

Análisis morfológico y molecular de las hembras partenogénicas del complejo *Moina micrura* en México.

Johanna Katerine Almeyda Osorio

Trabajo de grado para obtener el título de Bióloga

Director

Manuel Elías Gutiérrez

Doctor en Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2017

Dedicatoria

Le dedico este presente proyecto a mis padres, que durante el desarrollo de mi carrera fueron el motor y la motivación que necesitaba cada día para no decaer ante las tantas veces que sentí desfallecer en este largo camino.

Gracias por sus palabras de aliento, por no dejarme sola nunca, por el apoyo recibido cada día, por confiar en que podía lograr todo lo que me propondría, por ser mi ejemplo de fortaleza y sabiduría, y por la paciencia de entender cada lagrima, cada rabieta, cada sonrisa.

Hoy este logro ha sido por ustedes, y doy gracias a Dios que puedan estar conmigo para dedicárselos. No me alcanzara la vida para devolver todo aquello que hasta el día de hoy me han brindado.

Los amo y los amare por siempre.

Agradecimientos

A Dios, por concederme la vida, y darme la sapiencia, el valor y la fuerza para superar paso a paso las dificultades del camino.

A la universidad Industrial de Santander y a todos los maestros que contribuyeron en mi formación profesional, por transmitirme sus conocimientos y experiencias, convirtiéndome de esta manera en una persona mucho más fuerte.

A el Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, por permitirme realizar mí trabajo investigativo y apoyarme en todos los trámites que necesite durante mi pasantía.

Al Dr. Manuel Elías Gutiérrez por abrirme las puertas de la investigación, por sus enseñanzas en todo este proceso, por la oportunidad que me brindo para ser parte de su grupo de investigación y por la confianza que deposito en mí.

A la Dr. Marta Valdez y su familia por brindarme un apoyo incondicional en cada momento durante mi estadía, ofrecerme su casa y hacerme sentir como parte de su familia.

A Ana Martínez y su familia por abrirme las puertas de su casa y brindarme la oportunidad de conocer la cultura chetumaleña.

A mi hermana Ivonne Roció Almeida por mostrarme el camino de diferentes maneras, por preocuparse por mí, por sus oraciones y por el apoyo que me ha brindado.

A Javier Plata Liévano que ha estado conmigo por más de 10 años, brindándome su amistad invaluable, apoyándome y aconsejándome en cada momento que lo he necesitado.

A Silvia Juliana López que ha sido durante estos últimos años mi amiga, mi consejera, mi cómplice y mi apoyo en muchos momentos vividos juntas.

A Laura Daniela Figueroa que a pesar de la distancia que nos separa, nos ha unido un amor y amistad verdadera que ha sobrepasado diferentes situaciones, pero que nos mantiene juntas apoyándonos en los buenos y malos momentos.

A todas las personas que llegaron a mi vida para quedarse o marcharse pero que de alguna manera han contribuido en mi crecimiento personal y profesional durante estos años, los recuerdo y recordare siempre.

¡Gracias!

Contenido

	Pág.
Introducción	17
1. Objetivos	20
1.1. Objetivo general.....	20
1.2. Objetivos específicos	20
2. Marco Teórico.....	21
2.1. Biología y descripción general.....	21
2.2. Morfología, taxonomía y código de barras	23
3. Materiales y métodos	27
3.1. Localidades de recolección	27
3.2. Material examinado	29
3.3. Análisis morfológico.....	32
3.4. Código de barras	36
3.5. Análisis de datos	37
4. Resultados	38
4.1. Morfología de las hembras partenogenéticas y efipiales del complejo <i>moina cf. micrura 1</i> y <i>moina cf. micrura 2</i>	38
4.2. Diferencias morfológicas entre los complejos <i>moina cf. micrura 1</i> y <i>moina cf. micrura</i> 2 de México.....	71

4.3. Diferencias morfológicas entre los complejos <i>moina cf. micrura 1</i> , <i>moina cf. micrura 2</i> mexicanas y <i>moina micrura s. str.</i> de republica checa	73
4.4. Análisis de la secuencia nucleotídica del marcador mitocondrial citocromo oxidasa subunidad i (620 pb) (coi) del grupo <i>moina micrura</i> : <i>moina cf. micrura 1</i> , <i>moina cf. micrura 2</i> y <i>moina micrura s. str.</i> , obtenido de la base de datos bold	76
5. Discusion.....	78
5.1. Morfología	81
5.2. Código de barras	84
6. Conclusiones.....	87
Referencias Bibliograficas	88
Apéndices.....	96

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Distribución geográfica de <i>Moina micrura s. str.</i> (Estanque Sadka).....	29
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Moina cf. micrura 1</i> (Salvador Durango limnetica, Provincia Durango, México. Fin carretera Chihuahua B, Provincia Chihuahua, México. Km 44 Parral-Jiménez, Provincia Chihuahua, México. Santa Teresita III A, Provincia Durango).....	30

Figura 3. Distribución geográfica de <i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 2 (Presa Ignacio Ramírez vertical y litoral, Ciudad de México. Valsequillo centro, Provincia Puebla, México. La Goleta, Provincia Soyaniquilpan, México. Cuitzeo, Provincia Michoacán, México).	32
Figura 4. Técnica para la disección de cladóceros para la observación del organismo completo. A. Hábito; B. Antenas, C. Tórax, D. Toracopodos I – V, E. Postabdomen, F. Valvas	35
Figura 5. Técnica para la disección de cladóceros para la observación del organismo completo. A. Hábito; B. Antenas, C. Tórax, D. Toracopodos I – V, E. Postabdomen, F. Valvas	43
Figura 6. <i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1. Durango, México, A. Anténulas; B. Cara posterior con sétulas largas; C. Hileras transversales de micro espinas, cara anterior. Visto en SEM; D. Seta sensorial; E. Hilera de espinas dispuestas en la base del extremo distal; F. Labro.....	44
Figura 7. <i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1. Durango, México. A. Basipodito con hileras de espinas esclerotizadas, superficie pilosa y seta distal externa; B. Protuberancia en la parte distal del basipodito, cara lateral; C. Setas sensoriales y espina distal externa del basipodito; D. Seta larga y seta corta proximal del basipodito; E. Seta larga distal interna del basipodito; F. Espina corta distal del basipodito, cara lateral.....	45
Figura 8. <i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1. Durango, México. A. Antenas natatorias, B. Acercamiento de la espina del segmento 1 del exopodito (1-1-0-1); C. Hilera de espinas en los segmentos del exópodo y endópodo.	46
Figura 9. <i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1. Durango, México. A. Postabdomen con hileras de espínulas; B. Dientes plumosos, vista lateral; C. Diente bidentado lateral con ramas desiguales; D. Setas natatorias; E. Garra postabdominal con hileras denominadas “Basaldorn”; F. Lado dorsal de la garra con hilera de espinas extendidas de la base a la punta.	47

Figura 10. *Moina* cf. *micrura* 1. Durango, México. A. Valvas con espinas marginales; B. Grupos organizados de espinas, margen ventral; C. Par de ganchos para las setas natatorias de *Moina* cf. *micrura* 1, margen dorsal; D. Superficie valvar con esclerotizaciones en forma de cuadrícula. .. 48

Figura 11. *Moina* cf. *micrura* 1. Chihuahua, México. A. Toracópodo I, LDI con seta anterior y dos setas largas; B. Endito 3 con seta anterior única fuertemente esclerotizada; C. Endito 1 con tres setas posteriores y endito 2 con dos setas; D. Gancho eyectores de diferente tamaño (flecha en la foto). 49

Figura 12. *Moina* cf. *micrura* 1. Chihuahua, México. A. Toracópodo II; B. Exopodito con seta larga setulada; C. Seta gruesa lateral en la base del exopodito; D. Tres enditos con setas posteriores fijas setuladas (E1: 2 setas, E2 y E3: 1 seta); E. Seta delgada cerca de la gnathobase (flecha gris), seguido de esto sensilia curvada, seta de batido (SB) señalada por flecha negra. Seta larga señalada como 1, setas posteriores en la placa filtradora (a-ñ), y 4 setas anteriores (1-4). 50

Figura 13. *Moina* cf. *micrura* 1. Chihuahua, México. A. Toracópodo III con 4 setas distales (c-f) y 2 setas laterales (a-b); B. Endito 1 con seta anterior (E1: SA), parte distal interna; C. Endito 2 con seta anterior (E2: SA) y otra seta posterior (E2: SP), parte distal interna; ubicada en la Fig. D. Por último, el endito 3 con seta anterior, parte distal interna; señalada por un asterisco en la Fig. C; E. Gnatobase con 40 a 45 setas. 51

Figura 14. *Moina* cf. *micrura* 1. Durango, México. A. Toracópodo IV con setas distales (c-f) y setas laterales (a-b); B. Endito 1 con una seta anterior (E1: SA), parte distal interna; Endito 2 con una seta anterior (E2:SA) y una seta posterior (E2: SP), parte distal interna; C. Gnatobase con 30 a 35 setas. 52

- Figura 15. *Moina* cf. *micrura* 1. Chihuahua, México. A. Toracópodo V, exopodo provisto de una seta larga distal (señalada por una flecha negra) y una pequeña seta apical (señalada por una flecha gris); B. Endopodito provisto de una seta corta y C. una seta larga. 53
- Figura 16. *Moina* cf. *micrura* 1. Durango, México. A. Hembra Efipial. B. Superficie del Efipio con un huevo y reticulación marcada superficial; C. Patrón de células semi circulares aplanadas, interconectadas unas con otras señaladas por una flecha, margen ventral y dorsal..... 54
- Figura 17. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Fotografía microscopio óptico. Hembra partenogenética. México. Habito, vista lateral. B. Microfotografía electrónica de barrido (SEM) de hembra partenogenética. México. Habito, vista lateral..... 59
- Figura 18. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Anténulas con sétulas largas, cara posterior; B. Hileras transversales de micro espinas, cara anterior. Visto en SEM; C. Anténula con seta sensorial ubicada hacia la parte proximal de la mitad distal y surgiendo de la cara lateral; D. Hilera de espinas dispuestas en la base del extremo distal; E. Nueve estetascos cortos de tamaño ligeramente diferente..... 60
- Figura 19. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Basipodito con hileras de espinas esclerotizadas y pelos pronunciados alrededor; B. Protuberancia en la parte distal del basipodito, cara lateral; C. Tres setas sensoriales del basipodito; D. Seta larga y seta corta proximal del basipodito; E. Seta larga distal del basipodito; F. Espina corta distal del basipodito, cara lateral. 61
- Figura 20. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Antenas natatorias; B. Hilera de espinas pequeñas en los segmentos del exópodo y endópodo; C. Antenas con el segmento del exopodito ausente de espina; D. Acercamiento de la espina del segmento 1 del exopodito (0-1-0-1) (señalada por una flecha negra). 62

