



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
IZTACALA**

**Esclareciendo la estasis morfológica de especies crípticas:
análisis morfométrico de las poblaciones de los rotíferos
Brachionus grupo *plicatilis* de los lagos de la Cuenca
Oriental, México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JORGE HERNÁNDEZ LOZANO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE CIROS PÉREZ
2016**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. Noviembre 2016



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.



“¿Quién crea al mundo? Quizás el mundo no fue creado. Quizás nada ha sido creado. Tal vez, todo es, ha sido y siempre será... un reloj sin un artífice.”

- **Watchmen, Alan Moore.**

“Vastas panorámicas del espacio se arremolinaban ante mí en una dimensión desconocida. La escena estaba bañada en un descolorido resplandor rojo, como el de un sol moribundo que, habiendo perdido a su planeta, hubiese ocupado ahora el lugar de la radiación violeta de la
ensenada.

Me causó un indescriptible impacto; era como si se me hubiese permitido mirar a otro mundo, un mundo increíblemente mayor que el nuestro, diferente al nuestro por distintos valores antipódicos y formas de vida, y lejos del nuestro en el tiempo y el espacio.

-Lo que ha visto, señor Phillips, era una escena de otra estrella lejana - dijo el señor Allan-, muy alejada en el espacio. De hecho, pertenece a otro universo. ¿Le ha convencido?”

-**La Hermandad Negra y otros cuentos, H. P. Lovecraft y August Derleth.**

“Una mano quemada es el mejor maestro.”

-**El señor de los anillos, J. R. R. Tolkien.**



AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto de Investigación en Limnología Tropical (PILT) por haberme dado la oportunidad de trabajar ahí.

A los proyectos PAPIIT-UNAM IN217513 e IN222916 por la beca de realización de tesis y por el financiamiento para la realización de esta investigación.

A mi comité tutorial:

Dr. Jorge Ciros Pérez

Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia

Dr. Elías Piedra Ibarra

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

M en C Arturo José Arturo Alcántara Rodríguez

Muchas gracias por su asesoría.



DEDICATORIAS

A Todas las personas con las que conviví del PILT, investigadores, alumnos y estudiantes fueron parte de esta aventura, todos y cada uno de ustedes aportaron al desarrollo del presente trabajo y al mío como persona.

A la familia:

Por haberme brindado todo su apoyo incondicional, siempre estuvieron ahí en todo momento. A mis abuelos, no tengo palabras para poder describir todo lo que hicieron, no solo brindarme un techo, muy pocas cosas se comparan con la sabiduría que sale de sus labios al hablar, años de experiencia le recuerdan a uno “que más sabe el diablo por viejo, que por diablo”. Muchas gracias Efrén Hernández y Alicia Arizmendi, este también es un logro de ustedes, otro fruto cosechado por nunca bajar la cabeza y siempre enfrentar a la vida de frente. No conozco personas más fuertes que ustedes, los amo y admiro.

A mis padres, en todo momento en el desarrollo de mi vida académica, este largo camino que inició en el preescolar y ha llegado a este momento. Cada paso fue dado con su guía, consejos, sermones y llamadas de atención. Nunca me dejaron solo, me ayudaban incluso cuando no podían, me aguantaron cuando no debían y me escuchaban cuando yo no quería hablar. Gracias por no dejarme solo, por apoyarme y quererme.

A mis tíos y tías, no los olvidé, ustedes igual me apoyaron en cada momento, a veces con pequeñas charlas, a veces apoyando el financiamiento de mi desarrollo académico, a veces invitándome las vacaciones (esos ratitos de relajación que todos necesitamos para no quebrarnos), ustedes también son parte de esto. Muchas gracias Lorena Hernández, el amor que usted siente por su familia es indescriptible. A Virginia Hernández, Marisol Lozano, Octavio Hernández, Martha Lozano, Blanca Lozano, Daniel Hernández, Guillermo Bravo y Guillermina Hernández, gracias por todo su apoyo, las pláticas y escucharme.



A las amistades:

Estos caminos no se deben de recorrer solos, en mi caso tuve una excelente compañía.

A los jinetes del caos (incluido Freddy), si deberíamos escribir un libro para hacer reír a la banda:

- A Jonathan “el Chino”, desde el cch mi buen, creí presentir algo ese día. Tu sinceridad fue y es abrumadora, la visión que nos compartiste del trabajo de campo y esas pequeñas frases peculiares (que dices a modo de refrán) eran más que suficientes para hacer pensar a cualquiera. Gracias por recordarnos siempre que nunca hay que olvidar de donde somos (¡Disculpa lo de la arrachera!).
- A Miguel “Theo”, desde primero, tantas cosas que decir y tan poco espacio, no sé qué habría sido de esta aventura si no te hubiera conocido, a ti que eras la representación humana del Ares y tus Gb de música. Gracias por expandir violentamente mis fronteras musicales, por escuchar, por aconsejar y siempre apoyar de cualquier modo posible. ¡Hasta por hormonarnos al mismo tiempo!
- “A quique el Cuervo” (Miriposa, 2015), siempre dispuesto a hacer alguna tontería, eso hizo muy ameno el tiempo a muchos, pero estresante a otros. Gracias por ser buen Hippie y amigo, nunca dejas solo, siempre te quedas a morir. Nunca olvidare el circulo radiactivo que creaste y como los destruiste tomándote “ese café” para ecología jaja.
- A Freddy, ese día que me compraste dos tortas de milanesa supe que eras especial. Gracias por el aguante y salvarnos de varias, no sé qué tengas, siempre hacías que a donde saliéramos fuera divertido (Como la Grange). Gracias por tan buenas charlas.

A Verde, gracias por ser una excelente amiga, fuerte e inteligente, siempre me gusto tu punto de vista. A Valentín, aprendí varias cosas contigo, te aprecio mucho y aún recuerdo cuando te dijeron que eras un “estuche de monerías”. A “Jano”, a pesar



de que te sientes si no te responden los “whats”, era bueno echar unas buenas charlas (en la única). A Leo y Miguel, señores, ustedes eran las maquinas del ocio científicamente bien definido, y se les agradece eso. No Ari, no te olvide, eres buena escuchando y te agradezco eso.

Para mis niñas, las conocí en cuarto semestre, desde entonces han sido parte de esto, en las buenas y en las malas. ¡Las quiero un montón chamacas!: A Sarai (Rebeca-“ñoñis”), Usted señorita me apoyó de gran manera, contribuiste mucho en mi desarrollo literario y musical, escuchaste, me aguantaste, aconsejaste y mucho, mucho más, gracias por todo, se le quiere y aprecia (también agradezco a tu matiz, los proyectos de arriba de la Beca igual). A Esme, eras la mamá de los pollitos, excelente escuchando y aún mejor aconsejando, gracias por todo. A Sandra “Sanch”, te quiero y gracias por respetar mi decisión de volverte mi amiga a los 5 minutos que te vi (jajaja), prometo no volverte a usar de protector de pantalla. A Lau, me acompañaste en ese ciclo pesado de francés y recuerda “uno puede ser inmortal, haciendo algo grandioso”. A Miri, muy buenas conversaciones, y muy buena retribución musical, gracias por escuchar. A Mary, mi princesa Rambo, esos ataques de simpleza, tu maldad interior, todas las risas, tú fuerza de voluntad, gracias por acompañarme.

A mis amistades del CCH, ya pasaron muchos años, pero aun así frecuento a varias, Francisco, Hugo, Isaac, Oswaldo, Dany, Fernando, David, gracias por su muy raro apoyo, los quiero y aprecio. Gaby, gracias por estar conmigo en esa etapa oscura de la carrera y darle luz. Y a ti Ramón, de una forma u otra cargaste todo esto en tu espalda igual, me escuchaste y aguantaste, tu apoyo y abrirte como persona me ayudaron a terminar esto, muchas gracias amigo.

Y para terminar, a mis amistades de toda la vida, Iván, Erick Eduardo, Eduardo Cardoso, Ricardo, Daniela, Cinthia y Rodrigo, ustedes tuvieron el mejor asiento de este show, rieron, se divertieron y sollozaron conmigo cuando era necesario, desde



el inicio de mi vida académica, a este momento y después de lo que tenga que seguir espero aún verlos a todos, gracias por todo.

Esta tesis está dedicada a todos ustedes, a mis demás compañeros, a todos los profesores con los que cursé y los investigadores que conocí. Muchas gracias FESI y UNAM.



Contenido

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIAS	4
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
¿Qué es una especie?	11
Las especies crípticas: escondidas a simple vista	13
El complejo críptico de <i>Brachionus</i> grupo <i>plicatilis</i>	14
OBJETIVO	19
Objetivos particulares	19
MÉTODOS	20
Área de estudio	20
Trabajo de campo	22
Trabajo de laboratorio: establecimiento de los cultivos	22
Análisis morfológicos	24
Análisis morfológicos: morfología tradicional lineal	25
Análisis morfológico: morfología geométrica	25
RESULTADOS	27
Morfología tradicional	27
Morfología geométrica	31
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIÓN	42
BIBLIOGRAFÍA	43
Anexo	54



RESUMEN

Las especies crípticas o gemelas están constituidas por organismos que presentan un parecido morfológico importante llegando al punto de ser indistinguibles. Debido al uso de claves de identificación de especies basadas en caracteres morfológicos este problema se ha acrecentado y pasó desapercibido durante mucho tiempo en especial en organismos pequeños. La utilización de técnicas con marcadores moleculares ha ayudado mucho a vislumbrar poco a poco esta diversidad oculta, sin embargo, otras técnicas (basadas en técnicas clásicas) como es el caso de la morfología geométrica utilizadas rigurosamente han tenido igualmente un efecto positivo en la resolución de este problema. Esta técnica se enfoca en conocer la variabilidad de la forma de los individuos y no sólo sus dimensiones, dando criterios diferentes al tamaño del organismo. Recientemente se encontró un rotífero en los lagos Alchichica, Atexcac y la Preciosa de la Cuenca Oriental, México, que pertenece al grupo de especies crípticas *Brachionus plicatilis*. Los análisis comparados por medio de marcadores moleculares, de compatibilidad reproductiva y ecofisiología concluyeron que este rotífero (denominado por el momento *Brachionus* sp. 'México') es una especie distinta dentro del complejo, pero muy similar morfológicamente a sus congéneres. Con el fin de analizar las posibles divergencias morfológicas sutiles que permitan reconocer a esta especie, en esta tesis se hicieron dos tipos de análisis morfométricos: (1) de morfología tradicional lineal, para conocer las dimensiones de los individuos y, (2) de morfología geométrica, para conocer la variabilidad de la forma que presentan entre ellos mismos y con respecto a otras especies filogenéticamente cercanas. Los resultados obtenidos en ambos análisis nos indican que las poblaciones del rotífero perteneciente a los lagos de la Cuenca Oriental no presentan diferencias significativas de tamaño y forma entre ellos, pero sí en comparación de las otras especies. Por lo que estos resultados, aunados a los publicados previamente sobre estos rotíferos, que los reconocen como una especie biológica con cohesión y aislamiento reproductivo, agrupamiento genético y ecológico específicos, etc., proporcionan información suficiente para poder hacer la descripción taxonómica formal de esta especie.



INTRODUCCIÓN

La vida se expresa en una inimaginable cantidad de tamaños, colores y formas. Se cree que en nuestro planeta apareció hace unos 3,500 años y persiste hasta la fecha, luchando, adaptándose, transformándose y evolucionando. La gran variedad y riqueza de especies es el patrimonio natural del planeta Tierra, resultado de un proceso histórico, lleno de patrones ecológicos y evolutivos irrepetibles en las mismas condiciones (Halffter & Ezcurra, 1992; Jeffries, 1997). Estas condiciones únicas en el tiempo originaron a la biodiversidad actual, la cual se ha mantenido y alterado por eventos como la diversificación genética, las dinámicas ecológicas (interacciones de poblaciones y comunidades en los ecosistemas) y las extinciones (Núñez, 2003). La propia aparición del *Homo sapiens* y su desarrollo debe verse vinculado al origen y mantenimiento de esta diversidad (Solís *et al.*, 1998).

La biodiversidad se define como toda variación de la base hereditaria en todos los niveles de organización, desde los genes en una población local de una especie, las especies que componen toda o una parte de una comunidad, y finalmente las mismas comunidades que componen la parte viviente de los múltiples ecosistemas del mundo (Wilson, 1988). Es decir, abarca todos los tipos y niveles de variación biológica.

Para conocer esta diversidad se realizan varios estudios que se enfocan en saber la riqueza y abundancia de las especies (diversidad alfa), su heterogeneidad dentro de un ecosistema (diversidad beta) y a nivel geográfico (diversidad gama), intentando responder preguntas como ¿qué especies hay?, ¿cuántas y en qué cantidad están?, ¿dónde y por qué están?

Sin embargo, conocer la diversidad “real” es una tarea más complicada, primero hay que saber discernir entre “especies”, segundo, los mismos métodos para saber “cuál especie es cual” pueden llevar a la confusión. En ocasiones hay especies que pueden ser reconocidas por los criterios utilizados para diferenciar a las especies entre sí.



¿Qué es una especie?

