



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**ESTRUCTURA Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS
COPÉPODOS CALANOIDES EN UN LAGO ALTAMENTE
VARIABLE EN LA CUENCA ORIENTAL MEXICANA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GEOVANI ARIEL JIMÉNEZ CRUZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE CIROS PEREZ

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2018



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.

Dedicatoria

A mis padres, Ariel y Reina, por todo el apoyo a lo largo de la vida, por permitirme tomar mis propias decisiones y por siempre estar ahí para apoyarme en las buenas y las no tan buenas. Gracias por todo su amor.

A mi hermana, Mariel, por ser por mucho tiempo inspiración de lucha y superación, por siempre estar ahí para echar la mano cuando más se necesita. Gracias en verdad, eres una gran madre, bióloga y hermana.

A mi hermano, Adrián, por ser siempre defenderme y enseñarme a ser leal aun cuando las cosas no fluyan de la mejor manera. Sabes que te quiero hermano, aunque seas un tanto gritón y enfadoso.

A mis otros hermanos, esos que pone la vida en el camino: Carlos, Erick, Salathiel, gracias por la aventuras y todos estos años de amistad, ustedes también son parte fundamental de todo esto. Gracias por estar siempre, desde los 12 años. Hemos compartido literalmente todas nuestras vidas y me siento muy orgulloso de cada uno de nosotros.

A Paulina, mi compañera en esta aventura, por todos los momentos, alegrías, enojos, por el apoyo y la sinceridad que me ha demostrado durante este tiempo. Gracias por recorrer este camino a mi lado. Gracias por tanto y por todo.

A todos todas las personas que han estado en algún punto de mi vida y que de cierta forma han dejado algo plasmado en mí, a todos, simplemente...

GRACIAS POR ESTAR.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por oportunidad de aprender, los conocimientos y oportunidades que me han brindado.

Al Dr. Jorge Ciros Pérez, por toda la paciencia y el apoyo que me ha brindado durante este tiempo, por todas las enseñanzas, pero sobre todo por ayudarme a entender la Biología de otra forma, por enseñarme a ser un “contador de historias”. Muchas gracias por tanto.

A la Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia por siempre brindarme su apoyo y sus muy muy importantes consejos, que sin duda ayudaran en gran medida a la realización de este proyecto.

Al Mtro. Omar Alfredo Barrera Moreno por ser amigo y mentor a lo largo de este tiempo.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras y la Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez por sus valiosos y acertados comentarios en la realización de este trabajo de investigación, por el tiempo dedicado a la mejora de este.

A todos los compañeros del PILT, gracias por la amistad y por aguantarme este tiempo.

Al proyecto DGAPA-PIPIIT UNAM: IN222916 por los apoyos brindados en las diferentes etapas de desarrollo de esta tesis.

Al CONACYT (proyecto: CB-255788), por la beca otorgada para la satisfactoria conclusión del presente proyecto de tesis.

Índice

Resumen	3
Introducción	5
Sistemas acuáticos continentales como modelos de estudio de diversificación	5
La especiación críptica y el reconocimiento de las especies	7
Los copépodos calanoides en el lago El Carmen.	12
Hipótesis.....	16
Objetivo general	18
Objetivos particulares:.....	18
Área de estudio	19
Métodos.....	21
Trabajo de campo	21
Estructura y dinámica poblacional.....	21
Identidad genética	23
Patrón de sustitución de los copépodos calanoides.....	26
Distribución de haplotipos en <i>M. cf. albuquerquensis</i>	27
Resultados.....	29

VARIABLES LIMNOLÓGICAS EN EL LAGO EL CARMEN	29
Estructura y dinámica poblacional.....	33
Identidad genética.....	36
Patrón de sustitución.....	41
Estructura genética y variación ambiental en <i>M. cf. albuquerquensis</i>	46
Discusión.....	49
Conclusiones.....	59
Literatura citada.....	61

Resumen

Los sistemas acuáticos continentales lacustres son ambientes en donde se espera que la diversificación sea mayor que en otros sistemas acuáticos. Esto se debe a su distribución a manera de islas y a que cada cuerpo de agua tiene características propias resultado de la combinación de factores fisicoquímicos y biológicos particulares. En esta tesis se analizó la estructura y dinámica poblacional de los copépodos calanoides del lago El Carmen (Puebla y Tlaxcala), un ambiente somero y efímero con amplias fluctuaciones de salinidad, a lo largo de un ciclo anual. Mediante un análisis de componentes principales y correlaciones entre las principales variables limnológicas (salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto) así como la densidad de las poblaciones de copépodos calanoides, se determinó que la salinidad y temperatura son las dos variables que mejor explican la varianza de las densidades poblacionales de estos organismos en el lago. La salinidad fue la única variable que mostró correlaciones estadísticamente significativas con la densidad de los copépodos adultos. A partir del análisis con el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I y de la utilización de metodologías *ad hoc* para discernir entre unidades taxonómicas operacionales (UTOs; i.e., especies; ABGD y PTP) se logró determinar la presencia de tres especies de copépodos calanoides: una afín al taxón *Leptodiptomus* cf. *sicilis*, que diverge 2.2% de *L.* cf. *sicilis* que habitan el lago Patricia, en Canadá y en promedio 25.3% de *L. sicilis* s.s. descrito en los Grandes Lagos canadienses. Además, dos especies gemelas afines a *Mastigodiptomus albuquerquensis* (1 y 2) con una distancia genética entre ambas

especies del 4.9%; en promedio ambas especies crípticas divergen 19.7% de otras especies afines al mismo género, así como 10.2% de los organismos determinados como *M. albuquerquensis* s.s. Se observó un patrón de sustitución de estas especies dentro del gradiente ambiental determinando principalmente por la salinidad donde *L. cf. sicilis* domina en condiciones de salinidad alta ($>7 \text{ g L}^{-1}$), mientras que las dos especies de *Mastigodiatomus* lo hacen en las salinidades intermedias (entre 5 y 6.5 g L^{-1}), lo que muestra la coexistencia de especies con un fuerte solapamiento de nicho. Sin embargo, –se observó que *M. albuquerquensis* 1 presentó una alta variabilidad genética intraespecífica, observándose la existencia de haplotipos aparentemente exclusivos de condiciones extremas de baja (2.2 g L^{-1}) o alta ($>7 \text{ g L}^{-1}$) salinidad, característica que hace suponer que esta especie es dominante sobre las otras dos especies de copépodos calanoides que habitan el lago dada la aparición y sustitución de genotipos especializados para hacer frente a las condiciones ambientales contrastantes. A partir de los resultados obtenidos podemos decir que los copépodos del lago El Carmen representan un sistema de estudio importante para entender los patrones de estructuración poblacional asociados a la variabilidad ambiental, así como para entender la divergencia de nicho en especies ecológicamente muy similares.

Introducción

Sistemas acuáticos continentales como modelos de estudio de diversificación

Los sistemas acuáticos continentales lacustres son ambientes en donde se espera que la diversificación sea mayor que en otros sistemas acuáticos (p.e., los ambientes marinos), ya que cada cuerpo de agua tiene características propias resultado de la combinación de factores fisicoquímicos y biológicos particulares (Barrera-Moreno *et al.*, 2015). Esa variabilidad ambiental producto de la combinación de factores fisicoquímicos y biológicos particulares ocurre incluso dentro de un mismo cuerpo de agua, tal como ocurre en los lagos temporales, que son un escenario idóneo en el cual podemos observar cómo cambia la dinámica y estructura de una población a lo largo del tiempo en respuesta a la variabilidad ambiental (Comin *et al.*, 1991; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

Dentro de los organismos planctónicos que habitan estos cuerpos de agua, el zooplancton, constituido por invertebrados pequeños (p.e., cladóceros, copépodos, rotíferos), juega un papel fundamental en la dinámica de estos ambientes. Los copépodos (Crustacea: Copepoda), son un grupo extraordinariamente diverso (se han descrito más de 13,000 especies; Morales-Ramírez *et al.*, 2014), destacando la existencia de una alta diversidad morfológica, fisiológica, de estrategias de vida y de capacidad para colonizar distintos ambientes.

Dichas características convierten a este taxón en un buen modelo para probar distintas hipótesis sobre una gran variedad de procesos biológicos (p.e., procesos de adaptación y diversificación; Bron *et al.*, 2011). Además, su importancia dentro de los ecosistemas acuáticos es por demás relevante, ya que son el eje principal de las cadenas tróficas dentro de dichos ambientes, ya que tienen un rol como consumidores primarios y/o secundarios, además de que sirven como una de las principales fuentes de alimento para niveles tróficos superiores (Williamson y Reid, 2010).

Debido a las características ambientales particulares del lago temporal El Carmen, ubicado en la Cuenca Oriental, México, es posible observar un gradiente ambiental amplio a lo largo del ciclo anual. Dentro del lago –entre otras especies planctónicas-, se ha registrado la presencia de tres especies de copépodos calanoides: *Leptodiptomus* cf. *sicilis* y dos especies crípticas (*i.e.*, especies filogenéticamente cercanas, pero difíciles de reconocer a simple vista; Bickford *et al.*, 2007) afines al taxón *Mastigodiptomus* cf. *albuquerqueensis* (Barrera-Moreno *et al.*, 2015; Barrera-Moreno, comunicación personal).

Los copépodos de vida libre presentan un desarrollo ontogénico complejo (Hairston y Bohonak, 1998) en el que además de los huevos subitáneos, se incluye la producción de huevos de resistencia. Esta capacidad les permite evitar la extinción de sus poblaciones aun cuando las condiciones del lago cambien totalmente o este se deseque (Hairston, 1996). Las características ambientales altamente variables y la diversificación de historias de vida han ocasionado la coexistencia de especies ecológicamente similares, donde

cada una tiene características ecofisiológicas particulares y distintas formas de responder a las condiciones ambientales (Alcántara-Rodríguez, 2010; Gabaldón *et al.*, 2015).

La especiación críptica y el reconocimiento de las especies

Según Bickford *et al.* (2007), se puede definir una especie críptica como “dos o más especies distintas que han sido erróneamente clasificadas bajo un solo nombre específico”. Es decir, se trata de dos o más especies que no se reconocen mediante características morfológicas, pero que exhiben características ecofisiológicas y de reproducción que las distinguen entre sí (Lee, 2000). La existencia de especies crípticas en copépodos y en otros invertebrados acuáticos es un fenómeno que ocurre comúnmente (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008), inclusive estas entidades pueden coexistir en simpatria (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

Para los taxónomos –y los biólogos en general- siempre ha sido una meta conocer el número de especies que habitan el planeta, sin embargo, en las últimas dos décadas la investigación sobre especies crípticas se ha incrementado notablemente, esto debido en gran medida, al desarrollo de herramientas moleculares que han facilitado la identificación de dichas especies (Bickford *et al.*, 2007).

Esta diversidad “oculta” ha supuesto un reto para los investigadores en los últimos años debido a que es complicado establecer un límite claro entre especies mediante únicamente información morfológica.

La identificación errónea de especies crípticas supone problemas en distintos niveles. Por ejemplo, subestimar los cálculos de diversidad específica de una zona de estudio determinada, es una de las muchas problemáticas que se pudiesen generar y que, a su vez, tiene consecuencias al momento de tomar decisiones sobre temas de conservación y manejo de recursos. Además de esto, se puede llegar a generar pérdidas económicas si no se logran determinar de manera certera especies crípticas con importancia médica y económica (p.e., control de plagas; Paterson, 1991). Finalmente, se podrían asumir conclusiones erróneas al momento de analizar la dinámica e interacción de las poblaciones en donde se formen complejos de especies crípticas (p.e., confundir una especie generalista que en realidad pudiera formar un complejo de especies especialistas; Hebert *et al.*, 2004; Marrone, 2013).

En particular, en sistemas acuáticos continentales, se han reportado varios casos de copépodos que inicialmente eran considerados especies con una distribución geográfica amplia, sin embargo, a través de evidencia molecular, morfológica, ecológica y/o reproductiva, se ha demostrado que gran parte de esas presuntas especies son en realidad dos o más especies crípticas que presentan un patrón de distribución restringido determinado por las condiciones ambientales (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014; Barrera-Moreno *et al.*, 2015). Debido a la dificultad de identificar mediante métodos taxonómicos clásicos (*i.e.*, solamente caracteres morfológicos), en años recientes se ha dado mayor importancia a la utilización de la información molecular para identificar organismos a nivel específico (Hebert *et al.*, 2003).

Uno de los genes que se ha propuesto como una herramienta eficiente, a manera de “código de barras universal”, para la identificación a nivel molecular de especies de metazoos, es el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (Hebert *et al.*, 2003). A pesar de ser una buena herramienta para identificar especies de grupos como lepidópteros (Hajibabaei *et al.*, 2006), peces (Lara, *et al.*, 2010), organismos zooplanctónicos como rotíferos (Mills *et al.*, 2016), cladóceros y copépodos (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014; Barrera-Moreno *et al.*, 2015), entre otros grupos (véase, p.e., : BOLD Systems, 2010; <http://www.boldsystems.org>), aún existen algunas controversias sobre su utilización, como por ejemplo, la idea de utilizar los marcadores moleculares como un sustituto de la taxonomía clásica (Ebach y Holdrege, 2005). Sin embargo, dichas afirmaciones no son del todo ciertas, ya que la utilización correcta de los marcadores moleculares no supone que se use como una herramienta antagonista a la taxonomía clásica, sino todo lo contrario, los marcadores moleculares son herramientas que deben de ser utilizadas como un apoyo necesario al momento de generar información taxonómica. Es importante resaltar que dicha información debe de ser validada, como ya hemos mencionado anteriormente, a través de análisis comparados morfológicos, ecológicos, reproductivos, etc., para lograr una taxonomía integrativa (Gregory, 2005; Schlick-Steiner *et al.*, 2010).

Otra de las dificultades que enfrenta la utilización de marcadores moleculares es el establecimiento de un límite claro acerca de cuanta divergencia genética -es decir, cuanta distancia genética- debe existir entre una especie u otra. Tradicionalmente, se utiliza una metodología llama “*barcode gap*”, que trata de encontrar el “*gap*” (la separación) entre la

diversidad intraespecífica y la diversidad interespecífica. Hebert *et al.* (2003), propusieron que dicho *gap* se calcula a partir de multiplicar 10 veces la distancia genética intraespecífica promedio. Mientras que Smith *et al.* (2005) propusieron que el *gap* se calculara a partir de aproximadamente el 3% de divergencia entre los clados. Sin embargo, como se puede observar, dichos métodos son arbitrarios y no tienen un algoritmo estadísticamente reproducible y fiable para delimitar a una especie.

Dadas estas circunstancias, Puillandre *et al.* (2012) propusieron un algoritmo automatizado para delimitar entre Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs) que correspondieran mejor con las especies biológicas. El algoritmo se basa en la misma metodología del *barcode gap*, sin embargo, el algoritmo agrupa el conjunto de datos en un número estimado máximo de grupos (*i.e.*, especies) de manera que, la distancia entre dos secuencias tomadas de grupos distintos será siempre mayor que la distancia del *gap*.

Una alternativa a esta metodología es la denominada GMYC (por sus siglas en inglés, *General Mixed Yule Coalescent*; Fujisawa y Barraclough, (2013), que delimita especies con la estadística de máxima verosimilitud a partir de un árbol ultramétrico, lo cual a su vez se puede convertir en un proceso computacionalmente tardado, demandante y que suele ser poco fiable, debido a la falta de información en ciertos taxones. El análisis PTP (por sus siglas en inglés, *Poisson Tree Processes*; Zhang *et al.*, 2013), surgió como una alternativa para determinar UTOs a partir de árboles filogenéticos sin la necesidad de que estos sean ultramétricos, eliminando así las dificultades técnicas del método de GMYC. El algoritmo PTP se basa en el número de sustituciones entre cada clado, suponiendo

que el número de sustituciones entre especies es significativamente (en sentido estadístico) más alto que el número de sustituciones dentro los individuos de la misma especie.

A partir de la idea de utilizar secuencias de DNA como códigos de barra en un análisis para discriminar entre especies, entonces es pertinente hablar de otro de los conceptos de especie muy utilizado, el concepto filogenético de especie. Dicho concepto fue propuesto por Eldredge y Cracraft (1980), y reestructurado por Wheeler y Platnick (2000), e indica que una especie es "la menor agregación de poblaciones (sexuales) o linajes (asexuales) diagnosticables por una combinación única de estados de carácter". En este concepto también se considera que dentro de ese grupo "existe un patrón de relación ancestro-descendiente entre los individuos" (Cracraft, 1983). De este modo, bajo el concepto filogenético de especie, podemos definir a la especie como un agregado de individuos dentro de un clado, con un ancestro en común y con una combinación de caracteres única.

Los copépodos calanoides en el lago El Carmen.

Existen varios trabajos realizados con copépodos del género *Mastigodiatomus*, los cuales indican que este taxón se encuentra distribuido desde la parte sur de los Estados Unidos hasta Centroamérica. En la actualidad dentro del este género, se reconocen al menos 11 especies distintas (Gutiérrez-Aguirre y Cervantes-Martínez, 2016).