- Figura 21. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Postabdomen, vista dorsal, con hileras de espínulas (señaladas por una flecha gris) y dientes plumosos, vista lateral (señalado por una flecha negra); B. Setas natatorias; C. Garra postabdominal con hileras denominadas “Basaldorn” (señaladas con una flecha negra) e hilera de espinas finas y cortas desde la base hasta la punta, vista dorsal (señaladas por una flecha gris). 63
- Figura 22. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Valvas con espinas marginales; B. Grupos poco diferenciados de espinas, margen ventral; C. Ganchos de las setas natatorias de *Moina* cf. *micrura* 2, margen dorsal; D. Superficie valvar con esclerotizaciones en forma de rectangular.. 64
- Figura 23. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Toracópodo I, LDI con seta anterior (SA) y dos setas largas (señaladas por una flecha negra), Endito 3 con una seta anterior única fuertemente esclerotizada (SA: E3); B. Endito 1 con tres setas posteriores y endito 2 con dos setas; y ganchos eyectores de diferente tamaño (GE)..... 65
- Figura 24. *Moina* cf. *micrura* 2. Michoacán, México. A. Toracópodo II; seta de batido (SB). Seta larga señalada como 1, setas posteriores en la placa filtradora (a-h), y 4 setas anteriores (1-4); B. Acercamiento de la seta gruesa lateral en la base del exopodito (flecha blanca) y la sensilia (flecha gris); C. Tres enditos con setas posteriores fijadas setuladas (E1: 2 setas, E2 y E3: 1 seta); D. Exopodito con seta larga setulada bilateral..... 66
- Figura 25. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Toracópodo III con 4 setas distales (c-f) y 2 setas laterales (señaladas por una flecha negra); B. Gnatobase con 35 a 45 setas..... 67
- Figura 26. *Moina* cf. *micrura* 2 Estado de México. A. Toracópodo IV con 4 setas distales (c-f) y 2 setas laterales (a-b); B. Gnatobase con 14 a 30 setas..... 68
- Figura 27. *Moina* cf. *micrura* 2. Puebla, México. A. Toracópodo V, exopodo provisto de una seta larga distal (señalada por una flecha negra), una pequeña seta apical (señalada por una flecha

blanca); y endopodito provisto de una seta larga (señalada por una flecha negra), una pequeña seta apical (señalada por una flecha blanca); y endopodito provisto de una seta larga (señalada por una flecha gris) B. Acercamiento del endopodito provisto de una seta corta (señalada por una flecha negra)..... 69

Figura 28. *Moina* cf. *micrura* 2. Estado de México. A. Hembra Efipial. B. Patrón de células semi circulares globosas, margen ventral y dorsal..... 70

Figura 29. Árbol Vecino más cercano (ID Árbol) utilizando el modelo de distancias (K2P) del gen COI, de la especie *Moina* cf. *micrura* disponibles en BOLD junto con las diferencias morfológicas obtenidas en cada grupo..... 78

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Localidades de recolección, fecha de colecta y números de acceso de la base de datos de bold que representan los tres grupos estudiados.....	96
Apéndice B. Diferencias morfológicas de las hembras partenogenéticas y efipiales de los complejos moina cf. Micrura 1, moina cf. Micrura 2 y moina micrura s. Str. Un signo de interrogación (?) Hace referencia a la información que falta.	99
Apéndice C. Divergencias genéticas (k2p) en diferentes niveles taxonómicos para las especies moina cf. Micrura 1 y moina cf. Micrura 2. Secuencias seleccionadas para el análisis 70.....	104
Apéndice D. Divergencias genéticas (k2p) en diferentes niveles taxonómicos para moina micrura s str. Secuencias seleccionadas para el análisis 80.	105
Apéndice E. Árbol vecino más cercano (id árbol) utilizando el modelo de distancias (k2p) del gen coi, de la especie moina cf. Micrura disponibles en bold. El primer grupo hace referencia a moina micrura s. Srt., el segundo grupo hace referencia a moina cf. Micrura 2 y el último grupo hace referencia a moina cf. Micrura 1	106

Resumen

TÍTULO: ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE LAS HEMBRAS PARTENOGENÉTICAS DEL COMPLEJO *MOINA MICRURA* EN MÉXICO*

AUTORES: Johanna Katerine Almeyda Osorio, Manuel Elias Gutierrez**

PALABRAS CLAVES: *Moina*, *Moina micrura*, Especie críptica, Taxonomía, COI, códigos de barras del ADN, México.

DESCRIPCIÓN:

La especie *Moina micrura* (Kurz 1874), ha sido considerada cosmopolita, con excepción de zonas árticas y templadas-frías. Actualmente este cladóceros es usado en estudios fisiológicos, embriológicos y genéticos. Además, es empleado en ensayos de toxicidad, e indicador biológico de sistemas eutróficos. Es una de las especies dentro de los cladóceros con más dificultad taxonómica, y posee altos patrones de variabilidad morfológica, que a menudo han sido atribuidos a su alta diversidad intraespecífica. Lo anterior, sumado al gran rango distribucional que se le atribuye y su taxonomía confusa, ha hecho que diferentes investigadores reconozcan que se trata en realidad de un complejo de especies crípticas.

Por lo tanto, este trabajo pretendió mediante el uso de la taxonomía integrativa, comparar y evaluar dos posibles especies que forman parte del complejo *Moina micrura* en diferentes localidades de México con *Moina micrura* s. str., de Republica Checa. En base a nuestros resultados, se corrobora que *Moina micrura* en lugar de ser una especie cosmopolita, es más bien un complejo de especies que presentan una clara distribución restringida. Se encontraron diferencias morfológicas relevantes en los toracópodos II, III y IV, en las anténulas, el basipodito, las antenas, el postabdomen, el efipto y las valvas entre las especies mexicanas y nuestro sujeto de referencia. Así mismo, por medio de los análisis moleculares con el gen estandarizado COI se encontró variación en las secuencias de nucleótidos para nuestras tres especies en estudio, separándolas como grupos diferentes con una divergencia mayor al 10%. Por último, encontramos que la distancia geográfica entre nuestras poblaciones es de aproximadamente 10.000 km.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director Manuel Elías Gutiérrez Doctor en Ciencias

ABSTRACT

TITLE: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF THE PARTHENOGENETIC FEMALES OF THE *Moina micrura* COMPLEX IN MEXICO*

AUTHORS: Johanna Katerine Almeyda Osorio, Manuel Elias Gutierrez**

KEY WORDS: *Moina*, *Moina micrura*, cryptic species, taxonomy, COI, Barcodes of life, Mexico.

DESCRIPTION:

The species *Moina micrura* (Kurz 1874), has been considered cosmopolitan, except for arctic and temperate-cold zones. Currently this cladoceran is used in physiological, embryological and genetical studies. Also, It is use in toxicity tests, and as bioindicator of eutrophic systems. It is one of the most confused cladoceran, due to its confused taxonomy, its high morphological variability patterns, (attributed to its high intraspecific diversity) and its wide distributional range. For all these reasons, it has been recognize as a complex of cryptic species. In Mexico there are 5 different morphotypes of this complex. Therefore, the aim of this work is to compare two of the Mexican morphotypes (*Moina* cf. *micrura* 1 and *Moina* cf. *micrura* 2) with *Moina micrura* s. str. from Czech Republic (*Terra typica*), and evaluate them through an integrative taxonomy approach. Based on our results, we can corroborate that *Moina micrura* instead of being a cosmopolitan species, is rather a complex of species that present a clear restricted distribution. We found significant morphological differences in thoracopods II, III and IV, antennules (A1), antenna (A2), postabdomen, ephippium and shell valves spinulation between the Mexican species and *Moina micrura* s. str.. Also, molecular analyses with COI gene, show a genetic divergence greater than 10%, so we can conclude that they are different groups and possibly different species. Finally, we find that the geographical distance between American and European populations is approximately 10,000 km.

* Degree work

** Science Faculty. School of Biology. Director Manuel Elías Gutiérrez Doctor of Science

Introducción

La identificación válida de especies de zooplancton de agua dulce es uno de los pasos fundamentales para entender la estructura, abundancia, diversidad y su papel funcional en las tramas tróficas (Paggi, 2004; Sharma et al., 2014). Uno de los grupos principales en el zooplancton dulceacuícola son los cladóceros. Algunas de las especies de este grupo son usadas en estudios fisiológicos, embriológicos y genéticos. Además, son empleados en ensayos de toxicidad como organismos de prueba, e indicadores biológicos de sistemas eutróficos, ya que son capaces de establecerse y desarrollarse en ambientes turbios, tolerar altos rangos de salinidad y deficiencias de oxígeno (Goulden, 1968; Krishnan & Chockalingam, 1989; Wong, 1989; Rodríguez-Estrada et al., 2003; Paggi, 2004; Sarma et al., 2005; Elías-Gutiérrez et al., 2008b; Miracle & Nandini, 2011)

El género *Moina*, descrito por Baird, 1850 (Crustacea: Anomopoda: Moinidae) es uno de los géneros con mayor dificultad morfológica y taxonómica dentro de los cladóceros (Goulden, 1968; Petrusek, 2002; Petrusek et al., 2004). Guarne & Richard (1892) sugirieron por vez primera una revisión taxonómica dentro del grupo, pero fue hasta que Brehm (1933) describió algunas características morfológicas importantes para discernir el género, y muchas de estas características desde ese entonces han servido para definir algunas especies.

Dentro del género, la especie *Moina micrura* (Kurz 1874) ha sido considerada cosmopolita, a excepción de zonas árticas y templadas-frías (Martínez-Jerónimo et al., 2007; Sarma et al., 2005). Esta especie es la más variable dentro del grupo, y este fenómeno se ha tratado de

explicar con base a su estrategia de vida, que le ha permitido responder a diferentes factores bióticos y abióticos, facilitándole la colonización exitosa en diferentes hábitats (Innes & Singleton, 2000; Sarma et al., 2005). Sin embargo otros autores han considerado a *Moina micrura* como un complejo de especies crípticas no resueltas (Goulden, 1968; Petrusek, 2002; Petrusek et al., 2004; Elías-Gutiérrez et al., 2008a). Este organismo presenta altos patrones de variabilidad morfológica, que han sido atribuidos a una alta diversidad intraespecífica (Cousyn et al., 2001; Elías-Gutiérrez et al., 2008a; Petrusek et al., 2004) y plasticidad morfológica, lo que ha llevado a establecer una sinonimia de siete especies con *Moina micrura* (Goulden, 1968), posición apoyada por otros autores (Smirnov, 1976; Petrusek et al., 2004).