La diversidad existe dentro de lo que denominamos especies, la presencia de alelos distintos para cada gen en cada individuo de una población (variación genética) es la fuente primordial para el proceso evolutivo (Halffter & Ezcurra, 1992). Se entiende por especie a aquel grupo taxonómico en el que se dividen los géneros, es la unidad básica de la clasificación biológica y tiene un papel único en la evolución, para denominarla se utiliza una nomenclatura binomial en latín (Lee, 2003). A diferencia de los otros niveles taxonómicos, actualmente hay varios conceptos que intentan definir de qué hablamos cuando hablamos de especie, ya que en el nivel de “especie” se deben presentar características que relacionen a sus miembros con los niveles taxonómicos superiores a los que pertenecen (Dominio, Filo, Clase, Orden) y, a la vez, los separen de otros grupos filogenéticamente cercanos (Familia y Género; véase, Ereshefsky, 2001; Mishler, 2000; Lee, 2003), en los que destacan la morfología (o algunos otros caracteres fenéticos) y el aislamiento reproductivo.

Los conceptos que utilizan al entrecruzamiento como criterio de delimitación entre especies (Lee, 2003), son aquellos en que una población posee flujo genético entre sus individuos, comparten sistemas de reconocimiento de pareja (Paterson, 1958) y presentan un aislamiento reproductivo con otras poblaciones. El concepto mejor representado de esta categoría es el denominado como de “especie biológica”, planteado por primera vez por Alfred R. Wallace (Wallace, 1865) y popularizado por Dobzhansky (1937) y Mayr (1942), que es el más aceptado actualmente y define a la especie como una población o conjunto de poblaciones integradas por individuos con características similares y que tienen el potencial para reproducirse entre ellos, dejar una descendencia fértil y que no poseen flujo genético con poblaciones de otras especies. Sin embargo, estos conceptos de entrecruzamiento no abarcan a un grupo de organismos denominado especies parasexuales, que son aquellas que no poseen reproducción sexual.

Los conceptos de cohesión (Lee, 2003) se basan en la cohesión de los individuos o poblaciones para categorizar a la especie. Las especies son grupos de organismos que comparten características que permanecen coherentes a través del tiempo,



permanecen en estasis y todas responden a las mismas fuerzas evolutivas. Ejemplos de estos conceptos son el de especie ecológica (Van Valen, 1976), que son aquellas poblaciones que comparten un nicho a través de tiempo; el de especie evolutiva (Wiley, 1978), la cual se define como un linaje (una secuencia ancestro-descendiente) de poblaciones u organismos que mantienen su identidad de otros linajes y que poseen sus propias tendencias históricas y evolutivas. Pero estos conceptos en ocasiones es complicado conocer el grado de cohesión entre poblaciones, teniendo un problema similar con las especies parasexuales.

Los conceptos monofiléticos de especie (Lee, 2003) establecen que todas las especies deben de ser entidades monofiléticas (que sólo tengan un ancestro en común) y basarse en ciertas características que posean todos los individuos a los que se agrupen, como las homologías (la relación que existe entre dos estructuras orgánicas cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo). Es aplicable solo a aquellos grupos que no muestra ninguna relación filogenética con cualquier otro grupo de organismos.

Los conceptos de similitud (Lee, 2003) son aquellos que están basadas en las características fenéticas de los individuos, estos fueron los primeros en ser utilizados y fueron los más importantes durante mucho tiempo (Sokal & Crovello, 1970). Aquel que más destacó fue el concepto de especie morfológica (Caín, 1954), que dividía a los individuos morfológicamente similares, generalmente asociados entre sí por una distribución geográfica definida y separados de otros conjuntos por discontinuidades morfológicas. Estos conceptos han tenido muchas críticas por no tomar en cuenta otras propiedades como las etológicas, ecológicas y reproductivas. Pero la primera aproximación para los estudios de diversidad se basa en el criterio de máxima semejanza morfológica, ya que la mayoría de las claves de identificación para diferentes grupos taxonómicos están basadas en la morfología. Sin embargo, existen numerosas especies que son morfológicamente muy similares, llegando incluso a confundirse con algunas ya descritas.



Las especies crípticas: escondidas a simple vista

Las especies crípticas o especies gemelas son aquellas especies que son extremadamente similares en apariencia (morfología, fisiología y comportamiento) pero se encuentran reproductivamente aisladas entre sí (Mayr, 1996). Se considera que dos o más especies diferentes son crípticas si fueron clasificadas erróneamente como una única especie por ser morfológicamente indistinguibles (Pfenninger & Schwenk, 2007), por lo que, si los conceptos de similitud tendrían problemas para poder discernir entre ellas, los de cohesión y entrecruzamiento podrían resultar más adecuados. En varios casos son varias especies las que son confundidas como sólo una y por lo tanto, forman un complejo de especies crípticas. Estos complejos se han descrito en varios grupos de organismos, como los mamíferos (Rohfl *et al.*, 1996; Res, 2002), artrópodos (David *et al.*, 1975; Palopoli *et al.* 1994), peces (Marsh *et al.* 1981; Clabaut *et al.*, 2007), aves (Sheets *et al.*, 2006) y cnidarios (Knowlton, 1993).

Hay pocas investigaciones enfocadas en conocer cuanta es la biodiversidad críptica existente; David Bickford *et al.* (2007) realizaron una revisión de la literatura depositada en las bases de datos *ISI Web of Science* (<http://scientific.thomson.com/products/wos/>) y *Zoological Record Plus* (<http://www.csa.com/factsheets/zooclust-set-c.php>) a partir de la búsqueda de las frases “especies crípticas” y “especies hermanas” en el título, resumen o palabras clave, y encontraron más de 3,500 referencias de los últimos 50 años, la mayoría referidas a especies animales; además, observaron un incremento en estos trabajos en las últimas dos décadas, con una amplia utilización de técnicas de biología molecular, destacando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual consiste en sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN de interés para la secuenciación de un gen determinado (técnica que permite saber la secuencia ordenada de los nucleótidos –guanina, citosina, adenina y timina– que forman un gen), elegido en función de lo que nos interese investigar. Por otro lado, un análisis elaborado por Pfenninger y Schwenk (2007), investigadores de la Universidad de Goethe (Alemania), arrojó que de 771,931 estudios, 2,207 contenían reportes de especies crípticas en todas las clases de



animales, incluyendo 996 nuevas especies de insectos, 267 de mamíferos, 151 de peces y 94 aves.

Pero es en particular en los pequeños invertebrados microscópicos acuáticos donde hay grandes cantidades de diversidad genética oculta dentro de los morfotipos que se consideran como una sola especie (Stelzer *et al.*, 2011). En los organismos zooplanctónicos marinos y de aguas continentales se ha observado que muchas especies que aparentan tener una distribución cosmopolita, presentando rasgos adaptativos a diferentes características fisicoquímicas, en realidad se trata de diferentes entidades biológicas con morfología muy similar. Se creía que esta amplia distribución se debía a la capacidad de los organismos de desarrollar huevos de resistencia, estructuras que pueden soportar condiciones totalmente negativas y que les permiten a las poblaciones dispersarse, ya sea mediante corrientes marinas y de viento, o por otros grupos de animales, ya que esto les permite colonizar nuevos ambientes y tener un elevado nivel de flujo y dispersión genética (Papakostas *et al.*, 2005). Con ayuda de las herramientas de la biología molecular, experimentos de entrecruzamiento y trabajos con diferentes técnicas de comparación morfométricas se han identificado en varios casos conjuntos de especies crípticas que presentan un aislamiento reproductivo (Knowlton, 1993; Ciroso-Peréz *et al.*, 2001a; Suatoni *et al.*, 2006; Montiel-Martinez *et al.*, 2008; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). El caso del rotífero monogononte *Brachionus plicatilis* es uno de los ejemplos más llamativos de esta diversidad oculta.

El complejo críptico de *Brachionus* grupo *plicatilis*

Brachionus plicatilis (O.F. Muller, 1786) es un rotífero de agua salina de distribución cosmopolita, tolera un amplio intervalo de salinidad por que se le considera eurihalino. Pertenece a la familia Brachionidae, dentro del orden Ploimida y la clase Monogononta. Gracias a su capacidad de adaptación a diferentes salinidades se puede encontrar en hábitats de cuerpos de agua lacustres y en las zonas marinas costeras (Walker, 1981) y, por esta misma capacidad, se creyó durante mucho tiempo que todas las poblaciones constituían una sola especie. Actualmente, está



reconocido como un conjunto de especies crípticas, que presentan poca variabilidad morfológica (Serra & Miracle, 1983). Es un linaje de mucha importancia comercial, es utilizado como alimento vivo para las larvas de los peces, ya que por su ciclo de vida su cuidado es relativamente fácil. Gracias a su importancia en la acuicultura es por lo que fue estudiado y se volvió un modelo de estudio para trabajos de ecología y evolución. En algunos casos, la determinación de especies dentro del complejo, sólo se puede hacerse por medio de análisis genéticos (Fontaneto *et al.*, 2007) o analizando el nicho que ocupan (Gómez *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 2000; Ciros-Pérez *et al.*, 2001; Montero-Pau *et al.*, 2011).

La historia taxonómica reciente de este taxón es interesante; en la década de los 1980's se reconoció que existían dos variantes morfológicas de esta especie, por lo que se describieron dos morfotipos sobre la base de su tamaño, que son L (*Large*), para aquellos de mayor tamaño, y S (*Small*) para los más pequeños (Fukusho *et al.*, 1982). La aparición de estos morfotipos fue atribuida a la época del año en la que el animal fuera encontrado. Fu *et al.* (1991) examinaron 67 cepas realizando un análisis de disimilitud (distancias euclidianas) con caracteres morfométricos del cuerpo y determinaron que 37 de estas cepas se encontraban dentro del morfotipo S y 30 en del tipo L. Posteriormente, Segers (1995) reexaminó los nombres existentes relacionados con *B. plicatilis* y propuso que *B. plicatilis* Müller, 1786 y *B. rotundiformis* Tschugunoff, 1921, eran los nombres correctos para los morfotipos L y S, respectivamente.

En ese mismo año, se realizaron estudios con marcadores moleculares a algunas poblaciones pertenecientes al complejo de especies crípticas; los resultados obtenidos por Gómez *et al.* (1995), revelaron que al menos existían tres especies biológicas en lugar de dos, encontrando un nuevo morfotipo, de tamaño intermedio y que además coexistían de manera regular. A inicios del siglo XXI, Ciros-Peréz *et al.* (2001a) realizaron un trabajo donde buscaron diferencias morfológicas, ecológicas y genéticas para diferenciar entre *B. plicatilis* y *B. rotundiformis*, además designaron una nueva especie para el nuevo morfotipo mediano, la cual fue descrita como *B. ibericus*, por Ciros-Pérez, Gómez & Serra, 2001. Los tres morfotipos se



renombraron de la siguiente forma: SS (*Small-Small*), para la variante pequeña; SM (*Small-Medium*), para la variante mediana y L (*Large*) para los grandes.

Análisis filogenéticos realizados con marcadores moleculares para genes mitocondriales (Citocromo Oxidasa Subunidad I o COI), y nucleares (Internal Transcribed Spacer o ITS 1 para ARN ribosomal) han aportado evidencia adicional para poder discernir mejor entre las diferentes especies. Trabajos realizados por Suatoni *et al.* (2006), Fontaneto *et al.*, (2009), y Mills *et al.* (2016), proponen que hay al menos 9 especies sin describir dentro del complejo críptico. Estos análisis se han ido complementando con aquellos enfocados en la divergencia morfológica y han ayudado a la descripción de otras especies.

El trabajo de Mills *et al.* (2016) también aporta nuevos análisis filogenéticos sobre los análisis morfológicos realizados en el complejo, describiendo que estas técnicas representan una buena herramienta para trabajar con el complejo de especies crípticas, encontrando una señal filogenética fuerte en los resultados obtenidos con base en tamaño de los organismos.

Las técnicas de morfología geométrica también han aportado resultados importantes en cuanto a conocer la forma de los organismos, convirtiendo una imagen digital de estos en una configuración geométrica vectorial a partir de marcas en un plano cartesiano, estas marcas son denominadas *landmarks* y se colocan en zonas de importancia morfológica (Klingenberg, 2011). La colocación de los *landmarks* es muy importante, estos dan los datos matemáticos para cuantificar la forma, por lo que debe hacerse bajo ciertos criterios: primero, los *landmarks* deben ser discretos, es decir, deben ser claramente diferenciables de las estructuras que lo rodean; segundo, los *landmark* deben “recrear” la forma en estudio; tercero, los *landmarks* deben ser de fácil ubicación; y, por último, deben estar claramente definidos y la orientación de las marcas debe ser la misma en todas las muestras, o se puede presentar una interpretación errónea de los resultados.



Actualmente, los análisis morfométricos son una herramienta muy útil en distintos campos de la biología, ayudando a poder diferenciar insectos (Mutanen & Pretorious, 2007) peces (Clabaut *et al.*, 2007), mamíferos (Rohfl *et al.*, 1996), aves (Sheets *et al.*, 2006), incluso árboles (Viscosi & Cardani, 2011) y en el registro fósil (Young *et al.*, 2010). También se han utilizado para comparar organismos que presentan especiación críptica en el zooplancton (Ciros-Peréz *et al.*, 2001a; Giri & José de Paggi, 2006; Fontaneto *et al.*, 2007).

Con base en estos antecedentes, actualmente tenemos seis especies de rotíferos dentro del complejo formalmente descritas, tres pertenecientes al morfotipo L: *B. plicatilis sensu stricto*, *B. asplachnoidis*, y *B. manjavacas* (Müller, 1786; Charin, 1947; Fontaneto *et al.*, 2007); dos al morfotipo SM: *B. ibericus* y *B. koreanus* (Ciros-Peréz *et al.*, 2001a; Hwang *et al.*, 2013) y uno al morfotipo SS: *B. rotundiformis* (Tschugunoff, 1921).

