadas y se extrajo el DNA del plásmido, el cual fue purificado empleando un kit de purificación illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit GE® y se mandó secuenciar. Finalmente el producto purificado se mandó secuenciar y las secuencias se alinearon con ayuda de las bases de datos existentes (inicialmente con <http://barcoding.si.edu/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y luego con <http://www.boldsystems.org/index.php/databases>) para saber si corresponden con la especie de que se trata.

La secuenciación se realizó en la FES Iztacala UNAM, en la Unidad de Biología Tecnología y Prototipos (UBIPRO), en el laboratorio de Bioquímica Molecular, empleando

un secuenciador automatizado 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), los vectores se secuenciaron en ambos sentidos con la ayuda de los primers universales T7, SP6, M13 reverse o M13 Forward o bien COX I forward y reverse.

Las secuencias obtenidas se revisaron y editaron a mano para posteriormente realizar su análisis. El alineamiento se realizó con Clustal W con las opciones predeterminadas y posteriormente, con el programa Mega 5 se calculó la divergencia genética (Kimura dos-parámetros (K2P)). Con estos datos se construyó un dendograma utilizando *Neighbor-joining*, empleando como grupos externos 8 secuencias obtenidas de GeneBank de 3 especies del género *Asplanchna* (*A. sieboldii* números de acceso *GeneBank* JX216493.1 al JX216496.1 y *A. silvestrii* números de acceso *GeneBank* JX216497.1 al JX216499.1) así como dos secuencias de *A. cf. tropica* y una secuencia de *Asplanchnopus multiceps*. Con ayuda del programa DNA Sequence Polymorphism 5.10.01, se analizaron las secuencias para conocer la frecuencia (h) y diversidad (hd) de haplotipos, así como la diversidad nucleotídica (pi) para cada localidad.

Resultados

Como se indicó en el apartado anterior el trabajo se puede dividir en dos etapas. En la primera se obtuvieron un total de 14 secuencias, 7 del marcador nuclear ITS y 7 del marcador mitocondrial COX 1, las cuales representan 3 localidades diferentes, las cuales se especifican en la tabla (6). Con estas secuencias se construyeron tres dendogramas, uno para cada marcador y uno que combina ambos marcadores (Fig. 24). En estos árboles se observa la formación de dos grupos cuando se emplea ITS, uno formado por Guerrero y Zumpango y otro por Xochimilco, cuando se emplea COX 1 se forman tres grupos, es decir se separan las tres localidades Xochimilco, Zumpango y Guerrero cuando se combinan los marcadores las relaciones filogenéticas resultantes son consistentes con las obtenidas con COX 1 (FIG 18). En las secuencias se encontraron un total de 110 sitios variables.

Tabla 6. Número de secuencias de los marcadores moleculares COX 1 e ITS y las localidades de donde se obtuvieron.

Marcador Molecular	Localidad	# Secuencias	Total
COX 1			
	Xochimilco	3	
	Zumpango	2	
	Guerrero	2	
	Total		7
ITS			
	Xochimilco	2	
	Zumpango	2	
	Guerrero	3	
	Total		7

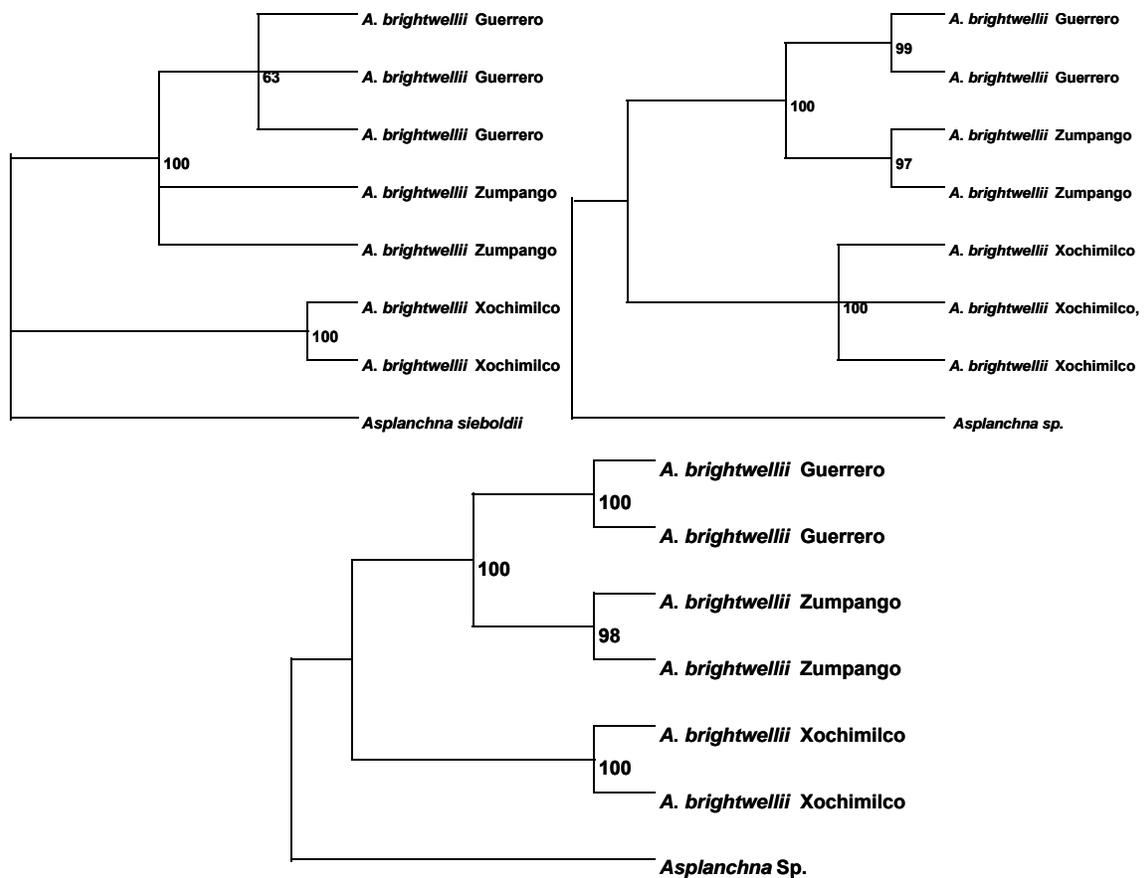


Fig 24. Árboles de distancia realizados con las regiones de a) ITS b) COX 1 y c) Combinación de ITS y COX 1. Se muestran los valores de bootstrap para 1000 réplicas.

Análisis moleculares *A. brightwellii*

Durante la segunda etapa, se empleó únicamente el marcador mitocondrial COX 1, considerando que la información que aportaba el marcador ITS no era sustancialmente mayor a la que aportaba este. Se obtuvieron 55 secuencias de COX 1 de las cuales: 25 pertenecieron a la especie *A. brightwellii* y 30 correspondientes a *A. girodi* así mismo se obtuvieron otra decena de secuencias entre organismos de otros géneros (p. ej. *Asplanchnopus multiceps*, *Brachionus calyciflorus*) y de otros aspláncnidos que solo se encontraron en una localidad (p.ej. *A. cf. tropica*) (Tabla 7).

Tabla 7. Número de secuencias obtenidas del marcador molecular COX 1 por localidad y el número de identificación de proceso en el Barcode of Life Data System (BOLD) donde están depositadas las secuencias junto con la información solicitada por la base de datos (fotos, coordenadas de colecta, electroferogramas etc).

Especie	Localidad	# Secuencias	# de acceso Bold
<i>A. brightwellii</i>			
	Xochimilco	5	CIZRO068-14- CIZRO071-14
	Zumpango	5	CIZRO080-14- CIZRO084-14
	Guerrero	5	CIZRO072-14- CIZRO074-14
	Morelos	5	CIZRO075-14- CIZRO079-14
	Tabasco	5	CIZRO055-14- CIZRO056-14
	Total	25	
<i>A. girodi</i>			
	Azcapotzalco	5	CIZRO052-14- CIZRO054-14
	Xochimilco	5	CIZRO091-14- CIZRO093-14
	Nevado de Toluca	5	CIZRO085-14- CIZRO087-14
	Zempoala	5	CIZRO088-14- CIZRO090-14
	Zumpango	5	CIZRO094-14- CIZRO096-14
	Querétaro	5	CIZRO097-14-CIZRO098-14
	Total	30	
<i>A. cf. tropica</i>		4	
<i>B. calyciflorus</i>		2	CIZRO050-14, CIZRO063-14
<i>B. caudatus</i>		2	CIZRO058-14- CIZRO060-14
<i>Asplanchnopus multiceps</i>		2	CIZRO051-14
	Total	10	

Después de realizar el alineamiento y edición de las secuencias, quedaron conformadas por fragmentos 570 residuos de los cuales 383 fueron sitios conservados y 187 variables. Intraespecíficamente, en *A. brightwellii* se observó una divergencia de 4.3%. La divergencia intrapoblacional en *A. brightwellii*, como se observa en la tabla 8, presentó valores de cero en todos los casos, siendo la más elevada la reportada en la población de Guerrero 0.07%.

Tabla 8. Porcentaje de divergencia intrapoblacional.

Localidad	<i>A. brightwellii</i>
Xoc	0
Zum	0
Gro	0.07
Mor	0
Tab	0

Como parte de los análisis intrapoblacionales en *A. brightwellii* se obtuvieron las frecuencias y diversidad haplotípicas, así como la diversidad nucleotídica de cada una de las poblaciones estudiadas, las cuales se muestran en la tabla 9. A través de estos análisis se observa que las poblaciones de *A. brightwellii* tienen valores bajos en los tres descriptores, teniendo únicamente un haplotipo en cada población, con excepción de Guerrero donde se presentaron dos, y consecuentemente los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica cercanos o iguales a cero.

Tabla 9. Número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (hd) y diversidad nucleotídica, de las poblaciones de *A. brightwellii* empleadas en el estudio.

Localidad	<i>A. brightwellii</i>		
	h	hd	pi
Xoc	1	0.0	0.0
Zum	1	0.0	0.0
Gro	2	0.4	0.0007
Mor	1	0.0	0.0
Tab	1	0.0	0.0
Total	5	0.7	0.04

En cuanto a la divergencia interpoblacional, en *A. brightwellii* las poblaciones más divergentes fueron Xochimilco y Tabasco que en promedio tuvieron 8.2 y 5.5% de divergencia respectivamente, en relación a las otras poblaciones (Tabla 10). Dentro de esta misma especie las poblaciones de Morelos y Zumpango no presentan divergencia respecto al marcador molecular empleado para el análisis. La divergencia interespecífica de *A. brightwellii* y las especies empleadas como grupos externos fueron en promedio de entre 12 y 14% para todas las poblaciones (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de divergencia interpoblacional de *A. brightwellii*. Adicionalmente la tabla muestra las divergencias respecto a los grupos externos *A. sieboldii*, *A. silvestrii* y *Brachionus calyciflorus*, como referencia.

Clon	Xoc	Zum	Gro	Mor	Tab	<i>A. sieboldii</i>	<i>A. silvestrii</i>	<i>A. cf. tropica</i>	<i>A. sp. AMD</i>
Xoc	-								
Zum	8.3	-							
Gro	8.3	2.6	-						
Mor	8.3	0	2.6	-					
Tab	7.9	4.6	5	4.6	-				
<i>A. sieboldii</i>	7.3	7.5	8.3	7.5	6.7	-			
<i>A. silvestrii</i>	13.2	11.9	12.8	11.9	12.1	12.1	-		
<i>A. cf. tropica</i>	18	19.4	20	19.4	18.2	17.8	17.4	-	
<i>A. sp. AMD</i>	12.6	15.9	16.7	15.9	16.1	15.8	15.8	18.5	-

La representación gráfica de las distancias interpoblacionales de *A. brightwellii* se muestra en la Figura 25. En la topología del árbol donde se representan las relaciones entre las poblaciones de *A. brightwellii* se formaron claramente cuatro grupos, uno por cada una de las localidades de 1) Xochimilco, 2) Tabasco y 3) Guerrero y el cuarto grupo formado por las localidades de 4) Morelos y Zumpango (Fig. 26). En el caso de *A. brightwellii* las poblaciones formaron grupos muy cohesivos, por lo que los valores intra e intergrupales fueron muy semejantes a los intra e interpoblacionales (Tabla 11). La divergencia promedio entre los grupos formados en el dendograma de *A. brightwellii* fue de 6.1%.

Tabla 11. Matriz de distancias intergrupales obtenidas a través de Kimura 2P. Los grupos están formados con las poblaciones más relacionadas de acuerdo al dendograma resultante de los análisis moleculares. Los grupos en *A. brightwellii* están formados de la siguiente forma: Grupo 1 Morelos (M1, M2, M3, M4 y M5) y Zumpango (Z1, Z2, Z3, Z4 y Z5), Grupo 2 Guerrero (G1, G2, G3, G4 y G5), Grupo 3 Tabasco (T1, T2, T3, T4 y T5) y Grupo 4 Xochimilco(X1, X2, X3, X4 y X5).

Clon	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
<i>A. brightwellii</i>				
Grupo 1	-			
Grupo 2	2.6	-		
Grupo 3	4.6	5	-	
Grupo 4	8.3	8.3	7.9	-

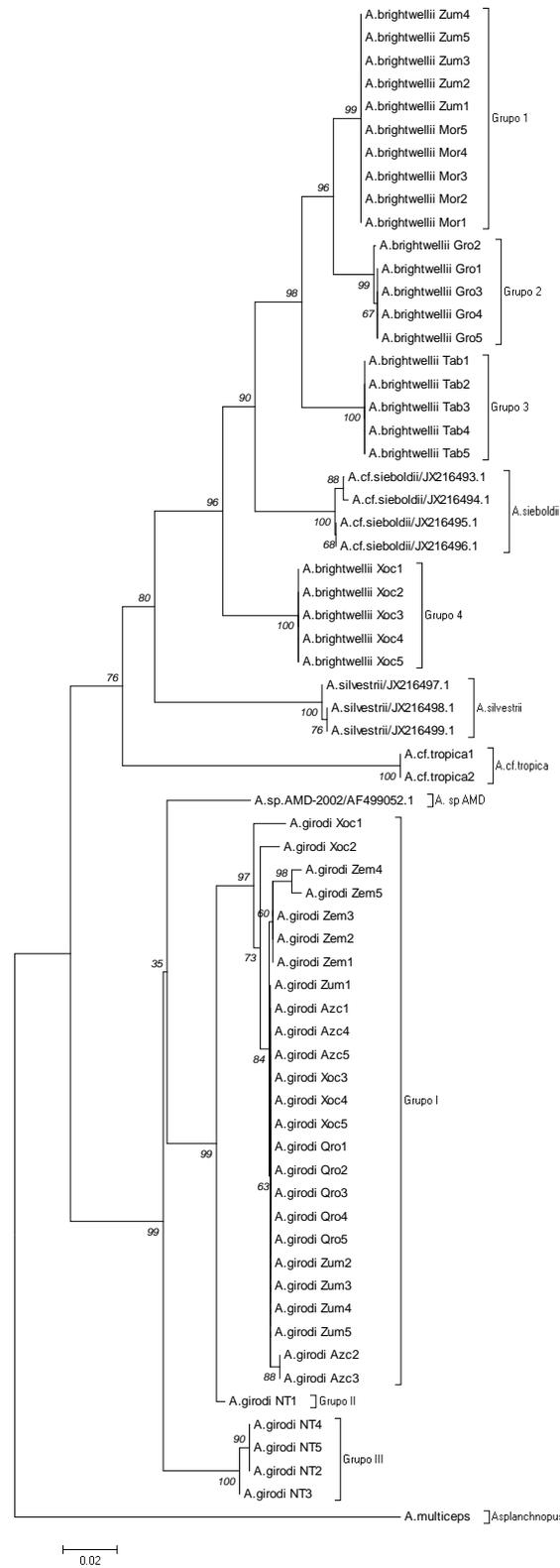


Fig 25. Árbol NJ realizado con 55 secuencias de asplánquidos (25 de *A. brightwellii* y 30 de *A. girodi*) de 11 localidades, basado en distancias de Kimura 2 Parametros (K2P) Se emplearon como grupos externos secuencias de *GeneBank* de las especies: *A. sieboldii* (GeneBank JX216493.1 al JX216496.1), *A. silvestrii* (GeneBank JX216497.1 al JX216499.1) y *Asplanchnopus multiceps*.

