



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

FILOGENIA MOLECULAR DE POBLACIONES
POLIMÓRFICAS DEL CAMARÓN RENACUAJO
TRIOPS (BRANCHIOPODA: NOTOSTRACA) DE MÉXICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Ecología de Zonas Áridas)

P r e s e n t a

L.E.M. Fidencio Hernández Martínez

La Paz, B. C. S. , diciembre 2004

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 06 del Mes de diciembre del 2004, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Filogenia molecular de poblaciones polimórficas del camarón renacuajo Triops de México"

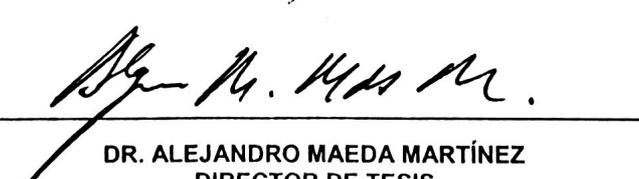
Presentada por el alumno:

Fidencio Hernández Martínez

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Ecología de Zonas Áridas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


DR. ALEJANDRO MAEDA MARTÍNEZ
DIRECTOR DE TESIS


DR. GOPAL MURUGAN
CO-TUTOR


DR. RAFAEL CAMPOS RAMOS
CO-TUTOR


DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tesis de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los recursos naturales con orientación en Ecología de Zonas Áridas.

Fidencio Hernández Martínez

Comité Tutorial y Evaluador

Director de tesis: Dr. Alejandro Maeda Martínez

Co-tutor: Dr. Gopal Murugan

Co-tutor: Dr. Rafael Campos Ramos

Comisión Revisora de Tesis

Dr. Alejandro Maeda Martínez

Dr. Gopal Murugan

Dr. Rafael Campos Ramos

Miembros del Jurado de Examen

Dr. Alejandro Maeda Martínez

Dr. Gopal Murugan

Dr. Rafael Campos Ramos

Resumen

Recientes estudios sistemáticos y genéticos de poblaciones de *Triops* de Norte América han reportado la co-ocurrencia de diferentes entidades genéticas y diferentes entidades morfológicas. Las de mayor interés sistemático son aquellas en las que, bajo una misma especie taxonómica (*T. longicaudatus*), entidades gonocóricas co-ocurren con entidades hermafroditas, ambas con morfología diferente. En México se ha observado dicha situación, sin embargo a la fecha no existen estudios sobre la identidad y las relaciones filogenéticas de estas formas simpátricas. En la presente investigación de tesis se estudió la identidad y la filogenia de morfotipos simpátricos de dos poblaciones de *Triops* del norte de México (Aguascalientes y Durango), en base a aproximaciones moleculares, morfológicas e histológicas. Se diseñaron iniciadores para la amplificación y secuenciación de la región control del ADNmt (ca. 460 pb). La filogenia de las entidades encontradas se analizaron junto con secuencias de *Triops* de Todos Santos (B.C.S.), Torreón (Coahuila), *T. longicaudatus* (E.U.A.), *T. cancriformis* (Japón) y *Lepidurus lemmoni* (B.C.N). Los resultados indican que la variabilidad de las secuencias de la región control es mayor que las reportadas para los genes 12S y 16S ARNr ADNmt. Los análisis señalan la presencia de diferentes haplotipos en cada población, y que las poblaciones mexicanas forman un grupo monofilético, con distancias genéticas entre ellas menores que con respecto a *T. cancriformis* y *L. lemmoni*. En las poblaciones estudiadas se encontraron cinco morfotipos: machos y hembras gonocóricas en Durango; machos, hembras gonocóricas y hermafroditas en Aguascalientes. Las entidades gonocóricas y hermafroditas de Aguascalientes son genéticamente mas cercanas entre ellas que con respecto a la entidad gonocórica de Durango. Los resultados sugieren que las poblaciones gonocóricas de Aguascalientes y Durango han sufrido una diferenciación o especiación alopátrica, mientras que los hermafroditas y gonocóricos de la población de Aguascalientes podrían representar diferentes especies evolutivas actualmente ocurriendo en condiciones de simpatria.

Palabras clave: *Triops*, región control, hermafroditas, especies simpátricas

Dr. Alejandro M. Maeda Martínez
Director de tesis

Abstract

Identity of two Mexican populations of *Triops*, one each from the state of Durango and Aguascalientes, was studied using partial sequences of the control region of mitochondrial DNA (mtDNA) and morphology. With sequences of these two populations, phylogeny of the genus was analysed by comparing sequences of *Triops* from Todos Santos (BCS), Torreón (Coahuila), *Triops longicaudatus* (USA), *T. cancriformis* (Japan) and *Lepidurus lemmoni* (BC). Sequences of the control region of mtDNA showed higher variations than the genes 12S and 16S of mtDNA. Observation of different haplotypes in each population demonstrate the utility of control region in studies at intrapopulation level. The Mexican populations formed a monophyletic group with genetic distances proportionally smaller between them than with *T. cancriformis* and *Lepidurus*. Five morphotypes have been distinguished in the two populations: gonocoric female and male in Durango; gonocoric female, male and hermaphrodites in Aguascalientes. The gonocoric forms of both localities presented a small number of morphological similarities suggesting that they are in a process of speciation. The hermaphrodites and the gonocoric females of Aguascalientes were morphologically different, but both lineages formed a monophyletic group. It is suggested that the hermaphrodite form might have derived from the gonocoric condition and these entities represent two sympatric species which do not suffer from introgression.

Key words: *Triops*, mitochondrial DNA, control region, hermaphrodites, sympatric species

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos con mucho cariño

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada con el número de registro 173044 desde septiembre del 2002 a septiembre del 2004.

Al CIBNOR, por las facilidades prestadas para poder realizar todo lo necesario en lo que respecta a mis estudios de maestría y trabajo de tesis.

Al comité tutorial de mi tesis: Dr Alejandro Maeda Martínez, Dr. Gopal Murugan y Dr. Rafael Campos.

Al personal del Posgrado del CIBNOR que participo de manera entusiasta con su trabajo, a la Dra. Thelma Castellanos, José Manuel Melero, Horacio Sandoval, Beatriz Gálvez, Osvelia Ibarra, Leticia González y Claudia Olachea.

Al personal de la biblioteca, especialmente a Ana María, Susana, Tony, Isabel y Esther.

A Norma, Sofía y Roxana (laboratorio de Diagnóstico Microbiológico); Carmen (del laboratorio de Histología) Delia (Biología Molecular) Pablo Monsalvo (Laboratorio de Bioensayos) y a la MC Hortencia Obregón (Laboratori de Carcinología) por el gran apoyo que me brindaron en la realización de este trabajo.

Un sincero agradecimiento a mis amigos Cesar, Reno, Verónica, Cathy, Aracely, Bere, Fabiola, Miguel, Raul, Marisol y a los compañeros de la generación de maestría 2002-2004 porque hicieron de mi estancia un tiempo memorable.

Un Gran Agradecimiento al Dr. Alejandro Maeda por todo el apoyo y comprensión que obtuve de él durante mi permanencia en el posgrado.

Contenido

1. Introducción	1
1.1. Filogenia molecular con ADN mitocondrial	2
1.2. Problemas de sistemática en los Notostraca	3
1.3. Biología reproductiva	7
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo general.....	10
2.2. Objetivos particulares	10
3. Hipótesis	10
4. Material y métodos	11
4.1. Obtención y preparación de organismos.....	11
4.2. Diseño de iniciadores para amplificar y secuenciar la región control (ADNmt). 12	
4.3. Extracción, amplificación, secuenciación y alineación de secuencias	13
4.4. Distancia genética y análisis filogenético	14
4.5. Obtención de datos morfológicos	15
4.5.1. Caracteres morfológicos cualitativos.....	15
4.5.2. Caracteres morfológicos merísticos.....	16
4.5.3. Caracteres morfométricos	16
4.6. Análisis morfológico.....	19
4.7. Análisis histológico gonadal.....	19
5. Resultados.....	20
5.1. Prueba de iniciadores	20
5.2. Análisis molecular	20
5.3. Análisis morfológico.....	23
5.3.1. Población Aguascalientes	23
5.3.2. Población de Durango.....	30
5.3.3. Comparación de las dos poblaciones en análisis de componentes principales	32
5.3.4. Análisis histológicos	36
6. Discusión	39
7. Conclusiones.....	48
8. Referencias.....	49

Apéndices.....	54
----------------	----

Lista de Figuras

Figura 1. Ubicación aproximada de las poblaciones de estudio	10
Figura 2. Vista dorsal de <i>Triops</i> sp.....	16
Figura 3. Vista ventral de <i>Triops</i> sp.....	16
Figura 4. Clasificación de la altura del órgano	17
Figura 5. Clasificación de la posición del órgano nuczal.....	17
Figura 6. Formas del órgano nuczal en <i>Triops</i>	17
Figura 7. Árbol filogenético con el método de Parsimonia Máxima.	22
Figura 8. Árbol filogenético con el método de Neighbor Joining.	24
Figura 9. ACP aplicando los tres tipos de variables.	27
Figura 10. Análisis de las proporciones morfométricas.	27
Figura 11. Análisis de caracteres merísticos2.	28
Figura 12. Análisis de caracteres morfológicos, componentes 1 y 2.....	29
Figura 13. Análisis de los tres tipos de caracteres de la población de Durango, gráfica de los componentes 1 y 2.....	30
Figura 14. Análisis de caracteres morfométricos de la población de Durango	30
Figura 15. Análisis de caracteres merísticos de la población de Durango	31
Figura 16. Análisis de caracteres cualitativos de la población de Durango	31
Figura 17. Análisis de los tres tipos de caracteres aplicado a las dos poblaciones.....	33
Figura 18. Análisis de los caracteres morfométricos de las poblaciones de Aguascalientes y Durango.	33
Figura 19. Análisis de los datos merísticos de las poblaciones de Aguascalientes y Durango	33
Figura 20. Análisis de los datos morfológicos de las poblaciones de Aguascalientes y Durango	34
Figuras 20-25. Gráficas de la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos de los caracteres merísticos de las poblaciones de Aguascalientes y Durango	36 y 37

Lista de Tablas

Tabla I. Origen y número de notostracos usados para el análisis de ADNmt	14
Tabla II. Valores asignados a las características morfológicas cualitativas usados en el análisis de componentes principales2.	15
Tabla III. Número y composición de bases de los fragmentos obtenidos de la región control del ADNmt de 17 haplotipos encontrados2.	21
Tabla IV. Distancias genéticas (Kimura 2-parameter) y diferencia del número de bases entre las secuencias de los organismos estudiados2.	25
Tabla V. Sitios variables de las secuencias de las poblaciones mexicanas estudiadas2.	26
Tabla VI. Observaciones de la presencia o ausencia de ovariotestes2.	38

Lista de Apéndices

Apéndice 1. Alineamiento de las secuencias de los crustaceos analizados para diseño de iniciadores y sitios de conservados2.	53
Apéndice 2. Posición de la región control en el genoma mitocondrial de <i>Triops cancriformi</i> 2.	56
Apéndice 3. Secuencia total de los los notostracos estudiados2.	57
Apéndice 4. Tablas de caracteres morfológicos de los organismos de Durango y Aguascalientes2.	60
Apéndice 5. Cálculo de la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos de los caracteres merísticos2.	66

1. Introducción

El orden Notostraca comprende un grupo pequeño de crustáceos branquiópodos ampliamente distribuidos. Sus dos géneros *Triops* y *Lepidurus* ocurren en cuerpos de agua temporales de todos los continentes, excepto en la Antártica (Sassaman et al.,

1997). De acuerdo al registro fósil, estos organismos han sufrido pocos cambios desde el Triásico. Los cambios aparentemente son mínimos, y los linajes actuales son difíciles de definir taxonómicamente a nivel especie (Longhurst, 1955; Maeda-Martínez et al., 2000). Su morfología fundamental no ha sufrido cambios en 170 millones de años (Sunou-Uchi et al., 1997). La especie viviente *Triops cancriformis* muestra diferencias mínimas con material fósil del Triásico. También las relaciones entre las diferentes formas o especies son pobremente entendidas debido a la carencia de caracteres diagnósticos que delimiten a las especies (King & Hanner, 1997).

1.1. Filogenia molecular con ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) es un marcador genético ideal para el análisis filogenético ya que permite la comparación de secuencias entre una amplia variedad de organismos. En general, en animales durante su reproducción sexual el ADNmt no se recombina; la evolución a nivel de secuencias de nucleótidos en el ADNmt es entre 1 a 10 veces más rápida que en el ADN nuclear (Avise, 1987).

La amplificación y secuenciación de ADNmt permite caracterizar los diferentes haplotipos de una población o una especie y con ello poder reconstruir su filogenia, dado que las partes de esta molécula comparten el mismo patrón histórico de descendiente común. Los datos de la filogenia de genes mitocondriales junto con la información geográfica de las especies proporcionan un medio para establecer conceptos filogeográficos intraespecíficos (Avise et al., 1987).

Las inferencias filogenéticas en el género *Triops* se han realizado utilizando los genes mitocondriales Citocromo Oxidasa I (COI), 12S y 16S ARNr (Murugan et al., 2002; Obregón-Barboza et al. en prep.). El uso de marcadores que muestren mayor

variación podrían dar mejor resolución sobre la historia evolutiva de las poblaciones de estos organismos. Este es el caso de la región control del ADN mitocondrial, que a tenido gran utilidad en trabajos de inferencia filogenética realizados en poblaciones de insectos y crustáceos (Chu et al., 2003; Brown et al., 2001; Vila et al., 2004 a, b; Dudycha, 2004). Es conocido que la región control muestra mayor cantidad de sitios informativos y de haplotipos (Chu et al., 2003) por lo que en el presente trabajo se pretende observar la variación existente dentro de poblaciones de *Triops* de México utilizando esta región.

1.2. Problemas de sistemática en los Notostraca

De acuerdo a los modelos de reproducción de Sassaman (1989, 1991, 1995), y Sassaman y Weeks (1993), en los Notostraca pueden ocurrir dos tipos de especie: las especies gonocóricas compuestas de machos y hembras con reproducción cruzada obligada, y las especies androdioicas compuestas de machos, hermafroditas anfigénicos y hermafroditas monogénicos; ambos tipos de hermafroditas son capaces de autofecundarse, y teóricamente también pueden ser fecundadas por machos. Así mismo, no se puede descartar la existencia de dos tipos adicionales de especie: las uniparentales compuestas solo de hermafroditas monogénicas y las partenogénicas (Sassaman, 2000, en Maeda-Martínez et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente, actualmente existe dificultad en la delimitación de especies en el género *Triops*. Se han sugerido caracteres morfológicos que diferencian las poblaciones de distintas regiones del mundo tales como las de África, Europa, Australia y Norteamérica. Estos caracteres incluyen el número de anillos ápodos, la morfología del caparazón, órgano nupal, ausencia o presencia de la segunda

maxila, la armadura de espinas en la superficie dorsal del telson y las espinas supernumerarias de los anillos ápodos.

La aparente ausencia de caracteres con diferenciación morfológica en los “fósiles vivientes” se ha considerado como una indicación de estancamiento evolutivo. Por esta razón, ha sido una práctica común agrupar a poblaciones no claramente diferenciadas morfológicamente bajo un mismo nombre científico. La práctica de la designación taxonómica de especies en base a morfología, puede resultar en la agrupación de individuos que ocurren en una amplia variedad de escenarios ecológicos y/o que presentan diferentes sistemas reproductivos (King & Hanner, 1997). De acuerdo a Fryer (1988), las morfoespecies de los notostracos, se podrían dividir en razas o en varias especies crípticas. El problema de identificación de cuatro especies nominales de *Lepidurus* de Norte América fue abordado por King & Hanner (1997) al realizar un análisis filogenético utilizando marcadores moleculares (ADNmt) y bioquímicos (isoenzimas). Estos autores reportaron que existen al menos cinco linajes evolutivos distintos en *Lepidurus* de Norte América, los cuales probablemente representan cinco especies separadas. Una vez que las especies fueron delineadas genéticamente fue posible identificar caracteres morfológicos diagnósticos los cuales previamente no pudieron ser notados. Así, un análisis que incluya datos morfológicos y genéticos debería proporcionar una descripción mas completa del la filogenia de *Lepidurus* (King & Hanner, 1997).

Suno-Uchi et al. (1997), estudiaron poblaciones de tres especies nominales de *Triops* y dedujeron sus relaciones filogenéticas en base a un análisis de secuencias parciales del gen 16S ARNr ADNmt y a la comparación morfológica del caparazón. El análisis morfológico no mostró una relación consistente entre las especies morfológicas

y las cuatro especies filogenéticas. Así mismo, Suno–Uchi et al. (1997) sugieren que la mayoría de las diferencias morfológicas aparentemente no están asociadas con la especiación, i.e., la *stasis* morfológica a largo plazo no es una propiedad diagnóstica a nivel de especie.

Linder (1952) y Longhurst (1955a) propusieron que todas las poblaciones de *Triops* del continente americano pertenecen a la especie morfológica *T. longicaudatus* (LeConte, 1840). Para esta especie, Linder reportó un amplio rango de variabilidad en muchos caracteres morfológicos y en la proporción de sexos, concluyendo que el género *Triops* de Norteamérica se compone de una especie politípica con muchas poblaciones sexuales localmente diferenciadas, con un rango de distribución que abarca las islas Galápagos, Hawaii y Argentina en Sudamérica. Teniendo en cuenta esta descripción, Sassaman et al. (1997) estudiaron si la variabilidad morfológica indica cambios sustanciales en la variabilidad genética a través del análisis de isoenzimas y de la proporción de sexos en una serie de poblaciones distribuidas en la parte oeste de Estados Unidos. Estos autores reportan resultados que indican que la especie politípica *Triops longicaudatus* definida por Linder (1952) y Longhurst (1955a) es realmente un mosaico de varios tipos de poblaciones, representando al menos dos especies genética y reproductivamente distintas que ocasionalmente co-ocurren sin introgresión. Las marcadas diferencias genéticas entre estas especies acompañadas por sutiles diferencias morfológicas ponen en duda la extensa sinonimia de *T. longicaudatus* (Sassaman et al., 1997).

En relación a las poblaciones de *Triops* que ocurren en México, Maeda-Martínez (1991) reportó la colecta de este animal en regiones áridas y semiáridas en los estados de Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Estado de

México, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas. Actualmente, *Triops* se conoce de 124 localidades distribuidas en 17 estados mexicanos (Maeda-Martínez et al., 2002).