Además, se conoce de algunos rotíferos que son considerados como especies distintas, pero aún no han sido descritos (Mills *et al.*, 2016), para referirnos a ellos se pone el género *Brachionus* acompañado de la localidad donde fue encontrado entre comillas, como es el caso de *B. sp. 'Almenara'* (Orthells *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2002) y *B. sp. 'Nevada'* (Gómez *et al.*, 2002).

Recientemente, Alcántara-Rodríguez *et al.* (2012) realizaron un estudio acerca de la adaptación local en los lagos de la Cuenca Oriental, México (Alchichica, Atexcac y La Preciosa) de las poblaciones del rotífero *Brachionus*, en estos lagos habita en el intervalo más bajo de salinidad que se haya registrado para el grupo, el cual es de 1.2 g L⁻¹ en el lago La Preciosa, Puebla (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Ellos encontraron que las poblaciones que habitan estos lagos, presentan diferencias en su intervalo de adaptación, pero que pueden reproducirse entre ellas sin problemas aparentes, pero no con individuos provenientes de otras especies filogenéticamente cercanas y, con ayuda del marcador molecular COI, se llegó a la conclusión de que estas tres poblaciones son una sola especie, que aún no ha sido descrita y pertenece al clado SM. Estas poblaciones son denominadas por el momento *B. sp. 'México'*.



De acuerdo con lo anterior, esta tesis contribuye a robustecer el conocimiento del complejo de especies crípticas de *B.* grupo *plicatilis*, realizando análisis de morfometría comparada a las poblaciones que se encuentran en la cuenca Oriental, conocidas como *B.* sp. 'México', contra otras filogenéticamente cercanas por medio de técnicas tradicionales lineales y de morfometría geométrica. Los resultados aportaron información tanto del tamaño y la forma de las poblaciones de *B.* sp. 'México', donde era de esperarse que las diferencias morfométricas entre ellas fueran bajas, pero que presentaran diferencias significativas cuando se les comparara con otras especies filogenéticamente cercanas que se utilizaron como contraste en este trabajo.



OBJETIVO

Analizar la divergencia morfológica del rotífero *Brachionus* sp. “México” que habita en tres lagos cráter (Alchichica, Atexcac y La Preciosa) de la cuenca Oriental, México, con respecto a otras especies filogenéticamente cercanas pertenecientes al clado “SM” del complejo de especies crípticas *B. plicatilis* mediante análisis comparados de morfometría tradicional y morfometría geométrica de la loriga.

Objetivos particulares

1. Caracterizar la divergencia morfológica intrapoblacional e interpoblacional de distintas variantes genéticas de *B. sp.* “México”.
2. Analizar si existe divergencia morfológica entre las poblaciones de *B. sp.* “México” con individuos de especies filogenéticamente cercanas (clado SM).



MÉTODOS

Área de estudio

La cuenca Oriental, de acuerdo a sus características hidrográficas, es del tipo endorreica y se localiza en los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz, entre las coordenadas 18° 48' - 19°43' N y 97° 09' - 98° 03' W dentro del Distrito Oeste de la Faja Volcánica Transmexicana (Escalante *et al.*, 2007). Abarca un área superficial de 5,250 km² aproximadamente a una altitud promedio de 2,300 m s.n.m. (Alcocer *et al.*, 1993). El clima es templado tropical, de semiárido a subhúmedo, la temperatura promedio anual va de los 12° C a los 16° C y la precipitación total anual es de 400-800 mm. La faja volcánica transversal y la ecoregión de bosque de pino-encino rodean la cuenca por el oeste, el norte y el sur de la misma, la vegetación incluye bosques de pino-encino y bosques de pino-abeto en las elevaciones más altas, con bosques de pino matorral seco, bosques de encino, matorrales juníperos y de yuca, vegetación halofítica y pradera (CONABIO, 2016).

La cuenca contiene algunos lagos poco profundos, la mayoría alcalinos. Se cree que durante el Pleistoceno parte de su área estaba cubierta por un gran lago que actualmente se encuentra reducido a algunos cuerpos de agua que se llenan en época de inundaciones y que permanecen secos una gran parte del año (Arredondo, 1995), como son los lagos efímeros El Carmen o Totolcingo y Tepeyahualco, también conocido como El Salado.

Por otro lado, también se encuentran seis lagos tipo *maar*, localmente llamados axalapascos (Reyes, 1979). Un *maar* es un cráter volcánico, generalmente ancho y bajo, producido por una explosión de una erupción freático-magmática, causada cuando el agua subterránea entra en contacto con magma. Estos, al llenarse de agua proveniente del manto freático forman lagos cráter.

Estos lagos cráter se originaron en el Pleistoceno tardío (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007). Las características de estos varían desde agua dulce hasta salina, aunque todos son alcalinos, con altas concentraciones de cloruros, bicarbonatos de sodio y magnesio (Davies *et al.*, 2002). Estos son: Quechulac, Aljojuca, Tecuitlapa,



Alchichica, Atexcac y La Preciosa, en los tres últimos habita el rotífero de interés *B.* sp. 'México' (Alcántara-Rodríguez, 2012.)

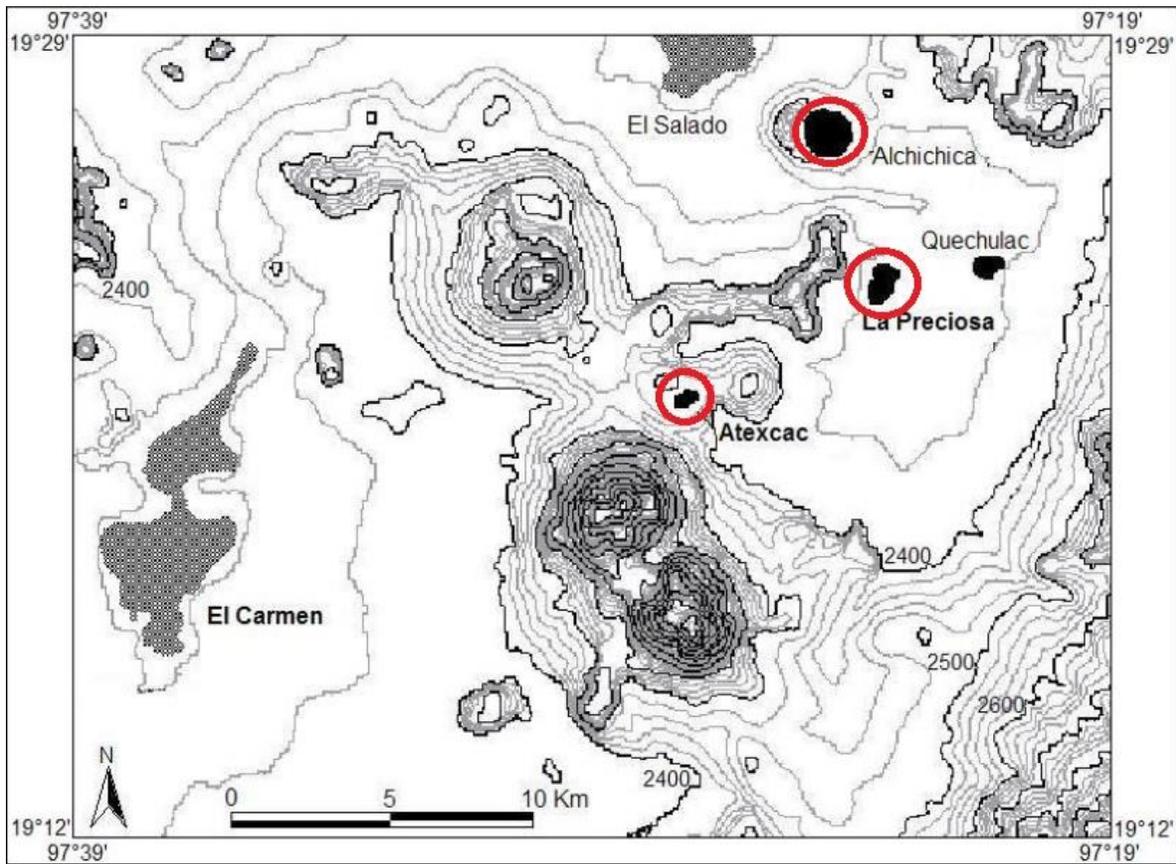


Figura 1. Mapa que muestra la localización de los lagos cráter de la Cuenca Oriental. Están marcados con un círculo rojo los lagos donde se trabajó. Modificado de Alcántara-Rodríguez, 2010.

El lago Alchichica es el lago más grande de la cuenca, se ubica en las coordenadas 19°25'13" latitud Norte y 97°24'00" longitud Oeste en el municipio de Tepayahualco a una altitud de 2,345 m s.n.m.(Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983). Es uno de los lagos naturales más profundos de México, con 62 m de profundidad máxima y abarca un área superficial de 1.733 km², su profundidad media es de 38.5 m. Es hiposalino de 8.5 g L⁻¹ a 9 g L⁻¹, alcalino, el pH varía de 8.7-9.2 y tiene una hidrodinámica característica de lagos monomícticos cálidos. Su temperatura varía de 14°C a 23°C (Armienta *et al.*, 2008) y se mezcla entre los 14.2 °C y 15 °C aproximadamente, a partir de finales de diciembre o principios de enero, finalizando en marzo (Macek *et al.*, 2009).



El lago La Preciosa está ubicado en las coordenadas 19°22'27" Norte y 97°21'23" Oeste a 2365 m s.n.m. Abarca un área superficial de 0.78 km², presenta una profundidad media de 20.72 m y posee 45.5 m de profundidad máxima (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983). Es alcalino con un pH entre 8.8 y 9. La temperatura del agua se encuentra entre 17.4 y 24.5 °C (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983; Arredondo-Figueroa, 2002; Peralta *et al.*, 2002). Tiene una salinidad de 1.0 a 1.5 g L⁻¹ (Peralta *et al.*, 2002).

El lago Atexcac está ubicado en las coordenadas 19°20'13" Norte y 97°21' 19" Oeste en el municipio de Guadalupe Victoria a una altitud de 2510 m s.n.m. Abarca un área superficial de 0.29 km², su profundidad media es de 25.72 m y tiene una profundidad máxima de 39.1 m (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983). Es un lago hiposalino 6.5 g L⁻¹, su pH es alcalino de 8.2 y es monomíctico cálido. Su temperatura va de los 16°C a los 22°C (Armienta *et al.*, 2008).

Trabajo de campo

Para llevar a cabo este estudio se establecieron en el laboratorio cepas de las poblaciones de los rotíferos *B. sp.* 'México' a partir de huevos de resistencia aislados de sedimentos obtenidos de la zona profunda de los lagos donde habita esta especie, que son: Alchichica, La Preciosa y Atexcac. Se utilizó una draga tipo Eckman para la extracción de material de las zonas profundas, tomando sólo la parte más superficial de los sedimentos, es decir los sedimentos más recientes (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012). Las muestras fueron guardadas en bolsas tipo Ziploc y transportadas al laboratorio del Proyecto de Investigación en Limnología Tropical (PILT) de la FES Iztacala donde fueron almacenadas en refrigeración (4°C).

Trabajo de laboratorio: establecimiento de los cultivos

Se establecieron las cepas de rotíferos de cada lago a partir de la re-suspensión de huevos de resistencia presentes en el sedimento con base en el trabajo de Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012. Para esto se colocaron 15 g de sedimento de cada



lago previamente homogenizado en tubos de centrifuga de 50 mL de capacidad, mismos que fueron aforados a 40 mL con una solución de sacarosa al 60 % y, posteriormente, se centrifugaron a 1,000 rpm durante un periodo de 5 min. El sobrenadante de los tubos fue filtrado a través de una malla de 20 μm y se recuperó el material restante, éste se observó en un microscopio estereoscópico Leica® EZ4 y se recuperaron los huevos de resistencia de *B. grupo plicatilis* identificados con base en su morfología y aislados mediante el uso de una pipeta Pasteur (Lomelí-Ramírez, 2013).

Para establecer los cultivos, los huevos de resistencia se colocaron de manera individual en cajas de cultivo multipocillos de poliestireno de 1.5 mL, un huevo por pocillo con la finalidad de tener cultivos monoclonales. Se preparó una solución acuosa con diferente concentración de sales minerales en base a la salinidad del lago de donde procedía el sedimento, es decir, 1.2 g L⁻¹ para el cultivo de la Preciosa (LaPr), 6.5 g L⁻¹ para el de Atexcac (Atx) y 9.0 g L⁻¹ para el de Alchichica (Alc). Para preparar el agua a las diferentes salinidades se elaboró una solución saturada de sal utilizando sales comerciales para acuario (Instant Ocean®, Aquarium Systems), como hizo Alcántara-Rodríguez (2010). Posteriormente esta, solución fue filtrada con un papel filtro para remover las partículas insolubles, después la solución fue disuelta con agua desionizada estéril hasta alcanzar el valor de salinidad deseado, el cual fue medido con un conductivímetro de la marca YSI® modelo 63.

A partir de los rotíferos eclosionados se eligieron al azar nueve cultivos monoclonales (tres por cada lago) los cuales fueron transferidos a tubos de ensayo con capacidad de 20 mL. Las nueve cepas se mantuvieron en sus salinidades de origen a una temperatura de 18°C (± 1 °C). Como alimento se utilizó el alga *Tetraselmis suecica*, cedida por el Instituto de Ciencias del Mar de Andalucía (Cádiz, España), se agregó en concentraciones superiores a los 8 mg C mL⁻¹ (Alcántara-Rodríguez, 2010). Semanalmente, se les cambió el medio reemplazando dos terceras partes del cultivo y sustituyéndolo por medio fresco. Estuvieron en estas condiciones hasta que las poblaciones de rotíferos fueran muy densas, aproximadamente dos meses, después, las cepas fueron transferidas a matraces Erlenmeyer con capacidad de 100 mL y se mantuvieron todos a una salinidad de 9



g L⁻¹, con la finalidad de que las poblaciones estuvieran en las mismas condiciones y que no influyan en los resultados del trabajo. La temperatura fue la misma de los cultivos pre-experimentales; mientras que el alimento se agregó en cantidades 10 mg C mL, con la finalidad de mantener una densidad poblacional elevada. Se mantuvieron así durante otro mes hasta que las poblaciones alcanzaron densidades altas y poder iniciar el trabajo.

