



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C

Posgrado en Ciencias del Agua

“DESCRIPCIÓN DEL COMPLEJO DE ESPECIES *LECANE BULLA*
(ROTIFERA: MONOGONONTA) EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS DE
QUINTANA ROO USANDO UN ENFOQUE TAXONÓMICO
INTEGRATIVO”

Tesis que presenta:

Jovana Lizeth Arroyo Castro

En opción al título de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AGUA

Directores:

Dr. Jesús Alvarado Flores

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Cancún, Quintana Roo, junio 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Jovana Lizeth Arroyo Castro

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS DEL AGUA



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Jovana Lizeth Arroyo Castro** titulado "**Descripción del complejo de especies *Lecane bulla* (Rotífera: Monogononta) en ecosistemas acuáticos de Quintana Roo usando un enfoque taxonómico integrativo**" fue realizado en la Unidad de Ciencias del Agua, en la línea de Ecología y Dinámica de Ecosistemas Acuáticos, en el Laboratorio de Ecotoxicología y Biología Molecular, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Jesús Alvarado Flores y la Dra. Cecilia Hernández Zepeda, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias del Agua de este Centro.

Atentamente.

Dra. Clelia De La Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 21 de junio de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Alvarado Flores y la Dra. Cecilia Hernández Zepeda por aceptarme como su alumna, por el tiempo, esfuerzo y apoyo, por darme todo lo que estuvo en sus manos para para la culminación de este trabajo.

A los laboratorios de Ecología y Biodiversidad de Organismos Acuáticos, de Biología Molecular y Ecotoxicología de la Unidad de Ciencias del Agua, pero en especial a la M en C Gabriela Rosiles González por su incondicional apoyo en laboratorio, por sus consejos y sugerencias que siempre amable y objetivamente me dio, por su amistad, gracias por todo.

Al Dr. Eduardo Cejudo, Dr. Gilberto Acosta González y al Dr. Roberto Rico Martínez por aceptar ser parte del comité de tesis, invirtiendo su valioso tiempo en este trabajo.

A los muchos maestros de esta honorable institución, el Centro de Investigación Científica de Yucatán que con ímpetu me brindaron una infinita gama de recursos para mi formación profesional.

A Nayla Muñoz Euan, Daniela Pérez Yañez, Miguel Hernández Pedraza, Leonela Chávez y Dilsa Morales por su apoyo incondicional como compañeros pero también como amigos durante todo este tiempo.

Al Dr. Diego Fontaneto, Dra. Elizabeth Walsh y Dra. Azar Kordbacheh que aun en la distancia siempre amablemente respondieron todas mis dudas, hicieron comentarios y aportaron con toda su experiencia a este trabajo.

A mis padres, mi familia, amigos y a Diego

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de esta investigación (número de becario 803745)

DEDICATORIA

A mis padres, Luis Arroyo y Alejandra Castro, les dedico este trabajo como la humilde muestra que tengo para agradecerles lo que durante toda mi vida he recibido de ustedes: amor, apoyo, tenacidad y temple. Gracias por dejarme abrir alas y permitirme volar lejos, por enseñarme que el límite es el cielo. Les dedico esto con todo mi corazón

A Diego, porque nada de este trabajo lo hubiera conseguido sin tu apoyo, por lo que haces por mi cada día, todos los días, por darme fuerzas cuando no puedo más, por hacerme sentir siempre que todo va estar bien, te dedico este trabajo que es tan tuyo como lo es mío. Te amo e infinitas gracias por todo.

A mi hermanito, Nathanael Arroyo porque siempre quiero ser para ti un ejemplo a seguir y porque siempre serás por quien yo diera la vida.

A las mujeres de mi vida: Rosario Castro, Gabriela Rosiles, Silvia Araujo (con Dhayra), Karla González (con Conztanza), Karen Jarquín (ahora con Amelia), Fernanda Campos, Alejandra Lara (con Agustina y Annia), Fabiola Villanueva (con Isis), Nayla Euan, Daniela Ortega y Daniela Pérez. Con ustedes he tejido durante todos estos años una red invisible de apoyo, de alegría y confianza que siempre me da energía cuando más fatigada estoy.

A Marcos Cen Pech, amor de mis amores, pedazo de mi alma, brisa que me protege, gracias por estar a mi lado durante todo este proceso, recuerda ¿Qué sería mi existencia sin tu presencia?

Al Dr. Jesús, por recibirme y por aprender juntos, por ayudarme, por apoyarme, a ti que eres un excelente profesor, pero un mejor ser humano y amigo.

A la Dra. Cecilia, por ser pieza clave en este proceso, por hacerme crecer y creer más en mí, por tu apoyo, por tus regaños, por tu tiempo, por tu amistad.

En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.

Lee Smolin - Físico teórico y cosmólogo.

“La tarea del ojo derecho es mirar dentro del telescopio, mientras que el ojo izquierdo mira dentro del microscopio” Leonora Carrington, Memorias de abajo

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. ANTECEDENTES.....	19
2.1. Generalidades de los rotíferos	19
2.2. Ciclo reproductivo de los rotíferos.....	20
2.3. Mecanismos de dispersión.....	21
2.4. Diversidad de rotíferos en los ecosistemas acuáticos.....	22
2.5. Retos de la identificación de rotíferos	23
2.6. Herramientas para la identificación de rotíferos.....	25
2.6.1. Herramientas morfológicas y morfométricas.....	26
2.6.3. Aislamiento reproductivo.....	28
2.6.4. Demografía de la tabla de vida.	29
2.7. ¿Qué se sabe sobre los complejos de especies en rotíferos?.....	30
2.8. Generalidades de <i>Lecane bulla</i>	31
2.9. <i>Lecane bulla</i> : especie de estudio en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVO GENERAL.....	35
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
7. METODOLOGÍA.....	36
7.1. Descripción del área de estudio.....	36
7.2. Cultivo de <i>Lecane bulla</i>	37
7.3. Análisis morfométrico de <i>Lecane bulla</i>	38
7.3.1. Morfometría tradicional.....	39
7.3.2. Morfometría geométrica	40
7.4. Análisis morfológico	41
7.5. Análisis molecular: obtención de secuencias.....	43
7.5.1. Limpieza de organismos	43
7.5.2. Extracción de ADN.....	43
7.5.3. Amplificación de ADN: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	44

7.5.4. Cuantificación de ADN	45
7.5.5. Secuenciación.....	46
7.6. Análisis filogenéticos.....	46
7.6.1. Edición de secuencias	46
7.6.2. Análisis de haplotipos	46
7.6.3. Cálculo de distancias genéticas por pares.....	47
7.7. Experimentos de entrecruzamiento sexual	47
7.8. Parámetros demográficos	48
8. RESULTADOS.....	50
8.1. Descripción de los ecosistemas acuáticos y parámetros físico-químicos	50
8.2. Caracterización morfométrica de las cepas de <i>Lecane bulla</i>	55
8.3. Determinación morfométrica de morfotipos de <i>Lecane bulla</i>	69
8.4. Descripción morfológica de los morfotipos de <i>Lecane bulla</i>	71
8.4.1. Diagnóstico diferencial	76
8.5. Reconstrucción filogenética e identificación de haplotipos de <i>Lecane bulla</i>	77
8.6. Determinación de aislamiento reproductivo en <i>Lecane bulla</i>	81
8.6.1. Observaciones adicionales	96
8.7. Descripción de las características demográficas de <i>Lecane bulla</i>	97
8.8. Descripción de especies	102
9. DISCUSIÓN.....	105
10. CONCLUSIONES.....	114
11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	114
12. LITERATURA CITADA.....	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Divergencia genética usando el marcador COI	28
Tabla 2. Lista de complejos de especies identificados en rotíferos aplicando diferentes herramientas.....	30
Tabla 3. Descripción de las localidades de muestreo.....	37
Tabla 4. Componentes de cada medio de cultivo.....	38
Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar el gen COI.	44
Tabla 6. Condiciones de la reacción de amplificación.	44
Tabla 7. Datos físicos y químicos de los sitios de muestreo.....	55
Tabla 8. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “El corchalito”.	57
Tabla 9. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “El Corchalito”	57
Tabla 10. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “El cenote de la cien”	58
Tabla 11. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Cenote de la cien”.. ..	58
Tabla 12. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Leona Vicario”.	59
Tabla 13. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Leona Vicario”.	60
Tabla 14. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Parque del Cenote”.	61
Tabla 15. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Parque del Cenote”.. ..	61
Tabla 16. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “El secreto”	62

Tabla 17. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “El secreto”	62
Tabla 18. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos de cada cepa obtenida a partir de organismos aislados de la muestra colectada en el sitio “Canal Cocodrilo”	63
Tabla 19. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Canal Cocodrilo”	64
Tabla 20. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Punta Nizuc”	65
Tabla 21. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Punta Nizuc”	65
Tabla 22. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Muyil”	66
Tabla 23. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Muyil”	66
Tabla 24. Medidas promedio con desviación estándar de hembras por cepa de organismos aislados de la muestra de “Punta Laguna”	67
Tabla 25. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Punta Laguna”. Dónde: HP= Huevo partenogenético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.	68
Tabla 26. Medidas promedio con desviación estándar de machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Chemuyil”	69
Tabla 27. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Chemuyil”	69
Tabla 28. Valores de la variabilidad genética para <i>L. bulla</i> de los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo..	79
Tabla 29. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “El corchalito” puestos con otras hembras	82

Tabla 30. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Cenote de la cien” puestos con otras hembras	83
Tabla 31. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Leona Vicario” puestos con otras hembras.....	84
Tabla 32. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Parque del cenote” puestos con otras hembras	86
Tabla 33. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “El secreto” puestos con otras hembras.....	87
Tabla 34. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Canal Cocodrilo” puestos con otras hembras.....	88
Tabla 35. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Punta Nizuc” puestos con otras hembra.....	90
Tabla 36. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Muyil” puestos con otras hembra	91
Tabla 37. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Punta Laguna” puestos con otras hembra.....	92
Tabla 38. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Chemuyil” puestos con otras hembra	94
Tabla 39. Parámetros demográficos para <i>L. bulla</i> en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo	98
Tabla 40 Porcentaje de huevos partenogénicos (♀) y macho (♂) eclosionados después de 24 h. Producción media de huevos de resistencia (quistes).....	100

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología general de un rotífero Monogononta	20
Figura 2. Ciclo reproductivo del rotífero monogonontos <i>Brachionus plicatilis</i>	21
Figura 3. Ecosistemas acuáticos localizados en la zona centro-norte del estado de Quintana Roo.	36
Figura 4. Mediciones realizadas a cada organismo de <i>L. bulla</i> para obtener los datos morfométricos tradicionales.....	39
Figura 5. Ubicación de landmarks para hembras (♀) y machos (♂) de <i>L. bulla</i>	41
Figura 6. Caracteres utilizados para la descripción morfológica de <i>L. bulla</i>	42
Figura 7. Localización de los ecosistemas acuáticos donde se colectaron los organismos de <i>L. bulla</i> de Quintana Roo.	50
Figura 8. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “El corchalito”..	56
Figura 9. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “El Cenote de la cien”	57
Figura 10. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Leona Vicario”	59
Figura 11. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Parque del Cenote”	60
Figura 12. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “El secreto”	61
Figura 13. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Canal Cocodrilo”	63
Figura 14. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Punta Nizuc”.....	64
Figura 15. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Muyil”.	66

Figura 16. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de <i>L. bulla</i> obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Punta Laguna”.....	67
Figura 17. Ejemplares de <i>L. bulla</i> de cepas obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Chemuyil”.....	68
Figura 18. Análisis de Escalamiento Multidimensional (MDS) y distribución de los morfotipos identificados para los diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo de <i>L. bulla</i>	71
Figura 19. Vista dorsal de especímenes de hembras de <i>L. bulla</i> de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.	72
Figura 20. Vista ventral de especímenes de hembras de <i>L. bulla</i> de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.	73
Figura 21. Membrana pleural de especímenes de hembras de <i>L. bulla</i> de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.....	74
Figura 22. Placa ventral del pie de especímenes de hembras de <i>L. bulla</i> de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.....	75
Figura 23. Dedos, uñas y accesorios de especímenes de hembras de <i>L. bulla</i> de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.....	76
Figura 24. Diferentes descripciones de hembras de <i>L. bulla</i> realizadas en otros estudios, las cuales fueron revisadas por Koste (2000).....	77
Figura 25. A) Reconstrucción de hipótesis filogenética usando el modelo. B) Mapa de la distribución de los haplotipos de <i>L. bulla</i> en Quintana Roo.	80
Figura 26. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “El corchalito”	81
Figura 27. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “El corchalito”.....	82
Figura 28. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “Leona Vicario”	84
Figura 29. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “Parque Cenote” ..	85

Figura 30. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “El secreto”	86
Figura 31. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “Canal cocodrilo”..	88
Figura 32. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “Punta Nizuc”	89
Figura 33. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “Muyil”	90
Figura 34. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “Punta Laguna” ...	92
Figura 35. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) “Chemuyil”	93
Figura 36. Representación del aislamiento reproductivo identificado en <i>L. bulla</i> que habita en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.	96
Figura 37. Multicopulas presentadas en <i>L. bulla</i>	97
Figura 38. Cuidado parental de la hembra de <i>L. bulla</i> de un huevo partenogenético....	97
Figura 39. Supervivencia (diamante) y valor reproductivo (cuadrado) de <i>L. bulla</i> en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.	99

RESUMEN

La presencia de complejos de especies crípticas (especies que no se pueden distinguir fácilmente solo por su morfología) es común en los rotíferos. Un claro ejemplo es el complejo de especies *Lecane bulla*, que se caracteriza por ser una de las especies más importantes del género *Lecane*, que exhibe variaciones morfológicas, plasticidad fenotípica y se encuentra en una variedad de ecosistemas acuáticos en todo el mundo. Lo anterior ha dificultado su descripción, convirtiéndolo en un reto taxonómico. El objetivo de este trabajo fue describir el complejo de especies *L. bulla* en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo usando un enfoque taxonómico integrativo. Se colectaron organismos en diferentes ecosistemas acuáticos (dolinas, pozas temporales, laguna costera y lago cárstico) de Quintana Roo y cultivaron en cepas en condiciones de laboratorio por un periodo de tres meses. Los resultados del análisis de morfometría geométrica y las comparaciones morfológicas indicaron que *L. bulla* posee dos morfotipos con diferente tamaño del cuerpo y forma del pie, dedo y uñas que se nombraron: morfotipo grande (G) y morfotipo pequeño (C). El porcentaje de divergencia osciló entre 3.1 a 9.6%, la diversidad haplotípica fue de 0.12 a 0.78 y la nucleotídica de 0.002 a 0.11, con la presencia de seis haplotipos. Los experimentos de entrecruzamientos determinaron que el aislamiento reproductivo en Quintana Roo se presenta en dos formas: (1) presencia de flujo genético en diferentes niveles, pues los machos fueron capaces de producir huevos de resistencia con hembras diferentes a la de su propia población, siempre que estas hembras fueran del mismo morfotipo; (2) ausencia de flujo genético, puesto que los machos no fueron capaces de producir huevos de resistencia con hembras diferentes a las de su propia población en ninguna ocasión. Hubo diferencias en las características demográficas; el morfotipo grande (G) presentó: esperanza de vida corta, crecimiento intrínseco positivo, tiempo generacional breve y un número bajo de descendientes que alcanzan la maduración sexual de forma acelerada, mientras que en el morfotipo pequeño (C) ocurrió lo contrario. Con toda esta información se proponen dos nuevas especies para este complejo: *Lecane ricomartinensis sp.nov* y *Lecane mayaensis sp.nov*.

ABSTRACT

The presence of complexes of cryptic species (species that are not distinguishable based only on morphology) is common in rotifers. One clear example is the species complex *Lecane bulla*, which is characterized as one of the most important species of the genus *Lecane*, it exhibits morphological variation, phenotypic plasticity and is found in a variety of aquatic ecosystems worldwide. The above mentioned has made it difficult to describe and it represents a taxonomic challenge. The objective of this study was to describe the complex of species *L. bulla* in the aquatic ecosystems of Quintana Roo using an integrative taxonomic approach. We collected organisms from ten aquatic ecosystems (dolines, temporary pools, coastal lagoon and karstic lake) of Quintana Roo and strains were cultivated under laboratory conditions for three months. The geometric morphometric analysis and the morphological comparisons indicated that *L. bulla* has two different morphotypes associated to body size and the foot shape, finger and nails. Morphotypes were therefore named: large morphotype (G) and small morphotype (C). Six different haplotypes were identified based on the percentage of genetic divergence, which ranged from 3.1 to 9.6%, the haplotypic diversity of 0.12 to 0.78 and the nucleotide diversity was 0.002 to 0.11. The cross-mating experiments determined that reproductive isolation in Quintana Roo occurs in two ways: (1) Presence of gene flow at different levels, as males were able to produce resistance eggs with females different from their own population, provided that these females were from the same morphotype (2) absence of gene flow, since the males were unable to produce resistance eggs with females different from their own population. There was variation in demographic characteristics. The large morphotype (G) presented: short life expectancy, intrinsic positive growth, short generational time, and a low number of descendants that reach sexual maturation in an accelerated manner, while in the small morphotype (C) the opposite occurred. With all this information, two new species are proposed for this complex *Lecane ricomartinensis sp.nov* and *Lecane mayaensis sp.nov*.

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad de las especies se refiere a la variedad de organismos vivos del planeta, la cual es clave para medir la biodiversidad (Butlin *et al.*, 2009). Las diferencias dentro de una especie o entre especies es producto de las estrategias de adaptación que han evolucionado y que se han acumulado a lo largo del tiempo (Challenger y Soberón, 2008). Por lo tanto, su delimitación debe considerar la variabilidad desde el nivel genético, pasando por los diferentes ecosistemas que habitan, así como los aspectos relacionados con la dinámica poblacional (Perales y Aguirre, 2008).

En la actualidad se han reportado entre 1.5 y 2 millones de especies alrededor del mundo (Chapman, 2009). En México se han descrito cerca de 108,519 especies, que representan el 10% de la diversidad del planeta en una sola nación (Sarukhán *et al.*, 2009). De ese número, el 70% se encuentra en la región tropical del país, conformada por los estados de: Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (SEDATU, 2017).

El estado de Quintana Roo es conocido por su alta diversidad tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, posee el 7.3% (7,938) de las especies descritas para México (Pozo *et al.*, 2011). Un gran número de esas descripciones corresponden al grupo biológico de los animales con 5,283 especies (Pozo *et al.*, 2011). Sin embargo hay grupos como los invertebrados de los cuales se conoce poco como el zooplancton. Esto se refleja en la falta de información taxonómica para grupos de importancia en los ecosistemas acuáticos como los rotíferos (CONABIO, 2018).

Los rotíferos son organismos microscópicos que habitan diferentes ecosistemas acuáticos (Segers, 1995). Su importancia reside en ser el soporte de los niveles tróficos superiores como los peces (Malekzadeh-Viayeh *et al.*, 2014), convierten a los productores primarios (algas y bacterias) en una forma aprovechable para los consumidores secundarios (larvas de insectos y peces), produciendo más del 30% del total de la biomasa del plancton de los ecosistemas acuáticos (Serranía-Soto, 1996).

Pese a su importancia, el estudio de los rotíferos dentro de los ecosistemas acuáticos en Quintana Roo (estimados en un número superior a las 6,717 formas) (Aguilar *et al.*, 2016) ha sido: escaso, fragmentado en tiempo y espacio e incluso inexistente (Suárez-Morales y Elías-Gutiérrez, 2003). Del 52% (2,049) de las especies invertebradas que habitan algún tipo de ecosistemas acuático en el estado, solo el 5% (118) corresponde a los rotíferos (Elías-Gutiérrez y García-Morales, 2011).

La falta de descripciones en los rotíferos se atribuye a que muchas especies de rotíferos han sido consideradas como cosmopolitas, incluido el monogononta *Lecane bulla* (Gosse 1851) (Segers, 1995). Esta especie se caracteriza por ser uno de los miembros más diversos del género *Lecane* (Segers, 1996); presenta variaciones morfológicas, alta plasticidad fenotípica y se encuentra en diferentes fuentes de agua en todo el mundo. Recientemente fue catalogada como un complejo de especies crípticas distribuido en diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo (García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013).

Por lo cual el objetivo general del presente trabajo fue describir la morfometría y morfología, el número de haplotipos, la presencia de aislamiento reproductivo y las características demográficas del complejo de especies *L. bulla* que habita en diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo desde el enfoque de la taxonomía integrativa.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los rotíferos

Los rotíferos son un grupo pequeño de invertebrados acuáticos microscópicos que llegan a medir de 50 hasta 2000 μm de longitud. Se encuentran entre los organismos planctónicos más abundantes y constituyen un vínculo crucial entre los niveles tróficos en los ecosistemas acuáticos en todo el mundo (Sarma *et al.*, 2017). Los rotíferos se han estudiado durante más de doscientos años y hasta la fecha se han descrito unas 2000 especies (Segers y De Smet, 2008); la mayoría de ellas (1600) se encuentran dentro del grupo Monogononta (Nogrady *et al.*, 1993). Anatómicamente los rotíferos poseen tres regiones funcionales (Serranía-Soto, 1996) (Figura 1):

1. **Cabeza:** Se localiza en la región anterior del cuerpo, en la cual se encuentra una estructura llamada corona, formada por una serie de cilios cuya función es la captura de alimento.
2. **Cuerpo:** También llamado tronco, puede tener forma alargada o de saco. En su interior se encuentra una faringe muscular llamada mástax. Dentro del mástax se encuentran unas mandíbulas llamadas trofi, que ayudan en el proceso de alimentación. El trofi es un rasgo taxonómico para la identificación no solo a nivel de familia, sino también a nivel de géneros y en algunos casos, de especies.
3. **Pie:** Su conformación es variable, más o menos móvil, frecuentemente con dedos. La función del pie y los dedos es ayudar a la fijación en el sustrato.

De acuerdo con Dumont (1983), los rotíferos son considerados de amplia distribución pues han mostrado tolerancia con respecto a factores como: temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad, entre otros. Aunque los miembros de este Phylum son fundamentalmente dulceacuícolas, ya que más del 90% de las especies conocidas son habitantes de estos ecosistemas (Cervantes-Martínez *et al.*, 2012), algunas especies se encuentran en aguas salobres o en ambientes marinos. En los rotíferos predominan las formas solitarias planctónicas, semiplanctónicas y bénticas; sin embargo, también existen formas coloniales, de vida libre o sésiles las cuales son menos abundantes (Sarma *et al.*,

2017). Las zonas litorales albergan una mayor riqueza de especies en comparación con las zonas pelágicas (Segers, 1995).

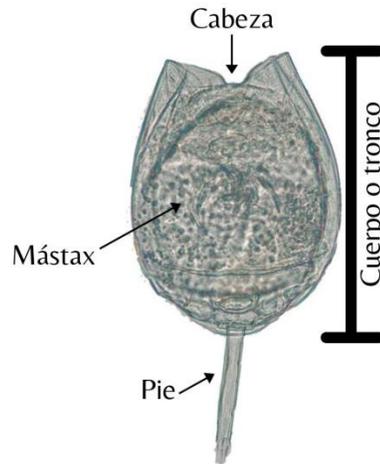


Figura 1. Morfología general de un rotífero Monogononta (Fotografía: Microscopio Imager A2, Axio ZEISS a 20x. *Lecane bulla* colectado en Cancún, Quintana Roo).

2.2 Ciclo reproductivo de los rotíferos

Los rotíferos monogonontos se reproducen por partenogénesis cíclica, la cual involucra una fase asexual denominada amíctica y otra sexual llamada míctica (Alvarado-Flores *et al.*, 2017). En la fase asexual solo participan las hembras, la reproducción es clonal, el genotipo es simplemente copiado por mitosis (no hay recombinación). Esta fase produce huevos diploides, con cascarones suaves y delgados (Cervantes-Martínez *et al.*, 2012). La fase sexual puede iniciar después de cambios en el ambiente como las épocas de sequía, incremento de temperatura, baja cantidad de alimento, baja concentración de oxígeno o de pH, una alta densidad de organismos, presencia de depredadores, entre otros factores (Walsh *et al.*, 2017). Durante la etapa sexual se producen hembras míticas, llamadas así porque producen huevos haploides por meiosis de los cuales eclosionaran machos que fecunden a las hembras iniciando así la reproducción sexual (Hanson *et al.*, 2013). La fertilización se realizará en la etapa temprana de la vida de la hembra, ya que en este periodo su tegumento es suave y el macho no tendrá problemas en fecundarla (Yin *et al.*, 2016). Los machos suelen ser más pequeños y carentes de aparato digestivo, el aparato reproductor suele ocupar gran parte del cuerpo con un pene bien desarrollado dependiendo de la especie (Nogrady *et al.*, 1993). Suelen estar listos

para copular una hora después de haber eclosionado, son muy activos y excelentes nadadores pues poseen una corona con una gran cantidad de cilios que les proporciona dicha movilidad (Smith, 2001) (Figura 2).

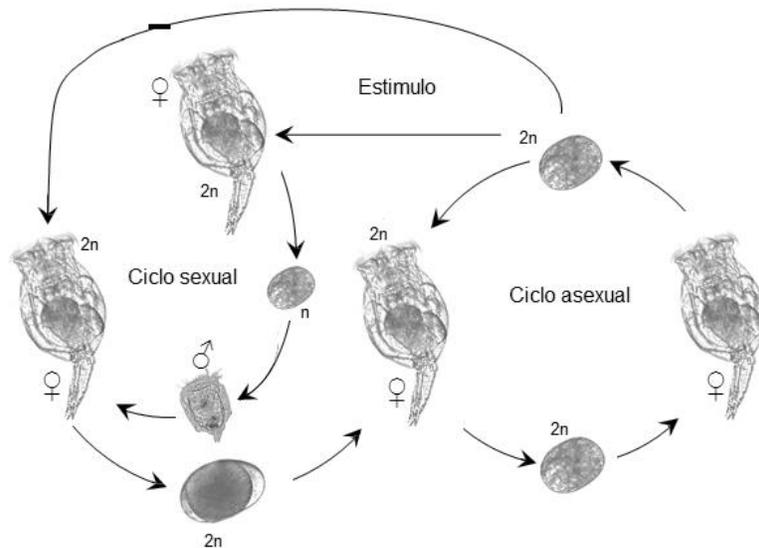


Figura 2. Ciclo reproductivo del rotífero monogonont *Brachionus plicatilis*. $2n$ son huevos diploides mientras que n son huevos haploides. Modificado de Mills, 2006.

2.3 Mecanismos de dispersión

La partenogénesis cíclica al combinar la fase asexual y sexual, garantiza la colonización y dispersión de los rotíferos en diferentes ecosistemas acuáticos. La reproducción asexual conduce al rápido crecimiento de la población, lo cual les permite responder rápidamente a casi cualquier señal en el ambiente (hacinamiento, depredación, competencia), asegurando su permanencia en el mismo (Alvarado-Flores *et al.*, 2017). La fase sexual permite el desarrollo de quistes o huevos de resistencia, con cascarones gruesos y ornamentados, resistentes a la desecación, al frío y transporte (Denekamp *et al.*, 2010). Dentro de estos se encuentran embriones que proporcionan genotipos recombinantes que se encuentran a disposición a través del tiempo y el espacio esperando condiciones ambientales favorables para eclosionar (Walsh *et al.*, 2017).

2.4 Diversidad de rotíferos en los ecosistemas acuáticos

Determinar la diversidad total de los taxones en los ecosistemas acuáticos dulceacuícolas es una tarea ardua y los recursos para la diversidad suelen ser limitados (Ruhí y Batzer, 2014). El estudio de ciertos grupos taxonómicos puede ayudar a predecir la variación en la diversidad de especies en otros grupos taxonómicos (Gastón, 1996). Esto permitiría que la conservación fuera potencialmente más eficiente pues aunque hay una creciente conciencia de la importancia de la conservación y manejo de los cuerpos de agua dulce (Bartout *et al.*, 2015), estos no siempre son considerados como reservorios de la diversidad de especies (Mellin *et al.* 2011).

En los ecosistemas acuáticos los estudios de grupos indicadores de la diversidad de especies, han incluido a los rotíferos (Cervantes-Martínez *et al.*, 2018). En términos generales son fáciles de monitorear y suelen mostrar relaciones sólidas y previsibles con otros grupos de invertebrados (Pearson, 1994). En México se cuenta con un inventario de 303 formas de rotíferos (Sarma *et al.*, 2009), pero se cree que este número puede ser superior, pues menos del 1% de los ecosistemas acuáticos del país ha sido analizado. La mayoría de los estudios en México se han realizado principalmente en ecosistemas acuáticos de gran extensión, de origen volcánico o en grandes presas como es el caso de El nevado de Toluca, Laguna de Alchichica o presa El Ocote en Aguascalientes, localizados en la parte centro y norte del país (Smirnov y Elías-Gutiérrez, 2011).

El estudio de la diversidad de especies que habitan los ecosistemas acuáticos en el sur del país, particularmente en Quintana Roo, son limitados a pesar a la enorme cantidad de ecosistemas permanentes y temporales que caracterizan al estado (Aguilar *et al.*, 2016). Si bien en Quintana Roo los ecosistemas acuáticos comparten un origen común, pues se encuentran en una plataforma calcárea rica en carbonatos que se originó en el Cenozoico, sus características particularidades y la diversidad de especies que en ellos habitan no pueden generalizarse (Lagomasino *et al.*, 2015). Se ha documentado que los ecosistemas acuáticos pueden varían en la concentración de nutrientes, clorofila, concentración de oxígeno disuelto, conductividad eléctrica, fisiografía e incluso su

hidroperiodo lo que es determinante para sostener diferente diversidad de especies (Cervantes-Martínez, 2005).

En Quintana Roo, uno de los primeros estudios para determinar la distribución y diversidad de rotíferos fue realizado en dos cenotes cercanos entre sí, ubicados en la parte central del estado. Se reportó la presencia de 15 familias de rotíferos y se concluyó que en los sistemas cársticos los rotíferos varían en sus patrones de sucesión, distribución, abundancia y tamaño dependiendo del tipo de ecosistema acuático en el que se desarrollan y que además presentan una variación en su diversidad estacional y temporal (Cervantes-Martínez, 2005).

En el estado la diversidad de rotíferos ha sido explorada en sistemas acuáticos localizados principalmente en la zona centro-sur; los resultados han demostrado la presencia de 118 especies de rotíferos, provenientes de muestras colectadas de la región litoral, limnética y pelágica (Elías-Gutiérrez y García-Morales, 2011). Las familias que albergan una mayor diversidad de especies de rotíferos en Quintana Roo son: la Brachionidae (13 especies), Colurellidae (13 especies) y Lecanidae (38 especies) (García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2004). Las especies más comunes son: *Keratella americana*, *Lecane arcula*, *L. bulla*, *L. cornuta*, *L. crepida*, *L. hastata*, *L. hornemanni*, *L. lunaris*, *L. obtusa* y *Dissotrocha aculeata* (Elías-Gutiérrez y García-Morales, 2011).

La región centro-norte del estado de Quintana Roo no sido explorada, los registros mencionados anteriormente (párrafo anterior) no reflejan la diversidad de rotíferos en esa área, por lo cual hay probabilidad de registrar nuevas especies habitando en los ecosistemas acuáticos de esa zona (García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013).

2.5 Retos de la identificación de rotíferos

La diversidad de los rotíferos que habitan los ecosistemas acuáticos se encuentra subestimada (Ortells *et al.*, 2000) ya que su plasticidad fenotípica que presentan representa un gran reto para su taxonomía. La plasticidad se refiere a la capacidad que tiene un organismo de cambiar sus estructuras morfológicas cuando se presentan

cambios en los factores bióticos como el tipo de alimento, densidad, depredación entre otros y/o abióticos como la temperatura, salinidad, pH, etc. y cuando las condiciones se reestablecen estos organismos vuelven a su estructura normal (Stelzer y Snell, 2003).

Debido a que los rotíferos son susceptibles a presentar plasticidad fenotípica, los análisis para estimar la diversidad basados únicamente en información morfológica pueden no diferenciar a las especies cuando la variación intraespecífica se superpone a la variación interespecífica (Fontaneto *et al.*, 2005). La taxonomía tradicional para clasificar a los rotíferos se basa en la descripción morfológica de sus formas físicas, por lo tanto plasticidad fenotípica hace que la identificación de las especies sea altamente problemática y por ende confusa.

Otro retro para la identificación de rotíferos es que varias especies de rotíferos consideradas cosmopolitas son de hecho, complejos de especies crípticas (Fontaneto, 2014). De acuerdo a la definición de Pfenninger y Schwenk (2007), las especies crípticas "son dos o más especies distintas que se clasificaron como una sola especie debido a su similitud morfológica". Para resolver este problema es importante determinar los haplotipos que pueden existir dentro de los morfotipos asignados en cada complejo, entendiéndose a estos como:

Haplotipo: Como la suma total del material hereditario que tiene un organismo y el cual puede ser heredado (Purcell *et al.*, 2007).

Morfotipo: Características morfológicas que puedan diferenciar a los individuos dentro de una población (dependiendo el autor, también se le puede denominar morfoespecie).

En otras palabras, una población presenta un solo haplotipo es decir posee material genético exclusivo de su especie, pero en una población los individuos pueden poseer diferentes morfotipos y seguir siendo la misma población. Por lo cual, la taxonomía que se basa únicamente en la morfología del organismo, puede en ocasiones no ser suficiente para determinar la presencia de especies crípticas (Zink, 1996).

Un reto adicional para determinar la taxonomía de los rotíferos es la formación de nuevas especies como producto del aislamiento reproductivo (Schröder y Walsh, 2010). Actualmente diferentes mecanismos geográficos, naturales y/o selectivos han hecho que muchos organismos incluidos los rotíferos se hayan dividido en dos o más subpoblaciones (Snook *et al.*, 2009). Lo anterior hace que el flujo genético entre poblaciones quede interrumpido y con el paso del tiempo se puedan acumular diferencias genéticas que impedirá o dificultará el cruzamiento entre organismos, que anteriormente se consideraban la misma especie llevándolas eventualmente al aislamiento (Pelletier *et al.*, 2009). Este proceso favorece la especiación por lo tanto, para determinar la taxonomía en poblaciones de rotíferos es importante determinar el comportamiento de reproductivo entre poblaciones de diferentes hábitats.

Además, las diferencias en las características demográficas de los rotíferos, las cuales están relacionadas a la diferenciación de nichos dentro de los ecosistemas acuáticos y pueden contribuir a la coexistencia y evolución de las especies (Montero-Pau *et al.*, 2014). Los experimentos de tablas de vida representan uno de los métodos más extendidos para estudiar la vida y la dinámica de una población de interés (Xiang *et al.*, 2016). Sus resultados derivan directamente de la vida de un organismo por ejemplo, la tasa de crecimiento instantáneo, tasa reproductiva neta, expectativa de vida y tiempo de generación (Cieplinski *et al.*, 2018). Por lo cual la investigación de diferencias en los parámetros demográficos de los rotíferos puede ayudar a evaluar los límites de las especies y sus preferencias ecológicas (Rissler y Apodaca, 2007)

2.6 Herramientas para la identificación de rotíferos

Con el fin de aportar evidencia complementaria que permita delimitar y describir mejor a las especies de rotíferos y esclarecer su taxonomía, cada vez es más recurrente la aplicación de diferentes herramientas de forma simultánea. Estas herramientas pueden ser métodos moleculares en combinación con aspectos morfológicos, además de análisis morfométricos, en conjunto con datos de entrecruzamientos. También se ha propuesto utilizar otras fuentes de información como los parámetros demográficos con un enfoque taxonómico integrador. Esto ha utilizado exitosamente por Mills *et al.*, (2017) en el

complejo de especies *Brachionus plicatilis*, por Michaloudi *et al.*, (2018) en el complejo de especies *B. calyciflorus* y recientemente por Kordbacheh *et al.*, (2019) en el complejo de especies *Euchlanis dilatata*.

2.6.1 Herramientas morfológicas y morfométricas

Para determinar la diversidad de rotíferos se utiliza la taxonomía basada en caracteres morfológicos, pero los caracteres taxonómicamente informativos pueden variar dependiendo la especie en estudio. Por ejemplo, para identificar especies del género *Brachionus* es recurrente el uso del tamaño de las espinas (Fu *et al.*, 1991), en cambio para identificar especies del género *Dicranophorus* la descripción del trofi es crucial (Jersabek, 1998), o en el caso del género *Lecane*, los caracteres morfológicos como la estructura de la lorica, la apertura de la cabeza o la placa ventral y dorsal son indispensables para determinar la taxonomía de las especies (Segers, 1994).

Los caracteres morfológicos se observan de forma tradicional al microscopio y a partir de las discontinuidades en la variación de éstos es posible distinguir entre especies (Leliaert, *et al.*, 2014). Sin embargo, con el desarrollo de herramientas como la morfometría, los organismos pueden ser sujetos a análisis cuantitativos. Por lo cual los estudios morfométricos se utilizan como una herramienta cuantitativa adicional para comparar diferentes formas de manera clásica y geométrica.

La morfometría clásica mide los cambios morfológicos que se producen en los organismos con base a sus dimensiones lineales. Los resultados que se obtienen de estas variables son datos numéricos que describen diferencias en el tamaño y no permiten la visualización de los cambios en forma (Zelditch, *et al.*, 2004). La morfometría geométrica por su parte ha demostrado ser muy efectiva para descomponer la variación que resulta de la fisiología de los individuos y de la escala en que fueron hechas las mediciones (variación del tamaño), por lo cual es una herramienta robusta que permite cuantificar la "forma pura" (Gunz *et al.*, 2005).

En este sentido, la morfometría geométrica ha sido aplicada exitosamente para analizar detalles minuciosos acerca de la forma y el tamaño en diferentes especies, con

mediciones que están basadas en puntos de referencia nombrados “*landmarks*” (Gamarra *et al.*, 2011). Estos puntos son definidos como coordenadas colocadas en un objeto en dos o tres dimensiones en un espacio de medidas (Watts *et al.*, 2015). Por ejemplo en *Brachionus calyciflorus*, *B. plicatilis* y *Bdelloidea* donde anteriormente la morfometría clásica no había sido útil para identificar especies dentro del complejo, la selección de estos puntos fue fundamental para la interpretación de la variación de la forma (Fontaneto *et al.*, 2004, 2005, 2007; Michaloudi *et al.*, 2018).