La plasticidad fenotípica y la variabilidad genética en los caracteres usados para el reconocimiento de las especies en estos organismos, han llevado a obtener identificaciones incorrectas (Hebert et al., 2003), y esto, sumado a la ausencia de taxónomos expertos en las especies problemáticas (Montiel-Martínez et al., 2008) (Sharma et al., 2014); conllevan a la necesidad de disponer herramientas adicionales y complementarias para garantizar la discriminación inequívoca entre especies estrechamente relacionadas (Hebert et al., 2003). Por esta razón, Hebert, et al., (2003) Propusieron como una herramienta para la identificación de los seres vivos eucariontes una secuencia estandarizada del ADN consistente en la primera mitad del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), a la que llamó “Códigos de Barras de la vida”, ya que más del 95% de los organismos poseen COI distintos que son compatibles con el sistema de clasificación actual en esencia basado en la propuesta de Linneo, donde la base es la especie y una serie de categorías jerarquizadas. Esta nueva herramienta no solo ha permitido dilucidar complejos de especies crípticas, sino que ha acelerado el descubrimiento de nuevas especies, aparte de una enorme cantidad de nuevas aplicaciones, basadas en el reconocimiento preciso de

la diversidad biológica (Elias-Gutierrez & Valdez-Moreno, 2008; Gutiérrez-Aguirre et al., 2014; Montiel-Martínez et al., 2008; Montoliu et al 2015), sin embargo, el gen propuesto inicialmente funciona con esta efectividad solamente en animales. Para las plantas y hongos se han propuesto otros genes alternativos.

Por lo anterior, este estudio pretende comparar morfológicamente dos especies denominadas *Moina micrura* 1 y *Moina micrura* 2 provenientes de diferentes localidades de México con *Moina micrura* s. str., descrita originalmente en la actual República Checa, y confrontar estos resultados morfológicos con datos obtenidos a partir de análisis moleculares.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Evaluar si los caracteres morfológicos y el gen mitocondrial citocromo oxidasa I de los complejos *Moina micrura* 1 y *Moina micrura* 2, corresponden al sujeto de referencia, en este caso *Moina micrura* s. str.

1.2. Objetivos específicos

Establecer las características morfológicas de la región cefálica, apéndices torácicos y post-abdomen de las hembras partenogenéticas de los complejos *Moina micrura* 1 y *Moina micrura* 2 de diferentes localidades de México.

Comparar las características encontradas en los complejos *Moina micrura* 1 y *Moina micrura* 2 con *Moina micrura* s. str., procedente de una localidad muy cercana a la localidad tipo original (que actualmente ha desaparecido) denominada Estanque Sadka en la República Checa, a fin de establecer las diferencias morfológicas entre ellas.

Relacionar los datos morfológicos obtenidos de las hembras de los complejos *Moina micrura* 1, *Moina micrura* 2 y *Moina micrura* de República Checa, con el fin de determinar si lo que se observa a nivel molecular con el gen citocromo oxidasa I, corresponde con las diferencias morfológicas de estos complejos.

2. Marco Teórico

2.1. Biología y descripción general

Los cladóceros o comúnmente llamados en México “pulgas de agua”, son uno de los grupos más abundantes del zooplancton de agua dulce, y miden alrededor de entre 0.2 mm y 6 mm de longitud (Forró et al., 2008; Trejo-Albarrán et al., 2014). Estos organismos con características morfológicas y biológicas distintivas presentan claras manifestaciones de radiación adaptativa, por lo que ocupan diversos hábitats, como lóticos, leníticos, litorales, limneticos, de profundidad variable, desde las latitudes tropicales hasta las regiones boreales, constituyendo parte importante de la biomasa de las comunidades del plancton, el bentos y los grupos asociados a la vegetación (Paggi, 2004; Elías-Gutiérrez et al., 2008b; Trejo-Albarrán et al., 2014).

Estos microcrustáceos, y varias especies del genero *Moina* desempeñan un papel importante en la cadena trófica, debido a que son consumidores de fitoplancton, bacterias y a la vez sirven como alimento para peces, crustáceos y aves (Thouvenot et al., 1999; Conde-Porcuna et al., 2004; Ortaz et al., 2006; Bekker et al., 2016).

Igualmente, son indicadores sensibles de estrés, se han destacado por su valor como indicadores biológicos, debido a que toleran condiciones de eutrofización o salinización extremas, y se han usado como organismos modelos en pruebas ecotoxicológicas (Elías-Gutiérrez et al., 2008b; Miracle & Nandini, 2011). Tanto así, que en México, por lo menos existe una norma oficial NMX-AA-087-2010-SCFI que permite utilizar a *Daphnia magna*, Straus

1820, en ensayos de toxicología, a pesar de ser un organismo exótico en el país (Elías-Gutiérrez et al., 2008b).

El ciclo reproductivo de los cladóceros tiene una fase sexual (gamogénesis) y otra asexual (partenogénesis) (Montellano-Rosales & Mendoza-Vallejo, 1994).

Las poblaciones de *Moina* están dominadas por hembras, debido a que su reproducción más continua es la asexual, es decir, sus huevos no necesitan ser fecundados, generando hembras neonatas muy similares a las adultas. Estas hembras presentan 3 mudas antes de llegar a ser adultas, y las diferencias entre estas etapas se presentan en la desaparición de los poros cefálicos, cambios menores en la morfología del escudo y la espinulación de las valvas. Así mismo, pueden reproducirse de forma sexual cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Ante un estímulo ambiental como reducción en el alimento, periodos de sobrepoblación, fotoperiodo o temperatura, las hembras partenogénicas generan un huevo diferente que si no es fecundado dará origen a machos haploides y de menor tamaño que las hembras. En el caso de estos machos, los cambios son más notorios que en las hembras, y necesitarán 2 mudas antes de llegar a ser adultos; donde presentarán bien desarrollados caracteres sexuales secundarios que permitirán el reconocimiento inequívoco entre especies. Estos caracteres son: el gancho copulador, la seta del macho y los cambios en el postabdomen. En el caso de que los huevos sean fecundados, se generará una estructura de resistencia llamada efipio, que puede ser liberado directamente en el agua, fusionarse en el caparazón o separarse con la muda o muerte de la madre (Elías-Gutiérrez et al., 2008b).

Estos efipios son resistentes a condiciones ambientales adversas, como la desecación. También sobreviven al paso por el tracto digestivo de peces y aves y pueden adherirse a plumas y/o pelos de diferentes animales que le permitirán su dispersión. Cuando las condiciones en el

ambiente sean optimas, los efipios eclosionarán en hembras partenogenéticas, mientras esto ocurre los efipios se sedimentarán en el fondo de los cuerpos de agua y permanecerán en estado latente (Elías-Gutiérrez & Sarma, 1999; Figuerola et al., 2002; Elías-Gutiérrez et al., 2004; Forró et al., 2008)

Hasta ahora se conoce un numero registrado de 620 especies de cladóceros basados en las descripciones existentes (Forro et al., 2008). Sin embargo, de esta cifra solo entre el 45-50% de las especies pueden ser consideradas válidas y bien descritas, ya que en la última década en la taxonomía de los cladóceros se han hecho descubrimiento de nuevas especies y familias antes desconocidas (Elias-Gutierrez & Valdez-Moreno, 2008; Dumont, 2016). Asi mismo, la integracion de nuevas y diferentes formas para aclarar la biodiversidad de este grupo han conllevado a la reevaluacion de que muchos de estos cladoceros ya descritos, indudablemente pertenezcan a especies sinonimizadas o representen complejos de especies cripticas (Korovchinsky, 2006; Elías-Gutiérrez et al., 2008a; Nedli et al., 2014).

La alta capacidad en los cladóceros de moverse y migrar ha contribuido a un error histórico de que la mayoría de las especies dentro de este grupo son cosmopolitas (Bekker et al., 2016). Por lo menos, Frey desde (1982,1987) proporciono evidencia morfológica y biogeográfica de que muchos cladóceros, a pesar de su capacidad de dispersión tienen distribuciones regionales.

2.2. Morfología, taxonomía y código de barras

La morfología de los cladóceros es muy variable, poseen una cabeza bien definida, cubierta por un escudo cefálico que presenta poros denominados “poros cefálicos” de función desconocida, sin embargo, estas estructuras son importantes desde el punto de vista taxonómico, en la

identificación de especies. Debajo de este escudo se insertan las antenas y las mandíbulas. En el margen anterior, coincidiendo con las antenas encontramos el fornix (Elías-Gutiérrez et al., 2008b).

La cabeza posee un solo ojo compuesto rodeado de lentes hialinas y puede presentar un ocelo correspondiente al ojo naupliar, que está formado por fotorreceptores. En la parte ventral de la región cefálica se encuentra el labro y de la cabeza hacia el tórax se presentan el resto de piezas bucales: mandíbulas, maxilulas y paragnatos (Elías-Gutiérrez et al., 2008b).

Igualmente, presentan un par de apéndices llamadas anténulas, que poseen un tamaño bastante reducido, ausentes de movimiento y cubiertas por el rostro. En su extremo distal se encuentran 9 proyecciones largas con función sensorial llamadas estetascos. Seguido a esto, se encuentran el segundo par de antenas, que constituyen el principal órgano de locomoción en los cladóceros (Elías-Gutiérrez et al., 2008b).

En Anomópodos el caparazón es bivalvo y puede presentar diferentes ornamentaciones. Cumple la función de cubrir el tórax, el abdomen y los 5-6 apéndices torácicos que son completamente diferentes para este grupo, donde cada uno realiza una función complementaria (raspar, capturar, limpiar o filtrar), o pueden ser similares como sucede en el grupo de los Ctenopoda. La parte posterior del caparazón puede terminar en una espina cuya longitud es variable incluso entre miembros de una misma especie (Elías-Gutiérrez et al., 2008b).

Seguido del tórax se encuentra el abdomen, que se continúa en una porción curvada hacia la parte ventral que recibe el nombre de “postabdomen”, cuya función aparentemente es de limpieza de los apéndices torácicos y del canal alimenticio. En este se encuentran el ano, las espinas anales y en el extremo distal las garras postabdominales, las cuales pueden tener un

arreglo de espinas en forma de péctenes que han sido de valor taxonómico en la diferenciación de especies (Elías-Gutiérrez et al., 2008b).