Adicionalmente, se cultivaron dos cepas de rotíferos pertenecientes a otros linajes filogenéticamente cercanos dentro del clado SM de este complejo: *Brachionus* sp. 'Almenara' (Alm) (Gómez *et al.*, 2002), donada por el Dr. Manuel Serra de la Universidad de Valencia, y la otra de la laguna de Alvarado, Veracruz, donada por el Dr. Alejandro Pérez Legaspi del Instituto Tecnológico de Boca del Río (ITBOCA) denominada *Brachionus* sp. 'Alvarado-Almenara' (Av-Alm), nombrada así por el lugar que se encontró y su cercanía filogenética con *B. sp.* 'Almenara' (A. Alcántara-Rodríguez, comunicación personal; Mills *et al.*, 2016). Estas cepas también fueron establecidas como cultivos monoclonales, tres cultivos de *B. sp.* 'Almenara' y cinco de *B. sp.* 'Alvarado-Almenara', crecieron en la misma cámara de incubación, con una salinidad de 15 g L⁻¹, la cual se ajustó a 9 g L⁻¹ para estar en las mismas condiciones. Por último, el M. en C. Arturo Alcántara Rodríguez proporciono imágenes digitales de individuos de una cepa del rotífero *B. ibericus* (SM5), con sus respectivas mediciones, para incluir a la especie en los análisis morfológicos.

Análisis morfológicos

De las cepas previamente cultivadas se tomaron 50 individuos de cada población (5 poblaciones; i.e., $n = 50 \times 5$) más las imágenes digitales de *B. ibericus* para la realización de estos análisis. Todas las hembras que fueron seleccionadas presentaban un único huevo subitáneo, esto para asegurar que ya tenían la talla de adulto. Estas fueron fijadas con formaldehído al 4% y se les tomaron fotografías de forma individual con un microscopio Leica[®] DMLB2 y una cámara digital Motic Imagic plus 2.0[®]. Las imágenes obtenidas fueron de una resolución de 2088 x 1550 píxeles en un formato de mapa de bits (*.bmp). En ellas se realizaron las mediciones



para la realización de los análisis de varianza morfológica. Se midieron todas las imágenes digitales con ayuda del programa Motic Imagic plus 2.0[®], previamente calibrándolo con un microscopio Leica[®] DMLB2. Todas las mediciones fueron obtenidas en μm y se les promedió.

Análisis morfológicos: morfología tradicional lineal

Se basa en la medición de los caracteres morfológicos más relevantes de los individuos. En este trabajo se midieron cinco caracteres con base en los trabajos de Ciro-Pérez *et al.* (2001) y Alcántara-Rodríguez (2010). Los caracteres medidos son: a) el largo de la loriga, b) el ancho de la apertura de la loriga, c) el ancho de la loriga, d) largo de las espinas interiores y e) el tamaño de la espina media. Además, se determinaron algunas relaciones alométricas que se relacionan con la forma del individuo (c/a , b/a) y la longitud relativa entre las espinas interiores dorsales (d/e). Los resultados capturados de las mediciones fueron promediados y analizados con el test de Kruskal-Wallis para comparación múltiple de medias, al obtener diferencias significativas se realizó un test *post hoc* U de Mann-Whitney para ver las diferencias entre las poblaciones (Dytham, 2011), ambos test se realizaron con ayuda del software IBM[®] SPSS[®] Statistics (SPSS[®] Inc, 2010).

Análisis morfológico: morfología geométrica

Estos análisis se basan en la cuantificación de la forma de un individuo, transformando su imagen a un polígono en un plano cartesiano, mediante la colocación de unas marcas denominadas *landmarks* en zonas de importancia morfológica (Klingenberg, 2011). Para trabajar con los *landmarks* fue necesario la transformación de las fotografías tomadas a imágenes digitales con formato *.tps con ayuda del software TPSutil[®] y luego se colocaron las marcas con el software TPSDig2[®] (Viscosi & Cardani, 2011). Las imágenes digitales con los *landmarks* fueron cargadas en un software de análisis morfológicos para trabajar con ellas, procesando los puntos seleccionados y expresándolos en coordenadas de GPA (análisis generalizado de Procrustes), con esta información se realizan los análisis



(Klingenberg, 2011; Viscosi & Cardani, 2011). Se utilizó el software de MorphoJ[®] desarrollado por Klingenberg (2011) debido a su conjunto de funciones y análisis que toman en cuenta la simetría bilateral de la configuración de los *landmarks* y sus herramientas para observar la varianza morfológica (Klingenberg, 2011).

Con base a lo explicado anteriormente, las fotografías tomadas fueron transformadas en imágenes digitales a las cuales se les colocaron siete *landmarks* (Fig. 2): cinco en las espinas y apertura de la loriga, uno en la parte media y más ancha de la loriga y el último en la parte más alejada de la loriga. Se cargaron las imágenes en el software MorphoJ[®] para la realización de los análisis morfológicos geométricos. Para conocer la variación de la morfología se realizó una serie de análisis estadísticos integrados en el programa.

Primero se realizó un ANOVA de las coordenadas obtenidas por el GPA (ANOVA de Procrustes) para conocer si hay variación entre los individuos (Klingenberg *et al.*, 2002). Después, para conocer con más detalle la varianza morfológica de los grupos se realizó un análisis de correlaciones canónicas (CVA, por sus siglas en inglés), ya que de acuerdo a otros trabajos (e.g., Rohlf *et al.*, 1996; Klingenberg *et al.*, 2005; Viscosi & Cardani, 2011) es muy efectivo para las comparaciones morfológicas, ya que puede hacer inferencias estadísticas, mostrar las diferencias que presenten y predecir afiliaciones entre los grupos de datos.

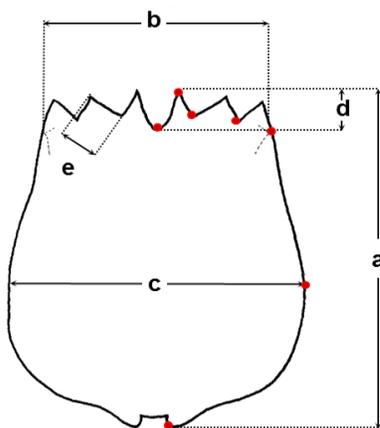


Figura 2 Variables para los análisis morfológicos: donde **a** es largo de la loriga; **b** el ancho de la apertura de la cabeza; **c** el ancho de la loriga; **d** largo de las espinas interiores y **e** el tamaño de la espina media, medidas que se utilizaron para la morfología tradicional. Los puntos rojos indican la localización de los *landmarks* para los análisis de morfología geométrica. Imagen tomada y modificada de Ciro-Pérez *et al.* (2001).



RESULTADOS

Morfología tradicional

La prueba de Kruskal-Wallis indico que se en al menos en algunas de las variables había diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones (ver tabla 1^a en el anexo), por lo que procedió a realizarse la prueba U de Mann-Whitney para ver en donde se encontraban estas diferencias (Véase de la tabla 2^a a la 10^a en el anexo).

La diferencia morfológica principal se presenta en el largo la loriga (la variable *a*, fig.2), en donde se agrupan las tres poblaciones pertenecientes a la cuenca Oriental, Alc, Atx y LPr conocidas como *B. sp.* 'México', no se aprecia ninguna diferencia estadística significativa entre ellas (Tabla 1 y 3 en el anexo, Fig. 2) con un promedio de $210.6 \pm 3 \mu\text{m}$ (U de Mann-Whitney; todas $p > 0.05$). Mientras que si difieren de las otras poblaciones y a su vez se presentan ligeras diferencias entre estas (U de Mann-Whitney; p todas < 0.05). Por lo que la población Alm que pertenece a *B. sp.* 'Almenara' es la especie más grande ($232.7 \pm 1.8 \mu\text{m}$), seguida de la población Av-Alm que es la de Alvarado ($224.5 \pm 1.3 \mu\text{m}$) y por último a *B. ibericus* ($164.6 \pm 1.9 \mu\text{m}$) como la más pequeña de las cuatro. (Véase Tabla 1 y la fig.3).

En el caso de la variable *c* (ancho de la loriga, véase la tabla 1 y la fig. 3) y de su relación con *a* (*c/a*), de igual manera, los rotíferos pertenecientes a *B. sp.* 'México' no presentan diferencias entre las poblaciones de Oriental (U de Mann Whiyney; todas $p > 0.05$; tabla 1 y 4 en el anexo) con tamaño de $144.7 \pm 2.2 \mu\text{m}$. Sin embargo, al igual que el largo, en esta variable *B. sp.* 'Almenara' ($155.8 \pm 3 \mu\text{m}$) y *B. sp.* 'Alvarado' ($159.3 \pm 3 \mu\text{m}$) mostraron diferencias significativas (U de Mann Whitney; todas $p > 0.05$). En la relación del largo contra el ancho de la loriga, *B. ibericus* no mostró diferencias con *B.* 'México' (U de Mann Whitney; $p > 0.05$), ya que presentan una forma similar si los comparamos contra *B.* 'Almenara' ($0.672 \pm 0.004 \mu\text{m}$) y *B.* 'Alvarado' ($0.741 \pm 0.009 \mu\text{m}$) que tienen formas relativamente más alargadas.



Tabla 1 Se muestran los resultados obtenidos (media \pm error estándar) de las mediciones de las cinco variables (*a*, el largo de la loriga; *b*, el ancho de la apertura de la cabeza; *c*, el ancho de la loriga; *d*, largo de las espinas interiores; y *e*, tamaño de la espina media) que se representan en la Fig. 2 y las relaciones alométricas asociadas con la forma del organismo (*c/a*, *b/a*, *d/e*, *d/a*). Todas las mediciones están μm . Los datos que presentan la misma letra indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones según el test post-hoc U de Mann-Whitney ($p > 0.05$).

Población	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>c/a</i>	<i>b/a</i>	<i>d/e</i>	<i>d/a</i>
LPr	208.14 \pm 2.8 ^b	100.5 \pm 1.5 ^b	146.52 \pm 2 ^b	25.9 \pm 0.3 ^b	17.18 \pm 0.3 ^b	0.701 \pm 0.005 ^b	0.475 \pm 0.009 ^a	1.136 \pm 0.01 ^c	1.114 \pm 0.01 ^b
Alc	211.5 \pm 3 ^b	102.69 \pm 2.6 ^{bc}	143.66 \pm 2.2 ^b	26.48 \pm 0.3 ^{bc}	17.73 \pm 0.3 ^{bc}	0.697 \pm 0.005 ^b	0.486 \pm 0.003 ^{ac}	1.115 \pm 0.01 ^c	1.121 \pm 0.01 ^{bc}
Atx	212.38 \pm 2.3 ^b	103.3 \pm 1.3 ^c	147.06 \pm 1.5 ^b	26.56 \pm 0.3 ^c	18.01 \pm 0.4 ^c	0.696 \pm 0.005 ^b	0.489 \pm 0.003 ^b	1.125 \pm 0.01 ^c	1.135 \pm 0.01 ^c
Alm	232.70 \pm 1.8 ^d	108.36 \pm 1.6 ^d	155.83 \pm 2.2 ^c	27.98 \pm 0.6 ^e	23.89 \pm 0.3 ^e	0.672 \pm 0.004 ^a	0.576 \pm 0.008 ^e	0.912 \pm 0.02 ^b	0.982 \pm 0.02 ^a
Av-Alm	224.51 \pm 1.3 ^c	106.25 \pm 1.2 ^d	159.93 \pm 2 ^c	22.4 \pm 0.4 ^d	20.21 \pm 0.4 ^d	0.741 \pm 0.009 ^c	0.543 \pm 0.005 ^d	1.474 \pm 0.01 ^d	1.474 \pm 0.01 ^c
<i>B. ibericus</i>	164.52 \pm 1.9 ^a	86.36 \pm 1.2 ^a	127.42 \pm 1.8 ^a	16.78 \pm 0.5 ^a	10.26 \pm 0.2 ^a	0.771 \pm 0.003 ^d	0.523 \pm 0.007 ^c	0.624 \pm 0.01 ^a	1.536 \pm 0.01 ^d