2.6.2 Marcadores moleculares: *Gen citocromo c oxidasa I (COI)*

Las tecnologías basadas en el estudio del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) son cada vez más usadas para acelerar la identificación de las especies y avanzar en el conocimiento sobre la diversidad (Hogg y Hebert, 2004). En el 2003 se propuso con éxito el uso de un fragmento del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la enzima citocromo C oxidasa (COI) como un marcador universal para el reconocimiento de las especies (Hebert *et al.*, 2003). Para la amplificación de este gen se han reportado diversos juegos de cebadores universales (Folmer *et al.*, 1994) que han sido exitosos para amplificar el gen y obtener secuencias de los rotíferos monogonontos y *Bdelloideos* (Birky, 2007). En la actualidad, las secuencias del gen COI aportan información complementaria para la taxonomía tradicional y permiten la identificación de las especies crípticas; además aportan información importante para identificar taxones que requieren de una investigación exhaustiva (Chen *et al.*, 2011).

El gen COI ha sido utilizado como marcador molecular en diversos trabajos enfocados al análisis de la diversidad críptica y los patrones de distribución de los rotíferos. En la Tabla 1 se presentan algunos trabajos realizados para analizar la divergencia genética usando el gen COI en rotíferos. El uso de estos marcadores moleculares han permitido un gran avance en el estudio de la diversidad genética en muchos grupos taxonómicos (Piñero *et al.*, 2008).

Tabla 1. Divergencia genética usando el marcador COI en diferentes rotíferos monogonontes.

Especie	Divergencia genética en el gen COI (%)	Referencia
<i>Brachionus plicatilis</i>	≤13.3 dentro de los clados ≥11.9 entre clados	Mills et al., 2017
<i>B. calyciflorus</i>	0.0 – 13	Gilber y Walsh, 2005; Li et al., 2010
<i>Epiphanes senta</i>	10.9 – 12.5	Schröder y Walsh (2007)
<i>Lecane bulla</i>	0.9 - 16	Walsh et al., 2009
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	≤4.4 dentro de los clados 5–24 entre los clados	Obertegger et al., 2014
<i>Testudinella clypeata</i>	0.16–4.5 dentro los clados 16.7–27.7 entre los clados	Leasi et al., 2013

Existen diversos parámetros para analizar la diversidad genética los que generalmente se usan para evaluar la variación genética en el ADN mitocondrial (mADN) son la diversidad haplotípica (H_d) y la diversidad nucleotídica (π). La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes; mientras que la diversidad nucleotídica es el número promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias escogidas al azar.

2.6.3 Aislamiento reproductivo

Los estudios genéticos son una herramienta fundamental para la delimitación de las especies, pero estos no determinan si las especies tienen la capacidad para el intercambio genético a través de la reproducción sexual (Bickford et al., 2007).

Entre las teorías para explicar cómo se desarrolla el aislamiento reproductivo entre las especies, se han sugerido mecanismos alopátricos (debido a barreras geográficas), simpátricos (poblaciones que viven en las misma área geográfica pero ocupan distinto hábitat) y parapátricos (poblaciones cuya área geográfica tiene distribución continua, pero el flujo genético es modesto) (Coyne y Orr, 1997). Se ha argumentado que las barreras reproductivas aparecen como subproductos de las adaptaciones a diferentes entornos geográficos y que las poblaciones que se adaptan acumulan diferencias genéticas y estas

eventualmente pueden conducir a la especiación (Snell y Hawkinson, 1983; Sobel *et al.*, 2010).

En este sentido, los experimentos de entrecruzamiento sexual tienen el potencial de determinar si la variación genética entre las especies crípticas en los rotíferos está acompañada por un aislamiento reproductivo (Gilbert y Walsh, 2005; Wiwegweaw *et al.*, 2009). En pocos estudios se han examinado el aislamiento reproductivo entre las especies crípticas de rotíferos.

Por ejemplo, Xiang *et al.*, (2011) llevaron a cabo experimentos de apareamiento cruzado entre especies crípticas de *B. calyciflorus* y consideraron la producción de huevos en reposo como el indicador del apareamiento exitoso. Otros autores han estudiado el aislamiento reproductivo entre especies crípticas antes y después del apareamiento como en el complejo de especies de *B. plicatilis* (Rico-Martínez y Snell, 1997; Suatoni *et al.*, 2006), *B. calyciflorus* (Gilbert y Walsh, 2005) y/o *E. senta* (Schröder y Walsh, 2007, 2010). Las pruebas de entrecruzamiento sexual pueden ayudar a determinar la presencia de aislamiento reproductivo y aumentar la confianza en la delimitación de los límites de las especies.

2.6.4 Demografía de la tabla de vida.

La demografía de la tabla de vida es importante para comprender la dinámica de la población del zooplancton (Xi *et al.*, 2013). Los estudios demográficos pueden proporcionar información valiosa sobre la idoneidad de las condiciones ambientales para el zooplancton (Ma *et al.*, 2010) como puede ser su mortalidad y fecundidad, supervivencia, promedio de vida útil, tiempo de generación y/o la tasa de crecimiento de la población (Saucedo-Ríos *et al.*, 2017).

Tal es el caso de *Keratella cochlearis* donde encontraron diferencias significativas entre sus tres haplotipos en sus características demográficas, comprobando que la diversidad genética puede reflejarse además en la demografía de la especie (Cieplinski *et al.*, 2018).

2.7 ¿Qué se sabe sobre los complejos de especies en rotíferos?

Los rotíferos poseen la capacidad de dispersión mediante sus huevos de resistencia, lo que ha hecho creer que estos tienen distribuciones cosmopolitas (Walsh *et al.*, 2017). Sin embargo, la aplicación de métodos moleculares, morfológicos, de comportamiento reproductivo y demográfico ha revelado que en realidad poseen un alto número de complejos de especies crípticas en el filo monogononta (Fontaneto, 2014) (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de complejos de especies identificados en los rotíferos aplicando diferentes herramientas: N= número de especies crípticas potenciales; Referencias= documentos sobre de cada complejo; Herramienta utilizada para su determinación: 1= Morfología y/o morfometría; 2= Moleculares; 3= Experimentos de entrecruzamiento reproductivo; 4= Aspectos demográficos

Complejo de especies	N	Referencia	1	2	3	4
<i>Ascomorpha ovalis</i>	2	García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013		×		
<i>Brachionus calyciflorus</i>	6	Michaloudi <i>et al.</i> , 2018	×	×		
<i>B. forficula</i>	2	Ge <i>et al.</i> , 2012		×		
<i>B. plicatilis</i>	15	Mills <i>et al.</i> , 2017	×	×	×	×
<i>B. urceolaris</i>	2	Curini-Galletti <i>et al.</i> , 2012		×		
<i>Ehipanes senta</i>	3	Schröder y Walsh, 2007	×	×	×	×
<i>Keratella cochlearis</i>	3	kordlinski <i>et al.</i> , 2017, 2018	×	×		×
<i>K. quadrata</i>	2	Ge <i>et al.</i> , 2012	×	×		×
<i>Mytilina ventralis</i>	5	García-Morales y Elías-Gutiérrez 2013		×		
<i>Platyias quadricornis</i>	2	García-Morales y Elías-Gutiérrez 2013		×		
<i>Synchaeta pectinata</i>	5	Obertegger <i>et al.</i> , 2012		×		
<i>S. tremula</i>	5	Obertegger <i>et al.</i> , 2012		×		
<i>Euchalis dilatata</i>	2	Korbackeh <i>et al.</i> , 2019	×	×	×	×
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	3	Obertegger <i>et al.</i> , 2014 Walsh <i>et al.</i> , 2009; García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013)	×	×		
<i>Lecane bulla</i>	10	García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013)		×		
<i>L. cornuta</i>	3	García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013)		×		
<i>L. crepida</i>	2	García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013)		×		
<i>L. lunaris</i>	2	García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013)		×		
<i>L. hastata</i>	2	García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013)		×		

Típicamente, se usa una divergencia genética del > 3% para delinear especies en base a datos de secuencia (Hebert *et al.*, 2003). Pero en estos estudios se ha mostrado altos niveles de divergencia entre las secuencias.

En la Tabla 2 se presentan estudios donde es notorio el uso en múltiples herramientas que permiten obtener resultados cada vez más confiables y robustos. Sin embargo, muchos trabajos han sido parciales o exclusivamente genéticos, por lo cual es deseable que estos complejos sean resueltos, sobre todo en aquellos cuyo número potencial de especies es altamente diverso (Fontaneto, 2014).

En este contexto, el género *Lecane* se caracteriza como uno de los géneros más diverso del filo monogononta (Segers, 2008). Se estima que este género presenta cinco potenciales complejos de especies que incluye a *L. bulla*. Se encuentra potencialmente distribuido alrededor del mundo, con varias especies por describir y cuyo aprovechamiento puede ser similar al ya ampliamente estudiado complejo *Brachionus plicatilis* (Fontaneto, 2014)

2.8 Generalidades de *Lecane bulla*

La especie *L. bulla* es una de las 209 especies descritas para el género *Lecane* que es considerado uno de los géneros más ricos en especies de Rotífera (Segers, 2008). Anteriormente *L. bulla* pertenecía a *Monostyla*, uno de los tres géneros propuestos derivado del grado de fusión de los dedos (Koste, 1978). Sin embargo este carácter fue considerado insuficiente para establecer diferentes géneros y por lo cual se decidió combinar a estos en un único género *Lecane* (Sharma, 1978).

En cuanto a su distribución *L. bulla* comparte con el género una amplia distribución, que predomina en ambientes tropicales o subtropicales (Segers, 2007). Se caracteriza por vivir principalmente en la parte litoral poco profunda de los ecosistemas acuáticos donde se alimentan de bacterias y detritus (Serranía-Soto, 2003). Acerca de sus características demográficas de acuerdo con Saucedo-Ríos *et al.*, (2017) son termoespecíficos (25°C), con un ciclo de vida promedio de siete días y una tasa de crecimiento intrínseco positiva.

En cuanto a los machos, los reportes son pocos debido principalmente a la rareza de su aparición, la cual es una consecuencia de sus mecanismos de reproducción (Segers, 1995). Dentro del género se han reportado 11 machos incluido el de *L. bulla* (Alvarado-

Flores *et al.*, 2017). Los machos tienen de manera general un cuerpo alargado, anillado con dedos completamente separados (Segers y Rico-Martínez, 2000). Se ha propuesto que debido a estas características morfológicas los machos pueden ser usados como clave en la sistemática en los rotíferos para poder delimitar especies (Sudzuki, 1999)

2.9 *Lecane bulla*: especie de estudio en los ecosistemas acuáticos Quintana Roo

De acuerdo con Kellogg y Shaffer (1993) el uso de determinados organismos es necesario para obtener conocimiento partiendo de lo general a lo particular. Por lo tanto, se han propuesto algunas especies como modelos que permiten obtener generalidades que pueden aplicarse para el resto de las especies que son similares, dado que no se cuenta con el tiempo ni con los recursos para estudiar a todas las especies.

Lo anterior permite entender los procesos de cómo funciona la especie, las partes que lo forman y el comportamiento que tiene, por lo tanto, estas especies modelo pueden ser elegidas si cumplen con los siguientes criterios:

1. Que sea accesible, es decir que exista disponibilidad y variabilidad.
2. Que sea de fácil manejo en laboratorio
3. Que los resultados que se obtengan sean fácilmente extrapolables a otros organismos

Con base a las consideraciones anteriores *L. bulla* es un excelente candidato de estudio, pues de acuerdo con diferentes evidencias se sabe que es una especie común y frecuentemente registrada en las muestras de plancton colectadas en los ecosistemas acuáticos de todo el mundo (Segers y Rico-Martínez, 2000). Se sabe que *L. bulla* no es una especie cosmopolita adaptada a vivir en amplias condiciones ambientales, si no que se trata de posibles especies especializadas a un ambiente determinado que presentan alta variabilidad interespecífica (Saucedo- Ríos *et al.*, 2017). Una ventaja del uso de *L. bulla* es que su mantenimiento en condiciones de cultivo en laboratorio requiere bajo costo y poco recurso para su crecimiento (García-Morales com. per).

En el estudio realizado por Walsh *et al.*, (2009) reportaron tres especies crípticas (que no fueron nombradas) dentro del complejo *L. bulla*, las cuales fueron encontradas en simpatria en sistemas acuáticos del desierto de Chihuahua con una divergencia genética entre el 12 al 15%. Por su parte García-Morales y Elías-Gutiérrez en 2013 al evaluar la eficiencia del ADN mitocondrial del gen COI como herramienta para determinar la divergencia entre especies, encontraron que *L. bulla* presentó 15 haplotipos distribuidos en: Campeche, Ciudad de México, Veracruz y Quintana Roo, dentro de ocho poblaciones divergentes. Finalmente, Moreno *et al.*, (2017) realizaron la estimación de la diversidad de especies de rotíferos probando la aplicación del código de barras de ADN en huevos de resistencia en la región Mediterránea: Encontraron 35 unidades taxonómicas operativas (OTU), revelando cuatro complejos especies crípticas, donde *L. bulla* presentó dos haplotipos diferentes, lo cual asevera el hecho que es un complejo de especies crípticas.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue describir la morfología y morfometría, el número de haplotipos, el aislamiento reproductivo y las características demográficas del complejo *L. bulla* en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. Para la cual se utilizó un enfoque integrado que incluyó caracteres moleculares así como características morfológicas. Para comprender el proceso de especiación del complejo *L. bulla* se investigó el aislamiento reproductivo y para entender su ciclo de vida se analizó sus características demográficas.

3. JUSTIFICACIÓN

La identificación de los complejos de especies es un paso clave para poder comprender mejor la diversidad dentro de los ecosistemas acuáticos (Bickford *et al.*, 2007). Muchos de estos complejos han sido determinados sin utilizar un enfoque taxonómico integrado (García-Morales y Elías-Gutiérrez, 2013). Lo cual ha hecho que el conocimiento sobre estos complejos de especies en muchos grupos taxonómicos como los rotíferos, se encuentre, fragmentado o incluso sea inexistente (CONABIO, 2018). El problema se agrava en Quintana Roo, pues la descripción de rotíferos solo corresponden al 5% (118) de los conocido en estado (Elías-Gutiérrez y García-Morales, 2011), reportado en unos cuantos ecosistemas acuáticos que si bien comparten un origen calcáreo común, sus características no pueden generalizarse (Cervantes-Martínez, 2005). Derivado de esta falta de información se han propuesto que algunas especies de rotíferos como *Lecane bulla* pueden ser usados como un modelo para obtener generalidades, las cuales podrían aplicarse a otras especies similares que habitan los ecosistemas acuáticos del estado, dado que no se cuenta con el tiempo ni con los recursos para estudiarlos a todos.

4. HIPÓTESIS

El complejo de especies *Lecane bulla* presentará diferentes morfotipos y haplotipos en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo, así como aislamiento reproductivo y diferencias en sus características demográficas.

5. OBJETIVO GENERAL

Describir el complejo de especies *Lecane bulla* (Rotifera: Monogononta) en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo usando un enfoque taxonómico integrativo.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la morfometría y morfología de cepas de las *Lecane bulla* provenientes de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.
2. Identificar los haplotipos, calcular su diversidad genética y realizar la reconstrucción filogenética de las cepas de *Lecane bulla* provenientes de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.
3. Establecer si existe aislamiento reproductivo entre las cepas de *Lecane bulla* provenientes de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.
4. Describir las características demográficas de las cepas *Lecane bulla* provenientes de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.

7. METODOLOGÍA

7.1 Área de estudio

Se colectaron muestras de zooplancton en diez ecosistemas acuáticos de la zona centro-norte de Quintana Roo usando una red de zooplancton tipo Wisconsin con una apertura de malla de 45 μm (Figura 3). Los ecosistemas acuáticos fueron clasificados comparando las características observadas en campo con la información disponible en bibliografía de diferentes autores (Tabla 3). De cada sitio se colectaron tres muestras de agua: una se preservó en formol al 5%, una en alcohol al 96% y una viva. Las muestras se etiquetaron correctamente y fueron trasladadas al laboratorio para su observación. En cada sitio se midieron los siguientes parámetros físico-químicos: pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y conductividad eléctrica (mS/cm) usando la sonda multiparamétrica YSI 600QS. Las coordenadas geográficas de cada ecosistema acuático se tomaron utilizando un GPS marca Garmin modelo 10.

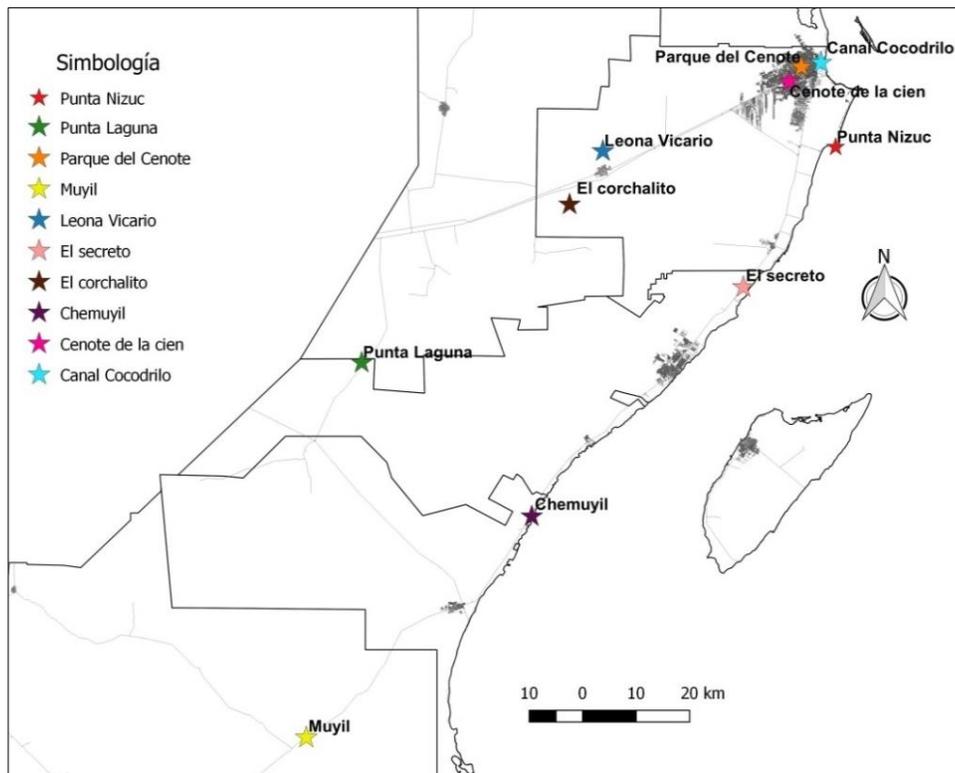


Figura 3. Sitios de muestreo localizados en la zona centro-sur del estado de Quintana Roo.

Tabla 3. Descripción de las localidades de muestreo.

Localidad	Municipio	Código y color	Tipo	Referencia
Canal Cocodrilo	Benito Juárez	CCD	Laguna Costera	Soria y Sahuquillo, 2009
Parque del Cenote	Benito Juárez	PC	Dolina	Schmitter-Soto <i>et al.</i> , 2002
Cenote de la cien	Benito Juárez	Ccien	Dolina	Herrera y Comín, 2000 Cervantes-Martínez <i>et al.</i> , 2009
Leona Vicario	Puerto Morelos	LV	Dolina	2009
El corchalito	Puerto Morelos	COR	Lago cárstico	De la Lanza y García, 1995
Punta Nizuc	Benito Juárez	PN	Laguna costera	Carrera y Fuente, 2004
El secreto	Solidaridad	SCR	Poza temporal	Arriaga <i>et al.</i> , 2000
Punta Laguna	Solidaridad	PL	Lago cárstico	De la Lanza, 1996
Chemuyil	Tulum	CHM	Poza temporal	Biggs <i>et al.</i> , 2017
Muyil	Felipe Carrillo Puerto	MYL	Poza temporal	Biggs <i>et al.</i> , 2017

7.2 Cultivo de *Lecane bulla*

En la Península de Yucatán los ecosistemas acuáticos presentan condiciones carbonatadas o con un incremento en los elementos mayores (Perry *et al.*, 2002), por ello previo a comenzar el crecimiento en cepas de los organismos colectados en campo de las muestras de agua, fue necesario elaborar medios de cultivo con características similares a las condiciones del agua de donde provenían.

Todos los medios se prepararon disolviendo los componentes que se presentan en la Tabla 4 en un litro de agua tipo I (ultrapura) con un pH de 7.3. El medio MD1 corresponde al medio tradicional sugerido por la EPA para agua dulce, el cual se usó para ecosistemas acuáticos de tipo dolinas. Los siguientes tres medios se modificaron basados en las características químicas que presentaron los ecosistemas acuáticos muestreados. De este modo el medio S (Tipo 2) cuyo contenido de sales es la mitad que lo sugerida por la EPA fue usado para pozas temporales, VD (Tipo 3) en lagunas costeras donde se incrementó al triple el contenido de sales y finalmente el D (Tipo 4) es el único en que sustituye el cloruro de potasio por carbonato de calcio y se utilizó en lagos de origen cárstico.

Una vez identificado el tipo de medio, se realizaron los cultivos de cepas a partir de la identificación de hembras de *L. bulla* en muestras de agua procedentes de campo. Cada hembra identificada se colocó de manera individual en pozas de cajas de cultivo de polietileno con 24 pozas estériles (marca Costar). A cada poza, se le agregó 500 µl medio de cultivo correspondiente (MD1, S2, VD3 o D4) y 50 µl de microalga *Nanochloropsis oculata* como alimento. Cada caja elaborada se mantuvo en la cámara bioclimática Thermo Scientific a una temperatura de 25°C ± 2°C, con un fotoperiodo de 12h de luz y 12h de oscuridad.

Cuando cada poza alcanzó un conteo a microscopio de densidades superiores a los 100 individuos, estos organismos se cambiaron a cajas Petri obteniendo una cepa de cada poza. Cada cepa producto de estas pozas de cultivo se etiquetó de acuerdo a su procedencia geográfica, con un número que pertenece a la poza donde creció y un color por ecosistema acuático. Por ejemplo: una de las cepas de Leona Vicario se le denominó como **C1LV**, donde C corresponde a la palabra cepa, LV al código del nombre del sitio Leona Vicario, 1 al número de pocillo donde creció y azul como color asignado. Los análisis y pruebas se realizaron después de transcurrir un periodo de tres meses en condiciones de laboratorio esto para asegurar que cualquier variación o diferencia pueda atribuirse únicamente a su haplotipo.

Tabla 4. Componentes de cada medio de cultivo.

	Fórmula	MD 1	S 2	VD 3	D4
1	NaHCO ₃	96 mg/l	48 mg/l	348 mg/l	192 mg/l
2	CaSO ₄ • 2H ₂ O	60 mg/l	30 mg/l	240 mg/l	135 mg/l
3	MgSO ₄ • 7H ₂ O	60 mg/l	30 mg/l	240 mg/l	60 mg/l
4	KCl	4 mg/l	2 mg/l	16 mg/l	0 mg/l
5	CaCO ₃	0 mg/l	0 mg/l	0 mg/l	100 mg/l

Compuesto: 1) Bicarbonato de sodio; 2) Sulfato de calcio dihidratado; 3) Sulfato de magnesio heptahidratado; 4) Cloruro de potasio y 5) Carbonato de calcio. La abreviación corresponde a la dureza del medio donde: MD=Moderadamente duro; S=suave; VD= Muy duro y D= Duro.

7.3 Análisis morfométrico

Dependiendo el tipo de análisis se determinó el número de hembras, machos, huevos partenogénéticos, huevos de macho y huevos de resistencia, pero en todos los casos

estos fueron seleccionados al azar de cada cepa. Las hembras se seleccionaron de la misma edad, excluyendo a las neonatas que tienden a ser más que pequeñas y para el caso de los huevos estos no debía presentar daños en el vitelo que los protege. Una vez seleccionados se colocaron en un portaobjetos, donde se les agregó 5 µl de solución de Bowin y 50 µl de formol para poder observar detalladamente y realizar las mediciones. Los machos fueron observados en vivo para poder obtener fotografías con el organismo completamente extendido. De cada organismo se tomaron fotografías con el microscopio Imager A2, Axio ZEISS usando la cámara AxioCam ICC1 con el software AxioVision SE64ReL 4.8 Inc 2003

7.3.1 Morfometría tradicional

Las mediciones de la morfometría tradicional fueron lineales. Esta información se utilizó para caracterizar la morfometría de las cepas de *L. bulla* de los diferentes ecosistemas acuáticos. Se seleccionaron 60 hembras y 20 machos de cada cepa al azar, en cuanto a los huevos partenogenéticos, resistencia y machos se seleccionaron únicamente 20 de cada uno por localidad. Sobre cada fotografía, usando la regla micrométrica del software AxioVision SE64ReL 4.8 Inc 2003 se midieron las siguientes secciones de cada organismo: A) largo, B) ancho y C) largo del pie (Figura 4).

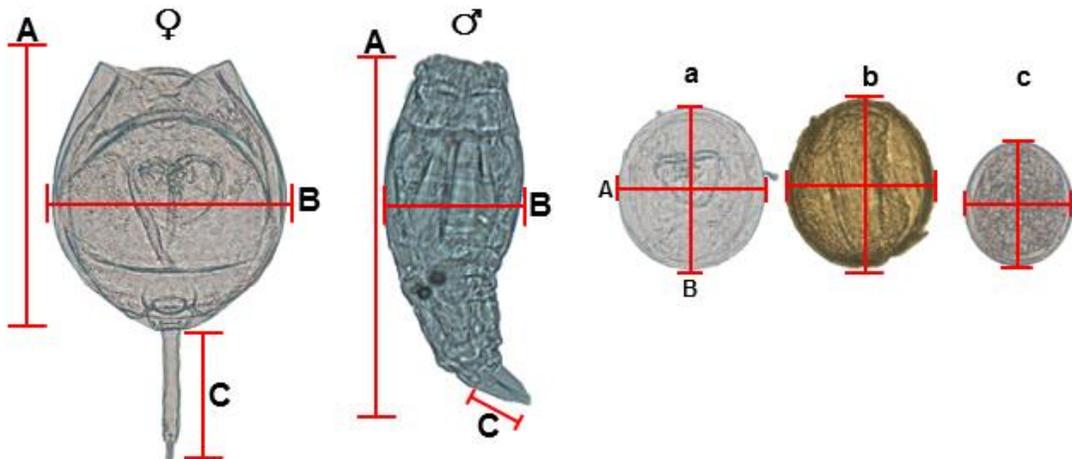


Figura 4. Mediciones realizadas a cada organismo de *L. bulla* para obtener los datos morfométricos tradicionales. ♀=hembras; ♂=machos; a=huevo partenogenético; b= huevo de resistencia; c= huevo de macho. Fotografía: Microscopio Imager A2, Axio ZEISS a 20x. Organismos colectados en Cancún, Quintana Roo.

7.3.2 Morfometría geométrica

La morfología geométrica se utilizó para determinar el número de morfotipos. Se seleccionaron fotografías de 20 hembras y 5 machos por cepa. No se analizaron los huevos partenogénéticos, de macho y resistencia, pues no se consideró que presentaran cambios debido a su bien definida forma elipsoides casi circular.

1. Cada fotografía se digitalizó usando el software TPSUtil 1.70x64 el cual convierte las fotografías de formato PNG o JPG a formato TPSfile.
2. Con el formato compatible se procedió a la selección de los *landmarks*. En el caso de *L. bulla* se definieron basados en las sugerencias taxonómicas de Segers (1995) y Koste (2000). Se seleccionaron 6 *landmarks*, usando únicamente la vista dorsal respetando la forma del cuerpo redondeado, la apertura de la cabeza y el final del cuerpo en puntos pares (Figura 5).
3. Una vez que fueron seleccionados los landmarks, se colocaron en cada fotografía usando el programa TPSDig2. Se cuidó que el orden de los puntos y la posición fuera la misma, de lo contrario se marcaba error.
4. Finalmente, los puntos seleccionados proporcionaron diferente información. En *L. bulla* se decidió trabajar con la medida centroide (medida central) de cada organismo. El programa TPSrelw32 lo calculó midiendo la distancia entre cada punto al centro de la forma, la cual es elevada al cuadrado, esas medidas se suman y se obtiene la raíz cuadrada y la cantidad resultante es el tamaño centroide. Esta variable de tamaño permite calcular el cambio isométrico de todos los puntos de referencia a partir del centro de la forma.

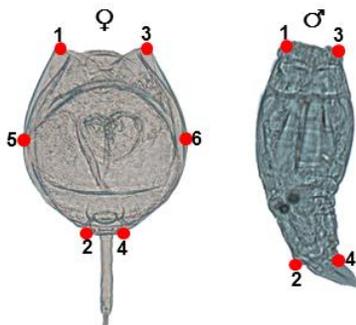


Figura 5. Ubicación de landmarks para hembras (♀) y machos (♂) de *L. bulla*. Fotografía: Microscopio Imager A2, Axio ZEISS a 20x. *Lecane bulla* colectado en Cancún, Quintana Roo.

Para determinar si las cepas presentaban diferencias significativas entre sus mediciones, se realizó un ANOVA de un solo sentido con un intervalo de confianza de 95% ($p < 0.05$) utilizando el paquete estadístico R 3.5.1.

Una vez determinada la existencia o no de diferencias entre las cepas, se realizó el análisis del grado de similitud de la variabilidad que presenta *L. bulla* en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. Para lo cual se usó a las cepas como variables y a los ecosistemas como factores en un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) aplicando el coeficiente de distancias de Bray-Curtis en el software estadístico PRIMERV6 que permite cuantificar las semejanzas e identificar a los taxones responsables de diferenciar grupos entre especies.

7.4 Análisis morfológico

Para el análisis morfológico fue necesario obtener fotografías usando la microscopía electrónica de barrido (MEB) en las cuales se presentan detalles que difícilmente se pueden observar con la microscopía de luz.

De las cepas establecidas en condiciones de laboratorio se seleccionaron 30 ejemplares de hembras por localidad. Los machos, huevos partenogénicos, huevos de resistencia y de machos no se analizaron debido a la fragilidad de su cuerpo el cual no resiste el procedimiento que se describe a continuación y que es indispensable para la obtención de fotografías.

El proceso de deshidratación consistió en colocar a los organismos por un periodo de 10 minutos en etanol al 70% y gradualmente llegar a una concentración de alcohol al 90%. Después se dejó en reposo por 48 horas y fueron introducidos en una cámara de punto crítico para su secado. Posteriormente fueron colocados en un cilindro de aluminio para ser cubiertos con una capa de oro de 2 nanómetros de espesor. Las fotografías fueron

obtenidas con el MEB JEOL 5900 LV en el Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Con las fotografías se realizó la descripción morfológica de los morfotipos identificados en cada ecosistema acuático, para lo cual se seleccionaron cinco características mencionadas por Segers (1995) y Koste (2000) para el género *Lecane* que corresponden a:

1. Vista y apertura de la cabeza dorsal.
2. Vista y apertura de la cabeza ventral.
3. Membrana pleural.
4. Detalle de la placa ventral del pie.
5. Pie que incluye: uñas, garras y accesorios.

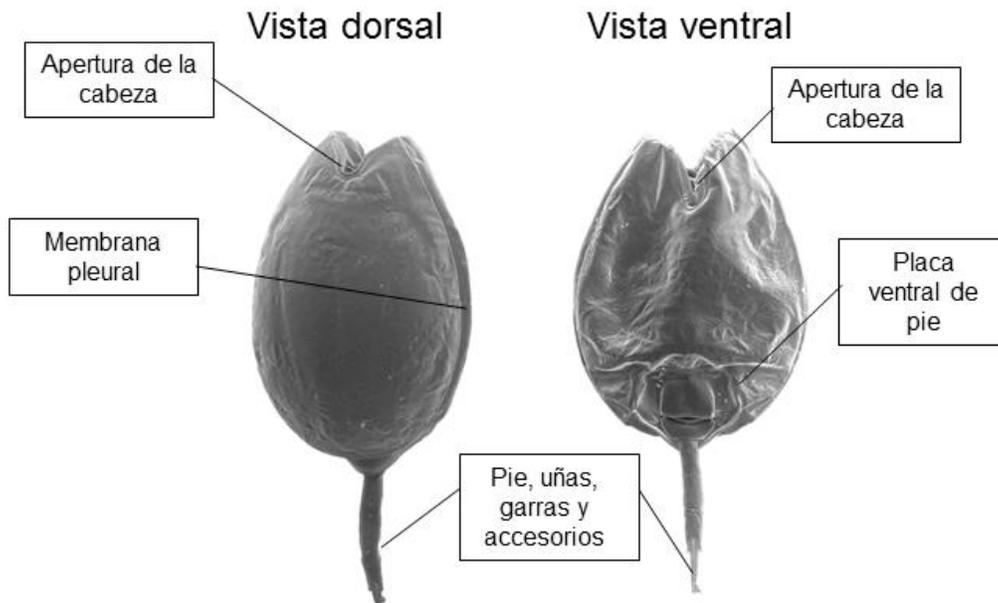


Figura 6. Caracteres utilizados para la descripción morfológica de *L. bulla*.

La información obtenida de la descripción de esas estructuras se comparó con las descripciones disponibles en claves taxonómicas, dicotómicas y pictóricas como las de Koste (1978); Segers (1995); Segers y Shiel (2003); Cervantes-Martínez *et al.*, (2012) y

en <http://rotifera.hausdennatur.at/Species/Index> (que es una plataforma en línea de base de datos de especies de rotíferos Catalog Rotifer World), para determinar la correcta morfología de los organismos y diagnóstico diferencial.

7.5 Análisis molecular: obtención de secuencias

7.5.1 Limpieza de organismos

Antes de su preservación los organismos pasaron 24 horas sin recibir alimento, esto con el fin de eliminar su contenido estomacal. En caso de haber presencia de residuos de alimento se realizó el lavado de los organismos, que consistió en agregar medio de cultivo en una placa de cristal con nueve pozos y cambiar a los organismos de pozo en pozo hasta eliminar los residuos. Los organismos se preservaron en tubos Eppendorf de 0.2 ml a 4°C con alcohol al 96% hasta su uso.

7.5.2 Extracción de ADN

El ADN en rotíferos se extrajo de todo el cuerpo del organismo de acuerdo con al protocolo HotShot modificado de Montero-Pau *et al.*, (2008).

1. Se eliminó el exceso de etanol de cada tubo.
2. Cada tubo se centrifugó para sedimentar los organismos y eliminar el etanol restante.
3. El etanol que no se eliminó manualmente, se retiró por evaporación. Se colocó cada tubo en un baño seco con la tapa abierta a 65°C (el tiempo varía de acuerdo a la cantidad de etanol en cada tubo).
4. Para la lisis del ADN se usó la resina Chelex®, el cual se agitó vigorosamente con ayuda de un agitador tipo vórtice con el fin de agitar las perlas.
5. Se agregaron 30 µl de resina Chelex® a cada tubo.
6. Se agregaron dos µl de proteinasa k a cada tubo.
7. Se colocó cada tubo en el agitador tipo vórtice por 15 segundos.
8. Cada tubo se centrifugó a 12,000 rpm (revoluciones por minuto), dando a esta velocidad únicamente un spin (pequeño giro).

9. Se incubó en el baño seco: 1) a 56°C por 10 minutos. Después se colocaron a 99°C por 10 minutos.
10. Cada tubo se colocó en el en un agitador tipo vórtice por 10 segundos y se centrifugó a 8000 rpm durante dos minutos.
11. Los tubos se incubaron a 4°C por un periodo de 30 minutos.
12. Finalmente se rescató el sobrenadante con una pipeta. Se evitó mover las perlas precipitadas al fondo. Cuando fue necesario, se utilizó el microscopio.

7.5.3 Amplificación de ADN: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Un segmento de 660 a 710 pb de COI se amplificó usando los cebadores de la Tabla 5 (Folmer *et al.*, 1994). Las amplificaciones de PCR se realizaron de acuerdo con el protocolo estándar Barcode of Life (Hajibabaei *et al.*, 2005). La mezcla PCR para la reacción de amplificación se realizó con las condiciones que se describen en la Tabla 6, en un volumen final de 25 µl

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los fragmentos del gen COI.

Nombre	Fragmento
LCO-1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G
HCO-2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA
Componente	Volumen
ADN	5.0 µl
Master Mix	12.5 µl
Primer Forward	1.00 µl
Primer Reverse	1.00 µl
Agua estéril	5.5 µl
Total	25 µl

Tabla 6. Condiciones de la reacción de amplificación.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

35 ciclos de dos minutos a 95°C, seguido de un minuto a 52°C y un minuto y medio a 72°C seguido de un paso final de siete minutos a 72°C. La secuencia completa tuvo un tiempo aproximado de dos horas con 25 minutos. Los productos de la amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y un marcador con

un tamaño de 1 kb. Los productos de la amplificación que obtuvieron el tamaño esperado, fueron eluidos del gel de agarosa para su purificación siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Se agregó un volumen igual de solución de membrana al volumen final de la amplificación obtenida en el PCR (20 μ l).
2. Se insertó una minicolumna en un tubo de recolección.
3. Se transfirió la mezcla de la membrana a la minicolumna.
4. Se incubó a temperatura ambiente por un minuto.
5. Seguidamente se centrifugó por un minuto a velocidad máxima (13,000 rpm).
6. Se descartó el sobrenadante.
7. Se agregaron 700 μ l de solución de lavado.
8. Se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto.
9. Se volvió a descartar el sobrenadante y reinsertó la columna.
10. Se agregaron 500 μ l de solución de lavado.
11. Se centrifugó a 13,000 rpm por cinco minutos.
12. Se transfirió la columna a un nuevo tubo.
13. Se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto.
14. Se transfirió a un tubo nuevo.
15. Se agregaron 30 μ l de agua destilada libre de nucleasas.
16. Se incubó a temperatura ambiente por un minuto.
17. Se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto.
18. Se desechó la columna. El sobrenadante es el ADN listo para cuantificar.

7.5.4 Cuantificación de ADN

La concentración del ADN eluido fue obtenido con el equipo NanoDrop 1000 siguiendo los pasos que se describen a continuación:

1. Se calibró el equipo con 4 μ l de agua destilada.
2. Se colocó 1 μ l de muestra.
3. Se realizó la medición, la cual se anotó el resultado de cada absorbancia.