En México, Gutiérrez-Aguirre y Cervantes-Martínez (2014), analizaron a los copépodos afines a *M. albuquerquensis*, que se pensaba era una especie con un rango muy amplio de distribución (desde el norte hasta el sur del país). Sin embargo, en dicho estudio, encontraron que al menos existen un par de especies que habitan en el centro del país (Lago de Pátzcuaro, Michoacán) y que han divergido de *M. albuquerquensis* s. s. (Chihuahua, México), y que este, a su vez, es genéticamente y morfológicamente distinto a otras especies de *Mastigodiatomus*. Estos resultados indican que, lo que se pensaba que en primera instancia era una sola especie con una distribución muy amplia, en realidad se trata de un complejo de especie crípticas, lo que abre las puertas al estudio mediante análisis molecular y análisis morfológico y ecológico en otras entidades similares a *M. albuquerquensis*.

Además, datos no publicados por Barrera-Moreno, generados a partir del gen mitocondrial COI, muestran que dentro de los copépodos determinados como *M. cf. albuquerquensis* que habitan el lago efímero El Carmen existen al menos dos linajes genéticamente distantes pero que son morfológicamente irreconocibles (Barrera-Moreno, comunicación personal). A pesar de esto, la información que se tiene de estas dos

entidades biológicas es muy escasa. Por ejemplo, no existen datos sobre la dinámica y estructura de sus poblaciones, ni tampoco de su dinámica dentro del gradiente ambiental que se ha reportado en el lago El Carmen.

Otra especie de copépodo calanoide que habita este lago pertenece al género *Leptodiptomus*, que en general, ha sido descrito como un taxón de talla pequeña a mediana (Elías-Gutiérrez *et al.*, 1999) y que presenta una distribución amplia dentro de Norteamérica, que va desde los Grandes Lagos, en Canadá, hasta la parte central de México. Se tienen documentadas al menos siete especies distintas de este género (véase Silva-Briano y Suárez-Morales, 2010), además del copépodo *L. cf. sicilis*, que habita dentro de la Cuenca Oriental (Barrera-Moreno, 2010) incluyendo el lago El Carmen.

Barrera-Moreno *et al.* (2015) analizaron las poblaciones de *L. cf. sicilis* en los lagos de Atexcac (un lago salino; 6.5 g L^{-1}), La Preciosa (un lago con salinidad baja; 1.2 g L^{-1}) y El Carmen (un lago somero y altamente variable; $1.9\text{-}48.3 \text{ g L}^{-1}$). En dicho trabajo, a pesar de que se encontró una baja divergencia genética interpoblacional ($<0.4 \%$ utilizando el gen COI), lograron observar diferencias a nivel morfológico (tamaño y coloración de los organismos), así como diferencias ecológicas y ecofisiológicas. Describiendo que los organismos se encuentran adaptados a las condiciones de su medio local –adaptación local– y observando la existencia de poblaciones especializadas a las condiciones de salinidad de sus lagos: una especialista a condiciones de salinidad alta (Atexcac) y otra a salinidades bajas (La Preciosa); además de una tercera población generalista, representativa del lago altamente variable, El Carmen. Además de estas

evidencias sobre la adaptación local de los copépodos *L. cf. sicilis* de la Cuenca Oriental, Figueroa-Maya (2015), describe un patrón de diferenciación de historias de vida entre los copépodos de los tres cuerpos de agua antes mencionados.

Con esta información, se podría formular la hipótesis de que estas tres poblaciones son en realidad tres especies que se encuentran en un proceso de divergencia temprano –esto debido a la baja divergencia genética <0.4%–. Sin embargo, tomando como criterio final para la separación de especies el entrecruzamiento, a partir de la información generada por Barrera-Moreno *et al.* (2015) y Figueroa-Maya (2015), no es posible asumir una completa separación reproductiva de éstas tres poblaciones. Por otra parte, Barrera-Sánchez (2016), reporta por primera vez, para las poblaciones especialistas de *L. cf. sicilis* de la Cuenca Oriental (poblaciones de Atexcac y La Preciosa), un proceso de aislamiento reproductivo postcigótico, lo que nos permite suponer, bajo una visión integrativa, utilizando datos moleculares, ecofisiológicos, morfológicos y de entrecruzamiento entre las poblaciones, que las poblaciones especialistas que habitan en la Cuenca Oriental son en realidad dos especies distintas, adaptadas a las condiciones locales de salinidad del cuerpo de agua en el que habitan y que además, dentro de la misma cuenca existe una tercera especie generalista que habita en un lago somero y altamente variable como lo es El Carmen..

A partir de los trabajos antes mencionados, podemos decir que en el lago El Carmen, que es un ambiente somero y altamente variable, coexisten dos especies crípticas afines a *M. cf. albuquerquensis*, además de otra especie aparentemente generalista atribuida a

un taxón denominado *L. cf. sicilis*. Lo anterior supone un escenario en donde coexisten tres especies de copépodos calanoides con capacidades ecofisiológicas y tróficas similares, que son planctónicas y que además tienen la capacidad de producir estructuras de resistencia que les permiten seguir dentro del sistema y escapar a las condiciones extremas de este ambiente.

De acuerdo con estos antecedentes, surgen una serie de preguntas: ¿Existirán diferencias en las dinámicas de las poblaciones de los copépodos calanoides a lo largo del gradiente ambiental?, ¿es la salinidad la variable ambiental que explica la presencia o ausencia temporal de estos organismos dentro de este cuerpo de agua somero y altamente variable?, o bien ¿existen otras variables que expliquen mejor la presencia de estas especies?, ¿qué tan frecuente es la coexistencia de estas especies ecológicamente tan similares en este lago?

Hipótesis

La existencia de un gradiente ambiental dentro del lago El Carmen, en el que la salinidad es uno de los factores que más varía a lo largo del año, así como la coexistencia de tres especies de copépodos calanoides (*L. cf. sicilis* y dos especies crípticas afines al taxón *M. cf. albuquerquensis*), permiten establecer tres escenarios para entender cómo es que coexisten estas poblaciones a lo largo del gradiente ambiental, en los que se tienen tres predicciones (Fig. 1):

- 1) Especies especialistas con óptimos poblacionales diferenciales y un patrón de sustitución claro, en donde se observan la entrada y salida de las especies dependiendo de la condición ambiental.
- 2) Especies generalistas siempre presentes a lo largo gradiente ambiental, pero con capacidades de carga diferentes.
- 3) Especies especialistas, presentes a lo largo de todo el gradiente ambiental y aunque hay una sustitución de genotipos asociada a los cambios temporales en las condiciones ambientales, las tres especies se mantienen con densidades diferenciales a lo largo del gradiente ambiental.

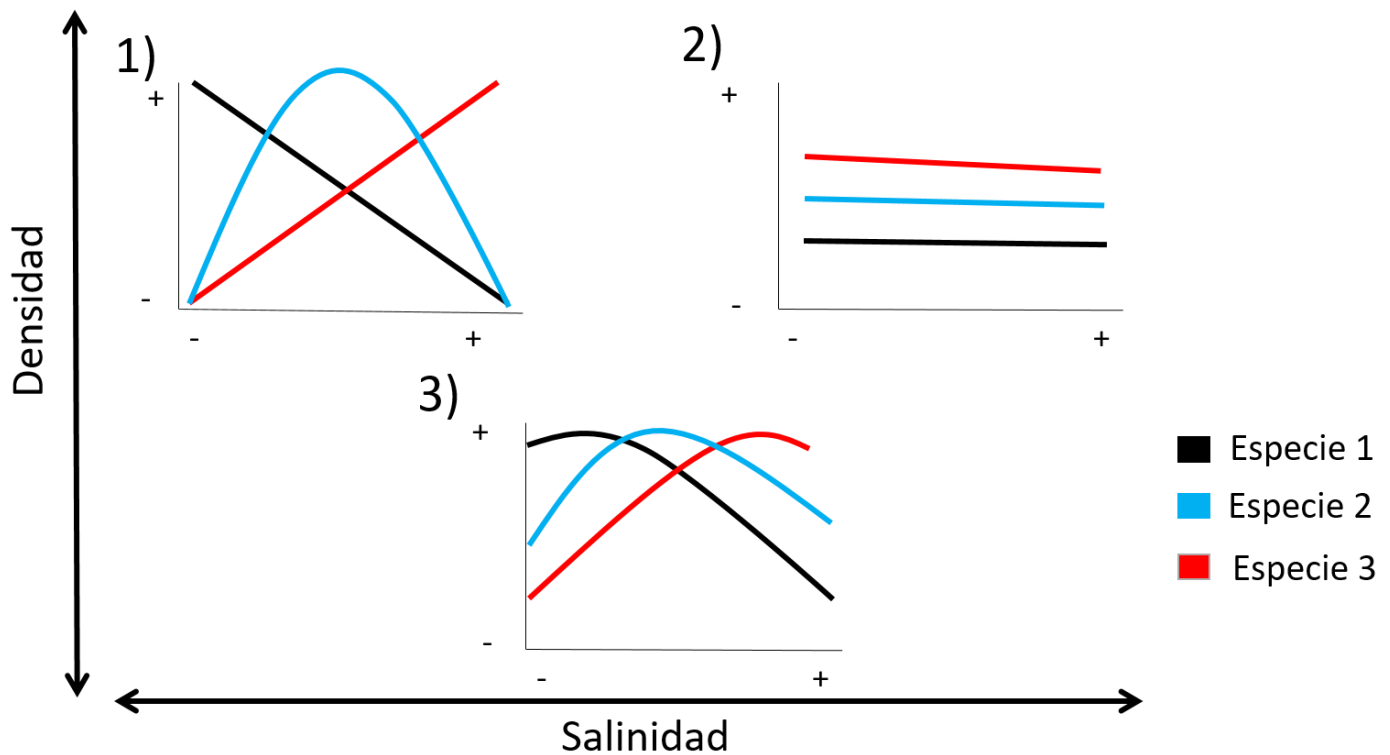


Figura 1. Se esquematizan los tres escenarios planteados para explicar el patrón de sustitución de las tres especies de copépodos calanoides que habitan el lago El Carmen.

1) Especialistas con patrón de sustitución claro; 2) generalistas presentes a lo largo de todo el gradiente ambiental, pero con eficacias diferenciales (no hay sustitución); 3) especialistas con óptimos diferenciales de eficacia, sin embargo, las tres están presentes a lo largo de todo el gradiente ambiental.

Objetivo general

Analizar la estructura y dinámica poblacional de los copépodos calanoides y su patrón de sustitución/coexistencia temporal de las especies existentes a lo largo de un ciclo anual en el lago efímero El Carmen.

Objetivos particulares:

- Describir el patrón de cambio de las principales variables limnológicas a lo largo de un ciclo anual en el lago El Carmen.
- Analizar la estructura y dinámica demográfica de los copépodos calanoides del lago El Carmen.
- Analizar la identidad genética de los copépodos calanoides utilizando el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I.
- A partir de los resultados obtenidos, describir el patrón de sustitución de las tres especies de copépodos calanoides a lo largo de un gradiente ambiental durante un ciclo anual.

Área de estudio

El lago El Carmen (19°09' a 19°26' N, 97°33' a 97°47' O; Fig. 2), también conocido como Totolcingo, ubicado en la Cuenca Oriental entre los límites de los estados de Tlaxcala y Puebla. Es un lago temporal, somero, con aguas muy turbias por sedimentos en suspensión. Ha sido reportado como un lago altamente variable, presentando un gradiente temporal de salinidad que va desde 1.4 hasta 10 g L⁻¹ (Barrera-Moreno, 2010). Dentro del lago habitan al menos un par de especies de copépodos calanoides afines a los taxones *M. cf. albuquerqueensis*, *L. cf. sicilis* y el copépodo ciclopoide *Acantocyclops cf. robustus*; además de otros organismos zooplanctónicos tales como los cladóceros *Daphnia similis*, *Daphnia cf. exilis*, *Moina wierzejskii*, *Moina hutchinson*, *Moina affinis* y *Alona sp.*; así como los rotíferos *Brachionus pterodinooides*, *B. urceolaris*, *Cephalodella catellina* y *Hexarthra jenkiniae* (Alcocer *et al.*, 1997; Martínez-Caballero, 2016; Serranía y López, comunicación personal).

Para el desarrollo de este proyecto, se seleccionaron tres estaciones de muestreo que representan ambientes contrastantes dentro del lago. Estas estaciones se encuentran separadas entre sí por un camino de terracería o un dique de ≥ 12 m de ancho que impide el flujo de agua entre ellas (o lo deja muy restringido). Las estaciones son de permanencia diferente (se desecan o llenan diferencialmente) a lo largo del ciclo anual, y proporcionan, de manera general, una representación del lago (Fig. 2C).

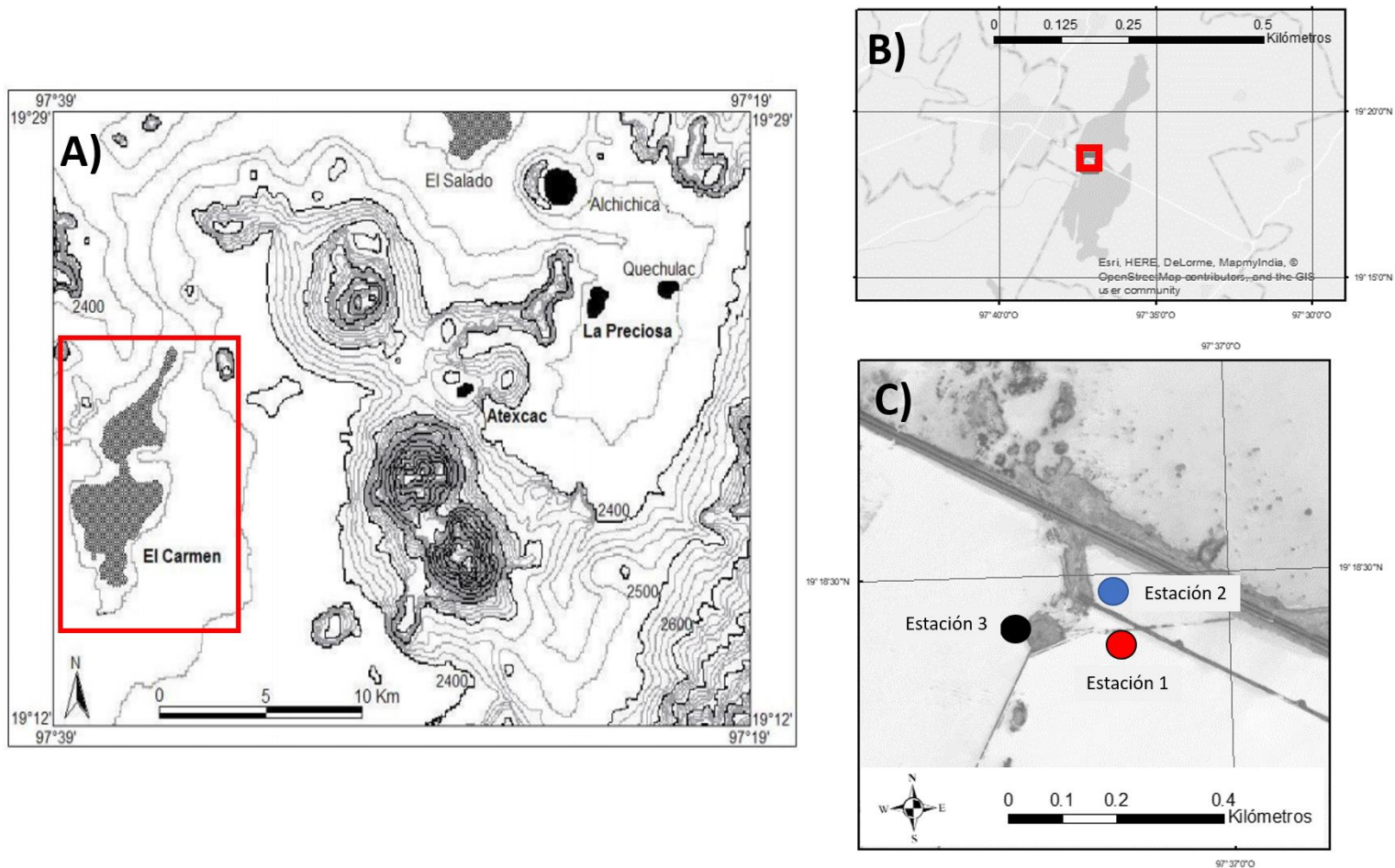


Figura 2. (A) Vista general de la Cuenca Oriental, ubicada entre los estados de Tlaxcala, Puebla y Veracruz, el recuadro señala la ubicación del lago El Carmen (modificado de Barrera-Moreno, 2010). **(B)** Vista general del lago, señalando la zona donde se realizaron los muestreos (modificados de Google Earth Pro®; Google Inc., 2017). **(C)** Localización de las estaciones de muestreo; se indican las tres estaciones (estación 1, estación 2 y estación 3).