Las especies de cladóceros debido a su complejidad morfológica, pueden ser divididas en tres categorías: 1) las especies morfológicamente bien diferenciadas que permiten una identificación fácil y confiable, b) las especies que después de un análisis exhaustivo pueden llegar a ser identificadas y c) las especies de morfología muy similar que se les ha denominado como especies crípticas (Elías-Gutiérrez, 2000).

La identificación de especies basada exclusivamente en la morfología proporciona diferentes limitaciones que impiden conocer realmente la biodiversidad del planeta, por ejemplo, la ausencia de taxonomos expertos, el uso de claves de identificación incompletas para los organismos de estudio, la plasticidad fenotípica y la variabilidad morfológica de los caracteres usados en el reconocimiento de especies, conducen a identificaciones incorrectas que conllevan a pasar por alto los taxones morfológicamente crípticos que son comunes en muchos grupos de animales (Hebert et al., 2003).

Estas limitaciones señalaron la necesidad de un nuevo enfoque para el reconocimiento de los taxones, por lo que Hebert et al., (2003) propuso hace 14 años, una alternativa donde utilizó métodos moleculares que permitieron la identificación rápida y eficiente de los seres vivos, incluyendo todas las etapas del organismo, a lo que llamo “Codigo de barras”. Esta propuesta se baso en la utilización de un fragmento de gen mitocondrial que codifica para la Citocromo Oxidasa I (COI o Cox 1) de la cadena respiratoria, con aproximadamente 648 pb. Este fragmento del gen ha tenido la ventaja de que más del 95% de las especies poseen COI diferentes, por lo que las divergencias del COI dentro de una especie nombrada pocas veces han superado el 2%, por lo tanto, miembros de diferentes especies mostraran una divergencia mayor al 3%. Al ser un

gen mitocondrial codificador de proteínas, las inserciones y/o deleciones son esporádicas. Así mismo, existen cebadores universales robustos que han permitido secuenciar la mayoría de los animales, y al poseer una elevada tasa de sustitución nucleótida ha proporcionado una buena señal filogenética (Hebert et al., 2003; Ratnasingham & Hebert, 2013). Los estudios con códigos de barras de ADN en animales, han facilitado la información confiable e ideal de los datos, debido a que actualmente existe más de dos millones de registros disponibles para esta región del gen (Ratnasingham & Hebert, 2013). En el caso del zooplancton, esta metodología ha demostrado que es una primera aproximación para el descubrimiento de especies crípticas, sobre todo en cladóceros y copépodos (Elías-Gutiérrez et al., 2008a; Gutiérrez-Aguirre et al., 2014).

Los objetivos iniciales de lo propuesto anteriormente fue crear una biblioteca de secuencias de códigos de barras para todas las especies conocidas, donde todas las secuencias generadas fueran subidas a una plataforma bioinformática de libre acceso llamada BOLD (The Barcode of Life Data System), con el fin de integrar la recolección de muestras para sus posibles estudios (Ratnasingham & Hebert, 2007). En BOLD, para poder generar los códigos de barra es necesario subir los datos requeridos (nombre de la especie, nombre del colector, fecha de recolección, coordenadas GPS, secuencia COI con al menos 500 pb, primers utilizados en el PCR, cromatogramas e información del depósito en una colección registrada) (Ratnasingham & Hebert, 2007). Los códigos de barras se agrupan en BINs (Barcode Index Number System), los cuales son un registro que proporciona una identificación única basada en la variación de las secuencias de ADN de su COI. Esto se hace por medio de un algoritmo eficaz y rápido que ha sido efectivamente probado en un amplio conjunto de grupos taxonómicos (Ratnasingham & Hebert, 2013).

Sin embargo, es de resaltar que el código de barras no reemplaza ni compite con la taxonomía tradicional, solo abre las puertas a la identificación de los seres vivos con un mayor número de recursos disponibles, lo que llamaríamos taxonomía integrativa, un concepto aplicado por Dayrat, (2005) para poder esclarecer la complejidad taxonómica de las especies que requieren un estudio a partir de múltiples y complementarias perspectivas, integrando la taxonomía clásica, el código de barras y otros tipos de información que permitirán una correcta identificación de las especies.

3. Materiales y métodos

Declaración de Ética

La recolección de muestras de zooplancton para estudios de investigación científica sin fines comerciales en el territorio mexicano no se rige bajo ninguna ley o acuerdo en ese país. Por lo tanto, no se requirió permisos específicos para este tipo de estudios de campo. Pero lo anterior no fue razón para que en todo este proyecto no imperaran los principios éticos universales, además de que su ejecución no causó daño a las zonas de muestreo.

3.1. Localidades de recolección

Los especímenes de *Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2 fueron recolectados en cinco localidades de México (Chihuahua, Durango, Michoacán, Puebla y Estado de México) entre los

años 2004, 2005, 2007 y 2011 (Ver anexo 1), con una red de plancton de 50 micras de abertura de malla (Elías-Gutiérrez et al., 2008a) en diversos ambientes de agua dulce. Los especímenes colectados fueron fijados en etanol al 96%. Sus coordenadas geográficas específicas y las fechas de recolección pueden ser confirmadas en los archivos del proyecto "Cladóceras de México" (Elías-Gutiérrez et al., 2008a), en el Barcode of Life Data Systems www.boldsystems.org (Ratnasingham & Hebert, BOLD: The Barcode of life Data System, www.barcodinglife.org, 2007).

En el caso de *Moina micrura* s. str. (Kurz, 1874), todo el material tipo de las especies descritas antes del año 1900 no se encuentran disponibles (Goulden, 1968), por lo tanto todos los ejemplares fueron recolectados en un estanque llamado Sadka (49.966 N, 15.33 E) situado entre los pueblos Ověčáry y Nové Dvory, 4.6 km al este de Kutná, en la República Checa, muy cerca de la localidad tipo original (Elías-Gutiérrez, datos no pub.) (Fig. 1).

La descripción morfológica de *Moina micrura* s. str., y las imágenes empleadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Doctor Manuel Elías Gutiérrez con fines comparativos; donde todas ellas corresponden y son propiedad del Grupo de Zooplancton y Oceanografía del Colegio de la Frontera del Sur (ECOSUR) – Unidad Chetumal, México. (Laminas 1-6; Datos no publicados, prohibido reproducir).

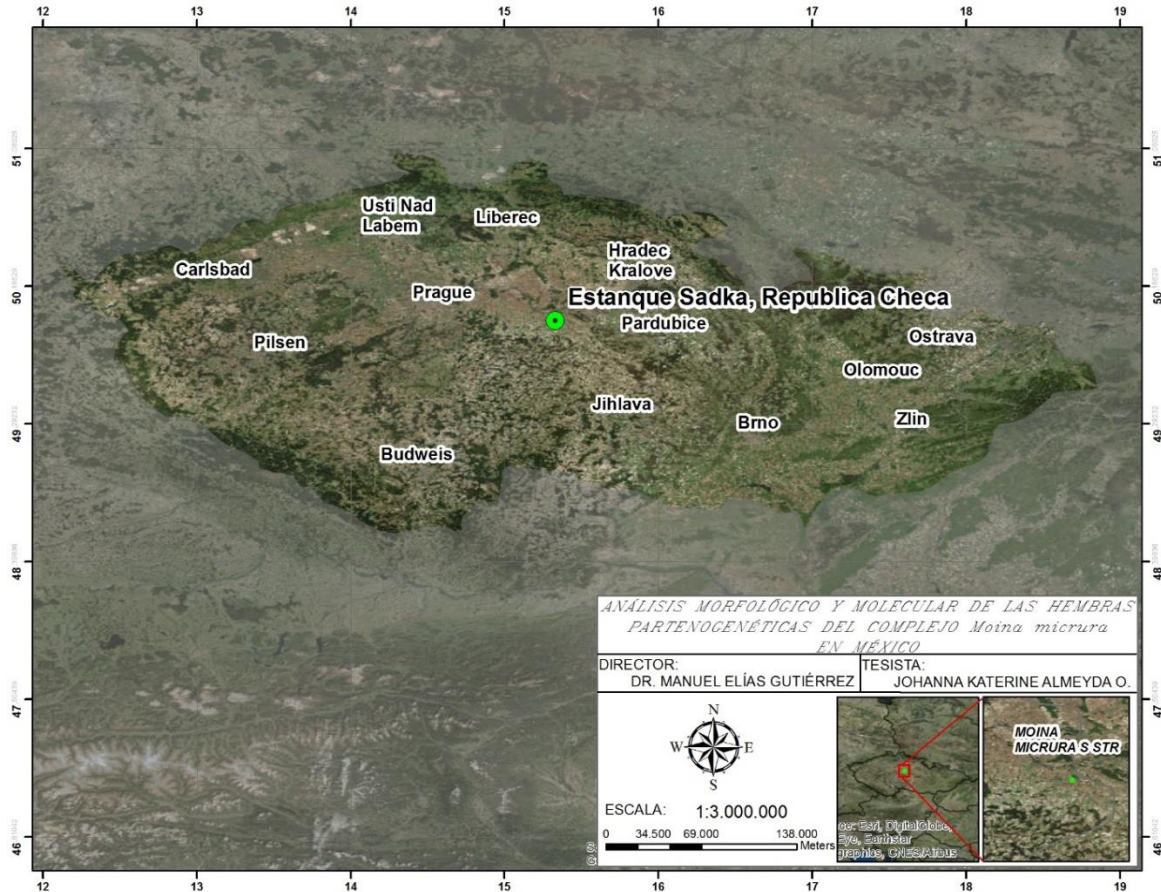


Figura 1. Distribución geográfica de *Moina micrura* s. str. (Estanque Sadka).

3.2. Material examinado

***Moina cf. micrura* 1:** Este grupo se encontró en las regiones semi-desérticas del norte de México, del lado oeste (Elías-Gutiérrez et al., 2008a). De este grupo se examinaron: 15 Hembras adultas partenogenéticas y 10 hembras epipiales del Salvador Durango limnética, Durango, México. Lat. 26.067, Long -104.974. 3 de octubre de 2004. Lote 1174-1176. 10 Hembras adultas partenogenéticas Fin carretera Chihuahua B, Chihuahua, México. Lat. 26.907, Long -104.559. 4 de octubre de 2004. Lote 1201-1202. 10 Hembras adultas partenogenéticas Km 44 Parral-Jiménez, Chihuahua, México. Lat. 27.047, Long -105.218. 4 de octubre de 2004. Lote 1207-

1208. 5 Hembras adultas partenogenéticas Santa Teresita III A, Durango, México. Lat. 26.351, Long -105.265. 4 de octubre de 2004. Lote 1191 (Fig. 2). Datos obtenidos por medio de la plataforma BOLDSYSTEMS, números de acceso (process Id's): ZPLMX 269, 270, 271. ZPLMX 361, 362, 363, 365. ZPLMX 261, 284, 285, 286, 287, 372, 373, 374, 375, 376, 377. ZPLMX 167,168. ZPLMX 366-371. ZPLMX 273, 276, 277, 288, 290.