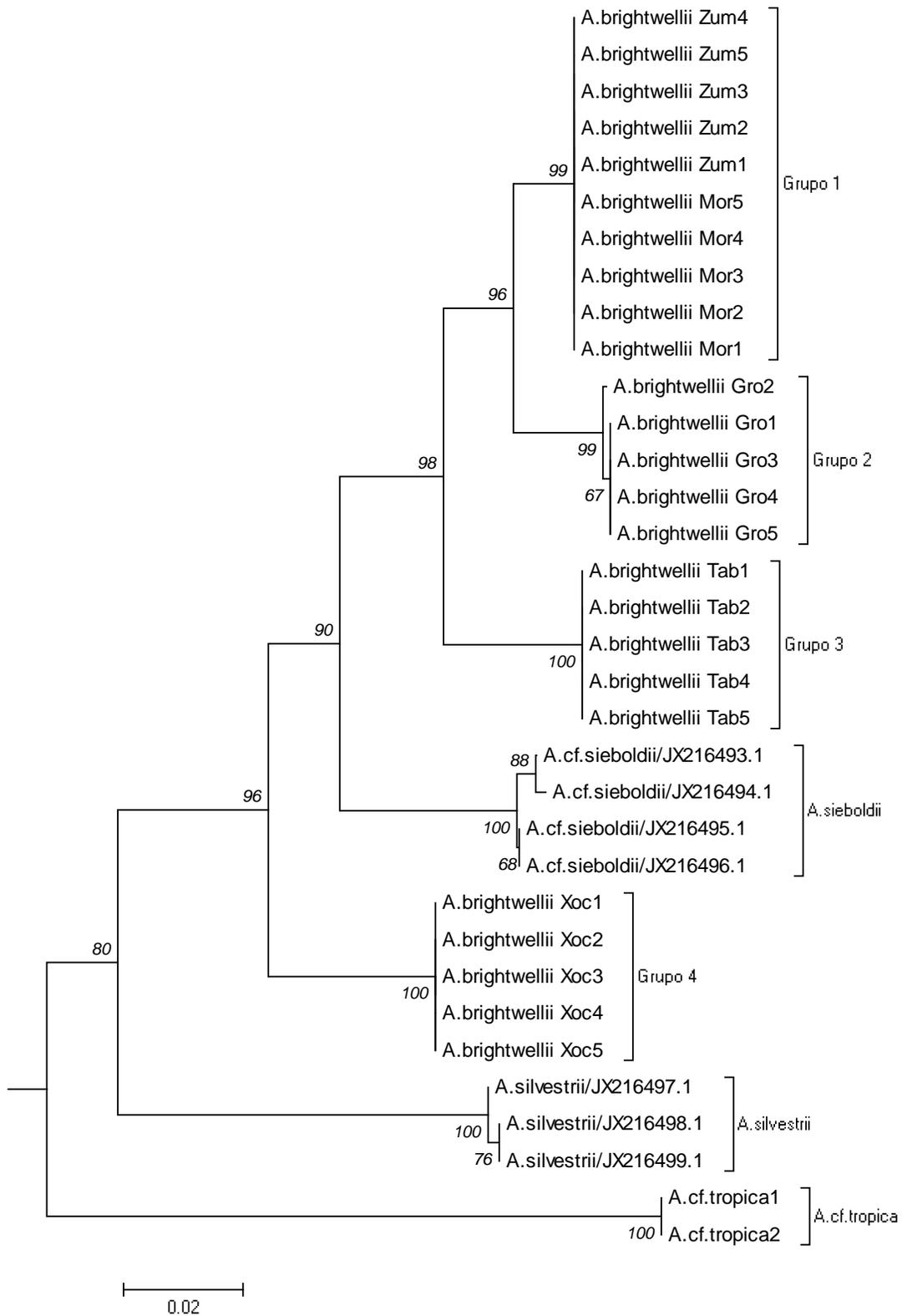


Fig 26. Detalle región correspondiente a la especie *A. brightwellii* del árbol NJ realizado con 55 secuencias de aspláncidos (25 de *A. brightwellii* y 30 de *A. girodi*) de 11 localidades, basado en distancias de Kimura 2 Parametros (K2P). Se emplearon como grupos externos secuencias de *GeneBank* de las especies: *A. sieboldii* (GeneBank JX216493.1 al JX216496.1), *A. silvestrii* (GeneBank JX216497.1 al JX216499.1) y *Asplanchnopus multiceps*.

Análisis moleculares *A. girodi*

Del total de secuencias generadas en este estudio 30 pertenecieron a la especie *A. girodi*, las cuales estuvieron formadas por 566 residuos de los cuales 426 fueron sitios conservados y 140 variables. La divergencia intraespecífica en *A. girodi* fue de 2.5%. En tanto que la divergencia intrapoblacional fue mayor respecto a la de *A. brightwellii*, teniendo valores de hasta 2.1% en el lago de Xochimilco (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje de divergencia intrapoblacional en *A. girodi*.

Localidad	<i>A. girodi</i>
Azc	0.2
Xoc	1.0
NT	2.1
Zem	0.7
Zum	0
Qro	0

En los análisis intrapoblacionales de *A. girodi* se observa un comportamiento diferente al mostrado por *A. brightwellii*, ya que únicamente dos poblaciones, Querétaro y Zumpango, tienen un haplotipo por población y los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica en cero, las cuatro poblaciones restantes, tienen entre 2 y 4 haplotipos por población por lo que los valores de diversidad se incrementaron notablemente (Tabla 13).

Tabla 13. Número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (hd) y diversidad nucleotídica, de las poblaciones de *A. girodi* empleadas en el estudio.

Localidad	<i>A. girodi</i>		
	h	hd	Pi
Azc	2	0.6	0.002
Xoc	3	0.7	0.03
NT	3	0.7	0.02
Zem	4	0.9	0.007
Zum	1	0.0	0.0
Qro	1	0.0	0.0
Total	11	0.7	0.02

Interpoblacionalmente, en *A. girodi*, la población de Nevado de Toluca fue la más divergente con un valor promedio de 6.4%, el resto de los valores de divergencia interpoblacional fueron menores a 1%, con excepción de la divergencia entre Xochimilco y Zempoala que fue de 1.2% (Tabla 14). La divergencia interespecífica de *A. girodi* y las especies empleadas como grupos externos fue de 15% en promedio para todas las poblaciones (Tabla 10).

Tabla 14. Porcentaje de divergencia interpoblacional de *A. girodi*. Adicionalmente la tabla muestra las divergencias respecto a taxones de rotíferos *Asplanchna sieboldii* y *Brachionus calyciflorus*, como referencia.

Clon	Azc	Xoc	NT	Zem	Zum	Qro	<i>A. sieboldii</i>	<i>A. silvestrii</i>	<i>A. cf. tropica</i>	<i>A. sp. AMD</i>
Azc	-									
Xoc	0.7	-								
NT	6.4	6.4	-							
Zem	0.8	1.2	6.5	-						
Zum	0.1	0.6	6.2	0.6	-					
Qro	0.1	0.6	6.2	0.6	0	-				
<i>A. sieboldii</i>	17.7	17.3	17.2	17.7	17.5	17.5	-			
<i>A. silvestrii</i>	16.8	16.7	16.9	16.7	16.6	16.6	12.1	-		
<i>A. cf. tropica</i>	19.8	19.4	19.5	20.1	19.6	19.6	17.8	17.4	-	
<i>A. sp. AMD</i>	7.2	7	6	7.1	7	7	15.8	15.8	18.5	-

La representación gráfica de las distancias interpoblacionales de *A. girodi* se muestran en las figuras 25 y 27. En el árbol de *A. girodi* observamos la formación de tres grupos, la conformación de estos no es equivalente a cada una de las poblaciones. En este árbol se obtuvo un grupo formado por cinco poblaciones entre las que se encuentran Azcapotzalco, Xochimilco, Zempoala, Zumpango y Querétaro, un segundo grupo formado por el clon 1 de Nevado de Toluca y el tercer grupo formado por los cuatro clones restantes de la población Nevado de Toluca (Fig. 27). La divergencia al interior de los grupos fue siempre menor a 1%, y entre los grupos los valores más elevados de divergencia se presentaron entre los grupos 1 y 3 (7.2%) y los menores entre los grupos 1 y 2 (2.5%). La divergencia promedio entre los grupos formados en el árbol de *A. girodi* fue de 6.3% (Tabla 15).

Tabla 15. Matriz de distancias intergrupales obtenidas a través de Kimura 2P. Los grupos están formados con las poblaciones más relacionadas de acuerdo al dendograma resultante de los análisis moleculares. Los grupos en *A. girodi* se componen de la siguiente forma: Grupo 1 Azcapotzalco (X1, X2, X3, X4 y X5), Xochimilco (CN1, CN2, CN3, CN4 y CN5), Zumpango (Z1, Z2, Z3, Z4 y Z5) y Zempoala (Ze1, Ze2, Ze3, Ze4 y Ze5), Grupo 2 Nevado de Toluca (NT1), Grupo 3 Nevado de Toluca (NT2, NT3, NT4 y NT5).

Clon	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>A. girodi</i>			
Grupo 1	-		
Grupo 2	2.5	-	
Grupo 3	7.2	5	-

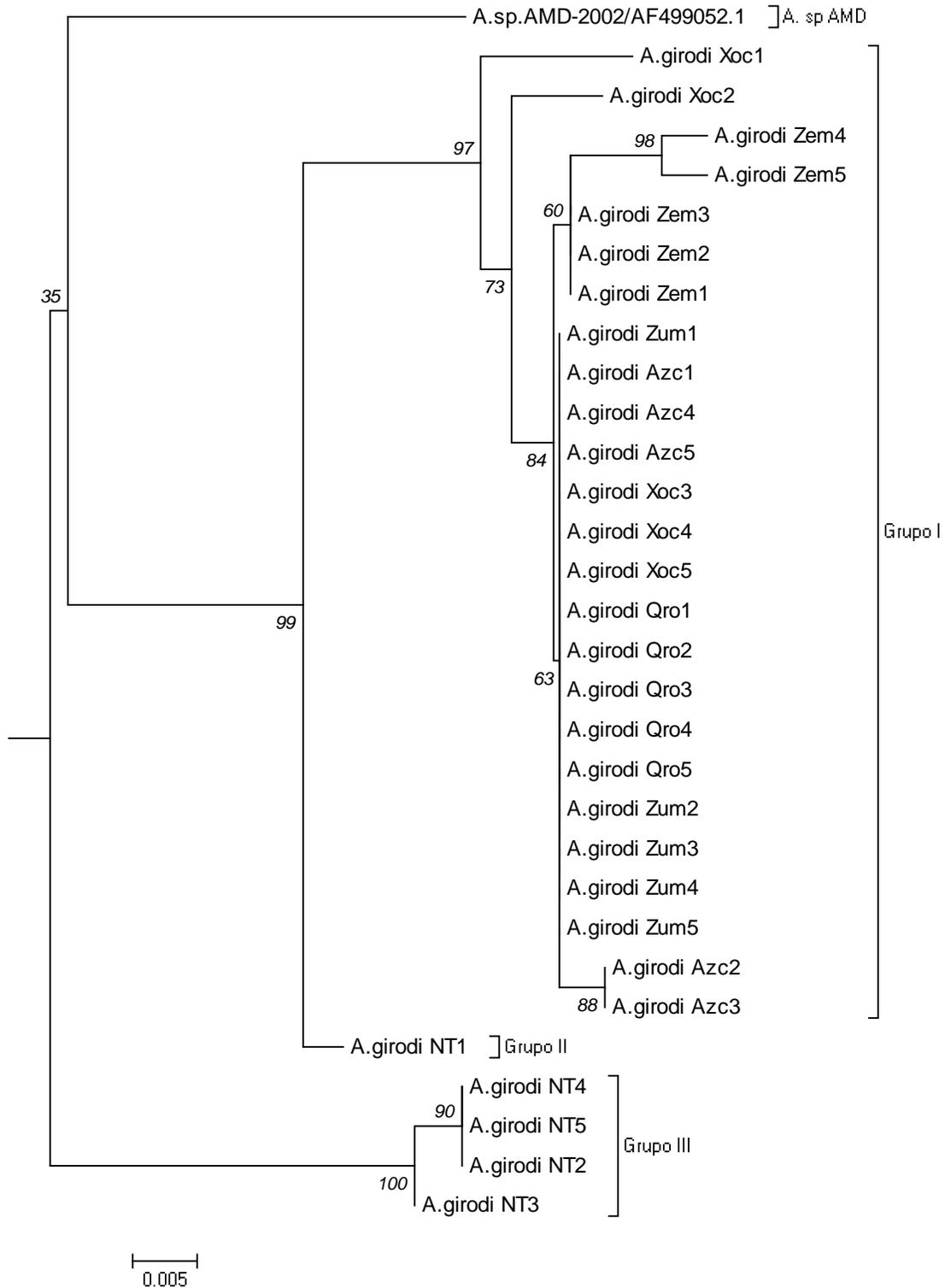


Fig 27. Detalle de la región correspondiente a la especie *A. girodi* del árbol NJ realizado con 55 secuencias de aspláncidos (25 de *A. brightwellii* y 30 de *A. girodi*) de 11 localidades, basado en distancias de Kimura 2 Parametros (K2P) Se emplearon como grupos externos secuencias de *GeneBank* de las especies: *A. sieboldii* (GeneBank JX216493.1 al JX216496.1), *A. silvestrii* (GeneBank JX216497.1 al JX216499.1) y *Asplanchnopus multiceps*.

Discusión

En el presente trabajo en una primera etapa se emplearon dos marcadores (COX 1 e ITS), sin embargo se observó que el empleo de ambos marcadores no modificaba los resultados de los análisis (Fig. 18). Si bien es recomendable emplear dos o más marcadores para este tipo de trabajos y sobre todo que estos sean de regiones diferentes (p. ej. nuclear y mitocondrial) ya que potencializa los resultados permitiendo hacer mejores inferencias sobre ellos (Gómez *et al.*, 2002), en este trabajo se observó que el marcador COX 1 tuvo la suficiente resolución por lo que se optó por emplearlo. Este comportamiento ha sido observado en otros trabajos, como los realizados por Xiang *et al.* (2006), donde la topología de los árboles obtenidos a partir de los marcadores moleculares ITS coincide con los generados por COX 1.