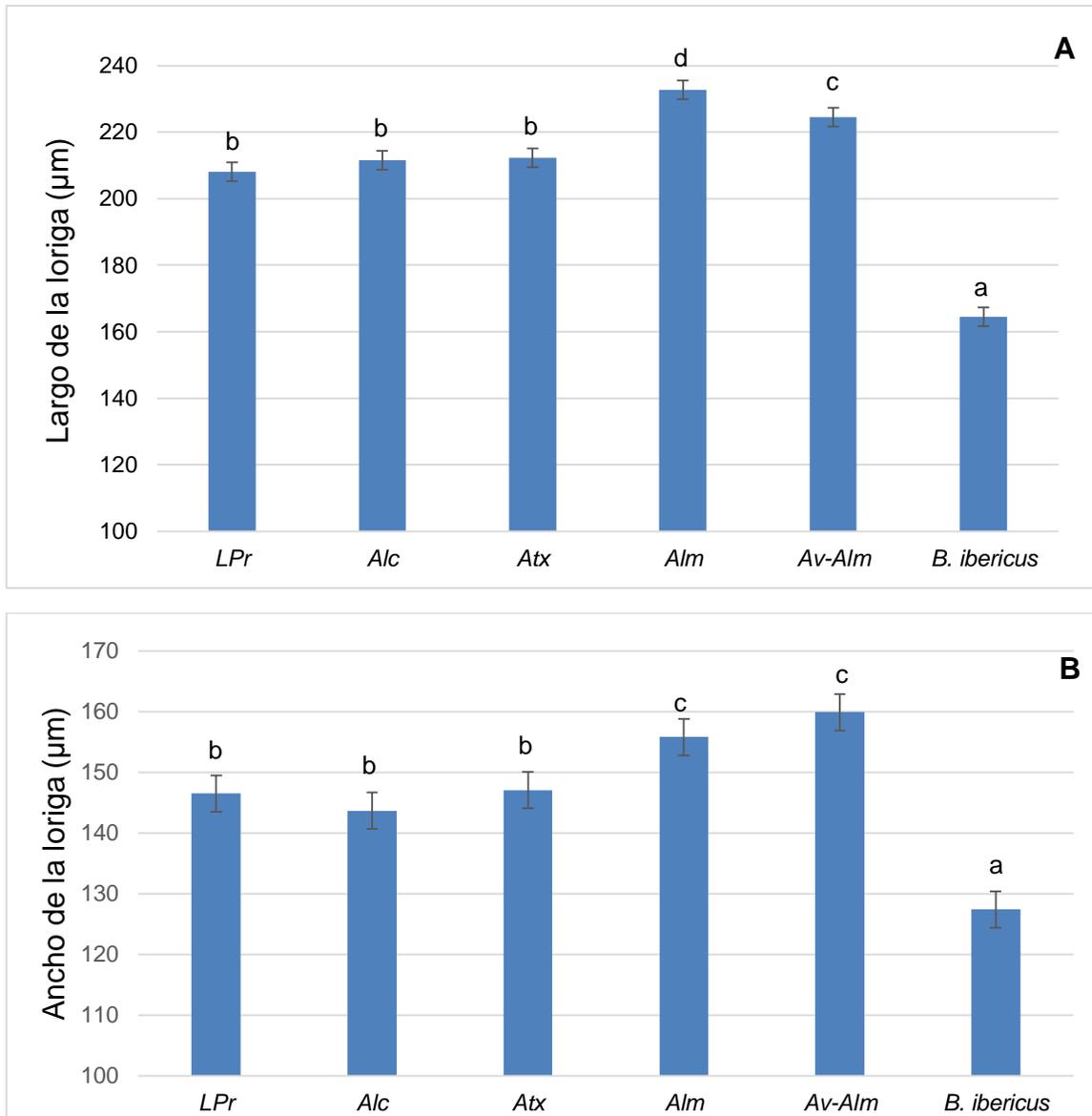


Figura 3 Se muestran los resultados (media \pm error estándar) de la variable a que corresponde al largo de la loriga (**A**) y la variable b que es el ancho de la loriga (**B**) de los individuos analizados de cada población. Poblaciones con diferente letra indican que hay diferencias significativas entre ellas según la prueba *post-hoc* de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

En las variables relacionadas con el tamaño de las espinas (*d* y *e*, véase; Tabla 1; y 5^a y 6^a en el anexo) y su relación alométrica (*d/e*) se repitió el mismo patrón que con las variables anteriores, las poblaciones de Alchichica, Atexcac y la Preciosa forman una agrupación aparte de las demás poblaciones (U de Mann-Whitney; todas $p > 0.05$);



mientras que *B. sp* 'Almenara', *B. sp* 'Alvarado' y *B. ibericus* están separadas entre sí (U de Mann-Whitney; todas $p < 0.05$).

El ancho de la apertura de la cabeza (variable *b*) tuvo diferencias significativas en la prueba de Kruskal-Wallis (Todas $p < 0.05$), y con la prueba de U de Mann Whitney se formaron varios grupos, uno con las poblaciones de *B. sp*. 'Almenara' ($108.3 \pm 1.9 \mu\text{m}$) y *B. sp*. 'Alvarado' ($106.3 \pm 1.2 \mu\text{m}$), y, en la cuenca Oriental la población de Alchichica (102.2 ± 2.6) μm no presenta diferencias respecto a las otras dos (LPr, $100.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$ y Atx $103 \pm 1.3 \mu\text{m}$), pero estas sí presentan diferencia entre ellas (U de Mann-Whitney todas $p > 0.05$). *B. ibericus* queda como un grupo aparte. La relación de apertura de la cabeza contra el largo de la misma (*b/a*), agrupa a todas las poblaciones como se describió previamente (U de Mann-Whitney; todas, $p < 0.05$) (Véase tabla 1 y las tablas de U de Mann-Whitney en el anexo).

Resumiendo, tanto en las cinco variables morfométricas como en sus relaciones alométricas principales, las tres poblaciones pertenecientes a los lagos de la Cuenca Oriental no presentaron diferencias morfológicas significativas, pero sí contra las demás poblaciones analizadas. Resaltando el largo de la loriga como la variable donde se aprecian mayores diferencias y que, junto con el ancho de la mismas y sus relaciones alométricas, separa a *B. sp*. 'México' y las demás poblaciones entre sí.



Morfología geométrica

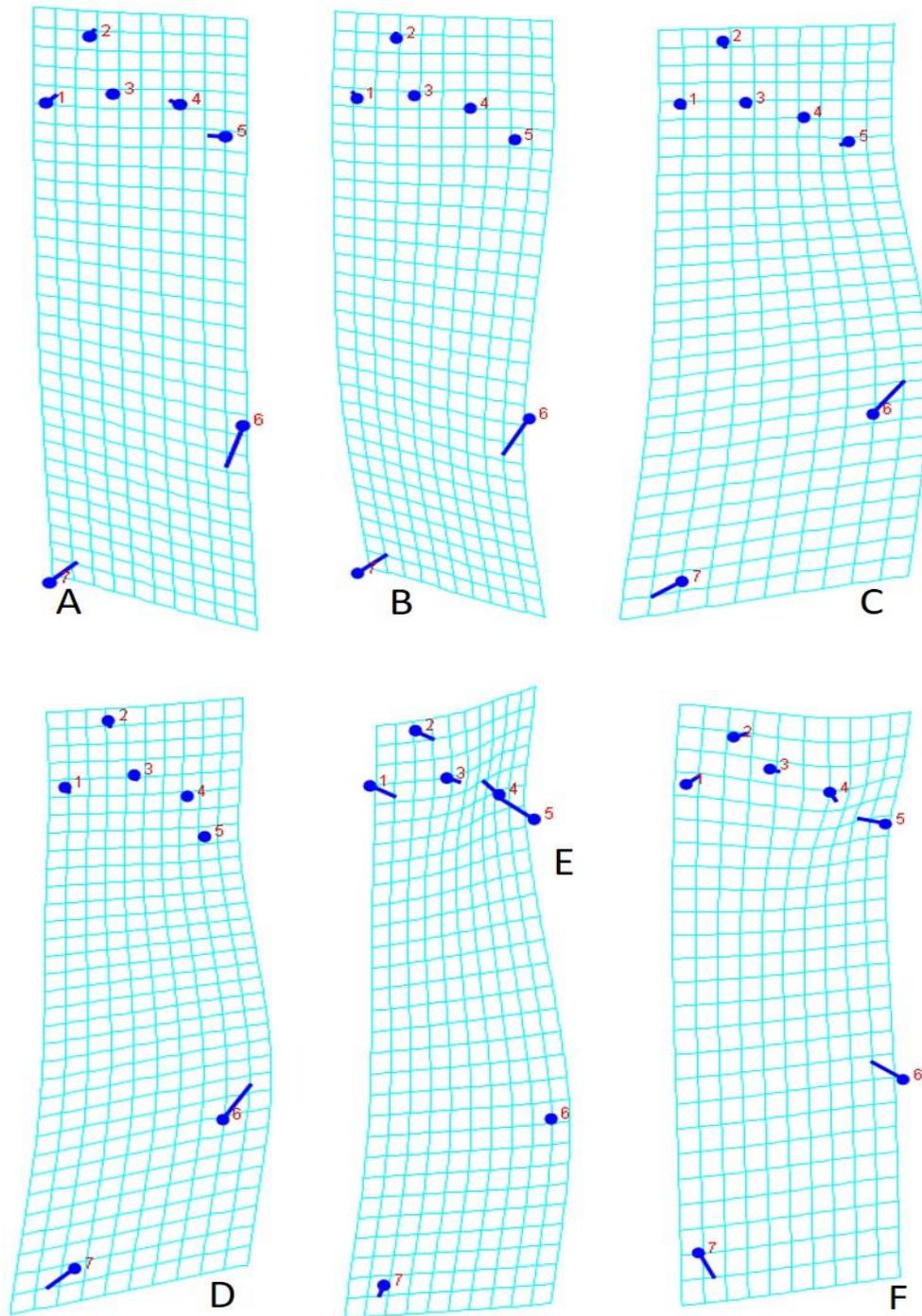


Figura 4 Se muestra la ubicación general de los *landmarks* en una red de deformación en un plano cartesiano representado por los centroides y las líneas de tendencia que representan a las seis poblaciones estudiadas, obtenidas a través de la interpolación de todas las imágenes digitales de cada



uno de los individuos analizados provenientes de las poblaciones experimentales. **A**, Alc; **B**, LPr; **C**, Atx; **D**, Alm; **E**, Av-Alm y **F**, *B. ibericus*.

Los *landmarks* de las imágenes digitales fueron transformados en coordenadas de GPA, obteniendo una configuración general para cada población, es decir que se recreó un rotífero virtual en base al promedio de todos los *landmarks* de cada una de las imágenes digitales (véase Fig. 4), representados por un centroide en cada uno de los siete puntos analizados. En las figuras se aprecian claramente los centroides, algunos de los cuales poseen una línea de tendencia, que muestra la variabilidad de la forma intra-poblacional. También se puede apreciar claramente que hay diferentes modificaciones espaciales entre las poblaciones. El análisis de ANOVA indicó (Véase tabla 3 y 4) que entre las poblaciones sí se encuentran diferencias significativas en al menos uno de los siete *landmarks* que delimitan la forma de los individuos y en el tamaño de su centroide.

Los datos fueron comparados mediante un análisis de correlaciones canónicas, para poder determinar las relaciones lineales entre ellos, se pueden agrupar y separar entre poblaciones. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 3 y 4.

El análisis se realizó con 5 variables canónicas (CV), de estas la que tuvo una mayor correlación canónica fue CV1, con un valor propio (i.e., *eigen values*) de 3.276 y un porcentaje de varianza explicada del 55.55%. Esta variable canónica representa la varianza morfológica en las espinas de las poblaciones (véase, Fig. 7). Seguida de CV2, con un valor propio de 2.028 y un porcentaje de varianza explicado del 34.38%, con un valor porcentual acumulativo entre las dos de 89.92%. Esta variable representa la varianza de los o 5 a 7, aquellos que delimitan la forma de la loriga. Ya con menor valor explicativo sigue CV3, alcanzando un valor porcentual acumulativo total de 96.21%; que señalan las diferencias entre los *landmarks* 3 a 5 que delimitan la apertura de la loriga. Las variables CV4 y CV5 no representan algún porcentaje de varianza importante (>3%).



Tabla 2 Resultados del análisis de correlación canónica de los *landmarks*. Donde se observa que la varianza obtenida se encuentra en 5 variables canónicas (CV). Se muestran los valores propios y la varianza explicada por cada variable canónica y el porcentaje acumulativo de la varianza.

VC	Valor propio (i.e., eigenvalores)	% varianza	% acumulativo
1	3.276	55.545	55.545
2	2.028	34.377	89.921
3	0.371	6.295	96.216
4	0.164	2.79	99.006
5	0.058	0.994	100

De acuerdo con lo anterior, Se utilizaron las variables CV1 y CV2 para realizar un análisis gráfico que muestra a todos los individuos analizados y, de esta forma, poder conocer los patrones de variación entre las poblaciones y su posible agrupación en conjuntos de datos. Para complementar este análisis, se adicionó un tercer eje (z), en el cual se representa el largo de la loriga, ya que fue la variable que mostró la mayor varianza en el análisis de morfología tradicional. El resultado se muestra en la Figura 5.