4. Se seleccionaron las muestras que superaron los 50 ng/ μ l, debido a que en ADNmicondrial es la cantidad mínima para su secuenciación.

7.5.5 Secuenciación

La secuenciación fue realizada por el departamento de Ciencias Biológicas DNA Analysis Core Facility de la Universidad de Texas en El Paso (BBRC DNA Analysis Core y NIMHD Gran) y la empresa MacroGen Humanizing Genomics en Seul, Corea.

7.6 Análisis filogenéticos

7.6.1 Edición de secuencias

1. Cada archivo de las secuencias obtenidas se abrió uno por uno. Se usaron los programas Sequence Scanner2 y Finch TV para su visualización. Se eliminaron de ambos extremos los ruidos de la secuenciación (cebadores, vectores, oligonucleótidos no identificados).
2. Seguidamente se colocaron juntas todas las secuencias y se visualizaron en el programa en línea Mafft versión 7 para su correcta alineación. Para las secuencias origen mitocondrial COI se utilizó el algoritmo automático.
3. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa BLAST para asegurar mediante el porcentaje de cobertura que la información a trabajar correspondiera específicamente a un rotífero de la especie *L. bulla*.

7.6.2 Análisis de haplotipos

Para determinar la diversidad de haplotipos se utilizó el programa dnasp5.exe, utilizando los alineamientos previamente realizados. En la pestaña de datos se seleccionó el formato COI: DNA, haplotipo y mitocondrial. Después se generó un archivo con los datos y se asigna un nombre para identificarlo. El programa además permite calcular la diversidad haplotípica (H_d), el número de haplotipos (h) y la diversidad nucleotídica (π) (Librado y Rozas, 2009). La clasificación de los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica (bajo, moderado y alto) se realizó de acuerdo al trabajo de Xiang *et al.*, (2010).

7.6.3 Cálculo de distancias genéticas por pares

Las divergencias genéticas intraespecífica es decir la diferencia en entre las especies o individuos de la misma especie se evaluó con el programa MEGA 7. Para estas distancias, se realizó una reconstrucción aleatoria con 1000 repeticiones, para obtener una única matriz final.

7.7 Experimentos de entrecruzamiento sexual

El experimento consistió en colocar machos y hembras en pozas de cultivo, donde se les añadió un ml de medio dulce y 10 µl microalga *Nanochloropsis oculata* como alimento. Los organismos fueron seleccionados al azar de las cepas en condiciones de laboratorio provenientes de muestras de campo de diferentes localidades. Los entrecruzamientos fueron realizados siguiendo cuatro criterios:

1. En cada repetición se respetó una relación 1:2 es decir, por cada hembra que se colocó se colocaron dos machos.
2. Que las hembras fueran recién eclosionada, esto debido a que los machos prefieren hembras con la lorica más suave y sin quistes.
3. Disponibilidad de organismos. No todas las cepas de todos los ecosistemas acuáticos produjeron el mismo número de individuos. Por lo cual los experimentos buscaron un número similar entre cada combinación.
4. Que en sus cepas de origen los machos estuvieran copulando a las hembras y estas hayan presentado quistes (control).

Cuando los experimentos cumplieron los criterios mencionados, la lectura de resultados se realizó siguiendo los siguientes puntos:

1. Lectura de las pruebas a las 24 h de iniciadas (monitorear)
2. Observar la viabilidad del quiste (forma y textura).

El parámetro indicador de una cruce positiva es la producción de quistes puesto que en *L. bulla* solo se produce un quiste por hembra, este se conserva en el interior de la hembra, la cual muere cuando este alcanza su tamaño óptimo.

Con los resultados de estos experimentos se calculó la distancia de aislamiento que es una expresión para medir qué tan separadas se encuentra una cepa de otra, para lo cual se utiliza la fórmula propuesta por Snell y Hawkinson (1983):

$$ID = \sum_{i=1}^N \frac{[(HO - HTi1) + (HO - HTi2)]}{N}$$

- ID= distancia de aislamiento.
- H0= % de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa).
- HTi1= % de apareamientos heterogámicos (entre las cepas) con hembras de la cepa i.
- HTi2= % porcentaje de apareamientos heterogámicos con machos de la cepa i.
- N = número de cepas comparadas.

Cuando el resultado es mayor que cero, indicó la preferencia masculina a las hembras de su propia cepa. Cuando es cercano a cero o por debajo, indicó una preferencia a las hembras de otras cepas. Un valor de ID de cero representó ninguna preferencia.

7.8 Parámetros demográficos

Todos los experimentos se realizaron utilizando exactamente la misma configuración experimental, incluida la concentración de alimentos, temperatura y condiciones de luz. Cada experimento comprendió tres fases como lo sugiere Cieplinski *et al.*, (2018):

1. Estandarización: El objetivo principal fue minimizar la posibilidad que se presentaran hembras altamente sexuales (que formaran quistes). Fue realizada en una placa de cultivo de 24 pozas, una por localidad, se colocaron cinco individuos con un mL de medio con *N. oculata* como alimento (1×10^6 cel/ml) (en esta fase se realizó el crecimiento intrínseco).

2. Sincronización: De las hembras de la fase 1 se seleccionaron las recién eclosionadas. Estas fueron colocadas en 1 placa de 24 pozas de manera individual. Los criterios de selección fue la transparencia de su cuerpo, tamaño corporal y falta de huevos. El objetivo general de esta fase fue tener hembras de una edad aproximada que produjeran descendencia de edad similar.
3. Experimento de tabla de vida: se realizó en placas de 24 pocillos con hembras de la fase 2. Se seleccionaron hembras recién eclosionadas que tuvieran un periodo de vida similar, cada hembra se monitoreo de dos a tres veces al día (periodos de 8 horas aproximadamente) para poder determinar el tiempo aproximado de producción de nuevas hembras, tiempo de vida etc.

Se calcularon los parámetros demográficos, de acuerdo a Walz (1983):

$$\text{Supervivencia } (lx): \frac{nx}{\#inicial \text{ de organismos}}$$

$$\text{Valor de reproducción } (vx): (lx * mx)$$

$$\text{Tasa de reproducción neta } R_0: \sum (mx * lx)$$

$$\text{Tiempo generacional } (T): \frac{\ln(R_0)}{r}$$

$$\text{Tasa de crecimiento intrínseco } (r): \frac{\ln[N(t2) - N(t1)]}{(t2 - t1)}$$

Dónde: x = estructura de la edad; nx = número de hembras vivas en determinado día; lx = número de crías/huevos puestos en determinado día.

De manera adicional se determinó:

- Porcentaje de eclosión de huevos partenogénéticos
- Porcentaje de eclosión de huevos de macho
- Promedio de producción de huevos de resistencia

Todos los valores de los parámetros demográficos fueron analizados para determinar si existían diferencias significativas entre las localidades utilizando la prueba pos hoc de Duncan (95% nivel de confianza).

8. RESULTADOS

8.1 Descripción de los ecosistemas acuáticos y parámetros físico-químicos

A continuación se presenta una breve descripción de ecosistemas acuáticos donde se realizaron las colectas de organismos, los cuales corresponden a diez localidades que varían en su tipo clasificación, localización, vegetación, profundidad y composición de su sedimento (Figura 7). En cuanto a los parámetros físico-químicos, se presenta el promedio de los datos registrados al momento de la toma de muestra, seguida de su desviación estándar (Tabla 6).

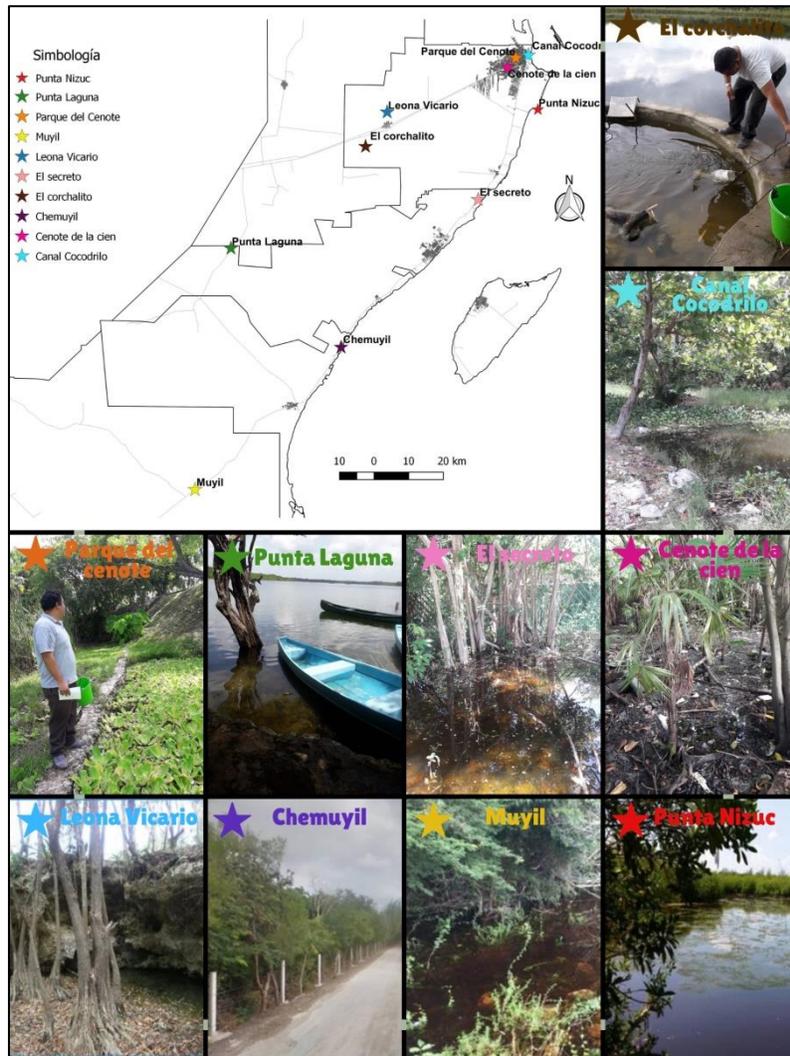


Figura 7. Localización de los ecosistemas acuáticos donde se colectaron los organismos de *L. bulla* de Quintana Roo.

a) Sitio: El Corchalito (COR)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra se colectó en un lago cárstico ubicado en las coordenadas 20° 55' 47" N, 87° 15' 47" W en el municipio de Puerto Morelos en la localidad de Leona Vicario (Figura 7). Se registró una profundidad máxima de 20 m (>50 cm en la zona litoral). Presentó un fondo rocoso con sedimento no consolidado y vegetación del tipo arbórea y herbácea. Se documentó que el ecosistema tiene un uso turístico recreativo y de cría y pesca de tilapia para consumo humano.

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: La temperatura registrada fue de 29.1 ± 0.6 °C, con una conductividad eléctrica de 0.3 ± 0.1 mS/cm y un pH de 7.2 ± 0.1 (Tabla 7).

b) Sitio: El Cenote de la cien (Ccien)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra provino de una dolina localizada en las coordenadas 21° 03' 11" N, 85° 52' 46" W en la zona urbana del municipio de Benito Juárez, en la ciudad de Cancún (Figura 7). Su profundidad máxima fue de 1.5 m pero en la zona litoral donde se colectó la muestra, la profundidad no superó los 50 cm. El fondo fue rocoso no consolidado. La vegetación es abundante del tipo arbóreo dominada por *Ficus spp*, palma chit (*Thrinax radiata*) y almendro (*Terminalia catappa*). Algunas observaciones registradas es que este sistema recibe agua mediante la escorrentía de la precipitación pluvial (Tabla 6).

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: Se registró una temperatura promedio de 27.2 ± 0.2 °C, con una conductividad eléctrica de 0.8 ± 0.2 mS/cm y un pH de 7.1 ± 0.3 .

c) Sitio: Leona Vicario (LV)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra procedió de una dolina localizada en las coordenadas 20° 58' 49" N, 87° 12' 12" W en el municipio de Puerto Morelos, en la localidad de Leona Vicario (Figura 7). La profundidad máxima fue de 1.5 m pero en la región litoral donde se colectó la muestra, la profundidad no superó los 50 cm. El fondo es no consolidado y con presencia de vegetación arbórea dominada por corcho (*Anona glabra*).

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: Los datos registrados al momento de la colecta fueron: temperatura 29.9 ± 0.1 °C, conductividad eléctrica de 0.8 ± 0.3 mS/cm y un pH de 8.2 ± 0.1 (Tabla 7).

d) Sitio: Parque del Cenote (PC)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra provino de una dolina localizada en las coordenadas $21^{\circ} 10' 31''$ N, $86^{\circ} 50' 54''$ W en la zona urbana del municipio de Benito Juárez, en la ciudad de Cancún (Figura 7). La profundidad no fue determinada pero se estima es superior a los 2 m. Presentó un fondo no consolidado con un alto contenido de materia orgánica en descomposición. La vegetación corresponde a áreas verdes municipales de herbáceas y arbóreas y se observaron pozas artificiales con agua.

PÁRAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: Se registró una temperatura fue 28.5 ± 0.3 °C, con una conductividad eléctrica de 0.8 ± 0.2 mS/cm y un pH de 6.8 ± 0.3 (Tabla 7).

e) Sitio: secreto (SCR)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra fue colectada de una poza temporal a la orilla de la carretera federal Cancún – Playa del Carmen en las coordenadas $20^{\circ} 46' 55.9''$ N, $86^{\circ} 57' 09''$ W en el municipio de Solidaridad (Figura 7). La poza es de carácter somero (no rebasó los 20 cm), con un fondo rocoso constituido por materia orgánica y con presencia de vegetación arbórea. Se encuentra delimitado por construcciones y se pudo observar que ecosistema probablemente pertenece a una zona inundable más amplia que se extiende al fondo. Se identificó durante la colecta que este ecosistema recibe agua principalmente de la escorrentía del agua de lluvia.

PÁRAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: La temperatura promedio registrada al momento del muestreo fue de 30.5 ± 0.7 °C, con una conductividad eléctrica de 1.1 ± 0.1 mS/cm y un pH de 6.1 ± 0.6 (Tabla 7).

f) Sitio: Canal Cocodrilo (CCD)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra fue colectada de una laguna costera ubicada en las coordenadas 21° 10' 55.1" N, 86° 48' 47.7" W en el municipio de Benito Juárez, en la ciudad de Cancún (Figura 7). Es un ecosistema acuático con una extensión de 450 m de largo, con una profundidad en su punto máximo de 2 m que pertenece al área natural Laguna Manatí (Llaguno *et al.*, 2014). El suelo es no consolidado conformado de materia orgánica y con una vegetación propia de manglar. Este ecosistema acuático se encuentra colindando con la colonia Vicente Lombardo Toledano, por lo cual la gente del área lo usa para pesca y recreación (Llaguno *et al.*, 2016).

PÁRAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: La temperatura promedio fue de 30.5 ± 0.3 °C, una conductividad de eléctrica de 3.1 ± 0.4 mS/cm y un pH de 6.5 ± 0.3 (Tabla 7).

g) Sitio: Punta Nizuc (PN)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra fue colectada en la laguna costera Nichupté localizada en las coordenadas 20° 56' 37" N, 86° 49' 03" W en el municipio de Benito Juárez, en la ciudad de Cancún, al límite del Parque Nacional Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc (Figura 7). Se encuentra al margen de un islote de la costa oriental, presenta una profundidad menor a los 50 cm y un fondo no consolidado. La vegetación en el área es mangle rojo (*Rhizophora mangle*) y mangle negro (*Avicennia germinans*) (Herrera-Silveira *et al.*, 2004).

PÁRAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: Los datos para la temperatura fueron 31.8 ± 0.3 °C, la conductividad eléctrica de 8.5 ± 0.1 mS/cm y un pH de 6.3 ± 0.2 (Tabla 7).

h) Sitio: Muyil (MYL)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra fue colectada de una poza temporal a la orilla de la carretera federal en las coordenadas 19° 57' 22" N, 87° 38' 22" W en el municipio de Felipe Carrillo Puerto en la localidad de Muyil (Figura 7). La poza es de carácter somero con una profundidad que no rebasó los 50 cm, presentó un fondo rocoso constituido por relleno de carretera y con presencia de vegetación ruderal. De acuerdo

con Cedeño-Vázquez y Pérez-Rivera (2010), es probable que esta poza forme parte de la zona inundable de la Laguna Esmeralda que se comunice en años de muy alta precipitación con zonas inundables cercanas.

PÁRAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: La temperatura registrada fue 31.5 ± 0.3 °C, con una conductividad eléctrica de 3.3 ± 0.1 mS/cm y un pH de 6.2 ± 0.3 (Tabla 7).

i) Sitio: Punta Laguna (PL)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra fue colectada de un lago cárstico localizado en las coordenadas $20^{\circ} 38' 40''$ N, $87^{\circ} 38' 05''$ W en el municipio de Solidaridad en la localidad de Punta Laguna (Figura 7). La profundidad en su punto máximo es de 23 m (en la parte litoral presentó aproximadamente 90 cm de profundidad). Está conformado de un suelo con capas alternas de carbonato y sedimento rico en elementos orgánicos (Hodell *et al.*, 2007). La vegetación predominante corresponde a selva mediana subperennifolia en diversos grados de sucesión (García-Frapolli *et al.*, 2009).

PÁRAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: Los datos promedio registrados para la temperatura fue 31.1 ± 0.1 °C, una conductividad eléctrica de 5.3 ± 0.1 mS/cm y un pH de 8.9 ± 0.1 (Tabla 7).

j) Sitio: Chemuyil (CHM)

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA: La muestra fue colectada de una zona inundable a la orilla del manglar en las coordenadas $20^{\circ} 21' 55''$ N y $87^{\circ} 19' 19''$ W localizado en el municipio de Tulum en la localidad de Chemuyil (Figura 7). Se trata de un cuerpo acuático que presenta una profundidad máxima de 50 cm con un fondo arenoso no consolidado con predominancia de mangle rojo (*Rhizophora mangle*). En campo se observó que este manglar se encuentra fragmentado y aislado debido a la construcción de carreteras y edificios habitacionales.

PÁRAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: La temperatura fue 27.1 ± 0.3 °C, con una conductividad eléctrica de 9.5 ± 0.1 mS/cm y un pH de 7.1 ± 0.2 (Tabla 7).

Tabla 7. Datos físicos y químicos de los sitios de muestreo.

Sitio	Tipo	°C	mS/cm	pH
1. El Corchalito (COR)	Lago cárstico	29.1 ± 0.6	0.3 ± 0.1	7.2 ± 0.1
2. El Cenote de la cien (Ccien)	Dolina	27.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2	7.1 ± 0.3
3. Leona Vicario (LV)	Dolina	29.9 ± 0.1	0.8 ± 0.3	8.2 ± 0.1
4. Parque del Cenote (PC)	Dolina	28.5 ± 0.3	0.8 ± 0.2	6.8 ± 0.3
5. El secreto (SCR)	Poza temporal	30.5 ± 0.7	1.1 ± 0.1	6.1 ± 0.6
6. Canal Cocodrilo (CCD)	Laguna costera	30.5 ± 0.3	3.1 ± 0.4	6.5 ± 0.3
7. Punta Nizuc (PN)	Laguna costera	31.8 ± 0.7	8.5 ± 0.1	6.3 ± 0.2
8. Muyil (MYL)	Poza temporal	31.5 ± 0.3	3.3 ± 0.1	6.2 ± 0.3
9. Punta Laguna (PL)	Lago cárstico	31.1 ± 0.1	5.3 ± 0.1	8.9 ± 0.1
10. Chemuyil (CHM)	Poza temporal	27.1 ± 0.3	9.5 ± 0.1	7.0 ± 0.2

Se presenta el promedio obtenido seguido de su desviación estándar. Dónde: °C=temperatura; mS/cm=Conductividad eléctrica.

Aunque son diferentes tipos de ecosistemas acuáticos, se estableció por sus características física y químicas, que presentan aguas cálidas propias de ambientes tropicales que van de los 27 a los 31 °C y con un pH que los clasifica con aguas ligeramente alcalinas 7 a 9. El único parámetro que mostró oscilaciones fue la conductividad eléctrica, se observó que los ecosistemas acuáticos Punta Nizuc, Punta Laguna, Chemuyil y Muyil presentaron la conductividad más alta (3.3 a 9.5 mS/cm) en comparación con Cenote de la cien, El corchalito, Leona Vicario, Parque del Cenote, El secreto y Canal Cocodrilo con una conductividad eléctrica de 0.3 a 3.1 ms/cm.

8.2 Caracterización morfométrica de las cepas de *Lecane bulla*

Se establecieron un total de 62 cepas en condiciones de laboratorio, que se iniciaron con individuos aislados procedentes de las muestras recolectas en cada ecosistema acuático. Se tomaron medidas a un total de 4,420 hembras, 254 machos, 200 huevos partenogénéticos, 200 huevos de resistencia y 200 huevos de machos. A continuación, se presenta una fotografía representativa de cada cepa donde el número corresponde a la poza de cultivo donde creció. En cada tabla se presenta el promedio y la desviación estándar en micras (µm) de cada medición realizada.

a) Sitio: El Corchalito (COR)

MATERIAL EXAMINADO: Se obtuvieron un total de 7 cepas. Se realizaron 490 mediciones para las hembras y 30 mediciones para los machos los cuales se presentaron solo en 3 de las 7 cepas. Los huevos partenogenéticos, de resistencia y de macho fueron tomados al azar de estas 7 cepas haciendo un total de 20 mediciones para cada tipo de huevo (Figura 8).

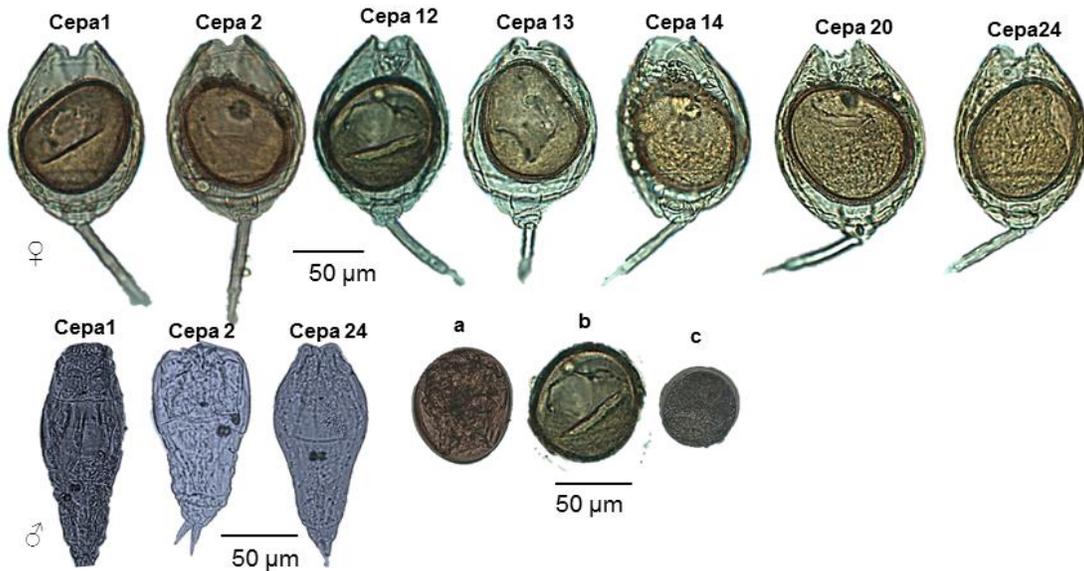


Figura 8. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “El corchalito”. Tipos de huevos: a= partenogenético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: El promedio las hembras y machos en cada cepa del “El corchalito” se registraron en la Tabla 8. En general los datos indicaron que el tamaño promedio de las hembras en este ecosistema es para el largo del cuerpo $131.4 \pm 4.2 \mu\text{m}$, para el ancho de $92.4 \pm 4.7 \mu\text{m}$ y el largo del pie $69.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$. En cuanto los machos, el tamaño promedio fue de $109.6 \pm 2.7 \mu\text{m}$ de largo, $60.0 \pm 2.7 \mu\text{m}$ de ancho y un el pie de $22.3 \pm 1.5 \mu\text{m}$ de largo. El promedio de cada tipo de huevo se reportó en la Tabla 9. El huevo de resistencia fue más grande que el huevo partenogenético tanto en el largo como en el ancho y que el huevo de macho es morfométricamente más pequeño que los dos anteriores.

Tabla 8. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “El corchalito”.

	Hembras (µm)			Machos (µm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 1	128.8 ± 3.1	90.9 ± 5.6	68.5 ± 1.1	111.5 ± 1.1	59.5 ± 1.2	24.1 ± 0.3
Cepa 2	133.2 ± 3.6	92.9 ± 5.1	66.5 ± 1.4	110.5 ± 2.3	60.3 ± 2.1	22.9 ± 0.5
Cepa 12	130.9 ± 4.8	91.2 ± 5.2	72.9 ± 3.1	108.5 ± 1.9	61.5 ± 1.9	20.3 ± 0.9
Cepa 13	132.5 ± 3.9	93.6 ± 3.4	69.3 ± 3.7	-	-	-
Cepa 14	132.4 ± 4.6	89.7 ± 5.5	68.2 ± 0.8	-	-	-
Cepa 20	130.6 ± 4.5	95.3 ± 2.4	69.1 ± 3.8	-	-	-
Cepa 24	131.7 ± 4.5	92.3 ± 4.3	69.5 ± 5.5	-	-	-

Tabla 9. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “El Corchalito”. Dónde: HP= Huevo partenogenético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (µm)	HR (µm)	HM (µm)
Ancho	78.2 ± 2.9	80.5 ± 3.1	55.3 ± 3.1
Largo	67.8 ± 7.3	76.9 ± 2.4	53.2 ± 2.4

b) Sitio: El cenote de la cien (Ccien)

MATERIAL EXAMINADO: Se establecieron 6 cepas. Se midieron un total de 420 hembras. Los machos se presentaron en 2 de las 6 cepas y se realizaron 24 mediciones. De cada cepa se tomó al azar 20 huevos partenogenéticos, de resistencia y de macho para obtener el promedio de cada uno dentro en el sitio (Figura 9).

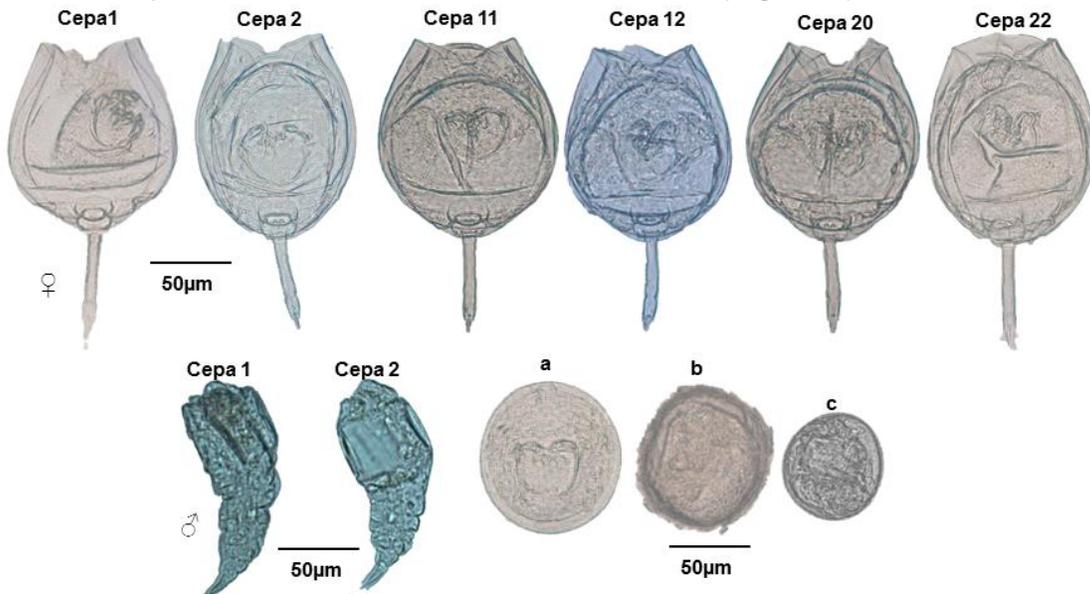


Figura 9. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “El Cenote de la cien”. Tipos de huevos: a= partenogenético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: Los datos para las hembras y machos se registraron en la Tabla 10. La información indicó que el tamaño promedio que presentan las de las hembras en este ecosistema acuático es para el largo del cuerpo $126.1 \pm 2.4 \mu\text{m}$, para el ancho de $84.4 \pm 4.5 \mu\text{m}$ y el pie de $70.1 \pm 3.6 \mu\text{m}$ de largo. Los machos por su parte, mostraron un largo promedio de $104.1 \pm 3.2 \mu\text{m}$, un ancho de $58.1 \pm 1.6 \mu\text{m}$ y un pie de $17.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ de largo. Morfométricamente los huevos de resistencia son más grandes tanto en el largo como en el ancho que el huevo partenogenético. El huevo de macho fue el más pequeño de los tres tipos (Tabla 11).

Tabla 10. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “El cenote de la cien”.

	Hembras (μm)			Machos (μm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 1	126.1 ± 2.2	83.7 ± 4.6	68.4 ± 5.8	104.6 ± 1.4	55.2 ± 0.7	16.2 ± 1.9
Cepa 2	125.3 ± 2.3	82.7 ± 5.5	67.7 ± 8.0	105.4 ± 0.6	57.6 ± 1.0	18.5 ± 2.2
Cepa 11	126.1 ± 2.7	83.0 ± 4.7	65.4 ± 8.3	-	-	-
Cepa 12	127.5 ± 2.2	87.8 ± 3.6	68.5 ± 1.7	-	-	-
Cepa 20	126.2 ± 2.6	85.3 ± 3.1	67.3 ± 9.1	-	-	-
Cepa 22	125.5 ± 2.5	84.6 ± 4.2	74.0 ± 10.2	-	-	-

Tabla 11. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Cenote de la cien”. Dónde: HP= Huevo partenogenético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (μm)	HR (μm)	HM (μm)
Ancho	74.4 ± 1.1	80.3 ± 3.2	53.3 ± 2.1
Largo	65.8 ± 1.4	75.1 ± 3.2	50.8 ± 2.2

c) Sitio: Leona Vicario (LV)

MATERIAL EXAMINADO: Con las muestras colectadas se inició el cultivo de cepas, donde se obtuvieron un total de 10 para este ecosistema acuático. Se realizaron 850 mediciones en hembras. Los machos se presentaron en 4 de las 10 cepas, por lo cual el número total de datos obtenido fue de 60 machos. Para conocer las medidas que presentaban los huevos partenogenéticos, de resistencia y de machos, de estas 10 cepas fueron tomados al azar 20 organismos para cada uno de los casos (Figura 10).

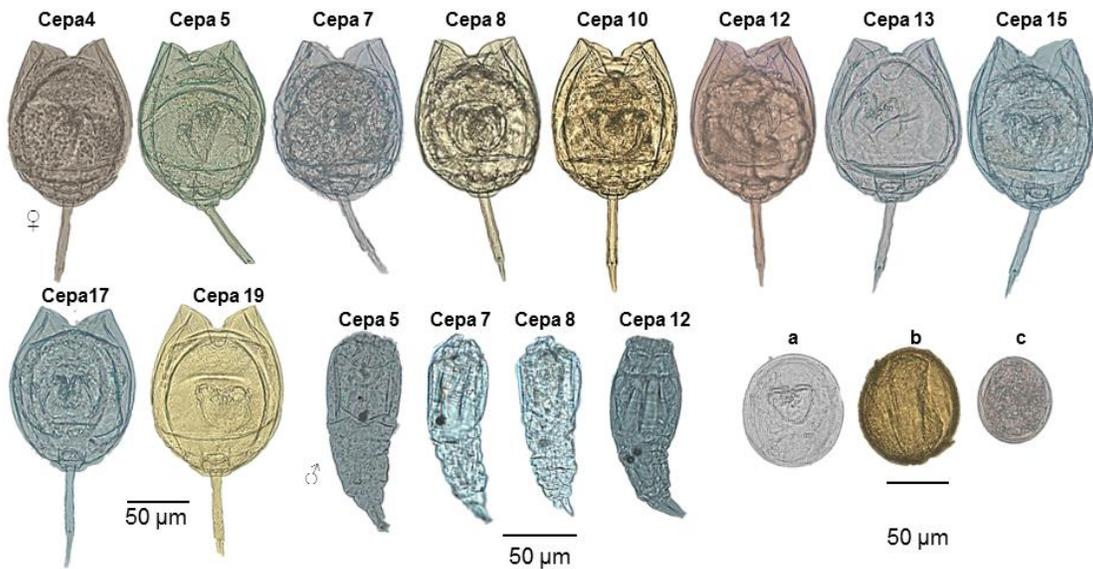


Figura 10. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Leona Vicario”. Tipos de huevos: a= partenogenético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: Los datos para las hembras y machos se registraron en la Tabla 12. La información indicó que el tamaño promedio que las hembras pueden presentar en este ecosistema acuático para el largo del cuerpo fue de $125.7 \pm 6.9 \mu\text{m}$, con un ancho de $84.8 \pm 7.5 \mu\text{m}$ y un pie de $65.9 \pm 4.0 \mu\text{m}$. Para los machos largo fue de $106.1 \pm 2.8 \mu\text{m}$, con 57.2 ± 2.6 de ancho y el pie fue de $19.3 \pm 2.4 \mu\text{m}$. Se reportó diferencias en el tamaño de los huevos partenogenéticos, resistencia y macho, siendo los huevos de resistencia los morfométricamente más grandes (Tabla 15).

Tabla 12. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Leona Vicario”.

	Hembras (μm)			Machos (μm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 4	128.3 ± 4.4	85.8 ± 5.4	63.9 ± 8.2	-	-	-
Cepa 5	127.8 ± 2.3	83.4 ± 3.6	69.6 ± 4.2	108.1 ± 5.0	56.0 ± 4.9	18.0 ± 1.9
Cepa 7	125.9 ± 4.9	83.7 ± 9.6	77.6 ± 4.2	103.3 ± 7.1	40.3 ± 3.9	18.9 ± 1.2
Cepa 8	125.3 ± 6.0	81.5 ± 4.2	64.5 ± 9.5	101.3 ± 5.7	41.6 ± 7.8	19.2 ± 0.8
Cepa 10	122.6 ± 9.8	87.3 ± 4.9	67.8 ± 6.9	-	-	-
Cepa 12	124.3 ± 5.9	86.7 ± 6.1	62.6 ± 3.8	108.3 ± 9.2	46.7 ± 7.8	19.6 ± 1.2
Cepa 13	124.1 ± 6.7	85.4 ± 7.3	66.8 ± 9.1	-	-	-
Cepa 15	122.7 ± 8.3	83.1 ± 9.2	68.5 ± 4.1	-	-	-
Cepa 17	127.6 ± 8.5	84.5 ± 9.0	69.1 ± 5.3	-	-	-
Cepa 19	126.4 ± 5.8	82.2 ± 7.4	63.7 ± 8.9	-	-	-

Tabla 13. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Leona Vicario”. Dónde: HP= Huevo partenogenético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (μm)	HR (μm)	HM (μm)
Ancho	70.1 ± 1.1	78.2 ± 3.0	53.2 ± 2.0
Largo	64.6 ± 3.1	64.1 ± 3.4	48.7 ± 2.6

d) Sitio: Parque del Cenote (PC)

MATERIAL EXAMINADO: Se obtuvieron un total de 9 cepas. Las hembras medidas fueron 520. Los machos se presentaron en 3 de las 9 cepas, de los cuales se midieron 30 en total. Los huevos partenogenéticos, de resistencia y de macho fueron tomados al azar de estas 9 cepas, haciendo un total de 20 mediciones para cada tipo de huevo (Figura 11).

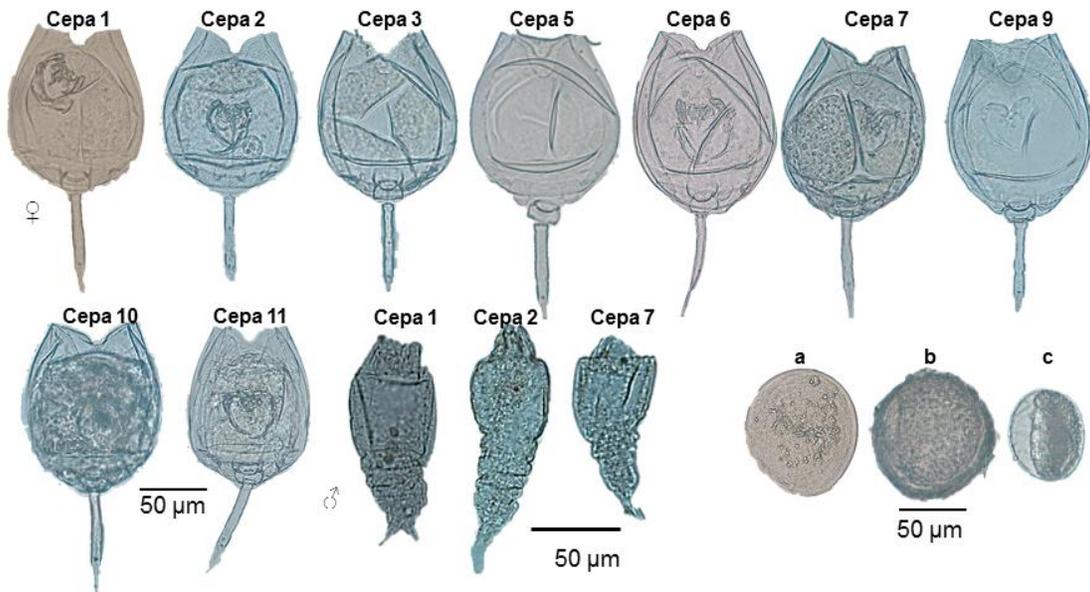


Figura 11. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Parque del Cenote”. Tipos de huevos: a= partenogenético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: En la Tabla 14 se registraron los promedios obtenidos de las hembras y machos de las cepas de “Parque del Cenote”. El tamaño promedio que presentaron las hembras en este ecosistema acuático fue para el largo del cuerpo $125.7 \pm 5.5 \mu\text{m}$, con un ancho de $87.8 \pm 5.0 \mu\text{m}$ y un largo del pie de $68.1 \pm 8.4 \mu\text{m}$. En cuanto a los machos el tamaño promedio del largo fue $106.3 \pm 2.1 \mu\text{m}$, con 57.2 ± 2.6 de ancho y el pie fue de

16.5 ± 1.9 µm. Se reportaron diferencias en el tamaño de los huevos partenogénéticos, resistencia y de macho. Los huevos de macho son los morfométricamente más pequeños de los tres (Tabla 15).