Analizando secuencias de fragmentos de los genes mitocondriales 12S y 16S ARNr, Murugan et al. (2002) estudiaron la identidad molecular de siete poblaciones Americanas de *Triops*. Los análisis filogenéticos mostraron que las especies de Norte América forman un grupo monofilético (Murugan et al., 2002). De las siete poblaciones estudiadas, seis representan diferentes especies filogenéticas: (1) Km 75 y Vizcaíno (sin presencia de machos); (2) El Arco (sin presencia de machos); (3) Km 64 (uniparental), (4) *T. longicaudatus* de Zacatecas (gonocórica); (5) Km 79.3 (androdioica); (6) kit comercial (androdioica).

Murugan et al. (2002) reportaron que *Triops* sp. Km. 64 (uniparental de forma corta) y *T. longicaudatus* (gonocórica de forma larga) de Zacatecas, son dos formas altamente divergentes en morfología y reproducción, sin embargo, presentan una distancia genética mínima en la secuencia de un fragmento del gen 12S (ARNr ADNmt). Bajo el concepto filogenético de especie propuesto por Cracraft (1983) definido como "grupo irreducible de organismos, diagnosticablemente distinto de otros grupos, dentro del cual existe un patrón paternal de ascendencia-descendencia", y por Nixon y Wheeler (1990) definido como "agregación mas pequeña de poblaciones (sexual) o linajes (asexual) diagnosticable por una combinación única de estados de carácter en individuos comparables", Murugan et al. (2002) propusieron separar dichas formas en dos entidades diferentes a nivel especie. Sassaman et al. (1997) reportaron también una alta similitud genética (en base a comparaciones de polimorfismos de

isoenzimas) entre poblaciones uniparentales de *Triops* de forma corta (citada como unisexual) y poblaciones gonocóricas de forma larga de E.U.A.

La cercanía genética de poblaciones altamente divergentes en morfología y reproducción, permite sugerir que en el género *Triops* los sistemas reproductivos hermafroditas autofecundables (e.g. *Triops* sp. forma corta) podrían originarse de sistemas reproductivos gonocóricos (e.g., *Triops longicaudatus* de forma larga) (Murugan et al., 2002).

En relación a lo anterior, recientes análisis de 28 poblaciones de *Triops* de México (Obregón-Barboza, en prep.) indican que en al menos en siete de ellas co-ocurren diferentes haplotipos y diferentes entidades morfológicas. Las de mayor interés sistemático son aquellas en las que entidades gonocóricas putativas co-ocurren con entidades hermafroditas, ambas con morfotipos diferentes. Sin embargo, a la fecha no existen estudios sobre la identidad y las relaciones filogenéticas de estas formas simpátricas.

1.3. Biología reproductiva

El hermafroditismo ha sido determinado en una población de *Triops longicaudatus* en cuyos conductos foliculares los lóbulos testiculares son perfectamente funcionales debido a que en ellos se muestra actividad meiótica y maduración espermática, así como funcionalidad de los gametos que no muestran signos de degeneración (Scanabissi y Mondini 2002b), contrario de como se muestra en los machos de *Lepidurus apus lubbocki*, donde los espermatozoos están degenerados y no se observan espermias que no sufran degeneración; por lo tanto la degeneración es un evento constante en *L. apus lubbocki* y no así en los ovariotestes de *T. longicaudatus*. A pesar que en las

poblaciones de *L. apus lubbocki* no hay machos funcionales, tampoco se observan ovariotestes en las gonadas de hembras, por lo que esta forma podría reproducirse de manera partenogenética (Scanabissi y Mondini 2002b). Se han realizado diferentes estudios de poblaciones en europeas de *Triops cancriformis* (Zaffagnini y Trentini, 1980; Engelman et al., 1996, 1997; Scanabissi y Mondini, 2002a), y en esta especie se han encontrado poblaciones gonocóricas, hermafroditas y partenogenéticas; estas últimas con ausencia de machos y carencia de ovariotestes en las gónadas; se ha logrado determinar el mecanismo de fertilización de los oocitos en algunos organismos que han sido considerados partenogenéticos como en el caso de *Eulimnadia texana*, que ahora se ha reportado como organismo hermafrodita y su reproducción parece ser autofertilización (Scanabissi y Mondini, 2002a). En las especies de *Triops* y como en todas las especies del los Notostraca el aparato genital femenino consiste de un par de gónadas dentro del hemocele que se encuentran paralelas a ambos lados del tracto digestivo extendiéndose desde la parte anterior del torax, hasta la región de los segmentos ápodos. Cada gónada consiste de un oviducto longitudinal elástico que por lo regular contiene ovocitos maduros en el organismo adulto; este oviducto se conecta a un ovisaco. A lo largo de todo el oviducto se encuentran numerosos conductos foliculares en cuyos extremos están las zonas germinales donde se encuentran los oogonios (Longhurts, 1955b; Trentini y Scanabissi, 1982, Scanabissi y Mondini 2002a). Los conductos están formados de una sola capa de células columnares unidas a la lámina basal. Los ovocitos maduros pasan a través del conducto folicular al momento que captan la sustancia formadora de la concha de los quistes.

En *Triops* las gónadas masculinas (testículos), forman un par y están distribuidas de la misma manera que las gónadas femeninas, a ambos lados del tracto digestivo dentro

del hemocele. Cada gónada tienen forma de un saco lobulado y cada una con un conducto longitudinal que se une al conducto eferente el cual tiene salida en la base del onceavo par de toracópodos. El esperma es una célula redonda no móvil con un núcleo central muy denso (Longhurst, 1954).

La manifestación del hermafroditismo en los Notostraca es a través de lóbulos o zonas masculinas dentro de los conductos foliculares de las gónadas femeninas, y en estos se realiza la espermatogénesis (Engelman et al., 1996, 1997; Longhurst, 1955; Scanabissi y Mondini 2002a; Zaffagnini y Trentini, 1980), y se encuentran distribuidos por todo el sistema gonadal.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Estudiar la identidad y relaciones filogenéticas de morfotipos simpátricos de dos poblaciones de *Triops* del norte de México, en base a aproximaciones moleculares.

2.2. Objetivos particulares

2.2.1. Diseñar y aplicar un par de iniciadores (“en avance” y “en reversa”) para la amplificación y secuenciación de la región control del ADNmt (ca. 460 pb) del género *Triops*.

2.2.2. Con secuencias un fragmento de la región control (ADNmt) (obtenido del objetivo 2.2.1.), estudiar la relación filogenética entre morfotipos simpátricos del género *Triops* procedentes de El Jagüey, Aguascalientes y Km 267, Durango.

2.2.3. Estudiar características morfológicas que permitan distinguir las diferentes entidades genéticas (haplotipos) encontradas.

2.2.4. Estudiar por métodos histológicos la condición anatómica de las gónadas con el fin de establecer la presencia o ausencia de ovariotestes y con esto inferir diferentes modos de reproducción de las diferentes entidades.

3. Hipótesis

Las poblaciones de *Triops* procedentes de los sitios de estudio se componen de individuos gonocóricos y de individuos hermafroditas que tienen la misma identidad molecular. Por lo tanto, a pesar de su divergencia morfológica y reproductiva, estos individuos forman una misma especie.

4. Material y métodos

4.1. Obtención y preparación de organismos

Con el fin de obtener organismos adultos, se realizaron cultivos de los diferentes morfotipos de *Triops* provenientes de dos poblaciones del norte de México (Fig. 1):

- (1) El Jagüey, Aguascalientes.
- (2) Km 267, Durango.

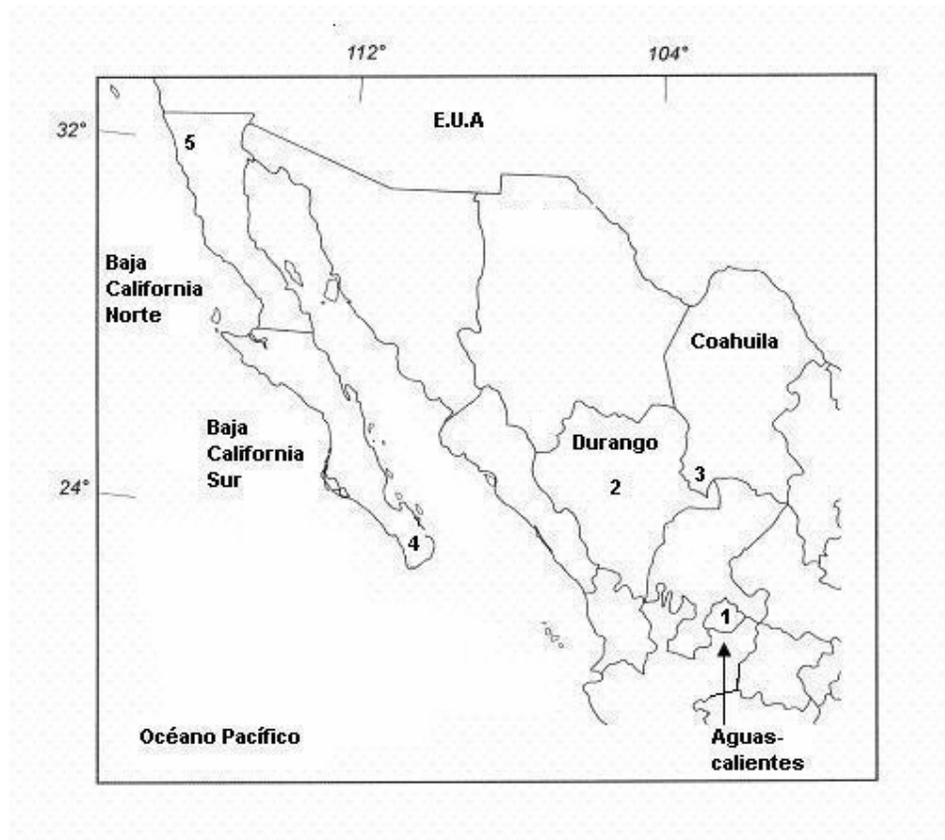


Figura 1. Ubicación aproximada de las poblaciones de estudio: 1. Estanque El Jagüey, Aguascalientes, Ags. 2. Km 267, carretera federal Zacatecas-Durango, Dgo. 3. Torreón, Coahuila. 4. Todos Santos, B.C.S. 5. Laguna Chapala, B.C.N.

De cada localidad se tomó una muestra (ca. 15 Kg) de suelo con quistes de *Triops* y se colocó dentro de un tanque de fibra de vidrio de 1,200 L de capacidad que posteriormente se llenó con 400 L de agua potable (sólidos disueltos totales (TDS) = 0.1 – 0.3 g L⁻¹). Los cultivos se mantuvieron al aire libre y se controló la exposición al sol

para no permitir temperaturas superiores a 33 °C del agua. Como suplemento alimenticio, cada tercer día se suministró un gramo de levadura deshidratada comercial. Después de 30 días de cultivo, se obtuvo un total de 65 organismos adultos, de los cuales 26 (3 machos y 23 “hembras”) fueron del Jaguey y 39 (18 machos y 21 “hembras”) del Km 267 (Tabla I). A todos los organismos se les realizó la revisión morfológica; del Jaguey, 17 individuos se estudiaron histológicamente y 6 molecularmente; del Km 267, 12 individuos se estudiaron histológicamente y 6 molecularmente. Los organismos para histología y análisis molecular se anestesiaron con agua potable gasificada (CO₂) comercial; al lograr la inmovilidad se hizo un corte en la región de los anillos ápodos; la parte caudal se fijó en etanol al 100 % para posterior extracción de ADN, mientras que la porción torácica se fijó en solución Davidson (Humanson, 1972) para posterior análisis histológico. Los individuos que no se destinaron para análisis histológico o molecular se fijaron en formalina al 5 %.

La obtención de datos morfológicos y biométricos se realizó utilizando un microscopio estereoscópico Zeiss (1.6 X) y un vernier Mitutoyo (SC-6). El ancho del telson en vista dorsal se obtuvo usando un microscopio estereoscópico Leica MZ 7.5 equipado con una reglilla calibrada en ocular.

4.2. Diseño de iniciadores para amplificar y secuenciar la región control (ADNmt)

En el GeneBank se realizó una búsqueda de genomas de ADNmt de crustáceos, con registro de la región control y genes o regiones adyacentes a esta. De las regiones adyacentes, se seleccionaron las secuencias mejor conservadas entre las siguientes especies: *Triops cancriformis* (NC 000844), *Daphnia pulex* (NC 004465), *Squilla mantis* (AY639936), *Panulirus japonicus* (NC 004251) y *Penaeus monodon* (NC

002184). La alineación de dichas secuencias se realizó con los programas ESEE (Cabot, 1998) y Clustal X (Thomson et al., 1997). Se seleccionaron regiones para diseñar a los iniciadores: 19 bases para el iniciador “en avance” y 24 para el iniciador “en reversa”, los cuales fueron fabricados por Invitrogen™.

La región control en *Triops cancriformis* se localiza entre el gen que codifica para el ARN ribosomal 12S y el gen que codifica para el ARN de transferencia isoleusina (Ile) (Umetsu et al., 2002; GenBank NC 004465). Las cinco especies de crustáceos de Gen Bank presentan la misma disposición de genes alrededor de la región control, y es en estos genes donde se buscaron las zonas conservadas (Apéndice 2). Se eligió un segmento del gen 12S ARNr que mostró mayor similitud entre las cinco especies, y es el mas cercano a la región control. La secuencia del iniciador “en reversa” diseñado por Colbourne et al. (1996) (5-AAATCGTGCCAGCCGTCGC-3) es homólogo a esta región conservada (Apéndice 1 y 2) y se encuentra a 160 pares de bases de distancia de la región control; por lo tanto se optó por transformar este iniciador en “avance”: T12S 5-GCGACGGCTGGCACGATTT-3. Las cinco secuencias del gen ARNt isoleucina mostraron homología en su mayor parte, por lo que se eligieron dos secciones cercanas a la región control para adaptarlas como iniciadores “en reversa” (Apéndice 1 y 2): TILE1 5- TATCAAGGTAATCCTTTTTATCAG -3 y TILE2 5- ACCCTATCAAGGT AATCCTTTTT -3, con una distancia hacia la región control de 10 y 15 pares de bases.

4.3. Extracción, amplificación, secuenciación y alineación de secuencias

A las porciones caudales fijadas en etanol al 100 % se les removió el exoesqueleto para obtener tejido muscular abdominal (Murugan et al., 2002). Del tejido muscular se realizó la extracción de ADN total (ADNt) utilizando el kit Puregene™. La

amplificación se realizó en un termociclador Techne Genius utilizando los iniciadores diseñados T12S y TILE2. Para la reacción se preparó una mezcla (50 μ l) que consistió de 40 a 60 ng de ADNt (templado), 5 μ l de 10X PCR buffer, 0.7 μ L de una mezcla de dNTP a una concentración de 10 μ Mol, 60 pMol de cada uno de los iniciadores y 1 unidad de RTS *Taq* ADN polimerasa. Las condiciones termocíclicas fueron las siguientes: desnaturalización preliminar del ADN a 94 °C por 5 minutos; 37 ciclos que abarcan (1) desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, (2) alineación a 50 °C por 40 segundos, y (3) extensión a 72 °C por 1 minuto; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit PCR DNA and Gel Band Purification GFX™ Amersham. Posteriormente se etiquetaron 50 ng de los productos de PCR con Bigdye y se realizó la secuenciación con el analizador ABI Prism-310. Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal X (Thomson et al., 1997) y se editaron manualmente con el programa ESEE (Eyeball Sequence Editor) (Cabot, 1998).

4.4. Distancia genética y análisis filogenético

Las distancias genéticas entre los haplotipos se calcularon con el método de Kimura 2-parameter y el análisis de parsimonia máxima se realizó con el programa MEGA 2 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Kumar et al., 2001). Utilizando el método de búsqueda de intercambios de ramas con el vecino cercano “Close Neighbor Interchange” (CNI) con un nivel de búsqueda de 3, con la formación de árboles iniciales para CNI elaborados en la modalidad de búsqueda heurística mini-mini con un factor de tres. También se utilizó Neighbor Joining (NJ) con el modelo de Kimura 2-parameter

Tabla I. Origen y número de notostracos usados para el análisis de ADNmt.

Especie	n	Localidad
<i>Triops</i> sp. Aguascalientes	6	Estanque El Jagüey, Salto del Burro, Aguascalientes, Ags., México. 21° 43' Norte y 102° 18' W.
<i>Triops</i> sp. Durango	5	Km. 267, carr. federal no. 45, Zacatecas-Durango, Dgo., México. 24° 0' 32" N, 104° 25' 19" W.
<i>Triops</i> sp. Todos Santos	1	Km 76.5, carretera federal No. 1, Todos Santos–Cabo San Lucas, B. C. S., México. 23° 14' N, 110° 09' W.
<i>Triops</i> sp. Torreón	1	Parque de beisbol infantil, lado sur, col. Torreón Jardín, Torreón, Coahuila, México. 25° 31' 37" N, 103° 25' 14" W.
<i>T. longicaudatus</i>	1	“Triops World” kit, sitio exacto de colecta de quistes desconocido. E. U. A. GenBank (C.A. AY639934)
<i>T. cancriformis</i>	1	Yamagata Prefecture, Japan, GenBank (C. A. NC_004465).
<i>Lepidurus lemmoni</i>	2	Km. 230, Laguna Chapala, Carr. Fed. No.1, San Quintín – Guerrero Negro, Ensenada, B. C. N., México. 29° 25' 23" N, 114° 25' 38" W.

considerando las transiciones y transversiones. En ambos análisis las aplicaciones se llevaron a cabo con la comparación de pares de secuencias (Pairwise Deletion). El análisis Bootstrap se realizó con 1000 repeticiones. En estos análisis se incluyó *T. cancriformis*, *T. longicaudatus* (secuencias en GenBank), *Triops* de dos poblaciones mexicanas y *Lepidurus lemmoni* como grupo externo (Tabla I).

4.5. Obtención de datos morfológicos

4.5.1. Caracteres morfológicos cualitativos

Los caracteres morfológicos cualitativos estudiados fueron ocho (Figs. 2 a la 5): posición (Pn), forma (Fn) y altura (An) del órgano nuczal, forma del sulcus (Fsu), superficie del caparazón (Scp), superficie de la carina (Scr), armadura de la inserción de la furca (Aif) y presencia de espinas posteriores marginales del telson (Ept). Para el estudio de estos caracteres en el análisis de componentes principales se les asignó un valor de acuerdo a la Tabla II.

Tabla II. Valores asignados a las características morfológicas cualitativas usados en el análisis de componentes principales.