Métodos

Trabajo de campo. Se realizaron muestreos biológicos mensualmente en el lago El Carmen durante el periodo de septiembre a septiembre 2016, completando un ciclo anual. En cada muestreo y en cada estación, se midieron oxígeno disuelto, conductividad –sólidos disueltos totales y salinidad-, temperatura y pH, utilizando una sonda multiparamétrica Hydrolab DataSonde3/Surveyor®.

Se colectaron muestras de zooplancton cualitativas y cuantitativas utilizando una red de plancton con una apertura de malla de 80 µm. Cuando el cuerpo de agua era muy somero se utilizó una bomba de agua manual para lograr conseguir el volumen requerido. Para obtener las muestras cuantitativas se filtraron entre 10-30 L de agua, posteriormente se fijaron con formaldehído a una concentración final del 4%. En el caso de las muestras cualitativas, el volumen fue variable (>30 L), se fijaron con etanol al 100% y preservaron en refrigeración a -4°C para posteriormente, realizar el análisis genético.

Estructura y dinámica poblacional. A partir de las muestras cuantitativas, se analizó la proporción de sexos y la estructura por edades de los copépodos calanoides. Estos se separando en cuatro grandes grupos dadas sus características morfológicas y ecológicas (Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Ciro-Pérez *et al.*, 2015): (1) larvas nauplio, (2) copepodito 1 a copepodito 3 (C1-C3), (3) copepodito 4 a copepodito 5, y (4) adultos machos y hembras. La identificación a nivel de especie se realizó analizando los caracteres sexuales secundarios en machos y hembras adultos de acuerdo con la literatura

especializada (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008; Reid y Williamson, 2010). En el caso de la diferenciación entre los estadios larvales y juveniles, al no poder distinguirse mediante alguna estructura morfológica, se diferenciaron a nivel genérico (*Leptodiatomus* vs. *Mastigodiatomus*) utilizando su tamaño relativo y/o color (*i.e.*, los individuos de *L. cf. sicilis* muestran una coloración rojiza y son más pequeños en comparación con los de *M. cf. albuquerquensis*, que además son translúcidos). Además, todos los organismos adultos -hembras y machos- se midieron a partir de la región cefalotorácica hasta la parte terminal del abdomen.

Una vez obtenidos los valores de las principales variables limnológicas a lo largo del ciclo anual, así como la densidad de organismos, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el programa SPSS versión 19 (IBM SPSS Inc., 2010), con la finalidad de encontrar aquellas características que expliquen mejor la variabilidad de las densidades poblacionales de los copépodos calanoides del lago El Carmen, de acuerdo con lo obtenido en el presente estudio. Para el análisis se excluyeron los meses con las salinidades más altas (octubre 2015, estación 2, y agosto 2016, estación 2) debido a que en estos meses no se encontraron copépodos calanoides y porque fue posible obtener una muestra suficiente para realizar el conteo, ya que el nivel del agua era muy bajo (agosto 2016, estación 2).

A partir de las densidades obtenidas, se realizaron correlaciones de Spearman para datos no paramétricos (Dytham, 2011) con la finalidad de analizar la existencia de una correlación

de estas variables demográficas con alguno de los parámetros limnológicos determinados.

Identidad genética. A partir de las muestras cualitativas de los meses de diciembre de 2015 y febrero del 2016, ambas de la estación 1, se aislaron y secuenciaron 10 y 5 hembras adultas del taxón *L. cf. sicilis*, respectivamente. Para el taxón *M. cf. albuquerquensis*, se aislaron y secuenciaron 10 hembras adultas de cada uno de las estaciones representativas de salinidades bajas a altas en donde se encontraron copépodos calanoides (2.2– 8.7 g L⁻¹): septiembre y diciembre de 2015 (5.8 y 8.7 g L⁻¹, respectivamente), febrero (7.4 g L⁻¹), junio (2.2 g L⁻¹) y septiembre de 2016 (5.4 g L⁻¹), todos ellos utilizando las muestras de la estación 1, a excepción de junio, donde se utilizó la muestra de la estación 3, debido a que no se encontraron suficientes individuos en las otras estaciones.

La identidad genética, se determinó con el marcador molecular Citocromo Oxidasa subunidad I (COI), el cual ha sido usado como una herramienta para la distinción interespecífica, así como para analizar de manera general la estructura genética de las poblaciones (Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014; Barrera-Moreno *et al.*, 2015). La extracción de ADN se realizó con el método de HotShot propuesto por Montero-Pau *et al.* (2008), colocando a cada individuo en tubos de 0.2 ml estériles, agregando 20 ml de buffer alcalino de lisis (NaOH 25 mM, EDTA disódico 0.2 mM, pH 8.0. Cada individuo fue macerado contra el tubo con una punta de micropipeta estéril. Una vez hecho esto, los tubos se incubaron a 96°C durante

30 minutos y posteriormente fueron colocados en hielo durante tres minutos. Se agregaron 20 µl de buffer neutralizador (Tris-HCl 40 mM, pH 5.0) a cada tubo y posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 3 min. Las muestras se almacenaron en congelación a -4°C para su análisis posterior.

Para la amplificación del gen COI se utilizaron los primers ZplankF1_tl/ZplankR1_tl, agregando a cada par de primers las colas M13F/M13R (Prosser *et al.*, 2013). Las reacciones de PCR se prepararon utilizando 10.5 µl de la solución comercial MasterMix® (Ampliqon PCR enzymes & Reagents©) que contiene Tris-HCl pH 8.5, (NH₄)₂SO₄, 2.2 mM MgCl₂, 0.11% Tween® 20, 0.22 mM de cada dNTP y 0.11 unidades/µl Ampliqon Taq ADN polimerasa; además se agregaron 0.5 µl de cada primer y 2 µl de ADN molde para obtener un volumen final de 13.5 µl. Posteriormente se utilizaron las siguientes condiciones para la amplificación del gen COI: 95 °C por 1 min, seguido por 5 ciclos a 94 °C por 40 s, 45 °C durante 40 s y 72 °C por 1 min; después, 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 51 °C durante 40 s y 72 °C por 1 min, seguidos de una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2%, utilizando 4.5 µl del producto de PCR y se agregaron 0.5 µl del colorante Midori Green Direct (NIPPON Genetics Co. Ltd.©). Los geles fueron expuestos a luz UV en un transiluminador Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) esperando observar bandas de un tamaño aproximado de 650 pb correspondientes al gen COI. Las muestras que mostraron bandas del tamaño adecuado y que, además, no presentaban fragmentos inespecíficos se enviaron para su secuenciación. Para este procedimiento, los productos obtenidos se marcaron utilizando el kit para secuenciación BigDye® Terminator v.3.1

(Applied Biosystems, Inc.) y se secuenciaron bidireccionalmente utilizando un secuenciador capilar ABI 3130 (Laboratorio de Análisis y Química de ADN, FES Iztacala, UNAM) siguiendo las instrucciones del fabricante (Hajibabaei *et al.*, 2006; Montiel-Martínez *et al.*, 2008).

Los electroferogramas generados se analizaron y editaron utilizando el software CodonCode Aligner (versión 7.0.1; CodonCode Corporation©) a partir del cual se obtuvieron las secuencias consenso que serían utilizadas para el análisis de divergencia genética. Además de las secuencias obtenidas, se utilizaron secuencias de ejemplares de *Mastigodiptomus* spp. y de *Leptodiptomus* spp, afines a las especies analizadas con la finalidad de comparar organismos dentro del mismo género; estas fueron tomadas del Barcode Of Life Data Systems (BOLD Systems, 2010; <http://www.boldsystems.org/>): *M. albuquerquensis* s.s., MMAST011-12; *M. patzcuarensis*, ZPLMX562-06; *M. moctezumae*, ZPLMX564-06; *M. reidae*, ZPLMX274; *M. texensis*, ZPLMX243; *M. cf. nesus*, GBA14283-13;.: *L. sicilis* s.s., CAISN950-13; *L. cf. sicilis* del Lago Patricia, BBCRU149-10; *L. garciai*, GBA14292-13; *L. novamexicanus*, ZPII189-07; *L. cuauhtemoci*, ZPII189-11. Se utilizó como grupo externo a ambos géneros a un copépodo de la misma familia -Diptomidae- *Hesperodiptomus articus* OZFWC405-11, debido a su cercanía filogenética con dichos géneros.

Las secuencias se alinearon con el método ClustalW utilizando el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2015). Las distancias genéticas entre las secuencias analizadas se calcularon utilizando el modelo de distancia de Kimura de dos parámetros (K2P; Kimura,

1980). Se generó un filograma a partir de K2P mediante el método del vecino más cercano (NJ; Saitou y Nei, 1987), con una secuencia de arranque (*bootstrap*) de 2,000 repeticiones (Felsenstein, 1985) para representar gráficamente los patrones de divergencia entre las especies de copépodos calanoides.

Las especies crípticas de *Mastigodiptomus* se delimitaron a partir del análisis de unidades taxonómicas operacionales (UTOs). Se utilizaron dos metodologías que han sido reportadas eficientes para este fin, inclusive con distancias genéticas pequeñas (Puillandre *et al.*, 2011; Ziang *et al.*, 2013). La primera, *Automatic Barcoding Gap Discovery* (ABGD; Puillandre *et al.*, 2011), que se basa en la utilización de la matriz de distancias genéticas generada a partir de K2P y la construcción de un dendrograma a partir de K2P y NJ. El segundo método, *Poisson Tree Processes Model* (PTP; Ziang *et al.*, 2013), está basado en la utilización del filograma construido a partir de K2P mediante el método NJ; además, dentro del algoritmo se utiliza una aproximación de máxima similitud para la construcción de dendogramas que delimitan la existencia o no de UTOs.

Patrón de sustitución de los copépodos calanoides. Después de determinar la identidad genética de los copépodos calanoides adultos del lago El Carmen (*L. cf. sicilis* y dos especies de *Mastigodiptomus*), se calcularon las proporciones de las OTUs según el número de secuencias obtenidas de *M. cf. albuquerquensis*. Una vez obtenidas las proporciones, estos valores se extrapolaron a las densidades obtenidas en cada mes y estación muestreados para obtener los valores de densidad de adultos estimados para cada taxón. A partir de estos valores, se analizaron los patrones de sustitución de los

copépodos a lo largo del gradiente ambiental determinado por la variable que presentó una correlación estadísticamente significativa con las densidades poblacionales. Además, se realizó un análisis de agrupamiento con las principales variables limnológicas y las densidades poblacionales, mediante el algoritmo UPGMA y el índice de disimilitud de Bray-Curtis, utilizando el software PAST versión 3.15 (Hammer *et al.*, 2001). Adicionalmente, se realizó un gráfico compuesto en donde se ubicaron cada una de las estaciones utilizadas para este análisis (Septiembre 2015 E1, Diciembre 2015 E1, Febrero 2016 E1, Junio 2016 E2 y Septiembre 2016 E1) dentro del ACP con las principales variables limnológicas determinadas en este estudio (salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto). En otro gráfico, las estaciones mencionadas anteriormente se ubicaron dentro del gradiente ambiental determinado por las dos variables que resultaran ser las que mejor expliquen la varianza de las densidades de los copépodos calanoides, determinadas a partir del ACP. En ambos casos, una vez ubicado cada uno de los puntos, se superpusieron gráficos de pastel con las proporciones de cada una de las especies para cada uno de los 5 puntos graficados, que representan cada una de las estaciones, esto con la finalidad de apreciar gráficamente el patrón de sustitución de cada una de las especies y el ensamblaje de copépodos a lo largo del gradiente ambiental.

Distribución de haplotipos en *M. cf. albuquerquensis*. Con la finalidad de comprender mejor el patrón de sustitución en *M. cf. albuquerquensis* del lago El Carmen, se obtuvieron los haplotipos correspondientes con el software DnaSP versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2010); donde, además, se calcularon los valores de diversidad nucleotídica (π) y diversidad haplotípica (H_D). Los haplotipos obtenidos fueron utilizados para generar una

red de haplotipos con ayuda del software NETWORK versión 5.0.0.1 (Fluxus Technology Ltd., 1999-2017), utilizando el algoritmo filogenético *Median-Joining* (Bandelt *et al.*, 1999). Además, con la finalidad de remover vectores o uniones innecesarias se utilizó el algoritmo MP (Polzin y Daneshmand, 2002), dentro del mismo software. Una vez obtenida la red de haplotipos, se editó y se escaló, colocando cada uno de los puntos generados, a lo largo de un gradiente de salinidad, con el propósito de observar la distribución de los diferentes haplotipos a lo largo de dicho gradiente.

Resultados

Variables limnológicas en el lago El Carmen

El lago El Carmen se comportó altamente variable a lo largo del ciclo anual en las principales variables limnológicas (Figs. 3 y 3.1). El pH tuvo un promedio de 9.73 ± 0.62 , con valores que van desde 8.67 en la estación 3 del mes de junio y un valor máximo de 11.2 en la estación 2 del mes de diciembre. El oxígeno disuelto varió de $4.17 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ en la estación 1 del mes de septiembre 2015 a $10.6 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ durante el mes de diciembre en la estación 2, con un promedio de $6.65 \pm 1.89 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. La temperatura y la salinidad fueron las variables más cambiantes a lo largo del ciclo anual. La temperatura máxima registrada fue de 26.95°C en la estación 3 del mes de marzo y la mínima 12.98°C en la estación 1 del mes de febrero, con un promedio anual de $20.92 \pm 3.41^\circ\text{C}$. En el caso de la salinidad, se registró una máxima en la estación 2 del mes de agosto (48.3 g L^{-1}), sin embargo, cuando se tomó esta muestra no fue posible realizar los muestreos cuantitativos ni cualitativos, esto debido a que en dicha estación estaba casi seca al momento del muestreo. En el caso de la estación 2 del mes de octubre, donde se registró una salinidad de 35.1 g L^{-1} , si se lograron tomar ambas muestras de organismos, sin embargo, no se encontraron copépodos calanoides en dichas condiciones. La salinidad mínima registrada fue de 1.9 g L^{-1} en la estación 1 del mes de junio.

En cuanto al ACP (Fig. 4), se observa que la salinidad, pH y oxígeno disuelto explican, en conjunto el primer eje (componente 1 = 56.5%). Sin embargo, al momento de realizar las correlaciones con las densidades poblacionales, solamente la salinidad fue

significativa ($p < 0.05$; Fig. 5). Por su parte, la temperatura explica el segundo eje (componente 2 = 26.4%); en conjunto, ambos componentes explican el 82.9% de la varianza de las principales variables limnológicas y las densidades estimadas para cada especie de copépodo calanoide.

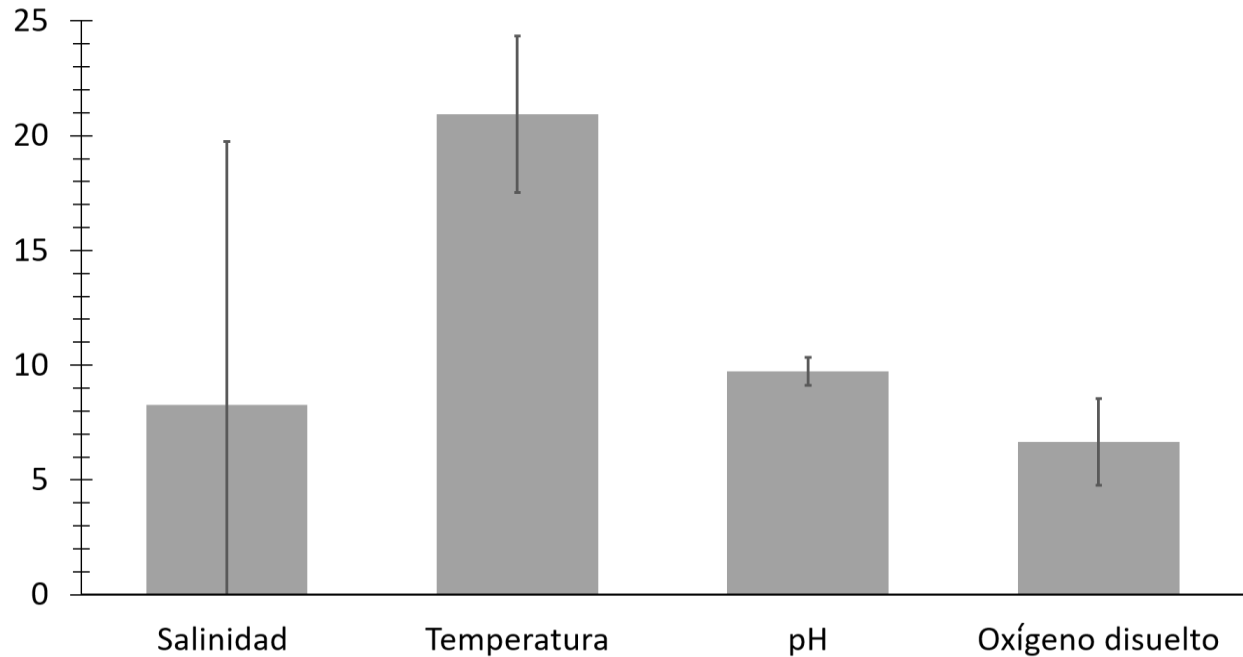


Figura 3. Promedio \pm desviación estándar de las principales variables limnológicas tomadas en El Carmen a lo largo del ciclo anual (salinidad: g L^{-1} ; temperatura: $^{\circ}\text{C}$; pH; oxígeno disuelto: $\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$).