Tabla 14. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Parque del Cenote”.

	Hembras (µm)			Machos (µm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 1	129.4 ± 4.5	88.0 ± 4.4	67.4 ± 5.8	98.1 ± 2.7	45.8 ± 1.1	16.2 ± 1.9
Cepa 2	123.9 ± 5.7	89.0 ± 4.3	67.7 ± 8.0	96.6 ± 3.3	46.1 ± 3.9	18.5 ± 2.2
Cepa 3	129.0 ± 5.3	85.5 ± 2.6	67.8 ± 9.2	-	-	-
Cepa 5	120.8 ± 8.0	85.0 ± 5.2	52.5 ± 0.9	-	-	-
Cepa 6	126.9 ± 3.8	88.9 ± 4.7	68.5 ± 1.1	-	-	-
Cepa 7	126.9 ± 3.7	90.4 ± 5.1	67.3 ± 9.0	84.5 ± 0.8	44.4 ± 0.9	16.7 ± 0.4
Cepa 9	125.2 ± 3.7	89.4 ± 5.1	69.2 ± 7.4	-	-	-
Cepa 10	122.7 ± 4.7	85.8 ± 3.3	74.4 ± 4.1	-	-	-
Cepa 12	123.0 ± 6.3	85.9 ± 3.2	76.5 ± 4.2	-	-	-

Tabla 15. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Parque del Cenote”. Dónde: HP= Huevo partenogénético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (µm)	HR (µm)	HM (µm)
Largo	73.6 ± 2.7	74.3 ± 2.5	55.5 ± 2.2
Ancho	66.0 ± 3.0	72.4 ± 2.8	44.2 ± 2.5

e) Sitio: El Secreto (SCR)

MATERIAL EXAMINADO: Se obtuvieron un total de 4 cepas. Se midieron un total de 240 hembras. Los machos se presentaron en 1 cepa de las 4 de los cuales se midieron 10. Se midieron al azar 20 huevos de cada tipo de huevo (Figura 12).

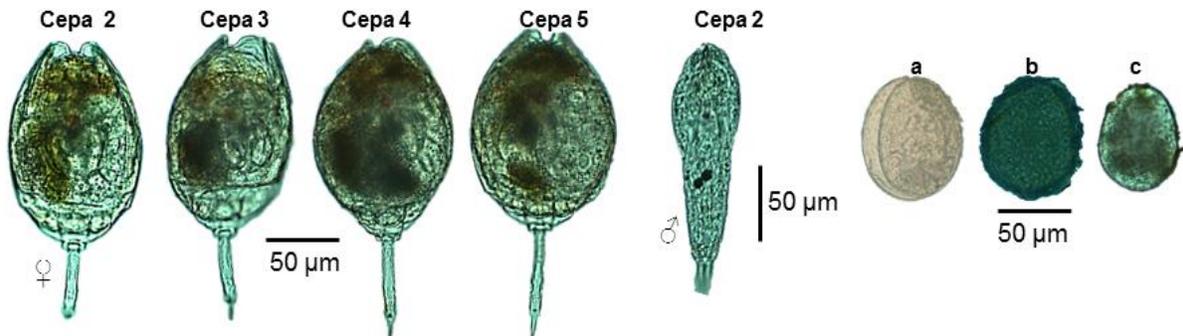


Figura 12. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “El secreto”. Tipos de huevos: a= partenogénético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: Los datos obtenidos para hembras y machos del El Secreto (SCR) se registraron en la Tabla 16. Los datos indicaron que el tamaño promedio de las hembras para el largo del cuerpo fue $124.7 \pm 4.5 \mu\text{m}$, para el ancho $86.4 \pm 3.8 \mu\text{m}$ y el largo de pie $48.4 \pm 2.8 \mu\text{m}$. Los machos mostraron un tamaño promedio para el largo de su cuerpo de $108.1 \pm 2.2 \mu\text{m}$, para el ancho $57.4 \pm 3.3 \mu\text{m}$ y un pie de $18.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$ de largo. La información los tipos de huevos se reportaron en la Tabla 17. Los resultados indicaron que los huevos de resistencia son morfométricamente más grandes que los huevos partenogénéticos tanto en el largo como en el ancho.

Tabla 16. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “El secreto”.

	Hembras (μm)			Machos (μm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 2	121.6 ± 5.0	85.9 ± 3.9	58.6 ± 6.1	108.2 ± 2.9	58.3 ± 2.4	18.2 ± 3.5
Cepa 3	127.2 ± 6.9	86.9 ± 4.2	65.0 ± 4.7	-	-	-
Cepa 4	125.5 ± 5.0	84.9 ± 4.2	65.0 ± 12.1	-	-	-
Cepa 5	124.7 ± 5.6	85.0 ± 5.2	52.5 ± 0.9	-	-	-

Tabla 17. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “El secreto”. Dónde: HP= Huevo partenogénético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (μm)	HR (μm)	HM (μm)
Largo	77.6 ± 2.0	78.7 ± 2.3	57.1 ± 1.9
Ancho	72.2 ± 2.3	75.2 ± 2.0	54.2 ± 2.0

f) Sitio: Canal Cocodrilo (CCD)

MATERIAL EXAMINADO: Se obtuvieron un total de 4 cepas para el sitio. Se midieron en total 240 hembras. Los machos se presentaron en 3 de las 4 cepas, en cepas se midieron 10 machos, haciendo un total de 30 mediciones. De estas 4 cepas fueron tomados al azar 20 huevos partenogénéticos, 20 de resistencia y 20 (Figura 13).

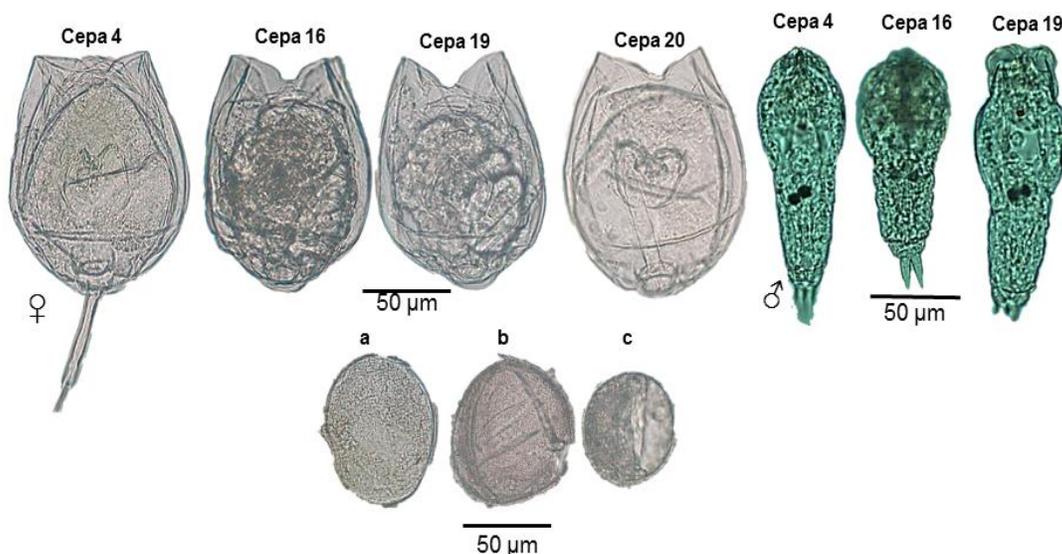


Figura 13. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Canal Cocodrilo”. Tipos de huevos: a= partenogenético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: Se registraron en la Tabla 18 las medidas promedio de las hembras y machos. Las hembras presentaron un largo del cuerpo de $122.4 \pm 6.4 \mu\text{m}$, el ancho 85.5 ± 6.0 y el largo del pie $66.1 \pm 7.1 \mu\text{m}$. Los machos presentaron un tamaño promedio del cuerpo de $106.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$, un ancho de $58.1 \pm 3.4 \mu\text{m}$ y un largo del pie de $17.3 \pm 2.1 \mu\text{m}$. La medida de cada tipo de huevo se reportó en la Tabla 19. El huevo de resistencia es más grande que el huevo partenogenético principalmente en su ancho.

Tabla 18. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos de cada cepa obtenida a partir de organismos aislados de la muestra colectada en el sitio “Canal Cocodrilo”

	Hembras (μm)			Machos (μm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 4	122.4 ± 6.4	86.2 ± 5.2	64.7 ± 7.0	102.6 ± 9.8	58.2 ± 1.9	17.4 ± 2.5
Cepa 16	119.1 ± 4.8	88.5 ± 4.0	64.0 ± 5.8	103.9 ± 9.4	58.3 ± 2.4	16.8 ± 1.9
Cepa 19	122.6 ± 6.0	84.0 ± 6.9	72.5 ± 3.3	106.5 ± 5.6	59.1 ± 1.9	17.8 ± 2.2
Cepa 20	117.8 ± 7.5	83.6 ± 6.7	62.9 ± 8.4	-	-	-

Tabla 19. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Canal Cocodrilo”. Dónde: HP= Huevo partenogenético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (μm)	HR (μm)	HM (μm)
Largo	79.8 ± 2.4	80.2 ± 2.3	67.1 ± 1.2
Ancho	69.0 ± 2.3	78.6 ± 1.9	60.8 ± 2.0

g) Sitio: Punta Nizuc (PN)

MATERIAL EXAMINADO: Un total de 7 cepas se obtuvieron de este sitio. Se midieron 490 hembras en total. Los machos se presentaron en 2 de las 7 cepas, de los cuales se realizaron un total de 30 mediciones. Los diferentes tipos de huevo se tomaron al azar de estas 7 cepas, con un total de 20 mediciones por cada tipo de huevo (Figura 14).

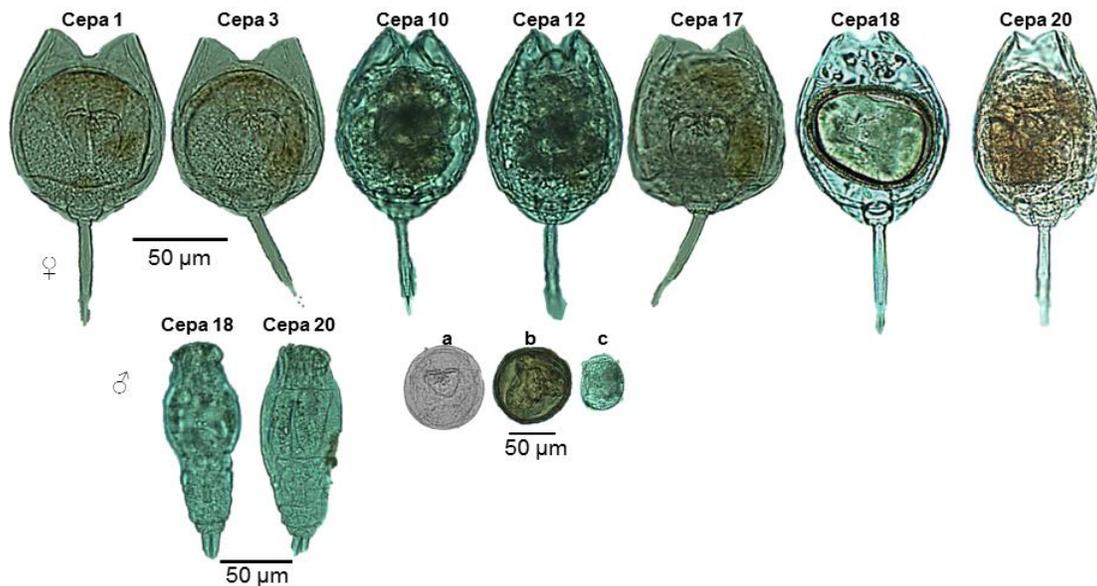


Figura 14. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Punta Nizuc”. Tipos de huevos: a= partenogenético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: Los datos morfométricos indicaron que las hembras de este sitio presentaron un largo del cuerpo promedio de $112.2 \pm 7.9 \mu\text{m}$, con un ancho de $77.5 \pm 7.3 \mu\text{m}$ y un pie con un largo de $6.2 \pm 5.4 \mu\text{m}$. En cuanto a los machos estos presentaron un tamaño promedio del largo del cuerpo es de $89.8 \pm 2.1 \mu\text{m}$, con un de ancho el 50.9 ± 1.9 y un pie de $15.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$ de largo (Tabla 20). El tamaño promedio de los huevos

partenogénéticos, resistencia y de macho, reportó diferencias en sus tamaños, siendo los huevos de resistencia los morfométricamente más grandes (Tabla 21).

Tabla 20. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Punta Nizuc”

	Hembras (µm)			Machos (µm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 1	118.5 ± 2.3	76.2 ± 5.3	68.2 ± 8.2	89.5 ± 1.1	51.7 ± 6.8	14.8 ± 1.5
Cepa 3	116.6 ± 9.9	74.5 ± 6.2	69.8 ± 5.8	90.2 ± 4.9	51.8 ± 2.0	15.6 ± 1.2
Cepa 10	110.5 ± 6.9	78.3 ± 4.0	65.0 ± 1.1	-	-	-
Cepa 12	115.6 ± 6.5	87.5 ± 6.4	64.2 ± 5.7	-	-	-
Cepa 17	113.0 ± 4.3	75.7 ± 6.4	68.8 ± 5.7	-	-	-
Cepa 18	108.9 ± 5.2	78.3 ± 8.0	63.1 ± 5.6	-	-	-
Cepa 20	112.8 ± 5.1	77.8 ± 7.3	67.8 ± 2.4	-	-	-

Tabla 21. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Punta Nizuc”. Dónde: HP= Huevo partenogénético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (µm)	HR (µm)	HM (µm)
Largo	65.1 ± 1.1	66.8 ± 1.1	57.3 ± 3.1
Ancho	61.3 ± 3.3	65.2 ± 3.2	50.2 ± 3.0

h) Sitio: Muyil (MYL)

MATERIAL EXAMINADO: Se obtuvieron un total de 4 cepas en condiciones laboratorio. En total se midieron 200 hembras. Para el caso de los machos, estos se presentaron en 1 de las 4 cepas y se midieron 10 individuos en total. Los huevos partenogénéticos, de resistencia y de macho fueron tomados al azar de las 4 cepas, haciendo un total de 20 mediciones para cada tipo de huevo (Figura 15).

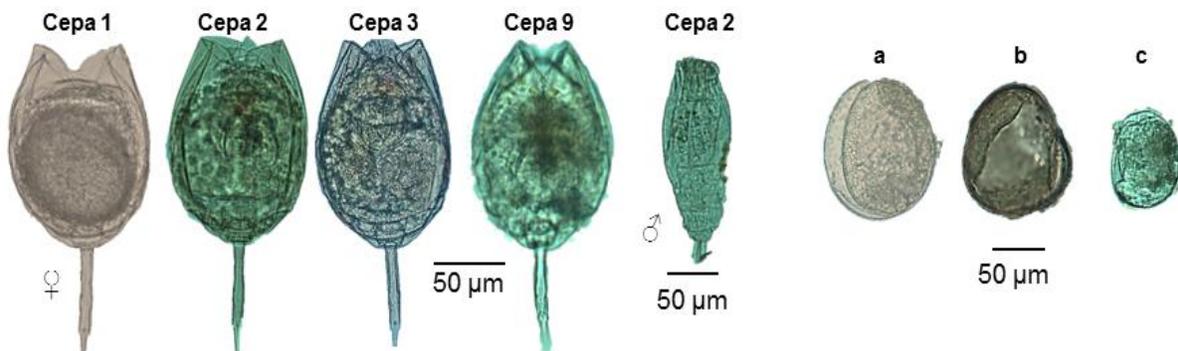


Figura 15. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Muyil”. Tipos de huevos: a= partenogenético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: Los datos obtenidos para hembras y machos de Muyil (MYL) se registraron en la Tabla 22. Los datos indicaron que el tamaño promedio que presentaron las hembras para el largo del cuerpo fue de $108.1 \pm 5.6 \mu\text{m}$, para el ancho $73.5 \pm 7.6 \mu\text{m}$ y el largo de pie fue $51.3 \pm 4.8 \mu\text{m}$. Los machos mostraron un tamaño promedio para el largo de su cuerpo de $82.1 \pm 2.6 \mu\text{m}$, para el ancho $44.1 \pm 1.2 \mu\text{m}$ y un pie de $18.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ de largo. La información de cada uno de los tipos de huevos para la localidad se encuentra en la Tabla 23. Cada uno de los huevos muestra diferencias en sus medidas, el huevo de macho es el morfométricamente es el más pequeño.

Tabla 22. Medidas promedio con desviación estándar de hembras y machos por cepa de organismos aislados de la muestra de “Muyil”.

	Hembras (μm)			Machos (μm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 1	108.9 ± 5.7	67.7 ± 5.2	50.1 ± 3.2	82.7 ± 4.2	44.1 ± 0.8	19.1 ± 0.6
Cepa 2	107.4 ± 7.0	72.2 ± 7.7	50.2 ± 5.6	-	-	-
Cepa 3	108.7 ± 3.5	82.0 ± 4.3	52.2 ± 5.2	-	-	-
Cepa 9	106.5 ± 5.2	72.7 ± 5.9	48.3 ± 3.7	-	-	-

Tabla 23. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de “Muyil”. Dónde: HP= Huevo partenogenético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (μm)	HR (μm)	HM (μm)
Largo	51.7 ± 3.0	55.5 ± 2.0	45.7 ± 2.6
Ancho	43.8 ± 2.0	49.3 ± 2.1	45.2 ± 2.4

i) Sitio: Punta Laguna (PL)

MATERIAL EXAMINADO: Se obtuvieron un total de 4 cepas donde en cada una se midieron 70 hembras haciendo un total de 280 mediciones. Los machos se presentaron en 1 de las 4 cepas, de los cuales se midieron 10 individuos. Los huevos

partenogénéticos, de resistencia y de macho fueron tomados al azar de estas 4 cepas, haciendo un total de 20 mediciones para cada tipo de huevo (Figura 16).

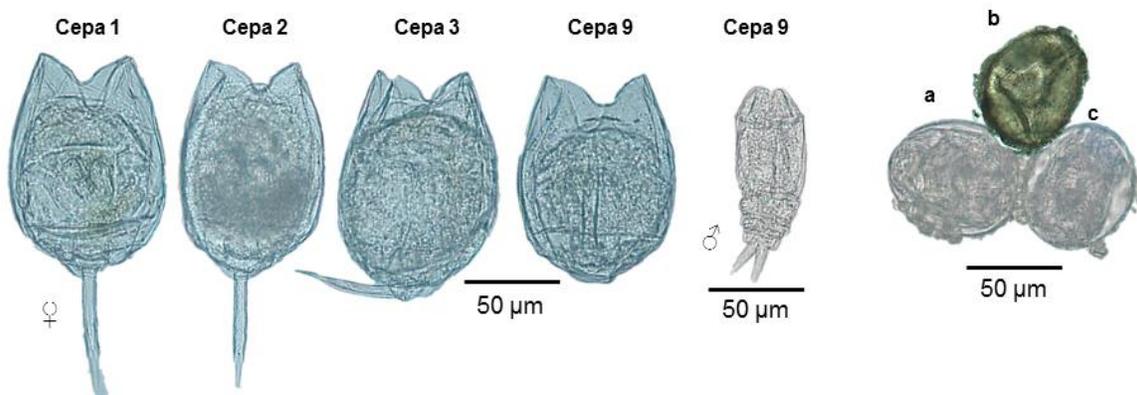


Figura 16. Ejemplares de hembras (♀) y machos (♂) de cepas de *L. bulla* obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de “Punta Laguna”. Tipos de huevos: a= partenogénético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: Los datos para hembras y machos se reportaron en la Tabla 24. Las hembras presentaron un tamaño promedio para el largo del cuerpo de $107.1 \pm 3.9 \mu\text{m}$; un ancho de $79.4 \pm 5.8 \mu\text{m}$ y un pie de $50.3 \pm 3.8 \mu\text{m}$ de largo. En el caso de los machos el largo promedio del cuerpo fue $81.6 \pm 2.4 \mu\text{m}$, con un ancho de $46.4 \pm 2.7 \mu\text{m}$ y un pie de $18.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ de largo. En la Tabla 25 se describieron las medidas promedio de cada tipo de huevo. Se reportó que los huevos de macho son morfológicamente más pequeños que los partenogénéticos y los de resistencia.

Tabla 24. Medidas promedio con desviación estándar de hembras por cepa de organismos aislados de la muestra de “Punta Laguna”.

	Hembras (μm)			Machos (μm)		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 1	107.6 ± 3.8	80.8 ± 3.9	53.2 ± 6.2	81.7 ± 4.2	43.1 ± 0.8	18.1 ± 0.7
Cepa 2	105.7 ± 2.6	78.4 ± 5.2	52.2 ± 5.2	-	-	-
Cepa 3	106.5 ± 2.5	78.1 ± 5.7	51.2 ± 5.2	-	-	-
Cepa 9	108.0 ± 4.9	78.2 ± 4.2	50.3 ± 3.7	-	-	-

Tabla 25. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de "Punta Laguna". Dónde: HP= Huevo partenogenético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (μm)	HR (μm)	HM (μm)
Largo	61.0 \pm 2.6	62.4 \pm 3.0	51.2 \pm 3.0
Ancho	55.6 \pm 3.0	59.2 \pm 3.1	48.8 \pm 2.4

j) Sitio: Chemuyil (CHM)

MATERIAL EXAMINADO: Se obtuvieron un total de 6 cepas. Se midieron 480 hembras en total de. Los machos se presentaron en 2 de las 6 cepas de los cuales se realizaron 20 mediciones. Se seleccionaron 20 huevos partenogenéticos, de resistencia y de macho al azar de las 6 cepas (Figura 17).

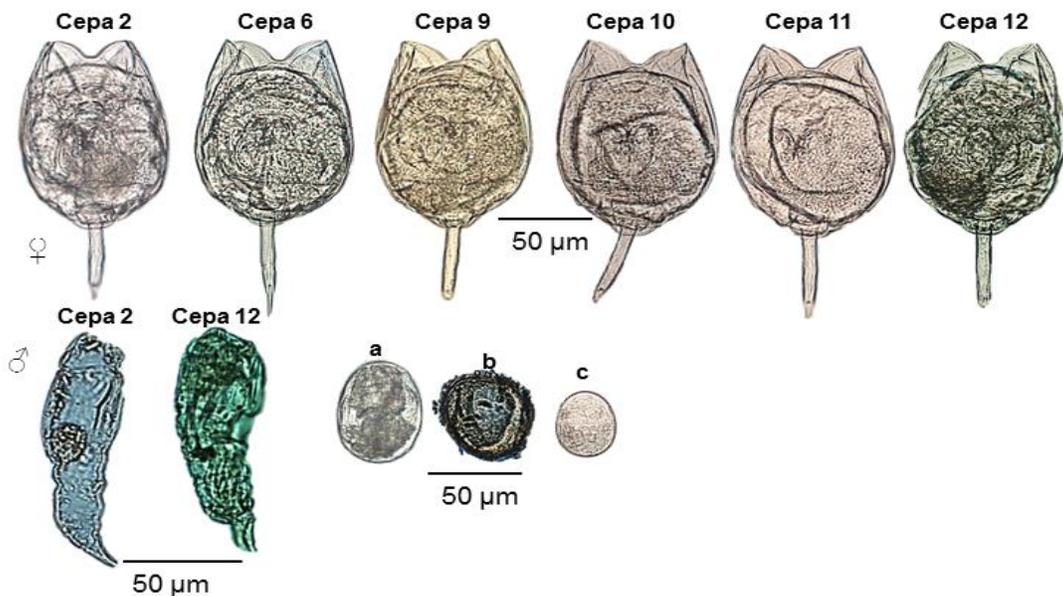


Figura 17. Ejemplares de *L. bulla* de cepas obtenidas a partir de organismos aislados de la muestra de "Chemuyil". Tipos de huevos: a= partenogenético; b= resistencia; c= macho.

MORFOMETRÍA: La información de hembras y machos se presenta en la Tabla 26. Las hembras registraron un tamaño promedio del cuerpo de $102.9 \pm 4.5\mu\text{m}$, con un ancho de $71.8 \pm 5.8\mu\text{m}$ y un pie de $48.4 \pm 2.8\mu\text{m}$ de largo. Los machos presentaron una longitud

de $78.4 \pm 2.6 \mu\text{m}$, con un ancho de $43.4 \pm 2.6 \mu\text{m}$ y un largo del pie de $18.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$. Las medidas promedio obtenidas de los huevos se presentaron en la Tabla 27. Morfométricamente hay diferencias entre sus mediciones, pero el huevo de macho es el más pequeño de los tres.

Tabla 26. Medidas promedio con desviación estándar de machos por cepa de organismos aislados de la muestra de "Chemuyil".

	Hembras			Machos		
	Largo	Ancho	Pie	Largo	Ancho	Pie
Cepa 2	103.1 ± 5.0	72.0 ± 4.8	52.4 ± 7.9	81.0 ± 5.0	41.0 ± 2.7	16.7 ± 1.3
Cepa 6	103.9 ± 3.6	73.5 ± 3.0	49.1 ± 5.8	-	-	-
Cepa 9	103.7 ± 4.8	71.3 ± 4.0	44.6 ± 6.6	-	-	-
Cepa 10	103.0 ± 4.1	71.3 ± 3.4	47.9 ± 6.0	-	-	-
Cepa 11	102.7 ± 4.1	72.2 ± 3.1	46.0 ± 6.0	-	-	-
Cepa 12	98.3 ± 4.3	73.9 ± 2.1	50.6 ± 6.1	75.3 ± 2.9	55.5 ± 6.5	18.8 ± 0.9

Tabla 27. Medidas promedio con desviación estándar de cada tipo de huevo en las cepas de "Chemuyil".
Dónde: HP= Huevo partenogenético; HR= Huevo de resistencia; HM= Huevo de macho.

	HP (μm)	HR (μm)	HM (μm)
Largo	61.0 ± 2.6	62.4 ± 3.0	51.2 ± 3.0
Ancho	55.6 ± 3.0	59.2 ± 3.1	48.8 ± 2.4

8.3 Determinación morfológica de morfotipos de *Lecane bulla*

Para la determinación de diferencias estadísticas significativas se realizó un análisis de ANOVA de un solo sentido con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$). El análisis incluyó la información obtenida de la digitalización de 1240 fotografías de hembras (20 por cada cepa) y 110 de macho (5 por cada cepa en las hubo presencia) de *L. bulla* proveniente de las 62 cepas caracterizadas en la sección anterior.

Un primer análisis consistió en comparar los valores que presentó cada una de las cepas entre sí para determinar si había diferencias estadísticamente significativas que indicaran que dentro de una misma localidad era posible encontrar diferentes tamaños. Los resultados mostraron que las cepas no presentaron diferencias estadísticamente

significativas cuando fueron analizadas de manera individual y por lo cual no fue posible diferenciar la presencia de distintos morfotipos dentro de un mismo tipo de ecosistema acuático de Quintana Roo pues el valor de $p < 0.21$.

Posteriormente se realizó el mismo análisis estadístico, pero ahora considerando a las cepas de cada ecosistema acuático como un solo dato para cada sitio, es decir, considerando la suma total de los datos de todas las cepas de cada sitio para hembras y machos. El resultado de ANOVA para el tamaño fue estadísticamente significativo pues el valor de $p < 0.001$ indicó diferencias en el tamaño de los especímenes de *L. bulla* entre los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.

Una vez determinado que las diferencias estaban dadas entre los ecosistemas acuáticos, se realizó un análisis de Análisis de Escalamiento Multidimensional (MDS) para identificar como esta variabilidad existente en los especímenes de *L. bulla* se encuentra presente en ecosistemas acuáticos de Quintana Roo (Figura 18).

Los resultados indicaron que el complejo *L. bulla* que habita en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo existen dos morfotipos. El primer morfotipo propuesto se encuentra distribuido en los ecosistemas acuáticos de Corchalito, Leona Vicario, Parque del Cenote, Cenote de la cien, El Secreto y Canal Cocodrilo ubicados en la región más norte del estado (Figura 18, círculo verde). Este se nombró como “morfotipo grande (G)”. En este morfotipo las hembras presentan un tamaño de 120 a 130 μm para el largo del cuerpo, de 80 a 90 μm en el ancho del cuerpo y pie de 65 a 70 μm de largo. Las medidas para los machos son para el largo del cuerpo de 80 a 100 μm , para el ancho de 60 a 70 μm y un pie de 17 a 20 μm de largo. Este morfotipo se habita en los cuatro tipos de ecosistemas acuáticos analizados en este estudio que son dolinas, lagunas costeras, lagos cársticos y pozas temporales (Figura 18).

El segundo morfotipo propuesto se nombró como “morfotipo pequeño (C)”. Se encuentra distribuido en los ecosistemas acuáticos de Muyil, Chemuyil, Punta Laguna y Punta Nizuc, los cuales se localizan en la parte centro-norte del estado (con excepción de Punta Nizuc) (Figura 18, círculo rojo). En este morfotipo las hembras presentan un tamaño para

el cuerpo de 90 a 110 μm de largo, con un ancho de 60 a 70 μm y un largo de pie de 45 a 50 μm . Las medidas en los machos son para el largo del cuerpo de 60 a 70 μm , con un ancho de 40 a 50 μm y un pie de las 15 a las 17 μm de largo. Este morfotipo pequeño habita en tres de los cuatro tipos de ecosistemas acuáticos analizados en este trabajo que son pozas temporales, lagunas costeras y lagos cársticos. No se reportó en dolinas (Figura 18).

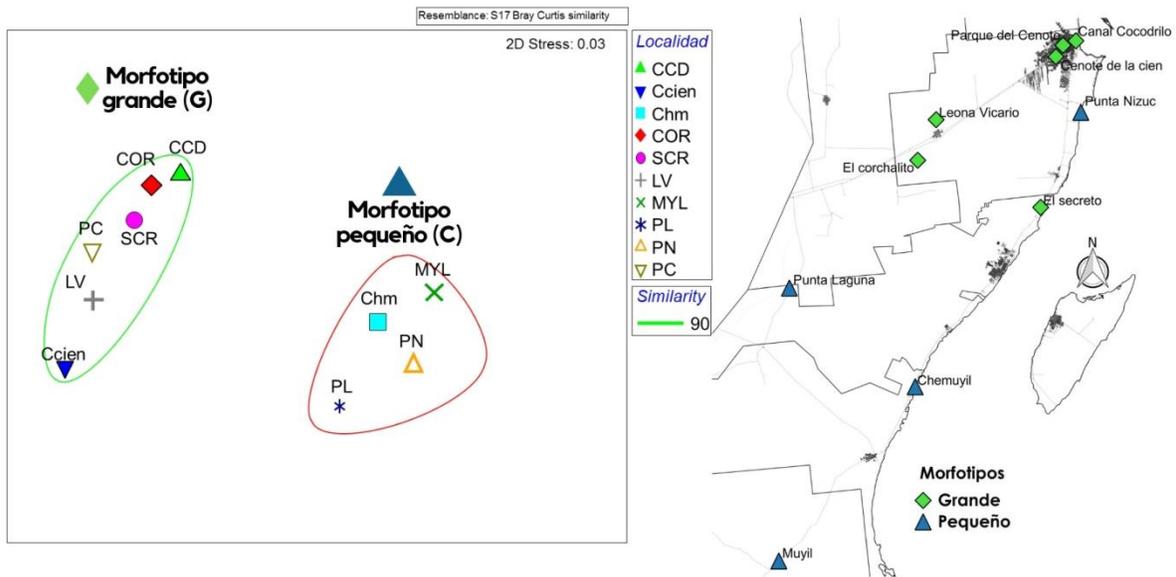


Figura 18. Análisis de Escalamiento Multidimensional (MDS) y distribución de los morfotipos identificados para los diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo de *L. bulla*. En el círculo verde se presenta el morfotipo grande (G) y en círculo rojo el morfotipo pequeño (C). (stress=0.03).

8.4 Descripción morfológica de los morfotipos de *Lecane bulla*

a) Vista y apertura dorsal de la cabeza

Estructuralmente el cuerpo es ovalado, cilíndrico, de aspecto rígido pero altamente flexible. La diferencia entre los morfotipos se encuentra en la apertura de la cabeza y grado de ornamentación. El morfotipo grande tiene la apertura de la cabeza amplia con esquinas redondeadas en forma de “U” (Figura 19a) y debajo de este se identifica un pliegue marcado (Figura 19c). La ornamentación es pronunciada al final del cuerpo con pequeños poros, donde se observaron pliegues en forma de “W”; que a los laterales de estos pliegues se vuelven de aspecto corrugado (Figura 19a). El morfotipo pequeño

presentó una amplia apertura de la cabeza con una proyección al final en forma de “U” apenas pronunciada (Figura 19b). Presentó un pliegue que no se identifica fácilmente (Figura 19d). Su ornamentación no es tan pronunciada, carece de poros y no presenta pliegues en forma de “W” (Figura 19b).

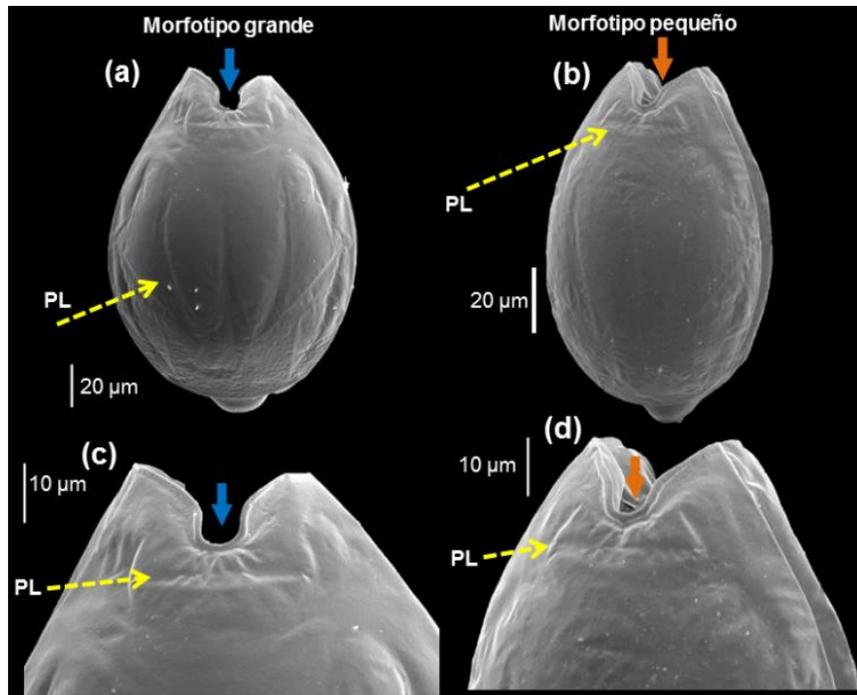


Figura 19. Vista dorsal de especímenes de hembras de *L. bulla* de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. Dónde: a-c=morfotipo grande; b-d=morfotipo pequeño; PL=pliegue.

b) Vista y apertura ventral de la cabeza

En ambos casos la placa dorsal como ventral tiene el mismo tamaño. La apertura de la cabeza ventral es mucho más amplia en el morfotipo grande (Figura 20 a y c) que en el morfotipo pequeño (Figura 20 b y d). En el morfotipo pequeño la apertura de la cabeza es breve con una proyección cóncava que está fuertemente pronunciada y ligeramente más cerrada, que en el morfotipo grande (Figura 20 c y d).

c) *Membrana pleural*

Se le denomina membrana pleural a la región que conecta las placas que conforman el cuerpo de los rotíferos. Su función es permitirle al organismo movilidad. Esta membrana es suave con estrías y se extiende de extremo a extremo del cuerpo del organismo. En esta membrana se encuentra oculto un pequeño poro redondo sobresaliente del cual usualmente nace una antena sensorial. En el caso de los dos morfotipos de *L. bulla* no se presentaron diferencias entre ambos y concuerdan con la descripción tradicionalmente descrita por Segers (1995) (Figura 21).

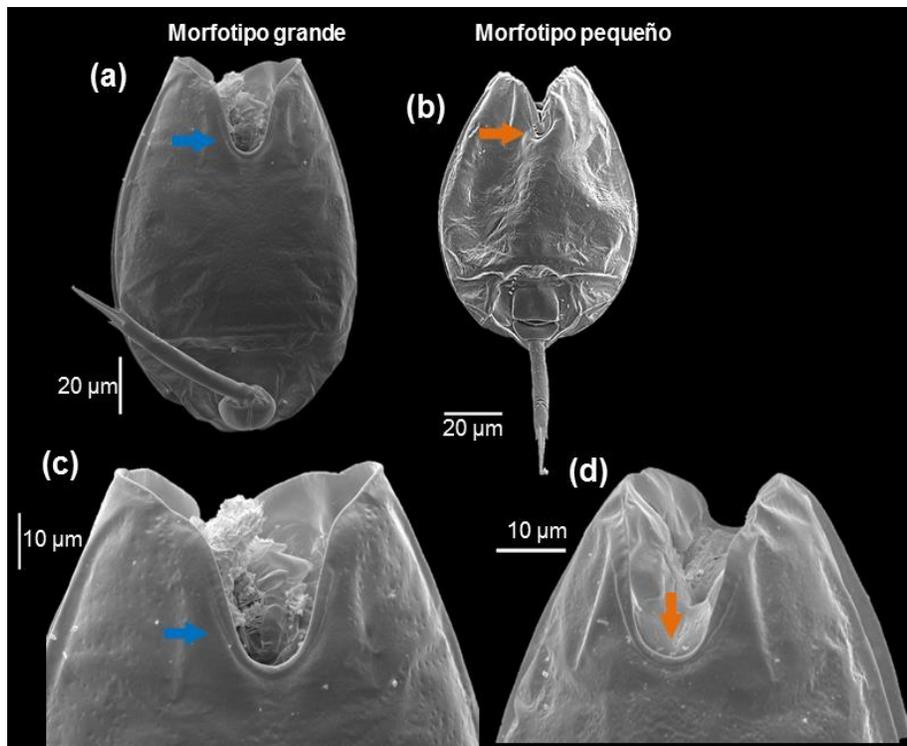


Figura 20. Vista ventral de especímenes de hembras de *L. bulla* de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. Dónde: a-c=morfotipo grande; b-d=morfotipo pequeño.