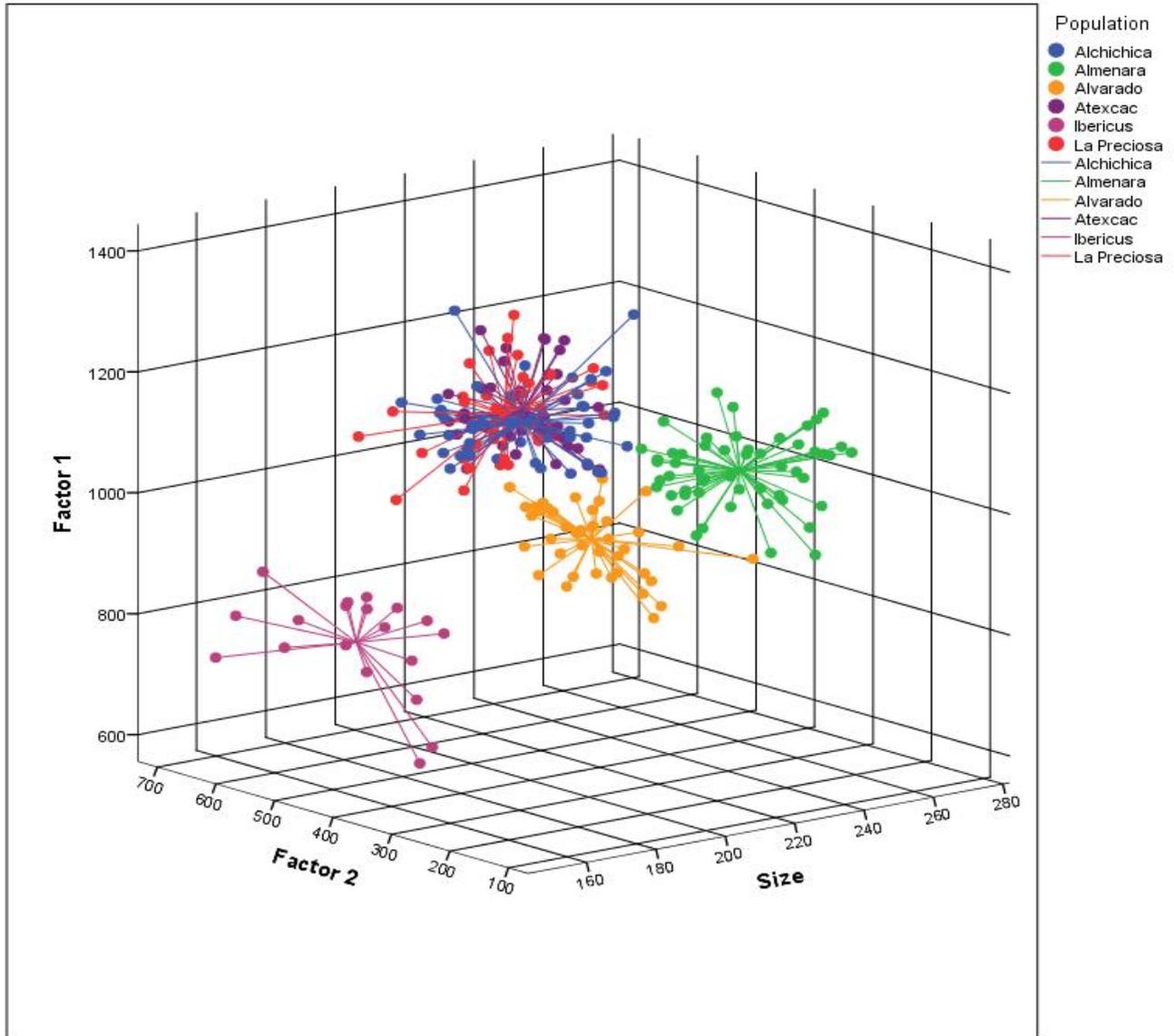


Figura 5 Se muestran las variables de correlación canónica resultado del análisis de morfología geométrica y el largo de la loriga. Factor 1 es la variable canónica 1 (CV1), Factor 2 es la variable canónica 2 (CV2), Size es el largo de la loriga. Cada punto es un individuo analizado por población. Las líneas que salen de cada punto se dirigen al centroide generado por los análisis de Procrustes de cada una de las poblaciones.

En la Fig. 5 se muestra que, en efecto, las poblaciones de la cuenca Oriental no presentan diferencias significativas entre sí en su varianza morfológica y el tamaño de su centroide generado por el análisis de Procrustes (valor de $p > 0.05$), por lo que forman un grupo que está claramente separado de las otras tres poblaciones. Tanto



B. sp. 'Almenara', *B. sp.* 'Alvarado' y *B. ibericus* muestran diferencias significativas en su forma y el tamaño de su centroide (valor de $p < 0.05$). Así, se observa que se forman cuatro grupos que pueden diferenciarse claramente, lo que indica diferencias significativas en la forma de la loriga de estas especies. El programa realiza igual una tabla de la distancia de Procrustes comparando a las poblaciones y donde se muestran las diferencias estadísticas (Tablas 3 y 4).

Tabla 3 Distancia de Procrustes entre las poblaciones.

	Alc	Alm	Av-Alm	Atxc	<i>B. ibericus</i>
Alm	0.0514				
Av-Alm	0.031	0.0543			
Atx	0.0504	0.0793	0.0481		
<i>B. ibericus</i>	0.0743	0.1059	0.0685	0.0366	
LPr	0.0524	0.0529	0.0347	0.0527	0.0734

Tabla 4 Valores- p ($< .05$) para el test de permutación de la distancia de Procrustes entre las poblaciones. Asterisco (*) significa que no hay diferencias estadísticamente ($P > .05$) significativas entre esos grupos de datos.

	Alc	Alm	Av-Alm	Atx	<i>B. ibericus</i>
Alm	.039				
Av-Alm	.012	<.001			
Atx	.059*	<.001	<.001		
<i>B. ibericus</i>	<.001	<.001	<.001	.011	
LPr	0.741*	.004	.017	.075*	<.001



Por lo tanto, los análisis morfológicos realizados, tanto los de morfología tradicional como geométrica, muestran que el rotífero *B. sp.* 'México' de la cuenca Oriental, puede diferenciarse morfológicamente de otras especies filogenéticamente cercanas pertenecientes al mismo linaje SM (véase, Mills *et al.*, 2016). Resaltando como sus principales diferencias el largo de loriga (variable *a* del análisis de morfología tradicional) y su varianza morfológica en la configuración espacial de las espinas antero-dorsales (*landmarks* 1 a 5) y la posición de la zona más ancha de la loriga (*landmark* 6). Así mismo, se muestra que las poblaciones de *B. sp.* 'Alvarado' y *B. sp.* 'Almenara' igualmente, presentan diferencias entre ellas. *B. ibericus* arrojó los resultados esperados, estando siempre separado de las demás poblaciones.



DISCUSIÓN

En esta tesis fue posible discernir entre diferentes especies pertenecientes al complejo críptico *Brachionus* grupo *plicatilis*, por medio de análisis comparados empleando herramientas de morfología tradicional y geométrica, sobre la base de su tamaño y la forma del cuerpo.

En los resultados de los análisis de morfometría tradicional se obtuvo que el tamaño es la principal característica para diferenciar a estas especies entre sí. Y la variable *a* del análisis, que corresponde a la longitud de la lorica, puede ser utilizada como un buen descriptor para, de manera general, diferenciar entre especies. Con base a ellas las poblaciones se diferenciaron de la siguiente manera: *B. sp.* 'Almenara' es la de mayor tamaño, seguida de *B. sp.* 'Alvarado', luego las tres poblaciones pertenecientes a los lagos de la cuenca Oriental, La Preciosa, Atexcac y Alchichica (que no presentan diferencias significativas entre ellas) y, finalmente, *B. ibericus* como la de menor tamaño. De acuerdo con la evidencia histórica, esta medida fue la primera utilizada para diferenciar entre morfotipos de *B. plicatilis* s.l. en los trabajos de acuicultura (véase, Fukusho *et al.*, 1982; Fu *et al.*, 1991) y que terminó por reconocerse como un carácter sinapomórfico (Mills *et al.*, 2016) que diferencia entre los tres clados en base a su tamaño relativo. Por lo que, hablar de los morfotipos L (*large*; para los de mayor tamaño), SM (*small-medium*; para aquellos de tamaño intermedio) y SS (*small-small*; para los más pequeños) propuestos por Gómez *et al.* (1995) y Serra (1995), siguen teniendo sentido no sólo práctico, sino biológico y filogenético.

Todas las demás variables de este análisis también muestran diferencias estadísticamente significativas, pero la mayoría están relacionadas con el tamaño de la lorica, es decir, con todas se ordenan a las poblaciones del mismo modo: *B. sp.* 'Almenara' la más grande y *B. ibericus* la más pequeña. Sin embargo, al relacionar estas variables entre sí nos muestran algunas relaciones alométricas que permiten identificar formas relativamente diferentes entre las especies. Al comparar *c/a* (ancho contra largo) se obtiene que las poblaciones con mayor tamaño como *B.* 'Almenara' y *B.* 'Alvarado', son también más alargadas mientras que, las que tienen menor tamaño



(en este caso *B. ibericus* y las poblaciones de la cuenca Oriental) son de cuerpos más cortos y redondeados. También se puede resaltar que, al comparar el tamaño de las espinas contra el largo (d/a), las poblaciones que tienen un menor tamaño tienen sus espinas relativamente más largas que aquellas que presentan un mayor tamaño. Por lo que los resultados de este análisis pueden discernir en base al tamaño y la forma relativa de los individuos.

Trabajos como el de Ciros-Pérez *et al.* (2001) ya mostraban que el tamaño de la loriga es un factor para discriminar entre los rotíferos pertenecientes al complejo. Estos autores encontraron diferencias entre las poblaciones que estudiaron, lo que los condujo a realizar una caracterización morfológica y hacen la descripción taxonómica de *B. ibericus* y la redescrición de *B. plicatilis* s.s. y *B. rotundiformis* s.s. Así, utilizando también relaciones alométricas describen que los individuos pertenecientes a *B. plicatilis* s.s. son menos anchos y más alargados, y que sus espinas son relativamente más chicas en relación al largo de su cuerpo en comparación con los otros dos grupos. Los rotíferos pertenecientes a *B. rotundiformis*, por su parte, son mucho más redondeados y *B. ibericus* se encuentra en un punto intermedio de forma. Este patrón coincide con los resultados de las relaciones ancho/largo y tamaño de las espinas/largo de la loriga obtenidas en esta tesis y que discriminan adecuadamente entre las poblaciones de *B. sp.* 'Mexico' y las demás, a pesar de que todas pertenecen al mismo clado (SM), donde, *a priori*, era de esperarse que las diferencias morfológicas fueran menores.

De manera complementaria, se realizó el análisis de morfometría geométrica para tener una mejor caracterización de la divergencia de forma de las poblaciones, ya que actualmente se ha comprobado que esta herramienta es muy útil en los distintos campos de la biología, ayudando a poder diferenciar especies con poca divergencia morfológica pertenecientes a diferentes grupos (Rohlf *et al.*, 1996; Sheets *et al.*, 2006; Mutanen & Pretorius, 2007; Clabaut *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2010; Viscosi & Cardani, 2011). Los resultados obtenidos en esta tesis a partir de la configuración de los *landmarks* indican que sí hay divergencia en la forma entre las especies.



La configuración utilizada permite conocer no sólo la forma de la lorica, sino también la que se pueda presentar en las espinas antero-dorsales. El análisis muestra que las principales diferencias se encuentran en la posición espacial de las espinas y del ancho de los individuos, que caracterizan a las variables canónicas uno (CV1) y dos (CV2), respectivamente, del análisis multivariado realizado. Este par de variables explican en conjunto el 89.9% de la varianza de la forma e indican que las poblaciones estudiadas muestran diferencias morfológicas entre ellas, siendo congruentes con los resultados obtenidos con el análisis de morfología lineal tradicional, que indican que las poblaciones de la Cuenca Oriental no presentan diferencias morfológicas entre ellas pero que, igualmente, se diferencia de las demás especies, las cuales también pueden ser separadas correctamente entre sí.

Otros trabajos de investigación en la que se utiliza este tipo de análisis para resolver problemas de estasis morfológica entre especies filogenéticamente muy cercanas es el caso de Fontaneto *et al.* (2007), quienes realizaron un estudio similar para poder diferenciar dos especies de rotíferos del complejo *B. plicatilis* pertenecientes al morfotipo L. Sin embargo, la posición de los *landmarks* que utilizaron estos autores, solo recorría el contorno de la lorica, sin considerar las espinas y además utilizaron también la morfología del trophi. Sus resultados encontraron diferencias sutiles tanto en la lorica como el trophi que permitió diferenciarlos como dos entidades taxonómicas, una correspondiente a *B. plicatilis* s.s. y la otra que describieron bajo el nombre de *B. manjavacas*. De manera parecida, Giri & José de Paggi (2006) trabajaron con otra especie del mismo género, en la cual se reconocen diferentes entidades al nivel subespecífico de "forma", los denominados *B. caudatus* f. *ahlstromi* y *B. caudatus* f. *austrogenitus*. En este estudio, la configuración de *landmarks* que ellos utilizaron también incluía a las espinas antero-dorsales y concluyeron en base a sus resultados que la morfología es conservativa y por lo tanto se trata de dos entidades taxonómicas distintas.

Los resultados obtenidos en esta tesis complementan los resultados obtenidos por Alcántara-Rodríguez *et al.* (2012), quienes trabajaron con las poblaciones de la



Cuenca Oriental y describen evidencia de adaptación local y divergencia genética entre ellas, concluyendo que se trata de una especie nueva de este complejo que aún no ha sido descrita y que, temporalmente han denominado *B. sp.* 'México'. Esta Tesis muestra que, a pesar de las divergencias ecológicas, no existe divergencia morfológica entre estas poblaciones. Por lo que ahora podemos decir que son genéticamente y morfológicamente iguales además que aún tienen el potencial de mantener flujo genético entre sí, aunque la población de La Preciosa ya tiene una divergencia ecológica importante.

Recientemente, Mills *et al.* (2016) realizaron un estudio integrativo, en el que reuniendo la mayor cantidad de información disponible de las especies dentro del complejo provenientes de todo el mundo y por medio de análisis de taxonomía molecular con las secuencias de los genes COI e ITS, concluyeron que existen al menos quince especies dentro del complejo (véase también Suatoni *et al.*, 2006), de las cuales sólo seis están descritas formalmente hasta la fecha. En base a estos datos realizaron un análisis enfocado en conocer la filogenia del grupo y, sus resultados indican que el tamaño de los individuos tiene una señal filogenética elevada. Además, establecen claramente la relación de *B. sp.* 'México' (clado SM7 *sensu* Mills *et al.*, 2016) con las otras seis especies hermanas del clado SM, siendo *B. sp.* 'Almenara' la especie filogenéticamente más cercana a *B. sp.* 'México'.