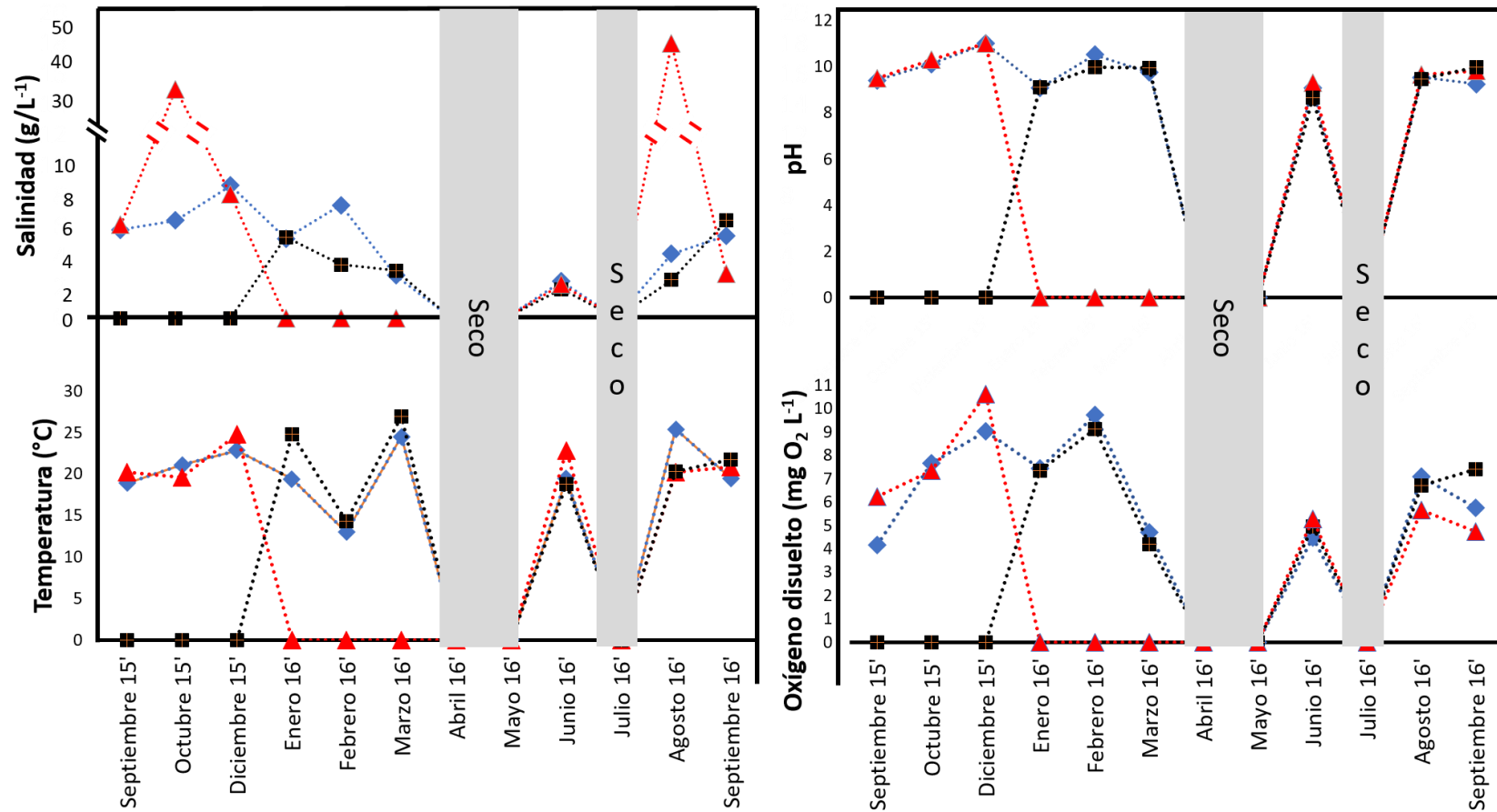


Figura 3.1. Se muestran las principales variables limnológicas a lo largo de un ciclo anual (septiembre 2015-septiembre 2016) para todas las estaciones: A) Salinidad (g L⁻¹); B) Temperatura (°C); C) pH; D) Oxígeno disuelto

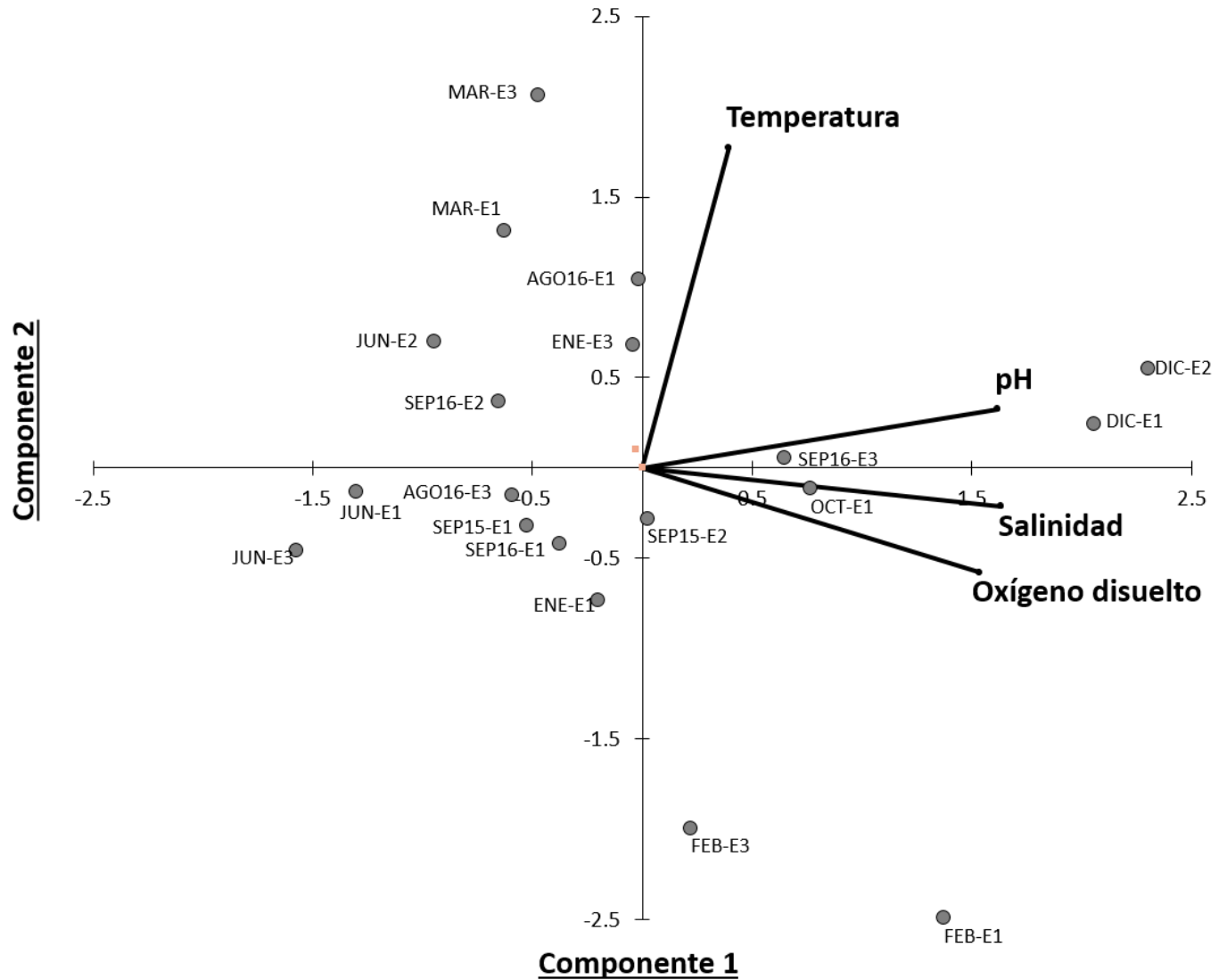


Figura 4. ACP para las densidades poblacionales y las principales variables limnológicas en el lago El Carmen a lo largo de un ciclo anual. La posición en el espacio de ordenación indica las fechas y estaciones de muestreo (puntos grises) y factores ambientales (vectores). El componente 1 está asociado a la salinidad, pH y oxígeno disuelto (56.5%); el componente 2 a la temperatura (26.4%). Estos factores explican el 82.9% de la varianza de las densidades poblacionales de los copépodos calanoides.

Estructura y dinámica poblacional

Las densidades de cada uno de los estadios de copépodos (larvas nauplio, copepoditos y adultos) no mostraron una distribución normal (pruebas de normalidad Shapiro-Wilk; todas $p \leq 0.01$). Se realizaron correlaciones de Spearman para datos no paramétricos para observar la relación entre la salinidad y la densidad de cada estadio de los copépodos estudiados (Fig. 6). En el caso de los estadios larvales y juvenil en *L. cf. sicilis* no se observó ninguna correlación entre la densidad y la salinidad a lo largo del ciclo anual ($p > 0.05$). Mientras que en el caso de *M. cf. albuquerquensis* las correlaciones fueron significativas ($p < 0.05$). En los nauplios, la salinidad explica el 46.4% de la variación, mientras que en el caso de los copepoditos es del 52%. Para los adultos, las correlaciones para ambas especies fueron igualmente significativas ($p < 0.05$) y la correlación existente fue del 74.5% en el caso de *M. cf. albuquerquensis* y del 75.5% para *L. cf. sicilis*.

En la Figura 7 se puede observar la variación de salinidad y la dinámica de las poblaciones de los copépodos calanoides adultos a lo largo del ciclo anual. Se observa que a salinidades menores ($\leq 3 \text{ g L}^{-1}$) las densidades de ambas especies son muy bajas, esto ocurre en la estación 3 durante los meses de febrero, marzo, junio y agosto; así como en la estación 1 de los meses de marzo y junio y en la estación 2 del mismo mes. En el caso de *M. cf. albuquerquensis*, las densidades más altas se obtuvieron en los meses de septiembre del 2015 en la estación 2, octubre 2015 y septiembre 2016, ambas

en la estación 1 (5.4– y 6.4 g L⁻¹). *L. cf. sicilis* tiene densidades más altas en diciembre estación 2 y enero estación 3 (5.3 y 8.1 g L⁻¹, respectivamente).

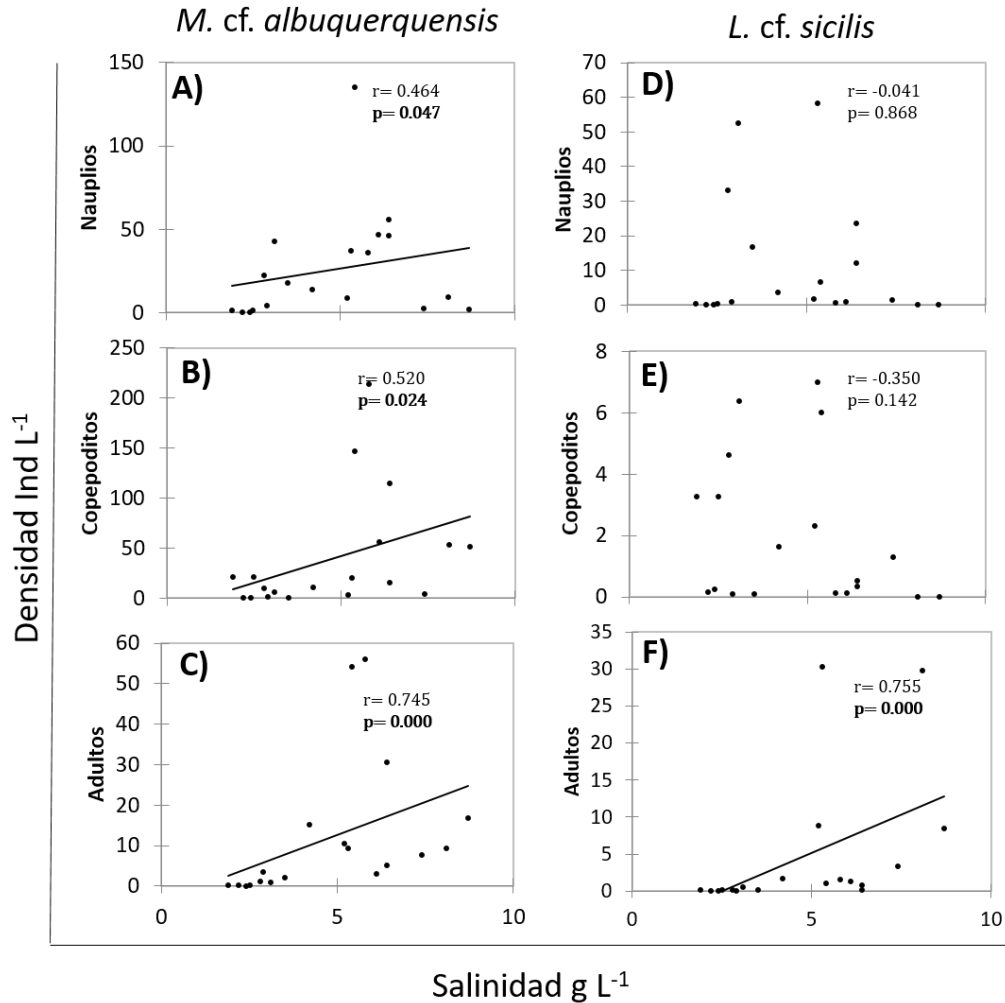


Figura 4. Correlación entre la salinidad y densidad de los copépodos *M. cf. albuquerquensis* (A-C) y *L. cf. sicilis* (D-F) del lago El Carmen. (A) Larvas *M. cf. albuquerquensis*; (B) juveniles *M. cf. albuquerquensis*; (C) adultos *M. cf. albuquerquensis*. (D) larvas *L. cf. sicilis*; (E) juveniles *L. cf. sicilis* y (F) adultos *L. cf. sicilis*. Se incluye en cada panel los valores de r y p según correlaciones no paramétricas de Spearman ($\alpha = 0.05$).

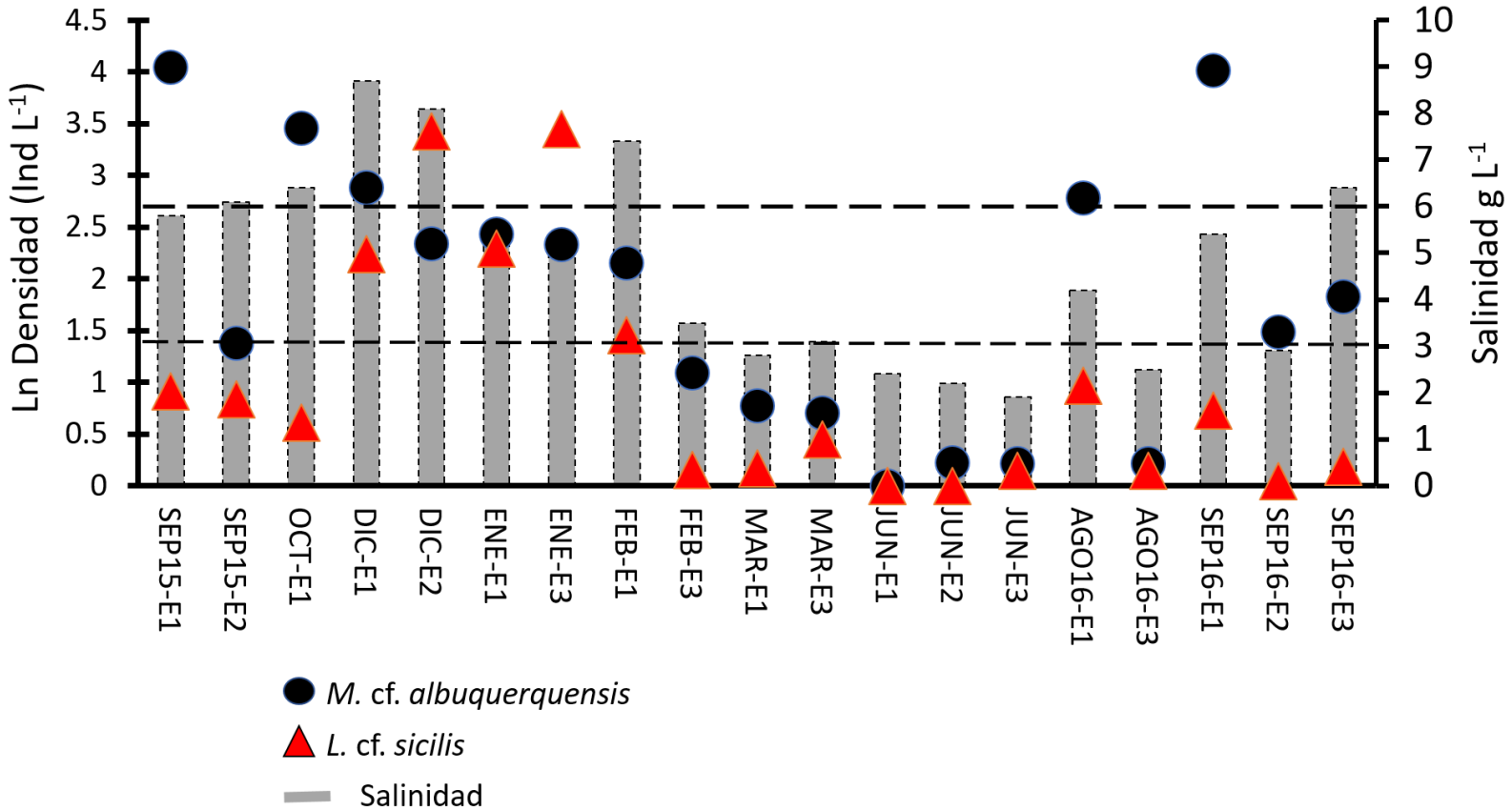


Figura 5. Dinámica de las densidades poblacionales de los copépodos calanoides (circulo negro *M. cf. albuquerquensis*, triangulo rojo *L. cf. sicilis*) en el lago El Carmen y de la salinidad (barras grises) a lo largo del ciclo anual. Las líneas punteadas delimitan los momentos con baja salinidad (<3 g L⁻¹), salinidad intermedia (3-6 g L⁻¹) y salinidad alta (>6 g L⁻¹) registrados durante el muestreo.