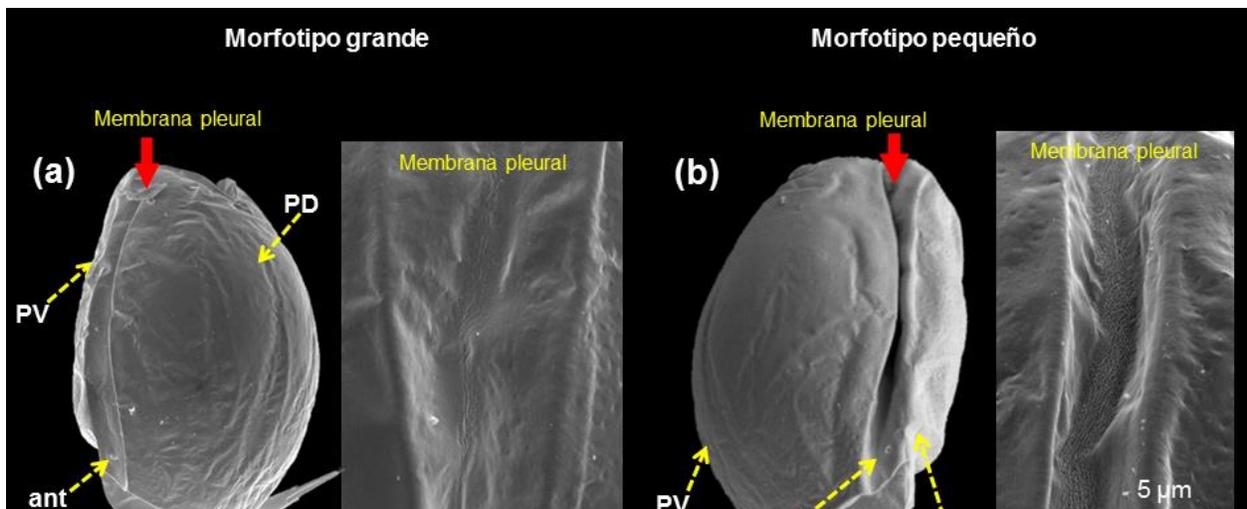


Figura 21. Membrana pleural de especímenes de hembras de *L. bulla* de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. Dónde: a = morfotipo grande; b=morfotipo pequeño; PV=Placa Ventral; PD= Placa Dorsal; ant= Antena

d) *Placa ventral del pie*

La placa ventral del pie se encuentra delimitada por un pliegue transversal (plv) que cruza a través de todo el cuerpo del organismo (Figura 22a-b). Las principales diferencias entre ambos morfotipos se encuentran en la forma y el tamaño de las placas coxales (pc). En el morfotipo grande estas placas coxales alcanzan el borde de la placa ventral y se encuentran definidas por los pliegues extracoxales (Plex) los cuales les dan una apariencia redondeada (Figura 22a). En cuanto al morfotipo pequeño estos presentaron unas placas coxales (pc) que sobresalen de la placa ventral, las cuales son alargadas con aspecto ovalado no bien definido donde los pliegues extracoxales (Plex) que definen a la placa coxal no se encuentran diferenciados o son muy suaves por lo cual no son identificables (Figura 22b). En cuanto al prepedal (Prep) y el pie pseudosegmentado (Psep) en ambos morfotipos es diferente (Figura 22). En los morfotipos grandes el prepedal es alargado horizontalmente y corto verticalmente con forma de rectángulo con un pie pseudoggmentado que sobresale del cuerpo del organismo y del cual nace el pie (Figura 22a). En cuanto a los morfotipos pequeños estos presentan un prepedal angosto verticalmente y ancho horizontalmente (Figura 22b) con un pie pseudosegmentado (Psep), el cual no se proyecta más allá de la placa ventral (Figura 22 b).

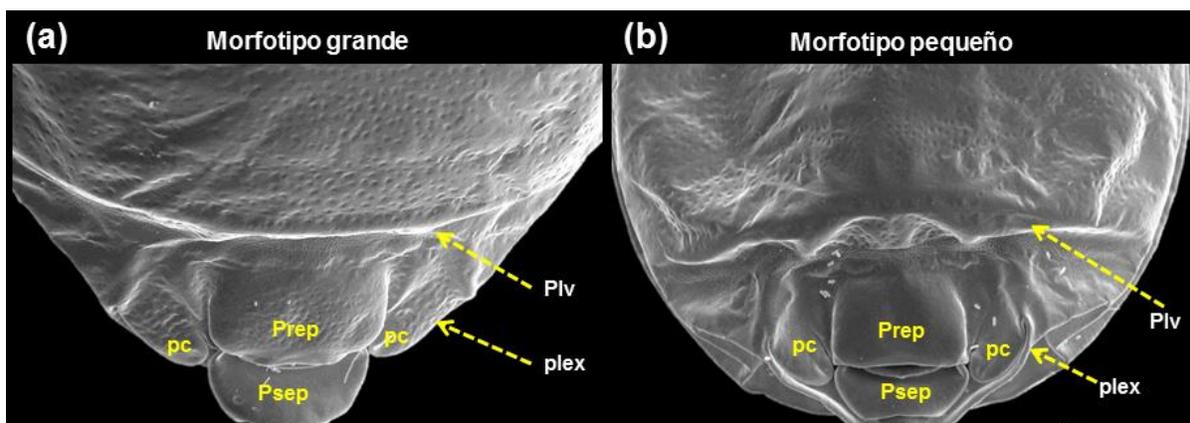


Figura 22. Placa ventral del pie de especímenes de hembras de *L. bulla* de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. Dónde: a = morfotipo grande; b = morfotipo pequeño; pc = placa coxal; Prep = prepedal; Plv = Pliegue ventral; plex = pliegue extracoxal; Psep = pie pseudosegmentado.

e) *Dedo, uñas y accesorios*

El dedo es recto y largo en ambos casos. Presenta dos uñas que terminan en una punta suave y no están fusionadas (Figura 23). La diferencia entre ambos morfotipos es la presencia de una muesca (ms) de donde nacen las uñas. En el caso del morfotipo grande, la muesca es pronunciada con forma de “U” invertida de donde nacen las uñas, que cuenta con accesorios (ac) a los laterales con un tamaño entre 5 a 8 μm (Figura 23a). El dedo además presentó un pliegue transversal (plt) que es incompleto (Figura 23a). En el morfotipo pequeño no se presentó una muesca (ms), se observa como las uñas nacen directamente del dedo, el tamaño de los accesorios no supera las 5 μm de largo. El dedo presentó un pliegue transversal (plt) completo, que atraviesa horizontalmente el dedo (Figura 23b).

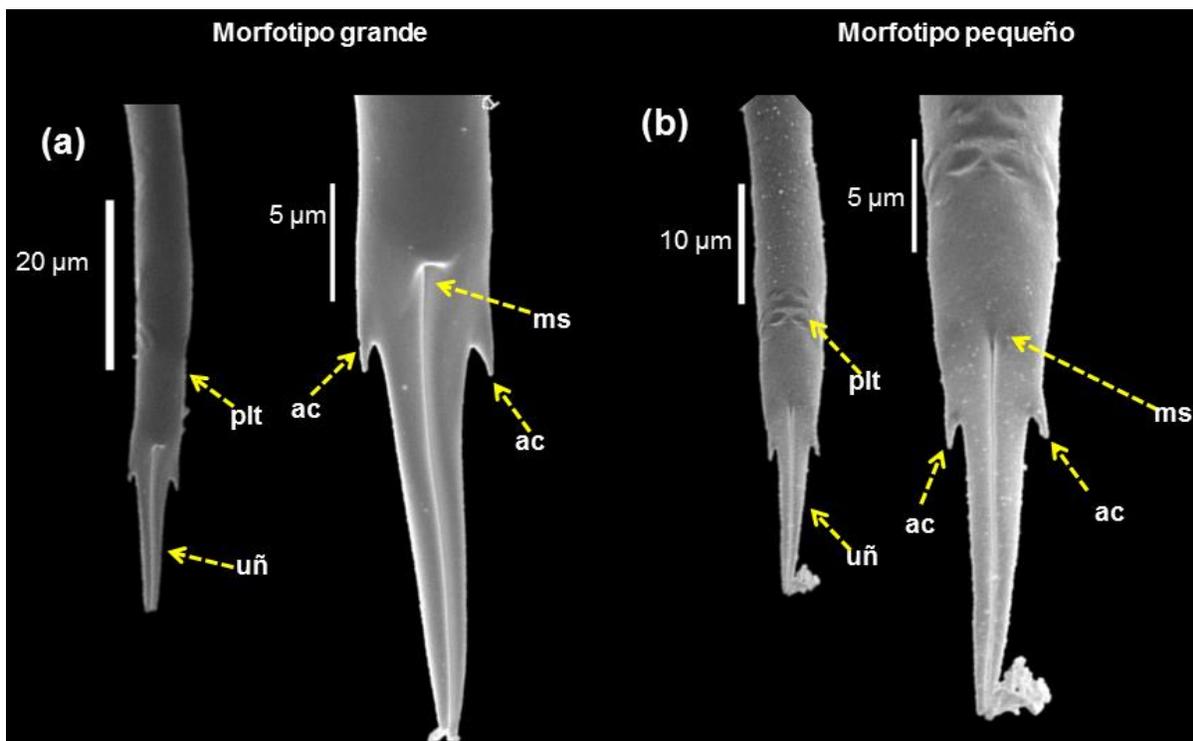


Figura 23. Dedos, uñas y accesorios de especímenes de hembras de *L. bulla* de cepas provenientes de organismos aislados de diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. Dónde: a =morfotipo grande; b=morfotipo pequeño; plt= pliegue transversal; uñ=uñas; ms=muesca; ac=accesorio

8.4.1 *Diagnosis diferencial*

Las descripciones realizadas de ambos morfotipos se compararon con la revisión elaborada por Koste (2000). Actualmente *L. bulla* cuenta con diez descripciones diferentes entre subespecies y formas (Figura 24). El morfotipo grande y pequeño de estudio no concuerda con las descripciones existentes debido a que:

1. Las formas a,b,f,g,h,i de *L. bulla* de la Figura 24 presentan estructuras fácilmente identificables como proyecciones en la placa dorsal, proyecciones puntiagudas al final del cuerpo, poros rugosos, dientes en la apertura de la cabeza o forma corporal triangular. Por esto se descarta que los morfotipos de los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo pertenezcan a alguna de estas descripciones.
2. La descripción de las formas c y e de *L. bulla* de la Figura 24, fueron realizadas en una única ocasión y por lo cual la información es inconclusa.
3. En el caso de *L. bulla goniata* y *slyrax* (Figura 24 d y j) aunque parecen morfológicamente similares a los morfotipos identificados, difieren en el dedo y la uña, pues en estos el dedo se encuentra completamente fusionado y termina en una punta fina bien definida. El cuerpo presenta una estructura ensanchada al final y la apertura de la cabeza es extremadamente cóncava, las cuales no presentan los morfotipos de *L. bulla* identificados en este estudio.

Por lo cual se concluye que los morfotipos identificados para *L. bulla* de los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo, no son comparables con los reportes hasta ahora existentes y que su diferencia principal se encuentra en la apertura de la cabeza, forma de las placas del pie y los detalles del dedo.

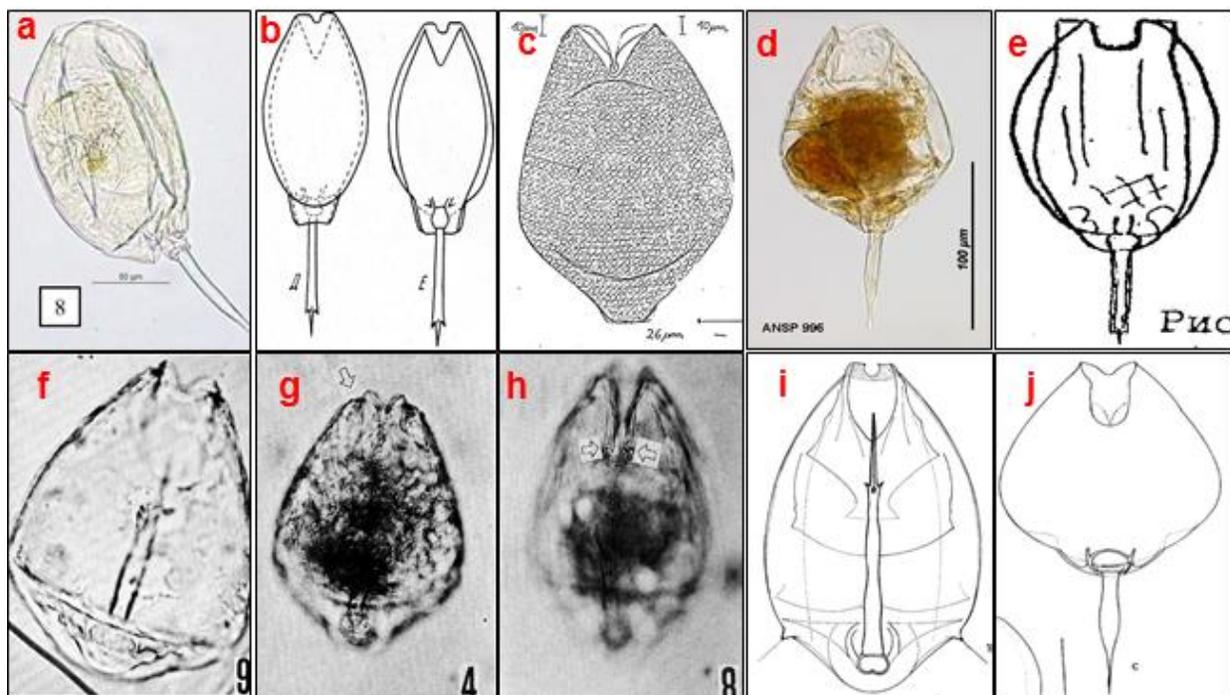


Figura 24. Diferentes descripciones de hembras de *L. bulla* realizadas en otros estudios, las cuales fueron revisadas por Koste (2000). Dónde: a=*L. bulla diabólica*; b= *L. bulla diana*; c=*L. bulla alveola*; d=*L. bulla goniata*; e=*L. bulla kutikovae*; f= *L. bulla constricta* f. *triangulata*; g=*L. bulla constricta*; h=*L. bulla dentata*; i=*L. bulla papilosa*; j=*L. bulla slyrax*.

8.5 Reconstrucción filogenética e identificación de haplotipos de *Lecane bulla*

Las topologías de todos los árboles filogenéticos se reconstruyeron utilizando un total de 62 secuencias de origen mitocondrial. De esas secuencias, 50 fueron obtenidas de la base de datos disponible en el NCBI y 12 restantes son de este trabajo, las cuales

proviene de ocho de los diez ecosistemas acuáticos analizados (Cenote de la cien y Punta Nizuc no presentaron secuencias de calidad).

Este árbol filogenético se dividió en cuatro clados (Clado I, Clado II, Clado III y Clado IV). El clado I se formó con secuencias provenientes de estudios realizados en ecosistemas acuáticos de Chihuahua, Campeche, Quintana Roo, Ciudad de México, Veracruz, Florida e Italia y de este trabajo de las secuencias obtenidas de Punta Laguna y Chemuyil (Figura 25). El clado II se agruparon secuencias de los ecosistemas acuáticos de Veracruz y Chihuahua, en este clado no se presentaron secuencias de este estudio (Figura 25). Este clado III se conformó por secuencias provenientes de Veracruz y de esta investigación de las del ecosistema acuático de Muiyil. Figura 25). El último clado el IV se organizó con secuencias originarias de Florida, Quintana Roo y Campeche y de este trabajo de las obtenidas de los ecosistemas acuáticos de Leona Vicario, Corchalito, El secreto, Canal Cocodrilo y Parque del cenote (Figura 25).

La divergencia genética promedio registrada entre las 62 secuencias de *L. bulla* osciló en un rango de entre 3.1-16%. Cuando se analizaron únicamente las 12 secuencias obtenidas en este estudio de *L. bulla* de los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo, las distancias presentaron un promedio entre 2.1-9.6%. Las cepas del Secreto mostraron la mayor divergencia tanto al ser comparadas con las 62 secuencias (16%) así como entre las secuencias de este estudio con 9.6%. La cepa de Chemuyil mostró una divergencia del 7.2% que no mostro similitud con secuencias de este estudio, pero si con de cepas que se han reportado para Chihuahua. Por su parte las secuencias con menor divergencia genética fueron las del Leona Vicario y Canal Cocodrilo y Parque del Cenote (2.1% de divergencia) que mostraron similitud con secuencias reportadas en Quintana Roo, Campeche y Florida (3.1% de divergencia).

Una vez determinada la divergencia genética, se calculó entre estas 62 secuencias la variabilidad genética, la cual permite determinar el número de haplotipos, la diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (π). Los resultados indicaron que *L. bulla* presentó 20 haplotipos, de los cuales seis se encuentran en los ecosistemas acuáticos

analizados en este trabajo. Los haplotipos se distribuyen en los clados del árbol filogenético de la siguiente manera: en el clado I se presentaron siete haplotipos, dos de estos coinciden en este trabajo. (Figura 25, punto verde y morado, Tabla 28). En el clado II se mostraron dos haplotipos, ninguno de estos se distribuye en los ecosistemas acuáticos de esta investigación (Figura 25). En el clado III se encontraron cuatro haplotipos, de los cuales uno se reportó en este estudio (Figura 25, punto amarillo, Tabla 28). Finalmente en el clado IV se presentaron siete haplotipos, tres de ellos se distribuyen en ecosistemas acuáticos de este estudio. Pero de estos tres haplotipos, uno es reportado por primera para Quintana Roo pues no coincide con ninguna de las secuencias registradas con anterioridad para el estado, este habita en el ecosistema acuático de “El secreto” (Figura 25, punto naranja, rojo y azul, Tabla 28).

En cuanto a los valores de diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π) estos se presentan en la Tabla 28. Los resultados presentaron tres escenarios: (1) ecosistemas

Sitio	H	n	sNCBI	Hd	π	¿Con quién es similar?	Tipo de ecosistema
LV, COR y							
PC	A	5	5	0.60	0.003	Quintana Roo, Florida	Dolinas
SCR	B	1	1	0.71	0.11	Campeche, Florida	Poza, laguna costera
MYL	C	1	6	0.21	0.002	Veracruz	Laguna costera, Poza
CHM	D	3	5	0.79	0.09	Chihuahua	Poza temporal
PL	E	1	3	0.12	0.007	Chihuahua, Italia	Poza, lago cárstico
CCD	F	1	3	0.63	0.004	Quintana Roo	Laguna costera

acuáticos con valores bajos de diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) como en Muyil y Punta Laguna. (2) valores altos de diversidad haplotípica (Hd) pero bajos de diversidad nucleotídica en ecosistemas acuáticos como (Leona Vicario, Corchalito, Parque del Cenote y Canal Cocodrilo. (3) Valores altos de diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π) como en los ecosistemas acuáticos de Chemuyil y El secreto

Tabla 28. Valores de la variabilidad genética para *L. bulla* de los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. Dónde: H= Haplotipo; n= número de secuencias de este trabajo; sNCBI= número de secuencias de otros trabajos que coincidieron con los haplotipos de este estudio; Hd= diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica.

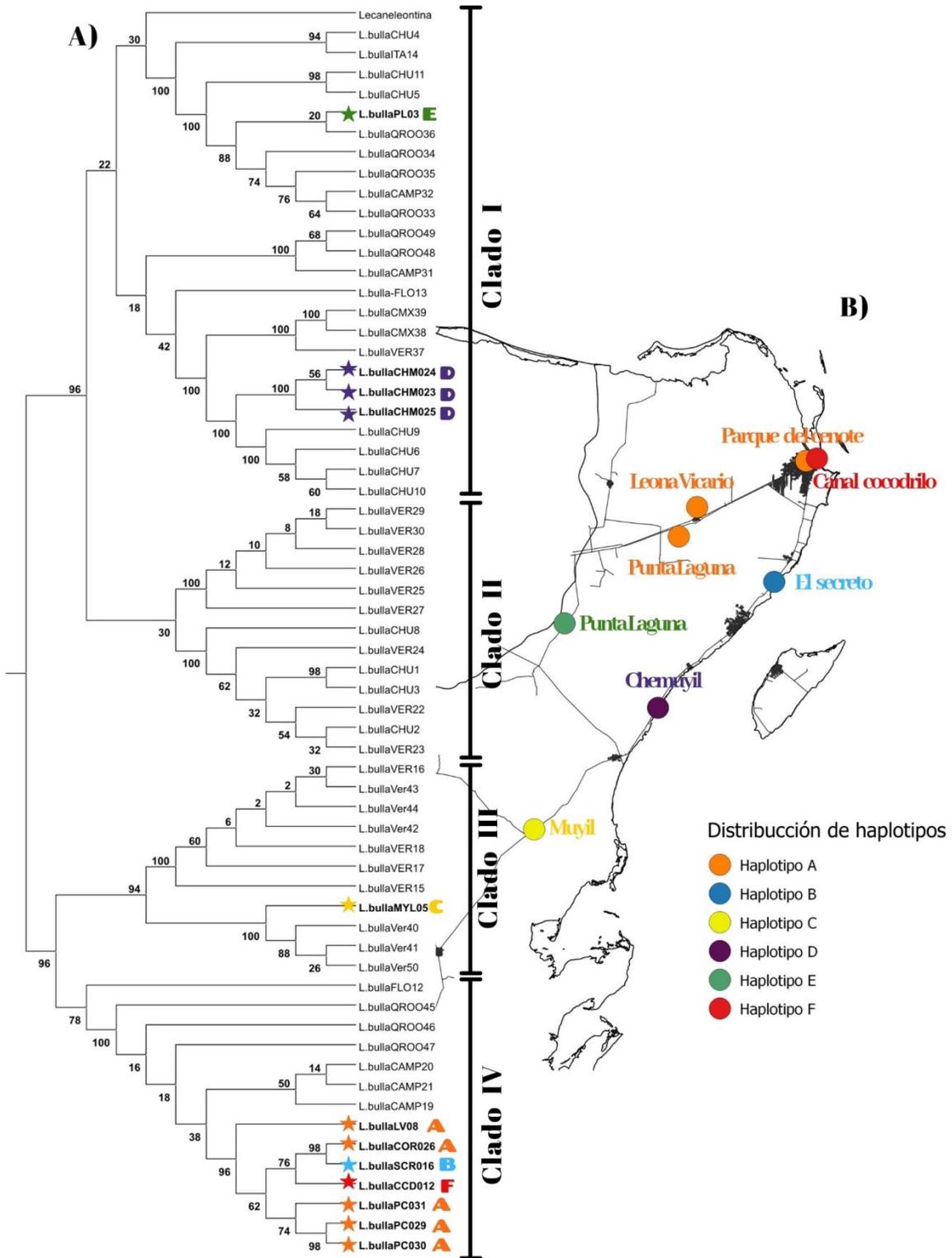


Figura 25. A) Reconstrucción de hipótesis filogenética usando el modelo Tamura-Kumar y el método Neighbor Joining con un bootstrap de 1000 repeticiones. B) Mapa de la distribución de los haplotipos de *L. bulla* en Quintana Roo. Los colores corresponden a cada haplotipo.

8.6 Determinación de aislamiento reproductivo en *Lecane bulla*

a) El corchalito (COR)

Se seleccionaron machos (♂) provenientes de las cepas de “El corchalito” los cuales fueron puestos con hembras (♀) de cepas de distintas localidades (Figura 26).

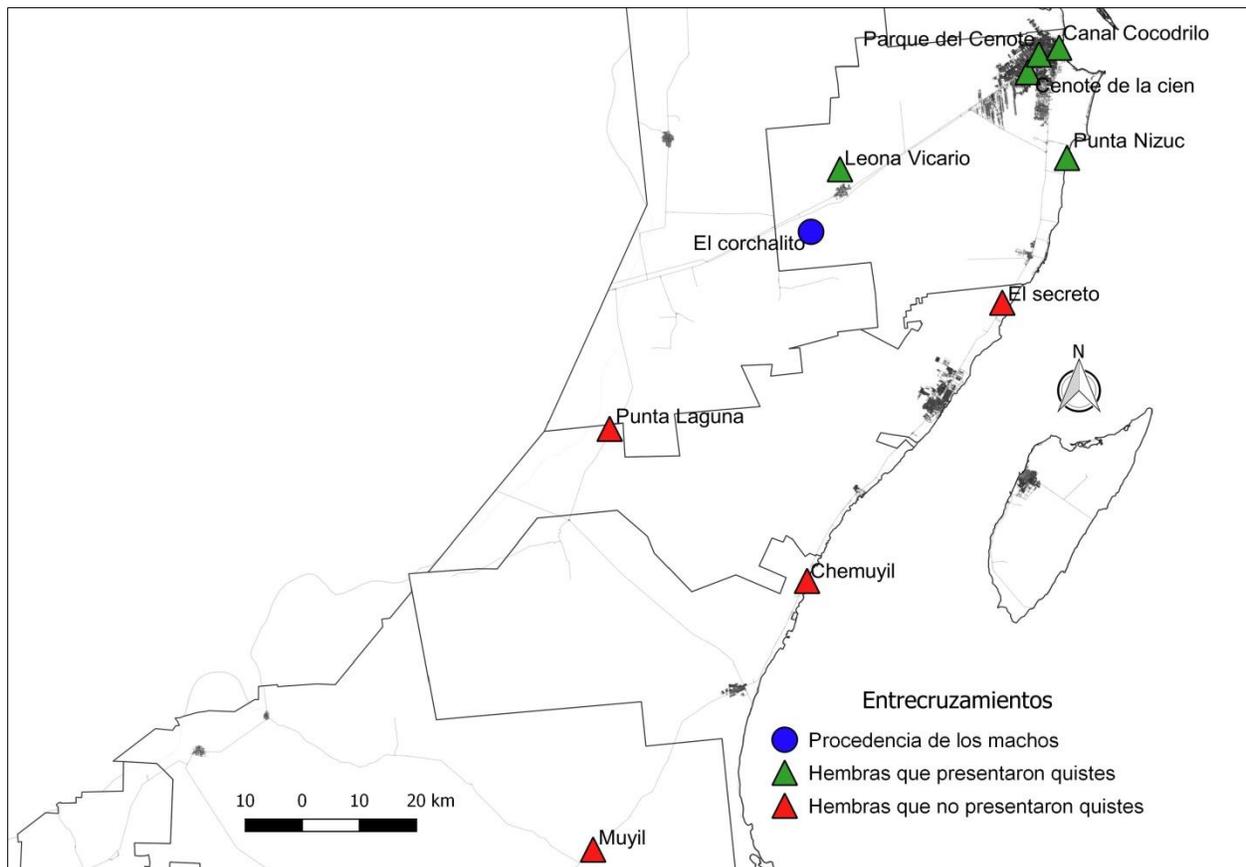


Figura 26. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de “El corchalito”

Los machos de COR fueron capaces de entrecruzarse exitosamente con hembras de Ccien, LV, PC, CCD y PN, ya que en esos casos las hembras presentaron la formación de quistes (Tabla 29). El porcentaje de fertilidad más alta se presentó en COR x LV con un 66%. Las hembras provenientes de SCR, MYL, PL y CHM no presentaron quistes en ningún caso. La distancia de aislamiento (ID) fue de 0.35 con un 21% de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) y 29% de heterogámicos (entre cepas), lo cual indicó que los machos pueden entrecruzarse con hembras de sus propias cepas y tener preferencia por las hembras otras localidades.

Tabla 29. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “El corchalito” puestos con otras hembras

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
COR x Ccien	132	66	32	48
COR x LV	48	24	16	66
COR x PC	50	25	11	44
COR x CCD	100	50	16	32
COR x SCR	100	50	0	0
COR x PN	50	25	5	20
COR x MYL	50	25	0	0
COR x PL	74	37	0	0
COR x CHM	88	44	0	0

b) Cenote de la cien (Ccien)

Se seleccionaron machos provenientes de cepas del “Cenote de la cien” (♂) que fueron colocados con hembras (♀) de cepas de diferentes ecosistemas acuáticos (Figura 27).

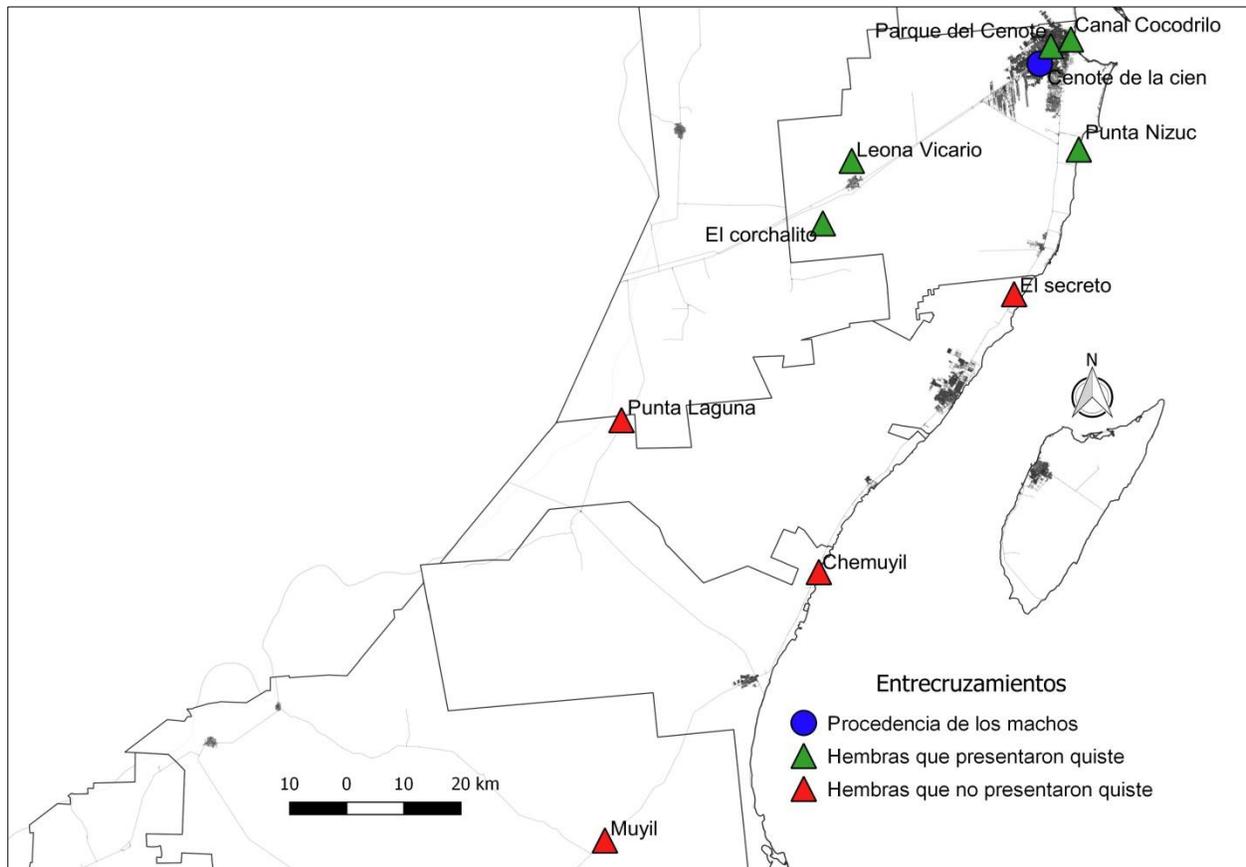


Figura 27. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de “El corchalito”

Se determinó que los machos de Cenote de la cien se entrecruzan positivamente con hembras de COR, LV, PC, CCD y PN, pues en todos se produjo la formación de quistes (Tabla 30). El porcentaje de fertilidad más alto se presentó en la combinación Ccien (♂) x PC (♀) donde de 91 hembras el 76% presentaron quistes. En las localidades SCR, MYL, PL y CHM no se presentaron quistes en ningún caso. La distancia de aislamiento (ID) calculada fue de 0.28 y se determinó que el 30% de apareamientos son homogámicos (dentro de la cepa) y 31% de heterogámicos (entre cepas). Los resultados indicaron que los machos del Cenote de la cien mantienen un equilibrio en los apareamientos entre hembras de su localidad y hembras de otros sitios.

Tabla 30. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Cenote de la cien” puestos con otras hembras

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
Ccien x COR	50	25	12	48
Ccien x LV	182	91	51	56
Ccien x PC	108	54	41	76
Ccien x SCR	100	50	0	0
Ccien x CCD	100	50	23	46
Ccien x PN	36	18	4	22
Ccien x MYL	54	27	0	0
Ccien x PL	50	25	0	0
Ccien x CHM	152	76	0	0

c) Leona Vicario (LV)

Los machos (♂) de las cepas provenientes de “Leona Vicario” se colocaron junto con hembras (♀) de cepas de otras localidades (Figura 28). Los resultados de la Tabla 31 indicaron producción de quistes en las hembras de COR, Ccien, PC, CCD y PN en presencia de machos de LV por lo cual son capaces de entrecruzarse. La fertilidad más alta entre los entrecruzamientos fue la reportada para la combinación entre LV (♂) x COR (♀) donde 76% de las hembras presentaron quistes. El cálculo de la distancia de aislamiento (ID) fue de 0.25. El porcentaje de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) y heterogámicos (entre cepas) fue de 31% y 37% respectivamente. No se reportaron quistes en SCR, MYL, PL y CHM. Los resultados indicaron que LV es capaz

de entrecruzarse exitosamente con hembras de su localidad y hacerlo con las hembras de otros sitios.

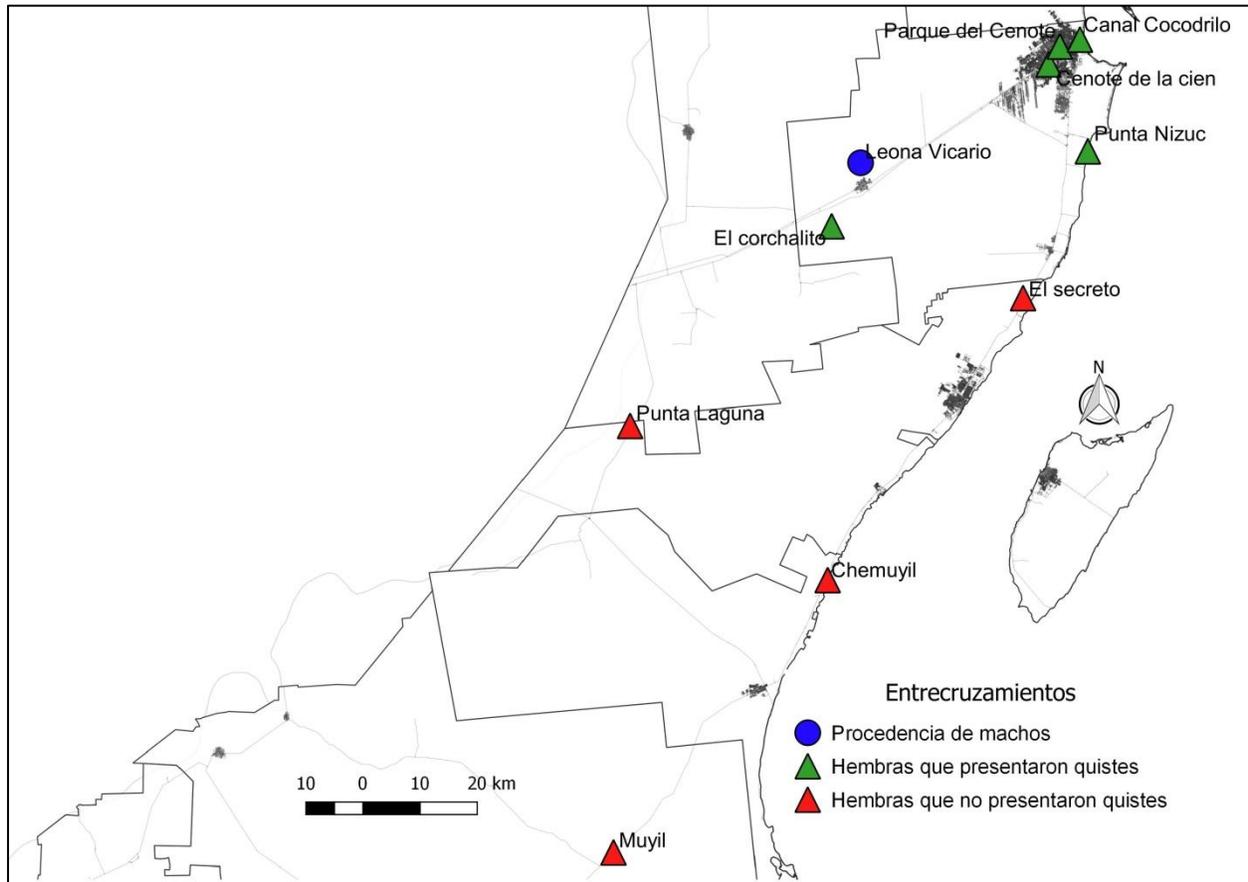


Figura 28. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de "Leona Vicario"

Tabla 31. Resultados de los entrecruzamientos con machos de "Leona Vicario" puestos con otras hembras.

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
LV x COR	152	76	58	76
LV x Ccien	56	28	16	57
LV x PC	376	188	115	61
LV x SCR	100	50	0	0
LV x CCD	100	50	17	34
LV x PN	66	33	8	24
LV x MYL	40	20	0	0
LV x PL	50	25	0	0
LV x CHM	194	97	0	0

d) Parque del cenote (PC)

Los machos (♂) de las cepas de este ecosistema acuático, se colocaron junto con hembras (♀) de cepas de distintas a las propias (Figura 29).