Así, esta tesis logra encontrar diferencias estadísticamente significativas en el tamaño y la forma entre tres linajes pertenecientes al morfotipo SM (de las cuales, solo *B. ibericus* tiene una descripción formal), y contribuir a aportar evidencia para que se pueda hacer en un futuro cercano la descripción apropiada de estos taxones con estatus indefinido (i.e., *nomina nuda*; International Code of Zoological Nomenclature, 1999). Dejando claramente establecido que las poblaciones de La Preciosa, Alchichica y Atexcac conforman una sola especie, *B. sp.* 'México', con características morfológicas únicas y claramente diferenciables de sus especies hermanas. Por otro lado, *B. sp.* 'Alvarado' y *B. sp.* 'Almenara' aunque no presenten divergencia genética entre ellas (Alcántara-Rodríguez, 2010; Mills *et al.*, 2016), nuestros resultados indican



que existen diferencias detectables en su tamaño y forma, por lo que es necesario un análisis más profundo para dilucidar la posible existencia de divergencia en algún otro rasgo (p. ej., reproductivo o ecológico), o bien la existencia de polimorfismos debidos a aislamiento geográficos, ecológico y/o deriva genética.

B. sp. 'México' está reconocido como una especie aún no descrita, de la cual, actualmente se conoce: (1) su divergencia genética y reproductiva dentro del clado SM; (2) su afinidad por las aguas relativamente dulces; (3) que presenta una relación filogenética muy cercana con *B. sp.* 'Almenara' y *B. ibericus*, y (4) que su distribución geográfica es limitada, se ha encontrado por el momento en sólo tres lagos cráter (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) y recientemente en el lago playa El Carmen (Jiménez-Cruz y Ciro-Pérez, comunicación personal), en la cuenca Oriental. Por lo que, los análisis de morfometría tradicional y geométrica realizados en esta tesis aportan información acerca de su morfología y la divergencia que presenta con respecto a especies cercanas, incrementado el conocimiento acerca de esta especie y su relación dentro del complejo de especies crípticas del complejo *B. plicatilis*, el grupo de rotíferos del cual se tiene más información de sus patrones de diversificación y evolución como con ninguno otro, dada su importancia en acuicultura, ecotoxicología, como modelo ecológico, fisiológico, etc. (Mills *et al.*, 2016).



CONCLUSIÓN

Los resultados de los análisis morfométricos indican que las tres poblaciones de los lagos La Preciosa, Alchichica y Atexcac ubicados en la Cuenca Oriental, México, no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas en su forma, por lo que no se distinguen morfológicamente. Sin embargo, se observaron diferencias significativas cuando se les compara con respecto a individuos pertenecientes a otras especies filogenéticamente cercanas ubicadas en el clado mediano (SM; *sensu* Gómez et al., 1995) del complejo *B. plicatilis*, como es el caso de *B. 'Almenara'* (poblaciones aisladas de Almenara, España y Alvarado, Veracruz) y *B. ibericus* (originalmente descrita en España) las cuales también muestran diferencias estadísticas entre sí.

Estos resultados, aunados a los publicados previamente sobre estos rotíferos (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012), que los identifican como una especie biológica con cohesión y aislamiento reproductivo, agrupamiento genético, rangos de tolerancia ecológica específicos, etc., proporcionan información suficiente para poder hacer la descripción taxonómica formal de la especie endémica que habita los lagos de la Cuenca Oriental que hasta ahora ha sido nombrada como *B. sp. 'México'*.



BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. C., Rohlf, F. J. y Slice, D. E. (2004) **Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”**. *International Journal of Zoology*. 71:5-16.
- Alcántara-Rodríguez, J. A. (2010) **Lagos-Crater de la Cuenca Oriental como modelo de diversificación biológica en sistemas de distribución insular: análisis de las poblaciones del rotífero *Brachionus* grupo *plicatilis***. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.
- Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Serranía-soto, C. R. 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., Lugo, A., Estrada, S., Ubeda, M. y Escobar, E. (1993) **La macrofauna Bentónica de los Axalapascos mexicanos**. *Actas VI Congreso Español de Limnología*. 33: 409-415.
- Armienta, M.A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Ceniceros, N. y Cruz, O. (2008) **Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes**. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 178: 249–258.
- Arredondo-Figueroa, J. L., Borrego, L. E., Castillo. R. M. y Valladolid, M. A. (1983) **Batimetría y morfometría de los lagos "maars" de la Cuenca de Oriental, Puebla, México**. *Biotica*. 8: 37-47.
- Arredondo-Figueroa, J. L. (1995) **Los axalapascos de la Cuenca Oriental, Puebla**. En: de la Lanza-Espino, G. y J.L. García-Calderón. *Lagos y presas de México*. Centro de Ecología y Desarrollo. México, D.F. pp. 65-87.



- Arredondo-Figueroa, J. L. (2002) **Los axalapascos de la Cuenca Oriental, Puebla.**
En: De la Lanza E.G., J.L. García-Calderón (Compiladores). *Lagos y presas de México*. AGT Editor, S.A. México, D.F. pp. 81-107.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. y Das, I. (2007) **Cryptic Species as a Window on Diversity and Conservation.** *Trends in Ecology and Evolution*. **22**: 148-155.
- Bookstein, F. L. (1991) **Morphometric tools for landmark data: Geometry and biology.** Cambridge, Cambridge University Press.
- Cain, A. J. (1954) **Animal species and their evolution.** Princeton Legacy Librerie, Hutchinson, Londres.
- Carrasco-Núñez, G., O, M. H. y Romero, C. (2007) **Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, eastern Mexico).** *Journal of Volcanology & Geothermal Research*. **159**: 179-197.
- Charin, N. N. (1947) **O novom vide kolovratki is roda Brachionus.** *Doklady Akademii Nauk SSSR*. **56**: 107-108.
- Ciros-Pérez, J. (2001) **Exclusión y competencia entre especies gemelas de rotíferos: mecanismos subyacentes.** Tesis Doctoral. Universitat de València, España.
- Ciros-Pérez J., Gómez, A. y 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.
- Ciros-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia. E. y Alcocer, J. (2015) **The role of ecophysiological and behavioral traits in structuring the zooplankton assemblage in a deep, oligotrophic, tropical lake.** *Limnology and Oceanography* **60**(6): 2158-2172.



- Clabaut, C., Bunje, P. M. E., Salzburger, W. y Meyer, A. (2007) **Geometric morphometric analyses provide evidence for the adaptive character of the Tanganyikan cichlid fish radiations.** *Evolution.* **61**: 560–578.
- CONABIO. (2015) recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/> el 24 de septiembre.
- David, J.R., Bocquet, C. (1975) **Similarities and differences in latitudinal adaptation of two *Drosophila* sibling species.** *Nature.* **257**: 588–590.
- Davies, S. J., Metcalfe, S. E., Caballero, M. E. y Juggins, S. (2002) **Developing Diatom-based transfer functions for central Mexican lakes.** *Hydrobiologia.* **467**:199-213.
- Del Toro, I. M. V., Manríquez, S. G. y Suazo, G. I. (2010) **Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa.** *International Journal of Morphology.* **28**(4): 977-990.
- Dobzhansky, T. (1937) **Genetics and the Origin of Species.** Columbia University Press, New York.
- Duarte, A. T., Barbosa, Jr. A. A. y Arruda, S. (2005) **Morphometric analysis of granulomas induced by *Mycobacterium bovis* suggests an influence of IFN-Gamma on the generation and modulation upon granulomatous inflammatory response in the different tissues.** *International Journal of Morphology.* **23**(4): 317-22.
- Dytham, C. (2011) **Choosing and using statistics: a biologist's guide.** Third edition. Willey-Blackwell editorial, Oxford, UK. Pp 142.
- Ereshefsky, M. (2001) **The Poverty of The Linnaean Hierarchy: A Philosophical Study of Biological Taxonomy.** Cambridge University Press, Cambridge.
- Escalante, T., Rodríguez, G., Gámez, N., León, L., Barrera, O. y Sánchez-Cordero, V. (2007) **Biogeografía y conservación de los mamíferos.** En: Luna, I., Morrone,



- J.J., y Espinosa, D. *Biodiversidad de faja volcánica Transmexicana*. UNAM, México, D.F. pp. 485-502.
- Fisk, D. L., Lattal, V., L. C., Knapp, R. y Pfrender, M. E. (2007) **Rapid evolution in response to introduced predators I: rates and patterns of morphological and life-history trait divergence**. *BMC Evolutionary Biology*. 7(22). doi.org/10.1186/1471-2148-7-22
- Fontaneto, D., Giordani, I., Melone, G. y Serra M. (2007) **Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex**. *Hydrobiologia*. 583: 297–307.
- Fontaneto, D., E. A. Herniou, C., Boschetti, M., Caprioli, G., Melone, C., Ricci y T. G. Barraclough. (2007) **Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers**. *PLoS Biol* 5(4): e87. doi:10.1371/journal.pbio.0050087.
- Fontaneto, D., Kaya, M., Herniou, E. A. y Barraclough, T. G. (2009) **Extreme levels of hidden diversity in microscopic animals (Rotifera) revealed by DNA taxonomy**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 53: 182-189.
- Fu, Y., Hirayama, K. y Natsukari, Y. (1991) **Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller**. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 151: 29-41.
- Fukusho, K. y Okauchi, M. (1982) **Straing and size of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, being cultured in Southeast Asian countries**. *Bulletin of National Research Institutes of Aquaculture*. 3: 107-109.
- Giri, F. y José de Paggi. (2005) **Geometric morphometric and biometric analysis for the systemati celucidation of *Brachionus caudatus* Barrois and Daday, 1894 (Rotifera Monogononta Brachionidae) forms**. *Zoologischer Anzeiger*. 244: 171-180.



- Gómez, A., Temprano, M. y Serra, M. (1995) **Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats.** *Journal of Evolutionary Biology.* **8:** 601-622.
- Gómez, A., Carvalho, G. R. y Lunt, D. H. (2000) **Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankter: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks.** *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences.* **267:** 2189-2197.
- Gómez, A., Serra, M., Carvalho, G. R. y Lunt, D. H. (2002) **Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera).** *Evolution.* **56:** 1431-1444.
- Halfpeter, E. y Ezcurra, G. (2002) **¿Qué es la biodiversidad?** En: **La diversidad biológica de Iberoamérica I.** Acta Zoológica Mexicana. Volumen especial. México, D. F. Pp 3-24
- Hwang, D. S., Dahms, H. U., Park, H. G. y Lee, J. S. (2013) **A new intertidal *Brachionus* and intrageneric phylogenetic relationships among *Brachionus* as revealed by allometry and CO1-ITS1 gene analysis.** *Zoological Studies.* **52:** 1-10.
- Jungers, W. L., Falsetti, A. B. y Wall, C. E. (1995) **Shape, relative size, and size-adjustments in morphometrics.** *American Journal of Physical Anthropology.* **38:** 137-61.
- Kendall, D. G. (1977) **The diffusion of shape.** *Journal of Applied Probability.* **9:** 428-30.
- Klingenberg, C. P., Barluenga M. y Meyer, A. (2002) **Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry.** *Evolution.* **56:** 1909-1920.



- Klingenberg, C. P. y Monteiro, L. R. (2005) **Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications.** *Systematic Biology*. **54**: 678-688.
- Klingenberg, C. P. (2011) **MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics.** *Molecular Ecology Resources*. **11**: 353-357.
- Knowlton, N. (1993) **Sibling Species in the Sea.** *Annual Reviews in Ecology and Systematics*. **24**(1): 189–216.
- Jeffries, M. (1997) **Biodiversity: from concept to crisis.** En **Biodiversity and conservation.** Routledge Taylor and Francis group, editorial. Londres. pp. 4-6.
- Lee, M. S. Y. (2003) **Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean Rank.** *Journal of Evolutionary Biology*. **13**: 179-188.
- Lomelí-Ramírez, N. A. (2013) **La salinidad como barrera ecológica en los patrones de dispersión y colonización de las estructuras de resistencia zooplanctónicas de la Cuenca Oriental, México.** Informe del Laboratorio de Investigación Científica y Tecnológica I y II para obtener el título de Bióloga. FES Iztacala, UNAM. 45 p.
- Macek, M., Alcocer, J., Lugo Vázquez, A., Martínez-Pérez, M. E., Peralta-Soriano L. y Vilaclara-Fatjó, G. (2009) **Long term picoplankton dynamics in a warm-monomictic, tropical high altitude lake.** *Journal of Limnology*. **68**: 183–192.
- Marcus, L. F. (1990) **Traditional morphometrics.** En: *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop.* Rohlf, F. J. & Bookstein, F. L. (Eds). Special Publication Number 2. Ann Arbor, Michigan, The University of Michigan. Museum of Zoology. pp. 77-122.
- Marsh, A. C., Ribbink, A. J. y Marsh, B. A. (1981) **Sibling species complexes in sympatric populations of *Petrotilapia Trewavas* (Cichlidae, Lake Malawi).** *Zoological Journal of the Linnean Society*. **71**(3): 253–264.