La divergencia entre géneros reportada en este trabajo (23%) se encuentra dentro del rango mencionado por otros autores para los rotíferos 22 y 29% de otros países (Gómez *et al.*, 2002; Derry *et al.*, 2003; Gilbert y Walsh, 2005) y es consistente con el observado con rotíferos colectados en México (García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013). La divergencia interpoblacional en *A. brightwellii* (hasta 8.3%) y *A. girodi* (hasta 6.7%), son considerados como valores elevados, debido a que la tasa evolutiva de COX 1 se ha calculado en torno a 1.4 a 2.3% por Ma (Knowlton y Weight 1998; Schubart *et al.*, 1998), y a que el 3% es el punto a partir del cual se pueden separar las especies para algunos autores (Herbert *et al.*, 2003). Los valores elevados de divergencia encontrados en los aspláncnidos, pueden estar relacionados con especies crípticas, ya que varios complejos de especies crípticas muestran valores de divergencia iguales o superiores a 5% (Avice, 1994; Moriyama y Powell, 1996; Avice y Walker, 1999). En el complejo de especies de rotíferos más estudiado, *B. plicatilis*, *B. ibericus* y *B. rotundiformis*, la divergencia es mayor de 12%, por lo que apoyados en esta y en otras evidencias (morfológicas y ecológicas) se han designado como especies diferentes (Ciros-Pérez *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002; Gómez, 2005). En otra especie de la familia Brachionidae (*B. calyciflorus*) se ha observado que clones provenientes de diferentes latitudes (Florida, Texas y Australia) no solamente presentan elevado porcentaje de divergencia (9-13%), también se ha comprobado que la divergencia se relaciona con aislamiento reproductivo (Gilbert y Walsh, 2005). Así mismo, la divergencia intergrupala promedio obtenida en este trabajo (8.2%) entre el grupo 1 (clones de Xochimilco) y

respecto a los otros grupos formados por las poblaciones de *A. brightwellii* o el (7.2%) de divergencia promedio entre el grupo 1 (clones 2, 3 y 4 de Nevado de Toluca) y los grupos restantes en *A. girodi* y nos hablan de una posible especiación críptica en estas especies. En otros rotíferos a los que se les ha asignado el estatus de complejos de especies crípticas como *Brachionus plicatilis*, *Keratella cochlearis* variedad *tecta* (sin espina) y variedad *robusta* (con espina) se observan valores de divergencia de 5.7, 2.6 y 4.4% respectivamente (Gómez *et al.*, 2000; Derry *et al.*, 2003) que son incluso menores a los obtenidos en este trabajo. Adicionalmente en un trabajo reciente García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013) dan cuenta de al menos 14 taxa, localizados en México, donde la especiación críptica parece ser un factor nodal para sus poblaciones, destacan que se observan divergencias mayores al 3% principalmente entre poblaciones de distintas localidades y en menor grado dentro del mismo cuerpo de agua.

Para tratar de dar una interpretación correcta de estos resultados sería interesante iniciar retomando las condiciones mencionadas por Kawecki y Ebert (2004) para que ocurra la adaptación local. En primer lugar el autor menciona que es necesario que exista una presión de selección divergente en los diferentes hábitats. Por lo que a este punto respecta, ambas especies (*A. brightwellii* y *A. girodi*) son consideradas como especies cosmopolitas por José de Paggi (2002), en México, ambas especies se registran frecuentemente (Sarma y Elías-Gutiérrez, 1997; Sarma y Elías-Gutiérrez, 2000; Serranía-Soto, 2006), lo que quedó de manifiesto en los resultados de este trabajo, lo que significa que estas especies tienen la capacidad de desarrollarse en ambientes diversos. Las poblaciones colectadas se localizaron en ambientes diversos como en el caso de *A. brightwellii* que se colectó en la presa Valerio Trujano una presa creada en 1970 y que se encuentra a una altitud de 800 msnm, que tiene una temperatura media de 26 °C y un 7.4 pH, el Lago de Zumpango que es un remanente del lago que ocupaba gran parte del Valle de México en épocas prehispánicas, y que tiene características muy peculiares, se localiza a 2200 msnm, tiene una temperatura media anual de 19 °C y un pH de 9.7, dentro de la misma cuenca se encuentra el lago de Xochimilco, que es también un remanente del lago prehispánico antes mencionado, y del cual aún prevalecen un conjunto de canales y lagos interconectados que abarcan un total de 190 Ha, este complejo tiene un temperatura promedio de 21.5 °C, un pH de 9 y sus aguas en la mayor parte de sus canales no están dominadas por cianoprocariontes. La mayor parte de

estos cuerpos de agua se localizan en la Faja Volcánica Transmexicana, que dada su intrincada fisiografía hace que existan barreras geográficas entre los lagos de más de 3000 m de altura al mismo tiempo que se presentan importantes variaciones climáticas entre los diferentes sistemas (Miller y Smith, 1986; Halffter, 1987). Por otro lado la FVT Los lagos localizados en la FVT han sido sometidos a una intensa actividad geológica que ha moldeado sus cuencas y ha determinado algunas de sus características (Miller y Smith, 1986), sin embargo un factor que tiene una gran importancia y que incide fuertemente en las comunidades que los habitan es el clima (Bradbury, 1989; Alcocer y Bernal-Brooks, 2010). La FVT es una zona de transición entre las regiones Neotropical y Neártica lo que la hace tener características climáticas muy peculiares (Marshall y Liebherr, 2000). De tal forma que los diferentes ambientes o factores abióticos a los que se exponen las poblaciones pueden ser importantes en su diversificación, ya que las diferencias en dichas condiciones son capaces de crear divergencia, mediante procesos de selección natural divergentes (Tobler *et al.*, 2008).

En segundo lugar Kawecki y Ebert (2004) mencionan que es necesaria la existencia de la interacción de un genotipo por hábitat, los resultados de este trabajo indican la existencia de 5 y 11 haplotipos en las poblaciones de *A. brightwellii* y *A. girodi* respectivamente lo que indica que existen diferentes combinaciones alélicas en los diferentes ambientes. Por otro lado los sistemas donde fueron colectados los aspláncnidos existieron al menos 35 km de distancia y en la mayoría de los casos entre los diferentes sistemas se presentaron barreras geográficas (montañas) de hasta 3,000 msnm. De tal forma que Xochimilco y Guerrero o Xochimilco y Tabasco están alejados geográficamente por cerca de 115 y 665 km respectivamente y con otras barreras físicas como montañas de más de 3000 msnm (Ferrari, 2000, 2012; De la Lanza y García-Calderón, 2002; Alcocer y Bernal-Brooks, 2010). Típicamente los rotíferos, son considerados como organismos con una buena dispersión (Bohonak y Jenkins, 2003), por lo que se esperaría que mientras más barreras físicas existan entre las poblaciones mayor será el aislamiento y el flujo genético disminuiría (De Meester *et al.*, 2002). Sin embargo esto no se cumple completamente en este trabajo. Las poblaciones de *A. brightwellii* tienen en promedio 8.2% de divergencia con respecto a la población de Xochimilco y si bien eso incluye casos en teoría lógicos (poblaciones distantes y con barreras físicas), también otros como Xochimilco y Zumpango que son

cuerpos de agua que se originaron en la misma época hace 700 Ka y que presentaban algún tipo de conexión natural y/o artificial hasta la conquista de México en (1521) donde a partir de esta fecha y hasta el siglo XVIII fueron paulatinamente drenados y por ende separados (Bradbury, 1971, 1989; González-Morán *et al.*, 1999; De la Lanza Espino, 2007). Sin embargo, los remanentes del lago de Zumpango y Xochimilco actualmente están separados por cerca de 55 km de distancia y por la Sierra de Guadalupe que tiene una altitud máxima de 2,900 msnm todas estas localidades en lo que se refiere a *A. brightwellii*. En el caso de *A. girodi* todas las poblaciones tuvieron valores elevados de divergencia (>6%) con respecto a la población del Nevado de Toluca, este último sistema es un lago cráter, localizado en un volcán que tiene cerca de 3,300 años sin actividad, a una altitud de 4,200 msnm (2000 m de diferencia con la población más cercana en términos de altitud) y que está a aproximadamente 50 km de Zempoala que es la población más cercana a él (Macias *et al.*, 1997; De la Lanza y García-Calderón, 2002; Armienta *et al.*, 2008). En algunas especies de rotíferos como por ejemplo en *B. plicatilis* se ha observado que existió una frecuente dispersión transcontinental a través de largas escalas de tiempo lo que generó distribuciones cosmopolitas, y después en escalas de tiempo microevolutivas ocurrieron procesos de divergencia alopátrica con lo que se creó un patrón de aislamiento por distancia (Suatoni *et al.*, 2006). Este proceso pudo haber ocurrido en los Aspláncnidos y ahora estamos observando el resultado de la divergencia alopátrica. Adicionalmente se sabe que es posible que en el zooplancton se presenten casos en los cuales la diferenciación genética de los organismos se presente en escalas geográficas pequeñas (Vanoverbeke y De Meester, 1997; De Meester *et al.*, 2002).

En tercer lugar y como consecuencia del segundo punto Kawecki y Ebert (2004) proponen que ante la existencia de un genotipo por ambiente este puede estar mejor adaptado y tener ventajas sobre los genotipos extranjeros. Es claro que a pesar de la buena y rápida dispersión que tienen los rotíferos (Bohonak y Jenkins, 2003), un huevo de resistencia que ha sido transportado no necesariamente será exitoso en la población, la hipótesis de la monopolización enunciada por De Meester *et al.* (2002) establece que los organismos locales tendrán ventaja sobre los extranjeros ya que los primeros tendrán una rápida adaptación al régimen selectivo local por sobre los organismos extranjeros por lo que se anulará la dispersión, existen otros factores como el acaparamiento de los recursos en el

sistema y el dominio numérico de los organismos nativos que contribuirán a que exista un bajo flujo de genes en el sistema, además de que de algún modo explica la elevada diferenciación genética reflejada en los marcadores moleculares (De Meester *et al.*, 2002; Campillo *et al.*, 2011). Al cumplirse estas tres condiciones y con los resultados moleculares obtenidos es muy probable que la divergencia que se observa entre algunas de las poblaciones de *Asplanchna brightwellii* y *A. girodi* signifique que se está ante dos complejos de especies.

Aunado a lo anterior debemos considerar que la variación fenotípica puede ser: inducida por el ambiente, lo que se conoce como plasticidad fenotípica (Pigliucci *et al.*, 2006), puede ser causada por factores genéticos intraespecíficos o puede estar encubriendo complejos de especies gemelas que están involucradas en la sucesión estacional (Serra *et al.*, 1997). Los rotíferos poseen características que facilitan la generación de especiación críptica, una de estas características es su sistema de reconocimiento durante el apareamiento el cual está basado en contacto y quimiorrecepción (Gilbert, 1963; Snell *et al.*, 1995), lo que trae como consecuencia que esté desacoplado de la divergencia morfológica y se promueva la especiación críptica con relativa frecuencia en el grupo (Knowlton, 1993; Serra *et al.*, 1997), lo cual puede estar relacionado con las variaciones observadas en *A. brightwellii* y *A. girodi*.

Conclusiones

Los análisis moleculares indican la existencia de un proceso de diversificación genética elevado (K2P >6%) dentro de las dos especies estudiadas, siendo más avanzado el que muestra *A. brightwellii* que el observado en *A. girodi*.

El marcador molecular COX 1 tuvo suficiente resolución para distinguir a nivel de especie en el género *Asplanchna* e incluso para separar las especies crípticas en *A. brightwellii* y *A. girodi*.

En *A. girodi* existe una relativa homogeneidad genética respecto al marcador molecular COX 1 sin embargo entre poblaciones de ambientes extremos el porcentaje de divergencia se incrementa.

Discusión general

La especiación críptica en los rotíferos es un tema que ha cobrado un especial interés en las últimas dos décadas (Serra *et al.*, 1997; Gilbert y Walsh 2005; Gómez, 2005; Walsh *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2012). La especiación críptica puede ser estudiada tomando en cuenta varios caracteres, en el caso de los rotíferos monogonontos se pueden considerar la morfología, la morfometría, la demografía, la ecología, la genética y el aislamiento reproductivo (mediante la reproducción sexual), de todos estos únicamente el último puede ser por sí sólo prueba de que existe un proceso de especiación sin embargo lo recomendable es siempre considerar varios caracteres antes de concluir sobre la existencia de divergencia dentro de un grupo.

Debido a lo anterior, en este trabajo se consideraron la morfometría, la morfología y los marcadores moleculares como los caracteres que nos permitan definir si existe la especiación críptica dentro del género *Asplanchna*. En primer lugar en el caso de *Asplanchna brightwellii* se pensaba era una especie con variaciones morfológicas producto de su plasticidad fenotípica, sin embargo la integración de los análisis reveló la existencia de un complejo de al menos 4 especies crípticas (Guerrero, Zumpango, Xochimilco y Morelos-Tabasco). El fenómeno de especiación críptica es común dentro de los rotíferos ya que ha sido descrito en un gran número de géneros, dentro de los que se encuentran *Brachionus* (Gómez *et al.*, 2000; Gómez, 2005), *Epiphanes* (Schröder y Walsh 2007), *Keratella* (Derry *et al.*, 2003) y *Lecane* (Walsh *et al.*, 2009). En el caso del complejo de especies de *A. brightwellii*, considerando exclusivamente el enfoque fenotípico, se pudo llegar a conclusiones semejantes. Sin embargo, los taxones son plenamente distinguibles a través de su asociación con los clados robustos producto de los análisis moleculares.

Se sabe que la talla de los organismos puede ser afectada por diversos factores como: la disponibilidad y calidad del alimento (Nandini y Rao, 1998; Hu y Geng, 2002; Geng y Hu, 2003), la temperatura (Carlin, 1943; Pejler, 1962), la depredación (Gilbert, 1967; Halbach, 1970; Pourriot, 1973), sin embargo en este trabajo los rotíferos se colocaron en las mismas condiciones (jardín común), por lo que ninguna de estas condiciones puede ser la causante de estas variaciones. Por el contrario en diversos trabajos dentro de los que destacan los realizados por Walsh y Zhang (1992), Wlsh (1995) y King *et al.* (1998) se ha observado

que existe una clara relación entre las variaciones genéticas y algunas variaciones morfológicas al grado de que se llegan a presentar barreras reproductivas entre los clones de un sistema. Por lo que en este caso se piensa que los cambios no obedecen a los factores ambientales y si a la existencia de diversificación críptica en el grupo.