Tipo de carina	Lisa	1
	1/4 lig. Aserrada	2
	1/2 lig. Aserrada	3
	Ligeramente aserrada semiaserrada	4
	Aserrada	5
Superficie del caparazón	Lisa	1
	Parches espinas aisladas	2
	Espinosa	3
spinas del telson	Si	1
	No	2
Forma del sulcus	Cerrada	1
	Abierta	2
Órgano nuczal: Posición	I	1
	II	2
Órgano nuczal: Forma	Triangular	1
	Semicuadrado	2
Órgano nuczal: Altura	I	1
	II	2
	III	3

4.5.2. Caracteres morfológicos merísticos

Los caracteres merísticos estudiados fueron seis (Figs. 2 y 3): número de espinas del sulcus (Esu), número de anillos corporales totales (Act), número de anillos ápodos (Aap), número de anillos con toracópodos (Atc), número total de toracópodos (Tto) y número de espinas postmarginales del último anillo (Eua).

4.5.3. Caracteres morfométricos

Los caracteres morfométricos estudiados fueron cuatro (Figs. 2 y 3): longitud de la línea media del caparazón (Lc), longitud frontal (Lf), longitud carinal (Lr) y ancho del telson (línea transversal) en vista dorsal (Lt). De estos caracteres morfométricos, también se

obtuvieron las siguientes proporciones o radios: La/Lc , Lf/Lc , Lt/Lc , Lf/Lr , Lt/Lf y Lt/Lr .

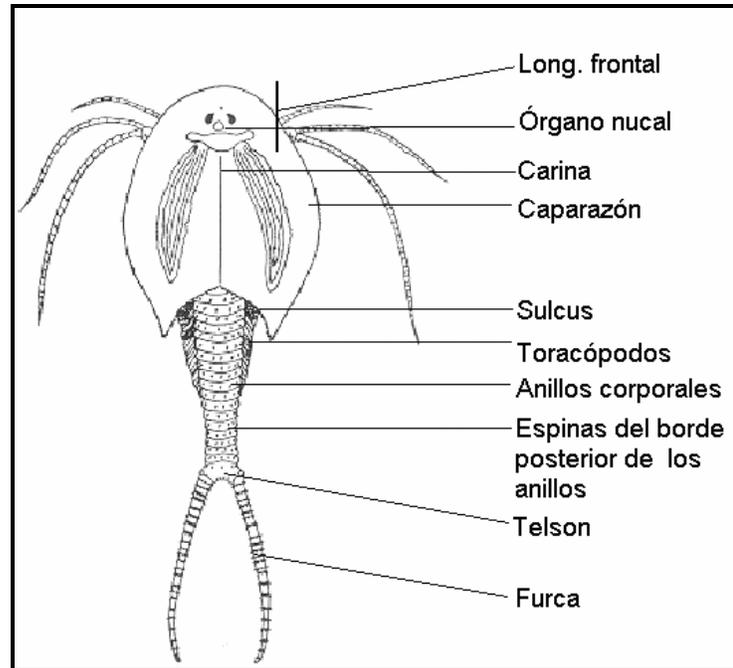


Figura 2. Vista dorsal de *Triops* sp. Tomado de Maeda-Martínez et al. (2002).

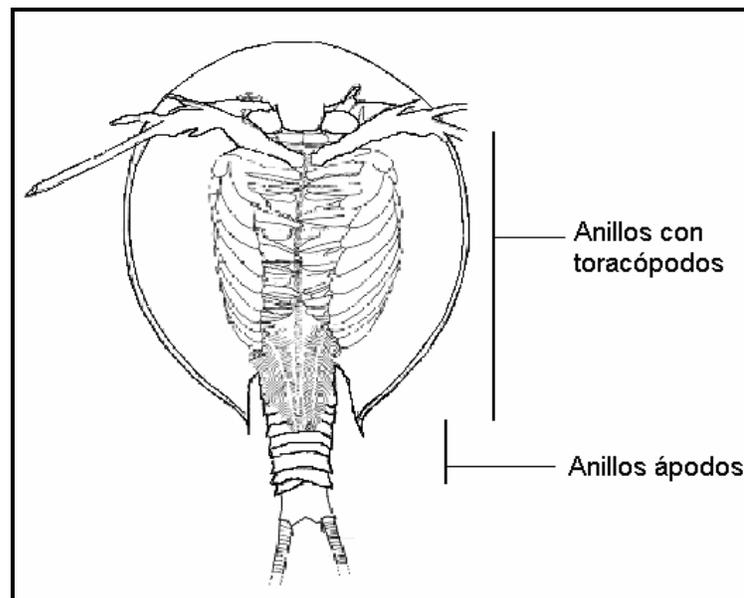


Figura 3. Vista ventral de *Triops* sp. Tomado de McLaughlin (1980).

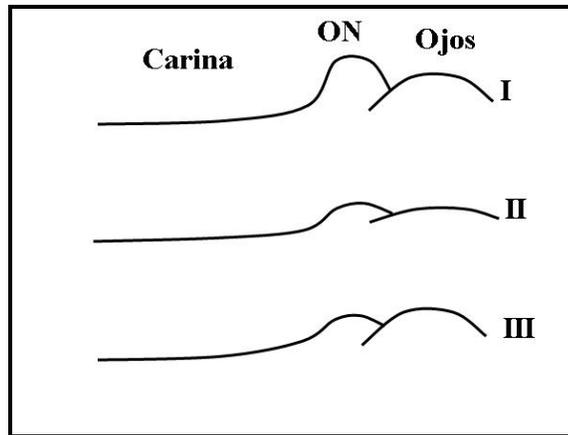


Figura 4. Clasificación (tipo I, tipo II y tipo III) de la altura del órgano nupal (ON) respecto a los ojos sésiles compuestos.

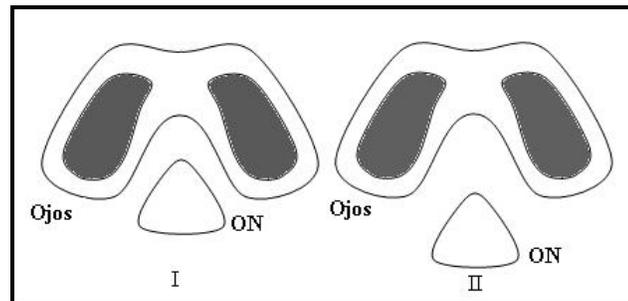


Figura 5. Clasificación de la posición del órgano nupal (ON) respecto a los ojos sésiles compuestos. I. Organó nupal pasa el límite posterior interorbital; II. Organó nupal no pasa el límite posterior interorbital.

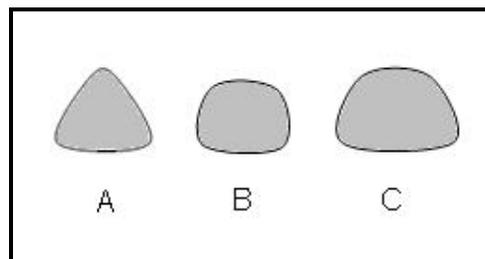


Figura 6. Formas del órgano nupal en *Triops*. A. triangular, B. semicuadrado y C. trapezoidal.

4.6. Análisis morfológico

Los datos morfológicos cualitativos, merísticos y morfométricos de las “hembras” estudiadas se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP) (Tabachnick y Fidell, 1996) (Statistica 5.0). Los diferentes tipos de datos morfológicos se analizaron por separado, así como también comparando los tres tipos en un mismo proceso de análisis. El análisis se realizó tanto con las hembras de la misma población, sí como con las hembras de las dos poblaciones. Los componentes fueron graficados con el programa Excel 2003.

Los 6 caracteres merísticos se compararon por pares de morfotipos encontrados en las dos poblaciones con base a la media, desviación estándar, valores mínimos y valores máximos de cada grupo.

4.7. Análisis histológico gonadal

Las porciones torácicas de los organismos fijadas inicialmente en solución de Davidson fueron transferidas a alcohol al 70 % a las 48 horas de iniciada la fijación y permanecieron en esta condición hasta su procesamiento histológico. Para realizar los cortes, el material se deshidrató en una serie de soluciones de alcohol (70, 80 90 y 100 %). Antes de este paso se removió la cabeza hasta el primer apéndice torácico; se continuó con la inclusión del material en una mezcla de parafina-xilol, y posteriormente se embebió en parafina para formar un bloque en las placas de inclusión (Humanson, 1972). De cada bloque se obtuvieron cortes longitudinales de 4 μ m utilizando un microtomo de rotación (Leica RM 2125). Una serie de cortes se tiñó con la técnica Hematoxilina-Eosina de Harris (HE) (Humanson, 1972), y la serie de cortes de respaldo se tiñó con la tinción de Fulgen (FE) (Howard et al., 1983) para la prueba confirmativa

de la presencia de tejido testicular. La observación histológica de las gónadas se realizó en un microscopio compuesto Olympus BX50. La interpretación histológica gonadal se basó en los trabajos de Longhurst (1954), y Trentini y Scanabissi (1982). En primer lugar se examinaron las laminillas teñidas en HE señalando las zonas probables de ovarioteses (OT); posteriormente dichos sitios se examinaron en los cortes de respaldo con tinción de Fulgen.

5. Resultados

5.1. Prueba de iniciadores

Las secuencias de la región control de *Triops* amplificadas con los iniciadores diseñados en este trabajo mostraron una similitud del 95.2 al 96.9 % con respecto a *T. longicaudatus* (GenBank No. de acceso NC 006079, genoma completo) y del 68.8 al 69.7 % con *T. cancriformis* (Apéndice 3).

5.2. Análisis molecular

Se analizaron un total de 17 secuencias, 15 del material de estudio (incluyendo material de *Triops* y *Lepidurus*) y dos del GenBank (Apéndice 3). Se detectaron un total de 13 haplotipos diferentes, que corresponden cinco de ellos a la población de Aguascalientes, cuatro a la de Durango, una a la de Torreón, una a Todos Santos y dos a *Lepidurus* (Tablas III y V).

El número de bases de los fragmentos obtenidos se presenta en la Tabla III. El número de bases del fragmento del haplotipo de Torreón es igual al de Aguascalientes, y el de Todos Santos es igual al de Durango. El fragmento de *T. longicaudatus* es del

mismo tamaño que el organismo T11 de Durango con 460 bases. El fragmento de *T. cancriformis* es de 454 bases, siendo el fragmento de menor tamaño.

Las secuencias de los organismos 2T9 y 2T15 de Aguascalientes son el mismo haplotipo, se encuentran dos inserciones y dos supresiones (deletions) respecto al resto de los haplotipos de esta población. El número máximo de bases diferentes entre los haplotipos de Aguascalientes es de diez (Tabla V). En esta población, la distancia Kimura 2-parameter abarcó desde 0.002 hasta 0.022 (Tabla IV). Las hembras de forma corta presentaron el mismo haplotipo, cuya distancia respecto a machos y hembras de forma larga fue igual a 0.022 y 0.020 respectivamente. Los haplotipos de las hembras de forma larga presentaron una distancia de 0.002 y 0.007 respecto a los machos y entre ellas es de 0.004. La distancia entre los dos machos es de 0.004.

En los haplotipos de Durango, los cambios observados son transiciones (Tabla V), y se encontró solo una inserción en el haplotipo T11, T12 y T29 presentaron el mismo haplotipo. La diferencia máxima en el número de bases en Durango es de seis.

La distancia mínima y máxima entre la población de Aguascalientes y la de Durango es de 0.029 y 0.041, que corresponde a una diferencia de 15 y 18 bases respectivamente. El haplotipo de Torreón con respecto a los de Aguascalientes muestra una distancia entre 0.025 y 0.027, mientras que con la de Durango es entre 0.031 y 0.038). La distancia entre el haplotipo de Todos Santos y los de Aguascalientes es entre 0.031 y 0.034, y con respecto al de Durango es entre 0.025 a 0.038. Con respecto a las poblaciones mexicanas, *Triops longicaudatus* y *T. cancriformis* exhibieron distancias entre 0.031-0.055 y 0.396-0.404 respectivamente. El género *Lepidurus* diverge de las poblaciones mexicanas entre 0.672 y 0.704, mientras que con *T. longicaudatus* en 0.664 y 0.56, y *T. cancriformis* en 0.617 y 0.620.

Tabla III. Número y composición de bases de los fragmentos obtenidos de la Región Control del ADNmt de 17 haplotipos encontrados. Las poblaciones estudiadas son: Aguascalientes (2T), Durango (T), Todos Santos, Torreón y Laguna Chapala (*Lepidurus lemmoni*).

Individuo	No. de bases	T	C	A	G	G+C
2T1♂	459	35.5	20.0	35.3	9.2	29.2
2T2♂	458	35.6	19.9	35.4	9.2	29.1
2T5♀	458	35.8	19.7	35.4	9.2	28.9
2T6♀	458	35.4	20.1	35.4	9.2	29.3
2T9♀	458	36.2	19.0	35.8	9.0	28.0
2T15♀	458	36.2	19.0	35.8	9.0	28.0
T7♀	459	35.3	20.5	35.5	8.7	29.2
T11♀	460	35.0	20.7	35.7	8.7	29.4
T12♀	459	35.3	20.5	35.5	8.7	29.2
T18♂	459	35.1	20.7	35.5	8.7	29.4
T29♂	459	35.3	20.5	35.5	8.7	29.2
Todos Santos	460	35.4	20.2	35.7	8.7	28.9
Torreón	458	36.0	19.4	35.2	9.4	28.8
<i>T. longicaudatus</i>	460	35.9	19.3	36.1	8.7	28.0
<i>T. cancriformis</i>	454	38.3	18.3	33.3	10.1	28.4
<i>Lepidurus</i> 1♂	472	37.7	11.0	38.6	12.7	23.7
<i>Lepidurus</i> 2♀	471	37.4	10.8	39.1	12.7	23.5
Promedio	460	36.0	18.8	35.8	9.5	28.2

Los análisis filogenéticos de parsimonia máxima y de 'vecino más cercano' (Neighbor Joining (NJ)) (Figuras 7 y 8) indican monofilia en los siguientes haplotipos: (1) los haplotipos de Aguascalientes y Torreón, (2) los haplotipos de Durango y (3) los haplotipos de Aguascalientes, Torreón y Durango. El haplotipo de Todos Santos es el grupo hermano de los anteriores grupos. El haplotipo de *T. longicaudatus* forma un grupo monofilético con todos los anteriores, lo cual indica que las poblaciones de

América son monofiléticas. La asociación de los haplotipos es consistente con las distancias de Kimura 2-parameter, es decir que las distancias observadas en la matriz de distancias evidencia la ubicación de los organismos en grupos. La forma corta de Aguascalientes tiene un ancestro común con las hembras de forma larga de la misma población, esta agrupación se ha determinado en un 56 y 58 % de los árboles.

5.3. Análisis morfológico

5.3.1. Población Aguascalientes

En el cultivo de la población de Aguascalientes se colectaron 23 “hembras” para analizarlas morfológicamente, tres de estas exhibían un abdomen más largo (morfotipo

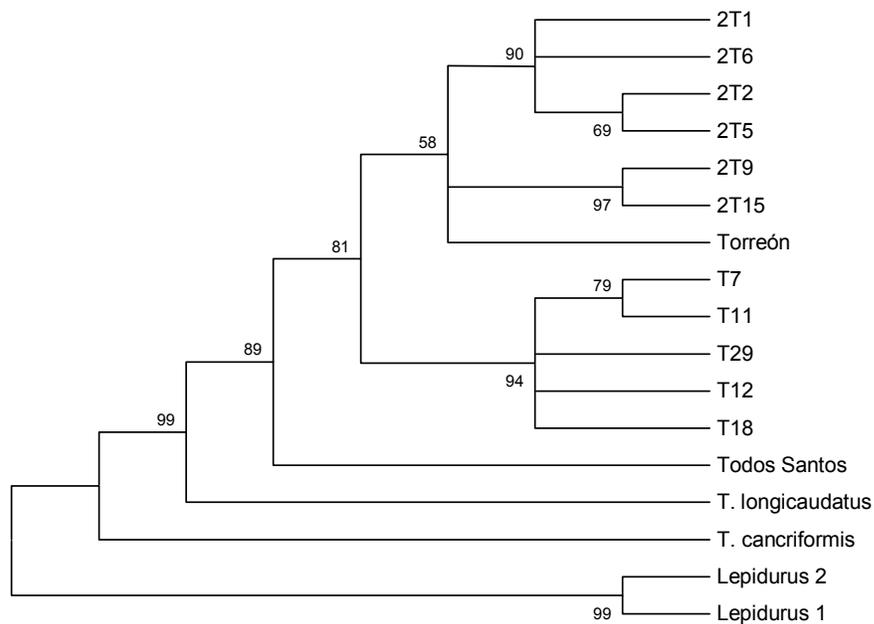


Figura 7. Árbol filogenético con el método de Parsimonia Máxima (Mega 2) (1000 repeticiones). Los valores de bootstrap están dados en cada nodo como porcentajes, 2T = haplotipos de Aguascalientes, T = haplotipos de Durango.

largo) que las demás, mientras que la mayoría presentaron un abdomen corto (morfotipo corto). Solo tres machos fueron encontrados en el tanque de cultivo. Las características morfológicas y los organismos utilizados para análisis histológico y molecular se

muestran en el Apéndice 4. En el ACP no se utilizaron los caracteres morfológicos de armadura de la furca, ni forma del órgano nuczal debido a la baja variación que mostraron, por lo que solo se usaron 18 caracteres.

Aplicando los tres tipos de caracteres morfológicos (cualitativos, merísticos y morfométricos) se encontró que los componentes que representan la mayor variación son 2, para el I es de 40.4 % y para el II es de 23.2 % con una variación total de 63.6 %. Aquí, los caracteres que más contribuyeron a la variabilidad fueron las espinas del sulcus, anillos totales, anillos ápodos, anillos con toracópodos, número de espinas en el último anillo, posición y altura del órgano nuczal para el componente 1; para el componente 2 los variables que más contribuyeron fueron los radios morfométricos Lf/Lc , Lt/Lc , Lf/Lr y Lt/Lf .

Los tres individuos “hembras” denominados como morfotipo largo se mantienen agrupados influenciados por el peso de las variables del componente 1, mientras que los del morfotipo corto están formando un grupo concentrado, excepto por dos individuos que están alejados de este grupo, pero favorecidos por las proporciones morfométricas (Fig. 9).