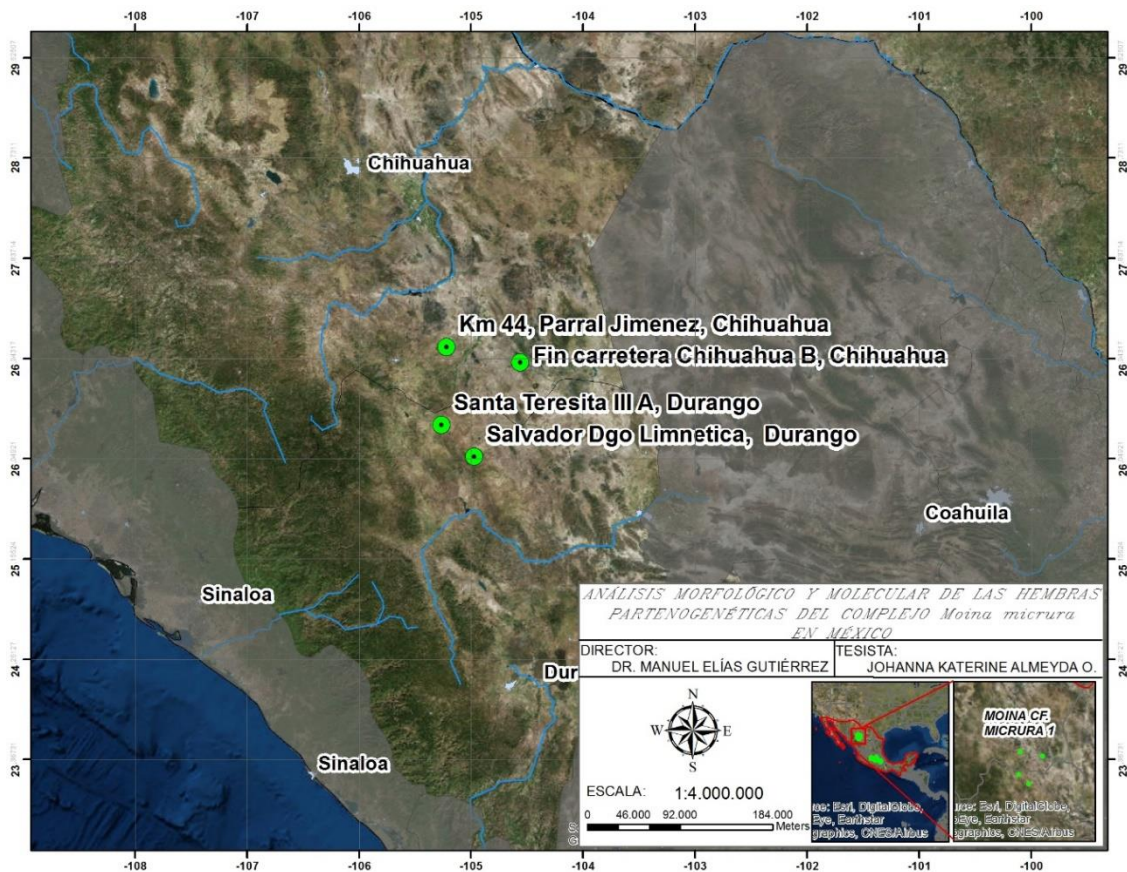


Figura 2. Distribución geográfica de *Moina cf. micrura* 1 (Salvador Durango limnetica, Provincia Durango, México. Fin carretera Chihuahua B, Provincia Chihuahua, México). Km 44 Parral-Jiménez, Provincia Chihuahua, México. Santa Teresita III A, Provincia Durango).

***Moina cf. micrura* 2:** Este grupo se encontró aparentemente restringida a las tierras altas de la meseta central en sitios de más de 2000 m sobre el nivel del mar (Elías-Gutiérrez et al., 2008a). De este grupo se examinaron: 10 Hembras adultas partenogenéticas y 10 hembras efipiales de la

presa Ignacio Ramírez arrastre vertical, Estado de México. Lat. 19.461, Long -99.797. 22 de junio de 2011. Lote 1755. 15 Hembras adultas partenogenéticas de la presa Ignacio Ramírez litoral, Estado de México. Lat. 19.462, Long -99.78. 22 de junio de 2011. Lote 1754. 5 Hembras adultas partenogenéticas Valsequillo centro, Puebla, México. Lat. 18.909, Long -98.16. 23 de mayo de 2007. Lote 1468. 10 Hembras adultas partenogenéticas La Goleta, Soyaniquilpan, Estado de México. Lat. 20.07, Long -99.556. 10 de Julio de 2005. Lote 1295-1298. 10 Hembras adultas partenogenéticas Cuitzeo, Michoacán, México. Lat. 19.925, Long -101.141. 18 de julio de 2005. Lote 1309 (Fig. 3). Datos obtenidos por medio de la plataforma BOLDSYSTEMS, números de acceso: HE- 405, 406, 407, 405.1, 406.1, 407.1. HE 619–619.1. ZMXII 026,050. ZPMLX 147,188, 339-342. ZPMLX 153, 154, 343, 344, 345, 346, 347, 348.

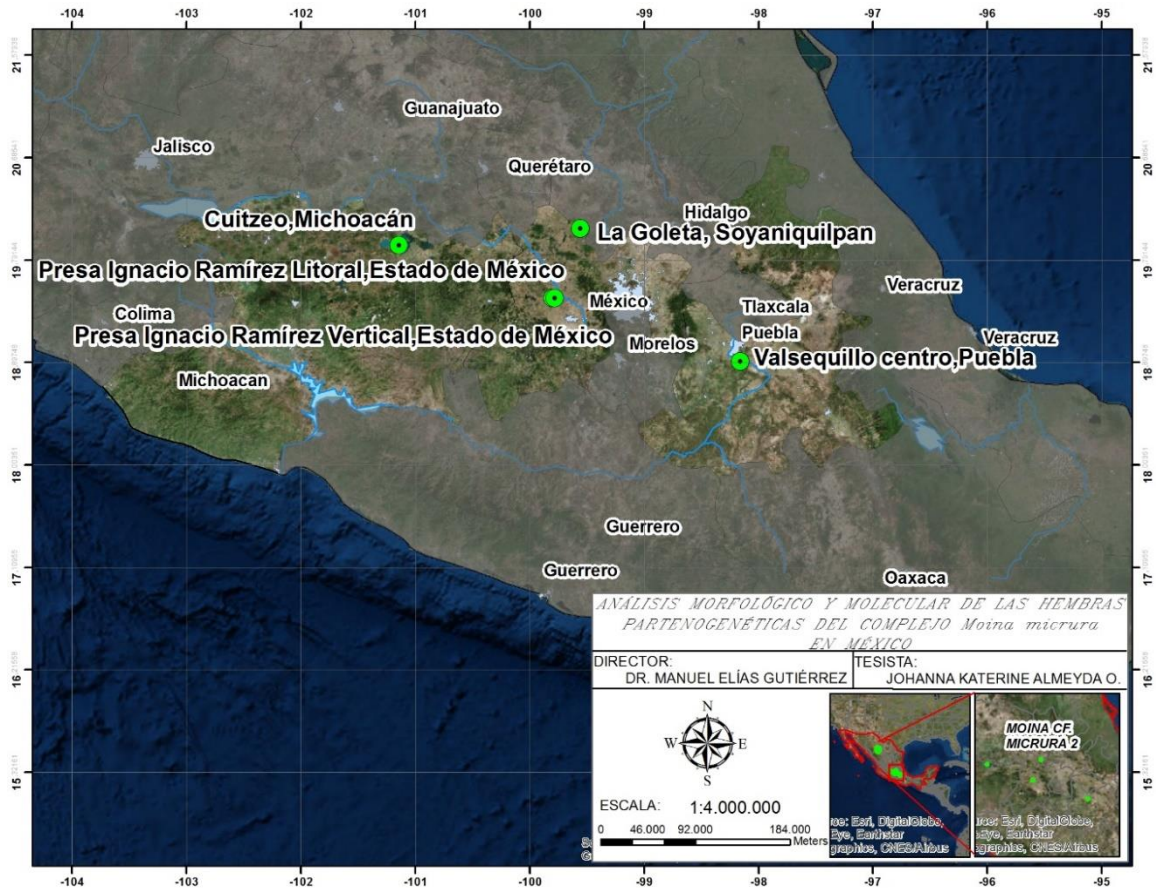


Figura 3. Distribución geográfica de *Moina* cf. *micrura* 2 (Presa Ignacio Ramírez vertical y litoral, Ciudad de México. Valsequillo centro, Provincia Puebla, México. La Goleta, Provincia Soyaniquilpan, México. Cuitzeo, Provincia Michoacán, México).

3.3. Análisis morfológico

De la colección de individuos antes descrita, para este trabajo, se separaron los morfotipos a estudiar en tubos eppendorf debidamente etiquetados; todo esto se hizo con un estereoscopio Discovery V12 Zeiss. Previo a la disección, se colocaron las hembras partenogenéticas y epipiales sobre un portaobjetos con glicerol y formol al 4% (1:1) y se montaron. Las observaciones y mediciones (Longitud y anchura del hábito, longitud y ancho de las anténulas,

longitud y ancho del basipodito) se realizaron en un microscopio Olympus Bx51 con un ocular micrométrico para fines comparativos en la realización de este estudio.

Con el objetivo de establecer cambios significativos en el tamaño corporal de *Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2, se midió la longitud y altura del cuerpo de cada uno de los organismos trabajados antes de ser diseccionados, verificando que no pertenecieran a alguno de sus congéneres. Así mismo, con estas medidas se halló la proporción (Altura/Longitud) como lo trabaja Hudec (1990) y Kotov (1999). Se elaboró una matriz de datos con las medidas halladas anteriormente mencionadas y se evaluó la distribución de los datos con un test de normalidad Shapiro-Wilk, posteriormente debido a que los datos no fueron normales, se decidió realizar la prueba de Mann Whitney que compara las medias de dos variables independientes no paramétricas. El análisis estadístico fue hecho en el software estadístico PAST versión 2.17c, asumiendo $P < 0.05$ como criterio de significancia.