En el caso de *A. girodi* la integración nos revela la existencia de una especie críptica (Nevado de Toluca) además de que se puede inferir que el proceso de diversificación en el grupo es menos avanzado debido a sus valores de divergencia (Gómez *et al.*, 2000; Gómez, 2005; Schröder y Walsh 2007; Xiang *et al.*, 2011). La especie críptica en *A. girodi* fue colectada a más de 4000 msnm en el cráter de un volcán inactivo lo que explica en cierta forma su aislamiento (Macias *et al.*, 1997; De la Lanza y García-Calderón, 2002; Armienta *et al.*, 2008). El resto de las poblaciones se colectaron en cuerpos de agua de la FVT, que producto de su intrincada fisiografía hace que existan barreras geográficas entre los lagos de más de 3000 m de altura al mismo tiempo que se presentan importantes variaciones climáticas entre los diferentes sistemas (Miller y Smith, 1986; Halffter, 1987), la poca variación morfológica y molecular en las poblaciones de *A. girodi* (Figs 13 y 19), no puede responderse adecuadamente con los datos obtenidos en este trabajo, sin embargo puede estar relacionado con la alimentación del organismo. La talla de los rotíferos es fuertemente influenciada por la disponibilidad de alimento (Wallace *et al.*, 2006). Este efecto ha sido descrito en varias especies como: *Euchlanis dilatata* (King, 1967), *Brachionus rubens* (Geng y Hu, 2003), *B. plicatilis* (Snell y Carrillo, 1984), *B. angularis* (Hu y Geng, 2002), *B. calyciflorus* (Kennari *et al.*, 2008) y *Plationus patulus* (Sarma y Rao, 1987), en las que se ha obtenido una relación directa, a mayor disponibilidad de alimento, mayor tamaño del organismo, lo cual incide en la demografía de los rotíferos ya que organismos de tallas pequeñas requieren de menos alimento para mantener su crecimiento poblacional en cero respecto de los rotíferos de tallas más grandes (Nandini *et al.*, 2007). *A. girodi* a diferencia de *A. brightwellii* consume presas de menor tamaño dentro de las que se encuentran fitoplancton, ciliados, dinoflagelados (*Ceratium* y *Peridinium*), euglenoides y rotíferos (*K. cochlearis*) además de que se considera menos voraz (Chang *et al.*, 2010). Por otro lado *A. girodi* es una de las especies que no se considera polimórfica en el género (José de Paggi, 2002), otras especies como *A. intermedia*, *A. sieboldii* y *A. silvestrii* con elevadas concentraciones de α -tocoferol en la dieta se desarrollan tres morfotipos (saquiforme,

cruciforme y campanulado) que tienen características particulares (Gilbert, 1976a; 1976b, 1976c, 1980, Gilbert *et al.*, 1979; Hamton, 1998). La amplia variedad de presas que puede consumir *A. girodi* y el hecho de no ser una especie polimórfica como otras en el género (p.ej. *A. brightwellii*, *A. sieboldii*) pueden estar relacionados con el hecho de que no exista una fuerte variación en la talla de las poblaciones ya que no hay una presión de selección tan marcada en este rasgo.

Los complejos de especies en estos organismos se han moldeado a lo largo del tiempo de acuerdo con Suatoni *et al.* (2006) se pudo presentar una frecuente dispersión transcontinental a través de largas escalas de tiempo lo que generó distribuciones cosmopolitas, y después en escalas de tiempo microevolutivas ocurrieron procesos de divergencia alopátrica con lo que se creó un patrón de aislamiento por distancia, si bien este patrón fue descrito para otra especie de rotífero (*B. plicatilis*) también pudo ocurrir en los aspláncnidos. Por otro lado, es probable que no necesariamente se requiera de la separación de las poblaciones por largas distancias para que ocurra la diferenciación genética ya que esta última puede ocurrir en escalas geográficas pequeñas (Vanoverbeke y De Meester, 1997; De Meester *et al.*, 2002). Esta coyuntura ha sido favorecida por algunas de las características de los rotíferos como su sistema de reconocimiento de pareja, que al estar basado en receptores químicos y en el contacto evolucionan desacoplados de la morfología (Gilbert, 1963; Snell *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 1997; Campillo *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista morfológico se podría haber llegado a conclusiones semejantes. Sin embargo, sin un método independiente que comprobara la hipótesis morfológica, en este caso aportado por los análisis moleculares, los taxones habrían permanecido ocultos, sobre todo en el caso de *A. girodi* donde las diferencias con todos los marcadores son más sutiles. Ante este escenario donde los aspláncnidos muestran una gran variabilidad morfométrica, morfológica, así como valores elevados de divergencia (> 8%) se hace necesario coleccionar estos rotíferos en más sistemas, así como realizar pruebas considerando descriptores demográficos e incluso de entrecruzamiento que nos den la prueba definitiva del nivel de divergencia que se presenta en el grupo.

Conclusiones generales

Las tres aproximaciones empleadas para la delimitación específica de los aspláncnidos (*A. brightwellii* y *A. girodi*) son compatibles en sus resultados y mutuamente imprescindibles para alcanzar una resolución sintética y robusta. De esta forma se pone de manifiesto la idoneidad de la taxonomía integrativa como marco metodológico para abordar el estudio de la diversidad de rotíferos.

Las especies *A. brightwellii* y *A. girodi* están integradas por especies crípticas por lo que constituyen en realidad complejos de especies.

El estudio de la distribución y diversidad de rotíferos requieren de aproximaciones sintéticas que profundicen y aclaren las relaciones entre ellos.

Literatura citada

Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the „revolution“. *Ital. J. Zool.* 71: 5-16.

Alcántara-Rodríguez, JA, Ciro-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Serranía-Soto C, y Piedra-Ibarra E. 2012. Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshwater Biology.* 57: 728-740.

Alcocer J, Bernal-Brooks FW. 2010. Limnology in Mexico. *Hydrobiologia.* 644: 15-68.

Aloia RC, Moretti RL. 1973. Mating behavior and ultrastructural aspects of copulation in the rotifer *Asplanchna brightwelli*. *Transactions of American Microscopy Society.* 92(3): 371-381.

Altındağ A, Segers H, Kaya M. 2009. Some Turkish Rotifer Species Studied Using Light and Scanning Electron Microscopy. *Turkish Journal of Zoology.* 33: 73-81.

Armienta MA, Vilaclara G, De la Cruz-Reyna S, Ramos S, Cenicerós N, Cruz O, Aguayo A, Arcega-Cabrera F. 2008. Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research.* 178: 249-258.

Avise JC. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution.* New York: Chapman y Hall.

Avise JC, Walker D. 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 96: 992-995.

Ayala FJ. 1975. Genetic differentiation during the speciation process. *Evolutionary Biology.* 8: 1-78.

Beauchamp P. 1951. Sur La variabilité spécifique dans le genre *Asplanchna* (Rotiferes). *Bulletin biologique de la France et de la Belgique.* 85: 137-175.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 22(3): 148-155.

Birky CWJr. 1964. Studies on the physiology and genetics of the rotifer, *Asplanchna*. In. *Methods and physiology*. *Journal of Experimental Zoology*. 155: 273-292.

Birky CWJr. 1966. Nuclear Number in the Rotifer *Asplanchna* Intracloonal Variation and Environmental Control. *Science*. 151(3710): 585-587.

Birky CWJr. 1967. Studies on the physiology and genetics of the rotifer, *Asplanchna*. III. Results of outcrossing, selfing, and selection. *Journal of Experimental Zoology*. 164: 105-116.

Birky CWJr. 1968. The Developmental Genetics of Polymorphism in the Rotifer *Asplanchna* I. Dietary vitamin e control of mitosis and morphogenesis in embryos. *Journal of Experimental Zoology*. 169: 205-210.

Birky CWJr. 1969. The Developmental Genetics of Polymorphism in the Rotifer *Asplanchna*. A method for quantitative analysis of changes in morphogenesis induced by vitamin E, and the short-term inheritance of the effects of vitamin E. *Journal of Experimental Zoology*. 170: 157-168.

Birky CWJr. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*. 35:125-148.

Birky CWJr. 2007. Workshop on barcoded DNA: application to rotifer phylogeny, evolution, and systematics. *Hydrobiologia*. 593 (1): 175-183.

Birky CWJr, Power JA. 1969. The Developmental Genetics of Polymorphism in rotifer *Asplanchna* I. A method for quantitative analysis of changes in morphogenesis induced by vitamin E, and the short-term inheritance of the effects of vitamin E. *Journal of Experimental Zoology*. 170: 157-168.

Birky CWJr, Gilbert JJ. 1972. Vitamin E as an extrinsic and intrinsic signal controlling development in the rotifer *Asplanchna*: uptake, transmission and localization of [³H]α-tocopherol. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 27(1): 103-120.

Birky CWJr, Fuerst P, Maruyama T. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift-equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*. 121: 613-627.

Birky CWJr, Wolf JC, Maughan H, Herbertson L, Henry E. 2005. Speciation and selection without sex. *Hydrobiologia*. 546: 29-45.

Black RW. 1980. The genetic component of cyclomorphosis in *Bosmina*. In *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*, Kerfoot WC (Ed.), University Press of New England, Hanover, New Hampshire, USA: 456-469.

Black RW, Slobodkin L. 1987. What is cyclomorphosis?. *Freshwater Biology*. 18: 373-378.

Blaxter ML. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*. 359: 669-679.

Bogoslavsky AS. 1958. New data on the reproduction of heterogonous rotifers. Observations on the reproduction of *Sinantherina socialis* (Lin.). *Zool. Zh.* 37: 1616-1623.

Bogoslavsky AS. 1960. Observations on the reproduction of *Conochiloides coenobasis* Skorikov and the statement of a physiological category of females new to heterogonous Rotifera. *Zool. Zh.* 39: 670-677.

Bogoslavsky AS. 1963. Materials to the study of the resting eggs of rotifers. Communication I. *Byull. Mosk. Obshch. Ispyt. Prir.* 68: 50-67.

Bogoslavsky AS. 1967. Materials to the study of the resting eggs of rotifers. Communication 2. *Byull. Mosk. Obshch. Ispyt. Prir.* 72: 46-67.

Bogoslavsky AS. 1969. Materials to the study of the resting eggs of rotifers. Communication 3. *Byull. Mosk. Obshch. Ispyt. Prir.* 74: 60-79.

Bohonak AJ, Jenkins DG. 2003. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecology Letters*. 6: 783-796.

Bookstein FL. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press.

Bradbury JP. 1971. Paleolimnology of Lake Texcoco, Mexico. Evidence from Diatoms. *Limnology and Oceanography*. 16(2): 180-200.

Bradbury JP. 1989. Late Quaternary lacustrine paleoenvironments in the Cuenca de México. *Quat. Sci. Rev.* 8: 75-100.

Calder WA III. 1984. *Size, function and life history*. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts.

Campillo S, García-Roger EM, Carmona MJ, Serra M. 2011. Local adaptation in rotifer populations. *Evol Ecol*. 25: 933-947.

Carlin B. 1943. Die Planktonrotatorien des Motalaström: zur Taxonomie und Ökologie der Planktonrotatorien. *Meddelanden fran Lunds Universtets Limnologiska Institution*. 5: 1-255.

Castonaguay E, Angers B. 2012. The Key Role of Epigenetics in the Persistence of Asexual Lineages. *Genetics Research International*. 2012: 1-9.

Chang KH, Doi H, Nishibe Y, Nakano SI. 2010. Feeding habits of omnivorous *Asplanchna*: comparison of diet composition among *Asplanchna herricki*, *A. priodonta* and *A. girodi* in pond ecosystems. *Journal of Limnology*. 69(2): 209-216.

Ciros-Pérez J, Gómez A, Serra M. 2001. On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *Journal of Plankton Research*. 23: 1311-1328.

Clément P. 1985. The relationships of rotifers. In *The origins and relationships of lower invertebrates*. Conway Morris S, George JD, Platt HM (Eds.). Systematics Association Volume 28. Clarendon Press, Oxford, UK: 224-247.

- Conde-Porcuna JM, Morales-Baquero R, Cruz-Pizarro L. 1993. Effectiveness of the caudal spine as a defense mechanism in *Keratella cochlearis*. *Hydrobiologia*. 255/256: 283-287.
- Daday E. 1891. Revision der *Asplanchna* Arten und die Ungarlandischen Representanten. *Math. Naturw. Ber. aus Ungarn*. 9: 69-89.
- De la Lanza Espino G. (Ed.). 2007. *Las Aguas Interiores de México: Conceptos y Casos*. AGT Editor, México, DF.
- De la Lanza Espino G, García-Calderón JL (Eds.). 2002. *Lagos y Presas de México*. AGT Editor, México, DF.
- De Meester L. 1996. Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: Patterns and processes. *Écoscience*. 3: 385-399.
- De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K. 2002. The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecol-Int J Ecol*. 23: 121-135.
- Derry AM, Hebert PDN, Prepas EE. 2003. Evolution of rotifers in saline and subsaline lakes: A molecular phylogenetic approach. *Limnol. Oceanogr*. 48: 675-685.
- De Smet WH. 1998. Preparation of rotifer trophi for light and scanning electron microscopy. *Hydrobiologia*. 387/ 388: 117-121.
- Dumont HJ. 1977. Biotic factors in the populations dynamics of rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih*. 8: 98-122.
- Dumont HJ. 1983. Biogeography of rotifers. *Hydrobiologia*. 104: 19-30.
- Elías-Gutiérrez M, Suárez-Morales E, Sarma SSS. 2001. Diversity of freshwater zooplankton in the neotropics: the case of Mexico. *Verh. Internat. Verein. Limnol*. 27: 4027-4031.
- Estevez MS, Malanga G, Puntarulo S. 2001. Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Plant Science*. 161: 9-17.

Ferrari L. 2000. Avances en el conocimiento de la Faja Volcánica Transmexicana durante la última década. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 53: 84-92.

Ferrari L, Orozco-Esquivel T, Manea V, Manea M. 2012. The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics*. 522-523: 122-149.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular and Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294-297.

Fontaneto D, Melone G, Wallace RL. 2003. Morphology of *Floscularia ringens* (Rotifera Monogononta) from egg to adult. *Invertebr Biol*. 122: 231-240.

Fontaneto D, Melone G, Cardini A. 2004. Shape diversity in the trophi of different species of Rotaria (Rotifera, Bdelloidea): a geometric morphometric study. *Italian Journal of Zoology*. 71: 63–72.

Fontaneto D, Melone G. 2005. Do rotifer jaws grow after hatching?. *Hydrobiologia*. 546: 213-221.

Fontaneto D, Melone G. 2006. Postembryonic Development of Hard Jaws (Trophi) in a Species Belonging to the *Brachionus plicatilis* Complex (Rotifera, Monogononta): A Morphometric Analysis. *Microscopy Research and Technique*. 69: 296-301.

Fontaneto D, Barraclough TG, Chen K, Ricci C, Herniou EA. 2008. Molecular evidence for broad-scale distributions in bdelloid rotifers: everything is not everywhere but most things are very widespread. *Mol. Ecol*. 17: 3136-3146.

Fontaneto D, Giordani I, Melone G, Serra M. 2007a. Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*. 583: 297–307.

Fontaneto D, Herniou EA, Boschetti C, Caprioli M, Melone G, Claudia Ricci, Barraclough TG. 2007b Independently Evolving Species in Asexual Bdelloid Rotifers. *PLoS Biol* 5(4): e87.

- Fryer MJ. 1992. The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell y Environment*. 15: 381-392.
- Fu Y, Hirayama K, Natsukari Y. 1991. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 151: 29-41.
- Fukusho K, Okauchi M. 1982. Strain and size of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. being cultured in Southeast Asian countries. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*. 3: 107-109.
- Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst GDD. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*. 18: 4541-4550.
- García-Morales AE, Elías-Gutiérrez M. 2013. DNA barcoding of freshwater Rotifera in Mexico: Evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecology Resources*. 1-11.
- Ge YL, Xi YL, Ma J, Xu DD. 2012. rDNA ITS sequences among morphotypes of *Keratella cochlearis*, *Keratella quadrata* and *Brachionus forficula* (Rotifera). *Genetics and Molecular Research*. 11(1): 765-774.
- Geng H, Xi Y, Hu H. 2003. Effects of food component and concentration on population growth, body size, and egg size of freshwater rotifer, *Bracionus rubens*. *Ying Uong Sheng Tai Xue Bao*. 14(5): 753-756.
- Gilbert JJ. 1963. Contact chemoreception, mating behaviour, and sexual isolation in the rotifer genus *Brachionus*. *Journal of Experimental Zoology*. 40: 625-641.
- Gilbert JJ. 1966. Rotifer Ecology and Embryological Induction. *Science*. 151(3715): 1234-1237.
- Gilbert JJ. 1967. *Asplanchna* and posterolateral spine induction in *Brachionus calyciflorus*. *Archiv für Hydrobiologie*. 64: 1-62.
- Gilbert JJ. 1968. Dietary control of sexuality in the rotifer *Asplanchna brightwelli* Gosse. *Physiological Zoology*. 41: 14-43.