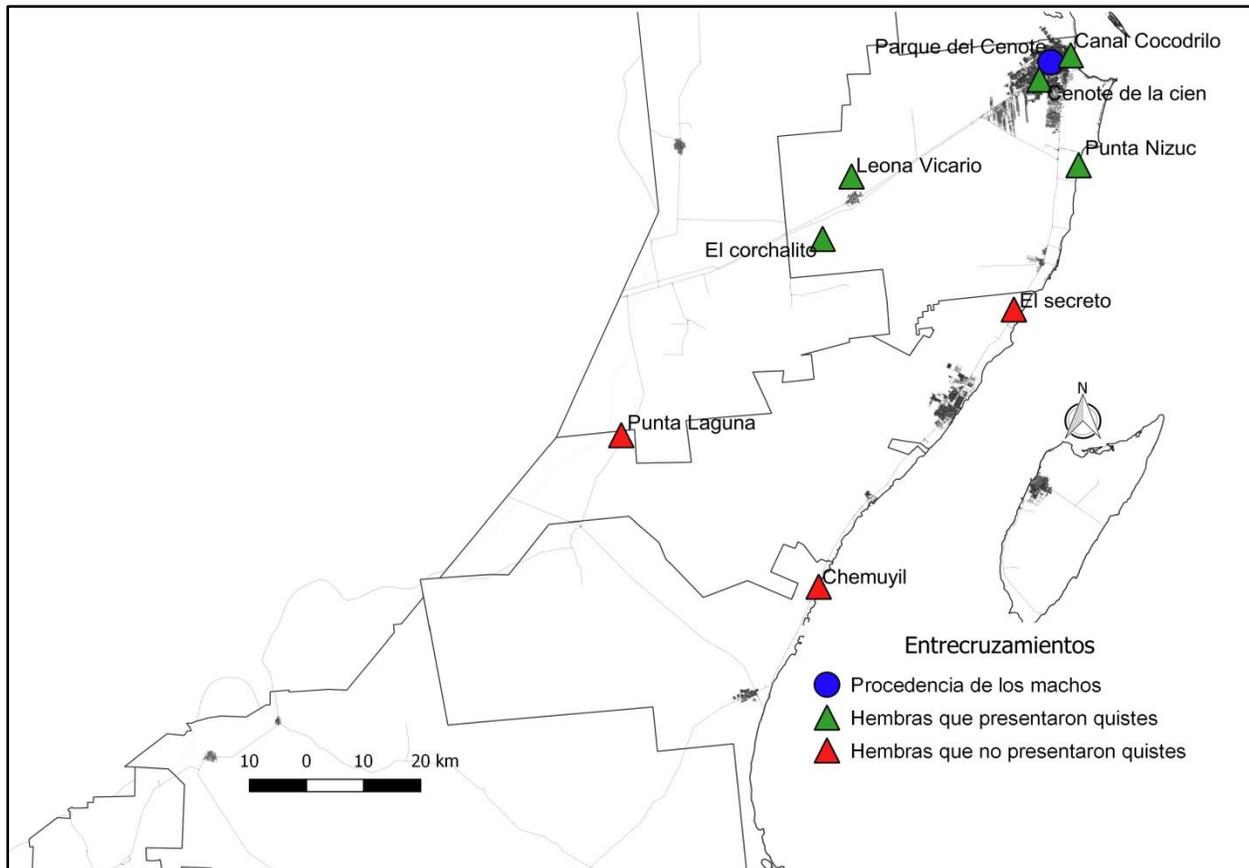


Figura 29. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de "Parque Cenote"

Los machos de PC pueden entrecruzarse con las hembras de las localidades de COR, Ccien, LV, CCD y PN, pues presentaron la formación de quistes. El entrecruzamiento realizado entre PC (♂) x Ccien (♀) presentó la fertilidad más elevada pues de 51 hembras 32 presentaron quistes es decir el 63% (Tabla 32). Los entrecruzamientos no exitosos fueron con las localidades SCR, PL y CHM pues no reportaron quistes. La distancia de aislamiento (ID) fue de 0.32 con 23% de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) y 28% heterogámicos (entre cepas). Los resultados indicaron que los machos del PC son capaces de entrecruzarse exitosamente con hembras de su localidad y hacerlo con las hembras de otros sitios.

Tabla 32. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Parque del cenote” puestos con otras hembras

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
PC x COR	120	60	28	47
PC x Ccien	102	51	32	63
PC x LV	78	39	18	46
PC x SCR	120	60	0	0
PC x CCD	120	60	25	42
PC x PN	50	25	8	32
PC x PL	100	50	0	0
PC x CHM	86	43	0	0

e) El Secreto (SCR)

Los machos (♂) del ecosistema acuático “El secreto” fueron seleccionados para ser puestos con hembras (♀) de cepas de distintas localidades (Figura 30).

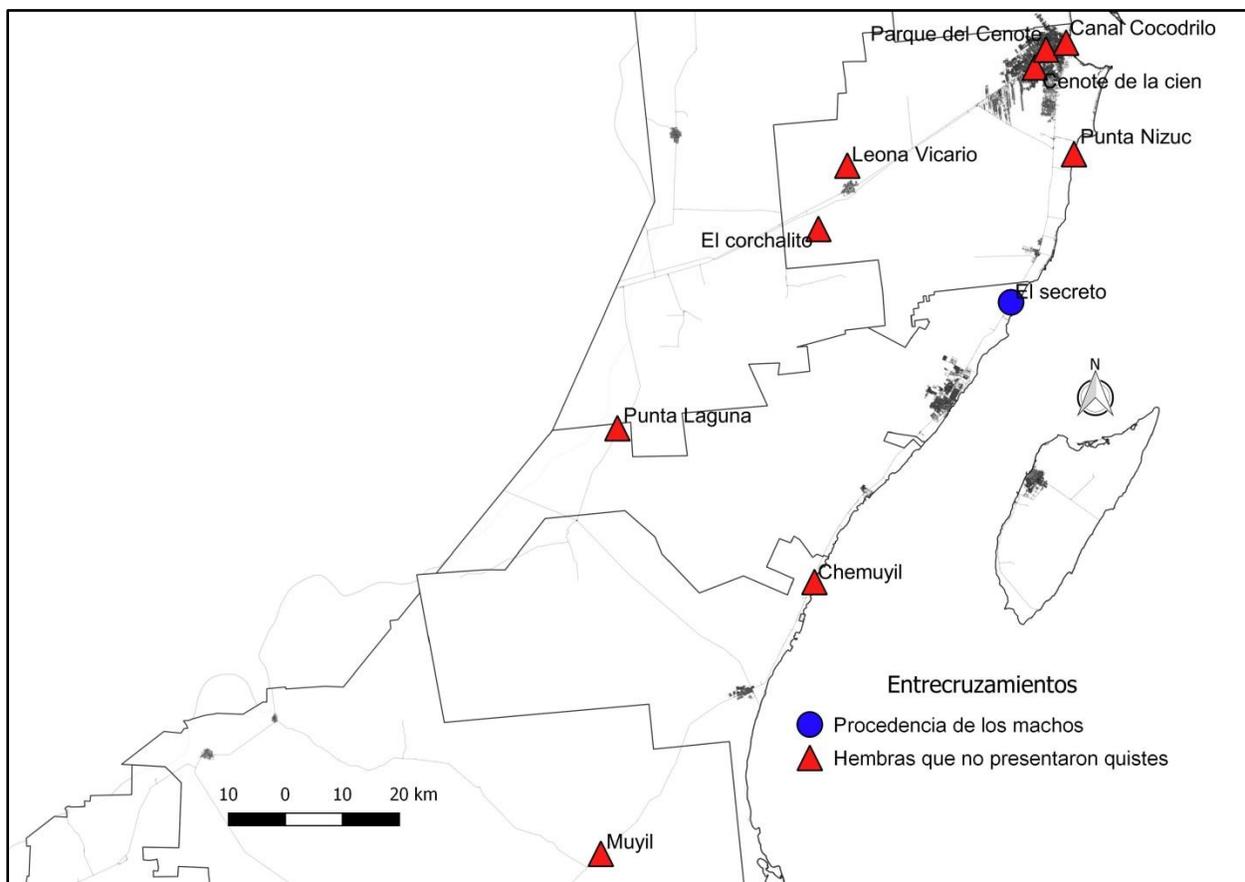


Figura 30. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de “El secreto”

Los resultados determinaron que los machos del SCR son incapaces de entrecruzarse, aparearse o reconocer a hembras de cualquier otro ecosistema acuático, pues en ninguno de los casos se reportó la formación de quistes (Tabla 33). Esto se reafirmó con el resultado del cálculo de la distancia de aislamiento (ID) que fue de 3.4, con 68% de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) y 0% heterogámicos (entre cepas). Estos resultados indican que los machos de la localidad del SCR prefieren exclusivamente a las hembras de su propio ecosistema.

Tabla 33. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “El secreto” puestos con otras hembras

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
SCR x COR	100	50	0	0
SCR x Ccien	60	30	0	0
SCR x LV	40	20	0	0
SCR x PC	56	28	0	0
SCR x CCD	50	25	0	0
SCR x PN	100	50	0	0
SCR x MYL	54	27	0	0
SCR x PL	70	35	0	0
SCR x CHM	44	22	0	0

f) Canal Cocodrilo (CCD)

En la Figura 31 se presentan las hembras (♀) de otros ecosistemas acuáticos que fueron puestas con los machos (♂) de Canal Cocodrilo. Los resultados indicaron que los machos de CCD pueden entrecruzarse exitosamente con hembras de las localidades de COR, Ccien, LV, PC y PN, pues en todos los caso se reportó la formación de quistes. La fertilidad más elevada correspondió al entrecruzamiento realizado entre CCD (♂) x PC (♀) pues de 52 hembras el 23 presentaron quistes lo que corresponde a 44% (Tabla 34). Los entrecruzamientos de SCR, MYL, PL y CHM no fueron exitosos, pues no reportaron quistes. La distancia de aislamiento (ID) fue de 0.42, con 13% de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) y 17% heterogámicos (entre cepas). Estos resultados indican que CCD puede entrecruzarse exitosamente con hembras de su localidad y hembras de otros sitios.

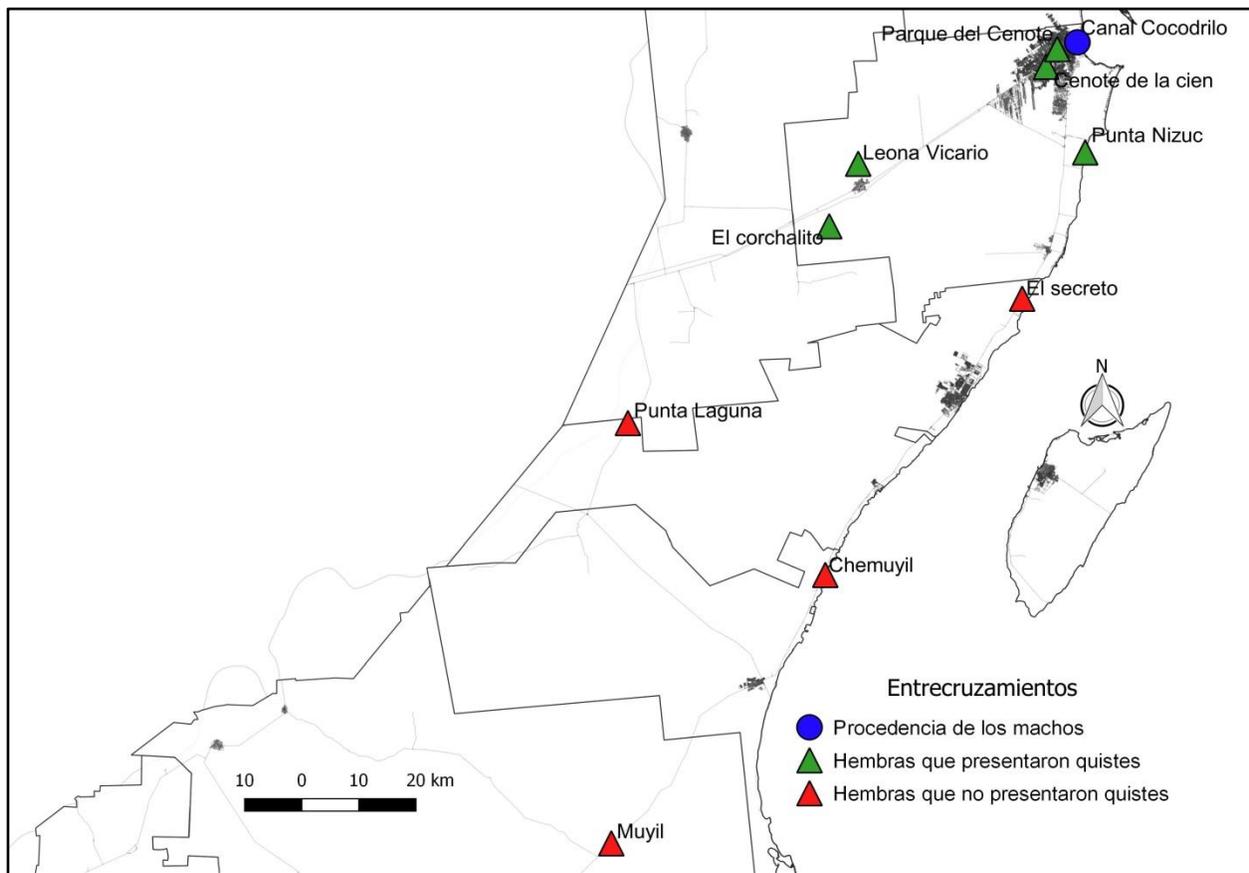


Figura 31. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de “Canal cocodrilo”

Tabla 34. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Canal Cocodrilo” puestos con otras hembras

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
CCD x COR	30	15	4	27
CCD x Ccien	42	22	9	41
CCD x LV	54	27	9	33
CCD x PC	104	52	23	44
CCD x SCR	76	38	0	0
CCD x PN	70	35	10	29
CCD x MYL	40	20	0	0
CCD x PL	78	39	0	0
CCD x CHM	120	60	0	0

g) Punta Nizuc (PN)

Los machos (♂) de Punta Nizuc seleccionados de las cepas de estos ecosistemas acuáticos fueron puestos con hembras (♀) diferentes a las propias (Figura 32).

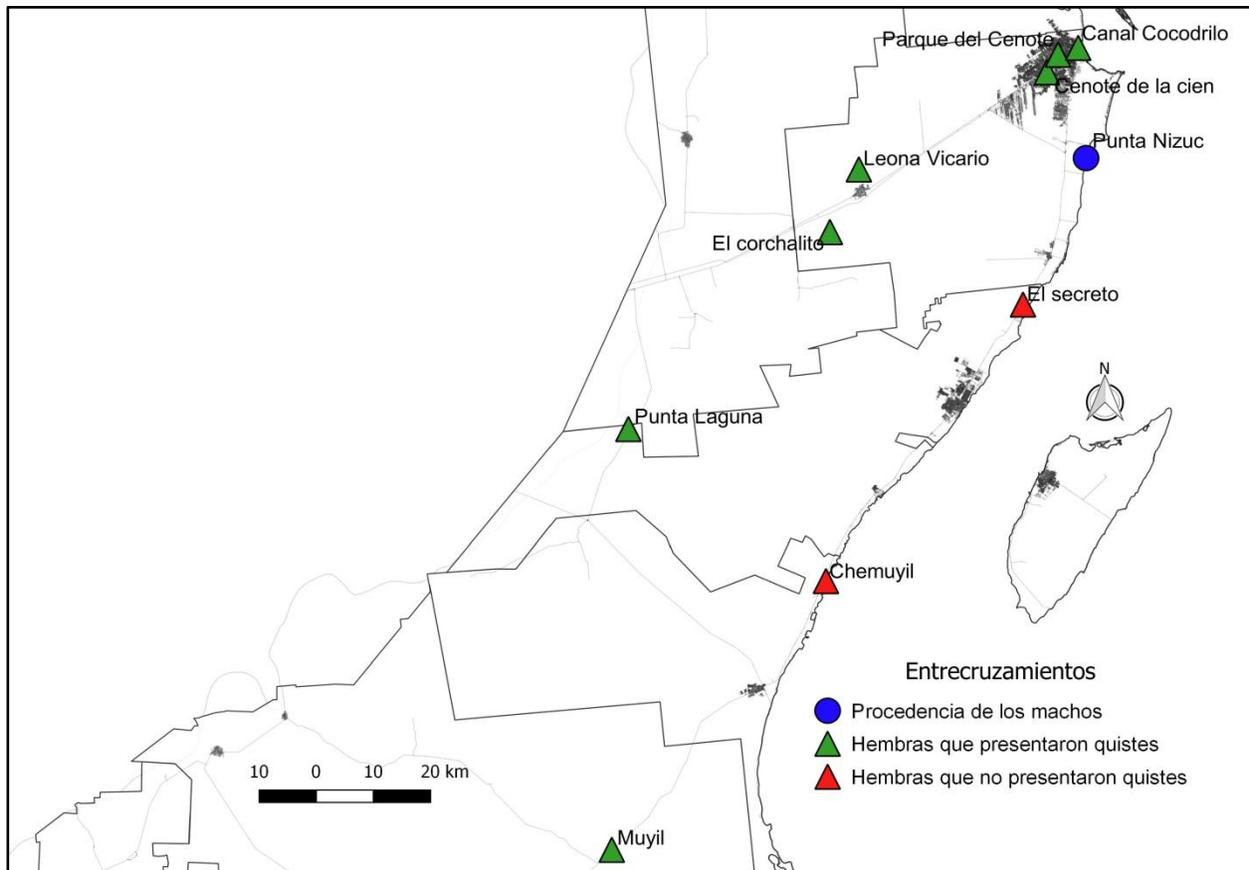


Figura 32. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de "Punta Nizuc"

Los resultados indicaron que los machos de PN son de los más exitosos para entrecruzarse. De las 10 localidades de este estudio en 8 lo lograron; se registró la formación de quistes con excepción de SCR y CHM. La fertilidad más elevada correspondió al entrecruzamiento realizado entre PN (♂) x MYL (♀) pues de 50 hembras 30 presentaron quistes lo que corresponde al 60% (Tabla 35). La distancia de aislamiento (ID) fue de 0.1, con 48% de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) y 45% heterogámicos (entre cepas). Estos resultados indican que PN puede entrecruzarse indistintamente con hembras de su localidad y hembras de otros sitios

Tabla 35. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Punta Nizuc” puestos con otras hembra

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
PN x COR	26	13	2	15
PN x Ccien	48	24	4	17
PN x LV	44	22	5	23
PN x PC	102	51	19	37
PN x SCR	108	54	0	0
PN x CCD	60	30	8	27
PN x MYL	100	50	30	60
PN x PL	44	22	13	59
PN x CHM	160	80	0	0

h) Muyil (MYL)

Se seleccionaron machos (♂) de las cepas provenientes de Muyil, los cuales fueron puestos con hembras (♀) de cepas de otros ecosistemas acuáticos (Figura 33).

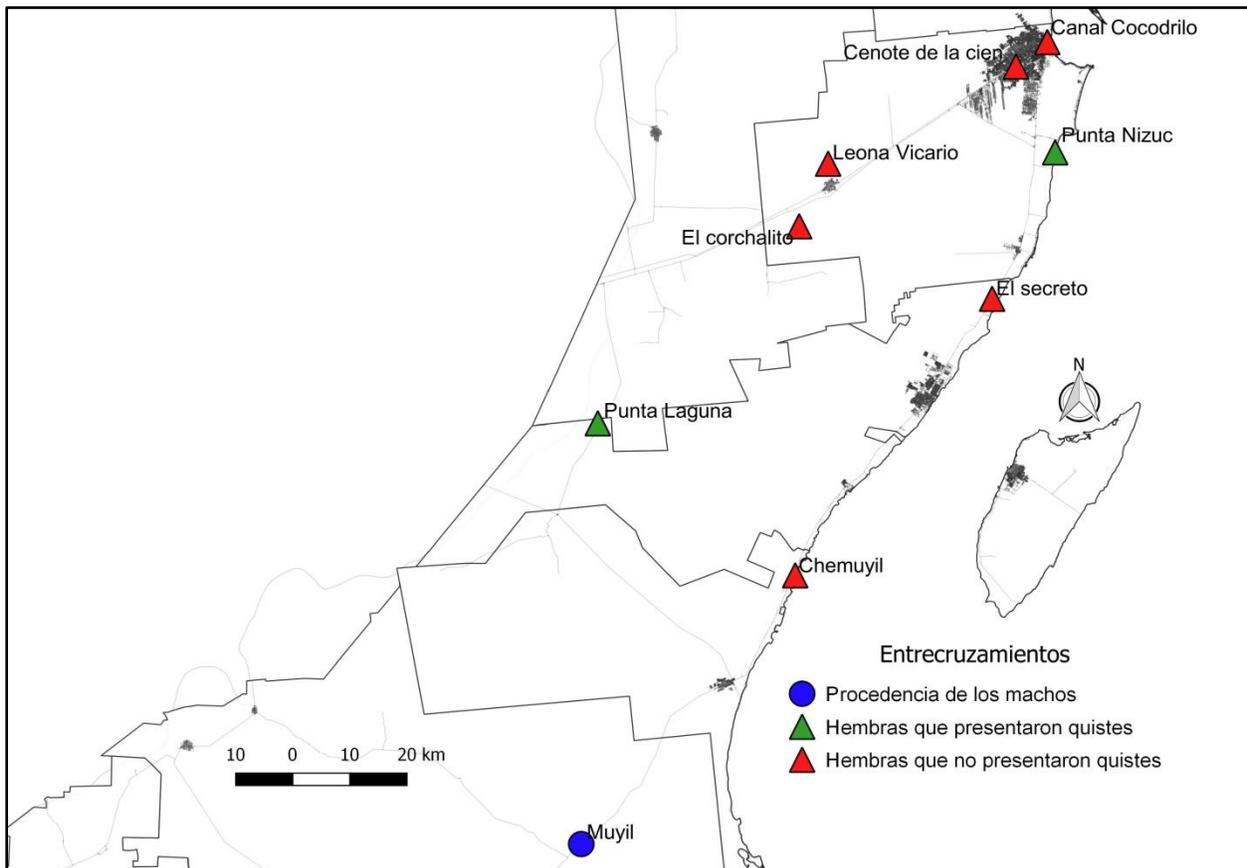


Figura 33. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de “Muyil”

Los resultados de los entrecruzamientos se presentan en la Tabla 36. Los machos de MYL solo pueden entrecruzarse con hembras de PN y PL. La fertilidad presentada fue de 63 y 66% para cada caso. En cuanto a los cálculos de la distancia de aislamiento (ID) esta fue de 3.4 y presento un 48% de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) y 19% heterogámicos (entre cepas). Estos resultados indican que MYL aunque puede entrecruzarse con hembras de cepas de otros sitios tiene preferencia por hembras de su misma cepa.

Tabla 36. Resultados de los entrecruzamientos con machos de "Muyil" puestos con otras hembra

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
MYL x COR	76	37	0	0
MYL x Ccien	60	30	0	0
MYL x LV	55	22	0	0
MYL x SCR	42	21	0	0
MYL x CCD	26	13	0	0
MYL x PN	48	24	15	63
MYL x PL	88	44	29	66
MYL x CHM	76	38	0	0

i) Punta Laguna (PL)

Los machos (♂) seleccionados provienen de cepas de Punta Laguna, mientras que las hembras (♀) fueron tomadas de cepas provenientes de ecosistemas acuáticos diferentes, los cuales se colocaron juntos (Figura 34). Los resultados demostraron que los machos de PL solo lograron entrecruzarse con hembras de PN y MYL exitosamente. La fertilidad más elevada fue de 76% en el entrecruzamiento entre PL (♂) x MYL (♀). La distancia de aislamiento (ID) calculada fue de 4.5 con apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) de 55% y apareamientos heterogámicos (entre cepas) de 10% (Tabla 37). Estos resultados indican que PL aunque puede entrecruzarse con hembras de cepas de otros sitios tiene preferencia por hembras de su misma cepa.

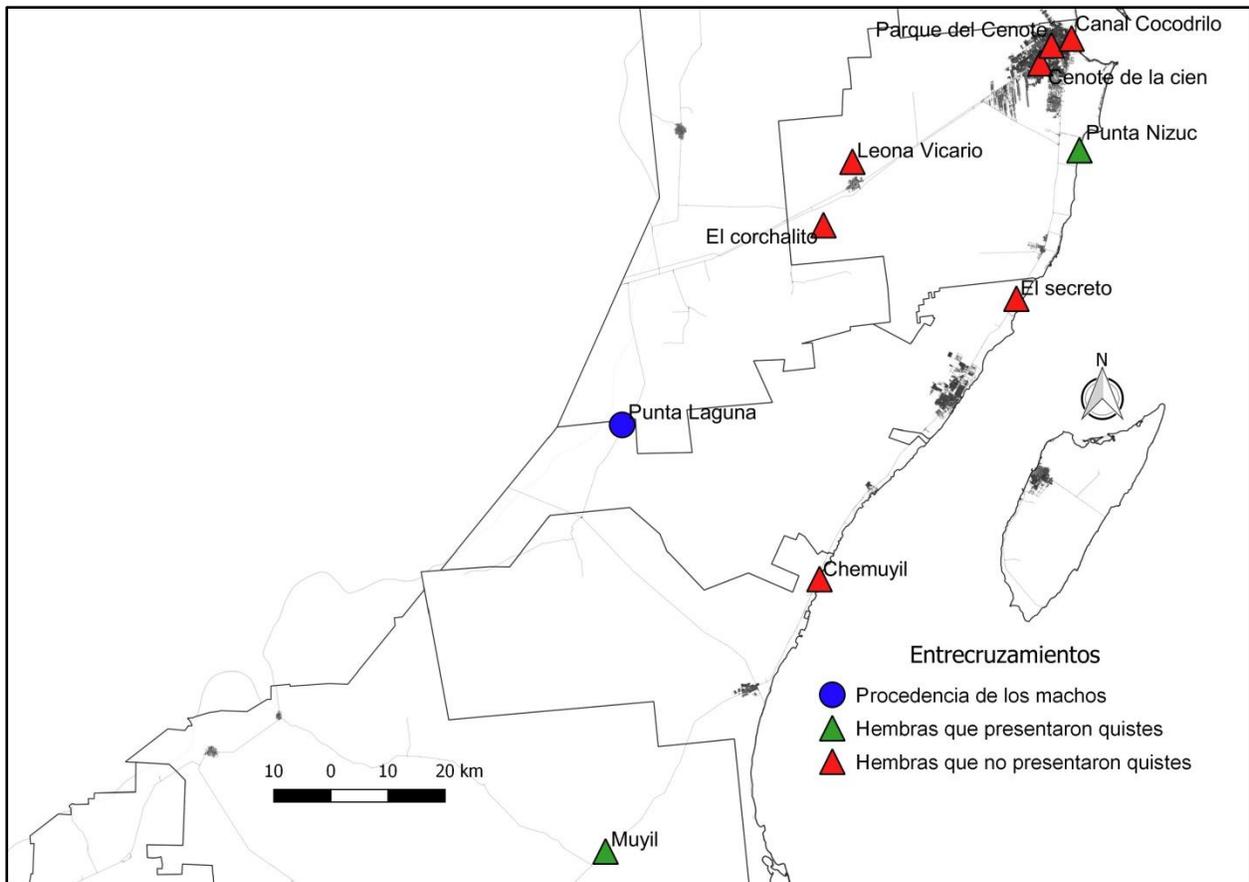


Figura 34. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de "Punta Laguna"

Tabla 37. Resultados de los entrecruzamientos con machos de "Punta Laguna" puestos con otras hembra

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
PL x COR	50	25	0	0
PL x Ccien	80	40	0	0
PL x LV	52	26	0	0
PL x PC	50	25	0	0
PL x SCR	70	35	0	0
PL x CCD	70	35	0	0
PL x PN	30	15	10	67
PL x MYL	50	25	19	76
PL x CHM	120	60	0	0

j) Chemuyil (MYL)

Los machos (♂) de la localidad de “Chemuyil” fueron seleccionados de cepas, los cuales se colocaron con hembras (♀) de cepas de distintas a la propia (Figura 35).

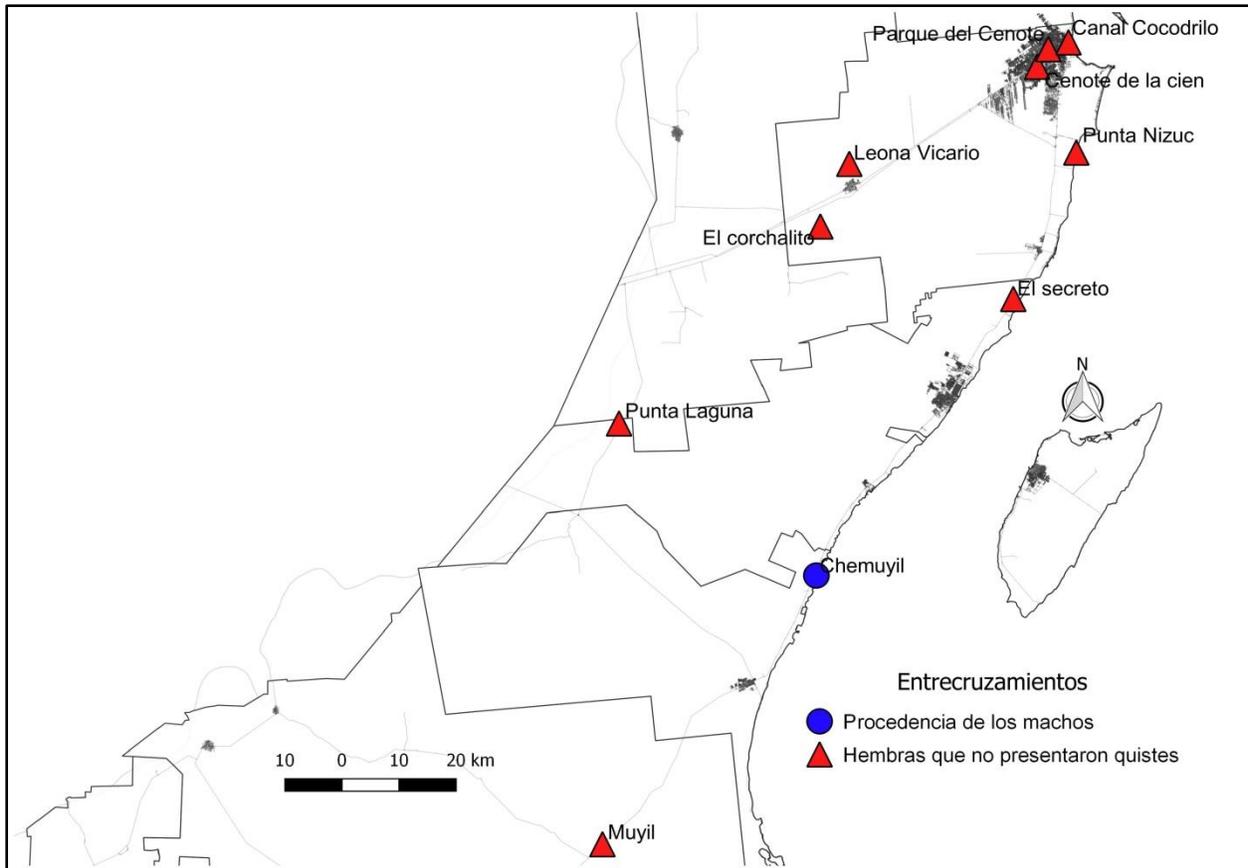


Figura 35. Mapa de entrecruzamientos realizados con machos (♂) de “Chemuyil”

Los resultados determinaron que los machos del CHM son incapaces de entrecruzarse, aparearse o reconocerse a hembras de cualquier otra localidad diferente a la suya, pues en ninguno de los casos se reportó la formación de quistes (Tabla 38). Esto se reafirmó con el resultado del cálculo de la distancia de aislamiento (ID) que fue de 4.5, con 78% de apareamientos homogámicos (dentro de la cepa) y 0% heterogámicos (entre cepas). Estos resultados indican que los machos de la localidad del CHM prefieren exclusivamente hembras de su localidad cepa.

Tabla 38. Resultados de los entrecruzamientos con machos de “Chemuyil” puestos con otras hembra

Cepas (♂ x ♀)	Número de ♂	Número de ♀	Quistes	% de fertilidad
CHM x COR	58	29	0	0
CHM x Ccien	72	36	0	0
CHM x LV	86	43	0	0
CHM x PC	102	51	0	0
CHM x SCR	100	50	0	0
CHM x CCD	100	50	0	0
CHM x PN	120	60	0	0
CHM x MYL	110	55	0	0
CHM x PL	98	49	0	0

Los resultados obtenidos de los experimentos de entrecruzamientos determinaron que en Quintana Roo el complejo *L. bulla* presenta aislamiento reproductivo, el cual se dividió en cuatro grupos reproductivamente diferentes (Figura 36) y se conforman de la siguiente manera:

El grupo uno se conformó por los organismos procedentes de cepas de: El corchalito, Cenote de la cien, Parque del Cenote, Leona Vicario y Canal Cocodrilo (Figura 36, círculo azul). Estos organismos pudieron entrecruzarse exitosamente entre ellos, reconocerse y producir quistes como resultado de su apareamiento. La distancia de aislamiento determinó que prefieren hembras de otros sitios (siempre dentro del mismo grupo) si se encuentran disponibles, lo cual se reflejó en porcentaje de apareamientos homogámicos el cual fue mayor (17 al 37%) que el heterogámico (13 al 30%). En estos ecosistemas acuáticos el morfotipo descrito corresponde al grande y en los cuales se reportaron el haplotipo A y F. Geográficamente estos ecosistemas se encuentran distribuidos en la zona norte del estado y se encuentran separados por una distancia de 46 km (el más lejano que es Leona Vicario).

El grupo dos se conformó de organismos provenientes de las cepas del ecosistema acuático de Punta Nizuc (Figura 36, cuadrado naranja). Los machos fueron capaces de entrecruzarse con hembras del grupo uno (descrito anteriormente) y grupo tres (a continuación) en las cuales se presentó quistes. La distancia de aislamiento fue 0.1 y el porcentaje de apareamientos homogámicos y heterogámicos presentaron valores

similares (48% y 45% respectivamente). Los resultados indicaron que los machos en Punta Nizuc no tuvieron preferencia entre las hembras de sus propia cepas y cepas de otra localidades. Punta Nizuc geográficamente se encuentra en la zona urbana de Cancún cercano al grupo uno pero a 146 km del grupo 3. Este grupo presentó el morfotipo pequeño.

El grupo tres se conformó de organismos provenientes de las cepas del ecosistema acuático de Muyil y Punta Laguna (Figura 36, triangulo amarillo). Estos organismos se entrecruzaron exitosamente entre ellos, lograron reconocerse y producir quistes como resultado de su apareamiento. Sin embargo, a diferencia del grupo uno y de acuerdo a sus resultados, si bien pueden entrecruzarse entre ellos muestran una preferencia por hembras de su propia cepa a hembras sobre las que puedan estar disponibles de otra localidad. Estas localidades se encuentran distanciadas geográficamente por 84 km; ambas presentaron el morfotipo pequeño y poseen el haplotipo C y E.

En el grupo cuatro de organismos provenientes de las cepas del ecosistema acuático de El secreto y Chemuyil (Figura 36, diamante morado). Ambas localidades presentaron el mismo comportamiento, son capaces de reproducirse con hembras de sus propias cepas pero no lograron hacerlo con hembras provenientes de cepas de las otras nueve localidades disponibles. La distancia de aislamiento de El Secreto (3.4) y Chemuyil (4.5) indicaron que se encuentran fuertemente aisladas del resto de las cepas de este estudio, pues solo pueden reconocer a las hembras de su propia población, lo cual se refleja en los altos valores del porcentaje de apareamientos homogámicos 68% y 78% (respectivamente) y su valor de cero para los heterogámicos. Ambos ecosistemas acuáticos son pozas temporales que geográficamente se encuentran distanciadas por 44 km. Para el caso de este grupo, aquí se presentaron el morfotipo grande (El secreto) y el morfotipo pequeño (Chemuyil) los cuales poseen el haplotipo B y D.

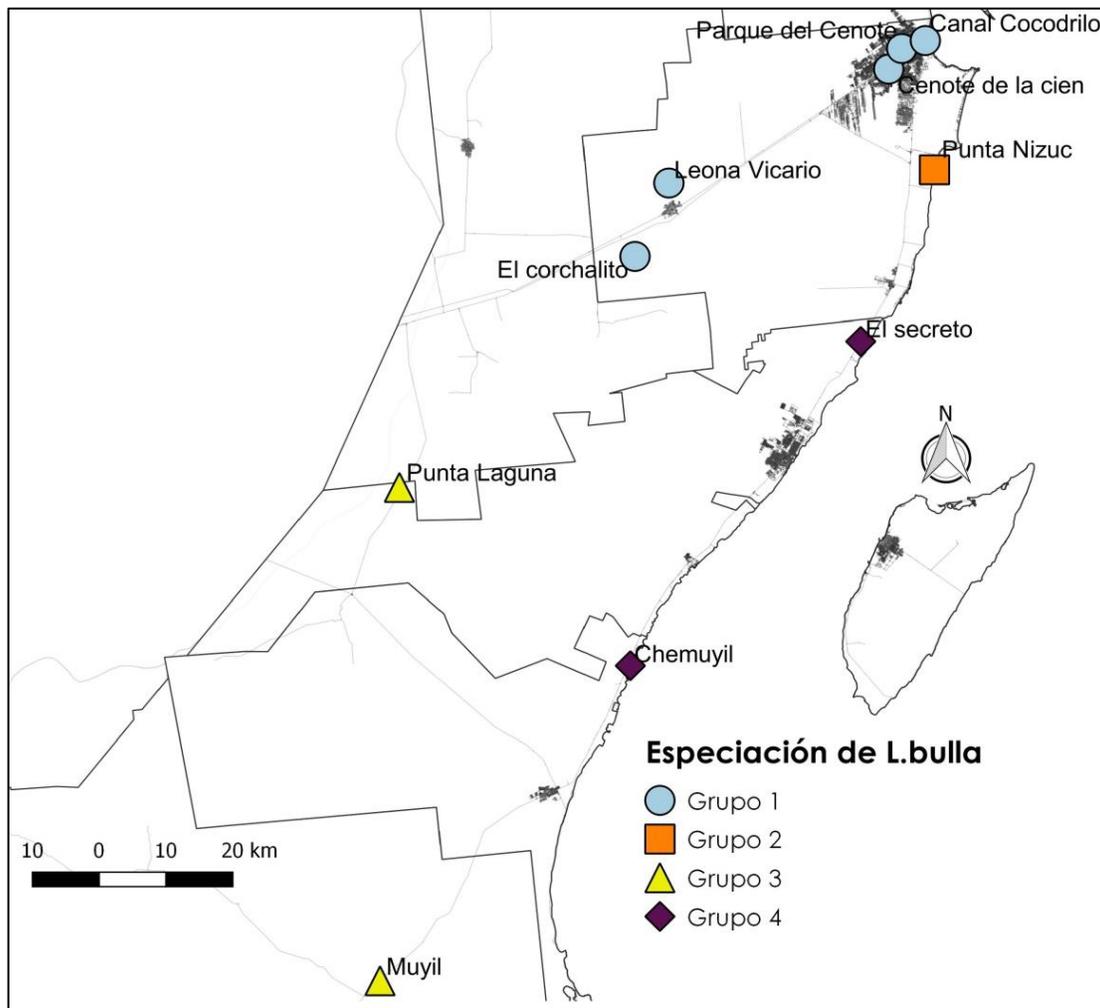


Figura 36. Representación del aislamiento reproductivo identificado en *L. bulla* que habita en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.

