



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

DIVERSIFICACIÓN CRÍPTICA EN AMBIENTES ECOLÓGICOS
CONTRASTANTES: ANALISIS DE LA POSIBLE ESPECIACIÓN
ECOLÓGICA EN POBLACIONES DEL COPÉPODO

Leptodiptomus cf. sicilis

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIÓLOGA

PRESENTA
ELIZABETH BARRERA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE CIROS PÉREZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Hipótesis.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos particulares.....	13
Material y métodos.....	13
Área de estudio.....	13
Establecimiento y mantenimiento de cultivos en laboratorio.....	16
Experimentos de entrecruzamiento.....	17
Intrapoblacionales F1.....	17
Intrapoblacionales F2.....	17
Interpoblacionales F1.....	18
Interpoblacionales F2.....	18
Resultados.....	20
Discusión.....	24
Conclusiones.....	29
Referencias.....	30

DEDICATORIAS

A mis padres Ernesto y Ángeles por apoyarme, comprenderme y respetar mis decisiones, la culminación de éste proyecto y el objetivo logrado también es de ustedes, no me alcanzará una vida para agradecer todo su apoyo, sin embargo, haré lo mejor posible, los amo.

A mis hermanos, Ernesto porque tu fuerza y valentía son admirables y, de manera contrastante y a la vez complementaria la convicción y perseverancia de Daniel me hacen ser una mejor persona. Gracias por ser excelentes hermanos, mi mayor privilegio en nuestra familia fue haber crecido junto a ustedes, los amo.

A ti, Osman por acompañarme en este largo camino, por compartir con cariño y paciencia los buenos y malos momentos de esta maravillosa aventura que nos ha unido aún más, por el apoyo incondicional que siempre me has brindado.

A mis amores Harlett y Pato, a mis amigos y equipo de toda la licenciatura.

A mis compañeros del PILT, por los bonitos momentos que compartieron conmigo, en especial a Miri, Omar, Aideé y Arturo.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor de tesis Dr. Jorge Ciro Pérez por la confianza que me otorgó para realizar este proyecto, por el apoyo y la enseñanza que me dejó haber trabajado bajo su dirección.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las experiencias y oportunidades que me otorgó al aceptarme en esta grandiosa Institución. A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por darme las herramientas necesarias para culminar mi formación profesional. A mis profesores de toda la licenciatura, en particular a Carmen Álvarez, Roberto Velasco, Martha Salcedo e Hibraim Pérez por ser excelentes profesores.

A mi comité sinodal:

Dra. Sofía Solórzano Lujano gracias por todas las enseñanzas transmitidas durante sus clases, por sus consejos acertados y muy oportunos, por la orientación y el apoyo que siempre me ha brindado.

M. en C. Omar Alfredo Barrera Moreno “Sobrino” por todo el apoyo que me brindaste desde que ingrese al laboratorio, por tu trabajo previo, que me permitió desarrollar este maravilloso proyecto, y sobre todo gracias por tu amistad.

Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia y Dr. Raúl Cueva del Castillo por sus observaciones y correcciones.

A PRONABES, SEP, por los apoyos económicos otorgados durante la licenciatura. Al proyecto PAPIIT-UNAM IN217513 e IN222916 por la beca de realización de tesis y por el financiamiento para la realización de esta investigación.

Resumen

El copépodo calanoide *Leptodiaptomus* cf. *sicilis* ha sido registrado en tres lagos cráter y un lago tipo playa dentro de la Cuenca Oriental, México, cada uno de estos lagos tiene características limnológicas particulares, especialmente en lo tocante a la salinidad y régimen hidrológico. Estudios previos señalan que las poblaciones de *L. sicilis* tienen adaptaciones ecofisiológicas asociadas a las condiciones locales de cada lago, así como patrones de diferenciación genética, en particular, en el lago Atexcac. Sin embargo, los individuos todavía muestran reconocimiento sexual interpoblacional y descendencia viable a corto plazo (eclosión de larvas nauplio). El objetivo de este estudio fue analizar la compatibilidad reproductiva en condiciones de laboratorio entre las poblaciones del copépodo *L. cf. sicilis* provenientes de los lagos vecinos de la Cuenca Oriental con los fenotipos adaptados a las salinidades más contrastantes (*i. e.*, Atexcac con 6.5 g l^{-1} –lago salino- y La Preciosa con 1.1 g l^{-1} –lago dulceacuícola-), con la finalidad de evaluar la compatibilidad genética interpoblacional resultado de la divergencia ecológica. Se realizaron experimentos de entrecruzamiento intra e interpoblacionales en condiciones de laboratorio en una salinidad intermedia que los individuos de las dos poblaciones toleran (3.8 g L^{-1}) evaluando la formación de huevos y siguiendo el desarrollo de los nauplios que eclosionaron hasta su muerte o hasta llegar a la madurez sexual. De los individuos F1 que llegaron a la madurez se realizaron las cruzas entre los híbridos para la obtención de la F2 y se evaluó su fecundación, eclosión y la formación de la generación F3. Los resultados de los cruces interpoblacionales muestran que, en salinidades intermedias, existe reconocimiento sexual, fecundación, formación de híbridos y eclosión de larvas. Los resultados de los cruces interpoblacionales muestran que, en salinidades intermedias, existe reconocimiento sexual, fecundación, formación de híbridos y eclosión de larvas. El desempeño de la segunda generación (F2): Machos de Atexcac/Hembras de La Preciosa (MA/HLP) se ve afectado de manera importante ya que no sobrevivieron más allá del primer estadio larval N1. Por su parte, los pocos individuos que alcanzaron la fase adulta en la cruce recíproca de la segunda generación (F2): Machos de La Preciosa/Hembras de Atexcac (MLP/HA)

tuvieron un mejor desempeño, mostrando mayores porcentajes de fecundación, eclosión de larvas y tiempo en llegar a la madurez. Por el contrario, la F2 de los cruces control intrapoblacionales mostró una eficacia mayor, con la mayoría de los descendientes llegando en su madurez sexual. En conclusión, la eficacia biológica en términos de supervivencia, desarrollo y reproducción de los individuos F1 fue similar en ambas cruces interpoblacionales, aunque las cruces intrapoblacionales tuvieron una eficacia más alta. La eficacia biológica de la descendencia de los híbridos F2 fue asimétrica, ya que, los descendientes de la cruce recíproca MA/HLP no fueron viables. Estos resultados indican que existe un aislamiento reproductivo postcigótico asimétrico en las poblaciones de *L. cf. sicilis*, llevándonos a la conclusión de que, las dos poblaciones de *L. cf. sicilis* de la Cuenta Oriental representan a dos especies biológicas diferentes, una habitando el lago salino Atexcac y otra en el lago dulceacuícola La Preciosa de la Cuenta Oriental, México.

Palabras clave: copépodos, adaptación local, evolución adaptativa, diversificación críptica, especiación ecológica.

DIVERSIFICACIÓN CRÍPTICA EN AMBIENTES ECOLÓGICOS CONTRASTANTES: ANÁLISIS DE LA POSIBLE ESPECIACIÓN ECOLÓGICA EN POBLACIONES DEL COPÉPODO *Leptodiptomus cf. sicilis*

Introducción

Las diversas condiciones ambientales originadas por su posición geográfica, historia geológica, variación topográfica y de climas, han hecho de México uno de los países con mayor riqueza y diversidad biológica en el mundo (Flores-Villela y Navarro Sigüenza, 1993), que incluye una gran cantidad de cuerpos de agua epicontinentales, como lagos, lagunas y presas, entre otros. (Arredondo, 1995). Los cuerpos de agua epicontinentales y su diversidad biológica cada vez están más amenazados por las actividades humanas, el manejo ineficiente y la falta de planeación (Aguilar, 2003). Para poder conservar y aprovechar de manera adecuada los hábitats naturales, es necesario conocer la diversidad de organismos y monitorear sus cambios a través del tiempo, así como conocer la cantidad y composición de las especies de un lugar (Martens y Hamer, 1999).

La especie es considerada la entidad filogenética básica (Lee, 2003), en la que se fundamenta la construcción de clasificaciones biológicas (Mishler y Luna, 1997). Sin embargo, no se tiene un concepto universal que pueda aplicarse sin ambigüedades a todos los grupos de seres vivos. Se han propuesto distintos conceptos, como el biológico, el morfológico (o fenético) y el filogenético, entre otros. Aunque se refieren a un mismo tipo de entidad, cada definición tiene un énfasis distinto, las diferencias en cada concepto se deben a la naturaleza y procesos que originaron a las entidades (De Queiroz, 1998).

Sin embargo, Lee (2003) considera que, en general, el aislamiento reproductivo o el entrecruzamiento son un buen criterio para definir a una especie, por lo menos, en organismos de reproducción sexual, a las que denomina como “bioespecies”. Una idea que recuerda al muy conocido concepto biológico de especie (Dobzhanski, 1937; Mayr, 1942), el cual plantea que una especie es un grupo de organismos que en poblaciones naturales pueden o se cruzan entre sí, y que están aislados reproductivamente de otros grupos (Mayr, 1970), un concepto que ya había sido formulado por Alfred R. Wallace desde el siglo XIX (Wallace, 1865). Por lo tanto, desde esta perspectiva, la especiación se da en términos

de la evolución de mecanismos de aislamiento reproductivo y se dice que se ha completado cuando las barreras reproductivas son suficientes para prevenir el flujo de genes entre estas dos nuevas especies.

El concepto morfológico de especie es, probablemente, el concepto que en términos prácticos más se utiliza en muchas disciplinas biológicas. En este concepto se supone que cada especie se distingue de otra principalmente por las diferencias en los caracteres morfológicos de los organismos, por lo cual, de manera cotidiana, surgen problemas al encontrar especies con morfologías muy similares, con polimorfismos o con dimorfismo sexual. Además, se vuelve muy subjetivo, pues el autor tendría que fijar los límites (más o menos arbitrarios) de divergencia fenotípica para separar entre las especies. Por lo que, utilizar solamente la morfología por muy detallada que sea, no es suficiente para definir una especie pues pueden existir diferencias genéticas, fisiológicas, conductuales, o ecológicas aun cuando dos poblaciones sean muy cercanas filogenéticamente y parecidas en su forma (Knowlton, 1993; Skelton, 1993; Montiel-Martínez, 2006).

A los grupos de organismos de especies biológicas distintas pero difíciles o imposibles de distinguir por métodos morfológicos, se les denomina especies crípticas o gemelas, y son comunes en diversos grupos de organismos acuáticos (Knowlton, 1993). Entre ellos, los organismos zooplanctónicos presentan este problema de reconocimiento entre entidades biológicas (Ciros-Pérez *et al.*, 2001; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012) y, en particular, es frecuente que se presente en taxones en los que se han documentado amplias estenciones de distribución y tolerancia a diferentes condiciones del medio (Lee, 2000). Las principales consecuencias de no reconocer este fenómeno de especiación críptica es que se puede subestimar la riqueza de especies, su historia evolutiva, así como entender las características ecológicas de cada especie (Barrera Moreno, 2010).