Analizando solo las proporciones morfométricas (Fig. 10) se tiene que dos componentes representan una variabilidad de 95.6 %: el primero con 68.7 % y el segundo con 26.9 %. En el primer componente los caracteres que dan la variabilidad son la longitud frontal por la longitud del caparazón y la longitud frontal por la longitud de la carina; y para el componente 2 son tres proporciones: la longitud del telson por la

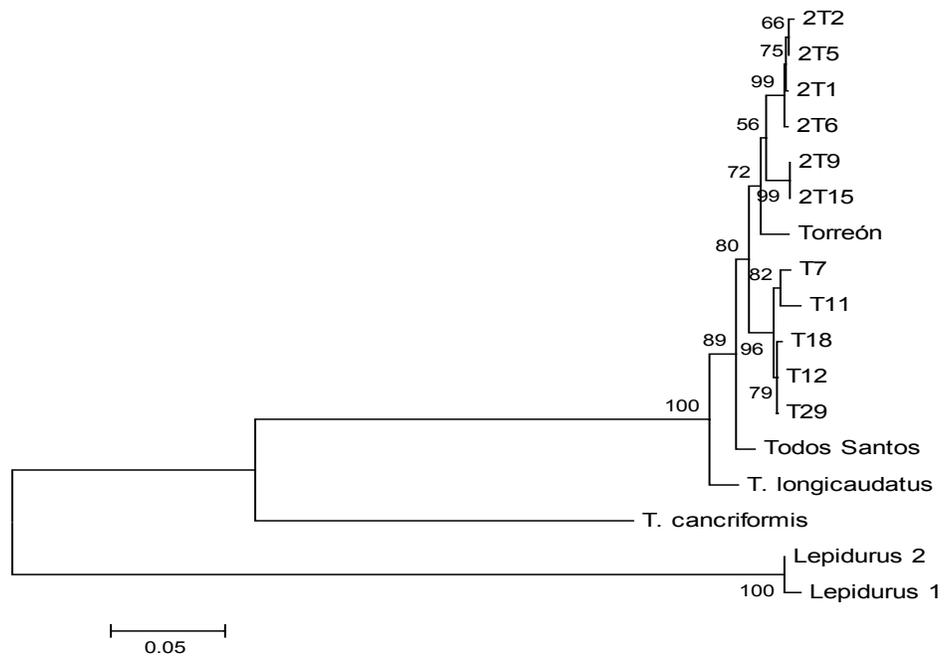


Figura 8. Arbol filogenético con el método de “vecino más cercano” (Neighbor Joining) (Mega 2) (1000 repeticiones). Los valores de bootstrap están dados en cada nodo como porcentajes, 2T = haplotipos de Aguascalientes, T = haplotipos de Durango.

Tabla IV. Distancias genéticas (Kimura 2-parameter) y diferencia del número de bases entre las secuencias de los organismos estudiados. L indica hembra de Aguascalientes de forma larga, c indica hembra de Aguascalientes de forma corta. Tlong = *Triops longicaudatus*, Tcr = *Triops cancriformis*, L1 = *Lepidurus*, L2 = *Lepidurus* 2 y T. S. = Todos Santos.

Organismos	2T1 ♂	2T2 ♂	2T5 ♀l	2T6 ♀l	2T9 ♀c	2T15 ♀c	T7 ♀	T11 ♀	T12 ♀	T18 ♂	T29 ♂	T. S.	Torreón	Tlong	Tcr	L1 ♂	L2 ♀
2T1♂		2	1	1	9	9	15	17	13	14	13	14	11	21	137	198	200
2T2♂	0.004		1	3	10	10	16	18	14	15	14	15	12	22	137	199	201
2T5♀l	0.002	0.002		2	9	9	15	17	13	14	13	14	11	21	137	198	200
2T6♀l	0.002	0.007	0.004		9	9	15	16	13	14	13	14	11	21	136	198	200
2T9♀c	0.020	0.022	0.020	0.020		0	16	18	14	15	14	14	11	21	136	194	196
2T15♀c	0.020	0.022	0.020	0.020	0.000		16	18	14	15	14	14	11	21	136	194	196
T7♀	0.034	0.036	0.034	0.034	0.036	0.036		6	4	5	4	15	14	22	139	196	199
T11♀	0.038	0.041	0.038	0.036	0.041	0.041	0.013		6	7	6	17	17	24	139	198	201
T12♀	0.029	0.031	0.029	0.029	0.031	0.031	0.009	0.013		1	0	11	14	18	137	195	198
T18♂	0.031	0.034	0.031	0.031	0.034	0.034	0.011	0.015	0.002		1	12	15	19	136	195	198
T29♂	0.029	0.031	0.029	0.029	0.031	0.031	0.009	0.013	0.000	0.002		11	14	18	137	195	198
T.santos	0.031	0.034	0.031	0.031	0.031	0.031	0.034	0.038	0.025	0.027	0.025		14	14	135	194	196
Torreón	0.025	0.027	0.025	0.025	0.025	0.025	0.031	0.038	0.031	0.034	0.031	0.031		20	137	197	199
Tlong	0.048	0.050	0.048	0.048	0.048	0.048	0.050	0.055	0.040	0.043	0.040	0.031	0.045		135	191	193
Tcr	0.397	0.398	0.398	0.394	0.393	0.393	0.403	0.404	0.396	0.392	0.396	0.388	0.397	0.385		183	184
L1♂	0.681	0.690	0.684	0.684	0.662	0.662	0.670	0.679	0.664	0.689	0.664	0.657	0.679	0.643	0.609		2
L2♀	0.690	0.699	0.693	0.693	0.670	0.670	0.684	0.693	0.679	0.675	0.679	0.665	0.687	0.651	0.612	0.004	

Tabla V. Sitios variables de las secuencias de las poblaciones mexicanas estudiadas. TS = Todos Santos, Tr = Torreón, 2T = Aguascalientes y T = Durango.

	Posición de bases																																			
	23	29	32	33	36	38	40	42	100	119	136	137	149	150	177	181	250	258	259	285	286	311	322	323	324	337	368	379	387	412	423	454	466	481		
	C	T	G	G	G	T	T	A	C	T	C	T	C	A	C	C	T	A	G	T	C	A	T	T	T	C	G	T	T	C	G	C	G	A		
2T1																																				
2T2		C							T																								-			
2T5									T																								-			
2T6																								C									-			
2T9											G		T		T	T			A				A											T	A	C
2T15											G		T		T	T			A				A											T	A	C
T7				A	A	C	C							G				G	A	C	T	C	A				A			T		T		C		
T11			A		A	C	C	G						G			C		A	C	T	C	A	A			A			T		T		C		
T12					A	C	C			C				G					A		T	C	A				A			T		T		C		
T18					A	C	C			C				G					A		T	C	A		C		A			T		T		C		
T29					A	C	C			C				G					A		T	C	A				A			T		T		C		
Tr.										C	T	C		G					A		T		A			T	A	C	C		A	T		C		
T.S.	T							T			A			G				G					A					C		T		T	A	C		

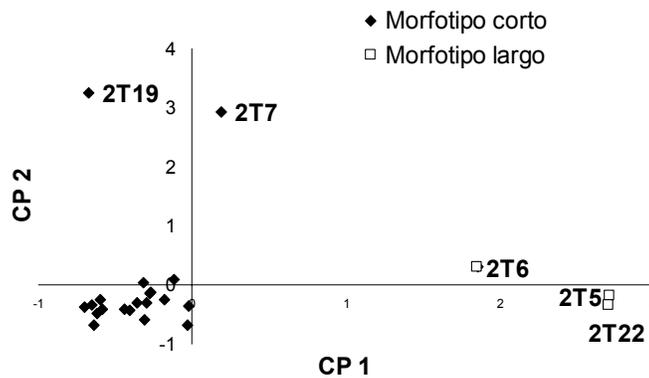


Figura 9. Análisis de los tres tipos de caracteres de la población de Aguascalientes.

longitud del caparazón, longitud del telson por la longitud frontal y la longitud del telson por la longitud de la carina. De esta manera, las “hembras” del morfotipo largo continúan agrupadas y se ven influenciadas por las variables de ambos componentes; las dos “hembras” del morfotipo corto se muestran separadas aun de la mayoría de las otras.

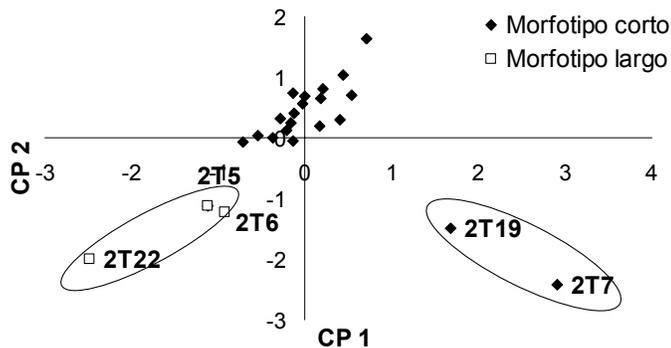


Figura 10. Análisis de las proporciones morfométricas de la población de Aguascalientes.

En base al análisis de los caracteres merísticos (Fig. 11), los dos primeros componentes explican el 83.4 % de la variación, el primero con 70.7 % y el segundo con 12.6 %. Los caracteres que proporcionan variación en el componente 1 son los

anillos ápodos y los anillos totales; en el componente 2 es el número de toracópodos. Las “hembras” del morfotipo largo no se agrupan aparte de las demás “hembras”, con estos datos tampoco se logran separar las hembras del morfotipo corto que en las gráficas anteriores se mostraban aisladas del resto.

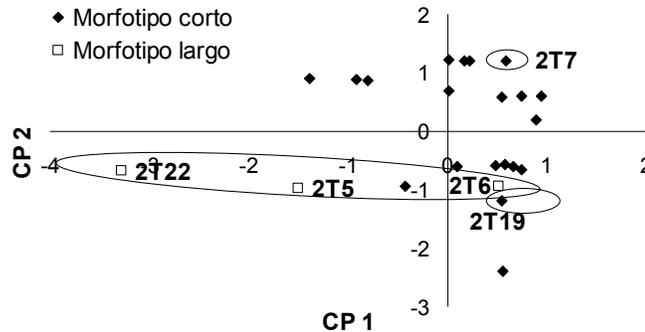


Figura 11. Análisis de caracteres merísticos.

En ACP aplicado a los caracteres morfológicos se obtienen tres componentes que dan una varianza acumulada de 79.0; el primero explica 37.9 % de la variabilidad y los otros dos con una variación semejante: 20.8 y 20.3 %. Las variables que contribuyen a la variación en el componente 1 son la posición y altura del órgano nuczal, en el componente 2 es la superficie del caparazón y en el tres es la forma del sulcus. Con esto se obtiene una agrupación de los organismos de la forma larga distante de los de la forma corta, estando ellos representados por las variables del componente 1. La mayoría de las hembras de forma corta tienen cualidades cercanas al promedio; pero en solo tres de ellas contribuye el componente 2, separándose del resto; esto es graficando el componente uno contra el dos (Figura 12).

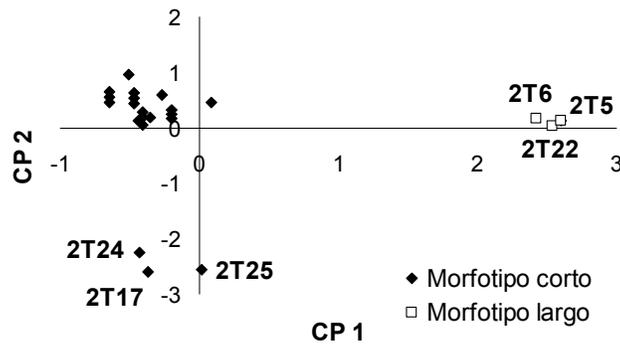


Figura 12. Análisis de caracteres morfológicos, Graficación del componente 1 y 2.

5.3.2. Población de Durango

De la población de Durango se colectaron 24 “hembras” y 16 machos, solo se tomaron 21 “hembras” para la caracterización. Preliminarmente no se detectaron distintos tipos de “hembras”. Analizando los tres tipos de caracteres se tiene que los tres primeros componentes representan una varianza acumulada de 50.5 %, el primero con 20.1 %, el segundo con 18.7 % y el tercero con 11.7 %. En el componente uno las proporciones Lt/Lc, Lt/Lf y Lt/Lr son las que determinan la variación; en el segundo componente son las proporciones Lr/Lc, Lf/Lc y Lf/Lr. No se pueden discernir grupos aislados entre todas las hembras al graficar el componente 1 con el 2 (Fig. 13).

Al emplear las proporciones morfométricas los componentes 1 y 2 tienen una varianza acumulada de 94.0 %, del cual el CP 1 es de 49.0 % y el 2 es de 44.9 %. Para el componente 1 las proporciones que expresan contribución son Lf/Lc y Lf/Lr; y para el 2 son Lt/Lc, Lt/Lf y Lt/Lr. De esta forma en la grafica (Fig. 14) no se observa un patrón de agrupamiento aunque el organismo 19 se encuentra alejado de los demás, al igual que en la grafica anterior.

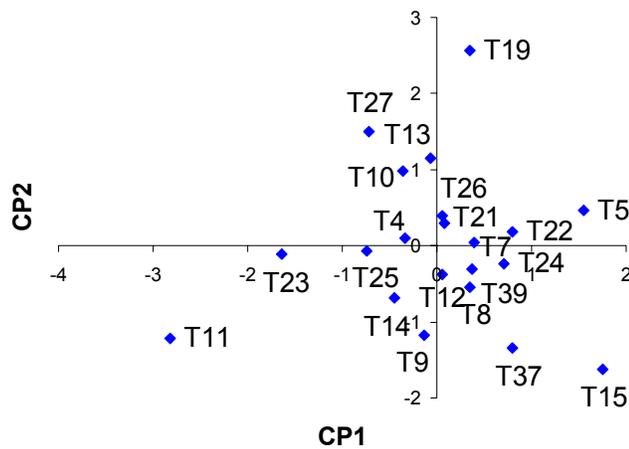


Figura 13. Análisis de los tres tipos de caracteres de la población de Durango, gráfica de los componentes 1 y 2.

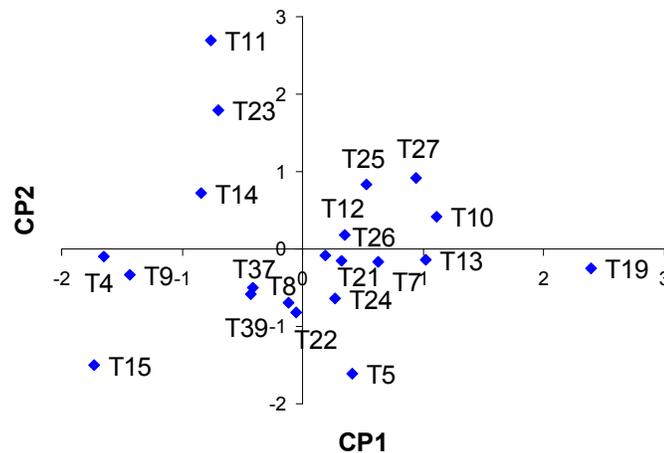


Figura 14. Análisis de caracteres morfométricos de la población de Durango.

En la gráfica de los datos merísticos (Fig. 15), la suma acumulada para los dos componentes de mayor variabilidad es de 58.2 %, en los cuales se tiene 33.8 y 24.3 % respectivamente. La variable que contribuye en el componente uno es el número de anillos ápodos; mientras que en el dos son los anillos totales y los anillos con toracópodos.

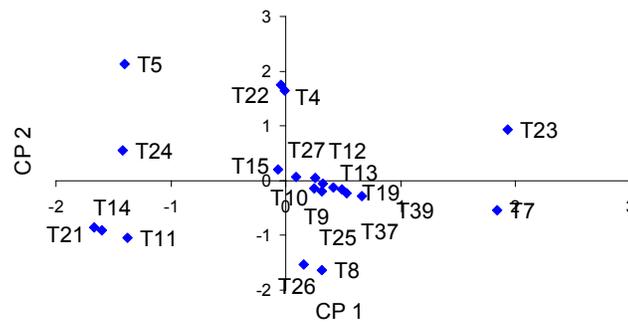


Figura 15. Análisis de caracteres merísticos de la población de Durango.

Obteniendo el ACP para los caracteres cualitativos se determinó que los dos primeros componentes representan una variación del 58.7 %, con 31.3 y 27.5 % respectivamente. En el componente 1 la forma del sulcus determina la variabilidad y en el 2 es la altura del órgano nucal; esto genera que en la gráfica (Fig. 16) se distingan varios grupos.

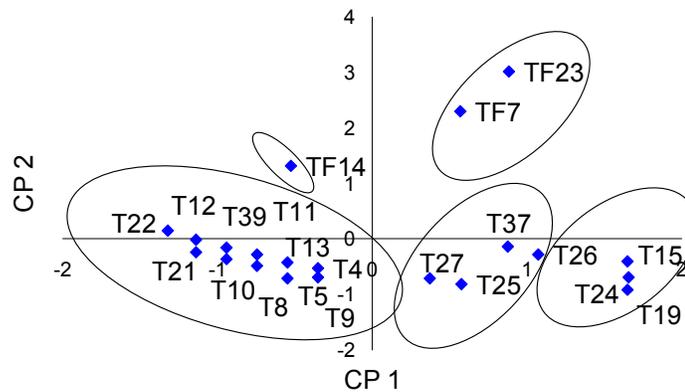


Figura 16. Análisis de caracteres cualitativos de la población de Durango.

5.3.3. Comparación de las dos poblaciones en análisis de componentes principales

Con los mismos caracteres usados anteriormente se realizó el ACP en el total de los organismos de las dos poblaciones. Al emplear todas las variables, en el primer componente se obtuvo un 38.0 % de variación y en el segundo un 16.2 %, con lo que se

tiene 54.2 % de variación acumulada. Las variables que proporcionan variación en el primer componente son: espinas del sulcus, anillos totales, anillos ápodos, número de toracópodos, espinas del último anillo, forma de la superficie de la carina y altura del órgano nuczal; en el componente 2 se encuentra la posición del órgano nuczal y las proporciones Lr/Lc , Lf/Lc , Lf/Lr . En la figura 17 de la gráfica de los dos componentes, las dos poblaciones se encuentran separadas a lo largo del primer componente, excepto las “hembras” de del morfotipo largo cuya variabilidad las ubica entre las características intermedias. En la figura 18 se presenta la distribución que tienen los organismos de ambas poblaciones al analizar los datos morfométricos. La suma de la varianza de los dos componentes es de 85.1 %, donde el primero es de 49.7 % y el segundo de 35.5 %. En este caso, para el primer componente la proporción que contribuye a la variación es Lf/Lc y Lf/Lr ; y para el segundo es Lt/Lc y Lt/Lr ; por lo tanto, hay organismos de ambas poblaciones cuyas medidas tienen semejanza.