Identidad genética

A partir del análisis molecular que se generó al comparar fragmentos de 629 pares de bases (pb) del gen COI, se logró determinar la identidad genética de los copépodos estudiados. En la Figura 8 se muestra el filograma simplificado obtenido a partir del análisis de distancias de K2P mediante el método de NJ. Además, en la Tabla 1 se muestran los valores promedio de la distancia genética entre las especies analizadas en este estudio. El clado formado por los copépodos *L. cf. sicilis* del lago El Carmen se encuentra alejado 18.4% de otras especies del género *Leptodiptomus*; además, esta población presentó una distancia genética promedio del 2.2% con los organismos registrados como *L. cf. sicilis* que habitan en el lago Patricia, Canadá. Así mismo, los *L. cf. sicilis* del lago El Carmen se encuentran alejados genéticamente en promedio 25.3% de aquellos identificados como *L. sicilis* s.s, colectados en los Grandes Lagos, Canadá.

En el caso de *M. cf. albuquerquensis* del lago El Carmen, se observa una divergencia promedio del 19.7% (Tabla 1) con otras especies del mismo género, además, dentro de los organismos de El Carmen, encontramos dos linajes que divergen entre sí en promedio 4.9% (Tabla 1), y a su vez, estos se encuentran alejados genéticamente de *M. albuquerquensis* s.s. (Chihuahua, México) en promedio 10.2%. De las 50 secuencias obtenidas para este taxón, 41 (82%) pertenecen a *M. cf. albuquerquensis* 1 que se encontró en las cinco estaciones analizadas (véase Metodología), mientras que se determinaron 9 individuos (18%) como *M. cf. albuquerquensis* 2, de los cuales dos se

encontraron en diciembre de 2015, dos en junio de 2016, una en septiembre de 2016 y cuatro en febrero de 2016.

A partir de los análisis ABGD (Figs. 9 y 10A) realizado con los copépodos *M. cf. albuquerquensis* del lago El Carmen en comparación con aquellas secuencias de *Mastigodiatomus* spp. depositadas en BOLD Systems, se observa que los dos clados formados dentro de este grupo corresponden a UTOs significativamente diferentes (divergencia intraespecífica previa ≤ 1.5) y por lo tanto, pueden ser consideradas como especies diferentes. Esto se confirma con el análisis PTP (Fig. 10B), donde se observa el mismo resultado (porcentaje de similitud dentro del clado $\geq 90\%$), que separa estas dos especies entre sí y de los otros taxones afines incluidos en el análisis.

En el caso del análisis ABGD y PTP de *L. cf. sicilis* (Figs. 11 y 12), los resultados obtenidos fueron igualmente consistentes y, a partir de ellos, se separa a *L. cf. sicilis* del lago El Carmen como una UTO independiente del grupo de *L. cf. sicilis* del lago Patricia y de *L. sicilis* s.s., y, por tanto, se confirma como una especie filogenética distinta.

Tabla 1. Resumen del porcentaje promedio de la distancia genética (K2P; D) entre los principales taxones de copépodos calanoides analizados en el presente estudio.

Comparación	D (%)	Error estándar
Entre géneros	26.7	0.024
Dentro de <i>M. cf. albuquerquensis</i> 1 El Carmen	0.2	0.001
Dentro de <i>M. cf. albuquerquensis</i> 2 El Carmen	0	0
Dentro de <i>Leptodiaptomus</i> El Carmen	0.3	0.001
Entre <i>Mastigodiaptomus</i> spp. de El Carmen	4.9	0.01
<i>Leptodiaptomus</i> El Carmen vs. secuencias externas de <i>Leptodiaptomus</i> spp.	18.4	0.017
<i>Mastigodiaptomus</i> spp. El Carmen vs. secuencias externas de <i>Mastigodiaptomus</i> spp.	19.7	0.016

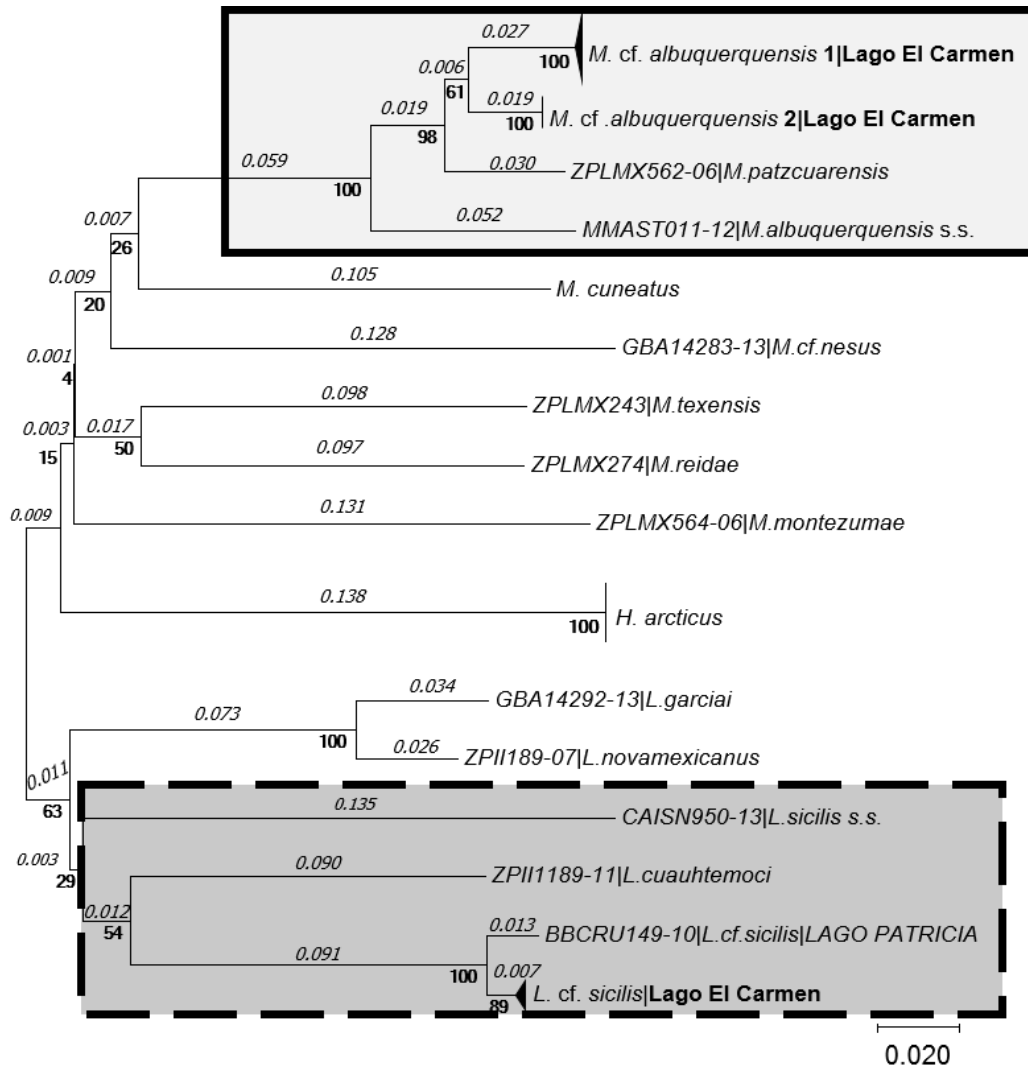


Figura 6. Filograma simplificado obtenido a partir de secuencias de COI, construido a partir de las distancias de K2P mediante el método de NJ. En negritas, se muestran los valores de *bootstrap* (2,000 repeticiones) y en cursivas los valores obtenidos para las distancias genéticas (K2P; véase Tabla 1). El recuadro con línea sólida resalta el clado con los taxones afines a *M. cf. albuquerquensis* de El Carmen y el recuadro con líneas punteadas resalta el correspondiente a *L. cf. sicilis*. Antes del nombre específico de cada especie se indica el código de identificación para cada secuencia dentro de BOLD Systems. Se utilizó como grupo externo a ambos géneros a *H. arcticus*.

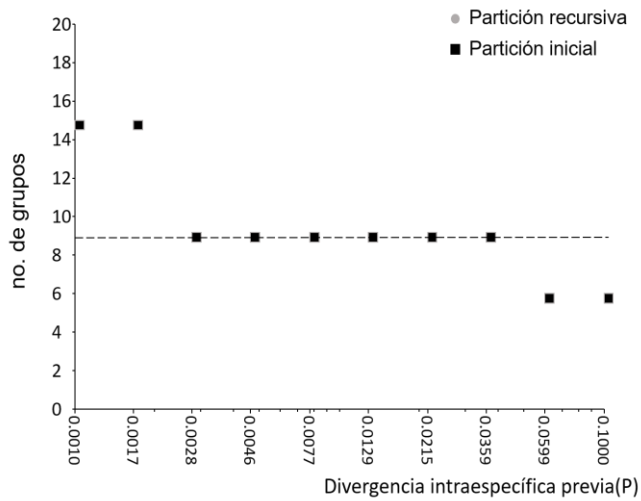


Figura 7. Resultado del análisis ABGD en el que se muestra el número de grupos generados a partir del análisis entre los linajes de *Mastigodiatomus* spp. La línea punteada indica el punto de estabilidad, que nos muestra el número más confiable de UTOs (i.e., 9 taxones) generados a partir de este algoritmo.

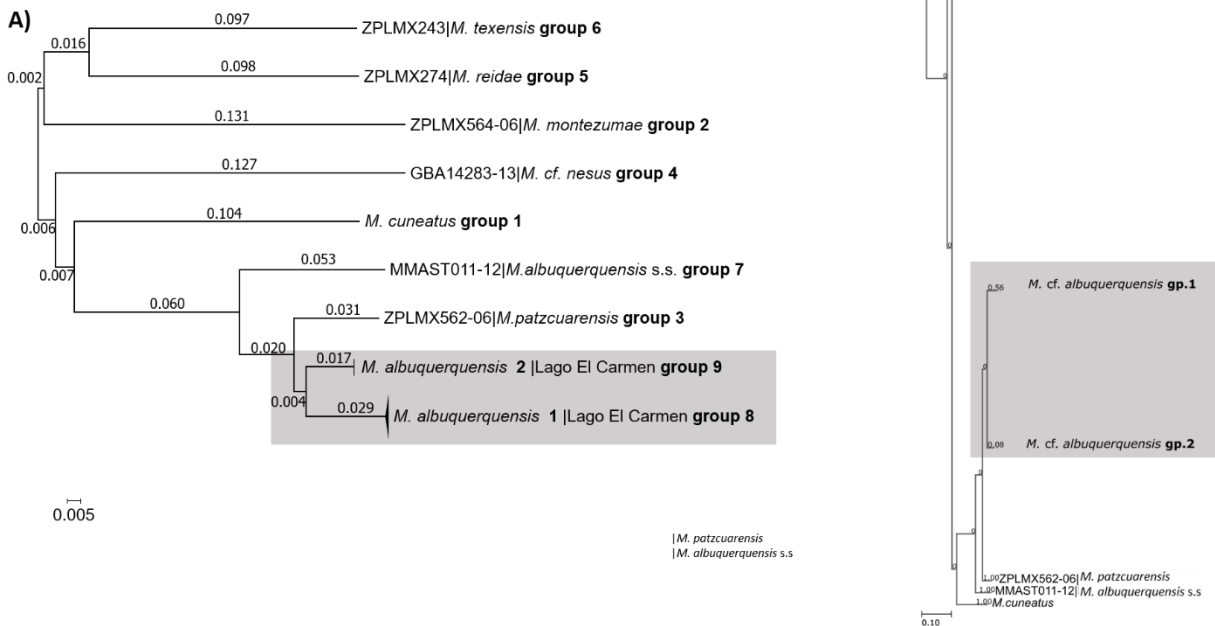


Figura 8. (A) Filograma simplificado con distancias K2P generado a partir del análisis ABGD para *Mastigodiatomus* spp., en donde cada grupo representa una UTO; **(B)** Cladograma simplificado generado a partir del análisis PTP, los valores sobre las ramas indican el valor de verosimilitud de cada uno de los clados, cada rama representa una UTO y corresponde a los grupos representados en la Fig. 9 (el grupo asignado se indica con negritas). En ambos casos, se enfatiza en el recuadro gris los taxones formados por *M. cf. albuquerquensis* del lago El Carmen.

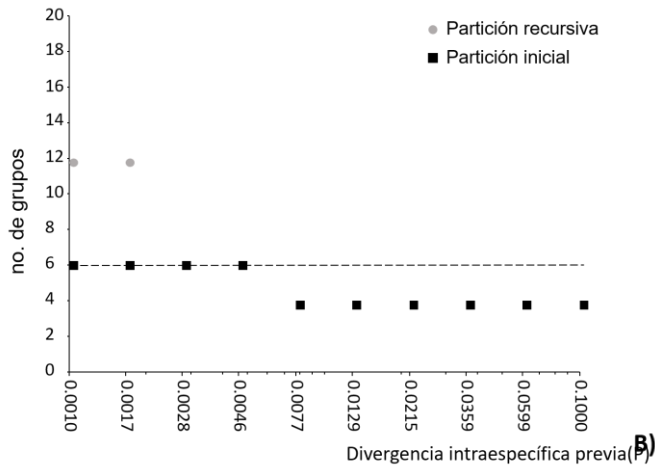


Figura 11. Se muestra el número de grupos generados a partir del análisis ABGD en *L. cf. sicilis*. En la línea punteada se indica el punto de estabilidad que nos muestra el número más confiable de UTOs generados a partir de este algoritmo.

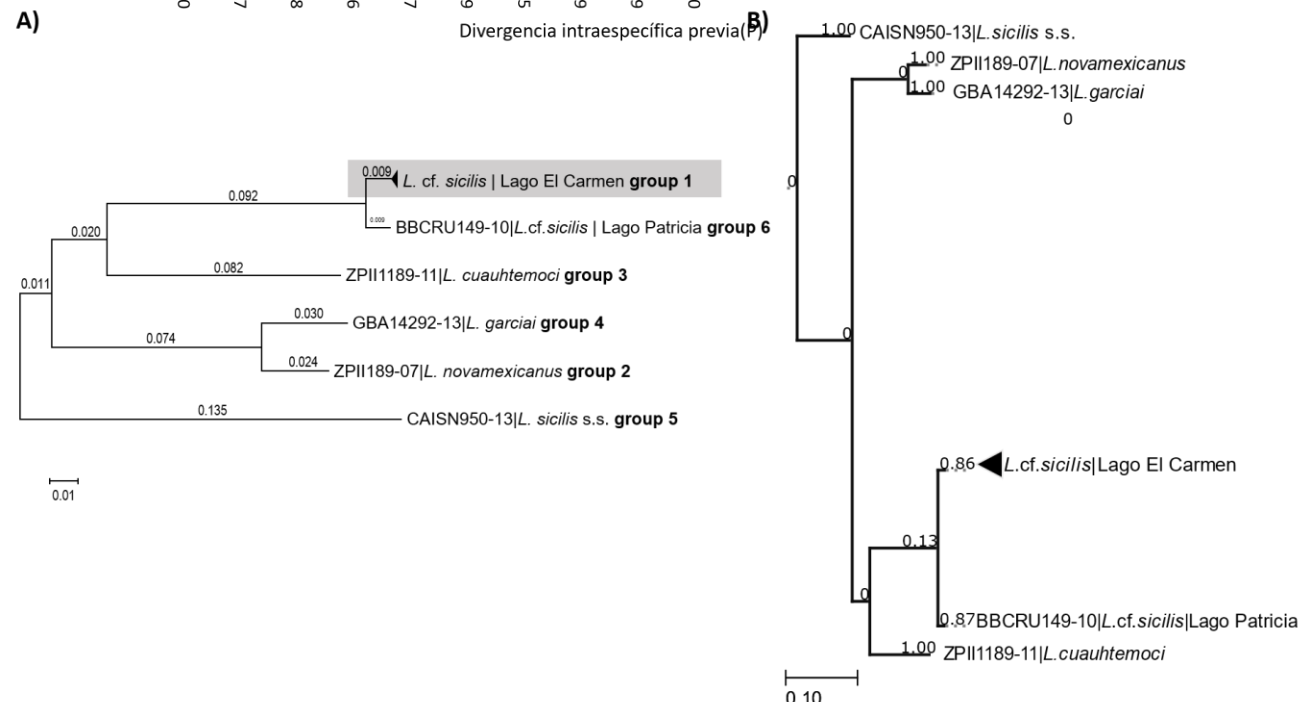


Figura 12. (A) Filograma simplificado con distancias K2P generado a partir del análisis ABGD en *Leptodiptomus* spp., en donde cada grupo representa una UTO. Se enfatiza en el recuadro gris el grupo formado por *L. cf. sicilis* del lago El Carmen. **(B)** Cladograma simplificado generado a partir del análisis PTP, los valores indican el valor de verosimilitud de cada uno de los cladogramas, cada rama representa una UTO y corresponde a los grupos representados en la Fig. 11 (el grupo asignado se indica con negritas). Se enfatiza en el recuadro gris el taxón *L. cf. sicilis* del lago El Carmen.