La reproducción (elemento fundamental en los principales conceptos de especie utilizados en biología evolutiva en eucariontes: “*Biological Species Concept*”, Dobzhanski, 1937 y Mayr, 1942; “*Recognition Species Concept*”, Paterson, 1985) es la herramienta más

objetiva y sensible para distinguir entre diferentes especies (p.e., Lee, 2000; Monchenko, 2000; Lee y Frost, 2002; Dodson *et al.*, 2003; Lee, 2003), pues tiene límites más definidos que otros conceptos (véase Lee, 2003), además de que existe evidencia de que el aislamiento reproductivo puede evolucionar rápidamente entre poblaciones aisladas (Lee, 2000) por lo que se considera crítico en el proceso de especiación (Ting *et al.*, 2000).

La evaluación de la reproducción es una herramienta necesaria, que cuando se relaciona con otras herramientas complementarias como el uso de diferentes marcadores moleculares, análisis morfológico, comparación ecofisiológica, etc., han permitido revelar complejos de especies crípticas entre los copépodos, p.e. en *Diacyclops bicuspidatus* (Monchenko, 2000), *Eurytemora affinis* (Lee y Frost, 2002), *Acanthocyclops vernalis* (Dodson *et al.*, 2003), *Phyllognathopus viguieri* (Glatzel y Königshoff, 2005), *Leptodiaptomus novamexicanus* (Montiel-Martínez *et al.*, 2008), *Mastigodiaptomus albuquerquensis* (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014), etc.

En el análisis morfológico de poblaciones del taxón *Leptodiaptomus cf. sicilis*, Barrera Moreno *et al.* (2015) reportan que, a pesar de la existencia de diferencias en el tamaño general del cuerpo y la coloración de los organismos, no existen diferencias significativas en el tamaño o la forma de diversos caracteres diagnósticos analizados, particularmente aquellos involucrados en la reproducción. Dado que el reconocimiento de pareja sexual entre los copépodos no depende de factores visuales (Strickler, 1998), sino que depende de estímulos químicos que son altamente específicos (Strickler, 1998; Kiorboe *et al.*, 2005), no es extraño que en muchos casos (p. e., *E. affinis* y *A. vernalis*; Lee, 2000; Lee y Frost, 2002; Dodson *et al.*, 2003) se presente estasis morfológica entre especies cercanas, pues es probable que la selección sexual se manifieste en la evolución de señales químicas más allá que en la divergencia morfológica de caracteres sexuales secundarios, o bien, que las tasas de divergencia sean bajas, y/o que los patrones que observamos sean resultado de especiación reciente (Lee, 2000).

La especiación es el mecanismo por el cual, a partir de una especie, se pueden formar dos o más especies (Mayr, 1982) a partir de la evolución de barreras biológicas que

interrumpan el flujo génico (Futuyma, 1998). Dobzhansky (1937) propuso la existencia de dos tipos de barreras reproductivas que mantienen a las especies como entidades discretas, barreras precigóticas y postcigóticas. Las primeras evitan los entrecruzamientos mediante mecanismos de aislamiento que tienen lugar antes o durante la fecundación, que actúan antes del intercambio gamético. Estas barreras pueden ser ecológicas, temporales, conductuales, mecánicas y gaméticas. Por otro lado, las barreras postcigóticas afectan la viabilidad de los híbridos, ya sea porque interfieren en el desarrollo del cigoto, u ocasionando la esterilidad de los híbridos, ocasionando abortos espontáneos, muerte prematura o enfermedad, etc. La existencia de estas barreras es fundamental en el proceso de especiación, ya que estas fuerzas son las principales responsables de generar y mantener la biodiversidad (Coine y Orr, 2004).

De manera general, analizando los patrones de distribución geográfica de los organismos, se han propuesto dos modelos principales de especiación. La especiación alopátrida se origina cuando una o más poblaciones de la misma especie se separan por una barrera física que divide la distribución espacial de la especie, impidiendo el flujo genético entre las subpoblaciones, que, con el tiempo, terminan adaptándose a las condiciones de su medio y eventualmente, quedan aisladas reproductivamente. Es decir, la evolución del aislamiento reproductivo como subproducto de la divergencia evolutiva entre dos poblaciones (Ridley, 2004). Otro modelo es la especiación simpátrida, en la que dos subpoblaciones que comparten la misma área de distribución (p.e., el mismo lago), utilizan nichos ecológicos diferentes, por ejemplo, (diferentes condiciones de luz, temperatura o alimento como sucede en un mismo cuerpo de agua), etológico, mecánico o genético que impedirían el libre flujo de genes (Ridley, 2004; Ruíz-Gutiérrez y Rodríguez-Caso, 2009).

Entre los distintos modelos de especiación existen diferentes procesos que pueden causar divergencia en las poblaciones, como la deriva genética, la selección natural o mutación, estos factores pueden actuar al mismo tiempo, y, además, la divergencia puede estar acelerada si la adaptación a nuevos hábitats implica cambios genéticos importantes.

En la deriva génica también llamada especiación por cambio de pico, para que una población cambie de un “pico adaptativo” a otro tiene que cruzar un valle que, en principio,

implica una reducción en la eficacia biológica. La selección natural no podrá conducir a una población a través de este valle adaptativo, pero la deriva génica sí podrá cambiar la configuración genética de una población hasta situarla al otro lado del valle, donde la selección la conducirá hasta un nuevo pico adaptativo. La divergencia necesaria para producir independencia evolutiva también puede ser impulsada por selección natural. La selección disruptiva/diversificadora puede estar implicada en prácticamente todos los tipos de especiación, teniendo un papel preponderante en ciertos tipos de especiación alopatrica y simpátrica. Cuando las poblaciones quedan separadas geográficamente se dan las condiciones para que la adaptación al ambiente pueda seguir un curso diferente en cada población, implicando así la modificación de distintos genes. Como consecuencia, la especiación sería un subproducto de la unión de dos factores: separación y adaptación (Perfectti, F. 2002).

La selección sexual puede ser un factor preponderante en la aparición de barreras etológicas de aislamiento y, por tanto, ser un agente causal de especiación, como ha sido propuesto para explicar la divergencia en simpatria de varias especies de peces cíclidos en el lago Victoria, cuyos machos, aunque con casi idéntica morfología, presentan coloraciones nupciales distintivas (Seehausen y van Alphen 2000). Si las preferencias para el apareamiento difieren entre poblaciones animales, inmediatamente podríamos estar ante un tipo de barrera etológica, y si, además, se produce un cambio en la genitalia debido a estas preferencias, se trataría de un tipo de barrera mecánica. La selección sexual ha conducido en muchos insectos a diferencias poblacionales en la genitalia masculina y/o femenina, así como en el tipo de espermatozoides y de proteínas de la glándula accesoria. Además de este tipo de barreras precigóticas, hay evidencias de que la selección sexual puede estar implicada en la aparición de aislamiento postcigótico en forma de esterilidad híbrida (Wu *et al.*, 1996).

La especiación ecológica es el proceso de formación de nuevas especies por el cual surgen barreras al flujo génico entre poblaciones como resultado de la selección divergente en respuesta a factores ecológicos relevantes (véase, p.e., Nosil, 2012). Esta puede ocurrir en cualquier patrón de distribución geográfica de las poblaciones (alopatria,

parapatría o simpatría), siempre y cuando el proceso de conducción sea la selección divergente (Funk, 1998; Schluter, 2001; Coyne y Orr, 2004; Rundle y Nosil, 2005). Es decir, la selección actúa en direcciones contrarias en dos poblaciones, e incluye el caso particular en el cual la selección favorece dos fenotipos distintos, generalmente extremos, dentro de una misma población o metapoblación.

La especiación no es un proceso que ocurre en todas las poblaciones de una especie, sin embargo, existen dos procesos que pueden suceder entre ellas e independientemente de que se dé la especiación: (1) la adaptación local, en la que el fenotipo de un grupo de organismos evoluciona a las condiciones de un ambiente en particular, y (2) la plasticidad fenotípica, que puede definirse como la capacidad de un genotipo para producir varios fenotipos en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales a lo largo de su ontogenia (Kingsolver *et al.*, 2002).

La plasticidad fenotípica puede ser un mecanismo que facilite la evolución de los taxones al favorecer la modelación de un carácter específico en el acervo genético cuando los organismos de una población llegan a un nuevo entorno (p. e., un cuerpo de agua). De este modo, las variaciones del genotipo pre-existentes necesarias para generar la plasticidad podrían permitir a una población persistir en las nuevas condiciones, a pesar de que inicialmente podría estar subadaptada a ellas, la persistencia a través del tiempo de esas variaciones permitiría que nuevas variaciones genéticas surjan a través de mutaciones y/o la recombinación, reforzando la adaptación a las condiciones del medio recién colonizado (Pigliucci, 2005); con el tiempo la selección natural podría favorecer una disminución de la plasticidad y favorecer eventualmente la adaptación local.

En cuerpos de agua epicontinentales, la adaptación local de los organismos a condiciones particulares puede ser tan fuerte que, en relativamente poco tiempo, quedaría limitado el flujo genético entre poblaciones que, en principio, tienen una capacidad potencial de colonizar diversos ambientes a través de la dispersión (De Meester *et al.*, 2002). Las adaptaciones que un linaje puede haber adquirido con el paso de las generaciones podrían permitirle ventajas sobre los nuevos colonizadores, provocando a la

larga, el aislamiento reproductivo requerido para ser considerado como una especie biológica distinta.

La hipótesis de la monopolización (De Meester *et al.*, 2002) es planteada a partir de las evidencias de adaptación local en organismos acuáticos epicontinentales, explicando que cuando algunas variantes genéticas de una población en particular colonizan (por medios activos y/o pasivos) un nuevo hábitat, al no existir competidores, lo hace tan eficazmente que terminan acaparando los recursos y creciendo rápidamente. Con el tiempo esta adaptación inicial se ve complementada por factores de competencia intrapoblacional, selección por los depredadores y con la formación de un banco de estructuras de resistencia que refuerza el efecto fundador. De modo que, cuando nuevos genotipos de la misma especie invaden el lugar, se ven en desventaja al no tener la capacidad de obtener los recursos necesarios para desarrollarse adecuadamente y terminan siendo desplazados (De Meester *et al.*, 2002). Por lo tanto, de acuerdo con esta hipótesis, la adaptación local tiene un papel primordial durante el proceso de reducción del flujo genético intrapoblacional.

Este fenómeno puede ocurrir en organismos zooplanctónicos que habitan cuerpos de aguas epicontinentales, principalmente los lagos endorreicos aislados entre sí. Estos organismos presentan un alto potencial de dispersión pasiva (Hairston y Fox, 2009) por lo cual, es fácil comprender los registros de distribución geográfica muy amplia que se les han asignado en diversos taxones (Knowlton, 1993). Sin embargo, bajo el planteamiento de la hipótesis de la monopolización, la adaptación rápida de los primeros migrantes a las condiciones locales terminará por reducir el flujo genético después de un tiempo relativamente corto, generando grandes diferencias en la composición de los genotipos entre poblaciones vecinas. Si a esto le sumamos los bajos niveles de divergencia morfológica (especiación críptica) en estos organismos, resultado de que la selección sexual no ocurre por factores de reconocimiento visual (Snell y Morris, 1993), se puede explicar porque en este tipo de organismos es común que ocurra adaptación local, como se ha evidenciado en rotíferos cladóceros y copépodos (Serra *et al.*, 1998; Lee, 2000; Ciro-Pérez *et al.*, 2001; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2016).