8.6.1 Observaciones adicionales

Durante los experimentos de apareamiento se reportaron comportamientos que no habían sido descritos con anterioridad para *L. bulla*, los cuales son multicopulas (Figura 37) y cuidado parental del huevo partenogenético (Figura 38). En las multicopulas se observó a más de un macho intentando copular a la misma hembra, estos machos no solo lo intentaron por la coyuntura de la placa ventral y dorsal, sino también por la corona ciliar (Figura 37). El cuidado parental observado corresponde a hembras cubriendo su huevo partenogenético con cúmulos de materia orgánica (Figura 38)



Figura 38. Multicopulas presentadas en *L. bulla*

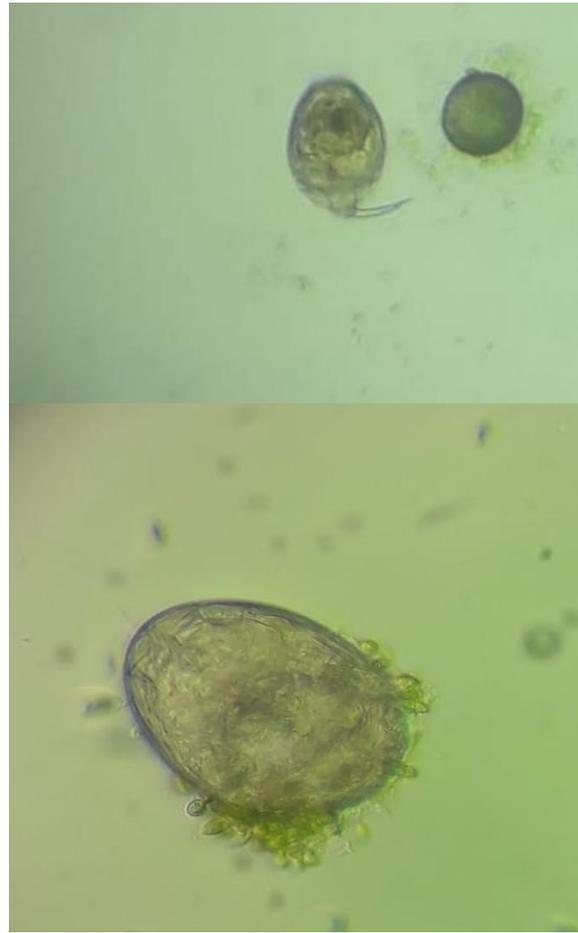


Figura 37. Cuidado parental de la hembra de *L. bulla* de un huevo partenogenético

8.7 Descripción de las características demográficas de *Lecane bulla*

Las hembras que habitan en los diferentes ecosistemas acuáticos de Quintana Roo mostraron diferencias estadísticamente significativas en sus características demográficas, con excepción del tiempo generacional (T). Se probaron las diferencias de los valores obtenidos, utilizando un análisis *post hoc* de Duncan con un $\alpha < 0.05$. El análisis determinó que las hembras de los ecosistemas acuáticos del COR, Ccien, LV, PC, SCR, CCD y PN son diferentes estadísticamente respecto a MYL, PL y CHM ($p < 0.01$) (Tabla 39).

Tabla 39. Parámetros demográficos para *L. bulla* en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo: Expectativa de vida (L; días), Tasa de crecimiento instantáneo (r), Tiempo de generación (T; días), Tasa reproductiva neta (R₀); número de descendientes machos durante su tiempo de vida (♂); valor de p (p).

	L	r	T	R ₀	♂
COR	8.2 ± 0.6	0.68 ± 0.2	4.0 ± 0.5	15.1 ± 0.1	10
Ccien	7.5 ± 0.1	0.68 ± 0.3	4.2 ± 0.1	15.5 ± 0.3	9
LV	7.3 ± 0.2	0.62 ± 0.1	4.0 ± 0.3	13.8 ± 0.6	8
PC	8.3 ± 1.0	0.69 ± 0.2	3.9 ± 0.1	15.6 ± 0.3	9
SCR	7.9 ± 0.5	0.67 ± 0.3	3.7 ± 0.4	14.6 ± 0.2	8
CCD	6.7 ± 0.1	0.62 ± 0.2	3.4 ± 0.1	13.4 ± 0.6	7
PN	4.8 ± 0.2	0.40 ± 0.1	4.7 ± 0.1	6.7 ± 0.1	4
MYL	11.5 ± 0.9	0.77 ± 0.6	5.4 ± 0.4	40.4 ± 0.1	4
PL	11.8 ± 0.9	0.78 ± 0.1	4.9 ± 0.4	48.2 ± 0.1	4
CHM	15.2 ± 0.8	0.82 ± 0.2	4.9 ± 0.8	56.5 ± 0.2	3
Valor p	0.01	0.01	0.71*	0.01	0.01

Se informa la media ± seguida por la desviación estándar para cada valor. Los parámetros demográficos son estadísticamente diferentes a p < 0.05, con la excepción de aquellos con un súper índice *, que no mostraron diferencias significativas.

En cuanto a la expectativa de vida (L; en días) las hembras del COR, Ccien, LV, PC, SCR, CCD y PN presentaron una expectativa de vida más corta (4.8 a 8.2 días) en comparación con las hembras de PL, MYL y CHM (11.5 a 15.2 días). Los valores reportados para la tasa intrínseca de crecimiento (r) fueron positivos, lo cual indicó que las hembras crecen y ese crecimiento es constante. Las hembras de COR, Ccien, LV, PC, SCR, CCD y PN presentaron valores de r que oscilaron entre 0.40 a 0.68 (PN presentó el valor más bajo) mientras que en MYL, PL y CHM fue de 0.77 a 0.82 (CHM presentó el valor más alto). El tiempo generacional (T) entendido como el tiempo que transcurrirá para que un individuo comience a producir descendencia, fue para las hembras de CCD (3.4 días) el más corto y el más largo de MYL (5.4 días) pero no hubieron diferencias significativas para considerar que estos varían (Tabla 38). En el caso de la tasa reproductiva neta (R₀) fue diferente al comparar COR, Ccien, LV, PC, SCR, CCD y PN con MYL, PL y CHM. En el primer grupo de hembras la tasa reproductiva fue más baja (6.7 a 15 descendientes) en comparación con las segundas, las cuales alcanzaron promedios de 40.4 a 56.5. Los machos estuvieron presentes en todas las localidades y el número total que puede llegar a producir una hembra a lo largo de su vida se presenta en la Tabla 39.

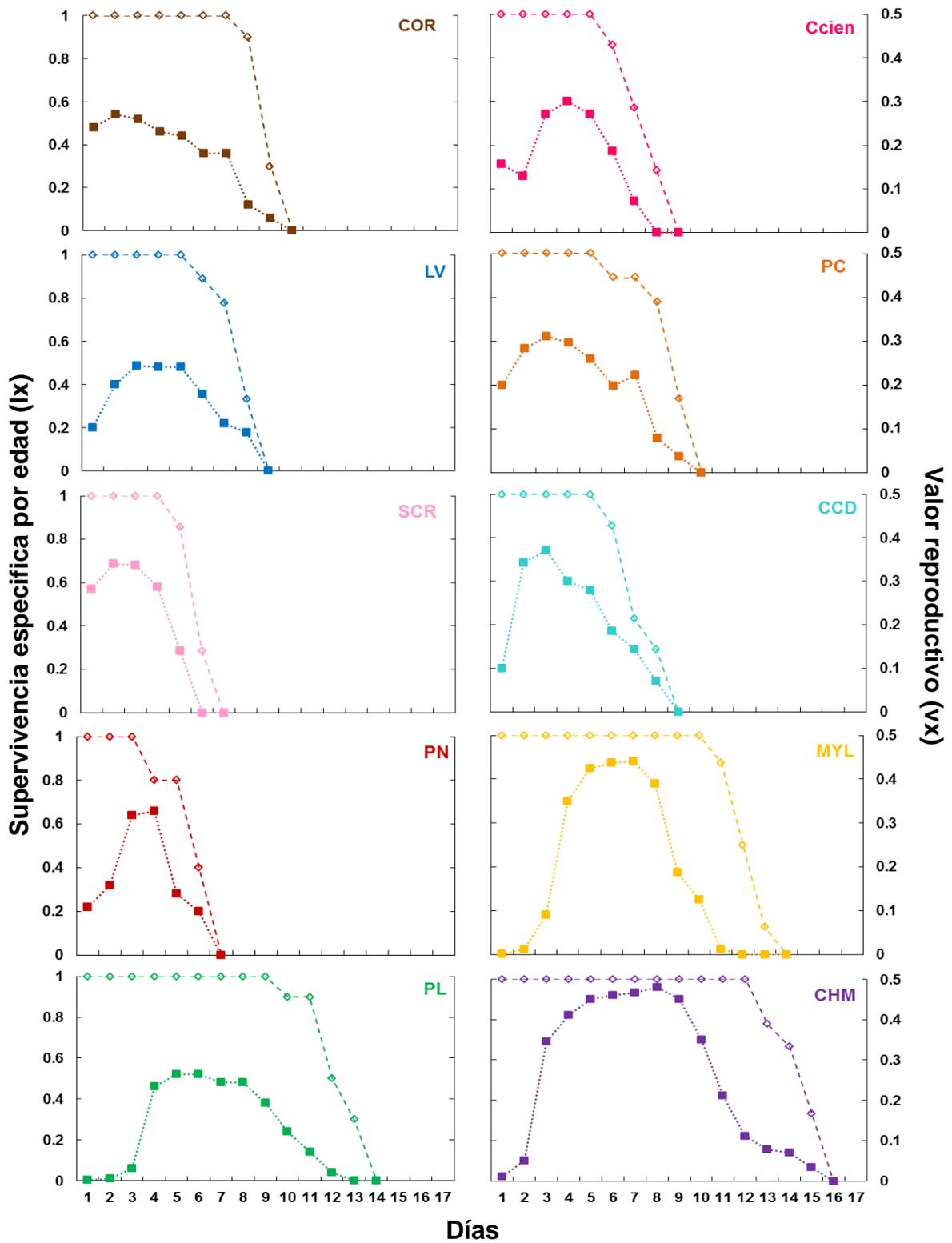


Figura 39. Supervivencia (diamante) y valor reproductivo (cuadrado) de *L. bulla* en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo.

La supervivencia específica por edad (l_x) y el valor reproductivo (v_x) dado a través de los días de vida de las hembras de *L. bulla* presentes en los ecosistemas acuáticos se presentan en la Figura 39. El comportamiento de ambos parámetros mostró diferencias entre las localidades de COR, Ccien, LV, PC, SCR, CCD y PN con respecto a MYL, PL y CHM. En el primer grupo de hembras se presentó la supervivencia más corta que comienza a descender rápidamente, con una curva de valor reproductivo que inició desde la eclosión de las hembras, con una producción de hasta 2.1 ± 0.1 de huevos partenogenéticos por día. Estas hembras continúan aportando valor reproductivo a la población a través del tiempo incluyendo el día de su muerte. El segundo grupo de hembras mostraron la supervivencia más larga que se mantiene a través del tiempo, su valor productivo inició entre el segundo y tercer día de nacimiento, los cuales presentan valores reproductivos de hasta 4.3 ± 0.3 huevos partenogenéticos por día, pero su producción se detiene dos días antes de su muerte.

Tabla 40 Porcentaje de huevos partenogenéticos (♀) y huevos de macho (♂) eclosionados después de 24 h. Producción media de huevos de resistencia (quistes).

Sitio	♀	♂	Quistes
COR	70%	77%	12.6 ± 1.6
Ccien	74%	78%	11.9 ± 1.1
LV	67%	75%	11.3 ± 2.1
PC	70%	80%	10.2 ± 0.5
SCR	74%	73%	9.3 ± 0.2
CCD	64%	69%	9.1 ± 0.1
PN	49%	51%	7.1 ± 0.6
MYL	25%	50%	4.7 ± 1.0
PL	50%	54%	4.0 ± 1.5
CHM	80%	55%	3.7 ± 0.1

Los huevos fueron colectados al azar de los cultivos. El número de pozos en todos los casos fue de 3 y cada pozo contenía 100 huevos. En el caso de los huevos de resistencia, corresponde al número total contado durante los experimentos de tasa de crecimiento intrínseca (r).

Los porcentajes de eclosión de los huevos partenogenéticos, huevos de macho y el promedio de producción de huevos de resistencia se muestran en la Tabla 40. Los huevos partenogenéticos de *L. bulla* se incubaron rápidamente y presentaron de manera general un buen éxito de eclosión con más del 50% de éxito, a excepción de las hembras de MYL donde menos solo el 25% lograron eclosionar. En cuanto a los huevos de machos, su

porcentaje de eclosión varió entre COR, Ccien, LV, PC, SCR y CCD con respecto a PN, MYL, PL y CHM, los primeros presentaron porcentajes más altos de eclosión comparado con los segundos donde solo el 50% de los machos llegaron a eclosionar. En cuanto a la producción de huevos de resistencia, la localidad que presentó mayor número de quistes fue COR (12.6 ± 1.6), mientras que CHM presentó el menor número con 3.7 ± 0.1 quistes en total.

Como se puede observar el complejo *L. bulla* en Quintana Roo presentó diferentes comportamientos que se ordenaron en dos grupos de localidades que corresponden a los ecosistemas acuáticos de COR, Ccien, LV, PC, SCR, CCD y PN en comparación con MYL, PL y CHM.

En el primer grupo se encuentran los cuatro tipos de ecosistemas acuáticos descritos en este estudio (dolina, poza temporal, laguna costera y laguna kárstica), donde *L. bulla* presentó una esperanza de vida corta, con un crecimiento intrínseco positivo, un tiempo generacional breve y un aporte a la tasa reproductiva neta con un menor número descendientes los cuales alcanzan la maduración sexual de forma acelerada, lo que les permite contribuir al valor reproductivo de su población desde el nacimiento. En estos ecosistemas el morfotipo predominante fue el grande a excepción de Punta Nizuc (morfotipo pequeño) con la presencia de cuatro haplotipos. Hubo éxito en su porcentaje de eclosión, tanto de huevos partenogenéticos como de machos y una alta producción de quistes.

En el segundo grupo se encontraron dos tipos de ecosistemas acuáticos de los descritos en este trabajo (laguna kárstica y poza temporal) donde *L. bulla* presentó una esperanza de vida larga, con un crecimiento intrínseco positivo, un tiempo generacional corto y un aporte a la tasa reproductiva neta alta con descendientes que alcanzan la maduración sexual después de los dos o tres días de nacer. En estos ecosistemas acuáticos *L. bulla* presentó el morfotipo pequeño con presencia de tres haplotipos diferentes. El éxito en su porcentaje de eclosión tanto de huevos partenogenéticos como de machos fue menos del 50% con una baja producción de quistes.

8.8 Descripción de especies

Toda la evidencia encontrada en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo, permite proponer dos nuevas especies nuevas para ciencia en el complejo de especies *Lecane bulla*, las cuales se describen a continuación:

Lecane ricomartinensis sp.nov

Tipo de localidad

Una poza temporal en la localidad Chemuyil, municipio de Tulum, México (20° 21' 55" N y 87° 19' 19"). Colectado el 22 de octubre de 2017.

Descripción morfológica y diagnóstico diferencial

Lecane ricomartinensis también pertenece al complejo de especies de *Lecane bulla*. Las hembras de esta especie son mucho más pequeñas que lo reportado (Segers 1995 y Koste, 2000). Longitud de la hembra 98-104 μm . Longitud del macho 75-81 μm . Ancho de la hembra 70-73 μm . Ancho del macho 41-55 μm . Longitud del pie en hembras 44-55 μm , en machos 16-18 μm . Tamaño del huevo de macho 51/48 μm (ancho/largo). Tamaño del huevo partenogénético 61/55 μm (ancho/largo). Tamaño del huevo de resistencia 59/62 μm (ancho/largo).

Esta especie se encuentra dentro del morfotipo pequeño de este estudio. Morfológicamente difiere en las uñas pues están nacidas directamente del dedo, el tamaño de los accesorios no superaron las 5 μm de largo. El dedo presentó un pliegue transversal (plt) completo, que lo atraviesa horizontalmente y que no se había reportado además, presenta una lorica fuertemente ornamentada.

Se diferencia además por su completo aislamiento reproductivo y sus valores en sus parámetros demográficos como altos porcentajes de eclosión, la expectativa de vida, la tasa de crecimiento instantáneo y la tasa reproductiva neta más larga, que no se reportaron en ninguna otra especie de este estudio.

Ecología y distribución

Esta especie se encontró la zona de manglar en Quintana Roo. El pH fue de 7.1, la temperatura fue de 27.1 C y la conductividad fue de 9.5 mS/cm.

Etimología

Esta especie lleva el nombre del Dr. Roberto Rico Martínez como homenaje a su amplia trayectoria estudiando en México a los rotíferos siendo el género *Lecane* el de su interés particular. El Dr. Roberto fue el primero en estudiar en México cepas de *Lecane bulla* incluidos machos y además planteó la hipótesis que se trataba de un complejo de especie crípticas.

Lecane mayaensis sp.nov

Tipo de localidad

Una poza temporal en la localidad El secreto, en el municipio de Solidaridad, México (20° 46' 55.9" N, 86° 57' 09" W). Colectado el 22 de octubre de 2017.

Descripción morfológica y diagnosis diferencial

Lecane mayaensis también pertenece al complejo de especies de *Lecane bulla*. Las hembras de esta especie son más grandes que lo reportado (Segers 1995 y Koste, 2000). La longitud de la hembra 120-130 µm. Longitud del macho 108-105 µm. Ancho de la hembra 84-87 µm. Ancho del macho 58-60 µm. Longitud del pie en hembras 52-65 µm, en machos 18-22 µm. Tamaño del huevo de macho 57/54 µm (ancho/largo). Tamaño del huevo partenogenético 77-72 µm (ancho/largo). Tamaño del huevo de resistencia 78/75 µm (ancho/largo). Esta especie se encuentra dentro del morfotipo grande de este estudio. Morfológicamente difiere porque las uñas presentan una muesca bien definida de las que nace el dedo, el tamaño de los accesorios superaron las 5 µm de largo. El dedo no cuenta con el transversal completo, presenta una lorica fuerte sin ornamentaciones. Se diferencia además por su completo aislamiento reproductivo y sus bajos valores en sus

parámetros demográficos de porcentaje de eclosión, expectativa de vida, la tasa de crecimiento instantáneo y la tasa reproductiva neta más corta.

Ecología y distribución

Esta especie se encontró la zona de manglar en Quintana Roo. El pH fue de 6.1, la temperatura fue de 30.5 C y la conductividad fue de 1.1 mS/cm.

Etimología

El nombre de la especie hace referencia al estado de Quintana Roo, el cual es referente de la cultura maya. Es un homenaje a la basta diversidad de especies del área y porque la mayoría de las poblaciones que representan a esta especie se encuentran en Quintana Roo.

9. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio cuyo objetivo es determinar la diversidad del complejo *Lecane bulla* en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo, mediante el uso de taxonomía integrativa, la cual considera el análisis morfológico, morfométrico, genético y parámetros demográficos. Lo anterior es importante, debido a que los ecosistemas acuáticos de la zona norte del estado no habían sido explorados con este objetivo.

Morfotipos de *Lecane bulla*

En el presente trabajo se realizó la identificación de los morfotipos del complejo *L. bulla* mediante el uso de morfometría geométrica y descripciones morfológicas. Con base en los resultados, se propone que para poder identificar morfotipos en el complejo *L. bulla*, se debe incluir en los análisis el tamaño corporal de hembras y machos, así como la identificación de estructuras del dedo, uñas y garras. Lo anterior debido a que los criterios propuestos por Segers (1995) y Koste (2000) que solo consideran la morfología de la apertura de la cabeza, la membrana pleural y la placa del pie, son insuficientes para diferenciar posibles morfotipos. El uso combinado de las medidas morfométricas con rasgos morfológicos han sido útiles para diferenciar morfotipos en otros complejos de especies de rotíferos como *Brachionus calyciflorus* (Mills *et al.*, 2017) *B. plicatilis* (Michaloudi *et al.*, 2018), *Testudinella clypeata* (Leasi *et al.*, 2013) o *Polyarthra dolichoptera* (Obertegger *et al.*, 2014).

La diferenciación morfológica no ocurre en todos los complejos de rotíferos, por lo cual no siempre es posible distinguir diferentes morfotipos. Por ese motivo es común que varios morfotipos se agrupen en una misma especie (Kordbacheh *et al.*, 2018). En el complejo *L. bulla* aislada de diferentes ecosistemas acuáticos en Quintana Roo este no es el caso, ya que se identificaron dos morfotipos. Lo anterior, no es poco, si se compara con el número de morfotipos identificados en otros complejos de rotíferos que son en promedio de dos a cuatro por complejo de especie (Schröder y Walsh, 2007; Mills *et al.*, 2016; Cieplinski *et al.*, 2017). Además, es importante mencionar que en este estudio se consideraron variables morfométricas a través del uso la morfometría geométrica, la cual

se ha propuesto recientemente como una herramienta para la determinación de morfotipos en rotíferos, pues es una técnica novedosa para investigar las diferencias de forma y tamaño que usualmente no son consideradas en los estudios morfológicos (Fontaneto, 2019).

Los ecosistemas acuáticos estudiados están localizados en un acuífero cárstico, en el cual las variables físico químicas son consideradas homogéneas (Schmitter Soto *et al.*, 2002) con excepción de la conductividad eléctrica, la cual se considera como la única variable que afecta la química del agua en el acuífero cárstico (Pérez *et al.*, 2011). También se sabe que la conductividad eléctrica en organismos del zooplancton como los ostrácodos, influye en su tamaño corporal, pues estos tienden a ser más grandes cuando los valores superan los 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Macario-González *et al.*, 2018). En el caso del complejo *L. bulla*, se observó que el morfotipo grande se distribuyó en ecosistemas acuáticos con valores de conductividad eléctrica en un rango de 0.2 a 1.3 mS/cm (200 a 1,300 $\mu\text{S}/\text{cm}$) y el morfotipo pequeño se distribuyó en aquellos con valores de conductividad eléctrica en un rango de 3.5 a 9.2 mS/cm (3,500 a 9,200 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Lo que sugiere que las diferencias observadas en el tamaño entre los morfotipos de *L. bulla* pueden ser atribuidas a la adaptación local inducida por las propiedades del agua de los ecosistemas acuáticos que habitan.

Los morfotipos identificados en este estudio provienen de diferentes tipos de ecosistemas acuáticos como dolinas, lagunas costeras, lagos cársticos y pozas temporales. Se observó que el morfotipo grande se distribuye en todos los tipos de ecosistemas acuáticos analizados en este trabajo, pero el morfotipo pequeño no se reportó en los ecosistemas acuáticos tipo dolina. Se sabe que los factores determinantes para el establecimiento de los rotíferos en los ecosistemas acuáticos son la temperatura, la conductividad eléctrica y el hábitat (Fontaneto, 2019). Sin embargo, cuando en un ecosistema acuático solo llega a dominar un morfotipo, se atribuye a fenómenos como la sucesión estacional (Loses, 2008). Este fenómeno se ha observado en el complejo *B. plicatilis* el cual presenta periodos de sucesión estacional alternativos entre morfotipos del mismo complejo, que pueden desplazar o permitir otros morfotipos en el mismo tipo de hábitat (Papakostas *et*

al., 2013). La ausencia del morfotipo pequeño en los ecosistemas acuáticos tipo dolinas en este estudio se puede atribuir a un periodo de sucesión estacional ocurrido durante el momento del muestreo.

Se sabe que en un mismo ecosistema acuático pueden coexistir diferentes morfotipos de rotíferos (Galbadón *et al.*, 2016), e incluso como lo mencionan Ortells *et al.*, (2003) en miembros del complejo de especies de *B. plicatilis* los diferentes patrones de sucesión estacional ayudan a explicar su coexistencia. Lo anterior es interesante ya que en el presente estudio, solo se encontró un morfotipo habitando por cada uno de los ecosistemas acuáticos estudiados. Esto podría explicarse por las siguientes limitantes del estudio: (1) El método de colecta utilizado puede no reflejar la totalidad de los morfotipos que se encuentran en el ecosistema, ya que se ha reportado que la inclusión de más puntos de muestreo dentro de la columna de agua o el incremento de estaciones en un mismo ecosistema incrementa el número de morfotipos identificados (Manickam *et al.*, 2019); (2) La estacionalidad del muestreo, el cual se llevó a cabo únicamente durante la temporada de lluvias, por lo cual se desconoce si existen más morfotipos que sean capaces de coexistir en otra temporada climática como secas o nortes, ya que otros estudios mencionan que la estacionalidad puede influir en la presencia de diferentes morfotipos (Fontaneto *et al.*, 2011).

Haplotipos de *Lecane bulla*

En este estudio se presenta el porcentaje de divergencia genética para la parte centro-norte del estado de Quintana Roo, la cual no había sido analizada hasta ahora. Los resultados indican que la divergencia genética del complejo *L. bulla* que habita en diferentes ecosistemas acuáticos en Quintana Roo tiene mayor variabilidad a lo reportado hasta el momento para el complejo. Si se comparan los resultados obtenidos por García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013) quienes analizaron 18 poblaciones provenientes de los estados de Veracruz, Campeche, Quintana Roo y Tabasco, quienes reportaron una divergencia genética media de 14.69% con los resultados de este trabajo que fue de 7.4% para 12 poblaciones, se observa que los de este estudio son superiores, pues tan solo

en la región norte del estado de Quintana Roo existe una mayor variabilidad que lo encontrado en cuatro estados del país incluida la zona sur de Quintana Roo.

Ahora bien, al analizar en conjunto todas las secuencias disponibles en el GenBank para *L. bulla*, se encontró que este complejo se divide en cuatro clados con una divergencia genética que va de 3.1 a 16%. Este número de clados difiere con el número de clados reportados por García-Morales y Elías-Gutiérrez (2013) que para la parte centro-sur del país fueron ocho y con los tres identificados por Walsh *et al.*, (2009) en 22 poblaciones de *L. bulla* la región norte de México en el desierto de Chihuahua. Si bien, el poder determinar cuántos clados componen el complejo de especies de *L. bulla* aún se requiere una investigación más exhaustiva, pues aún existen un sinnúmero de ecosistemas acuáticos por explorar en la Península de Yucatán (Aguilar *et al.*, 2016). Los resultados en este trabajo soportan la hipótesis que estos cuatro clados identificados pueden ser los principales dentro del complejo *L. bulla*. Estos cuatro clados además presentan una variación lo suficientemente alta para proponer la descripción de especies dentro del complejo *L. bulla* a su clasificación taxonómica actual (Segers 1995), como ha sucedido en otros complejos de especies como *Brachionus calyciflorus* (Papakostas *et al.*, 2016), *B. plicatilis* (Mills *et al.*, 2017), *Testudinella clypeata* (Leasi *et al.*, 2016) *Euchlanis dilatata* (Kordbacheh *et al.*, 2017) donde la divergencia genética encontrada osciló desde el 5 al 24% con la cual se propusieron nuevas especies dentro de estos complejos.

Aún se requieren más estudios para determinar los factores que han influido en la divergencia de estos clados, sin embargo, se ha sugerido que esta divergencia al menos en rotíferos como *Epiphanes senta* estudiados en ecosistemas acuáticos de Texas, Hawái y México, está impulsada principalmente por las condiciones ambientales, pues las regiones de este estudio disponen de ecosistemas acuáticos distintos que no comparten la misma historia geológica (Schröder y Walsh, 2010). En el complejo *L. bulla* distribuido en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo, esta idea se sustenta con valores de la variabilidad genética y la distribución de los haplotipos encontrados, los cuales indican que las poblaciones de *L. bulla* se han adaptado a las particularidades ambientales de cada ecosistema acuático que habitan por diferentes procesos los cuales

se encuentra relacionados con los valores en su diversidad haplotípica y nucleotídica (Campillo *et al.*, 2011). Las diferencias en estos valores se pueden agrupar en tres categorías: (1) valores de baja diversidad haplotípica y nucleotídica: esto sucede en las poblaciones cuando ocurren procesos de colonización reciente y un efecto fundador persistente (Avice, 2009), (2) diversidad haplotípica alta pero diversidad nucleotídica baja: pueden provenir de una población ancestral estable capaz de establecer un haplotipo que no varíe entre los miembros de la misma población (De Meester *et al.*, 2002), y (3) valores altos de diversidad haplotípica y nucleotídica: podrían indicar que la población se encuentra separada y aislada por diferentes mecanismos alopátricos y/o simpátricos (Piñero *et al.*, 2008).

Aislamiento reproductivo de *Lecane bulla*

El proceso de especiación en rotíferos generalmente se infiere a partir de las divergencias genéticas que resultan en un determinado número de haplotipos, no obstante, los estudios del aislamiento reproductivo casi no se realizan (Schröder y Walsh, 2007). Estos permiten determinar el flujo genético a través de la reproducción sexual entre rotíferos colectados en diferentes ecosistemas acuáticos (Schröder y Walsh, 2010). En este trabajo se presenta por primera ocasión para el complejo *L. bulla* información acerca del aislamiento reproductivo en cepas aisladas en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. De manera general estudiar el entrecruzamiento y el comportamiento sexual en rotíferos es complicado debido a la dificultad de lograr machos en condiciones experimentales (Alvarado-Flores *et al.*, 2017).

Se determinó que en Quintana Roo, el aislamiento reproductivo de *L. bulla* presenta dos escenarios. En el primero los organismos del complejo *L. bulla* presentan cierto grado de aislamiento reproductivo, ya que aún se presenta flujo genético entre organismos de diferentes ecosistemas acuáticos. En el segundo, los organismos del complejo *L. bulla* tienen total ausencia de flujo genético debido que no pueden producir huevos de resistencia y por lo cual se encuentran aislados reproductivamente del resto de organismos provenientes de diferentes ecosistemas acuáticos de este estudio.

En ambos escenarios, uno de los mecanismos que ha explicado la presencia o ausencia de flujo genético entre poblaciones es la preferencia y/o selección por una pareja correcta (Snell y Hawkinson, 1983). Se sabe que para lograr que un apareamiento sea exitoso deben de ocurrir dos cosas: (1) la hembra debe enviar una señal al macho de que ella es, de hecho, la especie correcta y que debe pasar su tiempo, energía y esperma apareando con ella, (2) el macho debe estar equipado para recibir, reconocer y responder a la señal de la hembra (Schörder y Walsh, 2010). Con base en lo anterior se puede explicar qué sucedió en los entrecruzamientos exitosos, ya que estos se dieron entre organismos del mismo morfotipo, es decir, los machos del morfotipo grandes pudieron copular exitosamente a las hembras del mismo morfotipo independientemente del ecosistema acuático del cual provenían, pero no lograban hacerlo con el morfotipo pequeño y viceversa. Con base en lo anterior, se puede sugerir que el primer mecanismo de especiación se asocia con la capacidad de los machos de *L. bulla* para poder de reconocer y copular a las hembras.

En cuanto a al primer escenario, donde las poblaciones de *L. bulla* aun presenten flujo genético, los resultados indican que la hipótesis del aislamiento geográfico como mecanismo de la especiación en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo no se cumple en su totalidad (Fontaneto *et al.*, 2011). Esto puede ser explicado porque los huevos de resistencia que poseen los rotíferos, pueden llegar a los ecosistemas acuáticos por diferentes mecanismos de dispersión como por ejemplo, pueden ser transportados por el viento (Walsh *et al.*, 2017). Una vez que llegan a los ecosistemas acuáticos se depositan en el sedimento y cuando las condiciones ambientales son adecuadas estos pueden “despertar” y actúan como reservorios o fuentes de diversidad genética y por lo cual han logrado colonizar diferentes tipos de ecosistemas acuáticos dentro de una región (Haag *et al.*, 2005). Otro proceso aunado que si bien no ha sido estudiado en rotíferos (hasta donde tenemos conocimiento), pero si en otros animales acuáticos como los peces es la conectividad hidrobiológica (Caballero-Vázquez y Vega-Cendejas, 2012). Se ha demostrado que los ecosistemas acuáticos con cierta conectividad permiten una mayor persistencia y resistencia de las especies y que los

ecosistemas actúan como un vivero en los cuales las especies pueden desplazarse y desarrollarse (Caballero-Vázquez y Vega-Cendejas, 2012). Por lo cual, la evidencia de flujo genético encontrada en este estudio, indica que los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo poseen aun una buena conectividad hidrobiológica, que aún debe de ser explorada en los ecosistemas acuáticos de la región.

En cuanto al segundo escenario, en el cual se identificó el grupo conformado por los organismos provenientes de las localidades El secreto y Chemuyil, en estos se presentó un completo aislamiento reproductivo derivado de su incapacidad de producir huevos de resistencia. Los resultados indican que es posible suponer que existe un aislamiento reproductivo en estos ecosistemas acuáticos en condiciones naturales, pues no presentaron huevos de resistencia en ninguna de las pruebas. Esto puede ser atribuido a mecanismos como la especialización ecológica (Tang *et al.*, 2012). Ambos ecosistemas acuáticos son pozas temporales, las cuales se sabe e son reservorios importantes de diversidad de especies inclusive endémicas (Biggs *et al.*, 2017) y en los rotíferos permiten el establecimiento de bancos o reservorios de huevos de resistencia (Walsh *et al.*, 2017). Es probable que los organismos colectados al momento del muestreo se deriven de este banco de huevos de resistencia presente en ambos sitios, los cuales eclosionaron y son por ende, completamente diferentes a los que habitan en otros ecosistemas acuáticos. Este resultado también puede asociarse al esfuerzo de muestreo en lugar de los patrones geográficos reales, pues se desconoce si en las pozas temporales el aislamiento reproductivo es más recurrente que en otro tipo de ecosistemas acuáticos.

Es importante mencionar que la ausencia o presencia de aislamiento reproductivo, puede ser un resultado no concluyente, porque los mecanismos de aislamiento que pueden existir en la naturaleza a menudo se rompen bajo condiciones experimentales (Meier y Willmann, 2000) y la posibilidad de entrecruzamiento no niega la posibilidad de que existan nuevas especies (Wheeler y Platnick, 2000b). Por ejemplo, *Brachionus ibericus* y el *B. almenara* (clado) que son miembros del complejo de *B. plicatilis* con una divergencia genética del 23%, forman huevos de resistencia viables en experimentos de entrecruzamiento sexual en laboratorio (Suatoni *et al.*, 2006). En poblaciones en

condiciones naturales de estos dos linajes, no se ha encontrado evidencia que la hibridación ocurra (Ortells *et al.*, 2000). Por lo tanto, tomando en cuenta los resultados de este estudio, no puede determinar si en los miembros del complejo *L. bulla* el aislamiento reproductivo ocurre de la misma manera que en condiciones de laboratorio.

Los resultados del estudio demostraron la presencia de multicópulas como uno de los comportamientos sexuales del complejo *L. bulla*. Se sabe que la multicópula es una estrategia empleada por las hembras para conseguir uno o más machos con el fin último de obtener descendencia (Sanz, 2013). Este comportamiento suele ocurrir con mayor frecuencia en especies donde uno de los sexos no es necesario después de apareamiento (Clutton-Brock, 1991). Considerando que *L. bulla* solo es capaz de producir un huevo de resistencia por hembra y al producirlo muere con este adentro, la hembra debe asegurar que su única oportunidad resulte exitosa, para garantizar su permanencia (Roff, 1992), por lo tanto, este comportamiento de multicopulas es común en rotíferos (Alvarado-Flores *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no había sido observado en el complejo de *L. bulla*. Adicionalmente, en el presente estudio se observó el cuidado parental del huevo. Este comportamiento ya había sido reportado con anterioridad por Schöder y Gilbert (2009) y se sabe que a mayor inversión de las hembras sobre sus descendientes, mayor será el éxito de permanencia en el ecosistema acuático (Sanz, 2013).

Características demográficas del complejo *Lecane bulla*

Existen pocos estudios sobre las características demográficas en *L. bulla* (Saucedo-Ríos *et al.*, 2017). Este trabajo es el primero en aportar información acerca de las características demográficas en cepas de *L. bulla* que habitan los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo. En el cual se demostró que *L. bulla* además de ser diferente genética y morfológicamente también difieren demográficamente.

Los estudios sobre las características demográficas realizados en miembros del zooplancton como los cladóceros, han demostrado una relación entre el tamaño corporal y los valores demográficos (Nandini *et al.*, 2007). Lo anterior sugiere que los valores obtenidos en el complejo *L. bulla* que habita en los ecosistemas acuáticos de Quintana

Roo se encuentran relacionados con el tamaño corporal, como sucede con otros miembros del género *Lecane* (Serranía-Soto *et al.*, 2011). En el caso de *L. bulla* de este estudio, se organizó en dos morfotipos. Por ejemplo, el morfotipo pequeño (90 a 110 μm de largo del cuerpo) vive más y tiene más descendencia que el morfotipo grande (120 a 130 μm de largo del cuerpo) sin embargo, en este último el valor reproductivo es mayor ya que aportan descendencia a partir de horas de eclosionar. Varios estudios han demostrado que el tamaño corporal en el género *Lecane* influye en las características demográficas (Serranía-Soto *et al.*, 2011). En especies de *Lecane* como *L. pyriformis*, *L. tenuiseta* y *L. cornuta* con medidas desde las 50-110 μm de longitud en el cuerpo, la expectativa de vida, valor reproductivo y tasa reproductiva neta son más altos en comparación con especies como *L. papuana* y *L. quadridentata* y *L. luna* con un tamaño corporal de entre 120-200 μm (Hummon y Bevelhymmer, 1979; Pérez-Legaspi *et al.*, 2010; Saucedo-Ríos *et al.*, 2017).