En la figura 19 de la gráfica de ACP de los caracteres merísticos tampoco hay una separación total de cada población; la contribución de variabilidad para el componente 1 es de 70.4 % y para el 2 es de 15.0 %; y para la acumulada es de 85.4 %. Con el análisis aplicado a los datos cualitativos (Fig. 20), se logra separar a ambas poblaciones, aunque existen individuos que pueden compartir atributos con la otra población a lo largo del componente 1. Las “hembras” del morfotipo largo de Aguascalientes se separan del resto de la población con respecto al componente 1. También hay 3 hembras de la población de Durango que se separan de esta población y cuyas características pueden ser similares a las hembras del morfotipo largo de Aguascalientes; estos organismos se encuentran dispersos en la gráfica de los caracteres merísticos, mientras que en las demás gráficas se encuentran juntos pero dentro del conglomerado de la población.

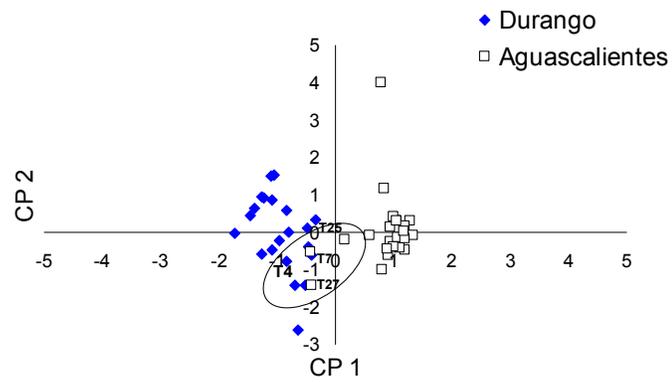


Figura 17. Análisis de los tres tipos de caracteres aplicado a las dos poblaciones.

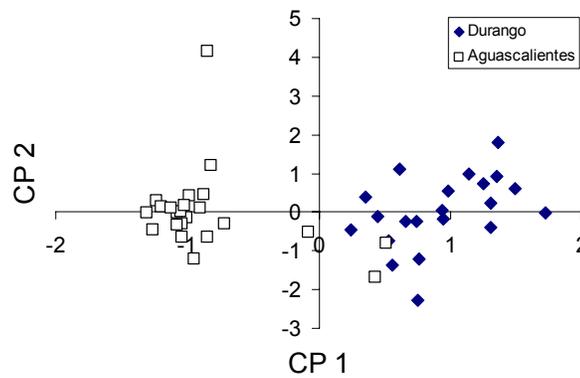


Figura 18. Análisis de los caracteres morfométricos en ambas poblaciones.

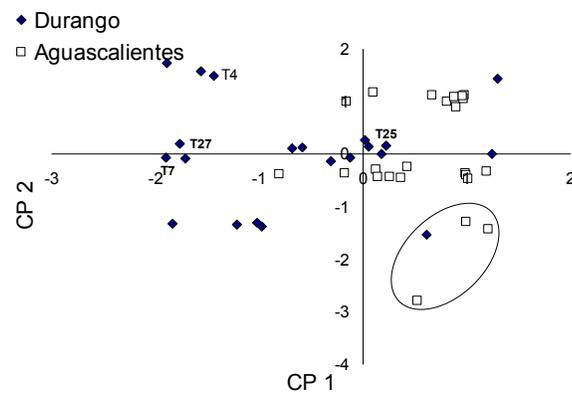


Figura 19. Análisis de los datos merísticos de ambas poblaciones.

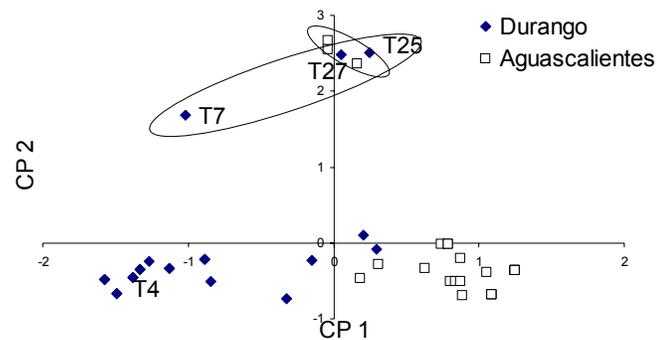


Figura 20. Análisis de los datos morfológicos en las dos poblaciones.

Teniendo en cuenta que en la población de Durango se encontraron “hembras” y machos de un solo tipo y que en la población de Aguascalientes hay tres tipos de organismos: “hembras” de forma corta, “hembras” de forma larga y machos de un solo tipo (ACP, análisis gonadal y molecular), los caracteres morfológicos merísticos analizados a través de la media, desviación estándar, mínimos y máximos, se comparan de la siguiente manera: “hembras” de Durango y “hembras” de forma larga de Aguascalientes, hembras de Durango y “hembras” de forma corta de Aguascalientes, “hembras” de forma larga y “hembras” de forma corta de Aguascalientes y machos de Durango con machos de Aguascalientes (Figs. 24 a la 29 y Apéndice 5).

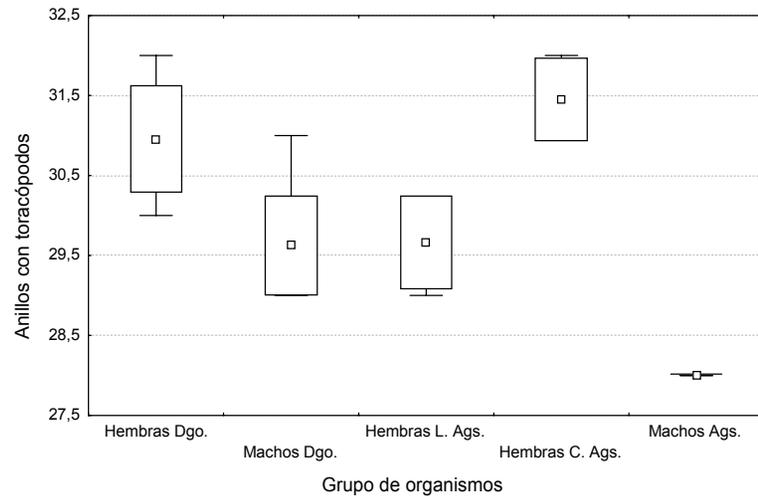
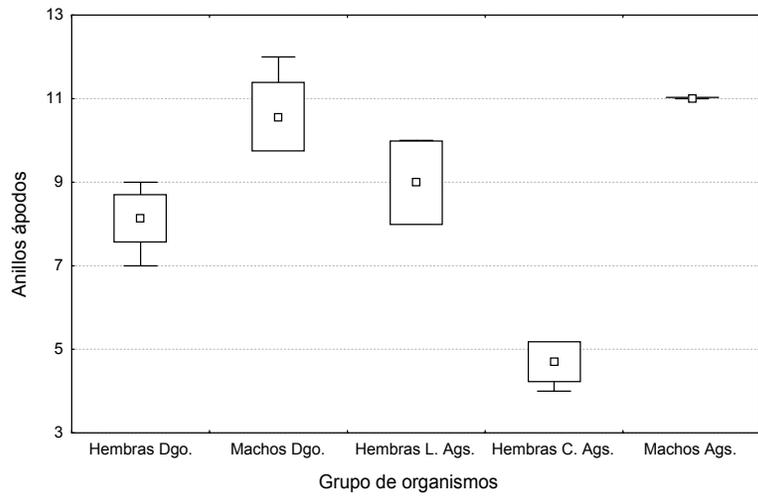
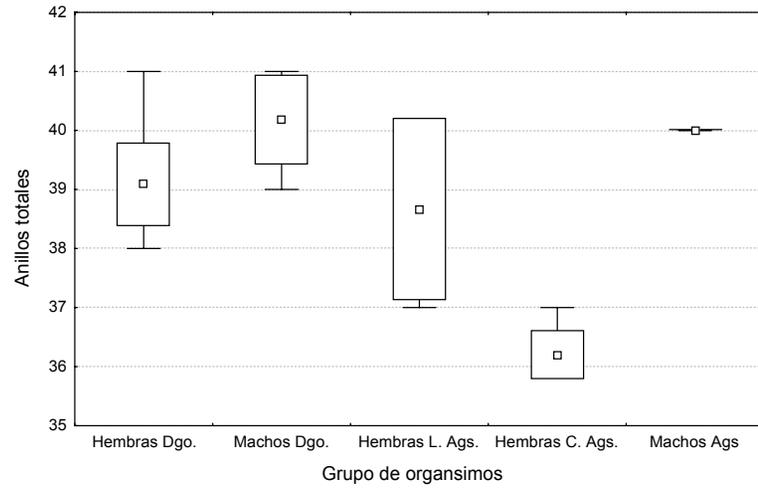
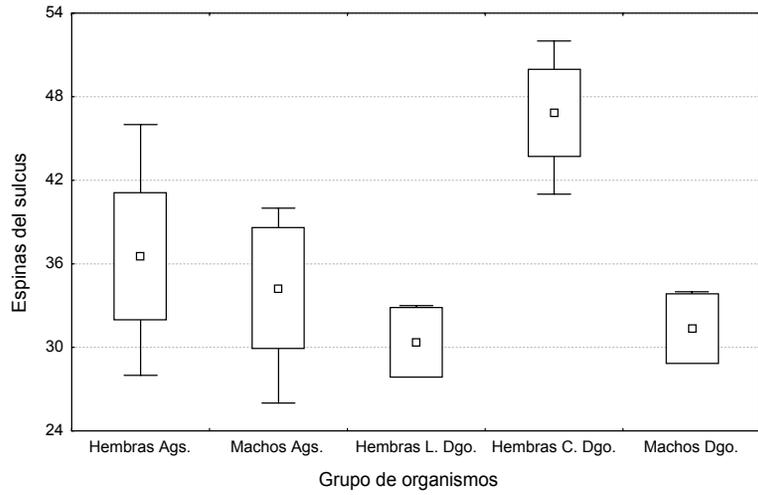
Al comparar el grado de semejanza de los 6 caracteres, se observa que entre la “hembra” de forma larga de Aguascalientes y la “hembra” de Durango hay cinco caracteres con valores semejantes entre estas dos formas, mientras que la diferencia se encuentra en el número de anillos con toracópodos, con una media de 29.6 en las “hembras” de Aguascalientes y de 31.0 en las de Durango. Entre las “hembras” de forma corta de Aguascalientes y las “hembras” de Durango únicamente hay similitud en la cantidad de anillos con toracópodos (carácter con el cual hay diferencias en las “hembras” de forma larga y la de Durango), con 31.0 en las de Durango y 31.5 en las

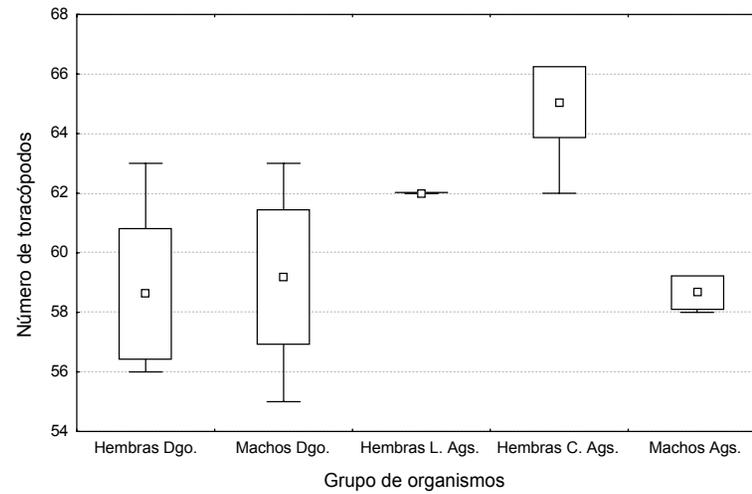
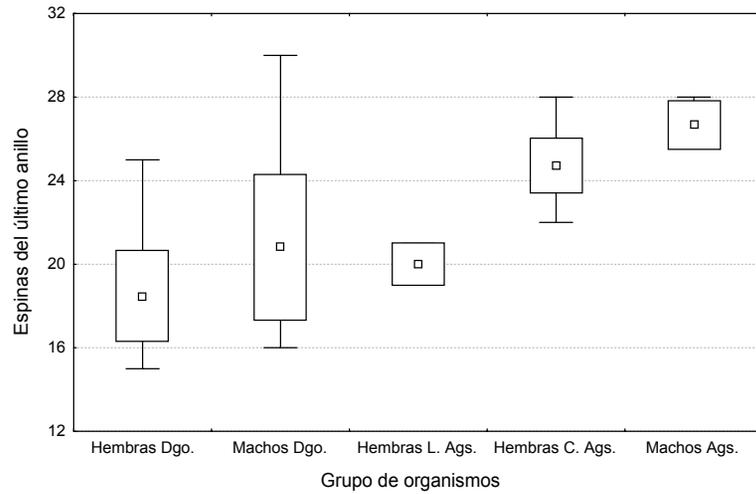
formas cortas de Aguascalientes; los cinco caracteres restantes no tienen semejanza. Consistente con la similitud morfológica de las “hembras” de forma larga y las de Durango, es la similitud morfológica de los machos de las dos poblaciones en los que cinco caracteres son iguales, excepto el número de anillos con toracópodos. Mientras que los machos de las dos poblaciones difieren en el número de anillos con toracópodos, las “hembras” de forma larga y los machos de Durango muestran la misma cantidad.

5.3.4. Análisis histológicos

Los cortes de la mayoría de los organismos de Durango mostraron necrosis. Solo en los cortes del organismo T15 se distinguieron amplias zonas de conductos foliculares conectadas a los oviductos longitudinales, así como también zonas germinales de los conductos foliculares; en los oviductos se observaron numerosos ovocitos inmersos en la materia formadora de la concha y folículos (tétradas) en diferente estado de maduración. No se encontraron evidencias de tejido testicular.

La cantidad de “hembras” utilizadas para el análisis gonadal de la población de Aguascalientes fue de 18 (Tabla VI). En 15 de ellas se observaron zonas de ovariotestes entre las células de los conductos foliculares, las cuales se encontraron esparcidos en toda la zona gonadal; se nota una constante producción de folículos y los oviductos se muestran llenos de ovocitos; estas hembras pertenecen al morfotipo corto. En las hembras del morfotipo largo no se encontraron evidencias de tejido testicular; se observó la producción de folículos y los oviductos con ovocitos.





Figuras 20–25. Gráficas de la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos de los caracteres merísticos. Se indican los grupos encontrados en cada población: las “hembras” y machos de Durango; “hembras” de forma larga, hembras de forma corta y machos de Aguascalientes.

Tabla VI. Observaciones de la presencia o ausencia de ovariotestes. Prueba presuntiva HE y confirmativa FG de las gónadas de las “hembras” de Aguascalientes: presencia (+) y ausencia (-).

Organismos	HE	FG
2T3	+	+
2T4	+	+
2T5	-	-
2T6	+	-
2T7	+	+
2T8	+	+
2T9	+	+
2T10	+	+
2T11	+	+
2T12	+	+
2T13	+	+
2T14	+	+
2T15	+	+
2T16	+	+
2T17	+	+
2T18	+	+
2T19	+	+
2T20	+	+

6. Discusión

Las secuencias obtenidas de la región control muestran diferentes tamaños; las de las poblaciones de estudio presentaron 458, 459 y 460 bases; y en *Lepidurus* con 472 y 471. Junto con esto, la variación en cuanto a supresiones e inserciones es notable en los organismos de la población de Durango, donde hay de uno a siete cambios de nucleótidos, mientras que en la de Aguascalientes se distinguen dos grupos con menos de tres cambios en uno y en el otro es de cero. Si se consideran tres especies en las poblaciones de estudio, la tasa de evolución vista en la región control parece ser rápida a este nivel. Entre *T. longicaudatus* proveniente de una población de Estados Unidos y de las poblaciones mexicanas los cambios en nucleótidos van de 14 a 24. Comparando *T. longicaudatus* y *T. cancriformis* se encontró que la diferencia es de 135 nucleótidos,

mientras que estos dos en relación con *Lepidurus* presentaron de 183 a 193 cambios. Con el gen 16S ARNr en un fragmento de 492 bases, el número de bases de diferencia entre *T. longicaudatus* del estado de Zacatecas y *T. cancriformis* es de 44, entre *T. cancriformis* y *Lepidurus lemmoni* del estado norteamericano de California es de 63. Con el gen 12S ARNr, *T. longicaudatus* y *T. cancriformis* es de 69, y entre *T. cancriformis* y *Lepidurus lemmoni* es de 100 en un fragmento de 570 bases, mientras que dentro de las poblaciones mexicanas estudiadas por Murugan et al. (2002), las diferencias que se registran en las poblaciones mexicanas es de uno a dos pares de bases en el gen 16S y de uno a nueve para el gen 12S. Estos autores también encontraron que dos entidades estudiadas que difieren morfológica y reproductivamente mostraron tan solo tres bases de diferencia en el fragmento del gen 12S y de dos bases en un fragmento del gen 16S. En el análisis de la región control de dos especies del género *Erebia* (Lepidoptera) en las que se suponía bienalismo y asincronía en sus ciclo de vida en una respecto a la otra, dando como resultado nula introgresión, se descubre una simpatria de modo que en cada cohorte de cada especie, no se detectan haplotipos diferentes a los encontrados en la misma población. Dentro de tres poblaciones de cada especie las similitudes son de 0.003 a 0.011 (Kimura 2-parameter) en *E. triaria* y de 0.000 a 0.006 en *E. palarica*, mientras que a nivel interespecífico hay una distancia promedio de 0.118 (Vila et al., 2004b). Por lo tanto la delimitación de especies con la región control se puede determinar usando mayor cantidad de diferencia de bases que con los fragmentos 12S o 16S, con lo cual a nivel intraespecífico se pueden distinguir subespecies o bien cuando el estado de caracter definido en entidades con diferencias morfológicas notables es mínimo al emplear genes con baja tasa de evolución y que no ayudan a delimitarlas como especies. Dentro de la especie *Semibalanus balanoides*

(Crustacea) al usar un fragmento de la región control de 107 pares de bases de dos sistemas de bahía: Damariscota, Maine y Narragansett Bay, Rhode Island, con aproximadamente 250 Km. de distancia entre los dos y con flujo continuo al mar, se ha detectado un flujo genético extensivo entre estas dos poblaciones (Brown et al., 1979); en este fragmento de 107 bases el número de estas con cambios ha sido de 1 a 10 entre las dos poblaciones. Extrapolando el fragmento de *Semibalanus balanoides* (107pb) a 472 pb tal como el largo de la secuencia de *Lepidurus* de este estudio se determina que la diferencia de bases podría ser de 4 a 44; este intervalo abarca la cantidad de bases encontradas que cambian entre las poblaciones mexicanas y *T. longicaudatus* de Estados Unidos (de 11 a 18 bases de diferencia). De la misma manera, comparando la diferencia de 13 y 21 bases entre estas poblaciones y una población de Alaska de la misma especie se puede estimar que en un fragmento de 470 bases la diferencia entre estas poblaciones podría ser de 57 a 92 sitios, mostrando posiblemente el límite de esta especie de *Semibalanus balanoides*; con esto se observa que la diferencia de bases en las poblaciones de México es inferior a este intervalo, lo que sugiere que podrían pertenecer a la misma especie filogenética. En la especie de *Semibalanus balanoides* existe flujo de genes entre las dos poblaciones y hay una marcada divergencia genética (Brown et al., 1979), sin embargo, en la población de Aguascalientes donde hay entre 9 y 10 sitios divergentes se pueden distinguir dos entidades diferentes en reproducción y morfología. La distancia promedio en la población de *Semibalanus balanoides* de Maine es de 0.049 y de 0.065 en Rhode Island, y entre las dos es de 0.058. En base a esto, los morfotipos de Aguascalientes podrían formar un linaje con diferentes morfotipos

En el lago Michigan se registran las especies nominales *Daphnia pulex* y *Daphnia pulicaria* donde cada una se encuentra en diferentes hábitats, sin embargo entre estas ocurre un flujo de genes continuo y sufren una divergencia incompleta (Dudycha, 2004); la distancia dentro de cada especie nominal es de 0.000 a 0.064 (*D. pulex*), de 0.000 a 0.076 (*D. pulicaria*) y de 0.000 a 0.071 entre las dos (secuencias de la región control); estos índices se asemejan a lo encontrado dentro y entre de las poblaciones mexicanas y con *T. longicaudatus*.