La comunidad zooplanctónica está constituida esencialmente por pequeños invertebrados entre ellos algunos microcrustáceos, de los cuales la subclase Copepoda tiene gran plasticidad evolutiva, adaptándose a diferentes ambientes y formas de vida (Suárez-Morales *et al.*, 2000a), capaces de invadir y sobrevivir en ambientes disímiles. De los taxones dulceacuícolas o epicontinentales los géneros *Mastigodiatomus* y *Leptodiatomus* de la familia Diaptomidae son los más diversos en aguas mexicanas (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008; Montiel Martínez *et al.*, 2008).

El ciclo de vida de los copépodos se desarrolla a partir de huevos subitáneos. Al ser fertilizados, estos huevos eclosionan en pocos días en etapa larval llamada naupliar. El desarrollo ontogenético es gradual. Cada organismo pasa por 6 estadios naupliares (N1-N6), a los que suceden 5 estadios de copepodito antes de alcanzar el estadio adulto (C1-C6) (Mauchline, 1998).

El copépodo calanoide *Leptodiatomus cf. sicilis*, ha sido registrado en cuerpos de agua dulce y salobres en una pequeña región geográfica en México, en particular en los lagos Atexcac, La Preciosa, Quechulac y El Carmen de la Cuenca Oriental (Barrera-Moreno, 2010). Estos lagos se caracterizan por ser de tipo endorreico, con distribución a manera de islas y cercanos entre sí (< 20 km de distancia entre ellos).

De los distintos estudios realizados en esta zona, destaca el realizado por Barrera-Moreno *et al.* (2015) en el que se describe la diferenciación genética, morfológica, ecológica y ecofisiológica de las poblaciones de *L. cf. sicilis*. Éstas se caracterizan por tener una baja divergencia morfológica interpoblacional, algunas diferencias genéticas asociadas a adaptaciones a las condiciones locales divergentes, pero con compatibilidad reproductiva interpoblacional (i.e., formación de híbridos y eclosión de las larvas) en condiciones de laboratorio. Sin embargo, en los análisis de compatibilidad reproductiva que realizaron estos autores no se evaluó el éxito a largo plazo de la descendencia interpoblacional y por lo tanto la posible existencia de barreras postcigóticas tardías.

Justificación

La distribución geográfica del copépodo *Leptodiptomus sicilis* se restringe al norte de América, tanto en cuerpos de agua dulces como salinos (Forbes, 1882). En México, Macek *et al.* (1994) registran por primera vez en los lagos de la Cuenca Oriental, en el lago Atexcac, la existencia de un copépodo que morfológicamente coincide con las descripciones del taxón *L. sicilis*. Tiempo después, Barrera (2010) registra la presencia en la zona de otras tres poblaciones de copépodos relacionados con este taxón, en los lagos cercanos La Preciosa, Quechulac y El Carmen, a las que denominó, en conjunto, como *L. cf. sicilis* ya que a pesar de las similitudes morfológicas que encontró entre ellas también encontró divergencias en las respuestas ecofisiológicas, talla, color y la descripción original de *L. sicilis sensu stricto*.

Dada la naturaleza de estos lagos, endorreicos, con una distribución insular, dentro de una zona geográfica relativamente pequeña (<30 km entre los dos lagos más distantes), con un gradiente de salinidad considerable (0.4-11 g L⁻¹) son el escenario natural ideal para probar hipótesis relativas a los procesos de diversificación biológica entre especies zooplanctónicas.

En análisis previos realizados con estos copépodos (Barrera-Moreno *et al.*, 2015) observamos que las poblaciones vecinas del taxón *Leptodiptomus cf. sicilis*, muestran una divergencia interpoblacional baja (<0.4% en la subunidad COI), pero están estructuradas genéticamente con un patrón de fragmentación alopátrida, además, estos resultados indican la existencia de fenotipos especializados a las condiciones locales de los lagos Atexcac, La Preciosa y El Carmen cuya salinidad es contrastante. Sin embargo, es importante resaltar que esta adaptación divergente de las poblaciones no ha producido incompatibilidad reproductiva pues se ha descrito la formación de híbridos interpoblacionales viables en condiciones experimentales de laboratorio. Por lo tanto, estas poblaciones todavía pueden ser consideradas una misma especie biológica, que han diversificado como consecuencia de selección disruptiva (condiciones diferenciales de salinidad). Sin embargo, en los análisis de compatibilidad reproductiva que realizaron

Barrera-Moreno *et al.* (2015) sólo se tomó en cuenta la formación de huevos y eclosión de las larvas, sin evaluar el éxito a largo plazo de la descendencia interpoblacional. Por lo que, dada la naturaleza de sus hábitats, las adaptaciones a las condiciones locales y la evidencia de fragmentación alopátrida que muestran las poblaciones, se podría esperar una disminución del flujo genético entre las poblaciones e incompatibilidad ecológica de los organismos como migrantes. También, es posible la existencia de algún grado de incompatibilidad reproductiva a través de la disminución de la eficacia de los híbridos, lo que permitiría revelar alguna barrera postcigótica que dificulte la conectividad entre los diferentes parches (metapoblaciones; véase de Queiroz; 2007) y, por lo tanto, su cohesión como una sola especie biológica (De Meester *et al.*, 2002; Nosil, 2012).

De acuerdo con esta idea y con el objetivo de evaluar los posibles mecanismos de aislamiento reproductivo postcigóticos, es necesario analizar y determinar el éxito a largo plazo de la descendencia interpoblacional, evaluando la supervivencia, el desarrollo y fertilidad de los híbridos para definir el estatus biológico de estos copépodos.

Hipótesis

En cuerpos de agua epicontinentales con distribución insular como lo son los lagos Atexcac y La Preciosa de la Cuenca Oriental, la adaptación local de los organismos a las condiciones ambientales particulares de cada lago (p. e., la salinidad), podría limitar la compatibilidad reproductiva entre los organismos de las poblaciones de copépodos pertenecientes al taxón *Leptodiptomus cf. sicilis*, favoreciendo la divergencia de linajes que, eventualmente, originarían especies biológicas distintas.

Objetivo general

Analizar la compatibilidad reproductiva en condiciones de laboratorio que existen entre dos poblaciones del copépodo *Leptodiptomus cf. sicilis* provenientes de los lagos vecinos con fenotipos adaptados a condiciones ecológicas contrastantes.

Objetivos particulares

Evaluar la compatibilidad reproductiva durante la cópula y transferencia de espermátforo entre los organismos de las dos poblaciones de copépodos, para estimar el reconocimiento de pareja y éxito de apareamiento como estimadores de la divergencia interpoblacional y eventual existencia de barreras precigóticas.

De existir apareamiento interpoblacional, evaluar la formación y eficacia biológica de los híbridos en términos de supervivencia, desarrollo y reproducción como medida de la compatibilidad postcigótica.

Sobre la base de los resultados previos de compatibilidad reproductiva, definir si las poblaciones analizadas son o no especies biológicas distintas.

Métodos

Área de estudio

Los lagos Atexcac (19° 20' N y 97° 27' O) y La Preciosa (19° 22' N y 97° 23' O) se localizan en la Cuenca Oriental en el estado de Puebla dentro del Distrito Oeste de la Faja Volcánica Transmexicana (Escalante *et al.*, 2007), a una altitud promedio de 2,300 m s.n.m., con una superficie de 5,250 km² (Alcocer *et al.*, 1993) (Fig. 1). Fueron originados durante el Cuaternario por una explosión freático-magmática que ha experimentado con el tiempo un proceso de desecación natural y humana. Basado en el análisis geológico, su origen ha sido calculado en 0.33 ± 0.08 millones de años (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007).

El agua que alimenta a los lagos proviene de fuentes subterráneas principalmente y en menor medida de la precipitación pluvial directa (Álvarez, 1950). Las características de estos lagos varían desde agua dulce hasta salina (Davies *et al.*, 2002). El clima es templado húmedo, con 14.4 °C de temperatura media anual y una precipitación anual de 656 mm (Arredondo, 1995). Entre estos lagos, La Preciosa se considera oligohalina, mientras que Atexcac es mesohalino, según la clasificación de Cowardin *et al.* (1979).

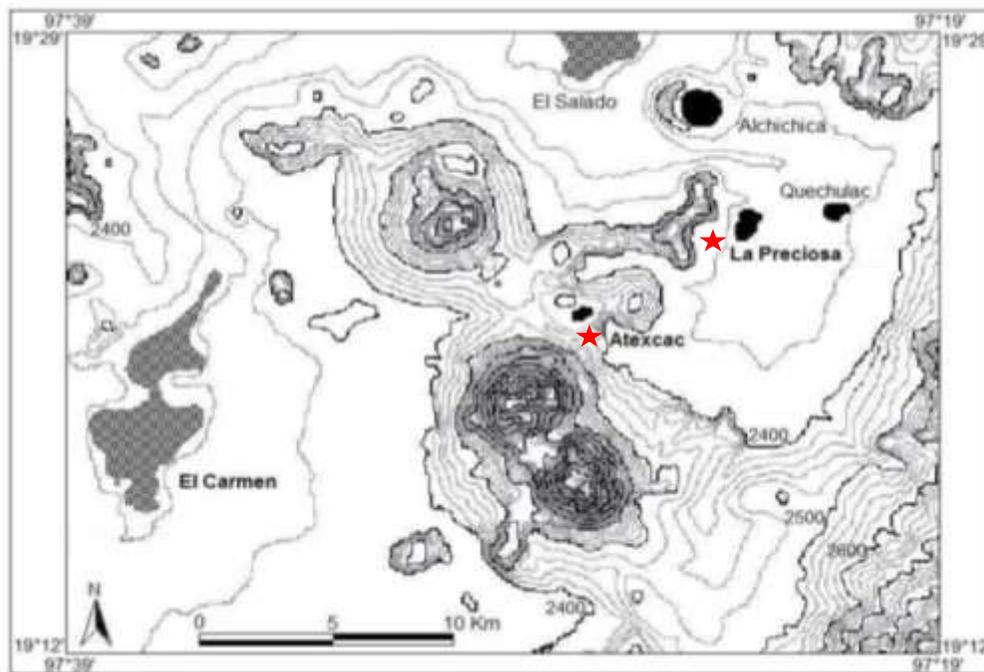


Fig. 1 Localización de los lagos-cráter La Preciosa y Atexcac (modificado de Alcántara-Rodríguez, 2010).

El lago La Preciosa (Fig. 1) es el segundo lago más grande de la Cuenca en cuanto a área y volumen, sólo detrás de Alchichica. Su forma es semi-triangular a grandes rasgos y con una longitud máxima de 1,300 m, con orientación NE-SW, la máxima profundidad se encuentra a los 45 m (Arredondo, 1995). El agua del lago tiene una salinidad de 1.1 g l^{-1} y conductividad de $2200 \mu\text{S/cm}$ (Armienta *et al.*, 2008). Las especies de metazooplancton registradas (J. Ciro-Pérez y B. López-López, comunicación personal; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Barrera-Moreno *et al.*, 2015) muestran una mezcla de especies de afinidad salina, así como especies comunes de aguas dulces: un copépodo calanoide del grupo *Leptodiptomus sicilis*, los copépodos cyclopoides *Eucyclops* cf. *pectinifer*, *E. torresphilipi* y *Macrocyclops albidus*; algunas especies de cladóceros (la especie planctónica *Ceriodaphnia* sp., y las especies litorales *Pleoroxus varidentatus*, *Alona setulosa* y *Chydorus brevilabris*), así como algunas especies de rotíferos (las especies salinas *Brachionus* sp. 'México' perteneciente al complejo *B. plicatilis* y *Hexarthra jenkiniae*, y las dulceacuícolas *B. calyciflorus* y *Filinia* cf. *pejleri*). En el lago se distribuye una especie de pez, *Poblana*

letholepis, endémica del lugar y considerada como amenazada según la NOM-059-SEMARNAT-2001 (Semarnat, 2002).