- Matamala, F., Fuentes, R. y Ceballos, M. (2006) **Morfología y morfometría del disco de la articulación témporomandibular en fetos y adultos humanos.** *International Journal of Morphology*. **24**(2): 245-50.
- Mayr, E. (1942) **Systematics and the origin of species.** Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. (1996) **What is a species, and what is not?** *Philosophy of Science* **63**(2): 262.
- Mills, S., Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciros-Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Hinson-Galindo, K., Jersabek, C. D., Malekzadeh-Viayeh, R., Leasi, F., Lee J.-S., Mark-Welch, D. B., Papakostas, S., Riss, S., Segers, H., Serra, M., Shiel, R., Smolak, R., Snell, T. W., Stelzer, C.-P., Tang, C. Q., Wallace R. L., Fontaneto, D. y Walsh E. J. (2016) **Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy.** *Hydrobiologia*. DOI 10.1007/s10750-016-2725-7
- Mishler, B. (2000) **Getting rid of species?** En: **Species: New Interdisciplinary Essays.** R. A. Wilson, editorial. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 307–315.
- Montero-Pau, J., Ramos-Rodríguez E., Serra, M. y Gómez, A. (2011) **Long-term coexistence of rotifer cryptic species.** *PLoS ONE*. **6**(6): e21530. dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021530
- Montiel-Martínez, A., Ciros-Peréz, J., Ortega-Mayagoitia, E. y Elías Gutiérrez, M. (2008) **Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiptomus garciai* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species.** *Journal of Plankton Research*. **30**(10): 179-1093.
- Müller, O.F. (1786) **Animacula infusoria fluviatilia et marina, quae detexit, systematice descripsit et ad vivum delineari curavit.** Havniae [Copenhagen] et Lipsiae [Leipzig]: cura Othonis Fabricii, typis Nicolai Mölleri.



- Mutanen, M. y Pretorius, E. (2007) **Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia.** *Systematic Entomology.* **32:** 371-386.
- Nuñez, I., Gonzales-Gaudio, E. y Barahona, A. (2003) **Biodiversity: History and context of a concept.** *Interciencia.* **28:** 387-393.
- Ortells, R., Snell, T. W., Gómez, A. y Serra, M. (2000) **Patterns of genetic differentiation in resting egg banks of a rotifer species complex in Spain.** *Archiv für Hydrobiologie.* **149:** 529-551.
- Oxnard, C. y O'Higgins, P. (2009) **Biology clearly needs Morphometrics! Does Morphometrics need Biology?** *Biological Theory.* **4:** 84-97.
- Palopoli, M. F. y Wu, C. I., (1994) **Genetics of hybrid male sterility between drosophila sibling species: A complex web of epistasis.** *Genetics.* **138(2):** 329–341.
- Papakostas, S., Triantafyllidis, A., Kappas, A. y Abatzopoulos, T. J. (2005) **The utility of the 16S gene in investigating cryptic speciation in the *Brachionus plicatilis* species complex.** *Marine Biology.* **147:** 1129-1139.
- Paterson, H. E. H. (1985) **The recognition concept of species.** En: **Species and Speciation** E. S. Vrba, editorial. Pretoria Transvaal Museum, Pretoria. pp. 21-29.
- Peralta-Soriano, L., Escobar, E., Alcocer J. y Lugo, A. (2002) **Oligochaetes from six tropical crater lakes in Central México: species composition, density and biomass.** *Hydrobiologia.* **467:** 109-116.
- Pfenninger, M. M. y Schwenk, K. (2007) **Cryptic Animal Species are Homogeneously Distributed among Taxa and Biogeographical Regions.** *BMC Evolutionary Biology.* **7:** 121-126.



- Petrusek, A., Tollrian, R., Schwenk, K., Haas, A., y Laforsch, C. (2008) **A “crown of thorns” is an inducible defense that protects *Daphnia* against an ancient predator.** *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*. **106**: 2248-2252.
- Volobouev, V. T., Aniskin, V. M., Lecomte, E. y Ducros, J. F. (2002) **Patterns of karyotype evolution in complexes of sibling species within three genera of African murid rodents inferred from the comparison of cytogenetic and molecular data.** *Cytogenetic and Genome Research*. **96**: 1-4.
- Reyes, C. M. (1979) **Geología de la cuenca Oriental. Estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala.** Colección científica prehistoria. Instituto Nacional de Antropología en Historia, México.
- Rohlf, F. J. y Marcus, L. F. (1993) **A revolution in morphometrics.** *Trends in Ecology and Evolution*. **8**(4): 129-32.
- Rohlf, F. J., Loy, A., y Corti, M. (1996) **Morphometric analysis of Old World Talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial-warp scores.** *Systematic Biology*. **45**: 344-362.
- Segers, H. (1995) **Nomenclature consequences of some recent studies on *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Brachionidae).** *Hydrobiologia*. **313/314**: 121-122.
- Serra, M., y M. R. Miracle. (1983) **Biometric analysis of *Brachionus plicatilis* ecotypes from Spanish lagoon.** *Hydrobiologia*. **104**: 279-291.
- Sheets, H. D., Covino, K. M., Panasiewicz, J. M y Morris S. R. (2006) **Comparison of geometric morphometric outline methods in the discrimination of age-related differences in feather shape.** *Frontiers in Zoology*. **3**(15). DOI: 10.1186/1742-9994-3-15



- Stelzer, M., Sun, J., Kamphas, T., Fekete, S. P., y Zeng, A-P. (2011) **An extended bioreaction database that significantly improves reconstruction and analysis of genome-scale metabolic networks.** *Integrative Biology*. **3**: 1071-1086.
- Sokal, R. y Crovello, T. (1970) **The biological species concept: a critical evaluation.** *The American Naturalist*. **104**: 127-153.
- Solíς, V., Madrigal, P. y Ayales, I. (1998) **Convenio sobre la diversidad biológica. Un texto para todos.** Convention on Biological Diversity secretariat. UICN, FES, FAO, FARBEN. Costa Rica.
- Suatoni, E., Vicario, S., Rice, S., Snell, T. y 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.
- Tschugunoff, N. L. (1921) **Über das Plankton des nördlichen Teiles des Kaspisees.** *Raboty Volzhskoj Biologicheskoy Stancii, Saratov*. **6**: 159-162.
- Van Valen, L. (1976). **Ecological species, multispecies, and oaks.** *Taxon (International Journal for Plant Taxonomy)*. **25**: 233-239
- Viscosi, V. y Cardini, A. (2011) **Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: A simplified protocol for beginners.** *PLoS ONE*. **6**:10: e25630. [dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025630](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025630)
- Wahl, C., Li, T., Choden, T. y Howland, H. (2009) **Morphometrics of corneal growth in chicks raised in constant light.** *Journal of Anatomy*. **214**(3):355-61.
- Walker, K. F. (1981) **A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Müller, 1786.** *Hydrobiologia*. **81**: 159-167.



Wallace, A. R. (1865) **On the phenomena of variation and geographical distribution as illustrated by the Papilionidæ of the Malayan Region.** *Transactions of the Linnean Society of London* **25**: 1-71.

Wiley, E. O. (1978). **The Evolutionary species concept reconsidered.** *Systematic Zoology*. **27**(1): 17-26.

Wilson, E. (1988) **Biodiversity.** National Academy Press. Washington, D. C. Estados Unidos.

Young, M. T., Brusatte, S. L., Ruta, M. y de Andrade, M. B. (2010) **The evolution of Metriorhynchoidea (Mesoeucrocodylia, Thalattosuchia): an integrated approach using geometric morphometrics, analysis of disparity, and biomechanics.** *Zoological Journal of the Linnean Society*. **158**: 801-859.



Anexo

Tabla 1^a Se muestran en la tabla los resultados obtenidos en el test de Kruskal-Wallis, todos los resultados cuyo valor de significancia sea $p < 0.05$ presentan diferencias estadísticamente significativas.

	a	b	c	d	e
X^2	112.016	98.897	88.783	110.170	164.650
gl	5	5	5	5	5
Valor de p	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001

A continuación se mostrará una serie de tablas donde se pueden ver los resultados de la prueba U de Mann-Whitney. Debido a que en esta prueba se comparan las series de datos en parejas, con la finalidad de conocer con mayor exactitud dónde están estas diferencias estadísticas, se obtuvieron 9 tablas (una por variable), y se colocaron en este anexo para no mostrar información redundante en el apartado de Resultados. De este modo las tablas pueden ser revisadas por quien guste ver los detalles estadísticos.



Tabla 2ª Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable a: **Largo de la Loriga**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	24	12.5	0	1	0	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	660	896.5	257	1258	-	
	Valor de p	.000	.000	.000	.001	-	
Alm	U de Mann-Whitney	627.5	889.5	273.5	-		
	Valor de p	.000	.000	.000	-		
Atx	U de Mann-Whitney	573.5	631	-			
	Valor de p	.405	.251	-			
Alc	U de Mann-Whitney	1538.5	-				
	Valor de p	.900	-				
Lpr	U de Mann-Whitney	-					
	Valor de p	-					



Tabla 3^a Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable b: **Ancho de la cabeza**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	122	81	0	39	7	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	1023.5	1298	102	1743	-	
	Valor de p	.000	.001	0	.313	-	
Alm	U de Mann-Whitney	627.5	1060.0	100.5	-		
	Valor de p	.000	.000	0	-		
Atx	U de Mann-Whitney	23	440.5	-			
	Valor de p	.000	.052	-			
Alc	U de Mann-Whitney	1432	-				
	Valor de p	.455	-				
Lpr	U de Mann-Whitney	-					
	Valor de p	-					



Tabla 4ª Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable c: **ancho de la loriga**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	133	205	22	40	32	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	660	766	139	1492	-	
	Valor de p	.000	.000	.000	.054	-	
Alm	U de Mann-Whitney	1082.5	1074.0	435.5	-		
	Valor de p	.001	.000	0.001	-		
Atx	U de Mann-Whitney	644.5	494	-			
	Valor de p	.942	.114	-			
Alc	U de Mann-Whitney	1307	-				
	Valor de p	.140	-				
Lpr	U de Mann-Whitney	-					
	Valor de p	-					



Tabla 5^a Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable d: **espina interior**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	6	0	0	3	23.5	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	817.5	727	255.5	438.5	-	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	-	-
Alm	U de Mann-Whitney	1067.5	1400.0	600	-	-	-
	Valor de p	.000	.001	.004	-	-	-
Atx	U de Mann-Whitney	538	704.5	-	-	-	-
	Valor de p	.223	.661	-	-	-	-
Alc	U de Mann-Whitney	1395	-	-	-	-	-
	Valor de p	.336	-	-	-	-	-
Lpr	U de Mann-Whitney	-	-	-	-	-	-
	Valor de p	-	-	-	-	-	-



Tabla 6ª Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable e: **espina intermedia**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	317	207.5	8.5	14	18	-
	Valor de p	.001	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	235.5	742.5	237	798	-	
	Valor de p	.000	.000	0.000	0.000	-	
Alm	U de Mann-Whitney	93.5	335.5	370.5	-		
	Valor de p	.000	.000	.000	-		
Atx	U de Mann-Whitney	98.5	415	-			
	Valor de p	.000	.110	-			
Alc	U de Mann-Whitney	1026	-				
	Valor de p	.202	-				
Lpr	U de Mann-Whitney	-					
	Valor de p	-					



Tabla 7^a Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable c/a: **ancho/largo**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	99	66	4	14	164	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	185	911	386	725	-	
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	-	
Alm	U de Mann-Whitney	866	860	442,5	-		
	Valor de p	0.000	.000	.000	-		
Atx	U de Mann-Whitney	510	546	-			
	Valor de p	.210	.258	-			
Alc	U de Mann-Whitney	990	-				
	Valor de p	.102	-				
Lpr	U de Mann-Whitney	-					
	Valor de p	-					



Tabla 8ª Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable c/a: **cabeza/largo**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	172	190	63	42	113	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	231	1159	50	1046	-	
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	-	
Alm	U de Mann-Whitney	779	600,000	15	-		
	Valor de p	.000	.000	.000	-		
Atx	U de Mann-Whitney	28	530	-			
	Valor de p	.000	.220	-			
Alc	U de Mann-Whitney	1431	-				
	Valor de p	.452	-				
Lpr	U de Mann-Whitney	-					
	Valor de p	-					



Tabla 9ª Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable d/e: **Espina intermedia/espina media**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	46	74	2	392	86	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	980	1134	381	713.5	-	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	-	-
Alm	U de Mann-Whitney	306	531,000	63	-	-	-
	Valor de p	.000	.000	.000	-	-	-
Atx	U de Mann-Whitney	502	538	-	-	-	-
	Valor de p	.017	.223	-	-	-	-
Alc	U de Mann-Whitney	1311	-	-	-	-	-
	Valor de p	.146	-	-	-	-	-
Lpr	U de Mann-Whitney	-	-	-	-	-	-
	Valor de p	-	-	-	-	-	-



Tabla 10^a Se muestran los resultados de la U de Mann-Whitney en la variable d/a: **Espina intermedia/largo**. Las poblaciones fueron comparadas una contra una, aquellos resultados cuyo valor de significancia sea $P > 0.05$ no presentan diferencias estadísticamente significativas

Población		Lpr	Alc	Atx	Alm	Av-Alm	<i>B. ibericus</i>
<i>B. ibericus</i>	U de Mann-Whitney	149	140	46	148	96	-
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	.000	-
Av-Alm	U de Mann-Whitney	438	379	145	1223	-	
	Valor de p	.000	.000	.000	.000	-	
Alm	U de Mann-Whitney	628	664	618	-		
	Valor de p	.000	.000	.001	-		
Atx	U de Mann-Whitney	57	704.5	-			
	Valor de p	.000	.061	-			
Alc	U de Mann-Whitney	1358	-				
	Valor de p	.239	-				
Lpr	U de Mann-Whitney	-					
	Valor de p	-					