Gilbert JJ. 1971a. Some notes on the control of sexuality in the rotifer *Asplanchna sieboldi*. Limnology and Oceanography. 16: 309-319.

Gilbert JJ. 1971b. Sensitivity and Specificity of the *Asplanchna* Response to Dietary α -Tocopherol. J. Nutrition. 1: 113-126.

Gilbert JJ. 1972. Alpha Tocopherol in Males of the Rotifer *Asplanchna sieboldi*: Its Metabolism and Its Distribution in the Testis and Rudimentary Gut. J. Exp. Zool. 181: 117-128.

Gilbert JJ. 1973. Induction and Ecological Significance of Gigantism in the Rotifer *Asplanchna sieboldii*. Science. 181(4094): 63-66.

Gilbert JJ. 1974. Dormancy in rotifers. Transactions of the American Microscopical Society. 93(4): 490-513.

Gilbert JJ. 1976a. Polymorphism in the Rotifer *Asplanchna Sieboldi*: Biomass, Growth, and Reproductive Rate of the Saccate and Campanulate Morphotypes. Ecology. 57(3): 542-551.

Gilbert JJ. 1976b. Selective Cannibalism in the Rotifer *Asplanchna Sieboldi*: Contact Recognition of Morphotype and Clone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 73(9): 3233-3237.

Gilbert JJ. 1976c. Sex-Specific Cannibalism in the Rotifer *Asplanchna sieboldi*. Science. 194(4266): 730-732.

Gilbert JJ. 1977. Defenses of Males Against Cannibalism in the Rotifer *Asplanchna*: Size, Shape, and Failure to Elicit Tactile Feeding Response. Ecology. 58(5): 1128-1135.

Gilbert JJ. 1980. Developmental Polymorphism in the Rotifer *Asplanchna sieboldi*: Three distinct female morphotypes, controlled by the level of dietary vitamin E, or tocopherol, allow this small aquatic organism to adapt rapidly to environmental changes. American Scientist. 68(6): 636-646.

- Gilbert JJ. 1988. Suppression of rotifer populations by *Daphnia*: a review of the evidence, the mechanisms, and the effects on zooplankton community structure. *Limnology and Oceanography*. 33: 1286-1303.
- Gilbert JJ. 1995. Structure, development and induction of a new diapause stage in rotifers. *Freshw Biol*. 34: 263-270.
- Gilbert JJ. 1999. Kairomone-induced morphological defenses in rotifers. En Tollrian R, Harvell CD. (Eds.) *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, Princeton: 127-141.
- Gilbert JJ. 2011. Temperature, kairomones, and phenotypic plasticity in the rotifer *Keratella tropica* (Apstein), 1907. *Hydrobiologia*. 678: 179-190.
- Gilbert JJ, Waage JK. 1967. *Asplanchna*, *Asplanchna*-Substance, and Posterolateral Spine Length Variation of the Rotifer *Brachionus calyciflorus* in a Natural Environment. *Ecology*. 48(6): 1027-1031.
- Gilbert JJ, Birky CWJr. 1971. Sensitivity and Specificity of the *Asplanchna* Response to Dietary α -Tocopherol. *Journal of the Nutrition*. 101: 113-126.
- Gilbert JJ, Wurdak ES. 1978. Species-Specific Morphology of Resting Eggs in the Rotifer *Asplanchna*. *Transactions of the American Microscopical Society*. 97(3): 330-339.
- Gilbert JJ, Birky CWJr, Wurdak ES. 1979. Taxonomic relationships of *Asplanchna brightwelli*, *A. intermedia* and *A. sieboldi*. *Arch. Hydrobiol*. 87(2): 224-242.
- Gilbert JJ, Walsh EJ. 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: Mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. *Hydrobiologia*. 546: 257-265.
- Gissi C, Iannelli F, Pesole G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*. 101: 301-320.
- Gómez A. 2005. Molecular ecology of rotifers: From population differentiation to speciation. *Hydrobiologia*. 546: 83-99.

Gomez A, Carvalho GR, Lunt DH. 2000. Phylogeography and Regional Endemism of a Passively Dispersing Zooplankter: Mitochondrial DNA Variation in Rotifer Resting Egg Banks. *Proceedings: Biological Sciences*. 267(1458): 2189-2197.

Gómez A, Serra M, Carvalho GR, Lunt DH. 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*. 56: 1431-1444.

González-Morán, Rodríguez R, Cortes SA. 1999. The Basin of Mexico and its metropolitan area: water abstraction and related environmental problems. *Journal of South American Earth Sciences*. 12: 607-613.

Gosse PH. 1850. Description of *Asplanchna priodonta* an animal of the class Rotifera. *Annals and Magazine of Natural History London*. 2: 18-24.

Gosse PH. 1887. Twenty-four new species of rotifer. *Journal of the Royal Microscopical Society*. London: 1-7.

Green J. 1987. *Keratella cochlearis* (Gosse) in Africa. *Hydrobiologia*. 147(1): 3-8.

Hagiwara A, Kotani T, Snell TW, Assava-Aree M, Hirayama K. 1995. Morphology, reproduction, genetics, and mating behavior of small, tropical marine *Brachionus* strains (Rotifera). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194: 25-37.

Halbach U. 1970. Die Ursachen der Temporalvariation von *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotatoria). *Oecologia*. 4: 262-318.

Halffter G. 1987. Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. *Annual Review of Entomology*. 32: 95-114.

Hampton SE. 1998. Morphotype-specific predation in the trimorphic rotifer *Asplanchna silvestrii*. *Hydrobiologia*. 387/388: 437-444.

Hampton SE, Starkweather PL. 1998. Differences in predation among morphotypes of the rotifer *Asplanchna silvestrii*. *Freshwater Biology*. 40: 595-605.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 270: 313-321.

Hino A. 1981. Taxonomical position, variation, and life history of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Saibai-gyogyo-kaihatsu*. 10: 109-123.

Hu H, Xi Y, Geng H. 2002. Effects of food concentration on population growth, body size, and egg size of freshwater rotifer *Brachionus angularis*. *Ying Uong Sheng Tai Xue Bao*. 13(7): 875-878.

Ito S, Sakamoto H, Hori M, Hirayama K. 1981. Morphological characteristics and suitable temperature for the growth of several strains of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 51: 9-16.

Jenkins DG, Underwood MO. 1998. Zooplankton may not disperse readily in wind, rain, or waterfowl. *Hydrobiologia*. 387/388: 15-21.

José de Paggi S. 2002. Rotifera, Vol. 6. Family Asplanchnidae. En Nogrady, T. y H. Segers (Eds). *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. Backhuys Publishers, The Hague. 1-27.

Kawecki T, Ebert D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol Lett.* 7: 1225-1241.

Kennari AA, Ahmadifard N, Kapourchali MF, Seyfabadi J. 2008. Effect of two microalgae concentrations on body size and egg size of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Biologia*. 63/3: 407-411.

Kennet GB, Gilbert JJ. 1982. Seasonal Patterns of Feeding by Natural Populations of *Keratella*, *Polyarthra*, and *Bosmina*: Clearance Rates, Selectivities, and Contributions to Community Grazing. *Limnology and Oceanography*. 27(5): 918-934.

King CE. 1967. Food, age, and the dynamics of a laboratory population of rotifers. *Ecology*. 48: 111-128.

King, C. E., 1977. Genetics of reproduction, variation and adaptation in rotifers. *Archiv für Hydrobiol. Beih.* 8: 187-201.

King CE, Snell TW. 1977. Genetic basis of amphoteric reproduction in rotifers. *Heredity* 39: 361-364.

King CE, Snell TW. 1980. Density-dependent sexual reproduction in natural populations of the rotifer *Asplanchna girodi*. *Hydrobiologia* 73: 149-152.

King CE, Serra M. 1998. Seasonal variation as a determinant of population structure in rotifers reproducing by cyclical parthenogenesis. *Hydrobiologia*. 387/388: 361-372.

King CE. 1980. The genetic structure of zooplankton populations. En Kerfoot WC (Ed.) *The Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*, University Press of New England, Hanover, New Hampshire, USA: 315-328.

King CE. 1993. Random genetic drift during ameiotic parthenogenesis. *Hydrobiologia*. 255/256: 205-212.

Kleinow W. 1993. Biochemical studies on *Brachionus plicatilis*: hydrolytic enzymes, integument proteins and composition of trophic. *Hydrobiologia*. 255/256: 1-12.

Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. **11**: 353-357.

Knowlton N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 24: 189-216.

Knowlton N, Weigt LA. 1998 New dates and new rates for divergence across the isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 265: 2257-2263.

Koehler JK. 1965. An electron microscopic study of the dimorphic spermatozoa of *Asplanchna* (Rotifera). I Adult testis. *Z. Zellforsch.* 65: 57-76.

Koste W. 1978. Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Ein Bestimmungswerk begründet von Max Voigt. Bornträger, Stuttgart. Vol. 1, Textband 673 p. Vol. 2, Tafelband.

Koste W, Shiel RJ. 1987. Rotifera from Australian inland waters. II. Epiphanidae and Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Invertebrate Taxonomy*. 7: 949-1021.

Koste W, Tobias W. 1988. Rotatorien der Sélingúe-Talsperre in Mali, Westafrika. *Senckenbergiana Biol.* 69: 441-466.

Kutikova LA. 1970. Rotifers of the fauna of the USSR. *Fauna USSR*, 104. Akademia Nauk, Leningrad. 744.

Lampert W, Sommer U. 2007. *Limnoecology: The ecology of lakes and streams*. Oxford University Press. 2 Ed. New York.

Levin SA. 2009. *The Princeton Guide to Ecology*. Princeton University Press UK.

Li HB, Xi YL, Cheng XF and Xiang XL. 2008. Sympatric speciation in rotifers: evidence from molecular phylogenetic relationships and reproductive isolation among *Brachionus calyciforus* clones. *Acta Zoolog. Sin.* 54: 256-264.

Lindstrom K, Pejler B. 1975. Experimental studies on the seasonal variation of the rotifer *Keratella cochlearis* (Gosse). *Hydrobiologia.* 46: 191-197.

Lynch M, Gabriel W. 1983. Phenotypic evolution and parthenogenesis. *Am. Nat.* 122: 745-764.

Macías JL, García-Palomo A, Arce JL, Siebe, C, Espíndola JM, Komorowski JC, Scott KM. 1997. Late Pleistocene–Holocene cataclysmic eruptions at Nevado de Toluca and Jocotitlán volcanoes, Central Mexico. En: Link KP, Kowallis BJ. (Eds.) *Proterozoic to Recent Stratigraphy, Tectonics, and Volcanology, Utah, Nevada, Southern Idaho and Central Mexico*, vol. 42. Brigham Young University. *Geology Studies*. part I.

Marshall CJ, Liebherr JK. 2000. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of Biogeography.* 27: 203-216.

Maynard Smith J. 1978. *The evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Mayr E. 1942. *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press. New York.

Messing J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Method Enzymol.* 101: 29-71.

Miller RR, Smith ML. 1986. Origin and geography of the fishes of central Mexico. The zoogeography of North American freshwater fishes. Ed. by Hocutt CH, Wiley OE, John Wiley y Sons, Inc., New York. 487-518.

Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.* 20: 685-692.

Moriyama EN, Powell JR. 1996. Intraspecific nuclear DNA variation in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 13: 261-277.

Mrazek A. 1897. Zur Embryonalentwicklung der Gattung *Asplanchna*. *Sitzungsber. Königl. Böhr. Ges. Wiss., Mathematisch-Naturwiss Cl.* 58: 1-11.

Nandini S, Rao TR. 1998. Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquatic Ecology* 31: 283-298.

Nandini S, Sarma SSS, Amador-López RJ, Bolaños-Muñoz S. 2007. Population growth and body size in five rotifer species in response to variable food concentration. *Journal of Freshwater. Ecology.* 22: 1-10.

Nogrady TLR, Wallace LR, Snell WT. 1993. Rotifera biology, ecology and systematics. SPB. Academic Publishing.

Nogrady T, Segers H. 2002. Guides to the identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World Rotifera. Vol. 6. Asplanchnidae, Gastropodidae, Lindiidae, Microcodidae, Syncheaetidae, Trochosphaeridae. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

Pavón-Meza EL, Sarma SSS, Nandini S. 2007. Combined effects of temperature, food (*Chlorella vulgaris*) concentration and predation (*Asplanchna girodi*) on the morphology of *Brachionus havanaensis* (Rotifera). *Hydrobiologia.* 593: 95-101.

Pejler B. 1962. On the variation of the rotifer *Keratella cochlearis* (Gosse). *Zoologiska Bidrag fran Uppsala* 35: 1-17.

- Pejler B. 1977. On the global distribution of the family Brachionidae (Rotatoria). Arch. Hydrobiol. 53: 255-306.
- Pejler B. 1980. Variation in the genus Keratella. Hydrobiologia. 73: 207-213.
- Pigliucci M. 2001. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. J. Exp. Biol. 209: 2362-2367.
- Pociecha A, Wilk-Woźniak E. 2008. Comments on the diet of *Asplanchna priodonta* (Gosse, 1850) in the Dobczycki dam reservoir on the basis of field sample observations. Oceanol. Hydrobiol. St. 37: 63-69.
- Pourriot R. 1973. Rapports entre la température, la taille des adultes, la longueur des oeufs et le taux de développement embryonnaire chez *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifère). Annales d'Hydrobiologie 4: 103-115.
- Pourriot R. 1977. Food and feeding habits of rotifera. Arch. Hydrobio. Beih. 8: 243-260.
- Pourriot R, Snell T. 1983. Resting eggs in rotifers. Hydrobiologia. 104: 213-224.
- Pourriot R, Benest D, Rougier C, Clement P. 1984. Caractères taxinomiques et espezificité dans le genre *Asplanchna* (Rotifères). Hydrobiologia 112: 41-44.
- Price TD, Qvarnström A, Irwin DE. 2003. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. Proc. R. Soc. Lond. B. 270: 1433-1440.
- Rico-Martinez R. and Snell TW. 1997. Binding and blocking of mating in *Brachionus plicatilis* (Muller) and *Brachionus rotundiformis* (Tschugunoff) (Rotifera) females by an antibody against the mate recognition pheromone. Hydrobiologia 358:71-76.
- Rico-Martinez R, Dingmann B, Snell TW. 1998. Mating behavior of eight rotifer species. Hydrobiologia. 356: 165-173.

Rohlf FJ. 2002. Geometric morphometrics and phylogeny. In Morphology, shape and phylogeny. (MacLeod, N., and P. L. Forey, eds.). Pp. 175-193. Systematics Association Special Volume Series 64. Taylor and Francis, London.

Rohlf FJ. 2005. Trends in Ecology and Evolution. 20: 13-14.

Rousselet CF. 1909. On the geographical distribution of the Rotifera. J. Quekett Microscop. Cl. Ser. 2. 10: 465-470.

Ruttner-Kolisko A. 1972. Rotatoria. Die Binnengewasser, 26: 99-233.