Patrón de sustitución

En la Figura 13 se observa el dendograma construido a partir del análisis de clasificación generado con el algoritmo UPGMA. Se incluyeron los valores de las principales variables limnológicas (salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto) así como las densidades estimadas de las tres especies de copépodos estudiadas. Se reconoce la agrupación de las estaciones de muestreo en tres grupos: el primero, con características de salinidad baja (2.2 g L^{-1} ; junio 2016); un segundo grupo caracterizado por presentar salinidades intermedias (septiembre 2015 y septiembre 2016) y un tercer grupo definido por salinidades altas (diciembre 2015 y febrero 2016)

Una vez determinada la identidad genética de las tres especies de los copépodos analizados, se identificó el patrón de sustitución a lo largo de un gradiente ambiental. En la Fig. 14A, se observa dicho patrón dentro del ACP, lo cual permitió determinar la salinidad y temperatura como las variables limnológicas que mejor explican la varianza de las densidades poblacionales de las tres especies de copépodos. De esta manera, en la Fig.14B, se observa la dinámica de estas tres especies dentro del gradiente determinado por temperatura y salinidad. Durante el mes de junio de 2016, bajo las condiciones de salinidad baja (2.2 g L^{-1}) y temperatura relativamente alta ($22.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$) sólo están presentes *M. cf. albuquerqueensis* 1 y *M. cf. albuquerqueensis* 2. En la segunda condición, caracterizada por dos estaciones con salinidades y temperaturas relativamente intermedias ($5-7 \text{ g L}^{-1}$; $18.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en septiembre 2015, y $19.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en septiembre 2016, respectivamente), se tuvo la presencia de las tres especies estudiadas,

aunque *M. cf. albuquerquensis* 1 dominó sobre las otras dos especies. Finalmente, el último grupo, fue definido por ser el de los meses de mayor salinidad (7.4 y 8.7 g L⁻¹; febrero 2016 y diciembre 2015, respectivamente), y con temperaturas contrastantes (12.9 °C en febrero 2016 y 22.8 °C en diciembre 2015).

De acuerdo con estos resultados, se puede asumir que la salinidad explica de mejor manera el patrón de sustitución de las tres especies. Cabe resaltar que en los momentos en los que la salinidad es más alta están relacionados con un incremento en la proporción de *L. cf. sicilis* (Fig 14A y B). Lo anterior se señala en la Figura 15, donde se observa un incremento poblacional de esta especie conforme aumenta la salinidad, así como una disminución en la densidad de ambas especies crípticas de *M. cf. albuquerquensis* en condiciones de salinidad altas. Es importante señalar que ambas especies crípticas afinas al taxón *M. cf. albuquerquensis*, presentan su óptimo poblacional en las mismas condiciones de salinidad intermedias (≈ 6 g L⁻¹; Fig. 15). Sin embargo, *M. cf. albuquerquensis* 1, alcanza densidades mayores a lo largo del gradiente ambiental en comparación con *M. cf. albuquerquensis* 2.

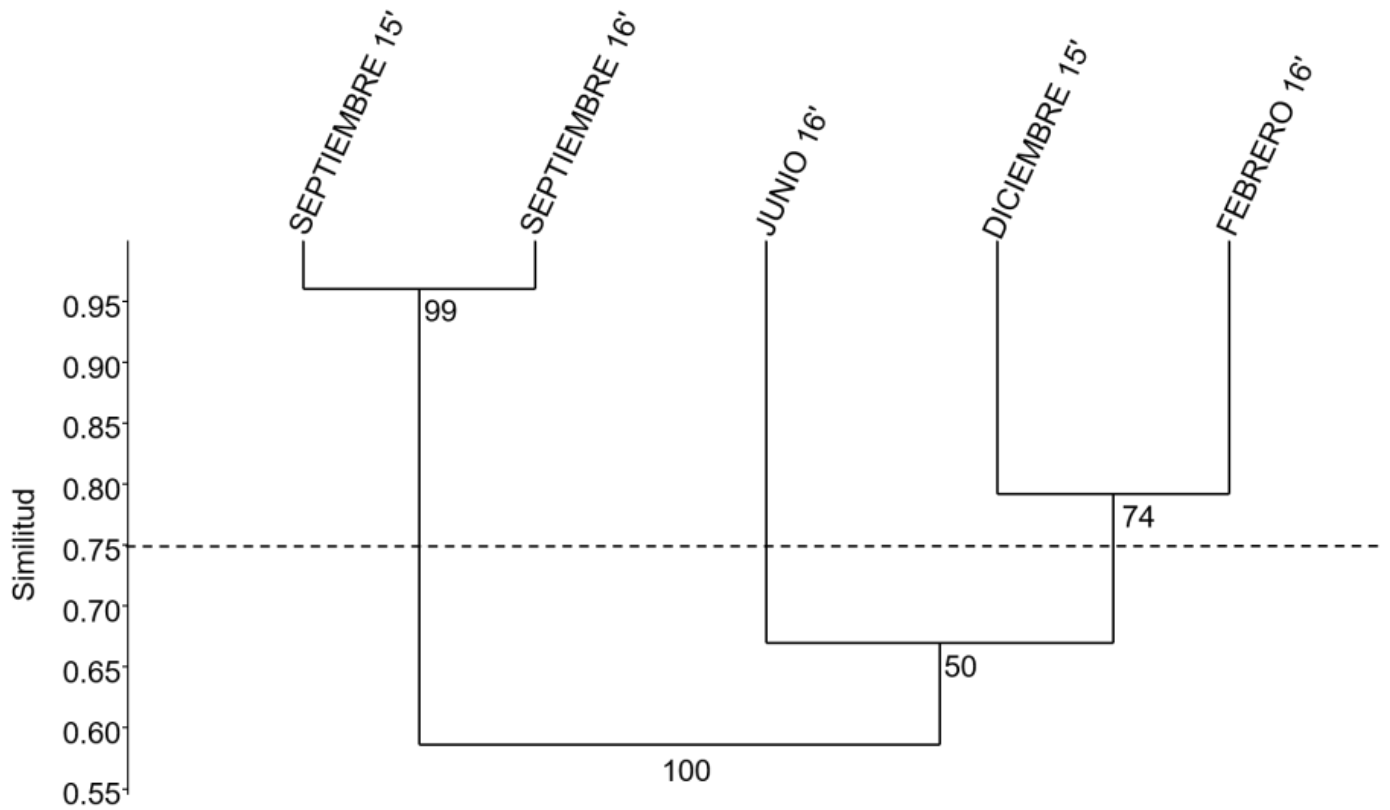


Figura 13. Análisis de clasificación de los ensamblados de los copépodos calanoides (densidades de adultos) del lago El Carmen en las fechas de muestreo analizadas, utilizando algoritmo UPGMA basado en el índice de similitud de Bray-Curtis, en donde se incluyen las variables limnológicas (la salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto. Cada nodo con valores de *bootstrap* (10,000 repeticiones).

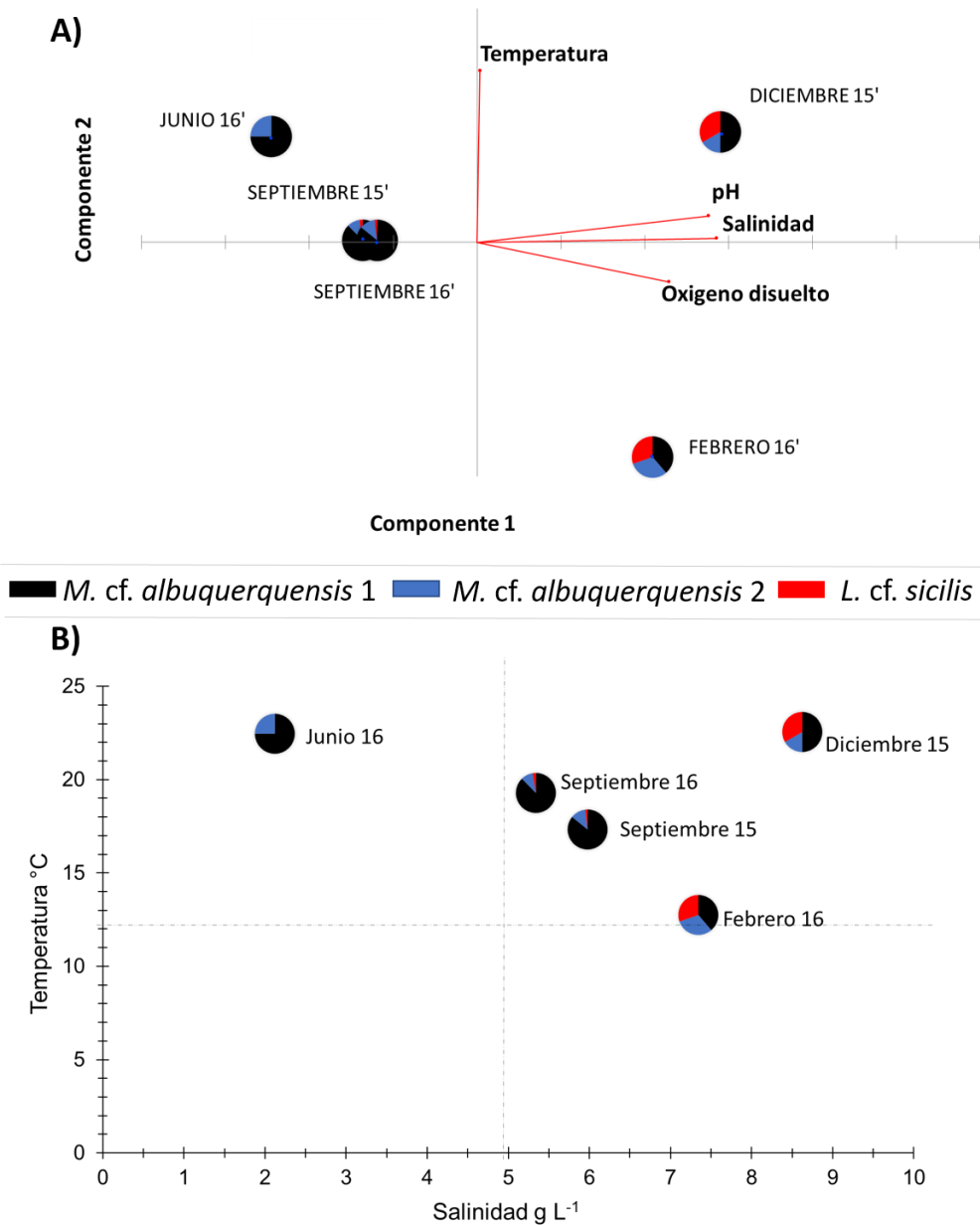


Figura 14. Proporción de las densidades de las tres especies de copépodos calanoides del lago El Carmen para las cinco fechas utilizadas en el análisis de la identidad (gráficas de pastel) en relación con las condiciones limnológicas del lago. Estructura del ensamblado de copépodos en espacio de ordenación según el análisis de ACP (**A**; véase, Fig. 4), y en relación con las dos variables limnológicas de temperatura y salinidad (**B**)

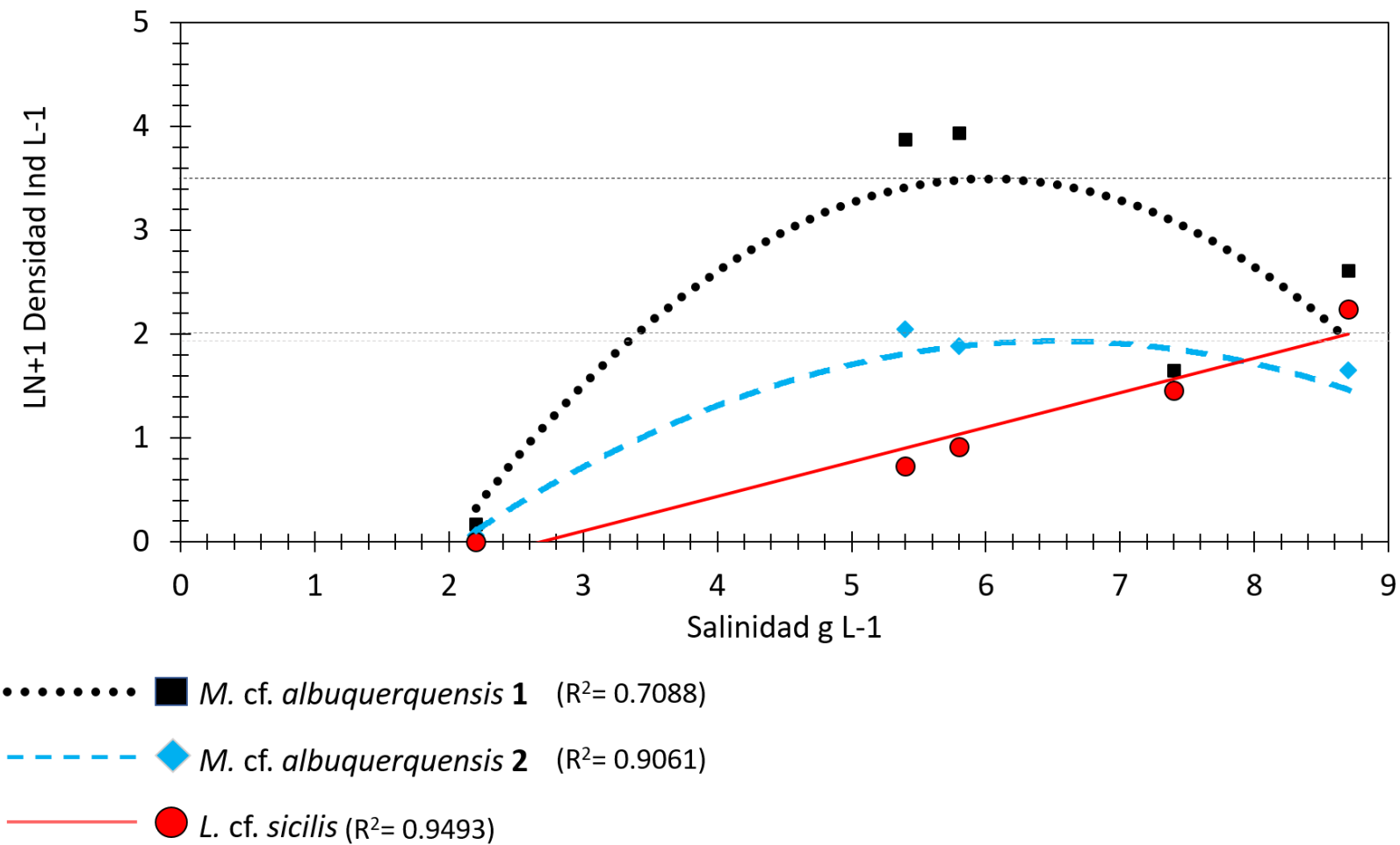


Figura 15. Patrón de sustitución de las tres especies de copépodos calanoides identificadas dentro del lago El Carmen. Se indican los valores de R^2 para cada una de las líneas de tendencia construidas a partir de una función polinomial de segundo grado.