Atexcac es un lago de forma ovoide (Fig. 1), con una longitud máxima, superficie, volumen y profundidad menores que en La Preciosa (Tabla 1), su orientación es NE-SW. La temperatura promedio del agua es templada 16.6 °C con el periodo de mezcla de enero a marzo a una temperatura alrededor de 15 °C. Su salinidad es de 6.5 g l⁻¹ y conductividad de 11,700 μS/cm (Armienta *et al.*, 2008) y en su geología se observa que cuenta con una pared formada por calizas de origen mesozoico, mientras que las demás son de material volcánico. Es un lago con baja diversidad de fitoplancton y zooplancton, se tienen registradas algunas especies de metazooplancton (J. Ciro-Pérez y B. López-López, comunicación personal): un copépodo del grupo *Leptodiptomus sicilis*, los cyclopoideos *E. torresphilipi*, *E. pseudoensifer* y *Paracyclops chiltonii* y dos especies de rotíferos (*B. grupo plicatilis* y *H. jenkiniae*), también hay un registro de cladóceros de los géneros *Daphnia* y *Ceriodaphnia* aunque en abundancias muy bajas. (Macek *et al.*, 1994).

Tabla 1. Características generales de los lagos La Preciosa y Atexcac (modificado de Arredondo, 1995; Armienta *et al.*, 2008).

	La Preciosa	Atexcac
Localización	19°22'N 97°23'W	19°20'N 97°27'W
Altitud (m s.n.m.)	2,330	2,340
Longitud máxima (km)	1.34	0.78
Área superficial (Km ²)	0.78	0.29
Volumen (m ³ X10 ⁶)	16.20	6.15
Profundidad máxima (m)	45	39
Clima	Templado	Templado
Temperatura en la Superficie (°C)	18.6	17.8
Temperatura en la Profundidad (°C)	15.2	14.9
Precipitación (mm)	457.2	457.2
Salinidad (g L ⁻¹)	1.1	6.5
Conductividad (μS/cm)	2,200	11,700
pH	8.4	8.6
Presencia de peces	Sí	---

Colecta y cultivo en laboratorio de *Leptodiaptomus cf. sicilis*

En los lagos Atexcac y La Preciosa (19° 22' N y 97° 23' W) se muestrearon organismos vivos con una red cónica de 80 µm de apertura de poro mediante arrastres verticales a lo largo de la columna de agua. Los copépodos fueron trasladados al laboratorio en botellas de plástico de 10 litros. Para establecer cultivos stock, se separó a los copépodos del resto de los organismos con un microscopio estereoscópico.

Los individuos separados se colocaron en recipientes de vidrio de 4 l, en medio preparado con sales comerciales (Instant Ocean®, Aquarium Systems) disueltas en medio EPA (USEPA, 2002) preparado con agua electrodesionizada (Millipore®, Elix-5) tratada previamente en autoclave a 121 °C durante 15 min. El agua se preparó a la salinidad en la que se encontró cada cuerpo de agua durante la colecta (Atexcac 6.5 g l⁻¹ y La Preciosa 1.1 g l⁻¹). Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de temperatura (18 ± 1 °C; similares a las naturales del epilimnion), con aireación y fotoperiodo constantes 12 h luz/12 h oscuridad, siguiendo la metodología propuesta por Montiel-Martínez *et al.* (2008).

Para el mantenimiento general y alimentación de las cepas de copépodos se utilizaron microalgas procedentes de cepas mantenidas en la colección del Laboratorio de Limnología de la FES Iztacala, UNAM: las algas verdes *Tetraselmis suecica* y *Scenedesmus* sp., originalmente cedidas por el Instituto de Ciencias del Mar de Andalucía (Cádiz, España) y por el Laboratorio de Zoología acuática II, Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala, UNAM, respectivamente. Estas microalgas se eligieron porque se encuentran en el intervalo de tamaños de las partículas alimenticias de las cuales se alimentan los diferentes estadios de copépodos en condiciones naturales (Santer, 1996; Schallenberg y Burns, 2001) y han demostrado ser adecuadas para cultivar a los copépodos de los lagos de Oriental (Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Barrera-Moreno, 2010). Para asegurar que la calidad de las algas fuera constante se establecieron cultivos semicontinuos, realizando la cosecha (remoción de un volumen estándar de cultivo) de las algas durante la fase exponencial de crecimiento, el volumen cosechado se sustituyó por medio de cultivo recién preparado

según correspondiera, el proceso se repetía cada tercer día para obtener el volumen original (véase Boraas, 1993).

Experimentos de entrecruzamiento

Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de alimento en exceso (~6,000 cel./ml), así como fotoperiodo y temperatura constantes como se describió previamente. La salinidad a la cual se realizaron los experimentos de entrecruzamiento interpoblacional se determinó a partir de resultados de experimentos de tolerancia a la salinidad (Barrera-Moreno *et al.*, 2015), eligiéndose 3.8 g l⁻¹ por ser la condición en la que las dos poblaciones estudiadas logran un desarrollo y supervivencia relativamente adecuados en comparación con sus salinidades de origen.

Intrapoblacionales. - A partir de los cultivos stock se aislaron aleatoriamente entre 100-200 organismos de cada una de las poblaciones estudiadas, se separaron machos adultos, los cuales se reconocieron por sus características sexuales secundarias (Barrera-Moreno, 2010) y hembras juveniles en estadio C5 (i.e., preadultos) distinguidas de las hembras adultas por la segmentación indefinida; para así asegurar que en el experimento sólo se utilizarían hembras no copuladas previamente. Una vez alcanzada la madurez, se colocaron aproximadamente 100 tríos (i.e., una hembra y dos machos adultos) de cada población en matraces con 50 ml de medio. Se analizaron 100 tríos de la cruce La Preciosa y 100 de Atexcac. Los tríos se observaron y recambiaron de medio diariamente durante 15 días. Los tríos con hembras muertas se eliminaron y en caso de que fueran machos se sustituyeron por otros. Las hembras con espermatóforo (copuladas) y/u ovígeras (portadoras de sacos de huevos) fueron transferidas individualmente a placas de poliestireno con 7 ml de medio. Una vez que eclosionaron las larvas nauplio, fueron transferidos individualmente a placas multipocillo con 7 ml de medio; se siguió su desarrollo diariamente hasta su muerte o hasta llegar a la madurez sexual.

Dado que los cultivos preexperimentales se mantuvieron en condiciones de laboratorio por al menos 3 meses antes de iniciar los experimentos formales y que bajo tales condiciones estos copépodos completan su desarrollo en aproximadamente un mes (véase Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Figueroa-Maya, 2015), es de esperarse que todos los organismos utilizados en estos ensayos hayan sido producidos y completado su desarrollo en las condiciones controladas de nuestros ensayos. Por lo tanto, en este trabajo se supone que el patrón de desarrollo, supervivencia y reproducción que observamos en los cruces intrapoblacionales describen adecuadamente la historia de vida de estas poblaciones en condiciones de laboratorio y pueden ser comparadas con los experimentos interpoblacionales de las generaciones F1 y F2.

Interpoblacionales F1.- A partir de los cultivos stock se realizaron cultivos preexperimentales en los que los copépodos fueron aclimatados gradualmente a la salinidad, incrementándola (para La Preciosa; salinidad de origen: 1.1 g l⁻¹ a 2.5 y 3.8 g l⁻¹) y disminuyéndola (para Atexcac; salinidad de origen: 6.5 g l⁻¹ a 5.4, 4.5 y 3.8 g l⁻¹) durante periodos de 24 horas entre recambios de medio hasta alcanzar la salinidad experimental final (3.8 g l⁻¹). Para colocar los tríos se siguieron los mismos procedimientos que en los cruces intrapoblacionales, i.e., 100 tríos de la crusa Machos Atexcac/Hembras La Preciosa (MA/HLP) y 100 de la crusa Machos La Preciosa/Hembras Atexcac (MLP/HA). Se siguió el método de “no elección”, es decir, los machos que se colocaron pertenecían solamente a una población y las hembras a otra (Montiel-Martínez *et al.*, 2008).

Interpoblacionales F2.- Del total de los individuos que llegaron a la madurez en el experimento anterior, se obtuvieron los individuos para formar un total de 9 tríos de la crusa MA/HLP (i.e., 18 machos y 9 hembras) y 14 de MLP/HA (i.e., 28 machos y 14 hembras), los cuales se colocaron aleatoriamente para realizar las cruces entre los híbridos F1 y obtener la F2, la fecundación se evaluó siguiendo los mismos procedimientos que se describieron en el entrecruzamiento de la generación F1.

Se calculó el porcentaje de fecundación de la relación entre el número de tríos experimentales y el número de hembras fecundadas (i.e., hembras que pusieron huevos). Se contabilizó el número de huevos puestos por hembra y se calculó el porcentaje de eclosión de los mismos. Para calcular el porcentaje de viabilidad de F3 se tomó en cuenta el número de tríos experimentales F2 y el número de hembras que produjeron huevos y eclosionaron sus larvas (Santer y van den Bosch, 1994; Santer, 1996; Montiel-Martínez *et al.*, 2008). Para determinar las diferencias entre cruzas se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y pruebas post hoc de Mann-Whitney cuando existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Para todas las pruebas estadísticas se utilizó el programa informático IBM SPSS Statistics versión 19 (IBM SPSS Inc., 2010).

Resultados

Una vez terminados todos los experimentos de reproducción, se comparó el porcentaje de fecundación, eclosión y supervivencia de los cruces interpoblacionales F1 y F2 (Fig. 2). En los cruces intrapoblacionales el porcentaje de fecundación de Atexcac fue mayor con un 58.33% respecto del de La Preciosa con un 50%, ambos presentaron los porcentajes más altos de fecundación (100 % Atexcac y 85.71% La Preciosa) comparados con los cruces interpoblacionales, en cuanto a la supervivencia el mayor porcentaje fue en el cruce Atexcac con una diferencia del 5%. Respecto a los cruces interpoblacionales, tanto los dos cruces F1 como el F2 MLP/HA presentaron porcentajes similares en cuanto a la fecundación con una diferencia \sim 13% por debajo del cruce interpoblacional F2 MA/HLP que presentó el porcentaje más alto (66.67%), éste, además, fue el cruce con el porcentaje de eclosión más bajo (65.12%), entretanto, el más alto fue de 80.36% en el cruce F2 MLP/HA, en cuanto a la supervivencia de estos organismos hasta llegar a edad adulta fue mayor en el cruce F1 de MLP/HA con 34.65 %, mientras que en los demás cruces la supervivencia no pasó del 30%, es importante resaltar que los individuos del cruce F2 MA/HLP no sobrevivieron más allá del estadio larval de nauplio 1 (N1).