En las poblaciones de Aguascalientes y Durango se esperaba encontrar polimorfismos en cuanto a morfología y reproducción, sin embargo en Durango se encontraron hembras con las mismas características morfológicas en las cuales no hubo distinción de grupos morfológicos (ACP); por la falta de evidencias de ovariotestes en el análisis gonadal se deduce que es una entidad gonocórica. En la población de Aguascalientes se obtuvieron tres hembras de la forma larga en las que se no se registraron ovariotestes por lo que puede tratarse de hembras gonocóricas, mientras que las hembras de forma corta que forman la mayor cantidad de individuos presentaron ovariotestes indicando ser anatómicamente hermafroditas. Por lo tanto se confirma que la población de Aguascalientes es polimórfica. El ACP discriminó a ambas entidades, sin embargo estas presentaron una distancia de Kimura de 0.020, la cual es relativamente baja en relación con lo que se muestra entre *T. cancriformis* y *T. longicaudatus* con 0.385. Cada grupo de hembras de la población de Aguascalientes podría constituir una especie de reciente divergencia dado que entre los machos y las hembras gonocóricas tienen mayor similitud que las uniparentales. No se conoce si existe entrecruzamiento entre los machos y las hembras uniparentales, para esto se tendría que observar la ocurrencia de apareamiento por el macho, la viabilidad de sus

quistes y la proporción de sexos en la descendencia, todo esto con el fin de determinar la ocurrencia de un sistema androdioico. La aparente baja distancia genética observada entre los dos sistemas reproductivos parece indicar que no existe un sistema androdioico; una hembra anfigénica al realizar entrecruzamiento o autofecundación daría por descendencia a hembras y machos con el mismo haplotipo, lo mismo sucedería con las hembras monogénicas. Hace falta secuenciar una gran cantidad de “hembras” uniparentales de la misma población de Aguascalientes para encontrar posibles haplotipos, semejantes al de los machos con lo que se determinaría la existencia de una especie androdioica. Otra posibilidad sería que en el mismo sitio están presentes dos especies con mínimas distancias en la región control.

Con el análisis filogenético usando parsimonia máxima y el método NJ, se determinó que las dos poblaciones de interés tienen un ancestro común. La secuencia de Torreón está agrupada con los organismos de Aguascalientes, se esperaba que se posicionara externo a las dos poblaciones. El organismo de Todos Santos es la secuencia más cercana a la monofilia de las dos poblaciones. En el filograma, *T. longicaudatus* está estrechamente relacionado con las poblaciones mexicanas, en comparación con *T. cancriformis*. Las proporciones de *T. longicaudatus*, *T. cancriformis* y *L. lemmoni* representan grandes distancias que podrían deducir las relaciones de género y especies entre estos organismos. La asociación de los organismos de cada una de las poblaciones es consistente con las distancias de Kimura 2-parameter, es decir que las distancias observadas en la matriz de distancias evidencia la ubicación de los organismos en grupos. La forma corta de Aguascalientes tiene un ancestro común con las hembras de forma larga de la misma población, esta agrupación se encontró 56 a 58 % de los árboles. Con el uso de Máxima Parsimonia y Neighbor Joining se confirma relación

genética sobre los dos morfotipos en Aguascalientes; inesperadamente se determina que el haplotipo de Torreón está más relacionado con la población de Aguascalientes que con la de Durango a pesar de la corta distancia geográfica que existe con la última. Murugan et al. (2002) señalaron que las poblaciones americanas de *Triops* forman un grupo monofilético; en el presente trabajo se confirma lo anterior (Fig. 7 y 8); el análisis filogenético sugiere una reciente divergencia a partir de un ancestro relacionado a *T. longicaudatus*, ya que incluso el organismo de Todos Santos ubicado en la península de Baja California, tiene pequeñas distancias con las del continente.

La tasa evolutiva en el género *Triops* puede ser mínima en relación a genes mitocondriales, sin embargo en otros géneros de crustáceos se han encontrado grandes diferencias entre dos poblaciones de la misma especie taxonómica (*Balanus balanoides*) (Brown et al., 2001). La región control puede ser útil en el estudio de procesos poblacionales debido a la presencia de distintos haplotipos en una misma población y a la aparente evolución rápida de sus nucleótidos (Avise et al., 1987).

En la localidad de Durango se obtuvieron evidencias de que se trata de una población gonocórica con una proporción de sexos de 1:1. Probando la variabilidad de los caracteres morfológicos en el ACP no se encontraron grupos aislados tal como se observó en la población de Aguascalientes. Al realizar un ACP solo a las hembras del morfotipo largo y las de Durango se observa que los dos primeros eigenvalores no representan variabilidad suficiente para separar ambos grupos de hembras, ya que las variables que contribuyen no influyen la formación de grupo.

A pesar de que la forma corta (hermafrodita) y la forma larga (gonocórica) de Aguascalientes son genéticamente similares, solo son altamente semejantes en dos características morfológicas (Figs. 24 a la 29), A este respecto, Sassaman et al. (1997)

encontraron tres tipos de poblaciones de *T. longicaudatus* en Estados Unidos: (1) población con proporción de sexos iguales, (2) población con ausencia de machos y (3) poblaciones compuestas de machos y dos tipos de “hembras”. Los dos tipos de “hembras” mostraban diferencias en cuanto al número de los anillos totales, anillos con toracópodos y ápodos, ellos reconocieron a estas diferencias como sutiles. Las “hembras” de forma larga y corta de Aguascalientes muestran un patrón similar a lo encontrado por Sassaman en cuanto a los caracteres mencionados (Apéndice 5). En este trabajo, los rangos de variación en cada tipo de hembra, aunque son similares, son distintivos de cada forma y no se sobreponen con las propiedades de la otra. Apoyado en análisis filogenéticos, menciona que ambas entidades forman dos especies. Por la semejanza morfológica entre la población gonocórica de Durango y la forma larga de Aguascalientes, así como en la morfología de los machos, se puede suponer que una población proviene de la otra y que cada una ha sufrido divergencia genética; el rango de variabilidad entre las dos (0.029-0.034) es inferior al intervalo comprendido por *T. longicaudatus*, *T. cancriformis* o *L. lemmoni*.

En base a análisis de proporción de sexos y filogenia en el grupo Conchostraca (Familias Limnadiidae, Cyzicidae, Leptestheridae y Cyclestheriidae), Sassaman (1995) sugiere que la uniparentalidad (hermafroditismo o partenogénesis) ha derivado de una condición ancestral gonocórica, y que en este grupo se ha manifestado cuatro veces en diferentes familias. Con los análisis anteriores, Sassaman llevó a cabo un análisis de herencia de genes ligados al sexo para inferir modelos de mecanismos que determinan el sexo en los sistemas gonocóricos, androdioicos y uniparentales. En las especies gonocóricas se indica que las hembras son heterocigóticas para uno o algunos factores genéticos que especifican el sexo. Esos factores se expresan de manera diferente en las

especies androdioicas (donde las hembras son capaces de autofertilización) para producir dos fenotipos de hembras, una heterocigótica y otra homogamética. Diferentes factores (“selección natural”) podrían favorecer a las hembras homocigóticas de las especies androdioicas para crear una condición uniparental; por lo que este mecanismo evolutivo podría explicar los casos de unisexualidad en los conostracos. No se puede descartar la posibilidad que mecanismos de este tipo originaron la condición hermafrodita en la población de *Triops* de Aguascalientes

La divergencia genética sugiere que el inicio de la uniparentalidad en la población de Aguascalientes es reciente; parece poco probable que haya hibridación entre las dos formas; en este estudio no se detectaron machos con un haplotipo semejante los uniparentales, por lo que parece es importante realizar estudios más detallados y determinar si la existencia de un sistema androdioico o que la androdioecia (sensu Sassaman, 1991) haya sido un estado reproductivo intermedio.

Las hembras gonocóricas de Aguascalientes formaron un grupo monofilético en los árboles, donde también se incluye al haplotipo de Torreón. Sin considerar a los hermafroditas por sus diferencias morfológicas, las dos poblaciones de hembras presentan similitudes morfológicas al igual que los machos de las dos poblaciones (ACP, gráficas de medias y desviación estándar). Las diferencias observables en el número de anillos con toracópodos pueden ser variantes a nivel interpoblacional. Se desconoce si se puede dar entrecruzamiento entre ellas, aunque el único aislamiento reproductivo puede darse por una barrera geográfica. Podría estarse llevando a cabo un fenómeno de especiación alopátrica, que de acuerdo al concepto de especie evolutiva (Simpson 1961), forman dos linajes con mínimas diferencia morfológicas, además, están aisladas reproductivamente. En el caso de conocerse la probabilidad de cruce

entre estas dos poblaciones, podremos aclarar que constituyen la misma especie biológica (Dobzhansky, 1937 en Avise, 1993), que de acuerdo a la interpretación de Mayr (1963 en Nuñez y Eguiarte, 1999) sobre este concepto, la especie esta formada de poblaciones con una realidad y cohesión genética donde los individuos poseen las cualidades para conformar una unidad reproductiva, ecológica y genética y por lo tanto, “son grupos de poblaciones naturales donde se da el entrecruzamiento y se reproducen aisladamente de otros grupos”. Los organismos gonocóricos y hermafroditas de Aguascalientes parecen haber tenido un ancestro común; los dos grupos muestran diferencias morfológicas y reproductivas, ambos se correlacionan aún con una mínima divergencia genética, lo que muestra la presencia de dos linajes con su propia identidad con sus propias tendencia evolutivas e históricas (Wiley, 1978 en Nuñez y Eguiarte, 1999) por lo que pueden formar dos especies en el sentido del concepto de especie evolutiva de acuerdo a la interpretación de Wiley: “es el único linaje de poblaciones ancestros descendientes que conservan su identidad ajena a otros linajes y tienen sus propias tendencias evolutivas y destino histórico”

7. Conclusiones

-Los iniciadores diseñados “en avance” T12S 5-GCGACGGCTGGCACGATTT-3 y “en reversa” TILE1 5-TATCAAGGTAATCCTTTTTATCAG-3 y TILE2 5-ACCCTATCAAGGTAATCCTTTTT-3, funcionan para la amplificación de la región control del ADN mitocondrial en los notostracos.

-Esta tesis presenta las primeras secuencias de la región control de *Triops* procedentes de poblaciones mexicanas.

-La región control en los notostracos muestra mayor variabilidad que los genes mitocondriales 12S y 16S, por lo que las secuencias de esta región pueden ser útiles en estudios de poblaciones de *Triops*.

-En las poblaciones estudiadas se encontraron cinco haplotipos en Aguascalientes y 4 en Durango.

-El análisis morfológico muestra la ocurrencia de cinco tipos de individuos:

machos + hembras gonocóricas de Durango, y machos + hembras gonocóricas + hermafroditas de Aguascalientes.

-Los análisis filogenéticos indican que las poblaciones americanas de *Triops* son monofiléticas.

-Se sugiere, sobre la base de que en la población de Aguascalientes existen entidades hermafroditas y gonocóricas, que los individuos hermafroditas divergieron de poblaciones de gonocóricas y que posteriormente lograron su aislamiento reproductivo.

-Las poblaciones gonocóricas mexicanas de *Triops* pueden estar presentando un proceso de especiación alopátrica, mientras que los hermafroditas y gonocóricos de la población de Aguascalientes forman especies diferentes.

8. Referencias

- Avise, C., J. Arnold, E. Ball, R. M. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, y N.C. Saunders, 1987. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetic and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:492
- Avise, C. J., 1993. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall. U.S.A. pp153-154.
- Brown, A. F., L. M. Kann y D. M. Rand, 2001. Gene flow versus adaptation in the northern acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*: insights from mitochondrial DNA variation. *Evol.* 55 (10):1972-1979).
- Cabot, E., 1998. The eyeball sequence editor. version 3.2 (c).
- Chu, K. H., C. P. Li, Y. K. Tam y Lavery.S., 2003. Application of mitochondrial control region in population genetic studies of the shrimp *Penaeus*. *Mol. Ecol.* 3:120-122.
- Cracraft, J. ,1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, R.F. Jhonston ed., Plenum Press, New York, pp159-1987.
- Colbourne, J. K. y P. D. N. Hebert, 1996. The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Phill.Trans.r. Soc. Lond. B* 355:349-360.
- Dudycha, J. L., 2004. Mortality dynamics of *Daphnia* in contrasting habitats and their role in ecological divergence. *Fresh. Biol.* 49:505-514.
- Engelmann, M., G. Hoheisel, T. Hahn, W. Joost, J. Vieweg y W. Naumann, 1996. Populations of *Triops cancriformis* Bosc (Crustacea, Notostraca) in Germany

- northerly 50° N are not clonal and at best facultatively hermaphroditic. *Crustaceana* (Leiden) 69: 755-768.
- Engelmann, M., T. Hahn y G. Hoheisel, 1997. Ultrastructural characterization of the gonads of *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca) from populations containing both female and males: no evidence for hermaphroditic reproduction. *Zoomorphology* 117: 175-180.
- Fryer, G., 1988. Studies on the functional morphology and biology of the Notostraca (Crustacea: Branchiopoda). *Philos. Trans. R. Soc. London B* 321: 27-124.
- Howard, D. W. y C. S. Smith, 1983. Histological techniques for marine bivalve molluscs. Technical Memorandum NM FS-F/NEC-25, Department of Commerce. Woods Hale, U.S.A pp 97.
- Humanson, G.L. 1972. *Animal tissue techniques*. W.H. Freeman and Company. 3a edición. U.S.A.
- King, L. J. & R. Hanner, 1997. Cryptic species in a "living fossil" lineage: Taxonomic and phylogenetic relationship within the genus *Lepidurus* (Crustacea: Notostraca) in North America. *Mol. Phyl. Evol.* 10:23-34.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen y M. Nei, 2001. *Mega2: Molecular evolutionary Genetics Analysis Software*, Arizona State iversity, Tempe, Arizona, U.S.A..
- Linder, F., 1952. Contributions to the morphology and taxonomy of the Branchiopoda Notostraca, with special reference to the North American species. *Proc. U. S. Nat. Mus.* 102:1-69.
- Longhurst, A. R., 1955a. A review of the Notostraca. *Bull. Brit. Mus. nat. hist. (Zool)* 3: 3-57.

- Longhurst, A. R., 1955b. The reproduction and cytology of the Notostraca (Crustacea, Phyllopoda). Proc.Zool. Soc. London. 125: 671-680.
- Maeda-Martínez, A. M., 1991. Distribution of species of Anostraca, Notostraca, Spinicaudata and Laevicaudata in México. Hidrobiologia, 212:209-212.
- Maeda-Martínez, A. M. H. Obregón-Barbosa, H. García-Velazco y G. Murugan, 2002. Branciopoda: Notostraca. En: Llorente, j. y J. J. Morrone (eds). Biodiversidad, Taxonomía y biogeografía de artrópodos de Mexico: Hacia una síntesis de su conocimiento. Vol. III, Universidad Nacional Autónoma de México, México: 333-339.
- McLaughlin, P. A., 1980. Comparative Morphology of recent Crustacea. W. H. Freeman and company. U.S.A.
- Murugan, G., A. M. Maeda-Martinez, H. Hobregón-Barboza y N. Y. Hernández Saavedra, 2002. Molecular caracterización of the tadpole shrimp Triops from the B.C. Peninsula México: New insight on species diversyti and philogeny of the genus. Hidrobiología 486: 101-113.
- Nixon, K. C. y Q. D. Wheeler, 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. Cladistics 6:211-223.
- Núñez-Farfán, J. y L. E. Eguiarte, 1999. La evolución biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, U.N.A.M. México. 457 pp.
- Paterson, H. E. H, 1992. Evolution and the recognition concept of species. En: McEvey, S. F.(Ed). The Johns Hopkins University Press. London. 137-153pp.
- Sassaman, C. 1989. Inbreeding d sex ratio variation in female-biased population of clam shrimp, *Eulimnadia texana*. Bull. Mar. Sci. 45:425-432.

- Sassaman, C., 1991. Sex ratio variation in female biased populations of Notostracans. *Hydrobiologia* 212: 169-179.
- Sassaman, C., 1995. Sex determination and evolution of unisexuality in the Conchostraca. *Hydrobiologia* 298:45-65.
- Sassaman, C., M. A. Simovich y M. Fugate, 1997. Reproductive isolation and genetic differentiation in Norteamerican species of Triops (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca). *Hydrobiología* 359:125-140.
- Sassaman, C. y S. C. Weeks, 1993. The genetic mechanism of sex determination in the conchostracans shrimp *Eulimnadia texana*. *Amer. Nat.* 141: 314-328.
- Sacanabissi, F. y C. Mondini, 2002a. A survey of the reproductive biology in Italian branchiopods. Parte A: The female gonad of *Limnadia lenticularis* (Linnaeus, 1761) (*Spinicaudata*) and *Lepidurus apus lubbocki* Brauer, 1873 (Notostraca). *Hydrobiologia* 486: 263-272.
- Sacanabissi, F. y C. Mondini, 2002b. A survey of the reproductive biology in Italian branchiopods. Part B: The male gonad of *Lepidurus apus lubbocki* Brauer, 1873 (Notostraca). *Hydrobiologia* 486: 273-278.
- Simpson, G.G., 1961. Principles of animal taxonomy. Columbia university press. U.S.A. 155pp.
- Suno-Uchi, N., F. Sasaki, S. Chiba y M. Kawata, 1997. Morfological stasis and phylogenetic relationships in Tadpole shrimps, *Triops* (Crustacea: Notostraca). *Biol. J. Linn. Soc.* 61: 439- 440.
- Tabachinck, B. G. y L. S. Fidell, 1996. Using multivariate statistic, . Harper Collins College Publishers. 3a edición. U.S.A. 573pp.

- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins, 1997. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- Trentini, M. and F.S. Scanabissi, 1982. Folicle duct cell ultrastructure and eggshell formation in *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca). *J. Morph.* 172:113–121.
- Umetsu, K., N. Iwabuchi, I. Yuasa, N. Saitou, P. F. Clark, G. Boxshall, M. Osawa y K. Igarashi, 2002. Complete mitochondrial DNA sequence of a tadpole shrimp (*Triops cancriformis*) and analysis of museum samples. *Electrophoresis* 23:4080–4084.
- Vila, M. y M. Bjorklund, 2004a. The utility of neglected mitochondrial control region for evolutionary studies in Lepidoptera (Insecta). *J. Mol. Evol.* 58: 280-290.
- Vila, M. y M. Bjorklund, 2004b. Testing biennialism in the butterfly *Erebia palarica* (Nymphalidae: Satyrinae) by mtDNA sequencing. *Ins. Mol. Biol.* 13: 213-217.
- Zaffagnini, F. y M. Trentini, 1980. The distribution and reproduction of *Triops cancriformis* (Bosc) in Europe (Crustacea, Notostraca). *Mon. Zool. Ital.* 14: 1-8.

Apéndice 1

Alineamiento de las secuencias de los crustáceos analizados para diseño de iniciadores y los sitios donde alineamiento de estos. Para cada gen se presenta su secuencia completa de acuerdo al registro que tienen en GenBank y la región conservada sobre la cual se propusieron los iniciadores, los sitios comunes en esta región se indican por barras verticales.

- 1 *Squilla mantis*
- 2 *Panulirus japonicus*
- 3 *Penaeus monodon*
- 4 *Daphnia pulex*
- 5 *Triops cancriformis*

–Secuencias del gen 12S ADNmt y alineamiento del iniciador de “en avance” T12S

```

1 -CATTCTAGGGGCTCTTTCCAGTACCCCTACTATGTTACGACTTATCTCACTTTGTAGG-
2 --CTTCTAGGTGCACCTTTCCAGTACACCTACTATGTTACGACTTATCTCATCTAATTTAA
3 AATTTCTAGGTACACTTTCCAGTACACCTACTATGTTACGACTTATCTCGCTTAAATTGA
4 TCATTCTAGATGCACCTTTCCAGTACATCTACTTTGTTACGACTTATCTCCTCTT-GAGAA
5 -CTATCTAGAGACACTTTCCAGTACATCTACTATGTTACGACTTATCTCCTTAGAGGA

```

```

1 -GAGAGCGACGGGCGATGTGTACATACCTCAGAGCTAATATCATTTTTGACTTACTAAA--
2 TGAAAGCGACGGGCAATATGTACACACTTTAGAGCTATTATCATTTTTACCTTATTTAAA-T
3 CGAGAGCGACGGGCGATGTGTACATAACCTAGAGCTAAAATCAAAGATCTTGTTAAAAT
4 -GAGAGTGACGGGCGATATGTGCACATCCTATTGCCTTATTCAACTTACTGTACTTAA--
5 -GAGAGCGACGGGCGATGTGTACACACCTCAGAGCCAACCTCAATAAAGAATTTTATT--

```

```

1 ATCACAATTACTATTAAATCCACCTTTAATTATTTATTTAAAAATAA-TATCCGTTTTTA
2 CTAAAATTTACAATTAAATCCATCCTCATATGTCAATTTCCCAACATAATCA-GCCTCTT
3 CT---TTTTACTTTTTAAATCCACCTTCAATAATAAAGATTCCTTTATTATTTTCGTATATT
4 GTAA-ATTTACTAATAAATCCACCTT-CACCTGAGTTTTAAGCCTAA-AATCCGTATTTTC
5 CTAA-ATTTACTACTAAATCCACCTT-AATAATATGTTTACACATACTAATCCGTATAAT

```

```

1 TATATTAAATTTGTAGCTCATTCCACTCACATTCATAAACTACACCTTGACCTGATATATT
2 TA-AAAATATTGTAACCCATTTATACTTAT-TCATAAGCAGCACCTTGATCTAATATATT
3 TT-AATATATTGTAACCCATCTCTTCCCTTTATCATAAGCTGCACCTTGATCTAATATACT
4 TATTAATAAATTTGTAGCTCATCACTGCCCT-TTTATAAACTGCACCTTGACCTGAAGTAAG
5 TATAATTTATTGTAACCCACTTCTCCCATATTTATAAGCTGCACCTTGACCTGAAGTCAT

```

```

1 ATATTTAAATATTTTTGGATAACTATTTATTTTTTAATGTTATCTAATAACGACGGTATA
2 TGATT----TCTATCAATTACAATAATTCGTACATAAAATTTATCTAACAATGAAGGTATA
3 AGCTAA-ACTATTTCAATAACTCTACATCTTAT-TAAAGTTACCTAATAATGACGGTATA
4 AAAAAT--ATTTTTCTGAAAA----CGTTCTTTTAAAGTAATCTGACAACGGCGGTATA
5 AAACCTTTAAATTAACCTAGATTA----TATTTTCTAAAAATAATCTGACAACGGCGGTATA

```

1 TAAATTGATT-----ACAAAAATGTGTAAGATTTTTTCGCGGATTATCGATTACTGAACAA
 2 CTGGCTCGA-----CAAGAACAAGAAAGATTCTACGTGGTTTATCGTTTATACAACAG
 3 CAAACTGTAATAATTACAAAATAAAGTAAGATATTTTCGTGGTTTATCGATTATAGGACAG
 4 CAAGCTTAA-----CAAAAAAGGGTAAGATAAAATGGGGACTATCAATTATAGGACAA
 5 CAAACTGAAT-----ACAAAAATATGTACATTTAAACGTGGAATATCGATCCAAGAGCAG

1 GTCCTCTAACCAGACTGAGGTACCGCCAAATTCCTTGGGTTTCAAGACAATAACTGTTT
 2 GTTCCTCTAACCAGACTAAAGTACCGCCAGGTTCTTTGAATTTCAAACAAATTAGTTATA
 3 GTTCCTCTAAATAGACTAAATTACCGCCAAATCCTTTGAGTTTCAAGATAATAACTGTTT
 4 GTCCTCTATTAGGA-TAAGATGCCGCCAAAATCCTTGGGTTTGAAGAACAAC---TTT
 5 GTTCCTCTAGTAAGAATGAAGTACCGCCAAATTCCTTAGGTTTAAAGATC-----TCT

1 ACTACCCTGGTTTAAGTTG----TTTTATTAAAGTATAGCAGGGTATCTAATCCTGGTTT
 2 AATACTCAAGCCATCCTTCGCTATTATTTTCCAGTGTAACAGGGTATCTAATCCTGGTTC
 3 AGTACCCAGGTAATTATA----ATTTAAATAAAGTGTAACAGGGTATCTAATCCTGGTTC
 4 ACTACCCTATTTACACTA-----TTATTTAG-AATAACAGGGTATCTAATCCTGGTTT
 5 ACTACCCTGGCAACAAAT-----TTAATAGGGAATAATAGGGTATCTAATCCTAGTTT

1 ATATCTTAAA-TTTTTAGATTTCTT--AAACATTGGTTTGTATAAAAAGCGATATTTT---
 2 ATATCTGAAACTTCTTGGCTTCAACCTAAGTCTACCCCTACAAGAACTCAATTACTTAGC
 3 ATCCCTTTATCTTAAACAGCTTCAAT-TAAGATTA AAACTTTTAT---TTTACTATTTATC
 4 TTTACCTAAAATTTTTTAGTCTCAAC--AGA-----TTTCTTAAGAATTTCCCTT-----
 5 AAACCCCTA--TCTACAAAGTTAAT--AAA-----TTTACTAAAAATTTCTAATTTAAA

1 ---AGTTATTTATTTTACCCACACCTAAT---ATCTCATTTTTATTTCAACAACCTGTTAT
 2 CTAATAAACAAATTTACCTCTTATTATTTTAAGCACTAAATAAGGAAGACTCATTTTCA
 3 --AAAAAACTGATTTTACCCCTTTATTAATATAGGC-CTTAAAAGAAAAAATTAATAAA
 4 --AAATTA AAAATTTTACC-----TTATC--AACAAAATTTACCATCTTTTACGAGAT
 5 --AAAAGAAAGATTTTACCCCTAATTTTTTC--ATCAAAAAAATCCCTTTAAAATCAATAT

1 AATAATCTTTTTTAACCAAATTTTGTTT---ACTTAACCTCACAGTATAACCGCGGCGGC
 2 TCTAACCGATG--ACTTATACTTCTT-C---ACTGGACCTTCAAGTCTAACCGCGGATGC
 3 TATAACTGTTTTTAACCAAATTTCTTTT---ATTTTACCTCTCAGTCTAACCGCGGCTGC
 4 C-GAATGTTAACTAAACAAAACTTTTACTCTACTAAAATCTTCGTCTAACCGCGACGGC
 5 T-TACT--TAATTCACCAATCTGTTTC---ATTTAAATCCTTCGTATAACCGCGGCGGC

T12S

GCGACGGC

||| ||

1 TGGCACAA-TTTTAGCCAGGTTTA--ATATGGTTTTCTAGTTCTAGTTTCCACTAATAAAA
 2 TGGCACAAGTTTTAACCTGGCCTA-AGTGGTGGTTTACTTAATCCAACTTTTGTTGATTTT
 3 TGGCACAAATTTTTAACAGGTATATAATTAGGATTACCAATTCCTAACGTTCAATTTATTGA
 4 TGGCACGA-TTTTAGTCAATTCTA--TGAGT-TTAACTAGGCCCAAAT---ATTTGTTTC
 5 TGGCACGA-GTTAAGCCGATCTTA--AAAACCTTGACTGATTCCAAAT---ATTTGATAA

TGGCACGA-TTT

||||| | ||

```

1 CTAATATTATGTGCTGAGAATTTAAAAATTATAACAAAAATTTACTTTTAAC-----ATT
2 TAAATTTTTAGTACTGCT--TTAATTTTTTCGTCATATATTTCACTCCGATCTATCTATT
3 TTAGCATTAGGTACTGAGAATTTATTTCTTAAAGAAAACCTCTACATTCAAACAATTTATT
4 CTAAAACCTACTACTACTTATTGTTTTATT-TAAATCCCCTGT--TTATAT-----AT
5 TCAAAATGAACCACTACTTCTTGAC---AT-TAAGTCCCTTATGCTTGTAT-----TT

```

```

1 GTTTTCTTCTAGAAAACACAAAA-----TTGT--CTTACTTATATTTACATGCACTTAG
2 CGCTCTCATATCAAATAAGAACAAGTTTTTTGTTTACTACCAGAATTTGCATGTACTTTC
3 AACCTTTAGTTTTAATAAAACCTA---T--TGT--AACATTAAGATTTACATGTACCATT
4 AGATTTAAC-TCAAAATAGAGCCA-----AAGC--CAGATTCAAACTTCCCTAA-----
5 GGCTTTTAGGTTTAAACAAAACAC-----TAGT--CAGAATCAAACATA-----

```

```

1 ----ACCAAAAAGAAAACAAATAGCTAGAGTCAAACTTTTG
2 CAACCCAACCTAGCAAAGAATATAGCAAGAATCAAACCTATAG
3 -AACCTAAAAATGAAAGAACA-AGCTAGGATAAAACCTTAC
4 -----
5 -----

```

–Secuencias del gen ARNt Isoleusina mitocondrial y alineamiento de los dos iniciadores de “en reversa” TILE1 y TILE2

```

1 AATGAAGTGCCTGA--AAAAGGATTATCTTGATAGGATAAAATAATGTAGATTTATAGTTT
2 AATATGATGCCTGATAAAAAGGTTTGCTTTGATAGAGCAAGTAATGTAATTTAAAC----
3 AATGAAGTGCCTGA--AAAAGGATTATCTTGATAGGATAAAACATGTAAGTATGAA-TCT
4 AGTTTGATGCCTGATTAAAGGGCTACCTT-GATAGGGTAGATGATGCAACTTGT-----
5 AATTGAATGCCTGATAAAAAGGATTACCTTGATAGGGTAAATCATGTGGCTACCCA----

```

```

TILE1          CTGATAAAAAGGATTACCTTGATA
TILE2          AAAAAGGATTACCTTGATAGGGT

```

```

| | | |   | | | | |   |   | | | |

```

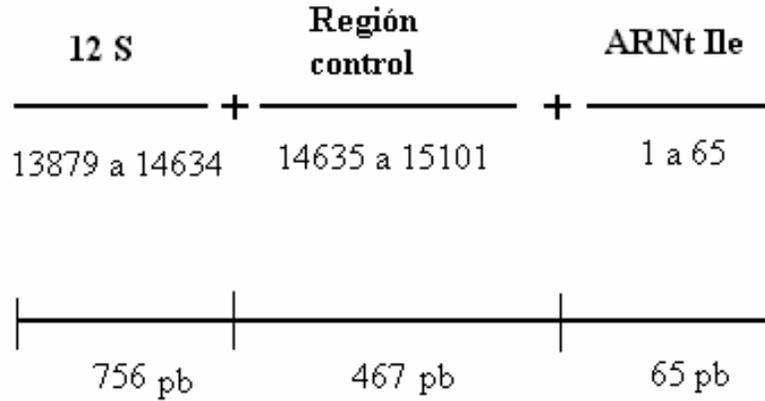
```

1 TACCTTTATTA
2 TACTCATATTA
3 TACCTTCATTA
4 TGCTCAAATTA
5 --CTTCAATTA

```

Apéndice 2

Posición de la región control en el genoma mitocondrial de *Triops cancriformis*. En la secuencia se señalan las regiones conservadas seleccionadas.



```

14461 CATTAAATCCTTCGTATAACCGCGGGCTGGCACGAGTTAAGCCGATCTTAAAAACCT
14461 CATTAAATCCTTCGTATAACC[CGCGGGCTGGCACGAGTT]AAGCCGATCTTAAAAACCT
14521 TGACTGATTCCAAAAATTTGATAATCAAAATGAACCACTACTTCTTGACATTAAGTCCCT
14581 TATGCTTGTATTTGGCTTTTAGGTTTAAACAAAACACTAGTCAGAATCAAACCTATTGAAT
14641 ATTTTTAAAAATTTAAAAATACTGTTAACTAATTTAAATTTAAACAAAGACAAAATGATTT
14701 AAGTATTATGTGTCCCTCCTCTCCCTCTAAAATACGTTCCCTACAGTGAAGCCCACTATT
14761 ATGTTAACTCTCTCATGTGGTGAGATACAACCTCAATCTCTACTCCTGATATATTTCTCA
14821 TTTTCCCTTTACTTCCTCATATGCTATTGAACCTCGGTGCTCTGGGGGGCAAATATTCTT
14881 TCCTATGCCTGTCTAAGTTCCTCCTATGTTAAGTGTCTACTTAGTGCCAACTAACTAAT
14941 CAGTTAATAATGAAAAGTTTTTTATCGTAAATAATTCTTACTATAGTTCATTGCTATGA
15001 TATAATTATTTAAATATTAAGACCCTATTTTTTCTTAAATTAATTTACTTAAAATAATA
15061 TTTATAGCATACTATCACAAAATAAAAACCTTTTATATTTT
1      AATTGAA[TCCTGATAAAAAGGATTACCTTGATAGGGT]AAATCATGTGGCTACCCACTTC
61     AATTA
  
```

Apéndice 3. Secuencia total de los fragmentos estudiados.

2T1	TTAAAA---C	CAAACATAAA	ACCTGAACTT	TGGACGATAT	AACAATAAAT	TATCACAAGC	AAAAA-TTT	TAAGTATTAT	TAACCCCC-T	CCTCCCT-CC	
2T2	---		C								
2T5	---										
2T6	---										
2T9	---										
2T15	---										
T7	---			A A C C							
T11	---			A A C C	G						
T12	---			A C C							
T18	---			A C C							
T29	---			A C C							
T.Santos	---										
Torreón	---		T		T						
T.Longic	---		A						CT - -		
T.Cancr	G T---A	TTTTT -	T A AA	ACTGTT AC	TT -	AACA A	C TGA		GTGT - C	T --	
L7	GGGGGGA	A TTT A	TT ACCT	AATTTA A A	AC- CGG	CT T A G A	AA-A	A AC- T	T T C	C AA	
L6	GGGGGGA	A TTTTA	TT ACCT	AATTTT A A	AC- CGG	CT T A G A	AACA	A AC- T	T T C	C AA	
2T1	TCTGAAATAC	ATTTCTACTT	GTAAAGCCCT	CTATACTATG	TTAACTATCA	CTAGTGGTGA	GATACAACCT	C-AGTCCCTA	C--TACATAA	ATACC---TT	
2T2								-	--	---	
2T5								-	--	---	
2T6								-	--	---	
2T9				G	T			- T	T--	---	
2T15				G	T			- T	T--	---	
T7					G			-	--	---	
T11					G			-	--	---	
T12		C			G			-	--	---	
T18		C			G			-	--	---	
T29		C			G			-	--	---	
T.Santos		C		TC	G			-	--	---	
Torreón				A	G			-	--	---	
T.longic		C		A	G			-	--	---	
T.cancr	A	G C A-	G	A	--	C T	AT		-A T	- C TG T	----T
L7	C A	- TGG	ATT	AA -- AA	T T T	A G G G G		C A TA	AC C TCGT	G A AAG	
L6	C A	- TGG	ATT	AA -- AA	T T T	A G G G G		C A TA	AC C TCGT	G A AAG	

Apéndice 4. Tablas de caracteres morfológicos de los organismos de Durango y Aguascalientes. Se indican los organismos utilizados para los análisis histológicos y moleculares (ADN).