Estructura genética y variación ambiental en *M. cf. albuquerquensis*

A partir de las 43 secuencias analizadas pertenecientes a individuos de las dos especies de *M. cf. albuquerquensis*, se identificaron 19 haplotipos y se obtuvo un valor de $\pi = 0.017$ y de $H_D = 0.883$ (Tabla 2). La red de haplotipos generada (Fig. 16) muestra 17 haplotipos de la especie *M. cf. albuquerquensis* 1, con 7 haplotipos que sólo aparecen en salinidades altas o bajas: 3 haplotipos de salinidad baja (2.2 g L^{-1}) y 4 haplotipos de salinidades altas ($>7 \text{ g L}^{-1}$); los 10 haplotipos restantes aparecen en salinidades intermedias (entre 5 y 6.5 g L^{-1}). En cuantos a los dos haplotipos de *M. cf. albuquerquensis* 2, ninguno está relacionado con condiciones externas particulares y se colectaron en salinidades intermedias (entre 5 y 6.5 g L^{-1}).

Tabla 2. Lista de haplotipos de los 43 individuos de *M. cf. albuquerquensis* del lago El Carmen, generada a partir de fragmentos de 629 pb del gen COI. Las flechas señalan los haplotipos que corresponden a la especie *M. cf. albuquerquensis* 2, el resto, corresponden a la especie *M. cf. albuquerquensis* 1. La red de haplotipos generada a partir de estos datos se puede observar en la Fig. 16.

Haplotipo	Número de individuos por haplotipo	ID de los individuos
Hap_1	12	SM16-9, SM16-2, SM16-10, SM15-7, SM15-5, SM15-3, JM-4, FM-6, FM-5, FM-4, DM-6, DM-10
Hap_2	1	SM16-8
Hap_3	1	SM16-7
Hap_4	5	SM16-5, SM16-4, SM15-6, JM-2, DM-2
→ Hap_5	8	SM16-3, SM15-10, JM-8, FM-9, FM-3, FM-2, FM-1, DM-7
Hap_6	1	SM15-9
Hap_7	1	SM15-8
Hap_8	1	SM15-4
Hap_9	1	SM15-2
Hap_10	1	SM15-1
Hap_11	2	JM-9, DM-3
→ Hap_12	2	JM-6, DM-9
Hap_13	1	JM-5
Hap_14	1	JM-3
Hap_15	1	JM-1
Hap_16	1	FM-8
Hap_17	1	FM-9
Hap_18	1	DM-8
Hap_19	1	DM-5

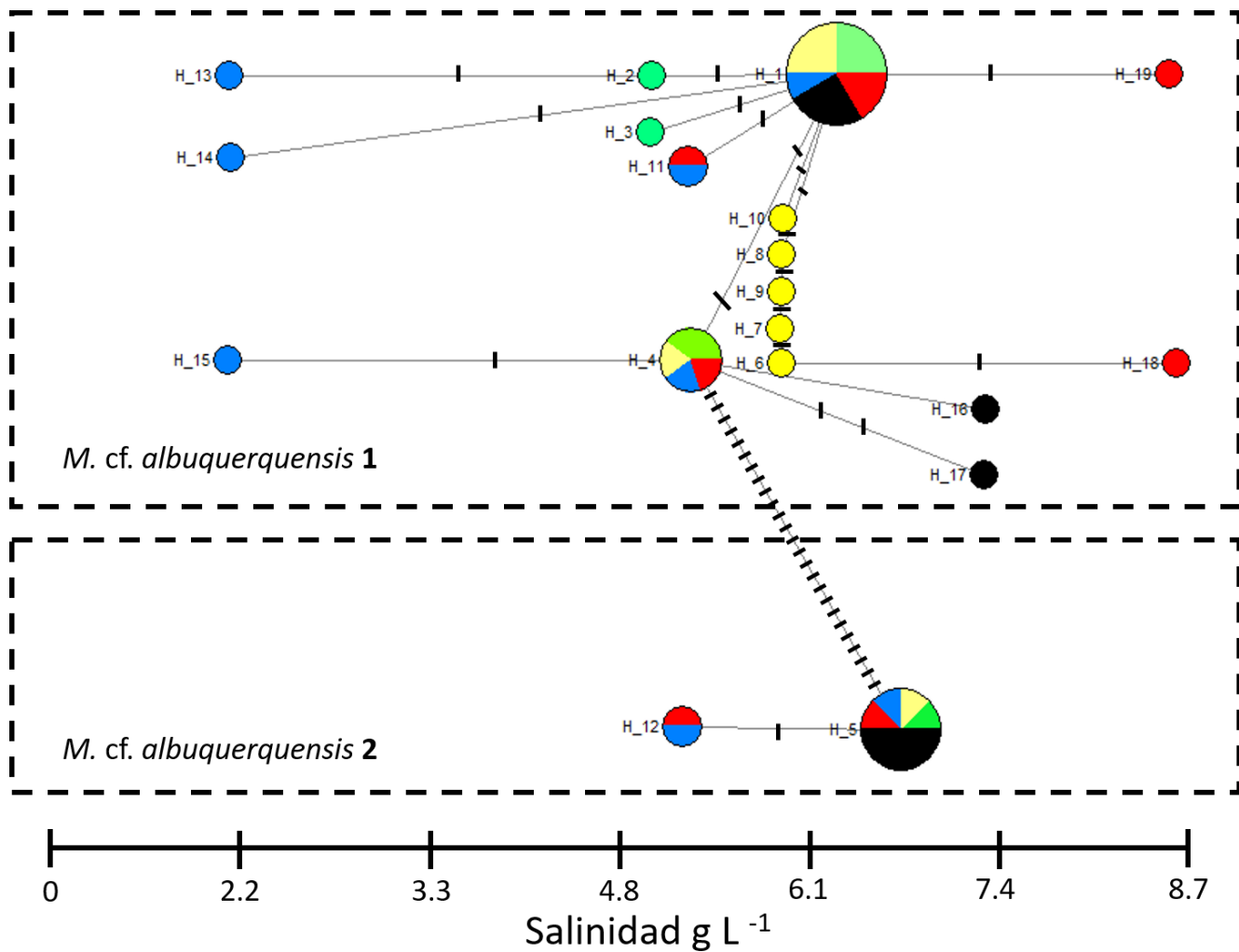


Figura 16. Red de haplotipos del gen mitocondrial COI de 43 individuos de *M. cf. albuquerquensis* del lago El Carmen. Se muestra el patrón de distribución de los haplotipos a lo largo de un gradiente de salinidad. El tamaño de los círculos varía según el número de individuos que corresponden a cada haplotipo (Tabla 2). Los haplotipos que corresponden a los meses representativos de salinidades altas ($\geq 7 \text{ g L}^{-1}$) se muestran en color rojo y negro; los haplotipos de salinidades bajas ($\leq 3 \text{ g L}^{-1}$) se muestran en color azul; los haplotipos de salinidades intermedias son los que corresponden a los colores amarillo y verde. Las líneas transversales sobre las ramas indican pasos mutacionales entre los haplotipos.

Discusión

El lago El Carmen, es un cuerpo de agua altamente variable a lo largo de un ciclo anual, como lo constatan las condiciones ambientales que se registraron en esta investigación. La variabilidad de las condiciones ambientales puede ser tan extrema que incluso, se registraron temporadas donde el lago llegó a secarse por completo durante algunos meses del ciclo anual (abril, mayo y julio de 2016; Figs. 3 y 4). A partir de los datos obtenidos en este estudio, se determinó que la salinidad ($1.9 - 48.3 \text{ g L}^{-1}$) y la temperatura ($12.98 - 26.95 \text{ }^{\circ}\text{C}$) son las dos variables limnológicas que tienen el mayor efecto para explicar la varianza de las densidades poblacionales de los copépodos calanoides que habitan el lago El Carmen. Estas dos variables han sido estudiadas ampliamente como factores ambientales que afectan directamente la estructura y la dinámica poblacional de los organismos zooplanctónicos en lagos tropicales (Last, 2002; Lewis, 2009), así como en lagos someros que presentan dinámicas en las que el cuerpo de agua puede llegar a secarse por completo (Gabaldón *et al.*, 2015a).

En cuanto a la temperatura, se sabe que es uno de los principales factores ambientales que afecta el tamaño corporal de los copépodos, observándose que existe, en general, una relación inversamente proporcional entre la temperatura y el tamaño del cuerpo de estos organismos (Anufriieva y Shadrin, 2013; Brun *et al.*, 2016). Además, la temperatura tiene otros efectos sobre el fitoplancton que a su vez podría producir un cambio en la disponibilidad de recursos para los copépodos, e inclusive, el aumento o la disminución de la temperatura podría afectar directamente el metabolismo de estos organismos.

Sin embargo, entre estas dos variables, solamente la salinidad presentó correlaciones estadísticamente significativas con las densidades de los diferentes estadios de los copépodos a lo largo del ciclo anual (Fig. 6). Estos resultados son consistentes con información previa que indica que, en lagos someros y efímeros, la salinidad es un factor ambiental determinante que tiene gran impacto sobre procesos ecológicos y evolutivos (Williams, 1998; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Gabaldón *et al.*, 2015b). En este sentido, la salinidad se ha estudiado como una variable importante que puede determinar la presencia o ausencia de especies de organismos zooplanctónicos, como son los copépodos, en donde es posible encontrar especies especializadas en los extremos de un determinado gradiente de salinidad (Battauz *et al.*, 2013). Además, dentro de la Cuenca Oriental –donde se ubica el lago El Carmen–, se ha estudiado como una variable que afecta directamente el crecimiento de copépodos (Montiel-Martínez *et al.*, 2008) e inclusive se ha relacionado con procesos de diversificación, promoviendo procesos de adaptación local y especiación ecológica en *L. cf. sicilis* (Barrera-Moreno *et al.*, 2015; Barrera-Sánchez, 2016).

En el caso de los estadios de nauplio y copepodito de *L. cf. sicilis* que no presentaron una correlación estadísticamente significativa con la salinidad, es muy probable que la variación de su densidad sea afectada por otros factores como la depredación de larvas y juveniles por parte de copépodos ciclopoideos, así como por larvas de insectos (Twombly *et al.*, 2007), o la competencia por recursos con otros organismos zooplanctónicos como los cladóceros (Toscano *et al.*, 2016), anostracos o conostracos (Dodson *et al.*, 2010) que habitan este cuerpo de agua, y que se registraron como abundantes cuando las

densidades de copépodos calanoides eran especialmente bajas, correspondiendo también a las condiciones de salinidad menores (Fig. 7).

Las fluctuaciones ambientales presentadas en el lago El Carmen, las cuales son bien representadas por variaciones amplias en la salinidad, suelen ocurrir en cuerpos de agua someros y forman parte de su dinámica natural. Dichas dinámicas son promovidas por temporadas de sequía y/o de lluvias, que afectan directamente la composición física, química y biológica de los lagos temporales (Comín *et al.*, 1991; Gabaldon *et al.*, 2015b). Además, se ha descrito que las fluctuaciones en la salinidad tienen un papel importante al momento de permitir la coexistencia de especies muy cercanas filogenéticamente (Comín *et al.*, 1991), siendo las capacidades ecofisiológicas y de historia de vida diferenciales a los cambios de salinidad las responsables de permitir que ocurra la coexistencia o exclusión de especies muy parecidas ecológicamente (Gabaldon *et al.*, 2015a).

Por su parte, con el estudio molecular analizado bajo el concepto filogénico de especie, fue posible determinar la existencia de tres taxones bien diferenciados que habitan el lago El Carmen. La presencia de dos especies gemelas afines a *M. cf. albuquerqueensis*, que divergen entre sí en promedio 4.9 % (19.7% en promedio respecto a las especies externas de *Mastigodiatomus* spp. comparadas), confirman la información que se tenía anteriormente. Sin embargo, la aproximación utilizada en este estudio adquiere importancia ya que por primera vez se recogen datos ecológicos de este par de especies crípticas que habitan en simpatría. Además, el descubrimiento de estas especies

gemelas que habitan dentro del mismo lago es relevante puesto que, estudios previos (Elías-Gutiérrez, *et al.*, 2008; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2014; Gutiérrez-Aguirre y Cervantes-Martínez, 2016) ya hacían referencia a la gran diversidad de especies dentro del género *Mastigodiatomus*. Estos estudios previos y los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la especie *M. albuquerqueensis* s.s. no tiene un rango de distribución que abarque México de norte a sur; sino que, como apunta Suárez-Morales (2005), puede tratarse de un complejo de especies con distribuciones más bien restringidas a lo largo del gradiente latitudinal, y que ha diversificado en un conjunto de especies con muy poca variabilidad morfológica, pero cada una con adaptaciones a condiciones ambientales particulares. De esta manera, tomando en cuenta que en sistemas acuáticos continentales tropicales la frecuencia de aparición de especies crípticas en copépodos es más habitual en comparación con lo ocurrido en sistemas templados (Lewis, 1996), es posible formular la idea de la presencia de taxones diferentes en nuestra área de estudio.

En el caso de *L. cf. sicilis*, a partir de los análisis realizados para la discriminación de UTOs, se logró determinar que la población que habita el lago El Carmen en realidad se trata de una especie separada genéticamente de especies aparentemente similares registradas en Canadá –divergencia genética del 2.2% con *L. cf. sicilis* del lago Patricia y del 25.3% con *L. sicilis* s.s. de los Grandes Lagos–. Así, a partir de los datos aquí generados y de los obtenidos por Barrera-Moreno *et al.* (2015), se confirma la existencia de un complejo de especies crípticas afines a *L. sicilis*, que han sufrido un proceso de adaptación local a las condiciones de salinidad propias de los lagos de la Cuenca Oriental y que incluye un representante que habita el lago El Carmen, mismo que a partir de los

resultados aquí obtenidos será nombrado como *Leptodiptomus* “El Carmen”. Sin embargo, es importante señalar que aún es necesario realizar el trabajo de morfología comparada para determinar las diferencias estructurales finas entre estas especies.

Al relacionar la densidad de las tres especies dentro de un gradiente determinado por la salinidad (Fig. 14a), se observa que a pesar de que estas especies de copépodos tienen características ecofisiológicas similares, al menos una de ellas (*Leptodiptomus* “El Carmen”), tiene un óptimo poblacional en salinidades altas (≥ 7 g L⁻¹), teniendo probablemente una mayor eficacia bajo dichas condiciones y, eventualmente, si dicha condición fuese persistente tenderá a desplazar a las dos especies gemelas de *Mastigodiptomus* que son afines a salinidades intermedias (entre 5 y 6.5 g L⁻¹).

En cuanto a la coexistencia de las dos especies gemelas afines a *M. albuquerquensis*, los resultados obtenidos hasta ahora muestran que estas especies presentan un solapamiento de nicho importante (Fig. 15). Sin embargo, existe una diferencia básica entre ellas, *M. cf. albuquerquensis* 1 (la especie que tiene mayor densidad a lo largo del gradiente ambiental y, por ende, la especie dominante) se observó en un rango más amplio de salinidades y, además, presentó haplotipos exclusivos que se encuentran en condiciones de salinidades contrastantes dentro del gradiente ambiental (Tabla 2, Fig. 16). Esta sustitución de haplotipos, aparentemente especializados, podrían significar una ventaja para la población de esta especie, permitiéndole establecerse de mejor manera en condiciones de salinidad baja a alta, dominando a su competidor, *M. cf. albuquerquensis* 2, y posteriormente, permitiéndole mantener su población con la

aparición de haplotipos afines a condiciones intermedias, que seguirán dominando sobre las otras dos especies. Sin embargo, esta aparente ventaja disminuye a medida que la salinidad aumenta provocando una disminución de la densidad considerable, permitiendo sólo la supervivencia de aquellas variantes genéticas que mejor soportan las salinidades altas ($\geq 7 \text{ g L}^{-1}$; véase Fig. 16).

A pesar de esas diferencias, es complicado suponer qué mecanismos determinan la coexistencia de estas dos especies. Montero-Pau y Serra (2011), proponen un mecanismo para explicar este fenómeno en organismos zooplanctónicos con la capacidad de generar estructuras de resistencia, tal como sucede con las tres especies estudiadas. En su trabajo, estos autores proponen que la coexistencia con solapamiento de nicho es posible debido a un efecto de compromiso dependiente de la densidad poblacional, donde la población que en un principio es dominante, con niveles altos de densidad, al llegar a un punto máximo, comienza a invertir más recursos en la producción de estructuras de resistencia (Ban y Minoda, 1994; Gyllström y Hansson, 2004). Esto a su vez, produce una disminución en la capacidad de competencia por recursos, así como en otras funciones como podría ser la osmoregulación, lo que permitiría una evasión temporal de las condiciones ecológicas menos favorables y que las especies pudieran coexistir o sustituirse en un sistema de este tipo con condiciones ambientales altamente variable (Roddie *et al.*, 1984).