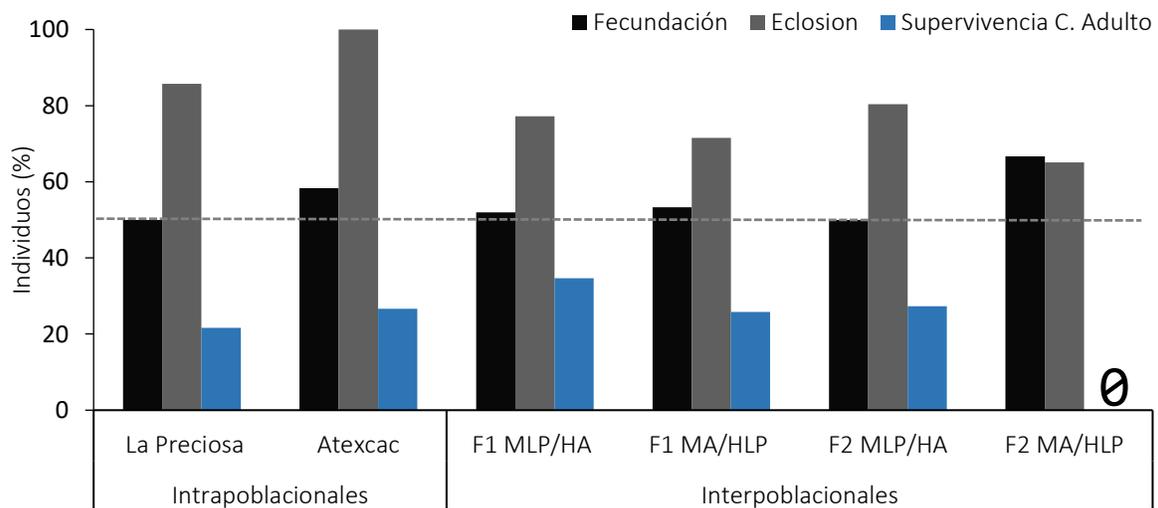


Fig. 2 Comparación del porcentaje de fecundación, eclosión y supervivencia en los cruces interpoblacionales de las generaciones F1 y F2 MLP/HA (Machos La Preciosa vs. Hembras Atexcac), MA/HLP (Machos Atexcac vs. Hembras La Preciosa). El símbolo \emptyset indica que ningún individuo sobrevivió.

Por otra parte, en la tabla 2 se observa que los individuos de los cruces interpoblacionales F2 tardan más tiempo en promedio (≥ 5 veces) para eclosionar (estadio N1) que los provenientes de cruces intrapoblacionales, según pruebas *post-hoc* de Mann-Whitney ($p < 0.05$). Sin embargo, este patrón no se observó en el tiempo promedio que tardan en llegar al estadio de desarrollo juvenil C1, donde los organismos del cruce intrapoblacional de Atexcac tardaron menos tiempo (9.07 ± 2.71 días) que los provenientes del cruce intrapoblacional de La Preciosa y de los interpoblacionales F1 y F2 MLP/HA, los cuales se comportan de manera similar (> 20.16 días). Este mismo patrón se observa en el tiempo para llegar al estadio adulto, donde los organismos del cruce intrapoblacional de Atexcac son los más rápidos, mientras que no hubo diferencias significativas entre los individuos del cruce La Preciosa y los individuos del cruce MLP/HA, los cuales se tardan más del doble en llegar a adultos.

Tabla 2. Comparación del tiempo promedio \pm error estándar (días) que tardan los individuos de las generaciones F1 y F2 de las diferentes cruces interpoblacionales en llegar a los estadios N1, C1 y Copepodito adulto en comparación con los cruces intrapoblacionales. (--) indica ausencia de datos. Letras diferentes (^a y ^b) indican diferencias significativas según pruebas *post-hoc* de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

	Cruzas	N1	C1	C. Adulto
Intrapoblacionales	La Preciosa	1.98 ± 1.03^a	25.81 ± 0.75^a	46.15 ± 3.11^a
	Atexcac	2.7 ± 1.38^a	9.07 ± 2.71^b	18.94 ± 0.93^b
Interpoblacionales	F1 MLP/HA	4.47 ± 1.81^a	20.16 ± 7.74^a	41.5 ± 8.31^a
	F1 MA/HLP	11.5 ± 1.87^b	25 ± 2.86^a	39.31 ± 3.17^a
	F2 MLP/HA	13.5 ± 6.89^b	21.5 ± 8.26^a	46.33 ± 2.89^a
	F2 MA/HLP	18 ± 2.0^b	--	--

Finalmente, es importante puntualizar que los individuos del cruce MA/HLP no sólo son los que tardan más tiempo en eclosionar, sino también son los únicos que no logran mudar a los demás estadios de desarrollo una vez que eclosionaron (Fig. 3).

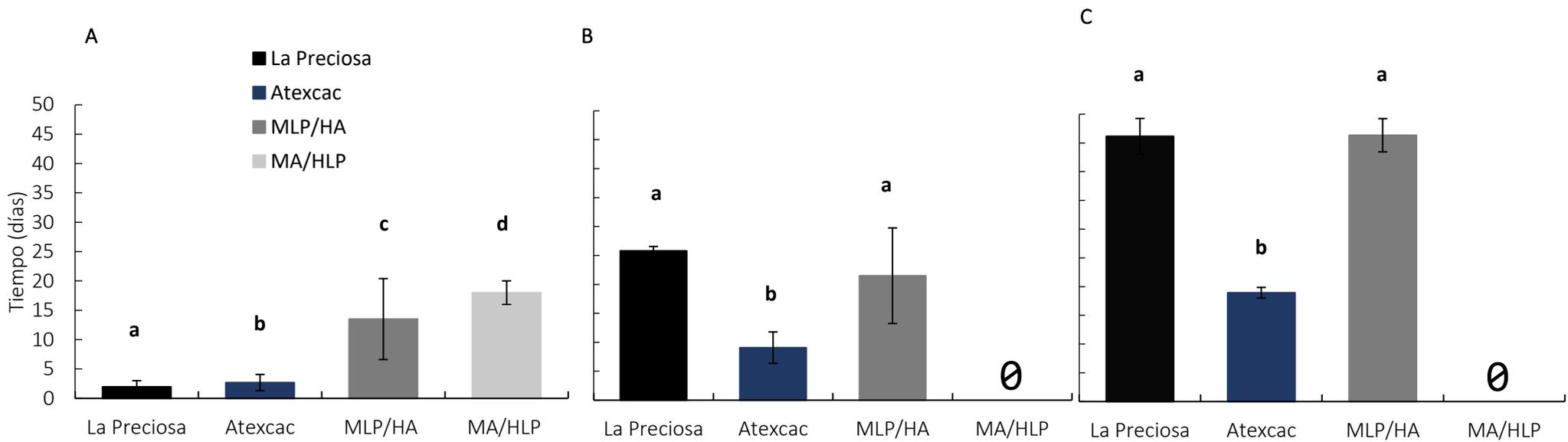


Fig. 3. Tiempo de desarrollo de los individuos experimentales en los cruces intra e interpoblacionales. (A) Tiempo promedio transcurrido desde la formación del huevo hasta la eclosión; (B) desde la formación de huevo hasta C1; (C) desde la formación de huevo hasta Adulto. Se indican las medias \pm error estándar; letras diferentes (a, b, c y d) indican diferencias significativas entre los entrecruzamientos según pruebas *post hoc* de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

En la Figura 4 se representa el tiempo de desarrollo entre cada etapa que tuvieron los copépodos de la generación F2 desde su eclosión, pasando por (1) el primer estadio larval, (2) el periodo larval de N2-N6 hasta mudar a juvenil (C1), (3) y el periodo juvenil hasta alcanzar la madurez (C1-C6). De acuerdo con nuestros resultados, se aprecia que a los individuos del cruce intrapoblacional de La Preciosa les toma menor tiempo eclosionar (>5 días; Fig. 4A), sin embargo, también son los que tardan más en llegar hasta la madurez (adulto), necesitando en promedio 20 días en la etapa larval y 20 más en la etapa juvenil. En esta población, mueren 28 individuos del estadio larval (N1), mientras que en el periodo larval N2-N6 hasta mudar a juvenil, mueren 8 individuos. En los individuos del cruce intrapoblacional de Atexcac mostraron algo similar respecto al tiempo que tardan en eclosionar, sin embargo, a aquellos individuos que alcanzan a llegar a la madurez, les toma menos de la mitad de tiempo que los del cruce de La Preciosa (Fig. 4B). Los cruces interpoblacionales mostraron que una reducción considerable en el número de individuos que lograron sobrevivir (Figs. 4C y 4D). A los organismos obtenidos de los cruces MLP/HA les toma más del doble de tiempo eclosionar respecto a los organismos provenientes de los cruces intrapoblacionales, transcurriendo de 20 a 30 días más para terminar la etapa juvenil (Fig. 4C). Sin embargo, los pocos individuos que llegan hasta adulto, son los que menos tiempo invierten en etapa juvenil (~10 días). Por su parte, se observa que a los individuos del cruce MA/HLP les toma un tiempo mayor eclosionar (~19 días), y son los únicos individuos que no sobrevive más allá del primer estadio (Fig. 4D).