Población Durango: caracteres merísticos								
Individuos	Histología	ADN	Esu	Atc	Aap	Act	Eua	Tto
T4 ♀	x	x	19+1+17	32	8	40	20	57
T7 ♀	x	x	23+2+23	31	7	38	17	56
T11 ♀	x	x	21+1+20	30	9	39	15	60
T12 ♀	x	x	21+1+19	31	8	39	25	61
T5 ♀	x		19+1+17	32	9	41	16	62
T8 ♀	x		18+1+19	30	8	38	-19	58
T9 ♀	x		16+1+18	31	8	39	19	59
T10 ♀	x		16+1+18	31	8	39	20	59
T13 ♀	x		20+1+20	31	8	39	19	60
T14 ♀	x		17+1+18	30	9	39	18	57
T15 ♀	x		22+1+24	31	8	39	18	56
T19 ♀			18+1+20	31	8	39	16	60
T21 ♀			19+2+17	30	9	39	20	57
T22 ♀			19+1+21	32	8	40	19	57
T23 ♀			16+1+17	32	7	39	16	56
T24 ♀			16+1+15	31	9	40	18	60
T25 ♀			14+1+16	31	8	39	21	61
T26 ♀			18+1+19	30	8	38	19	56
T27 ♀			18+1+17	31	8	39	18	56
T37 ♀			16+1+18	31	8	39	18	63
T39 ♀			8+1+20	31	8	39	17	60
T18 ♂		x	20+1+19	30	10	40	20	63
T29 ♂		x	17+1+19	29	10	39	17	58
T32 ♂			18+0+17	30	10	40	18	60
T33 ♂			18+1+18	30	11	41	16	57
T34 ♂			13+1+15	29	10	39	19	59
T35 ♂			17+0+18	30	10	40	19	55
T36 ♂			17+1+20	29	12	41	30	60
T38 ♂			16+0+16	29	10	39	22	56
T40 ♂			12+0+14	29	12	41	22	62
T41 ♂			20+1+20	30	11	41	19	61
T42 ♂			19+1+18	30	10	40	27	58
T43 ♂			16+1+15	31	10	41	21	59
T44 ♂			19+1+18	30	10	40	20	57
T45 ♂			14+1+15	30	10	40	21	62
T48 ♂			14+1+16	29	12	41	21	60
T49 ♂			20+1+20	29	11	40	21	60

Población Durango: caracteres morfométricos										
Individuos	Lc	Lf	Lr	Lt	Lr/Lc	Lf/Lc	Lt/Lc	Lf/Lr	Lt/Lf	Lt/Lr
T4 ♀	12.7	4.8	7.4	2.1	58.3	37.8	16.5	64.9	43.8	28.4
T7 ♀	18	7.4	11	3	61.1	41.1	16.7	67.3	40.5	27.3
T11 ♀	20.7	7.8	13	4.3	62.8	37.7	20.8	60.0	55.1	33.1
T12 ♀	21	8.4	13.2	3.6	62.9	40	17.1	63.6	42.9	27.3
T5 ♀	15.9	6.5	9.7	2.3	61	40.9	14.5	67.0	35.4	23.7
T8 ♀	19	7.5	11.8	3	62.1	39.5	15.8	63.6	40.0	25.4
T9 ♀	21	7.8	13	3.4	61.9	37.1	16.2	60.0	43.6	26.2
T10 ♀	15.9	6.7	9.6	2.8	60.4	42.1	17.6	69.8	41.8	29.2
T13 ♀	20.3	8.6	12	3.4	59.1	42.4	16.7	71.7	39.5	28.3
T14 ♀	18.5	7	11.6	3.3	62.7	37.8	17.8	60.3	47.1	28.4
T15 ♀	24.3	8.8	15.4	3.5	63.4	36.2	14.4	57.1	39.8	22.7
T19 ♀	15	6.8	8.6	2.5	57.3	45.3	16.7	79.1	36.8	29.1
T21 ♀	16.8	6.8	10.3	2.8	61.3	40.5	16.7	66.0	41.2	27.2
T22 ♀	14.7	5.9	8.9	2.3	60.5	40.1	15.6	66.3	39.0	25.8
T23 ♀	14.9	5.8	8.9	2.9	59.7	38.9	19.5	65.2	50.0	32.6
T24 ♀	15.7	6.3	9.8	2.5	62.4	40.1	15.9	64.3	39.7	25.5
T25 ♀	16.5	6.7	10.2	3	61.8	40.6	18.2	65.7	44.8	29.4
T26 ♀	15.5	6.3	9.3	2.6	60	40.6	16.8	67.7	41.3	28.0
T27 ♀	14.2	6	8.3	2.6	58.5	42.3	18.3	72.3	43.3	31.3
T37 ♀	21.4	8.2	13.7	3.4	64	38.3	15.9	59.9	41.5	24.8
T39 ♀	21.8	8.5	13.5	3.5	61.9	39	16.1	63.0	41.2	25.9
T18 ♂	18.1	7.3	11.5	3.3	63.54	40.3	18.2	63.5	45.2	28.7
T29 ♂	21	8.6	13.4	3.7	63.81	41.0	17.6	64.2	43.0	27.6
T32 ♂	25	9.8	16.2	4.7	64.80	30.3	18.8	60.5	48.0	29.0
T33 ♂	20.6	8	13.2	3.6	64.10	38.8	17.5	60.6	45.0	27.3
T34 ♂	22.3	8.9	14.1	4.1	63.20	39.9	18.4	63.1	46.1	29.1
T35 ♂	20.7	8.2	13.7	4.1	66.20	39.6	19.8	59.9	50.0	29.9
T36 ♂	21.2	8	13.9	4.2	65.60	37.7	19.8	57.6	52.5	30.2
T38 ♂	19.3	8.1	12.1	3.4	62.70	42.0	17.6	66.9	42.0	28.1
T40 ♂	20.7	8.6	13.1	3.1	63.30	41.5	15.0	65.6	36.0	23.7
T41 ♂	18.4	7.6	11.5	3.4	62.50	41.3	18.5	66.1	44.7	29.6
T42 ♂	17.9	7.3	10.9	3	60.89	40.8	16.8	67.0	41.1	27.5
T43 ♂	12.7	5.4	7.5	2.4	59.06	42.5	18.9	72.0	44.4	32.0
T44 ♂	22.2	8.6	14.7	4	66.22	38.7	18.0	58.5	46.5	27.2
T45 ♂	15.8	6.8	9.4	2.8	59.49	43.0	17.7	72.3	41.2	29.8
T48 ♂	17	7.6	9.8	3.2	57.65	44.7	18.8	77.6	42.1	32.7
T49 ♂	16	6.9	9.7	2.9	60.63	43.1	18.1	71.1	42.0	29.9

Población Durango: caracteres morfológicos							
Individuos	Scr	Scp	Ept	Fsu	Órgano nucal		
					Posición	Forma	Altura
T4 ♀	1/4 lig. aser.	Espinoso	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T7 ♀	Lisa	Parches	Si	Abierta	II	Semicuadrado	II
T11 ♀	1/4 lig.aser.	Parches	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T12 ♀	1/4 lig.aser.	Lisa	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T5 ♀	Lisa	Parches	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T8 ♀	1/4 lig.aser.	Parches	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T9 ♀	1/4 lig.aser.	Espinoso	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T10 ♀	Lisa	Lisa	Si	Cerrada	I	Semicuadrado	III
T13 ♀	Lisa	Parches	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T14 ♀	Lisa	Lisa	No	Cerrada	I	Triangular	II
T15 ♀	Lisa	Lisa	Si	Abierta	I	Triangular	III
T19 ♀	Lisa	Lisa	Si	Abierta	I	Triangular	III
T21 ♀	1/4 lig.aser.	Lisa	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T22 ♀	Aserrada	Parches	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T23 ♀	1/2 lig.aser.	Parches	Si	Abierta	I	Semicuadrado	II
T24 ♀	1/2 lig.aser.	Parches	Si	Abierta	I	Triangular	III
T25 ♀	Aserrada	Parches	Si	Abierta	II	Triangular	III
T26 ♀	Lig.aserrada	Lisa	Si	Abierta	I	Triangular	III
T27 ♀	Lig.aserrada	Lisa	Si	Abierta	II	Triangular	III
T37 ♀	Aserrada	Lisa	Si	Abierta	I	Ovalado	III
T39 ♀	Lisa	Lisa	Si	Cerrada	I	Triangular	III
T18 ♂	Lisa	Lisa	Si	Cerrada	I	Triangular	II
T29 ♂	Lisa	Lisa	Si	Cerrada	I	Triangular	II
T32 ♂	Lisa	Lisa	Si	Abierta	-	-	-
T33 ♂	Lisa	Lisa	Si	Cerrada	I	Triangular	II
T34 ♂	Lisa	Lisa	Si	Cerrada	I	Triangular	II
T35 ♂	Lisa	Lisa	Si	Abierta	I	Triangular	II
T36 ♂	Lisa	Lisa	Si	abierta	I	Triangular	II
T38 ♂	Lisa	Lisa	Si	Cerrada	I	Triangular	II
T40 ♂	Lisa	Lisa	Si	abierta	I	Triangular	II
T41 ♂	Lisa	Lisa	Si	cerrado	I	Triangular	II
T42 ♂	Lisa	Lisa	Si	Abierto	I	Triangular	II
T43 ♂	Lisa	Lisa	Si	abierto	I	triangular	II
T44 ♂	Lisa	Lisa	Si	Cerrado	I	Semicuadrado	II
T45 ♂	Lisa	Lisa	Si	Cerrado	I	Triangular	II
T48 ♂	Lisa	Lisa	Si	Abierto	I	Triangular	II
T49 ♂	Lisa	Lisa	Si	Abierto	I	Triangular	II

*No se incluye la armadura de la inserción de la furca

Población de Aguascalientes: caracteres merísticos								
Individuo	Histológico	ADN	Esu	Atc	Aap	Act	Eua	Tto
2T1♂		x	16+1+18	28	11	40	28	59
2T2♂		x	15+1+14	28	11	40	26	58
2T26♂			15+1+16	28	11	40	26	59
2T5♀g	x	x	13+1+15	30	9	39	19	62
2T6♀g	x	x	15+1+15	29	8	37	21	62
2T22♀g			18+1+15	30	10	40	20	62
2T9♀h	x	x	21+1+24	32	4	36	22	66
2T15♀h	x	x	22+1+22	32	5	37	25	64
2T3♀h	x		25+1+25	31	5	36	24	64
2T4 ♀h	x		24+1+25	32	5	36	25	66
2T7♀h	x		21+1+23	31	5	36	23	66
2T8♀h	x		24+1+21	31	5	36	25	66
2T10♀h	x		26+1+26	32	5	37	26	66
2T11♀h	x		23+1+23	31	5	36	28	64
2T12♀h	x		22+1+22	32	4	36	25	66
2T13♀h	x		26+1+25	31	5	36	23	64
2T14♀h	x		24+0+22	32	5	37	25	66
2T16♀h	x		24+1+22	31	5	36	25	66
2T17♀h	x		24+1+25	31	5	36	25	66
2T18♀h	x		22+1+22	31	5	36	25	64
2T19♀h	x		226+1+25	32	4	36	25	64
2T20♀h			22+1+22	32	5	37	25	66
2T21♀h			23+1+23	32	4	36	23	66
2T23♀h			26+1+24	31	5	36	26	62
2T24♀h			22+1+19	31	4	36	25	65
2T25♀h			24+1+26	31	4	36	24	64

Población de Aguascalientes: ccaracteres morfométricos										
Individuos	Lc	Lf	Lr	Lt	Lr/Lc	Lf/Lc	Lt/Lc	Lf/Lr	Lt/Lf	Lt/Lr
2T1♂	18.4	7.3	11.9	3.1	60.3	39.7	14.9	65.9	37.5	24.7
2T2♂	17.3	7.3	10.8	3.1	61.8	38.2	13.2	61.7	34.5	21.3
2T26♂	17.8	7.3	11.3	3.1	59.3	40.7	16.0	68.8	39.4	27.1
2T5♀g	16.2	6.6	9.6	2.6	60.2	39.8	16.4	66.0	41.2	27.2
2T6♀g	17.1	6.8	10.3	2.8	59.6	29.8	19.1	50.0	64.3	32.1
2T22♀g	18.5	8.0	10.9	3.1	61.8	38.9	14.6	62.9	37.5	23.6
2T9♀h	14.2	5.4	8.6	2.1	60.6	38	14.8	62.8	38.9	24.4
2T15♀h	14.1	5.4	8.6	2.1	61.4	38.6	14.3	62.8	37	23.3
2T3♀h	14.1	5.6	8.5	2.1	61.6	37.7	14.4	61.1	38.2	23.3
2T4 ♀h	15.2	5.8	9.4	2.0	60.6	39.4	14.1	65.1	35.7	23.3
2T7♀h	9.4	2.8	5.6	1.8	60.7	39.3	14.3	64.7	36.4	23.5
2T8♀h	14.4	5.6	8.9	2.1	61.4	40	15.0	65.1	37.5	24.4
2T10♀h	14.0	5.4	8.6	2.0	61	38.3	14.9	62.8	38.9	24.4
2T11♀h	14.6	5.5	9.0	2.1	62	38.7	14.8	62.5	38.2	23.9
2T12♀h	14.2	5.6	8.6	2.0	61.3	38.7	14.1	63.2	36.4	23
2T13♀h	14.0	5.5	8.5	2.0	61.8	38.2	13.9	61.8	36.4	22.5
2T14♀h	14.0	5.6	8.6	2.1	69.1	28.9	18.6	41.8	64.3	26.9
2T16♀h	14.2	5.5	8.8	2.1	59.6	40.4	14.7	67.9	36.4	24.7
2T17♀h	14.2	5.5	8.7	2.0	60.7	39.3	14.8	64.6	37.7	24.4
2T18♀h	14.4	5.5	8.9	2.0	58.9	43.2	16.8	73.4	38.8	28.4
2T19♀h	9.7	2.8	6.7	1.8	61.3	39.4	14.6	64.3	37	23.8
2T20♀h	13.6	5.5	8.1	2.0	61.4	38.6	15.2	63.0	39.2	24.7
2T21♀h	13.5	5.3	8.2	2.0	62.4	39	14.2	62.5	36.4	22.7
2T23♀h	13.7	5.4	8.4	2.0	64.6	39.6	16.8	61.3	42.4	26
2T24♀h	13.2	5.1	8.1	2.0	62.4	42.2	17.9	67.6	42.4	28.7
2T25♀h	14.1	5.5	8.8	2.0	63.5	41	17.4	64.6	42.4	27.4

Población de Aguascalientes: caracteres morfológicos								
Individuos	Scr	Scp	Ept	Aif	Fsu	Organo nucal		
						Posición	Forma	Altura
2T1♂	Lisa	Lisa	1	Si	Cerrada	1	1	3
2T2♂	Lisa	Lisa	1	Si	Cerrada	1	1	3
2T26♂	Lisa	Lisa	1	Si	Cerrada	1	1	3
2T5♀g	Aserrada	Parches	1	Si	Abierta	2	1	3
2T6♀g	1/2 lig. aserr.	Parches	1	Si	Cerrada	2	1	3
2T22♀g	Semiaserrada	Parches	1	Si	Cerrada	2	1	3
2T9♀h	1/2 lig. aserr.	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T15♀h	Aserrada	Parches	2	Si	Cerrada	1	1	1
2T3♀h	1/2 lig. aserr.	Parches	2	Si	Abierta	1	1	1
2T4 ♀h	Aserrada	Parches	1	Si	Abierta	1	1	1
2T7♀h	Aserrada	Parches	2	Si	Abierta	1	1	1
2T8♀h	1/2 lig. aserr.	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	2
2T10♀h	1/2 lig. aserr.	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T11♀h	Aserrada	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T12♀h	Aserrada	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T13♀h	1/2 lig. aserr.	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T14♀h	Aserrada	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T16♀h	Aserrada	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T17♀h	Semiaserrada	Lisa	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T18♀h	Aserrada	Parches	1	Si	Abierta	1	1	1
2T19♀h	Aserrada	Parches	1	Si	Cerrada	1	1	1
2T20♀h	Aserrada	Parches	2	Si	Cerrada	1	1	1
2T21♀h	Aserrada	Parches	2	Si	Cerrada	1	1	1
2T23♀h	Aserrada	Parches	1	Si	Abierta	1	1	1
2T24♀h	1/2 lig. aserr.	Lisa	1	Si	Abierta	1	1	1
2T25♀h	Aserrada	Lisa	2	Si	Abierta	1	1	1

*No se incluye la armadura de la inserción de la furca

Apéndice 5. Cálculo de la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos de los caracteres merísticos. Se indican los grupos encontrados en cada población: las “hembras” (♀ Durango) y machos (♂ Durango) de Durango; “hembras” de forma larga (♀ L.Ags.),

Grupos	Espinass del sulcus				Anillos totales				Anillos ápodos				Anillos con toracópodos			
	Media	Desv.std.	Min.	Max.	Media	Desv.std.	Min.	Max.	Media	Desv.std.	Min.	Max.	Media	Desv.std.	Min.	Max.
♀ Durango	36.5	4.6	28.0	46.0	39.1	0.7	38	41	8.1	0.6	7.0	9.0	31.0	0.7	30.0	32.0
♂ Durango	34.3	4.4	26.0	40.0	40.2	0.8	39	41	10.6	0.8	10.0	12.0	29.6	0.6	29.0	31.0
♀ L.Ags.	30.3	2.5	28.0	33.0	38.7	1.5	37	40	9.0	1.0	8.0	10.0	29.7	0.6	29.0	30.0
♀ C.Ags.	46.9	3.1	41.0	52.0	36.2	0.4	36	37	4.7	0.5	4.0	5.0	31.5	0.5	31.0	32.0
♂ Ags.	31.3	2.5	29.0	34.0	40.0	0.0	40	40	11.0	0.0	11.0	11.0	28.0	0.0	28.0	28.0

“hembras” de forma corta (♀ C.Ags.) y machos (♂ Ags.) de Aguascalientes.

Grupos	Numero de toracópodos				Espinass del ultimo anillo			
	Media	Desv.std.	Min.	Max.	Media	Desv.std.	Min.	Max.
♀ Durango	58.6	2.2	56.0	63.0	18.5	2.2	15.0	25.0
♂ Durango	59.2	2.3	55.0	63.0	20.8	3.5	16.0	30.0
♀ L.Ags.	62.0	0.0	62.0	62.0	20.0	1.0	19.0	21.0
♀ C.Ags.	65.1	1.2	62.0	66.0	24.7	1.3	22.0	28.0
♂ Ags.	58.7	0.6	58.0	59.0	26.7	1.2	26.0	28.0