Este punto de máxima densidad poblacional, y, por lo tanto, de generación de estructuras de resistencia, podría estar asociado también con el aumento en la densidad de

Leptodiptomus “El Carmen”, que alcanza densidades altas en salinidades mayores a 7 g L⁻¹. Si se observa esto dentro del gradiente ambiental (Fig. 15), podemos suponer que la disminución en la densidad y en la capacidad competitiva debido a la producción de estructuras de resistencia por parte de *M. albuquerquensis* 1, da la oportunidad del incremento de la densidad poblacional de *Leptodiptomus* “El Carmen”, que, según datos de laboratorio, es una especie generalista, con una eficacia mayor a salinidades intermedias (3.8 g L⁻¹; Barrera-Moreno *et al.*, 2015). Sin embargo, los datos obtenidos en campo indican que esta especie presenta su óptimo en condiciones de salinidad alta (≥ 7 g L⁻¹), contrastando con la información anterior. Además, resulta interesante observar que esta especie logra mantenerse en el sistema en salinidades inferiores a 7 g L⁻¹, aunque con densidades poblacionales relativamente bajas (ver Fig. 15), situación que puede ser explicada debido a una eventual diferenciación de nicho trófico resultado de la diferencia de tamaño respecto a las dos especies de *M. cf. albuquerquensis*. De esta manera, al ser de menor tamaño (machos 1.1 mm \pm 0.05; hembras 1.2 mm \pm 0.06), *Leptodiptomus* “El Carmen” podría aprovechar los recursos de menor tamaño que dejan disponibles *M. cf. albuquerquensis* 1 y 2 (machos 1.4 mm \pm 0.09; hembras 1.6 mm \pm 0.17), que, al ser de mayor talla, tendrían preferencia por recursos relativamente más grandes. Se han reportado ejemplos de coexistencia de especies simpátricas en otros organismos zooplanctónicos como es el caso de rotíferos, en los que se ha observado tal divergencia de nicho trófico determinada por el tamaño de los competidores (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

Finalmente, es importante resaltar que, dada la aproximación metodológica de esta tesis, es muy difícil establecer con certeza cuál o cuáles son los mecanismos que explican la

coexistencia-exclusión de estas tres especies de copépodos calanoides con requerimientos ecofisiológicos similares. Sin embargo, es posible formular algunas hipótesis, sobre las cuales se podrían enfocar las siguientes investigaciones: 1) la caracterización morfológica de las dos especies gemelas afines al taxón *M. cf. albuquerqueensis*, utilizando morfología comparada en busca de rasgos finos asociados a estructuras sexuales (reproductivas), natatorias (hidrodinámicas) y apéndices bucales (rasgos tróficos), con la finalidad de encontrar diferencias morfológicas que ayuden a inferir ventajas o desventajas competitivas a lo largo del ciclo de vida de las dos especies gemelas. 2) Extender el trabajo de identificación molecular utilizando genes nucleares, por ejemplo, ITSs (*Internal Transcribed Spacer 1*), ya que a pesar de que la utilización de COI como una primera aproximación es altamente fiable para reconocer especies en los copépodos calanoides (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008), existen autores que remarcan la importancia de utilizar más de un gen para poder discernir completamente entre especies gemelas (Puilandre *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Papakostas *et al.*, 2016). 3) Realizar experimentos que puedan determinar diferencias en los rasgos de historia de vida importantes (p. ej., el tiempo de desarrollo, los patrones de supervivencia, las tasas reproductivas, producción de huevos de resistencia, etc.; Jiménez-Melero, 2005), así como determinar la posibilidad de entrecruzamiento entre estas dos especies. 4) Una vez teniendo una identificación morfológica y/o molecular confiable y rápida, realizar experimentos de análisis de respuestas numéricas y funcionales de estas especies con el fin de analizar sus características tróficas finas y sus capacidades competitivas (véase p.e., Ciro Pérez *et al.*, 2001; 2015). 5) Una última aproximación que se podría utilizar a

partir de la información generada en la presente investigación, es el análisis de expresión diferencial (Bron *et al.*, 2011) en genes específicos encargados del proceso de osmorregulación, con la finalidad de observar si dicha expresión diferencial de genes es la que permite la dominancia de una especie o de otra, y así lograr explicar, mediante datos ecofisiológicos y de expresión genética, un proceso de diversificación de dos especies dentro de un mismo espacio geográfico y temporal.

Conclusiones

- El análisis de las variables limnológicas y las densidades de los diferentes estadios de los copépodos calanoides observadas en condiciones naturales en el lago El Carmen (análisis multivariado) mostraron que la salinidad y la temperatura son las dos variables que mejor explican la dinámica y estructura del ensamblado a lo largo de un ciclo anual.
- De estas dos variables ambientales, solo la salinidad mostró una correlación estadísticamente significativa con todos los estadios de desarrollo de *Mastigodiatomus* 1 y 2, y con los adultos de *Leptodiatomus* “El Carmen”. Se observó que en salinidades bajas ($\leq 3 \text{ g L}^{-1}$) los individuos adultos de *Leptodiatomus* “El Carmen” y *Mastigodiatomus* spp. presentaron densidades poblacionales muy bajas; por debajo de 2 g L^{-1} estas especies no se presentaron de forma activa dentro del sistema.
- Los análisis moleculares revelan la existencia de dos especies afines al taxón *M. albuquerquensis* con una distancia genética entre ambas especies del 4.9% y del 19.7% con relación a otras especies del género *Mastigodiatomus*. Además, se confirma la presencia de la especie *Leptodiatomus* “El Carmen”, genéticamente diferente a *L. sicilis* s.s. en un 25.3% y filogenéticamente próximo a otra UTO distinta que habita en Canadá (lago Patricia) con una divergencia del 2.2%.

- Se observó un patrón de sustitución de las tres especies con óptimos diferenciales a lo largo del gradiente temporal determinado principalmente por la salinidad: *M. cf. albuquerquensis* 1 y *M. cf. albuquerquensis* 2 presentan óptimos en salinidades intermedias (entre 5 y 6.5 g L⁻¹), mientras que *Leptodiaptomus* “El Carmen” presenta su óptimo poblacional en salinidades altas (≥ 7 g L⁻¹). Para el caso de *M. cf. albuquerquensis* 1, se encontraron haplotipos exclusivos para salinidades bajas (2.2 g L⁻¹), así como para salinidades altas (> 7 g L⁻¹).
- El modelo hipotético propuesto al comienzo de esta investigación que más se asemeja a los resultados obtenidos, es aquel donde coexisten especies especialistas con óptimos diferenciales de eficacia, sin embargo, las tres especies se encuentran presentes a lo largo de todo el gradiente ambiental (Ver figura 1, modelo 3).
- Los copépodos del lago El Carmen representan un sistema de estudio importante para entender los patrones de estructuración poblacional asociados a la variabilidad ambiental, así como para entender la divergencia de nicho en especies ecológicamente muy similares.

Literatura citada

- Alcántara-Rodríguez JA, Ciroso- Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Serranía-Soto CR, 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.
- Alcántara-Rodríguez JA. 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. 77 p.
- Alcocer J, Lugo A, Escobar E, Sánchez MR y Villaclara G. 1997. The macrobenthic fauna of a former perennial and now episodically saline Mexican lake. *Int. J. Lake. Res.* 46: 224-229.
- Anufrieva EV y Shadrin NV. 2013. Factors determining the average body size of geographically separated *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885) populations. *Zool. Res.* 35 (2): 132–141.
- Ban S y Minonda T. 1994. Induction of diapause egg production in *Eurytemora affinis* by their own metabolites. *Hydrobiologia.* 292 (1): 195-189.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.

- Barrera-Moreno OA, Ciros-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Alcántara-Rodríguez JA, Piedra-Ibarra E. 2015. From local adaptation to ecological speciation in copepod populations from neighboring lakes. *PLoS ONE*. 10(4): e0125524.
- Barrera-Moreno OA. 2010. *Análisis de las poblaciones de los copépodos Leptodiptomus cf. sicilis (Copepoda: Calanoida) en los lagos de la Cuenca de Oriental, México*. Tesis de Maestría en Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México, D.F. 66 p.
- Barrera-Sánchez E. 2016. *Diversificación críptica en ambientes ecológicos contrastantes: Análisis de la posible especiación ecológica en poblaciones del copépodo Leptodiptomus cf sicilis*. Tesis de Licenciatura en Biología; UNAM, FES Iztacala. México, D.F. 44 pp.
- Battauz YS, José de Paggi SB, Paggi JC, Romano J, Barberis I. 2013. Zooplankton characterization of Pampean saline shallow lakes, habitat of the Andean flamingoes. *J. Limnol.* 72(3): 531-542.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KKK, Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22: 148–155.
- Bron JE, Frisch D, Goetze E, Johnson SC, Lee CE, Wyngaard GA. 2011. Observing copepods through a genomic lens. *Front. Zool.* 8 (22): 1-15.

- Brun P, Payne MR, Kiørboe T. 2016. Trait biogeography of marine copepods – an analysis across scales. *Ecol. Lett.* 19: 1403–1413.
- Ciros-Pérez J, Carmona MJ, Serra M. 2001. Resource competition between sympatric sibling rotifer species. *Limnol. Oceanogr.* 46(6): 1511–1523.
- Comín FA, Julia R, Comín P. 1991. Fluctuations, the key aspect for the ecological interpretation of saline lake ecosystems. *Oecol. Aquat.* 10: 127-135.
- Cracraft J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.* 1: 159–187
- Dodson SL, Cáceres LE, Rogers DC. 2010. Cladocera and other Branchiopoda. En Thorp JH y Covich AP (eds.) *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. 3ra ed. Elsevier. 829-899 pp.
- Dytham C. 2011. *Choosing and using statistics: A biologist's guide*. 3a ed. Wiley-Black Well. Oxford. 316 pp.
- Ebach MC y Holdrege C. 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*. 434: 697.
- Egan SP, Hood GR, Feder JL. 2016. Speciation with gene flow. *Encycl. Evol. Biol.* 4: 209-215.
- Eldredge N y Cracraft J. 1980. Phylogenetic patterns and the evolutionary process. *New York: Columbia University Press*.

- Elías-Gutiérrez M, Martínez-Jerónimo FM, Ivanova NV, Valdez-Moreno M, Hebert PDN. 2008. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*. 1839:1–42.
- Elías-Gutiérrez M, Suárez-Morales E, Romero-Márquez B. 1999. A new species of *Leptodiaptomus* (Copepoda, Diaptomidae) from Northwestern Mexico with comments on the distribution of the genus. *J. Plankton. Res.* 21(4): 603–614.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Figuroa-Maya A. 2015. *Eficacia diferencial entre la entrada en latencia vs la reproducción continua de Leptodiaptomus cf. sicilis (Copepoda: Calanoida) en ambientes hidrológicamente contrastantes*. Tesis de Licenciatura en Biología; UNAM, FES Iztacala. México, D.F. 46 pp.
- Fujisawa T y Barraclough TG. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent. *Syst. Biol.* 62(5): 707–724.
- Gabaldón C, Carmona MJ, Montero-Pau J, Serra M. 2015a. Long-term competitive dynamics of two cryptic rotifer species: Diapause and fluctuating conditions. *PLoS ONE*. 10(4): e0124406.

- Gabaldón C, Montero-Pau J, Carmona MJ, Serra M. 2015b. Life-history variation, environmental fluctuations and competition in ecologically similar species: Modeling the case of rotifers. *J. Plankton Res.* 37(5): 953–965.
- Gregory TR. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature.* 434: 1067.
- Gutiérrez-Aguirre MA y Cervantes-Martínez A. 2016. A new species of *Mastigodiatomus* Light, 1939 from Mexico, with notes of species diversity of the genus (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae). *Zool. Keys.* 637: 61–79.
- Gutiérrez-Aguirre MA, Cervantes-Martínez A, Elías-Gutiérrez M. 2014. An example of how barcodes can clarify cryptic species: The case of the Calanoid Copepod *Mastigodiatomus albuquerquensis* (Herrick). *PLoS ONE.* 9(1): e85019.
- Gyllström M y Hansson LA. 2004. Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquat. Sci.* 66: 274 –295.
- Hairston NG y Bohonak AJ. 1998. Copepod reproductive strategies: Life-history theory, phylogenetic pattern and invasion of inland Waters. *J. Mar. Syst.* 15: 23-34.
- Hairston NG. 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol. Oceanogr.* 41(5): 1087-1092.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 968–971.

- Hajibabaei M, Smith MA, Jansen DH, Rodríguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded, *Mol. Ecol.* 6(4): 959-964.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleo. Electron.* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313–321.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2(10): e312.
- Hoelzel AR y Green A. 1992. Analysis of population level variation by sequencing PCR-amplified DNA. En Hoelzel AR. (ed.) *Molecular genetic analysis of population: A practical approach*. Oxford Univ. Press. 159-187 pp.
- Kimura M. 1980. A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (7): 1870–1874.

- Lara A, Ponce de León JL, Rodríguez R, Casane D, Cote G, Bernatchez L, Machado GE. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: Evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Mol. Ecol. Res.* 10: 421–430.
- Last WM. 2002. Geolimnology of salt lakes. *Geosci. J.* 6 (4): 347-369.
- Lee CE. 2000. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate “populations”. *Evolution.* 54 (6): 2014-2027.
- Lewis WM. 1996. Tropical lakes: How latitude makes a difference. En Schiemer F y Boland KT (Eds.) *Perspectives in Tropical Limnology*, SPB Academic Publishing. 43-64 pp.
- Lewis WM. 2009. The ecological niche in aquatic ecosystems. En Likens GE (ed.). *Encyclopedia of Inland Waters*. Elsevier. 411-415 pp.
- Lewis WM. 2010. Biogeochemistry of tropical lakes. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 30 (10): 1595–1603.
- Librado P y Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25: 1451-1452.
- Marrone F, Lo Brutto S, Hudsdoerter AK, Arcuelo M. 2013. Overlooked cryptic endemism in copepods: Systematics and natural history of the calanoid subgenus *Occidodiaptomus* Borutzky 1991 (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 66: 190–202.

- Mayr E. 1963. *Animal species and evolution*. Cambridge, MA. Belknap Press.
- Mills S, Alcántara-Rodríguez JA, Ciros-Pérez J, Gómez A, Hagiwara A, Galindo K, Jersabek C, Malekzadeh-Viayeh R, Leasi F, Lee J, *et al.* 2016. Fifteen species in one: Deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*. 796 (1): 39–58.
- Montero-Pau J y Serra M. 2011. Life-Cycle Switching and coexistence of species with no niche differentiation. *PLoS ONE*. 6(5): e20314.
- Montero-Pau J, Ramos-Rodríguez E, Serra M, Gómez A. 2011. Long-term coexistence of rotifer cryptic species. *PLoS ONE*. 6(6): e21530.
- Montiel-Martínez A, Ciros-Pérez J, Ortega-Mayagoitia E, Elías-Gutiérrez M. 2008. Morphological, ecological, reproductive, and molecular evidence for *Leptodiptomus garciai*. (Osorio-Tafall, 1942) as a valid endemic species. *J. Plankton Res.* 30(10): 1079-093.
- Papakostas S, Michaloudi E, Proios K, *et al.* 2016. Integrative taxonomy recognizes evolutionary units despite widespread mito-nuclear discordance: Evidence from a rotifer cryptic species complex. *Systematic Biol.* 65(3):508-24.
- Paterson HEH. 1991. The recognition of cryptic species among economically important insects. En Zalucki MP (ed.) *Heliothis: Research methods and prospects*. Springer-Verlag. 1–10 pp.

- Polzin T y Daneschmand SV. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Oper. Res. Lett.* 31: 12-20.
- Prosser S, Martínez-Arce A, Elias-Guiterrez M. 2013. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Mol. Ecol.* 13: 1151–1155.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21: 1864–1877.
- Reid JW y Williamson CE. 2010. Copepoda. En Thorp JH y Covich AP (eds.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. 3ra ed. Elsevier. 829-899 pp.
- Roddie BD, Leakey RJG, Berry AJ. 1984. Salinity-temperature tolerance and osmoregulation in *Eurytemora affinis* (Pope) (Copepoda: Calanoida) in relation to its distribution in the zooplankton of the upper reaches of the Forth estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79 (2): 191-211.
- Saitou N y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH. 2010. Integrative taxonomy: A multisource approach to exploring biodiversity. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 421–38.

- Smith MA, Poyarkov NA Jr, Hebert PDN. 2008. COI DNA barcoding amphibians: Take the chance, meet the challenge. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 235–246.
- Suarez-Morales E, Reid JW, Elías-Gutierrez M. 2005. Diversity and distributional patterns of neotropical freshwater copepods (Calanoida: Diaptomidae). *Int. Rev. Hydrobiol.* 90(1): 71–83.
- Toscano BJ, Rombado BR, Rudolf VHW. 2016 Deadly competition and life-saving predation: The potential for alternative stable states in a stage-structured predator–prey system. *Proc. R. Soc. B.* 283: 20161546
- Twombly S, Wang G, Hobbs T. 2007. Composite forces shape population dynamics of copepod crustaceans. *Ecology.* 88(3): 658–670.
- Wheeler QD Y Platnick NI. 2000. The phylogenetic species concept (sensu Wheeler and Platnick). En Wheeler QD Meier R (eds.) *Species concepts and phylogenetic theory: A debate.* Columbia University Press. 55-69 pp.
- Williams WD. 1998. Salinity as a determinant of the structure of biological communities in salt lakes. *Hydrobiologia.* 381: 191–201.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29 (22): 2869-2876.