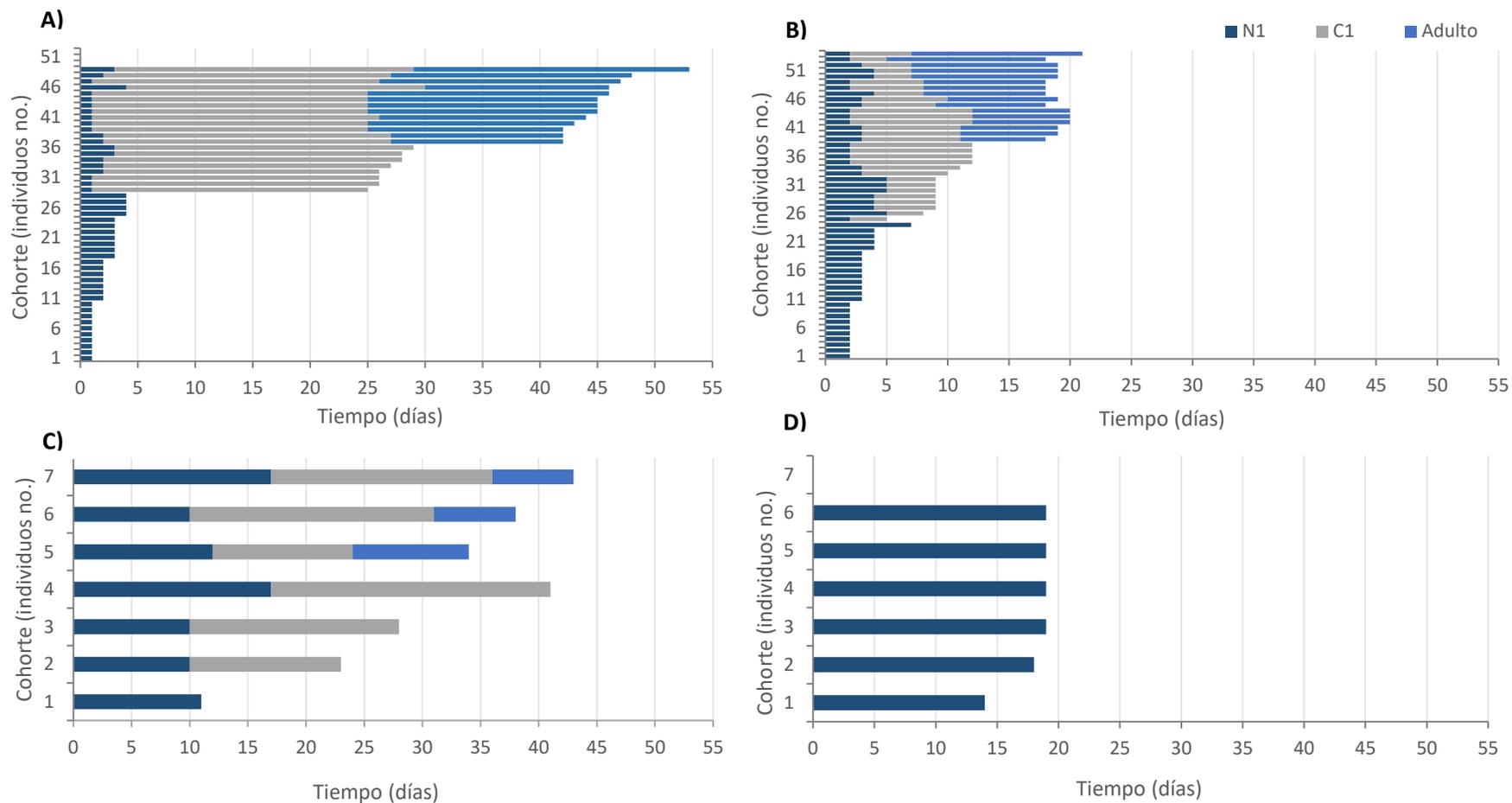


Fig. 4. Tiempo de desarrollo de cada uno de los individuos experimentales en los cruces intra e interpoblacionales. A) Cruce intrapoblacional La Preciosa; B) Cruce intrapoblacional Atexcac; C) Cruce interpoblacional F2 MLP/HA y D) Cruce interpoblacional F2 MA/HLP. (N1) Tiempo transcurrido desde la formación del huevo hasta la eclosión; (C1) Tiempo transcurrido desde el estadio N1 hasta C1; (Adulto) Tiempo transcurrido desde el estadio C1 hasta Adulto. Cada barra representa a los diferentes individuos experimentales hasta alcanzar el estadio adulto o hasta el momento de su muerte.

En ambos cruces intrapoblacionales (Fig. 5) el 100% de los individuos sobrevivió el primer estadio larval (N1). En contraste, en el cruce interpoblacional F2 MA/HLP, cuyo porcentaje de eclosión fue el más bajo de los diferentes cruces (65.12%), los individuos no sobrevivieron después del estadio N1. En el cruce intrapoblacional de Atexcac, la supervivencia hasta el estadio N2 fue del 100%. Se observó que los cruces intrapoblacionales se comportan de manera similar tanto en el porcentaje de supervivencia hasta alcanzar el estadio adulto como en la probabilidad de producir la siguiente generación (F3; i.e., reproducirse y producir huevos viables que eclosionan), la cual fue de 52.1 % en el cruce La Preciosa y 53.8 % en Atexcac. En el cruce interpoblacional MLP/HA el porcentaje de supervivencia hasta C1 es incluso mayor que en los cruces intrapoblacionales (73.33%), sin embargo, la probabilidad de fecundación, formación de huevos y producción de la generación F3 (eclosión de larvas) es mucho menor (8%). Por último, en el cruce MA/HLP la supervivencia más allá del estadio N1 fue nula.

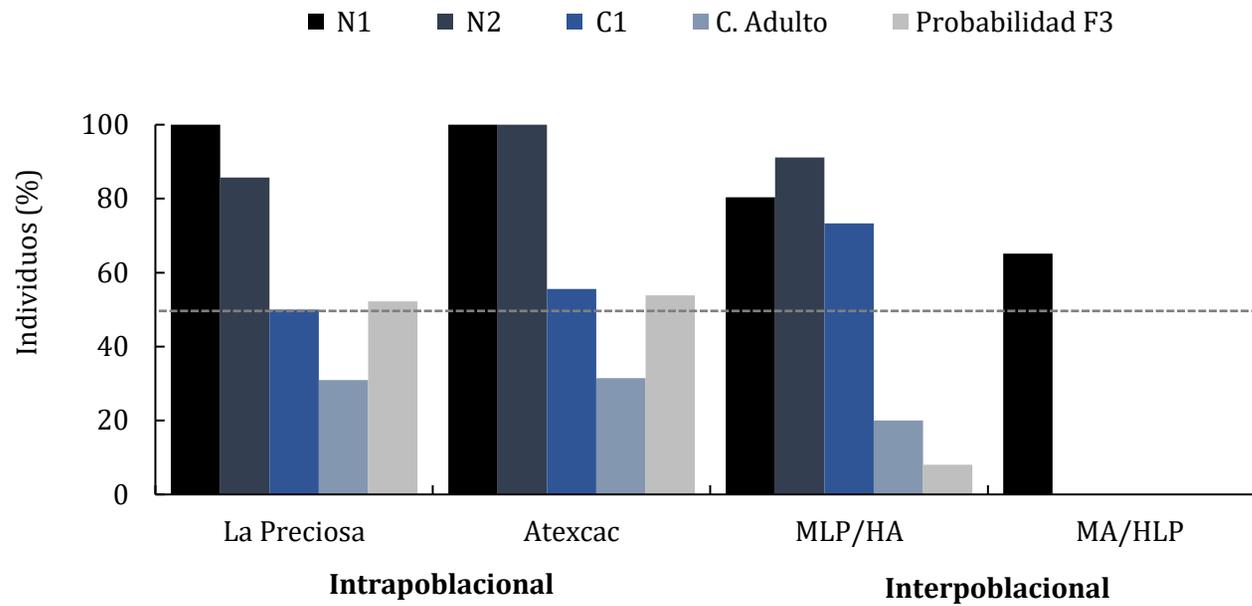


Fig. 5 Supervivencia (porcentaje de individuos que pasan de un estadio a otro) y probabilidad de producir la generación F3 (i.e., reproducirse y producir huevos viables que eclosionan) de los entrecruzamientos intra e interpoblacionales.

Discusión

Los copépodos provenientes de estos lagos están mejor adaptados a la salinidad de sus lagos de origen, sobreviviendo y reproduciéndose mejor en sus condiciones de origen, como se corroboró experimentalmente en esta tesis, donde el mayor porcentaje de eclosión de huevos producidos se dio en los cruces intrapoblacionales (85.7 % en La Preciosa y 100 % en Atexcac).

La salinidad es un factor ambiental que afecta diferentes parámetros de la historia de vida de los crustáceos dulceacuícolas, como la supervivencia, crecimiento, desarrollo, la esperanza de vida, el número y tamaño de la descendencia, la edad reproductiva, la distribución de las poblaciones, llegando, eventualmente a formar una barrera ecológica que impide el flujo génico interpoblacional dando origen a divergencias filogenéticas (Lowe *et al.*, 2005a; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Barrera-Moreno *et al.*, 2015).

Los cambios en la salinidad pueden tener efectos directos o indirectos sobre el metabolismo y el balance osmótico de los crustáceos dulceacuícolas (Geoffrey y Bayly, 1971; Farmer, 1980; Roddie *et al.*, 1984; Lapucki y Normant, 2008). En copépodos, el intercambio de líquidos opera mediante una glándula maxilar (Ramírez, 2002) recientemente se reportó que en el copépodo calanoide *Eurytemora affinis* el transporte de iones se localiza tanto en las glándulas maxilares como en los cuatro pares de patas natatorias –endópodos y exópodos P1 al P4– (Johnson *et al.*, 2014). Mientras que la tolerancia a los cambios de salinidad se relaciona con la acción de Na(+), K(+)-ATPasa, actuando en la osmoregulación celular de organismos eurihalinos, aumentando la actividad enzimática en proporción a la salinidad del medio (Hollyday *et al.*, 1990), sin embargo, la Na(+), K(+)-ATPase por sí sola no puede proporcionar la fuerza motriz para la captación del Na(+) en medios diluidos (agua dulce), una concentración ambiental debajo de 1.0 mM de NaCl crea un gradiente con los fluidos corporales que supera el límite termodinámico para la absorción de iones de Na(+), K(+)-ATPasa (Larsen *et al.*, 1996) y aunque la función de Na(+), K(+)-ATPasa sería insuficiente para la absorción de iones de entornos diluidos, esta enzima es fundamental para la absorción de iones en hábitats salinos. Por otra parte, Lee *et*

al. (2001, 2011) reportaron que en poblaciones de agua dulce la actividad de la H⁺ V-ATPasa es crucial para la absorción de iones, y tanto la actividad de Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPasa como de H⁺ V-ATPasa están relacionadas con un rápido cambio evolutivo durante las invasiones de hábitats de solución salina a hábitats de agua dulce por el copépodo *E. affinis*, las diferencias en esta característica pueden ser parte de las adaptaciones de los organismos a su entorno. Lowe *et al.* (2005a) reportan que las diferencias en la actividad de estas enzimas son resultado de la expresión génica. Los cambios en la acción de la Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPasa en respuesta a la salinidad son un buen indicador de la capacidad osmoreguladora de un organismo Lowe *et al.*, (2005b) por lo que contar con una gran capacidad de variar su actividad permitirá mantener el balance iónico y osmótico bajo diferentes condiciones de salinidad (Caberoy y Quintino, 2000) y desarrollarse en diferentes medios, mientras que al no tener esta capacidad, un cambio en el medio puede afectar tanto a la supervivencia como el crecimiento y la tasa de reproducción, como lo reportan Barrera-Moreno *et al.* (2015) para las poblaciones de *L. cf. sicilis* que se ven afectados en procesos como la supervivencia, desarrollo y reproducción por este factor debido a la adaptación local que presentan.

En cruces de poblaciones genéticamente divergentes se ha observado que la eficacia de los híbridos F1 generalmente es similar a la de los parentales. Sin embargo, la reducción en la eficacia se puede observar en su descendencia (generación F2), es decir, en la inviabilidad del híbrido (Burton, 1987, 1990a, 1990b; Edmands, 1999; Edmands y Deimler, 2004; Willett, 2008a), que incluye rasgos de la eficacia tales como el tiempo de desarrollo, la supervivencia, la eclosión, la fertilidad y la tolerancia a la salinidad.

Esto concuerda con los resultados obtenidos, donde las generaciones F1 de cruces intra e interpoblacionales tienen comportamientos, en general, similares en los porcentajes de fecundación y supervivencia hasta llegar a la edad adulta, sin embargo, la inviabilidad total de los híbridos se observa en la generación F2 en la cruce MA/HLP, donde a pesar de que fueron pocos los individuos que alcanzaron la adultez, tuvieron un mayor porcentaje de fecundación, aunque en contraparte, el porcentaje de eclosión fue el más bajo y, como se observó en los resultados, los individuos no sobrevivieron más allá del estadio N1.

Esto ocurre también en algunas poblaciones del copépodo *Tigriopus californicus* que, a pesar de tener altos niveles de divergencia genética, bajo condiciones de laboratorio aún se pueden desarrollar cruces interpoblacionales y estos no muestran ninguna evidencia de aislamiento precigótico, pero muestran que el aislamiento reproductivo postcigótico se manifiesta como una baja eficacia de los híbridos F2 (Burton, 1987; Edmunds, 1999; Palmer y Edmands, 2000).