Ruttner-Kolisko A. 1974. Plankton Rotifers Biology and taxonomy. Die Binnengewasser, XXVI/1 supp.

Ruttner-Kolisko A. 1989. Problems in taxonomy of rotifers, exemplified by the *Filinia longiseta-terminalis* complex. Hydrobiologia. 186/187: 291-298.

Salt GW. 1989. Comparisons of the diets and reproductive performances of two sympatric rotifers, *Asplanchna girodi* and *Asplanchna priodonta*. Freshwat. Biol. 22: 417-430.

Salt GW, Sabbadini GF, Commins ML. 1978. Trophi morphology relative to food habits in six species of rotifers (Asplanchnidae). Transactions of the American Microscopical Society, 97: 469-485.

Sarma SSS. 1993. Feeding responses of *Asplanchna brightwelli* (Rotifera): laboratory and field studies. Hydrobiologia. 255/256: 275-282.

Sarma SSS. 1999. Checklist of rotifers (Rotifera) from Mexico. Environment y Ecology. 17 (4): 978-983.

Sarma SSS y Rao TR .1987. Effect of food level on body size and egg size in a growing population of the rotifer *Brachionus patulus* Müller. Arch. Hydrobiol. 111: 245-253.

Sarma SSS y Dumont HJ 1993 Morphometric relations between body size and trophi size in *Brachionus* (Rotifera). Biol. Jb. Dodonaea. 61: 161-167.

Sarma SSS y Elías-Gutiérrez M 1997 Taxonomic studies of freshwater rotifers (Rotifera) from Mexico. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 44(3): 341-357.

Sarma SSS, Nandini S y Stevenson RAA. 1998. Nutritional quality of prey (*Brachionus calyciflorus*) affects the population growth of predatory rotifers (*Asplanchna sieboldi*) (Rotifera). *Hidrobiologica* 8: 73-80.

Sarma SSS y Elías-Gutiérrez M. 2000. Rotifers from Mexico: new records in high altitude ponds. *The Southwest. Nat.* 45(3): 366-373.

Sarma SSS, Serranía-Soto C, Nandini S. 2009. Rotíferos. En: Ceballos G, List R, Garduño G, López-Cano R, Muñozcano-Quintanar MJ, Collado E, San-Román JE. (Eds.) *La Diversidad Biológica del Estado de México. Estudio de Estado. Biblioteca Mexiquense del Bicentenario. Colección Mayor, Gobierno del Estado de México. Apéndice VII.*

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1-6.

Schröder T, Walsh EJ. 2007. Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species. *Hydrobiologia* 593: 129-140.

Schröder T, Walsh E. 2010. Genetic differentiation, behavioural reproductive isolation and mixis cues in three sibling species of Monogonont rotifers. *Freshwater Biology.* 55: 2570-2584.

Schubart CD, Diesel R, Hedges SB. 1998. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature.* 393: 363-365.

Segers H. 1992. Internacional training course zooplankton: a tool in a lake management. Introduction to the practice of identifying Rotifera. 3A Universiteit Gent. Belgium.

Segers H. 1996. The biogeography of littoral Lecane Rotifera. *Hydrobiologia.* 323: 169-197.

- Segers H. 2003. A biogeographical analysis of rotifers of the genus *Trichocerca* Lamarck. 1801 (Trichocercidae, Monogononta, Rotifera), with notes on taxonomy. *Hydrobiologia*: 500: 103-114.
- Segers H. 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*. 1564: 1-104.
- Segers H. 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*. 595: 49-59.
- Segers H, De Smet WH. 2008. Diversity and endemism in Rotifera: a review, and *Keratella bory* de St Vincent. *Biodivers Conserv*. 17: 303-316.
- Serra M, Miracle MR. 1987. Biometric variation in three strains of *Brachionus plicatilis* as a direct response to abiotic variables. *Hydrobiologia*. 147: 83-89.
- Serra M, Galiana A, Gómez A. 1997. Speciation in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*. 358: 63-70.
- Serra M, Gómez A, Carmona MJ. 1998. Ecological genetics of *Brachionus* sympatric sibling species. *Hydrobiologia*. 388: 373-384.
- Serranía Soto C. 2006. Diversidad de rotíferos monogonontos de la parte central de México. Tesis de Maestría, UNAM.
- Shield RJ, W. Koste. 1993. Rotifera from Australian inland waters . IX. Gastropodidae, Synchaetidae, Asplanchnidae (Rotifera: Monogononta). *Transactions of The Royal Society of South Australia*. 117: 11-139.
- Simpson GG. 1967. *Principles of Animal Taxonomy*. 3 ed. Columbia Univ. Press, N. York.
- Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 16: 393-430.
- Snell TW. 1998. Chemical ecology of rotifers. *Hydrobiologia*. 387/388: 267-276.

Snell TW, Carrillo K. 1984. Body size variation among strains of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 37: 359-367.

Snell TW, Childress M, Winkler BC. 1988. Characterization of the mate recognition factor of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 89: 481-485.

Snell TW, Rico-Martínez R, Kelly LN, Battle TE. 1995. Identification of a sex pheromone from a rotifer. *Mar. Biol.* 123:347-353.

Sommer U. 1988. Some size relationships in phytoflagellate motility. *Hydrobiologia*. 161: 125-131.

Stemberger RS, Gilbert JJ. 1984. Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis*: induction by cyclopoid copepods and *Asplanchna*. *Freshwater Biol.* 14: 639-647.

Stemberger RS, Gilbert JJ. 1987. Defenses of planktonic rotifers against predators. In Kerfoot WC, Sih A. (Eds.) *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. University Press of New England, Hanover.

Suatoni E, Vicario S, Rice S, Snell T, Caccone A. 2006. An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer-*Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 41: 86-98.

Sudzuki M. 1955. On the general structure and the seasonal occurrence of the males in some Japanese rotifers. III. *Zool. Mag.* 64: 189-193.

Sudzuki M. 1964. New Systematical Approach to the Japanese Planktonic Rotatoria. *Hydrobiologia*, XXIII. 1-124.

Tobler M, DeWitt TJ, Schlupp I, García de León FJ, Herrmann R, Feulner PGD, Tiedemann R, Plath M. 2008. Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecilia mexicana*. *Evolution*. 62: 2643-2659.

Tollrian R. 2002. Phenotypic plasticity: Beyond nature and nurture. *Nature*. 416: 584-585.

Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. 2000. Preparation of PCRQuality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT) BioTechniques. 29: 52-54.

Vanoverbeke J, De Meester L. 1997. Among-populational genetic differentiation in the cyclical parthenogen *Daphnia magna* (Crustacea, Anomopoda) and its relation to geographic distance and clonal diversity. Hydrobiologia. 360: 135-142.

Via S, Gomulkiewicz R, De Jong G, Scheiner SM, Schlichting CD, Van Tienderen PH. 1995. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. Trends in Ecology and Evolution. 10: 212-217.

Voigt M. 1956-1957. Rotatoria. Die Rddertiere Mitteleuropas. Gebriider Borntraeger, Berlin.

Wallace RL, Snell TW. 2001. Rotifera. In Thorp JH, Covich AP. (Eds.) Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates, 2nd ed. Academic Press, San Diego, 195-254.

Wallace RL, Snell WT, Nogrady T. 2006. Rotifera Biology, Ecology and Systematics. SPB. Academic Publishing.

Walsh EJ. 1995. Habitat-specific predation susceptibilities of a littoral rotifer to two invertebrate predators. Hydrobiologia. 313/314: 205-211.

Walsh EJ, Zhang L. 1992. Polyploidy and body size variation in a natural population of the rotifer *Euchlanis dilatata*. J. Evol. Biol. 5: 345-353.

Walsh EJ, Wallace RL, Shield RJ. 2005. Toward a better understanding of the phylogeny of the Asplanchnidae (Rotifera). Hydrobiologia. 546: 71-80.

Walsh EJ, Schröder T, Wallace RL, Ríos-Arana JV, Rico-Martínez R. 2008. Rotifers from selected inland saline waters in the Chihuahuan Desert of México. Saline Systems. 4:7.

Walsh EJ, Schröder T, Wallace RL, Rico-Martinez R. 2009. Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*. 30: 1046-1050.

Welch DM, Meselson M. 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic Exchange. *Science*. 288(5469): 1211-1215.

West-Eberhard MJ. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. New York, NY: Oxford University Press.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

Wierzejski, A. 1892. Zur Kenntnis der Asplanchna Arten. *Zool. Anz*. 15: 345-349.

Williams GC. 1975. *Sex and Evolution*. Princeton University Press, Princeton.

Wurdak ES, Gilbert JJ, Jagels R. 1978. Fine Structure of the Resting Eggs of the Rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna sieboldii*. *Transactions of the American Microscopical Society*. 97(1): 49-72.

Xi Y-L, Liu G-Y, Jin H-J. 2002. Population growth, body size, and egg size of two different strains of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera) fed different algae. *Journal of Freshwater Ecology*. 17(2): 185-190.

Xiang XL, Xi YL, HuHY. 2006. Phylogenetic relationships of *Brachionus* rotifers based on rDNA ITS 1 gen sequences. *Acta Zoologica Sinica*. 52: 1067-1074.

Xiang XL, Xi YL, Wi XL, Zhang G, Wang JX, Hu k. 2011. Patterns and processes in the genetic differentiation of the *Brachionus calyciflorus* complex , a passively dispersing freshwater zooplankton. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 59: 386-398.

Yufera M. 1982. Morphometric characterization of a small-sized strain of *Brachionus plicatilis* in culture. *Aquaculture*. 27: 55-61.

Zhang JY, Xi YL, Ma Q and Xiang XL (2010). Taxonomical status of two *Brachionus calyciforus* morphotypes in Lake Liantang based on ITS sequence. *Acta Hydrobiol. Sin.* 34: 935-942.

Anexo 1

Artículos publicados

Journal Home page: www.jeb.co.in * E-mail: editor@jeb.co.in

JEB
Journal of Environmental Biology



ISSN: 0254-8704
CODEN: JEBIDP

Morphological, morphometrical and molecular (*CO1* and ITS) analysis of the rotifer *Asplanchna brightwellii* from selected freshwater bodies in Central Mexico

Jorge Jiménez-Contreras¹, S.S.S. Sarma^{2,*}, Elías Piedra-Ibarra³,
Marissa Calderón-Torres⁴ and S. Nandini²

¹Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000 Coyoacán, Mexico City, 04510, Mexico

²Laboratorio de Zoología Acuática, Edificio Unidad de Morfofisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala, Av. de los Barrios no. 1, Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, 54090, Mexico

³Unidad de Biomedicina, Universidad Nacional Autónoma de México Campus Iztacala, Av. de los Barrios no. 1, Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, 54090, Mexico

⁴Unidad de Prototipos, Universidad Nacional Autónoma de México Campus Iztacala, Av. de los Barrios no. 1, Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, 54090, Mexico

*Corresponding Author email: ssssarma@gmail.com

Publication Info

Paper received:
30 August 2012

Revised received:
09 January 2013

Accepted:
01 February 2013

Abstract

We evaluated different strains of the rotifer *Asplanchna brightwellii* collected from central Mexico using morphology, morphometry and molecular tools (*CO1* and ITS). Three distinct clonal populations from each of the 3 regions (Mexico City, State of Mexico and State of Guerrero) were established under laboratory conditions. For a given waterbody, morphometric comparisons within the populations of *A. brightwellii* showed almost stable measurements of trophi and with no statistically significant differences among them ($p>0.05$). However, asplanchnid body length and width as well as the cyst diameter varied significantly depending on the waterbody from which *A. brightwellii* was collected. The smallest adults (about 700 μm) were from Valerio Trujano lake (Guerrero State) samples while the largest were from Xochimilco lake. Similar tendencies were reflected in the diameter of resting eggs. In addition, morphologically the cysts of *A. brightwellii* from the three waterbodies showed slightly different pattern. The number of globular structures on the surface of cysts was smaller for Valerio Trujano strain, while these were larger and less numerous for both Xochimilco and Zumpango strains. The ITS region tree displayed two groups Xochimilco and Valerio Trujano -Zumpango, this analysis did not reflect the morphological grouping; on the contrary the *CO1* gene tree separated the populations according to morphological clusters and location (Xochimilco, Valerio Trujano and Zumpango lakes). When the tree was built using the combination of both ITS and *CO1* sequences, the phylogenetic relationships observed on *CO1* gene were consistent; but showed differences with the relationships observed on ITS region tree (only two groups).

Key words

CO1, Fingerprinting, ITS, Resting eggs, Rotifers, Trophi

Introduction

Rotifers are common in a variety of freshwater, brackish, saline and marine water habitats (Wallace *et al.*, 2006). The most important characteristic for the entire phylum is the presence of muscular pharynx (mastax) with chitinous jaws (trophi) in females. Usually the identification of many rotifers species is based on the morphology of trophi alone (Fontaneto *et al.*, 2008). Although this morphological trait

has been successfully used in the separation of many species of rotifers, it is not useful to distinguish cryptic species or for same species that exhibits cyclomorphosis which also happens for the rotifer genus *Asplanchna* (José de Paggi, 2002).

The family Asplanchnidae comprises of three genera *Harringia* benthic organisms and with a foot well developed, *Asplanchnopus* semi-planktonic with reduced

foot and *Asplanchna* planktonic without foot (Walsh et al., 2005). Within the genus *Asplanchna* there are nine species which are distributed from temperate to tropical regions (Segers, 2007). The general body shape of *Asplanchna* is not very useful for identification. Therefore trophi is largely used for distinguishing different species. However, currently there are still many problems related to taxonomy of trophi in the genus *Asplanchna*, because the differences among the closely related species (e.g., *A. brightwellii* and *A. sieboldii*) are difficult to describe (Altindag et al., 2009; Chang et al., 2010). In addition, within a given species of *Asplanchna* the morphological variations in trophi of field-collected specimens are large and can lead to mistakes in identifying the species. For example, the trophi size of *A. sieboldii* can vary from 130-170 µm and the tooth on the inner margin of rami also varies considerably (José de Paggi, 2002). In addition, *A. sieboldii* develops different morphs depending on the availability of food in the environment (Chang et al., 2010). If the available prey items are large (such as cladocerans or copepods) then the large campanulate forms appear in the population; when the food availability is in short, to avoid cannibalism, some individuals in the population develop lateral humps (Wallace et al., 2006). Morphometric analysis of clonal cultures of a given species of *Asplanchna* is helpful to quantify the range of variation in the morphology of trophi. This approach too has limitations because establishing clonal cultures of widely separated geographic strains is both expensive and regulatory national laws often prevent introduction of foreign taxa. The establishment of cultures of clones of species obtained from within a nation is thus helpful for morphometric analysis of different stages in the life history. However, this alone is not sufficient for species that show cryptic diversity. Therefore, it is necessary to employ other biological tools such as molecular analysis (Schröder and Walsh, 2010).

Temperature is one the important natural variables affecting the morphology, distribution and density of rotifers (Wallace and Snell, 2010). Factors other than temperature too have considerable influence on the morphological traits of rotifers. In addition to the well-known phenomenon of cyclomorphosis that occurs in various rotifer genera including *Asplanchna*, factors such as topographical, hydrological and altitude offer opportunities for the development of isolated populations (Wallace et al., 2006). This aspect has not been well studied for many rotifer genera except for *Brachionus* (Ortells et al., 2006). Genetic traits of isolated populations are also dependent on physical barriers (Hoffmann and Rieseberg, 2008).