La identificación de las especies se hizo mediante observaciones de organismos completos y las disecciones, siguiendo las descripciones de diferentes autores (Goulden 1968, Alonso 1996, Kotov et al., 2005). Para el análisis fino de las muestras se siguió el procedimiento dado por Elías-Gutiérrez et al., 2008b que sugiere la extracción de los apéndices torácicos con la ayuda de agujas de tungsteno afiladas por electrolisis con una corriente de 6 V en una solución de KOH al 10%.

Las micro disecciones se realizaron en el estereoscopio Discovery V12 Zeiss. Este proceso se desarrolló de la siguiente manera: Para empezar, una aguja de tungsteno sujeto el cuerpo del organismo a la altura de la cámara embrionaria para separar cuidadosamente las antenas del individuo, esto con el fin de observar en perfecto estado los detalles que nos proporcionaría esta estructura (Pelos, espinas, setas etc.). Después de retiradas las antenas, se introdujo la otra aguja

por la parte ventral de las valvas para separar el tórax del resto del cuerpo, dejando las valvas. Seguido de esto se separó uno por uno los apéndices del organismo (Toracopodos I, II, III, IV y V). Por último, después de tener estas estructuras separadas, se cortó el postabdomen del organismo para su posterior observación (Fig. 4). Las preparaciones se sellaron con el medio de montaje Gurr (medio de montaje DePex, BDH England) para posteriormente ser integradas a la colección de referencia de ECOSUR Chetumal. El examen de estas preparaciones se realizó por medio de las técnicas de microscopía de luz a campo claro, contraste de fases y contraste interdifereencial de fases (Normanski) en el microscopio óptico anteriormente mencionado. Las mediciones se realizaron con un micrómetro ocular. Durante la observación de las disecciones, se tomaron fotografías de los ejemplares en diferentes planos focales, con un mínimo de 90 fotos y un máximo de 500 fotos, para posteriormente empalmarlos utilizando el software Helicón Focus, versión 6.3.0 (<http://www.heliconsoft.com>) con el que se obtuvo una sola imagen nítida. Y con el software Photoshop 6.0 se realizó una limpieza del fondo, se anexó una escala y se almacenó. Todo esto se realizó bajo la observación y asesoramiento del Dr. Manuel Elías Gutiérrez.

Para el análisis más detallado de las estructuras se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Para esto se requiere que el material de observación pase por una serie de pasos antes de ser visto al microscopio. Esta fase empieza por pasar los organismos completos seleccionados por una deshidratación de alcoholes sucesivos con el fin de extraer el agua. Para esto, los organismos se depositaron en pequeños tubos debidamente sellados y etiquetados en un tren de alcoholes que empezó en una concentración del 30% continuando de 10 en 10 hasta llegar al 90%, pasando al 96% y finalizando en 100% (Elías-Gutiérrez et al., 2008b). Una vez deshidratadas las muestras se procedió a secarlas por el

procedimiento del punto crítico, realizado con un equipo de alta gama (Samdri-7957). Este procedimiento fue introducido por Anderson (1951) y aplicado por vez primera en crustáceos por Crittenden (1981), y desde entonces ha sido el método mayormente empleado en cladóceros (Juracka et al., 2016). Después de secado el material en el Samdri-7957 se procedió a montar las muestras para ser cubiertos con una película de oro de 3 nanómetros de espesor utilizando el equipo DENTON VACUUM. Llegado a este punto las preparaciones se observaron y se fotografiaron con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6010PLUS/LA en el Colegio de la frontera del Sur (ECOSUR), Unidad Chetumal, México. Todo este procedimiento estuvo bajo la dirección del Dr. Manuel Elías Gutiérrez.

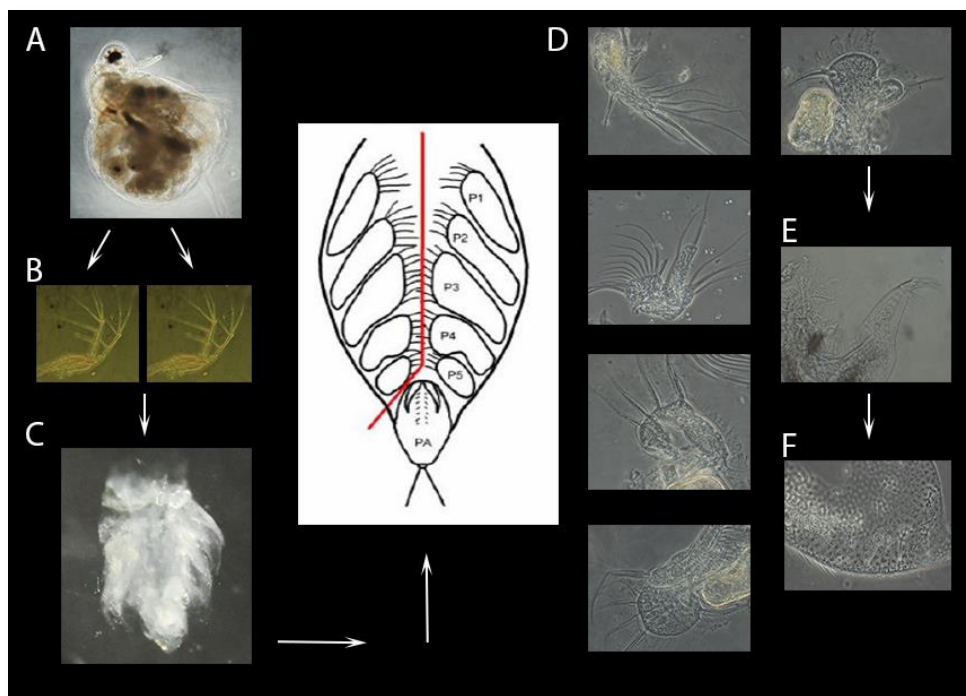


Figura 4. Técnica para la disección de cladóceros para la observación del organismo completo. A. Hábito; B. Antenas, C. Tórax, D. Toracopodos I – V, E. Postabdomen, F. Valvas

3.4. Código de barras

La extracción, amplificación y secuenciación de ADN se realizó en ECOSUR Chetumal, utilizando protocolos estandarizados (Hajibabaei et al., 2005).

El ADN se extrajo de la homogenización de individuos completos usando una mezcla de proteinasa K con buffer de lisis de invertebrados dirigido toda la noche a 56 °C, esto se hizo mediante el uso de placas con membranas de fibra de vidrio

AcroPrep 96.1 mL de 2.0 µm PALL y la estación de manejo de microfluidos Biomek NX© (Ivanova et al., 2006).

Se amplificó un segmento de 658 pb del COI usando los primers LCOI490 y HCO2198 (Folmer, Black, Hoeh, & Vrijenhoek, 2004). El volumen total para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue de 12.5 µl, la cual contenía 6.25 µl de trehalosa al 10%, 2 µl de agua estéril, 1.25 µl de buffer 10X para PCR, 0.625 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.125 µl de cada primer (0.01 mM), 0.0625 µl de dNTP (0.05 mM), 0.3125 U de TaqDNA polimerasa (New England Biolabs or Platinum Taq from Invitrogen) y 2.0 µl de templado de DNA. Los productos del PCR fueron visualizados en geles de agarosa prefabricados (E-Gels©, Invitrogen) y los más intensos seleccionados para su secuenciación.

La secuenciación se realizó en el Biodiversity Institute of Ontario, usando el kit BigDye© Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Inc.) descrito en Hajibabaei et al., 2006 y el secuenciador capilar ABI 3730, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el software SEQSCAPE v.2.1.1 (Applied Biosystems, Inc.).

Las secuencias para cada espécimen, los cromatogramas, los set de primers, las fotografías y las localidades de recolección para las especies trabajadas en este estudio se encuentran disponibles dentro del proyecto “Cladóceros de México” en la base de datos BOLD Systems (www.boldsystems.org, Ratnasingham & Hebert, 2007)

3.5. Análisis de datos

Para identificar especies de cladóceros con el COI, se calculó por medio de las herramientas disponibles en BOLD la divergencia de las secuencias usando el modelo de distancias genéticas de Kimura dos parámetros (K2P) (Kimura, 1980). Las distancias génicas se calcularon a nivel de especie. Mediante el modelo de Vecino más cercano se elaboraron árboles de identificación en base a las distancias obtenidas con el K2P, para obtener representación gráfica de los patrones de divergencia entre especies (Saitou & Nei, 1987). Finalmente se construyó un árbol simplificado usando el software MEGA 3 (Kumar et al., 2004) y con ello se examinó la relación entre los taxones.

4. Resultados

4.1. Morfología de las hembras partenogenéticas y efipiales del complejo *moina cf. micrura 1* y *moina cf. micrura 2*.

Taxonomía

Phylum Arthropoda

Clase Branchiopoda

Orden Anomopoda Sars, 1865

Familia Moinidae Goulden, 1968

Genero Moina Baird, 1850

Moina cf. micrura 1

(Figuras 5 – 16)

Descripción de la hembra

Hembra partenogenética adulta: Largo: 0,65 mm a 0,85 mm (n=40). Cuerpo casi redondeado en vista lateral, altura: 0,45 mm - 0,55 mm y radio (Altura/longitud = 0,47-0,67 mm) (Fig. 5). Altura máxima en la porción media-posterior, dependiendo del número de embriones que porte. No posee pelos ni espinas en la cabeza. El dorso de las valvas es fuertemente convexo, y en la mayoría de las hembras se eleva ligeramente por encima del margen dorsal de la cabeza. El ángulo postero-dorsal está bien definido. El margen posterior de las valvas es más o menos recto finalizando con margen ventral ampliamente convexa. La superficie de las valvas posee

esclerotizaciones leves, con puntos amarillos. Los organismos diseccionados eran de color blanquecino.

Cabeza: Relativamente grande y redondeada, que se extiende en dirección antero-ventral. Con una marcada depresión supra-ocular y un ojo compuesto rodeado de lentes hialinos. Ocelo ausente. No posee pelos ni espinas alrededor de las márgenes ni en la superficie de la cabeza.

Anténulas (Figura 6): Ligeramente ensanchadas hacia la parte proximal (Figura 6B), largas y casi cilíndricas con una longitud de 133 a 150 micras (Fig. 6A). Posee sétulas largas en la cara posterior (Figura 6B) y numerosas hileras transversales de dentículos o micro espinas en la cara anterior (Figura 6C), observables exclusivamente mediante la microscopia electrónica de barrido (SEM). Seta sensorial delgada ubicada ligeramente hacia la parte distal de la mitad proximal y surgiendo de la cara lateral (Fig. 6A, D). Extremo distal rodeado de una hilera de espínulas con bases gruesas y cortas (Fig. 6E). Nueve estetascos cortos de tamaño ligeramente diferente.