Un modelo que ayuda a explicar el aislamiento reproductivo es el modelo de incompatibilidades Dobzhansky-Muller (DM) en el que interacciones perjudiciales con base genética contribuyen al aislamiento reproductivo postcigótico mediante la reducción en la eficacia de los híbridos (Coyne y Orr, 2004). El modelo de incompatibilidades DM describe un escenario de aislamiento reproductivo postcigótico con cambios neutrales o beneficiosos en un solo locus dentro de una población que tiene interacciones perjudiciales con alelos derivados de manera similar en otro locus de otra población parental en híbridos (Coyne y Orr, 2004).

Los factores genéticos que llevan a la reducción de la eficacia del híbrido son complejos y podrían conducir a asimetrías entre cruces ya que estos factores genéticos son heredados de manera uniparental (p.e. un gen o subunidad de ADN mitocondrial o múltiples regiones cromosómicas) (Willett, 2011). Esta asimetría en la supervivencia se encontró comparando a los cruces interpoblacionales F2, donde a los organismos de la cruce MLP/HA les toma menor tiempo eclosionar y algunos sobreviven hasta la edad adulta, a diferencia de la cruce MA/HLP que no solo les toma un tiempo mucho mayor eclosionar, además, no sobreviven más allá del primer estadio de desarrollo.

Las diferencias en el aislamiento reproductivo postcigótico de híbridos provenientes de cruces recíprocos son comunes, este patrón puede ser originado por diferentes causas, una de las causas en estas incompatibilidades es la interacción de elementos genéticos citoplasmáticos tales como el ADN mitocondrial (ADNmt) que es heredado por vía materna estrictamente (Turelli y Moyle, 2007). Las interacciones pueden ser perjudiciales entre proteínas codificadas por genes nucleares y proteínas codificadas por ADNmt provocando

lo que se conoce como ruptura de coadaptación genómica, contribuyendo a un aislamiento reproductivo postcigótico asimétrico (González-Zuart, 2008; Nosil, 2012).

En relación con el efecto de la salinidad, Ellison y Burton (2008b, 2010) reportan que otro factor que afecta la eficacia de los híbridos podría ser la transcripción de ADNmt que es dependiente de la interacción entre secuencias que codifican para ADNmt y nuclear al mismo tiempo. En híbridos esta interacción se interrumpe por la diferencia en los niveles de transcripción de ADNmt en condiciones de estrés por salinidad. De acuerdo con lo anterior, se puede suponer que la asimetría observada en la eficacia de los híbridos de las generaciones F2 puede tener una base genética (Coyne y Orr, 2004; Noor y Feder, 2006). Por lo que, en cuerpos de agua con poca variación ambiental como lo son Atexcac y La Preciosa donde los organismos están adaptados a sus condiciones locales contrastantes, con el tiempo y el aislamiento adecuados, la salinidad eventualmente terminará potenciando barreras fisiológicas resultado de variantes genéticas seleccionadas con capacidades de expresión fenotípica aptas para las condiciones locales particulares (Barrera Moreno, 2010).

De acuerdo con lo anterior, los resultados de esta tesis, permiten entender el patrón de diversificación de las poblaciones vecinas de copépodos de los lagos Atexcac y La Preciosa, las cuales, aunque con baja divergencia, están diferenciadas genéticamente como resultado de una capacidad de dispersión baja lo que ocasiona un flujo de genes restringido reforzado por una selección a ambientes divergentes en factores ecológicos relevantes (Barrera Moreno *et al.*, 2015). La alta probabilidad de aislamiento precigótico entre las poblaciones debido a la inviabilidad de los inmigrantes sugiere un estado avanzado en el "continuo de especiación" (Nosil *et al.*, 2009; Nosil, 2012). Sin embargo, la selección divergente de las poblaciones no ha producido la incompatibilidad reproductiva completa, por lo que, de acuerdo con el concepto biológico de especie (Mayr, 1942; Lee, 2003) aún podrían considerarse como la misma especie (véase, Barrera Moreno *et al.*, 2015). Sin embargo, los análisis realizados para determinar el éxito a largo plazo de la descendencia interpoblacional (supervivencia, desarrollo y fertilidad de los híbridos resultantes más allá de la primera etapa de la generación F1 revelaron también la existencia de barreras

reproductivas postcigóticas. A pesar de que los híbridos (F1) de La Preciosa y Atexcac sobreviven a la madurez sexual, la generación F2 de la cruce recíproca MA/HLP ya no es viable. De persistir las condiciones actuales, la especiación por mecanismos ecológicos debe completarse en su totalidad. Por lo que, se propone que las poblaciones analizadas, y previamente registradas como *Leptodiptomus cf. sicilis*, a pesar de tener características morfológicas muy similares y divergencias genéticas bajas, en realidad representan a dos especies biológicas diferentes, con pocas probabilidades de tener flujo genético entre ellas dada su baja eficacia como migrantes (aislamiento precigótico) y baja compatibilidad reproductiva postcigótica, por lo que, podrían ser consideradas como especies gemelas, una habitando el Lago Atexcac y otra en el lago La Preciosa.

Conclusiones

- Existe reconocimiento sexual, fecundación, formación de híbridos y eclosión de larvas entre las poblaciones provenientes de lagos con salinidades divergentes. En condiciones de laboratorio, ambas cruzas interpoblacionales (MA/HLP y MLP/HA) fueron exitosas, aunque las cruzas intrapoblacionales tuvieron una eficacia más alta.
- La eficacia biológica, en términos de supervivencia, desarrollo y reproducción, de los integrantes de F1 fue similar en ambas cruzas interpoblacionales de los copépodos provenientes de los lagos La Preciosa y Atexcac.
- La eficacia biológica de la descendencia de los híbridos F2 fue asimétrica. A los organismos de la craza MLP/HA les toma menor tiempo eclosionar y algunos sobreviven hasta la edad adulta, sin embargo, la craza recíproca MA/HLP no fue viable.
- Estos resultados indican que existe un aislamiento reproductivo postcigótico asimétrico en las poblaciones de *L. cf. sicilis*, que sumado al aislamiento precigótico por la poca viabilidad de los inmigrantes, documentado previamente, llevan a la conclusión que las dos poblaciones de *L. cf. sicilis* de la Cuenta Oriental representan a dos especies biológicas diferentes, una habitando el lago salino Atexcac y otra en el lago dulceacuícola La Preciosa de la Cuenta Oriental, México.

Referencias

- Aguilar, V. 2003. Aguas continentales y diversidad biológica de México: un recuento actual. *Biodiversitas*. 8(48):1-15.
- Alcántara-Rodríguez, J. A. 2010. *Lagos-cráter de la Cuenca de Oriental como modelo de diversificación biológica en sistemas de distribución insular: análisis de las poblaciones del rotífero Brachionus grupo plicatilis*. Tesis de Maestría (Biología Ambiental). Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM, México, D.F. pp. 77.
- 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 Biol.* 57:728-740.
- Alcocer, J., Lugo, A., Estrada, S., Ubeda, M. y Escobar, E. 1993. La macrofauna bentónica de los axalapascos mexicanos. *Actas VI Congr. Esp. Limnol.* 33:409-415.
- Álvarez, J. 1950. Contribución al conocimiento de los peces de la región de los Llanos, estado de Puebla (México). *Anales Esc. Nal. Cienc. Biol.* 6(1-4):81-107.
- Arredondo, 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.
- Armienta, M. A, Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O. 2008. Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *J. Volcanol. Geoth. Res.* 178:249-58
- Badii, M. H., Landeros, J., Foroughbakhch, R. y Abreu, J.L. 2007. Biodiversidad, evolución, extinción y sustentabilidad. *Daena: Int. J. Good Consc.* 2(2):229-247.
- Barrera-Moreno, O. A. 2010. Análisis de las poblaciones de los copépodos *Leptodiaptomus* cf. *Sicilis* (Copepoda:Calanoida) en los lagos de la Cuenca Oriental, México. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias del Mar y Limnología. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 71.
- Barrera-Moreno, O., Ciro-Pérez, J., Alcántara-Rodríguez, J. A. y Piedra-Ibarra, E. 2015. From local adaptation to ecological speciation in copepod populations from neighbouring lakes. *PLoS ONE*. 10(4): e0125524.

- Bohonak, A. J., Jenkins D. G. 2003. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecol. Lett.* 6:783-96.
- Boraas, M. E. 1993. Semicontinuous culture methods. En: Walz, N. (ed.). Plankton regulation dynamics. *Ecological Studies* 98. Springer-Verlag, Berlin. pp. 13-20.
- Burton, R. S. 1987. Differentiation and integration of the genome in populations of the marine copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution* 41:504-513.
- Burton, R. S. 1990a. Hybrid breakdown in developmental time in the copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution* 44:1814-1822.
- Burton, R. S. 1990b. Hybrid breakdown in physiological response a mechanistic approach. *Evolution* 44:1806-1813.
- Caberoy, N. B. y Quintino, G. F. 2000. Changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity and gill chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and juveniles in response to salinity and temperature. *Fish. Physiol. Biochem.* 23:83-94.
- Carrasco-Núñez G., M.H. Ort y C. Romero. 2007. Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *J. Volcanol. Geoth. Res.* 159:179-197.
- Coyne, J. A. and Orr, H. A. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass, USA.
- Ciros-Pérez, J., Gómez, A y Sierra, 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.* *J. Plankton. Res.* 23:1311-1328.
- Cowardin, L. M., Carter, V., Golet, F. C. y LaRoe, E. T. 1979. *Classification of wetlands and deep water habitats of the United States*. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C., U.S.A. pp. 131.
- 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.
- De Meester, L., Gómez, A., Okamura, B. y Schwenk, K. 2002. The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecol.* 23:121-135.
- De Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. En: Howard D. J. y Barlocher S. H. (eds). *Endless forms species and speciation*. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra. pp. 57-75.

- De Queiroz, K. 2007. Species Concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56(6):879-886.
- Dobzhansky, T. 1935. A critique of the species concept in biology. *Philos. Sci.* 2:344-355.
- Dobzhansky T.1937. *Genetics and the Origin of Species*, Columbia. University Press, New York, NY, USA. pp. 364.
- Dodson, S. I., Grishanin, A. K., Gross, K. y Wyngaard, G. A. 2003. Morphological analysis of some cryptic species in the *Acanthocyclops vernalis* species complex from North America. *Hydrobiologia*. 500:131-143.
- Edmands, S. 1999. Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a range of divergence. *Evolution* 53:1757-1768.
- Edmands, S. y Deimler, J. K. 2004. Local adaptation, intrinsic coadaptation and the effects of environmental stress on interpopulation hybrids in the copepod *Tigriopus californicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 303:183-196.
- Ehrlich, P. R. y A. Ehrlich. 1981. *Extinctions*. Random House, New York. pp. 305.
- Elías-Gutiérrez, M., Suárez-Morales, E., Gutiérrez-Aguirre, E., Silva-Briano, M., Granados-Ramirez, J. G. y Garfias-Espejo, T. 2008. *Guía ilustrada de los microcrustáceos (cladóceros y copepodas) de las aguas continentales de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 36.
- Ellison, C. K, Burton, R. S. 2008a. Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution* 62:631-638.
- Ellison, C. K, Burton, R. S. 2008b. Genotype-dependent variation of mitochondrial transcriptional profiles in interpopulation hybrids. *P. Natl. Acad. Sci.* 105:15831-15836.
- Ellison, C. K, Burton, R. S. 2010. Cytonuclear conflict in interpopulation hybrids: the role of RNA polymerase in mtDNA transcription and replication. *J. Evolution. Biol.* 23:528-538.
- Escalante, T., G. Rodríguez, N. Gámez, L. León, O. Barrera y V. Sánchez-Cordero. 2007. Biogeografía y conservación de los mamíferos. En: Luna, I., Morrone, J. J. y Espinosa, D. (eds.). *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*. UNAM, México, D.F. pp. 485-502.
- Farmer, L. 1980. Evidence for hyporegulation in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*: 65:359-362.