Recently molecular analysis has been considered as a valuable tool for phylogenetic studies where it has been demonstrated the congruence between taxonomy derived

from molecular data and that derived from morphological analysis. The molecular analysis includes scrutiny of large and small subunits of ribosomal RNA genes (rRNA), mitochondrial DNA, mainly the cytochrome oxidase c subunit 1 gene (*CO1*) and sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) regions of the rRNA genes (Cooke and Duncan, 1997).

The *CO1* gene has been chosen as DNA barcoding of eukaryotes. It codifies for a mitochondrial protein, which is important in the electron transport chain, and therefore has a central role in the metabolism of eukaryotic aerobic organisms. In addition, mitochondrial genes have high evolutionary rates than nuclear genes (Strüder-Kypke and Lynn, 2010). However, *CO1* gene has limited use for identifying certain taxonomic groups, such as fungi, with low amounts of variation in the genes and also by the variable structure of the mitochondrial genomes. Therefore, ITS has been established as a barcode for fungi and thought to be a more suitable DNA barcoding for plants (Chen et al., 2010).

The aim of this work was to understand whether intra- and inter-population variability of *A. brightwellii* from geographically isolated waterbodies in three States of Central Mexico indicate the possible existence of cryptic diversity. For this, data of trophi measurements, structure of resting eggs and *CO1* gene analysis were used. We also analyzed the ITS sequence as a complementary to barcode and thus we compared the results of ITS with the *CO1* gene classification.

Materials and Methods

Live zooplankton samples from different zones (pelagic and littoral or near shore) of the three freshwater bodies viz., Xochimilco Nativitas, (Mexico City), Zumpango (State of Mexico), Valerio Trujano (Guerrero State) were separately collected using a plankton net of 50 µm mesh size (Table 1). All the chosen waterbodies are within the national territorial limits of Mexico, and differ by a distance of about 500 km. Live samples were brought to the laboratory and observed using a Nikon stereomicroscope SMZ645. Selected physico-chemical variables of water were also measured from the site at the time of sampling. From the live zooplankton samples, we isolated between 10 and 20 individuals of *Asplanchna* spp., and transferred them individually into 100 ml glass beakers containing 50 ml of moderately hardwater, the EPA medium. The EPA medium was daily prepared by dissolving 1.14 mM NaHCO₃, 0.44 mM CaSO₄, 0.50 mM MgSO₄ and 54 mM KCl in 1 l of distilled water (Weber, 1993). In order to feed *Asplanchna*, we separately cultured three brachionid rotifers, viz. *Brachionus havanaensis*, *B. rubens* and *Platyonus patulus* using the single celled green alga *Chlorella vulgaris* as the diet. *C.*

vulgaris was batch-cultured in 2 l transparent bottles using Bold's basal medium (Borowitzka and Borowitzka, 1988). Alga in the log-phase of growth was harvested, centrifuged at 300 rpm for 5 min., rinsed and re-suspended in distilled water. From the algal concentrate we quantified cell density using a haemocytometer and offered it to brachionid prey at 0.5×10^6 cells ml^{-1} after diluting as needed using EPA medium. The other test conditions were: temperature $23 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 6.8-7.2, continuous but diffused fluorescent illumination, the medium and the prey daily replaced.

Individuals of *Asplanchna* from each jar were offered the prey (*Brachionus havanaensis*, *B. rubens* and *Platyonus patulus* in equal proportions) at a density of about 5 ind. ml^{-1} . In order to keep the prey active, we added low density of *Chlorella* (at 0.05×10^6 cells ml^{-1} which is not enough for the brachionids to reproduce (Nandini *et al.*, 1997). When the asplanchnid density was high in each jar (about 1 ind. ml^{-1}), a few individuals from each jar were separated using a Pasteur pipette and transferred to a compound microscope and identified using José de Paggi (2002). Trophi were separated using commercial sodium hypochlorate solution (8%). After ascertaining which culture jars contained *A. brightwellii*, rest of the jars were discarded. We used individuals of *A. brightwellii* from different zones of a given waterbody and were considered here as distinct populations. Populations of *A. brightwellii* from the three different geographical regions were treated as distinct clones.

Morphological and morphometric analyses : To perform these analyses individuals of different clones (and their populations) of *A. brightwellii* collected from each of the three waterbodies indicated earlier were used. These were separately cultured as monoclonal cultures starting with one amictic female (three independent populations per site). For the morphometry of trophi adults were used. Measurements were done for the ramus, the tooth on inner margin of the ramus and the bulla (Fig. 1). These were done using both optical and electron microscopy. For obtaining cysts, the populations were allowed to grow further until density-dependent sexual reproduction produced males and resting eggs (Wallace and Snell, 2010). Cysts thus collected from the culture jars were employed for both light and electron microscopy studies; morphometric measurements included cyst diameter while morphological description consisted of characteristic pattern of ornamentation on cyst surface.

For light microscopic observations, we first drew the length and breadth of individuals using a light microscope (at low magnification, 10-20X) fitted with calibrated camera lucida. Because *Asplanchna* is an illoricate, it was measured in live condition. Subsequently, the specimens of *A. brightwellii* were individually used to

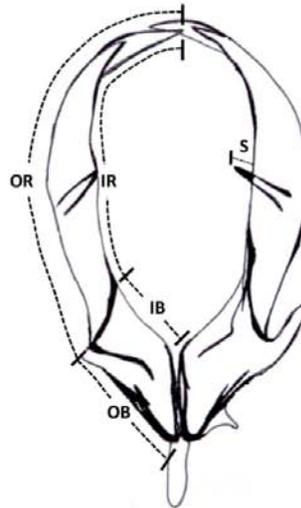


Fig. 1 : Details of trophi measurements made for different clones and populations of *A. brightwellii*. OR= Outer margin of the ramus, IR = Inner margin of the ramus, S = spine on the inner margin of the ramus and OB = Outer margin of bulla.

isolate trophi. Then by orienting the trophi at appropriate position, they were drawn using camera lucida (at high magnification, 100X). The measurements of the trophi were done using Digital Plan Measure (Scale Master Pro, Model 6025). We measured the inner and outer margins of the ramus and averaged them; the same procedure was done for the bulla, as shown in Fig. 1. From each clone about 15 individuals were measured and thus resulting into 40-45 specimens per study site.

For electron microscopy preparations, the trophi were rinsed several times using distilled water and mounted dry on stubs for cold coating following De Smet (1998). The resting eggs were air-dried for 24hr and later mounted on stubs for cold coating. We used scanning electron microscope (JEOL, LV 5900) at 10,000–25,000X for morphological observations.

DNA amplification and sequence analysis : Since *Asplanchna* was fed brachionids, the gut contained DNA of prey. This was eliminated by starving the predators for 6-12 hr by which time no prey items were present in the gut and the previously consumed brachionids were fully digested (Nandini and Sarma, 1999). Genomic DNA of starved adult *A. brightwellii* was extracted by alkaline-boiling lysis. PCR amplifications were performed with *Taq* DNA

polymerase (Invitrogen) using specific primers for mitochondrial *CO1* gene HCO2198: 5' TAAACT TCAGGG TGA CCAAAAAT CA 3' : 5' TGA TTT TTT GGT CAC CCT GAA GTT TA 3' and for nuclear ITS region (ITS4: TCCGCCGTATTGATATGC, ITS5: GGAAGTAAAAG TCGTAACAAGG). For the PCR amplification we used the following program: 1 cycle for 2 min at 94 °C, 30 cycles for 30 sec at 94 °C, 30 sec at 57 °C annealing temperature of ITS region, 1 min at 72 °C; and 1 cycle for 5 min at 72 °C; for *CO1* amplification were 40 cycles with a annealing temperature of 45 °C. The PCR products were verified by electrophoresis in 1% agarose gel electrophoresis, purified by gel band purification kit (GE Healthcare) and cloning in pDrive (Qiagen) or pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) vectors following the manufacturer's instructions. The vectors were sequenced in the DNA Sequencing Laboratory of our university (UBIPRO, FES Iztacala), using the automated sequencer 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The vectors were sequenced in both directions with the universal primers T7, SP6, M13 Reverse or M13 Forward. A total of 650 and 789 bp was used for phylogenetic analysis with *CO1* gene and ITS region.

The phylogenetic estimations among *Asplanchna brightwellii* were done using PAUP 4.0b10 for 32-bit Microsoft Windows (Sinauer Associates, Sunderland, USA), and a heuristic search was carried out with 100 random stepwise addition replicates. There was a maximum of 1000 trees for each replicate. Successive approximations were performed on data sets weighted a *posteriori* based on the rescaled consistency index derived from trees obtained from unweighted parsimony analyses. A total of 1000 replicates bootstrap was done, and a consensus tree was obtained using the majority rule. The branches with less than 50% bootstrap support were collapsed in the consensus tree. The multiple alignments were done using the ClustalX Program with default settings (Thompson *et al.*, 1997).

Results and Discussion

Morphology and Morphometry : Selected data on the physico-chemical variables showed that altitude and temperature varied, while the other two parameters were nearly similar (Table 1). The trophi of *A. brightwellii* is different from other congeneric species and can be easily distinguished, for example from *A. sieboldii* that possesses

a large spine on the inner margin of the ramus. Information on the morphometry of *A. brightwellii* obtained from different waterbodies showed significant differences in the body size and the trophi size (Table 2). For a given waterbody, comparisons within the three populations of *A. brightwellii* showed almost stable measurements of trophi and with no statistically significant differences among them ($p > 0.05$, one way ANOVA, Table 3). However, asplanchnid body length and width varied significantly depending on the waterbody from which *A. brightwellii* was collected. In addition, populations of *A. brightwellii* from Valerio Trujano and Xochimilco, but not those of Zumpango, showed differences in the cyst diameter (Fig. 2). Compared to inter-population differences, those of intra-strain are far greater. The smallest adults (about 700 μm) were from Valerio Trujano lake (Guerrero State) samples while the largest were from Xochimilco lake. The body size of *A. brightwellii* from Zumpango showed intermediate values. Similar tendencies were reflected in trophi size and the diameter of resting eggs (Table 4).

Morphologically the cysts of *A. brightwellii* from the three different waterbodies showed slightly different pattern (Fig. 2). The number of globular structures on the surface of cysts was smaller for Valeriano Trujillo strain, while these were larger and less numerous for both Xochimilco and Zumpango lakes.

***CO1* and ITS phylogenetic analysis :** To determine if the *CO1* and ITS sequence reflect the morphological and morphometric differences observed in the three clones of *A. brightwellii*; we amplified these markers and obtained a 650 bp of the *CO1* gene and a 789 bp of ITS region. A total of 13 sequences was aligned by CLUSTAL W program and obtained an ITS and *CO1* gene tree by a heuristic search based on maximum parsimony with a bootstrap of 1000 iterations, resulting in the final consensus tree (and the branches were collapsed using majority-rule). The ITS region tree displayed two groups Xochimilco and Valerio Trujano-Zumpango (Fig. 3a); this analysis did not reflect the morphological grouping; on the contrary, the *CO1* gene tree separated the organisms according to morphological clusters and location (Xochimilco, Valerio Trujano (Guerrero) and Zumpango lakes) (Fig. 3b). In the *CO1* gene sequence one hundred ten sites were variable and fifty five were parsimony informative sites, whereas for the ITS sequence,

Table 1 : Sample collection sites, mean temperature, pH, K and the number of individuals used for morphometry

Collection site	Coordinates	Altitude (m)	Mean temp.(°C)	pH	K	Ind.
Xochimilco, Mexico City	19°15.190'N and 99° 5.559'W	2240	21	8.4	0.7	42
Zumpango, State of Mexico	19° 46.991'N and 99° 8.377'W	2200	19	9.7	0.9	45
Valerio Trujano, Guerrero State	18°18.294'N and 99°27.595'W	800	26	7.4	0.2	45

Table 2 : Results of one way-ANOVA performed on the body size, width, lengths of rami, bulla, spine on the inner margin of rami and cyst diameter of *A. brightwellii* obtained from three freshwater bodies (Xochimilco lake, Zumpango lake and Valerio Trujano lake)

Source of variation	df	SS	MS	F
Body length	2	2169308	1084654	60.09***
Error	129	2328546	18050	
Body width	2	479220	239610	55.65***
Error	129	555419	4305	
Rami	2	6275	3137	62.82***
Error	129	6443	49.94	
Bulla	2	599	299	29.82***
Error	129	1295	10.04	
Spine length	2	5.85	2.92	6.65**
Error	129	56.76	0.44	
Resting egg diameter	2	3556	1778	27.16***
Error	132	8642	65.47	

df = degrees of freedom, SS = sum of squares, MS = mean squares, F = F-ratio, *** = p<0.001; ** = p<0.01

one hundred twenty two sites were variable and ninety six sites corresponded to parsimony.

When the tree was built using the combination of both ITS and *CO1* sequences (Fig. 4), the phylogenetic relationships observed on *CO1* gene were consistent, but showed differences with the those observed on ITS regions tree (only two groups), taking into account that the DNA amplifications came from the same samples, the differences between ITS region and *CO1* gene must probably only indicate a differential rate of divergence for the two sequences. When the trees were re-done with the *CO1* gene sequence of *Asplanchna* sp. and the ITS region of *Asplanchna sieboldii* the clustering were the same as *CO1* gene tree (Fig. 4) also the concatenated tree was consistent with the morphological classification.

Our study confirms that within a narrow geographical area (by about 500 km), there is considerable difference in the morphology and morphometry of *A. brightwellii*. Samples from Valeriano Trujillo lake represent typical tropical conditions while those from Zumpango and Xochimilco are from high altitude (Table 1). Depending on the collection site, the morphology and morphometry of *A. brightwellii* vary. For example, the morphological variations have been reported within a given species of *Asplanchna* (José de Paggi, 2002).