Labro: Con cuerpo principal carnoso, estrechándose distalmente, con margen ventral convexa, segmento basal de forma cilíndrica y con pelos largos en la parte curvada (Fig. 6F).

Antenas (Figura 7): Segmento basal grande (Basipodito) con una longitud de 212 - 240 micras. En la superficie dorsal y ventral del basipodito presenta hileras transversales de espinas fuertemente esclerotizadas, de tamaño irregular y pelos finos alrededor (Fig. 7A). En la parte distal del basipodito presenta unas pequeñas protuberancias, así como en la cara lateral del segmento cerca de donde se inserta el endopodito (flecha en la Fig. 7B), también presenta 3 setas sensoriales y una espina distal del lado externo (Fig. 7C). En la parte proximal interna del basipodito se encuentran 2 setas, una larga (125 - 180 micras) y otra corta (80 - 120 micras) (Fig. 7D), con una proporción respecto al basipodito de 1,6 - 1,3 veces y 2,6 veces - 2 veces. En la parte distal del basipodito se encuentran 1 seta larga (115 - 160 micras) (Fig. 7E) y una espina

corta distal (12-20 micras), con una proporción respecto al basipodito de 1,8 - 1,5 veces y 17 - 10.6 veces (Fig. 7F).

Antenas natatorias (Figura 8): exopodito con 4 segmentos, ligeramente más corto que el endopodito, el cual presenta 3 segmentos (Fig. 8A). Formula antenal: Setas 0-0-1-3 / 1-1-3, espinas 1-1-0-1 / 1-1-1. En la Fig. 12B se observa acercamiento de la espina del primer segmento del exopodito. Los segmentos de las ramas poseen hileras transversales de diminutas espinas, observables exclusivamente mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Fig. 8C). En ambas ramas antenales hay tres setas largas y apicales natatorias, todas con segmento basal y distal, armadas bilateralmente con largas y finas setas. Las setas laterales poseen las mismas características.

Postabdomen (Figura 9): Parte distal con forma cónica, ensanchado en la parte proximal. Margen ventral casi recto con diminutas espínulas formando filas transversales (flechas en Fig. 9A). En vista lateral una hilera de 7-9 dientes plumosos grandes (Fig. 9B). Distalmente se presenta un diente bidentado lateral, siempre con la rama distal significativamente más larga que la rama proximal (Fig. 9C). Setas natatorias bisegmentadas, más largas que el postabdomen, con la parte proximal más corta y sin sétulas; su parte distal más larga con pocas setas finas, ubicadas bilateralmente (Fig. 9D).

Garra postabdominal larga y recurvada, con punta afilada y puntiaguda (Fig. 9E, F) hacia el extremo distal. La parte ventral proximal de la garra tiene una hilera de 6-10 espinas afiladas, denominados "Basaldorn" (Fig. 9E). El lado dorsal de la garra tiene una hilera de espinas finas que se extienden desde su base hasta la punta (Fig. 13E), ligeramente más pequeñas hacia la parte distal (Fig. 9F).

Valvas (Figura 10A-D): Grandes y subovoidales, con 13 a 17 espinas marginales a lo largo del margen ventral (Fig. 10A). Posterior a la última espina, se observan grupos organizados de 8 a 13 espínulas. En cada grupo se pueden apreciar de 8 a 10 espinas que aumentan de tamaño distalmente (Fig. 10B). En la parte dorsal de las valvas existe un par de ganchos curvados (Fig. 10C), uno por cada valva. La superficie de las valvas presenta esclerotizaciones en forma de cuadrícula (Fig. 10D) y círculos redondos de color amarillo vistos en el microscopio óptico.

Toracópodos

Toracópodo I (Figura 11A): Lóbulo distal o endito 4 (“segmento final”) con una sola seta anterior gruesa fuertemente esclerotizada, con el margen basal desnudo y el extremo distal con sétulas cortas y finas. Junto a esta se observan dos setas largas, delgadas y blandas; bilateralmente setuladas. Endito 3 (“penúltimo segmento”) con una seta anterior, única y gruesa fuertemente esclerotizada (flecha en la foto 11B), cuya presencia o ausencia es usado como carácter importante para el grupo “*micrura*” (Smirnov, 1971; Kotov et al., 2005) y una seta posterior, bilateralmente setulada. Endito 2 con dos setas posteriores. Endito 1 con tres setas posteriores (Fig. 11C). La armadura de las setas blandas y pertenecientes al E2/E3 es igual. Por último, este toracópodo posee dos ganchos eyectores curvados de diferente tamaño (flecha en Fig. 11D), que es un carácter distintivo de los anomópodos (Elmoor-Loureiro, 2005).

Toracópodo II (Figura 12A): Exopodito cilíndrico (Padhye & Dumont, 2014) con una seta larga bilateralmente setulada (flecha en Fig. 12B) (Kotov et al., 2005 dice que la homología de este “lóbulo distal” con un exopodito es dudosa). En su base presenta una pequeña seta gruesa lateral (flecha en Fig. 12C). Tres enditos que llevan 4 setas fijas posteriores, con setulacion bilateral (Fig. 12D) y una seta pequeña delgada cerca de la Gnatobase, señalada por una flecha gris en la Fig. 12E. Después de esta pequeña seta se presenta una sensila curvada. Otra seta larga

y setulada está presente después de la sensila, esta seta se denomina “seta pulsante larga o seta de batido (SB)” homóloga a la que se encuentra en Ilyocryptidae (Kotov et al., 2005), señalada por una flecha negra en la Fig. 12E y las siglas SB.

Gnatobase con cuatro setas anteriores, una sola seta larga cerca de la seta de batido (señalada como 1 en la Fig. 12E), tres setas en la esquina basal de la gnatobase (2-4 en la Fig. 12E), y de 13 a 16 setas posteriores en la “placa filtradora” de la gnatobase (Fig. 12E, a-ñ).

Toracópodo III (Figura 13A): Exopodito grande y plano (120 – 130 micras) con 4 setas distales (c-f) y 2 laterales (a-b), todas ellas setuladas bilateralmente. Parte distal interna con tres enditos. Endito 1, con una seta anterior (Fig. 13B). Endito 2 con una seta anterior (Fig. 137C) y otra posterior (Fig. 13D). Endito 3 con una seta anterior (Fig. 13C, marcada con un asterisco).

La gnathobase se encuentra bastante extendida, en comparación con los enditos que se empiezan a perder parcialmente (Elmoor-Loureiro, 2005). Y como se describe en otros Moinidae este toracópodo está principalmente formado por la gnathobase (Kotov et al., 2005) donde encontramos alrededor de 40 a 45 setas bisegmentadas y setuladas bilateralmente en el segmento distal (Fig. 13E).

Toracópodo IV (Figura 14A): Exopodito plano similar al del toracópodo III, pero menos ancho y largo (50 – 80 micras) con 4 setas distales (c-f) y 2 laterales (a-b), todas ellas setuladas bilateralmente. Parte distal interna con dos enditos. El endito 1 con una seta anterior y el endito 2 con una seta anterior y una seta posterior (Fig. 14B). La gnathobase se encuentran alrededor de 30 a 35 setas bisegmentadas y setuladas bilateralmente en el segmento distal (Fig. 14C).

Toracópodo V (Figura 15): Exopodito grande y ovoide con margen setulado, provisto de una seta larga distal (señalada por una flecha negra en la Fig. 15A) y una pequeña seta apical (señalada por una flecha gris en la Fig. 15A) setuladas bilateralmente. Endopodito con margen

setulado, provisto de una seta corta (señalada en la Fig. 15B) y una seta larga (señalada en la Fig. 15C).

Hembra Efipial (Figura 16A): Efipio maduro con un solo huevo y reticulación marcada en toda la superficie del caparazón (Fig. 16B). En la margen ventral y dorsal se observa un patrón de células semi circulares de diferente tamaño aplanadas, interconectadas unas con otras, dejando entre ellas espacios con proyecciones delgadas (flecha en la Fig. 16C).



Figura 5. Técnica para la disección de cladóceros para la observación del organismo completo. A. Hábito; B. Antenas, C. Tórax, D. Toracopodos I – V, E. Postabdomen, F. Valvas