- Figueroa-Maya, A. 2015. Eficacia diferencial entre la entrada en latencia vs. la reproducción continua de *Leptodiptomus cf. sicilis* (Copepoda: Calanoida) en ambientes hidrológicamente contrastantes. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 42.
- Forbes, S. A. 1982. On some Entomostraca of Lake Michigan and adjacent waters. *Am. Nat.* 116:537-542:640-649.
- Flores-Villela, O. y A. G. Navarro- Sigüenza. 1993. Un Análisis de los Vertebrados Terrestres Endémicos de Mesoamérica en México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 44:387-395.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp. 763.
- Funk, D. J. (1998). Isolating a role for natural selection in speciation: host adaptation and sexual isolation in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. *Evolution* 52:1744-1759.
- Glatzel, T. y Königshoff, D. 2005. Cross-breeding experiments among different populations of the “cosmopolitan” species *Phyllognathopus viguieri* (Copepoda:Harpacticoida). *Hydrobiologia* 534:141-149.
- Geoffrey, W. B. y Bayly, I. A. E. 1971. A comparative study of osmotic regulation in four species of calanoid copepod. *Comp. Biochem. Physiol, Part B*: 38:361-371.
- González-Zuart, C. A. 2008. Selección sexual y aislamiento reproductivo en peces de la familia Goodeidae. Tesis que para obtener el grado académico de doctor en ciencias. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 80.
- Gutiérrez-Aguirre, M. A., Cervantes-Martínez, A., Elías-Gutiérrez, M. (2014). An Example of how barcodes can clarify cryptic species: The case of the calanoide copepod *Mastigodiptomus albuquerquensis* (Herrick). PLoS ONE 9(1): e85019. DOI: 10.1371/journal.pone.0085019
- Hairston, N. G. y Fox, J. A. 2009. Egg Banks. In: Gene E. Likens, (Editor) Encyclopedia of Inland Waters. volume 3, Oxford: Elsevier. pp. 659-666.
- Hollyday, C. H., Roer, D.B. y R.D. 1990. Salinity-induced changes in brachial Na⁺/K⁺ - ATPase activity and tranepithelial potential difference in the brine shrimp *Artemia salina*. *J. Exp. Biol.* 151:279-296.
- IBM SPSS Statistics Inc. 2010. Versión 19. United States.

- Johnson, K. E., Perreau, L., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. y Lee, C. E. 2014. Without gills: Localization of osmoregulatory function in the copepod *Eurytemora affinis*. *Physiol. Biochem. Zool.* 87:310-324.
- Kingsolver, J. G., Pfenning, D. W. y Servedio, M. R. 2002. Migration, local adaptation and the evolution of plasticity. *Trends Ecol. Evol.* 17(12):540-541.
- Kiorboe T, Bagoien E. 2005. Motility patters and mate encounters rates in planktonic copepods. *Limnol. Oceanogr.* 50:1999-2007.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 24:189-216.
- Lapucki, T. y Normant, M. 2008. Physiological responses to salinity changes of the isopod *Idotea chelipes* from the Baltic brackish waters. *Comp. Biochem. Physiol. Part A:* 149:299-305.
- Larsen, E. H., Christoffersen, B. C., Jensen, L. J., Sorensen., J. B. y Willumsen, N. J. 1996. Role of mitochondria-rich cells in epithelial chloride uptake. *Exp. Physiol.* 81:525-534.
- Lee, C. E. 2000. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate "populations". *Evolution* 54:2014-2027.
- Lee, C. E. and B.W. Frost. 2002. Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae). *Hydrobiologia.* 480:111-128.
- Lee, C. E., M.S.Y. 2003. Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean rank. *J. Evol. Biol.* 16:179-188.
- Lee C. E., Kiergaard, M., Gelembiuk, G.W., Eads, B. D. y Posavi, M. 2011. Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65:2229-2244.
- Lowe, C. D., Montagnes, S. J. y D. J. S. 2005a. An interdisciplinary approach to assess the functional diversity of free-living microscopic eukaryotes. *Aquat. Microb. Ecol.* 41:67-77.
- Lowe, C. D., Montagnes, S.J. y D.J.S. 2005b. Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Mar. Biol.* 146:923:929.
- Macek, M., Vilaclara, G. y Lugo, A. 1994. Changes in protozoan assemblage structure and activity in a stratified tropical lake. *Mar. Microb. Food Webs* 8:235-249.
- Martens, K. y Hamer, M. 1999. Taxonomy and biodiversity. *Hydrobiologia* 397:1-3.
- Mauchline, J. 1998. *The Biology of Calanoid Copepods*. Advances in Marine Biology, 33. Nueva York: Academic Press. pp. 710.

- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press, New York, U.S.A. pp. 372.
- Mayr, E. 1970. *Population species and evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge. pp. 453.
- Mayr, E. 1982. *Speciation and Macroevolution*. *Evolution* 36(6):1119-1132.
- Mishler, B.D. y Luna, E. 1997. Sistemática filogenética y el concepto de especie. *Bol. Soc. Mex. Bot.* 60:45-57.
- Monchenko, V. I. 2000. Cryptic species in *Diacyclops bicuspidatus* (Copepoda: Cyclopoida): evidence from crossbreeding studies. *Hydrobiologia* 417:101-107.
- Montiel-Martínez, A., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E. y Elías-Gutiérrez, E. 2008. Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiptomus garciai* (Osorio-Tafall, 1942) as a valid endemic species. *J. Plankton Res.* 30(10):1079-1093.
- Montiel Martínez, A. 2006. Análisis comparativo de poblaciones parapátricas de *Leptodiptomus novamexicanus* (Copepoda: Calanoida): ¿especie eurialhalina o complejo e especies gemelas?. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias del Mar y Limnología. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 32.
- Mills, S., Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciro-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.
- Noor, M. A. F., Feder, J. L. 2006. Speciation genetics: evolving approaches. *Nat Rev Genet.* 7:851-861.
- Nosil, P., Harmon, L.J., Seehausen, O. 2009. Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends Ecol. Evol.* 24:145-56.
- Nosil, P. 2012. *Ecological speciation*. Oxford University Press, Nueva York. pp. 280.
- Palmer, C. A. y Edmands, S. 2000. Mate choice in the face of both inbreeding and outbreeding depression in the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. *Mar. Biol.* 136:693-698.

- Paterson, H. E. H. 1985. The recognition concept of species. En: *Species and Speciation*. Pretoria Transvaal Museum, Pretoria. pp. 21-29.
- Perfectti, F. 2002. Especiación: modos y mecanismos. *Evolución: La base de la biología*. M. Soler. Proyecto Sur. España. 18. 307-321.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol. Evol.*20(9):481-486.
- Ramírez, F. C. 2002. *Plancton sin formol*. Publicaciones Especiales INIDEP, Mar del Plata, Argentina. pp. 96.
- Roddie, B. D., Leakey, R. J. G. y Berry, J. 1984. Salinity-temperature tolerance and osmoregulation in *Eurytemora affinis* (Poppe) (Copepoda: Calanoida) in relation to its distribution in the zooplankton of the upper reaches of the Forth estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*79:191-211.
- Rundle, H D, Nosil, P. 2005. Ecological speciation. *Ecol Lett.* 8:336-52
- Ruíz-Gutiérrez, R. y Rodríguez-Caso, J.M. 2009. Especiación: Teorías, modelos y polémicas. En: J.J. Morrone y Magaña, P. (eds). *Evolución biológica, una visión actualizada desde la revista Ciencias*. Fac. de Ciencias, UNAM, México. pp. 297-334.
- Santer, B. 1996. Nutritional suitability of the dinoflagellate *Ceratium furcoides* for four copepod species. *J. Plankton Res.* 18:323-333.
- Santer, B. y Van den Bosch, F. 1994. Herbivorous nutrition of *Cyclops vicinus*: the effect of pure algal diet on feeding, development, reproduction and life cycle. *J. Plankton Res.* 16:171-195.
- Seehausen, O. y Van Alphen, J. 2000. Can sympatric speciation by disruptive sexual selection explain rapid evolution of cichlid diversity in Lake Victoria?. *Ecol. Lett.* 2: 262-271.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. Diario Of. de la Fed., México, D.F. pp. 85.
- Serra, M., Gómez, A. y Carmona, M.J. 1998. Ecological genetics of *Brachionus* sympatric sibling species. *Hydrobiologia* 387/388:373-384.

- Schallenberg, M. y Burns, C. W. 2001. Test of autotrophic picoplankton as early indicators of nutrient enrichment in an ultra-oligotrophic lake. *Freshwater Biol.* 46:27-37.
- Schluter, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends Ecol. Evol.* 16:372-380.
- Skelton, P. 1993. *Evolution*. The Open University, London. pp. 743-841.
- Snell, T. W., y Morris, P. D. 1993. Sexual communication in copepods and rotifers. *Hydrobiologia* 255:109-116.
- Sokal, R.R., y F.J. Rohlf. 1969. *Biometry*. W. H. Freeman, New York, U.S.A. pp. 327-332.
- Strickler, J. R. 1998. Observing free-swimming copepods mating. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B.* 353:671-680.
- Suárez-Morales, E., Reid, J.W y Gasca, R. 2000. Copepoda. En: Llorente-Bousquets, J., González, E. y Papavero, N. (eds.). *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México*. Vol. II. UNAM, México, D.F. pp. 171-190.
- SPSS Inc., 2008. *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Chicago, Illinois, U.S.A.
- Ting, J. H., Nelly, L. S. y Snell, T. W. 2000. Identification of sex, age and specie-specific proteins on the surface of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Mar. Biol.* 137:31-37.
- Turelli, M. y Moyle, L. C. 2007. *Asymmetric postmating isolation: Darwin's Corollary to Haldane's rule*. *Genetics* 176:1059-1088.
- USEPA. 2002. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5th ed. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency. pp. 275.
- Wallace, A. R. 1865. On the phenomena of variation and geographical distribution as illustrated by the Papilionidae of the Malayan region. *Zool. J. Linn. Soc-Lond.* 25:1-71.
- Willett, C. S., Burton, R. S. 2008. No evidence for faster male hybrid sterility in population crosses of an intertidal copepod (*Tigriopus californicus*). *Genetica* 133:129-136.
- Willett, C. S. The nature of interactions that contribute to postzygotic reproductive isolation in hybrid copepods. *Genetica* 139:575-588.
- Wu, C. I, Johnson, N. A. y Palopoli, M. F. 1996. Haldane's rule and its legacy: why are there so many sterile males?. *Trends Ecol. Evol.* 11: 281-284