Information about zooplankton predators (vertebrates and/or invertebrates) in the freshwater bodies is helpful to understand the population abundances and adaptive strategies of *A. brightwellii* in a given waterbody. Since *Asplanchna* is a large transparent predator and with

Table 3 : Results of one way-ANOVA performed on the body size, width, lengths of rami, bulla, spine on the inner margin of rami and cyst diameter of three cultured populations of *A. brightwellii* obtained from Xochimilco lake, Zumpango lake or Valerio Trujano lake

Source of variation	df	SS	MS	F
Valerio Trujano population				
Body length	2	141457	70728	5.72**
Error	42	519573	12370	
Width	2	27537	13768	5.42**
Error	42	106720	2540	
Rami	2	75.80	37.90	1.55 ^{ns}
Error	42	1024	24.38	
Bulla	2	34.45	17.22	3.01 ^{ns}
Error	42	240.18	5.71	
Spine length	2	1.11	0.55	2.33 ^{ns}
Error	42	9.98	0.23	
Resting egg diameter	2	683	341	5.39**
Error	42	2658	63	
Xochimilco population				
Body length	2	20357	10178	0.35 ^{ns}
Error	39	1109700	28453	
Width	2	9440	4720	0.94 ^{ns}
Error	39	196693	5043	
Rami	2	4.36	2.18	0.02 ^{ns}
Error	39	3834	98.32	
Bulla	2	2.41	1.20	0.06 ^{ns}
Error	39	725.84	18.61	
Spine length	2	0.61	0.30	0.42 ^{ns}
Error	39	28.23	0.72	
Resting egg diameter	2	722	361	6.59**
Error	42	2299	55	
Zumpango population				
Length	2	15057	7528	0.60 ^{ns}
Error	42	522400	12438	
Width	2	31864	15932	3.653*
Error	42	183163	4361	
Rami	2	142.67	71.33	2.20 ^{ns}
Error	42	1361.22	32.41	
Bulla	2	10.31	5.16	0.767 ^{ns}
Error	42	282.58	6.73	
Spine length	2	0.97	0.49	1.29 ^{ns}
Error	42	15.86	0.38	
Resting egg diameter	2	124	62.13	1.21 ^{ns}
Error	42	2153	51.28	

df =degrees of freedom, SS=sum of squares, MS=mean squares, F=F-ratio, **=p<0.01, *=p<0.05; ns=non-significant (p>0.05)

less than 4% dry weight, this is not a preferred prey item to the larval fishes (Wallace et al., 2006; Dumont, 2007). However, when *Asplanchna* feeds on other zooplankton, its stomach appears coloured and in such cases fish larvae easily locate and feed on such individuals (M. Gophen, personal communication). We have not analyzed the gut contents of larval fishes from the waterbodies from which *A. brightwellii* was isolated. Certain predatory copepods

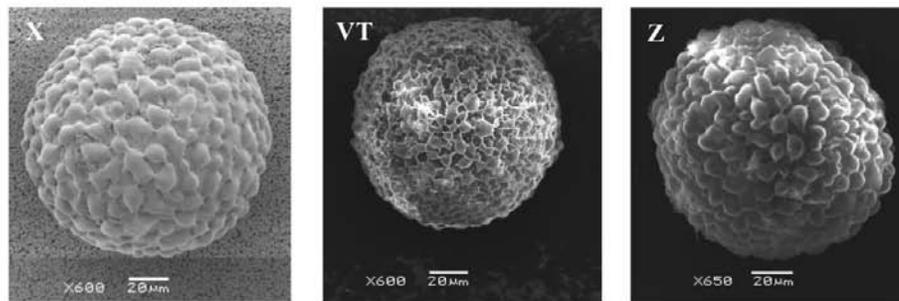


Fig. 2 : Morphology of cysts of cultured *A. brightwellii*. X = Xochimilco (Mexico City), VT: Valerio Trujano (State of Guerrero); Z: Zumpango (State of Mexico)

(Cyclopoidea) feed on *Asplanchna* (Brandl, 2005). Although we encountered cyclopoids in our plankton collections, these were not quantified.

Information about food resources of *A. brightwellii* from the chosen waterbodies is also scanty. We found *Brachionus havanaensis*, *Keratella cochlearis* and *Polyarthra vulgaris* in relatively higher abundances (50 ind. l⁻¹) in the zooplankton samples. Both *Brachionus* and *Keratella* are preferred prey items for *Asplanchna* while *Polyarthra* generally escapes predation (Chang et al., 2010).

The differences in the morphological traits are also reflected in the molecular analysis adapted in this work. Both ITS and CO1 indicated results depending on the power of resolution of the techniques. It is generally assumed that CO1 is a less powerful tool to evidence the genetic divergence among populations of the same species (Chen

et al., 2010). Therefore, ITS is thought to be alternative approach for evaluating such species. The variability in genes of any species of *Asplanchna* is not well established. However, it is largely believed that *Asplanchna* with shortest generation time among all rotifer species (Dumont and Sarma, 1995) is considered to one factor that could contribute to high amount of variation in genes. In addition, members of *Asplanchna* reproduce rapidly and build up populations that quickly crash with the production of cysts (Wallace and Snell, 2010). The genetic recombination due to sexual reproduction together with variable food and feeding habits contribute to variations in the morphology of trophi and cysts.

From the maximum parsimony trees, it is evident that populations of *A. brightwellii* from Valerio Trujano and Zumpango were closely related than the either to Xochimilco. The phylogenetic significance of this remains

Table 4 : Morphometric data on the body size, trophi size and cyst diameter of *A. brightwellii* cultured under laboratory conditions. For each site, the measurements (µm) were based on three clones

Collection site	Body size		Trophi size (length)			Resting egg diameter
	Length	Width	Rami	Bulla	Spine	
Valerio Trujano	692±28 ^{ac}	313±13 ^{ac}	77±1 ^{ad}	24±0.6 ^{ad}	3.6±0.1 ^{ad}	138±2 ^{ac}
	783±36 ^{af}	351±14 ^a	76±1 ^a	23±0.4 ^{ad}	3.8±0.1 ^{ad}	148±1 ^{bj}
	648±18 ^{bc}	291±11 ^{bc}	74±2 ^a	21±0.7 ^a	3.4±0.1 ^{af}	142±2 ^{bc}
Xochimilco	1038±41 ^d	480±21 ^d	92±3 ^b	28±1.0 ^b	3.4±0.2 ^{bd}	159±2 ^{dg}
	993±47 ^d	447±16 ^d	93±3 ^b	28±1.0 ^b	3.6±0.2 ^{bc}	150±2 ^{ej}
	1040±44 ^d	476±20 ^d	92±2 ^{bc}	28±1.0 ^b	3.7±0.2 ^{bf}	157±2 ^{fdi}
Zumpango	817±33 ^e	357±26 ^e	82±1 ^{cd}	24±0.5 ^{cd}	3.2±0.1 ^{cd}	153±2 ^h
	847±28 ^{ef}	417±11 ^{fb}	83±1 ^c	24±0.4 ^{cd}	3.0±0.1 ^{cd}	149±2 ^{bi}
	861±25 ^e	408±8 ^{eb}	86±2 ^{cd}	25±1.0 ^c	3.3±0.2 ^c	152±2 ^{hj}

Shown are the mean ± SD based on 40–45 individuals. For each variable, data carrying similar alphabets are not significant (p>0.05)

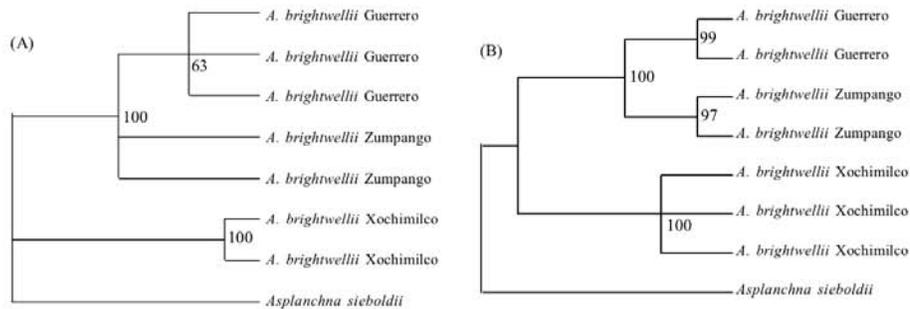


Fig. 3 : Maximum parsimony trees of ITS region (A) and COI gene (B) resulting from analysis of the ITS region and COI gene sequences of *A. brightwellii* species. The source of clone is indicated after the species name. *Asplanchna sieboldii* and *Asplanchna sp.* were used as outgroup. Bootstrap values for 1000 replicates are shown above branches.

unclear at this stage. However, morphological analysis showed that indeed the largest individuals of *A. brightwellii* were observed from Xochimilco. The range of variation in the body length and width as well as the morphology of resting eggs of all the strains of *A. brightwellii* agree with the descriptions available in literature (José de Paggi, 2002). The morphology of trophi, the size and nature of spine on the inner margin of rami observed here also agree with the earlier studies (Wallace *et al.*, 2006; Wallace and Snell, 2010).

The resting egg morphology in rotifers is believed to be species-specific (Wallace and Snell, 2010). In our study we found that the pattern of lobular surface of resting eggs of *A. brightwellii* varied among the populations, although the basic structure was similar to the description available in literature (Wallace and Snell, 2010). Resting egg morphology, however, showed that strains from Xochimilco and Zumpango more closely related than those of Guerrero. Geographically, Xochimilco and Zumpango are closer (about 100 km) while Guerrero is wide apart (about 350 km).

The results of the analysis of ITS region tree yielded two groups of Xochimilco and Guerrero-Zumpango populations. However, this analysis did not reflect the morphological grouping where there were indeed significant differences among the strains of *A. brightwellii* with respect to the body size (length and width), length of rami, bulla and spine on the inner margin of rami as well as the diameter of resting eggs. On the contrary the COI gene tree separated the populations of *A. brightwellii* according to morphological clusters and location (Xochimilco, Guerrero and Zumpango lakes). For certain taxa such as cnidarians, COI analysis is largely ineffective (McFadden *et al.*, 2011). Therefore other molecular techniques are adapted. As indicated earlier, ITS is useful for the species with variable structure of mitochondrial genomes. ITS has been

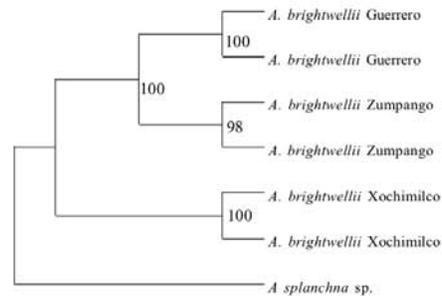


Fig. 4 : Maximum parsimony tree of combination of ITS region and COI gene sequences of *A. brightwellii*. The source of clone is indicated after the species name. *Asplanchna sp.* was used as outgroup.

successfully applied to the rotifer *Brachionus plicatilis* complex (Gómez *et al.*, 2002).

Many morphological traits including the body size of rotifers are inducible. For example, larger bodied individuals of *Brachionus* species due to the presence of infochemicals from *Asplanchna* has been well documented (Gilbert, 1998). Depending on the prey availability, some species of *Asplanchna* change from smaller sized o large-bodied individuals (Wallace and Snell, 2010). Therefore field collected samples may not be at times fully appropriate for interpreting molecular data with morphological adaptations. On the other hand, it is also possible that widespread physiological and behavioral adaptations together with sexual communication through chemical signals may be responsible for the lack of morphological changes in certain species of rotifers (Gómez *et al.*, 2002). Therefore, a

combination of morphological traits and molecular approach would help resolve some interrelationships among species or even clones (Birky *et al.*, 2011). In our study we cultured all the strains of *A. brightwellii* under identical test conditions including the quantity and the type of prey items. In spite of this, we observed significant differences among the strains, with reference to morphology and molecular analysis. It appears that physical barrier, geographical distance, temperature, geological factors as well as the presence of predators and prey items are probably responsible for the observed differences. These differences clearly show the need to consider strains of much wider geographical regions. Thus, in conclusion our morphological and morphometric evaluations together with *CO1* and ITS strongly indicate the existence of considerable variations in the strains of *A. brightwellii* obtained from Central Mexico.

Acknowledgments

We thank two anonymous reviewers for constructive comments on our manuscript. This study is supported by PAPCA (2010-1011-25 project). Partial financial assistance was also obtained from PAPIIT-IN221111. JJC has received doctoral scholarship (59114) from CONACyT (Mexico).

References

- Altindag, A., H. Segers and M. Kaya: Some Turkish rotifer species studied using light and scanning electron microscopy. *Turkish J. Zool.*, **33**, 73, (2009).
- Birky, C.W. Jr., C. Ricci, G. Melone and D. Fontaneto: Integrating DNA and morphological taxonomy to describe diversity in poorly studied microscopic animals: New species of the genus *Abrochtha* Bryce, 1910 (Rotifera: Bdelloidea: Philodinavidae). *Zoological J. Linnean Society*, **161**, 723-734 (2011).
- Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzka: *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, London, pp. 477 (1988).
- Brandl, Z.: Freshwater copepods and rotifers: Predators and their prey. *Hydrobiol.*, **546**, 475-489 (2005).
- Chang, K.H., H. Doi, Y. Nishibe and S.I. Nakano: Feeding habits of omnivorous *Asplanchna*: Comparison of diet composition among *Asplanchna herricki*, *A. priodontia* and *A. girodi* in pond ecosystems. *J. Limnology*, **69**, 209-216 (2010).
- Chen, S., H. Yao, J. Han, C. Liu, J. Song, L. Shi, Y. Zhu, X. Ma, T. Gao, X. Pang, K. Luo, Y. Li, X. Li, X. Jia, Y. Lin and C. Leon: Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *Plos One*, **5**, 1-8 (2010).
- Cooke, D.E.L. and J.M. Duncan: Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. *Mycology Res.*, **101**, 667-677 (1997).
- De Smet, W.H.: Preparation of rotifer trophi for light and scanning electron microscopy. *Hydrobiol.*, **387/388**, 117-121 (1998).
- Dumont, H.J.: Rotifers, the jelly plankton of freshwater. *Hydrobiol.*, **593**, 59-66 (2007).
- Dumont, H.J. and S.S.S. Sarma: Demography and population growth of *Asplanchna girodi* (Rotifera) as a function of prey (*Anuraeopsis fissa*) density. *Hydrobiol.*, **306**, 97-107 (1995).
- Fontaneto, D., W.H. De Smet and G. Melone: Identification key to the genera of marine rotifers worldwide. *Meiofauna Marina*, **16**, 75-99 (2008).
- Gómez, A., M. Serra, G.R. Carvalho and D.H. Lunt: Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, **56**, 1431-1444 (2002).
- Hoffmann, A.A. and L.H. Rieseberg: Revisiting the impact of inversions in evolution: From population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **39**, 21-42 (2008).
- José de Paggi, S.: Rotifera, Vol. 6. Family Asplanchnidae. In: *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. Backhuys Publishers (Eds. T. Nogrady and H. Segers), The Hague, pp. 1-27 (2002).
- McFadden, C.S., Y. Benayahu, E. Pante, J.N. Thoma, P.A. Nevarez and S.C. France: Limitations of mitochondrial gene barcoding in *Octocorallia*. *Mol. Ecol. Res.*, **11**, 19-31 (2011).
- Nandini, S. and S.S.S. Sarma: Effect of starvation time on the prey capture behaviour, functional response and population growth of *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Freshwater Biology*, **42**, 121-130 (1999).
- Nandini, S., S.S.S. Sarma, R.J. Amador López and S. Bolaños Muñoz: Population growth and body size in five rotifer species in response to variable food concentration. *J. Freshwater Ecology*, **22**, 1-10 (2007).
- Ortells, R., A. Gómez and M. Serra: Effects of duration of the planktonic phase on rotifer genetic diversity. *Arch. Hydrobiol.*, **167**, 203-216 (2006).
- Schröder, T. and E.J. Walsh: Genetic differentiation, behavioral reproductive isolation and mixis cues in three sibling species of monogonont rotifers. *Freshwater Biology*, **55**, 2570-2584 (2010).
- Segers, H.: Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, **1564**, 1-104 (2007).
- Strüder-Kypke, M.C. and D. Lynn: Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. *Systematic and Biodiversity*, **8**, 131-148 (2010).
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins: The ClustalX windows interface: Exible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4876-4882. (1997).
- Wallace, R.L., T.W. Snell, C. Ricci and T. Nogrady: Rotifera. Volume 1: Biology, Ecology and Systematics (2nd edition). In: *Guides to the identification of the microinvertebrates of the world*. (Ed.: H.J. Dumont), Kenobi Productions and Backhuys Publishers, pp. 299 (2006).
- Wallace, R.L. and T.W. Snell: Rotifera. In: *Ecology and Systematics of North American Freshwater Invertebrates*. (Eds. J.H. Thorp and A.P. Covich), (3rd Edn.) Academic Press, NY, pp. 180-235 (2010).
- Walsh, E.J., R.L. Wallace and R.J. Shiel: Toward a better understanding of the phylogeny of the Asplanchnidae (Rotifera). *Hydrobiol.*, **546**, 71-80 (2005).
- Weber, C.L.: Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. (4th Edn.), United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90/027F, pp. 293 (1993).