La tasa instantánea de crecimiento de la población (r) es otra variable importante contemplada en las características demográficas (Serranía-Soto *et al.*, 2011). Para la mayoría de las especies de rotíferos la r varía de 0.2 a 1.0 (Sarma *et al.*, 2017). En el presente trabajo, los valores r se encontraron dentro de este rango. A la fecha, no hay mucha información disponible sobre los valores r de las especies de *L. bulla* sin embargo nuestros resultados concuerdan con estudios realizados por Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 2001; Serranía *et al.*, 2011; Saucedo-Ríos *et al.*, 2017 para otros miembros del género *Lecane*.

En el presente estudio, los porcentajes en la eclosión de huevos fueron diferentes entre los morfotipos. La eclosión de huevos partenogenéticos ya ha sido reportado en diferentes complejos de especies (Galbadón *et al.*, 2015), pero en el caso de los machos, este porcentaje es poco conocido (Yin *et al.*, 2016). La eclosión de huevos de resistencia no fue determinada, ya que como se ha reportado con anterioridad, es muy difícil lograrlo en este género en particular (Segers, 1995) sin embargo, si se obtuvo la producción promedio de huevos de resistencia, la cual no había sido documentada para *L. bulla*. Se ha sugerido que el éxito de eclosión se encuentra directamente relacionado con el tamaño

del huevo, es decir, el desarrollo de organismos pequeños es más rápido que el de individuos grandes (Gillooly *et al.*, 2002). Sin embargo, los resultados del estudio indican que los huevos de macho y de hembra presentaron porcentajes de eclosión similares. La eclosión parece estar relacionada con otros factores como: similitud entre los haplotipos (Gabaldón *et al.*, 2015), características morfológicas incluyendo el tamaño del cuerpo (Ma *et al.*, 2010), la integridad de los huevos en la cáscara, el tamaño del embrión y el color de los huevos (García-Roger *et al.*, 2006) y principalmente a la expectativa de vida y supervivencia (Sarma *et al.*, 2017). Las hembras que presentaron ciclos de vida más corto presentaron los mejores porcentajes de eclosión y producción. Los resultados sugieren que esto se relacione con altas tasas de reproducción asexual, las cuales conducen al rápido crecimiento de la población y como consecuencia las hembras son capaces de producir gran cantidad de huevos partenogenéticos que eclosionan para permanecer en el ecosistema como mecanismo de compensación para estos periodos cortos de vida como se ha observado en rotíferos como *L. tenuiseta* y *L. pyriformis* (Hummon y Bevelhymer, 1979).

10. CONCLUSIONES

El uso de la taxonomía integrativa es una herramienta fundamental que aprovecha diferentes características complementarias para delimitar, describir e identificar especies.

En el presente trabajo fue posible determinar que la diversidad del complejo *L. bulla* estimada para Quintana Roo es posiblemente mucho más elevada que lo propuesto hasta el momento, pues en un número pequeño de poblaciones del rotífero en la región norte del estado, existen diferencias morfológicas y morfométricas que permitieron por primera vez para el complejo determinar que en este los organismos se dividen en dos morfotipos, grande (G) y pequeño (P). Lo anterior, es un hallazgo importante considerando que en muchos complejos de especies la diferenciación morfológica no ocurre con frecuencia. En el aspecto genético, este estudio demostró altos porcentajes de divergencia genética y de variabilidad haplotípica y nucleótida con un rango lo suficientemente alto para considerar la existencia de diferentes especies dentro del complejo *L. bulla*. Los resultados obtenidos mostraron que en el complejo *L. bulla* el flujo genético se encuentra condicionado por los ecosistemas acuáticos que habitan más que por mecanismos alopátricos o simpátricos. En el presente estudio, se comprobó que el complejo puede presentar diferencias demográficas, las cuales parecen estar relacionados con el tamaño del morfotipo. Como resultado del análisis de la taxonomía integrativa utilizada para estudiar el complejo *L. bulla* en ecosistemas del norte de Quintana Roo, se proponen dos nuevas especies dentro del complejo *L. bulla*: *Lecane ricomartinensis sp.nov* y *Lecane mayaensis sp.nov*. Este trabajo contribuye al conocimiento de la sistemática de un grupo taxonómicamente difícil y se espera sea un punto de comparación para el estudio de otros grupos cuya variación y diversificación refleja la diversidad de formas que habitan en la región sureste de México.

11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

En este trabajo se demuestra que la diversidad en los ecosistemas acuáticos de Quintana Roo pero también de otros ecosistemas, debe de ser analizada desde un enfoque taxonómico integrativo. Para comprender la diversidad que conforma los ecosistemas acuáticos no basta solo identificar la presencia de complejos de especies, sino que es necesario que los estudios futuros se enfoquen en la descripción las formas y tamaño de las especies que los conforman, en entender mejor los mecanismos involucrados en la especiación, la identificación de barreras reproductivas, la diferenciación en los comportamientos de apareamiento, la viabilidad de los híbridos, la variación genética. Para estudiar más a fondo la diferenciación de nichos ecológicos, deberían incluirse otras variables ambientales como la densidad de los alimentos, el tipo de alimentos y las competiciones en experimentos de tablas de vida entre especies y se debe explorar la base genética de la variación en la adaptación ecológica. Solo de esta manera se logrará comprender y cuantificar la diversidad, lo cual es imprescindible si se quiere poder explicarlo y en definitiva, conservarlo, porque quizás actualmente uno de los retos más desafiantes en la conservación de la biodiversidad global y la priorización del hábitat es la correcta y pronta identificación de las especies que habitan en los diferentes ecosistemas del mundo.

12. LITERATURA CITADA

- Aguilar, Y., Bautista, F., Mendoza, M.E., Frausto, O. y Ihl, T. (2016). Density of karst depressions in Yucatán state, Mexico. *Journal of Cave and Karst Studies*, 78 (2), pp. 51–60.
- Alvarado-Flores, J., Guerrero-Jiménez, G., Silva-Briano, M., Adabache-Ortíz, A., Delgado-Saucedo, J.J., Pérez-Yañez, D., Marín-Chan, A., DeGante-Flores, M., Arroyo-Castro, J.L., Kordbacheh, A., Walsh, E. y Rico-Martínez, R. (2017). Sexual reproductive biology of twelve species of rotifers in the genera: Brachionus, Cephalodella, Collotheca, Epiphanes, Filinia, Lecane, and Trichocerca. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 50(2), pp. 141-163.
- Arriaga-Cabrera, V., Aguilar-Sierra, L. y Alcocer, J. (2000). *Aguas continentales y diversidad biológica de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México.
- Awise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36, pp. 3–15.
- Bartout, P., Touchart, L., Terasmaa, J., Choffel, Q., Marzecova, A., Koff, T., Kapanen, G., Qsair, Z., Maleval, V., Millot, C., Saudubray, J. y Aldomany, M. (2015). A new approach to inventorying bodies of water, from local to global scale. *Journal of the Geographical Society of Berlin* 146, pp. 245–258.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram K.K. y Da, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22 (3), pp. 148-155
- Biggs, J., Fumetti, S. y Kelly-Quinn, M. (2017). The importance of small waterbodies for biodiversity and ecosystem services: implications for policy makers. *Hydrobiologia* 793, pp. 3-39.

- Birky, C.W. (2007). Workshop on barcoded DNA: application to rotifer phylogeny, evolution, and systematic. *Hydrobiologia*, 593, pp. 175-183.
- Butlin, R., Bridle J. y Schluter, D. (2009). *Speciation and patterns of diversity*. Cambridge University Press.
- Caballero-Vázquez, J.A. y Vega-Cendejas, M.E. (2012) Spatial patterns of diversity at local and regional scales in a tropical lagoon. *Neotropical Ichthyology*, 10 (1), pp. 99-108.
- Campillo, S., García-Roger, E.M., Carmona, M.J. y Serra, M., (2011). Local adaptation in rotifer populations. *Evolutionary Ecology* 25, pp. 933-947.
- Carrera, E. y De la Fuente, G. (2004). Inventario y clasificación de humedales en México. Parte 1. Ducks Unlimited de México A.C. (DUMAC), Monterrey, México.
- Cedeño-Vázquez, J.R. y Pérez-Rivera, S.D. (2010). El Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) en Laguna Esmeralda, Quintana Roo, México. *Revista Latinoamericana de Conservación* 1(2), pp. 91-98.
- Cervantes-Martínez, A. (2005). Análisis limnológicos de dos sistemas cársticos (cenotes) de la Península de Yucatán con énfasis en la variación espacial y temporal del zooplancton. Tesis de Doctoral. El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal, México. 171p.
- Cervantes-Martínez, A., Gutiérrez-Aguirre, M.A., Delgado Blas V. y Ruíz Ramírez, J. (2012). *Especies de zooplancton dulceacuícola de Cozumel*. México D.F. Universidad de Quintana Roo.
- Cervantes-Martínez, A., Gutiérrez-Aguirre, M.A., Elías-Gutiérrez M., Arce-Ibarra A.M., y García-Morales A.E. (2018). Biodiversidad acuática en cenotes de la Península de Yucatán (Quintana Roo, México). *Teoría y Praxis* 25 (1) pp. 49-68

- Cervantes-Martínez, A., Mazeta-Barrerra, M. y Gutiérrez-Aguirre, M.A. (2009). Limnología básica del lago cárstico turístico Cenote Azul en Quintana Roo, México. *Hidrobiológica* 19 (2), pp. 177-180.
- Challenger, A. y J. Soberón. (2008). *Los ecosistemas terrestres*. En: Capital Natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 87-108.
- Chapman, A.D. (2009). Numbers of living species in Australia and the world. 2nd ed.
- Chen J., Li Q., Kong, L.F. y Yu, H. (2011). How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: the case study of a poorly understood marine fauna. *PLoS ONE* (6).
- Cieplinski, A., Obertegger, U. y Weisse, T. (2018). Life history traits and demographic parameters in the *Keratella cochlearis* (Rotifera: Monogononta) species complex. *Hydrobiologia* 81, pp. 325–338.
- Cieplinski, A., Weisse, T. y Obertegger, U. (2017). High diversity in *Keratella cochlearis* (Rotifera, Monogononta): morphological and genetic evidence. *Hydrobiologia* 796, pp. 145-159.
- Clutton-Brock, T.H. (1991). *The evolution of parental care*. Princeton University Press, Princeton.
- Coyne, J.A. y Orr, H.A. (1997). Patterns of speciation in *Drosophila* revisited. *Evolution* 51, pp. 295–303.
- Curini-Galletti, M., Artois, T., Delogu, V. y De Smet, W.H. (2012). Patterns of diversity in soft-bodied meiofauna: Dispersal ability and body size matter. *PLoS ONE* 7 (3).
- De la Lanza, G. (1996). Diccionario de hidrología y ciencias afines. UNAM-Plaza y Valdés, México. 283 pp.

- De la Lanza-Espino, G. y García-Calderón, J.L. (1995). Lagos y presas de México. Editorial Centro de Ecología y Desarrollo, México. 320 pp.
- De Meester, L., Gómez A., Okamura B. y Schwenk K. (2002). The monopolization hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica* 23, pp. 121-135.
- Denekamp N.Y., Suga K., Hagiwara A., Reinhardt R. y Lubzens, E. (2010) *A Role for Molecular Studies in Unveiling the Pathways for Formation of Rotifer Resting Eggs and Their Survival During Dormancy*. En: Lubzens E., Cerda J., Clark M. (eds) *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*. Topics in Current Genetics, 21. Springer, Berlin, Heidelberg
- Dumont, H. J. (1983). Biogeography of rotifer. *Hydrobiologia* 104, pp. 19-30.
- Elías-Gutiérrez, M. y García-Morales, A.E. (2011). *Rotíferos*. En: Riqueza Biológica de Quintana Roo. Un análisis para su conservación, Tomo II (Eds.): Pozo, C., Armijo-Canto, N. y Calmé, S. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), pp. 100-103.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5), pp. 294-299.
- Fontaneto, D. (2014). Molecular phylogenies as a tool to understand diversity in rotifers. *International Review of Hydrobiology* 99, pp. 178–187.
- Fontaneto, D. (2019). Long-distance passive dispersal in microscopic aquatic animals. *Movement Ecology* 7 (10), pp. 1-10.
- Fontaneto, D., Herniou, E.A., Barraclough T.G. y C. Ricci. (2007). On the global distribution of microscopic animals: new worldwide data on bdelloid rotifers. *Zootaxa* 46(3), pp. 336-346.

- Fontaneto, D., Melone, G. y Cardini, A. (2004). Shape diversity in the trophi of different species of Rotaria (Rotifera, Bdelloidea): A geometric morphometric study. *Italian Journal of Zoology*, 71(1), pp. 63-72.
- Fontaneto, D., Melone, G. y Ricci, C. (2005). Connectivity and nestedness of the meta-community structure of moss dwelling bdelloid rotifers along a stream. *Hydrobiologia* 542, pp.131- 136.
- Fontaneto D., Westberg M., y Hortal, J. (2011). Evidence of Weak Habitat Specialisation in Microscopic Animals. *PLoS ONE* 6(8).
- Fu, Y., Hirayama, K. y Natsukari, Y. (1991) Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 151, pp. 29–41.
- Gabaldón, C., Fontaneto, D., Carmona, M.J., Montero-Pau, J. y Serra, M.S. (2017). Ecological differentiation in cryptic rotifer species: what we can learn from the *Brachionus plicatilis* complex. *Hydrobiologia* 796, pp. 7–18.
- Gabaldón, C., Serra, M., Carmona, M.J. y Montero-Pau, J. (2015). Life-history traits, abiotic environment and coexistence: the case of two cryptic rotifer species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 465, pp. 142-152.
- Gamarra, B., Romero, A., Pérez-Pérez, A. y Galbany, J. (2011). Caracterización morfológica del M2 de primates hominoidea a partir de análisis de Fourier. *Revista argentina de antropología biológica* 13 (1), pp. 24-41.
- García-Frapolli, E., Ramos-Fernández, G., Galicia, E. y Serrano, A. (2009). The complex reality of biodiversity conservation through natural protected area policy: three cases from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Land Use Policy* 26, pp. 715–722.

- García-Morales A.E. y Elías-Gutiérrez, M. (2004). Rotifer from southeastern Mexico, new records and comments on zoogeography. *Series Zoology* 75, pp. 99-120.
- García-Morales, A.E. y Elías-Gutiérrez, M. (2013). DNA barcoding freshwater Rotifera of Mexico: Evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecology Resources* 13, pp. 1097–1107.
- García-Roger, E., Carmona, M.J. y Serra, M. (2006). Patterns in rotifer diapausing egg banks: Density and viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2, pp. 198-210.
- Gaston, K.J. (1996). *Biodiversity-congruence*. *Progress in Physical Geography* 20, pp. 105–112.
- Ge, Y.L., Xi, Y.L., Ma, J. y Xu, D.D. (2012). rDNA ITS sequences among morphotypes of *Keratella cochlearis*, *Keratella quadrata*, *Brachionus forficula* (Rotifera). *Genetics and Molecular Research* 11 (1), pp. 765-774.
- Gilbert, J.J. y Walsh, E.J. (2005). *Brachionus calyciflorus* is a Species Complex: Mating Behavior and Genetic Differentiation Among Four Geographically Isolated Strains. *Hydrobiologia* 546: pp. 257–265.
- Gillooly, J.F., Charnov, E.L., West G.B., Savage V.M., y Brown J.H. (2002). Effects of size and temperature on developmental time. *NATURE* 417: pp. 70-73.
- Gunz, P., Mitteroecker, P. y Bookstein, F.L. (2005). *Semilandmarks in three Dimensions*. En: Slice, D.E (ed.). *Modern morphometrics in physical anthropology*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp. 73-98.
- Haag, C.R., Riek, M., Hottinger, J. W., Pajunen, V.I. y Ebert, D. (2005). Genetic diversity and genetic differentiation in *Daphnia* metapopulations with subpopulations of known age. *Genetics* 170, pp. 1809–1820.

- Hajibabaei, M., Waard, J.R., Ivanova, N.V *et al.* (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B–Biological Sciences* 360, pp. 1959–1967.
- Hanson, S. J., Claus-Peter, S., Welch, D.B y Logsdon, J.M. (2013). Comparative transcriptome analysis of obligately asexual and cyclically sexual rotifers reveals genes with putative functions in sexual reproduction, dormancy, and asexual egg production. *Genomics* 14 (412), pp. 1-17.
- Hebert, P.D., Witt, J. y Adamowicz, S.J. (2003). Phylogeographical patterning in *Daphnia ambigua*: Regional divergence and intercontinental cohesion. *Limnology and Oceanography* 48 (1), pp. 261-268.
- Herrera-Silveira, J.A. y Comín, F.A. (2000). *An Introductory account of the types of aquatic ecosystems of Yucatan Peninsula*. En: Munawar M., Lawrence, S.G., Munawar, I.F. y Malley, D.F. (eds.): *Ecovision World Monographs Series. Aquatic Ecosystems of Mexico: Status y Scope*. Backhuys Pub. Leiden, Netherlands.
- Herrera-Silveira, J.A., Comín, F.A., Aranda-Cirerol, N., Troccoli, L. y Capurro, L. (2004). Coastal Waters Quality Assessment in the Yucatan Peninsula: Management Implications. *Ocean & Coastal Management* 47, pp. 625-639.
- Hodell, D.A., Kamenov, G.D., Hathorne, E.C., Zachos J.C., Röhl, U. y Westerhold, T. (2007). Variations in the strontium isotope composition of seawater during the Paleocene and early Eocene from ODP Leg 208 (Walvis Ridge). *Geochemistry Geophysics Geosystems* 8, pp. 1-15.
- Hogg, I.D. y Hebert, P.D. (2004). Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82, pp. 749-754.

- Hummon W.D y Bevelhimer D.P. (1979). Life table demography of the rotifer *Lecane tenuiseta* under culture conditions, and various age distribution. *Hydrobiologia* 70, pp. 25-28
- Jersabek, C.D. (1998). Dicranophoridae (Rotifera) from the Alps. *Hydrobiologia* 387/388, pp. 63–77.
- Kellogg, E. y Shaffer, B. (1993). Model organism in evolutionary studies. *Systematic Biology* 42 (4), pp. 409-414.
- Kordbacheh, A., Garbalena, G. y Walsh, E.J. (2017). Population structure and cryptic species in the cosmopolitan rotifer *Euchlanis dilatata*. *Zoological Journal of the Linnean Society* 181, pp. 757–777.
- Kordbacheh, A., Shapiro N.S. y Walsh, E.J. (2019). Reproductive isolation, morphological and ecological differentiation among cryptic species of *Euchlanis dilatata*, with the description of four new species. *Hydrobiologia* pp. 1-22.
- Kordbacheh, A., Wallacel, R.L. y Walsh, E.J. (2018). Evidence supporting cryptic species within two sessile microinvertebrates, *Limnias melicerta* and *L. ceratophylli* (Rotifera, Gnesiotrocha). *PLoS ONE* 13(10).
- Koste, W. (1978). Rotatoria. Die Radertiere Mitteleuropas. Borjtraeger, Berlin, Germany. 673p.
- Koste, W. (2000). Study of the Rotatoria-Fauna of the Littoral of the Rio Branco, South of Boa Vista, Northern Brazil. *International Review of Hydrobiology* 85 (4), pp. 433-469.
- David Lagomasino, D., Price R.M., Herrera-Silveira, J., Miralles-Wilhelm, F., Merediz-Alonso, G. y Gómez-Hernández, Y. (2015). Connecting Groundwater and Surface Water Sources in Groundwater Dependent Coastal Wetlands and Estuaries: Sian

- Ka'an Biosphere Reserve, Quintana Roo, Mexico. *Estuaries and Coasts* 38, pp. 1744–1763.
- Leasi, F., Tang, C.Q., De Smet, W.H. y Fontaneto, D. (2013). Cryptic diversity with wide salinity tolerance in the putative euryhaline *Testudinella clypeata* (Rotifera, Monogononta). *Zoological Journal of the Linnean Society* 168, pp. 17–28.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J., Zuccarello, G. y Clerck, O. (2014). DNA-based species delimitation in algae. *British Phycological Society* 49 (2), pp. 179-196.
- Li, L., Niu C. y Ma, R. (2010). Rapid temporal succession identified by COI of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas in Xihai Pond, Beijing, China, in relation to ecological traits. *Journal of Plankton Research* 32, pp. 951–959.
- Librado, P. y Rozas, J., (2009). DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, pp.1451-1452.
- Llaguno, O., Alcolcer, Y., V., Rodríguez J., Albornoz, P. y Cortez P. (2014). Estudio geohidrológico y de escorrentía para la prevención de inundaciones en zonas aledañas a la Laguna del Manatí. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, calve interna HC1453.3, Jiutepec, Morelos.
- Llaguno, O., Rodríguez-Varela, J.M., Alcocer-Yamanaka, V.H. y Bourguett-Ortiz, V.J. (2016). Modelización del flujo superficial para el trazo de una red de drenaje pluvial en la ciudad de Cancún, Quintana Roo, México. *Acta Universitaria* 26, pp. 98-106.
- Ma, Q., Xi, Y.L., Zhang, J.Y., Wen, X.L., y Xiang, X.L. (2010). Differences in life table demography among eight geographic populations of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera) from China. *Limnologica* 40, pp. 16–22.

- Macario-González, L., Cohuo, S., Elías-Gutierrez, M., Vences, M., Pérez, L. y Schwalb, A. (2018). Integrative taxonomy of freshwater ostracodes (Crustacea: Ostracoda) of the Yucatán Peninsula, implications for paleoenvironmental reconstructions in the northern Neotropical region. *Zoologischer Anzeiger* 275, pp. 20-36.
- Malekzadeh-Viayeh, R., Pak-Tarmani, R., Rostamkhani, N. y Fontaneto, D. (2014). Diversity of the rotifer *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera: Monogononta) in Iran through integrative taxonomy. *Zoological Journal of the Linnean Society* 170, pp. 233–244.
- Manickam N., Santhanam P., Saravana Bhavan P. (2019) *Techniques in the Collection, Preservation and Morphological Identification of Freshwater Zooplankton*. En: Santhanam P., Begum A. y Pachiappan P. (eds). *Basic and Applied Zooplankton Biology*. Springer, Singapore Meier y Willmann, pp 139-195.
- Meier, R. y Willmann R. (2000). *The hennigian species concept*. En Wheeler Q. D. y R. Meier (eds). *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. Columbia University Press, New York, pp. 30–43.
- Mellin, C., Delean, S., Caley, J., Edgar, G., Meekan, M., Pitcher, R., Przeslawski R., Williams A. y Bradshaw, C. (2011). Effectiveness of biological surrogates for predicting patterns of marine biodiversity: a global meta-analysis. *PLOS ONE* 6 (6).
- Michaloudi, E., Papakostas, S., Stamou, G., Nedela, V., Tihlarikova, E., Zhang, W., Steven, A. y Declerck, J. (2018). Reverse taxonomy applied to the *Brachionus calyciflorus* cryptic species complex: Morphometric analysis confirms species delimitations revealed by molecular phylogenetic analysis and allows the (re)description of four species. *PLoS ONE* 13(9).
- Mills, S. (2006). Investigations of the *Brachionus plicatilis* species complex, with particular reference to southwest Western Australia. Tesis de doctorado. University of Western Australia, Perth, pp. 540.

- Mills, S., Alcántara-Rodríguez, J.A., Ciros-Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Galindo, K.H., Jersabek, C.D., Malekzadeh-Viayeh, R., Leasi, F., Lee, J.S., et al. (2017). Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia* 796, pp. 39–58.
- Montero-Pau, J., Gabaldón, C., Carmona, M.J. y Serra, M. (2014). Measuring the potential for growth in populations investing in diapause. *Ecological Modelling* 272 (24), pp. 76–83.
- Montero-Pau, J., Gómez, A. y Muñoz, J. (2008). Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods* 6, pp. 218–222.
- Moreno, E., Conde-Porcuna, J.M. y Gómez, A. (2017). Barcoding rotifer biodiversity in Mediterranean ponds using diapausing egg banks. *Ecology and Evolution* 7, pp. 4855–4867.
- Nandini, S., Sarma, S.S.S., Amador-López R.J. y Bolaños-Muñoz, S. (2007). Population growth and body size in five rotifer species in response to variable food concentration. *Journal of Freshwater Ecology*, 22, pp. 1-10.
- Nogrady, T., Wallace, R.L. y Snell, T.W. (1993). *Rotifera Vol 1: Biology, ecology and systematics*. En: Green, J., Walter, K., Birger, P, y Dumont, H: Guides of the identification of Microinvertebrates of the Continental Waters of the World 4. The Netherlands. SPB Academic Publishing, pp. 142.
- Obertegger, U., Flaim, G. y Fontaneto, D. (2014). Cryptic diversity within the rotifer *Polyarthra dolichoptera* along an altitudinal gradient. *Freshwater Biology* 59, pp. 2413–2427.

- Obertegger, U., Fontaneto, D. y Flaim, G. (2012). Using DNA taxonomy to investigate the ecological determinants of plankton diversity: Occurrence of *Synchaeta* (Rotifera, Monogononta) in mountain lakes. *Freshwater Biology* 57, pp. 1545–1553.
- Ortells, R., A. Gómez y M. Serra, (2003). Coexistence of cryptic rotifer species: Ecological and genetic characterization of *Brachionus plicatilis*. *Freshwater Biology* 48, pp. 2194–2202
- Ortells, R., Snell, T.W., Gómez, A. y Serra, M. (2000). Patterns of genetic differentiation in resting egg banks of a rotifer species complex in Spain. *Archiv für Hydrobiologie* 149, pp. 529–551.
- Papakostas, S., Michaloudi, E., Proios, K., Brehm, M., Verhage, L., Rota, J., Peña, C., Stamou, G., Pritchard, V., Fontaneto, D. y Declerck, J. (2016). Integrative Taxonomy Recognizes Evolutionary Units Despite Widespread Mitonuclear Discordance: Evidence from a Rotifer Cryptic Species Complex. *Systematic Biology* 65 (3), pp. 508–524
- Papakostas, S., Michaloudi, E., Triantafyllidis, A., Kappas, I., y Abatzopoulo, T.J. (2013). Allochronic divergence and clonal succession: two microevolutionary processes sculpturing population structure of *Brachionus* rotifers. *Hydrobiologia* 700, pp. 33–45
- Pearson, D.L. (1994). Selecting indicator taxa for the quantitative assessment of biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 345, pp. 75–79.
- Pelletier, F., Garant, D. y Hendry, A.P. (2009). Eco-evolutionary dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, pp. 1483–1489.
- Perales, H.R. y Aguirre, J.R. (2008). *Biodiversidad humanizada*. En: Capital Natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 565-603.

- Pérez, L., Bugja, R., Lorenschat, J., Brenner, M., Curtis, J., Hoelzmann, P., Islebe, G., Scharf, B. y Schwalb, A. (2011). Aquatic ecosystems of the Yucatan Peninsula (Mexico), Belize, and Guatemala. *Hydrobiologia* 661, pp. 407–433
- Pérez-Legaspi, I.A. y Rico-Martínez, R. (2001). Acute toxicity tests on three species of the genus *Lecane* (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia* 446/447, pp. 375–381.
- Pérez-Legaspi I. A., Quintanar J. L., y Rico-Martínez R. (2010). Comparing toxicity endpoints on *Lecane quadridentata* (Rotifera: Monogononta) exposed to two anticholinesterases pesticides. *Environmental Toxicology* 27(9), pp. 518-525.
- Perry, E.C., Velázquez-Oliman, G. y Marín, L. (2002). The hydrogeochemistry of the karst aquifer system of the northern Yucatan Peninsula, Mexico. *International Geology Review* 44, pp. 191–221.
- Pfenninger, M. y Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *Bio Med Central Evolutionary Biology* 7 (121), pp. 1-6.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., et al. (2008). *La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas*. En: Capital Natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 437-494.
- Pozo, C., Armijo Canto, N. y Calmé, S. (editoras). (2011). *Riqueza Biológica de Quintana Roo. Un análisis para su conservación, Tomo I*. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Gobierno del Estado de Quintana Roo y Programa de Pequeñas Donaciones (ppd). México, D. F.
- Pozo, C., Armijo Canto, N. y Calmé, S. (editoras). (2011). *Riqueza Biológica de Quintana Roo. Un análisis para su conservación, Tomo II*. El Colegio de la Frontera Sur

(ECOSUR), Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Gobierno del Estado de Quintana Roo y Programa de Pequeñas Donaciones (ppd). México, D. F.

Purcell S., Daly, M.J. y Sham, P.C. (2007). WHAP: haplotype-based association analysis. *Bioinformatics* 23, pp. 255-256.

Rico-Martínez, R. y Snell T.W. (1997). Male discrimination of female *Brachionus plicatilis* Müller and *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff (Rotifera) strains. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 190, pp. 39-49.

Rissler, L.J. y Apodaca, J.J. Adding More Ecology into Species Delimitation: Ecological Niche Models and Phylogeography Help Define Cryptic Species in the Black Salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology*, 56(6), pp. 924–942,

Roff, D.A. (1992). *The Evolution of Life Histories: Theory and Analysis*. Chapman & Hall, New York.

Ruhi, A. y Batzer D.P. (2014). Assessing congruence and surrogacy among wetland macroinvertebrate taxa toward efficiently measuring biodiversity. *Wetlands* 34, pp. 1061–1071.

Sanz, J.J. (2013). *Evolución de los sistemas de apareamiento*. Proyecto Sur de Ediciones S.L., Granada.

Sarma, S.S.S., Jiménez-Santos, M.A., Nandini, S. y Wallace, R.L. (2017). Demography of the sessile rotifers, *Limnias ceratophylli* and *Limnias melicerta* (Rotifera: Gnesiotrocha), in relation to food (*Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890) density. *Hydrobiologia* 796, pp. 181–189.

Sarma, S.S.S., Serranía-Soto, C. y Nandini, S. (2009). Rotíferos. En: La diversidad biológica del Estado de México: estudio de estado de México. CONABIO, pp. 102-106.

- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón, J., Dirzo, R., Llorente-Bousquets, J., Halffter, G., González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S., De La Maza, J. (2009). Capital Natural de México: Conocimiento actual, evaluación y perspectivas de Sustentabilidad. Síntesis. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 100 pp.
- Saucedo-Ríos, S., Santos-Medrano, G.E. y Rico-Martínez, R. (2017). Life table analysis reveals variation in thermal tolerance among three species of the *Lecane* genus (Rotifera: Monogononta). *Annales de Limnologie* 53, pp. 253-259.
- Schmitter-Soto, J. J., Escobar-Briones, E., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M. y Marín L. E. (2002). *Los cenotes de la Península de Yucatán*. En: De la Lanza-Espino, G. y García-Calderón, J. L. (Comps.). *Lagos y Presas de México*. México, pp. 337-381.
- Schröder, T. y Gilbert, J.J. (2009). Maternal age and spine development in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: increase of spine length with birth orders. *Freshwater Biology* 54, pp. 1054–1065.
- Schröder, T. y Walsh, E.J. (2007). Cryptic speciation in the cosmopolitan *Epiphanes senta* complex (Monogononta, Rotifera) with the description of new species. *Hydrobiologia* 593, pp. 129–140
- Schröder, T. y Walsh, E.J. (2010). Genetic differentiation, behavioural reproductive isolation and mixis in three sibling species of monogonont rotifers. *Freshwater Biology* 55 (12), pp. 2570–2584.
- SEDATU (Secretaría de Desarrollo Agrario, Territorial y Urbano) (2018). <https://www.gob.mx/sedatu>
- Segers, H. y Shiel, R.J. (2003). Microfaunal diversity in a biodiversity hotspot: New rotifers from South-western Australia. *Zoological Studies*, 42(4), pp. 516–521.

- Segers, H. (1994). On four new tropical and subtropical *Lecane* (Lecanidae, Monogonta, Rotifera). *Hydrobiologia* 287, pp. 243-249.
- Segers, H. (1995). Rotifera Vol. 2 The Lecanidae (Monogononta). The Hague, the Netherlands. SPB Academic Publishing, pp. 226.
- Segers, H., (1996). The biogeography of littoral *Lecane* Rotifera. *Hydrobiologia* 323, pp. 169–197.
- Segers, H. (2007). Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa* 2, pp. 1-103.
- Segers, H. (2008). Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595 (1), pp. 49-59.
- Segers, H., y Rico-Martínez, R. (2000). The male of *Lecane bulla* (Gosse, 1851): new support for the synonymy of *Lecane* Nitzsch, *Monostyla* Ehrenberg and *Hemimonostyla* Bartos. *Journal of Natural History* 34, pp. 679–683.
- Segers, H. y De Smet, W. H. (2008). Diversity and endemism in Rotifera: a review, and *Keratella* Bory de St Vincent. *Biodiversity and Conservation* 17, pp- 303-316.
- Serranía-Soto, C.R. (1996). Diversidad de Rotíferos Monogonontos en algunos sistemas acuáticos del Estado de México. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes, Iztacala, Estado de México. México, pp. 74.
- Serranía-Soto, C.R. (2003). Some taxonomical aspects of Rotifera from central Mexico. *Scientiae Naturae* 6 (1), pp. 53-61.
- Serranía-Soto, C., Sarma, S.S.S. y Nandini, S. (2011). Studies on comparative population growth of some species of the rotifer *Lecane* (Rotifera). *Journal of Environmental Biology* 32, pp.523-527.

- Sharma, B. K. (1978). Contributions to the rotifer Fauna of West Bengal. Part I. Family Lecanidae. *Hydrobiologia* 57(2), pp. 143-153.
- Smirnov, N.N. y Elías-Gutiérrez, M. (2011). Biocenotic Characteristics of Some Yucatan Lentic Water Bodies Based on Invertebrate Remains in Sediments. *Inland Water Biology* 4 (2), pp. 211–217.
- Smith, D.G. (2001). *Rotifera (Weel animals)*. Pennak's freshwater invertebrates of the United States: Porifera to Crustacea. New York: John Wiley y Sons Inc, pp. 129-190.
- Snell, T.W. y Hawkinson, C.A. (1983). Behavioral reproductive isolation among populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Evolution* 37, pp. 1294-1305.
- Soria, J.M. y Sahuquillo, M. (2009). *Lagunas costeras* En: Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino 303 pp.
- Stelzer, C.P. y Snell, T.W. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by density-dependant chemical cue. *Limnology and Oceanography* 48, pp. 939–943.
- Suárez-Morales, E. y Elías-Gutiérrez, M. (2003). *Estado actual del conocimiento de los copépodos de aguas continentales de México*. En: Barreiro-Güemes M.T., Meave del Castillo, M.E., Signoret-Poillon, M. y Figueroa-Torre M.G. (eds.). *Planctología Mexicana*. Sociedad Mexicana de Planctología, A.C. México, pp. 157-170.
- Suatoni E., Vicario S., Rice S., Snell, T. y Caccone, A. (2006). An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41, pp. 86–98.
- Sudzuki, M. (1999). An approach to the identification of the common rotifers. Sanseido, Tokyo, 151 pp.

- Tang C.Q., Leasi F., Obertegger, U., Kieneke, A., Barraclough, T.G. y Fontaneto, D. (2012). The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, pp.16208–16212.
- Walsh, E.J., May, L. y Wallace, R.L. (2017). A metadata approach to documenting sex in phylum Rotifera: diapausing embryos, males, and hatchlings from sediments. *Hydrobiologia* 796, pp. 265–276.
- Walsh, E.J., Schroder, T., Wallace, R.L. y Rico-Martínez, R. (2009). Cryptic speciation in *Lecane bulla* (Monogononta: Rotifera) in Chihuahuan Desert waters. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 30, pp. 1046–1050.
- Walz, N. (1995). Rotifer populations in plankton communities: Energetics and life history strategies. *Experientia* 51, pp. 43-45.
- Watts, A.C., Watts, D.L., Cohen, M.J., Heffernan, J.B., McLaughlin, D.L., Martin, J.B., Kaplan, D.A., Osborne, T.Z. y Kobzia, L.N. (2015). Evidence of biogeomorphic patterning in a low-relief karst landscape. *Earth surface processes and landform*, pp. 1-14.
- Wheeler, Q.D. y Platnick, N.I. (2000). *A defense of the phylogenetic species concept (sensu Wheeler and Platnick)*. En Wheeler Q.D. y Meier, R. (eds) *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. Columbia University Press, New York, 185–197.
- Wiwegweaw, A., Seki, K., Mori, H. y Asami, T. (2009). Asymmetric reproductive isolation during simultaneous reciprocal mating in pulmonates. *Biology Letters* 5, pp. 240–243.
- Xi, Y.L., Xu, D.D., Ma, J., Ge, Y.L. y Wen, X.L. (2013). Differences in life table parameters between *Keratella tropica* and *Keratella valga* (Rotatoria) from subtropical shallow lakes. *Journal of Freshwater Ecology* 28, pp. 539–545

- Xiang, L.X., Chen, Y.Y., Han, Y., Wang, X.L. y Xi, Y.L. (2016). Comparative studies on the life history characteristics of two *Brachionus calyciflorus* strains belonging to the same cryptic species. *Biochemical Systematics and Ecology* 69, pp. 138-144.
- Xiang, X.L., Xi, Y.L., Wen, X.L., Zhang, J.Y. y Ma, Q. (2010). Spatial patterns of genetic differentiation in *Brachionus calyciflorus* species complex collected from East China in summer. *Hydrobiologia* 638, pp.67-83
- Xiang, L.X., Xi, Y.L., Wen, X.L., Zhang, G., Wang, J.X. y Hu, K. (2011). Genetic differentiation and phylogeographical structure of the *Brachionus calyciflorus* complex in eastern China. *Molecular Ecology* 20, pp. 3027–3044
- Yin, X.W., Tan, B.B., Zhou, Y.C., Li, X.C., y Liu, W. (2016). Development time of male and female rotifers with sexual size dimorphism. *Hydrobiologia*, 767, pp. 27–35
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, H., y Fink, W. (2004). Geometric morphometrics for biologists: a primer. *Elsevier*, pp. 432.
- Zink, R.M. (1996). Comparative phylogeography in North American birds. *Evolution* 50 (1), pp. 308-317.