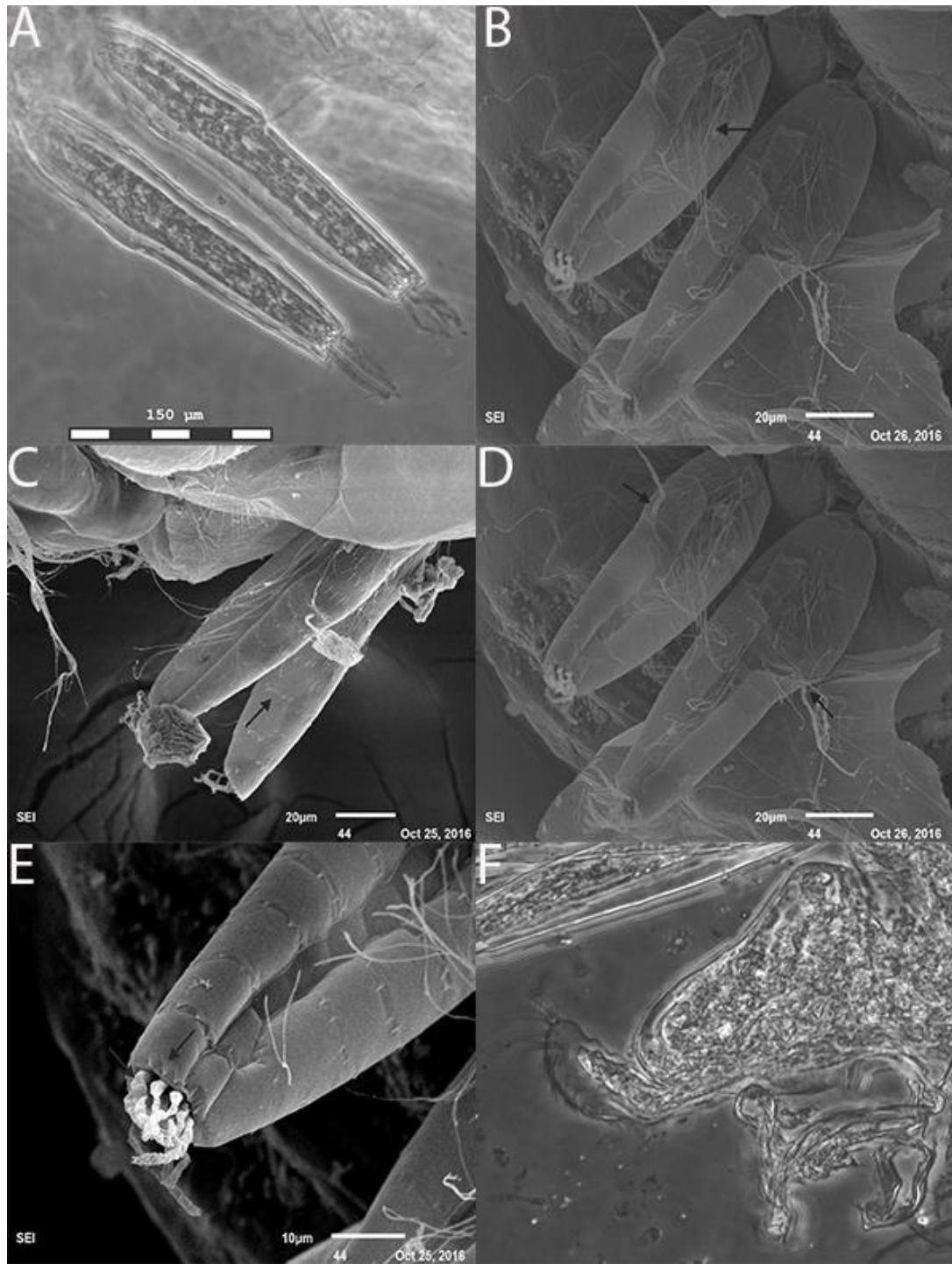


Figura 6. *Moina cf. micrura* 1. Durango, México, A. Anténulas; B. Cara posterior con sétulas largas; C. Hileras transversales de micro espinas, cara anterior. Visto en SEM; D. Seta sensorial; E. Hilera de espinas dispuestas en la base del extremo distal; F. Labro

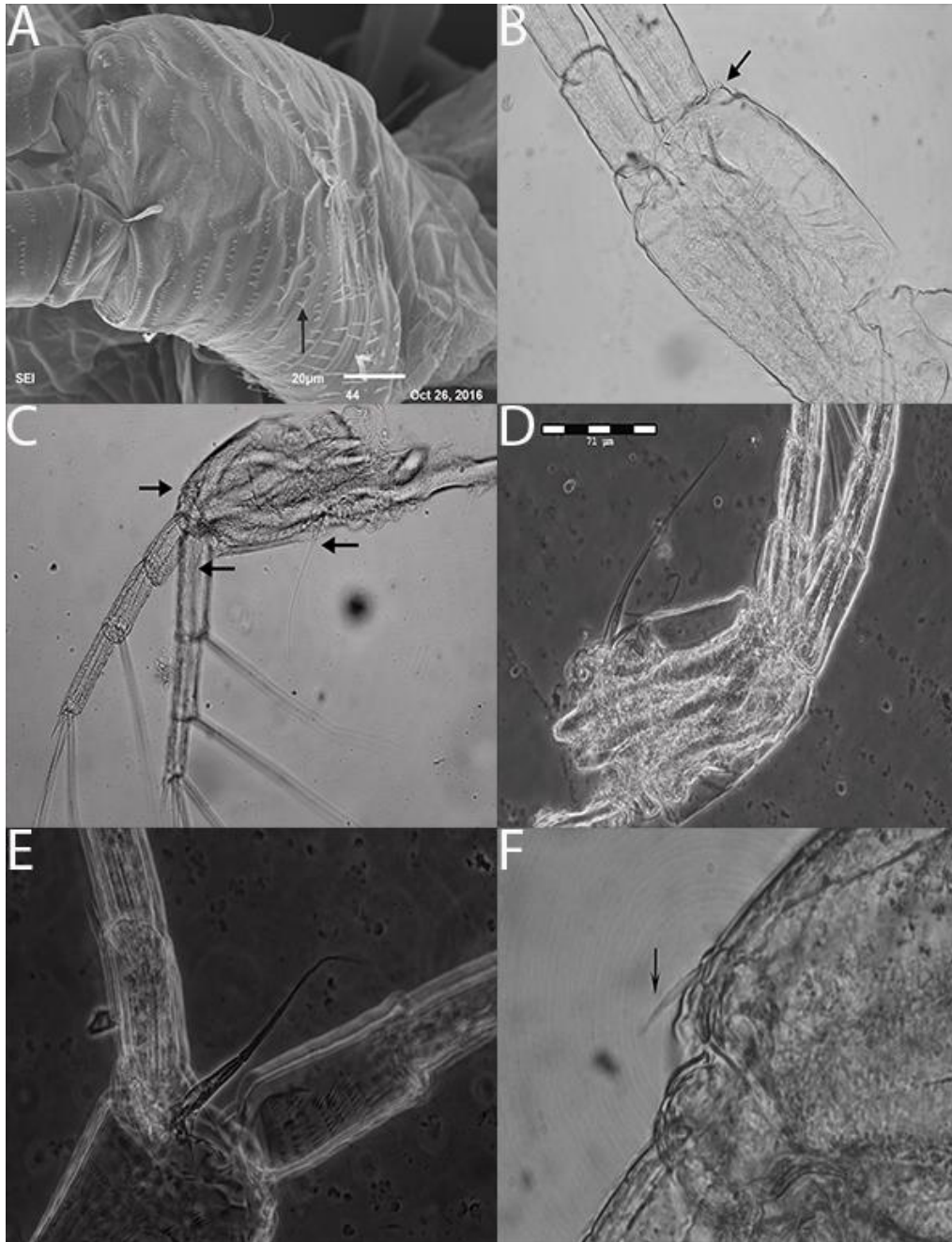


Figura 7. *Moina cf. micrura* 1. Durango, México. A. Basipodito con hileras de espinas esclerotizadas, superficie pilosa y seta distal externa; B. Protuberancia en la parte distal del basipodito, cara lateral; C. Setas sensoriales y espina distal externa del basipodito; D. Seta larga y seta corta proximal del basipodito; E. Seta larga distal interna del basipodito; F. Espina corta distal del basipodito, cara lateral.



Figura 8. *Moina cf. micrura* 1. Durango, México. A. Antenas natatorias, B. Acercamiento de la espina del segmento 1 del exopodito (1-1-0-1); C. Hilera de espinas en los segmentos del exópodo y endópodo.

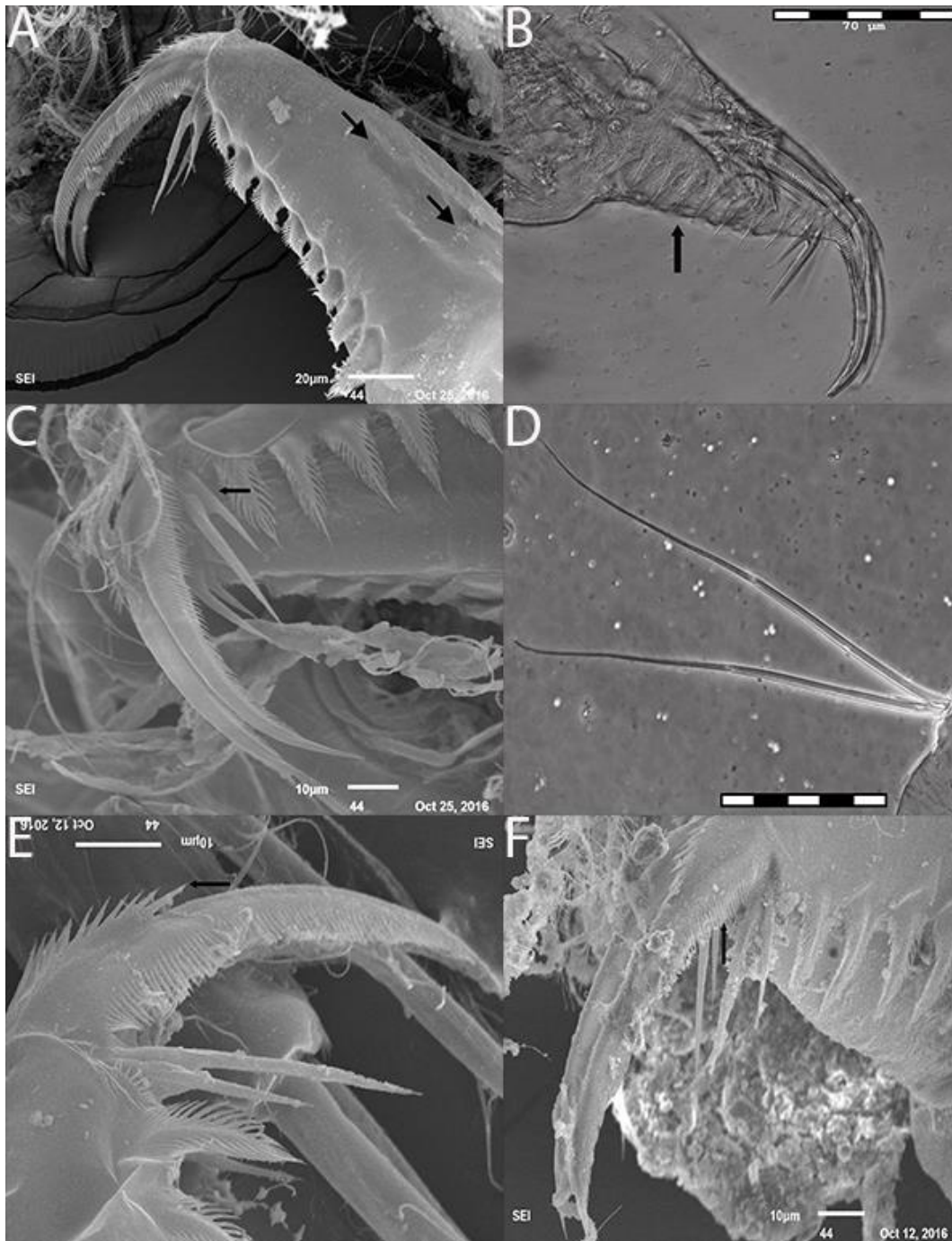


Figura 9. *Moina cf. micrura* 1. Durango, México. A. Postabdomen con hileras de espínulas; B. Dientes plumosos, vista lateral; C. Diente bidentado lateral con ramas desiguales; D. Setas natatorias; E. Garra postabdominal con hileras denominadas “Basaldorn”; F. Lado dorsal de la garra con hilera de espinas extendidas de la base a la punta.

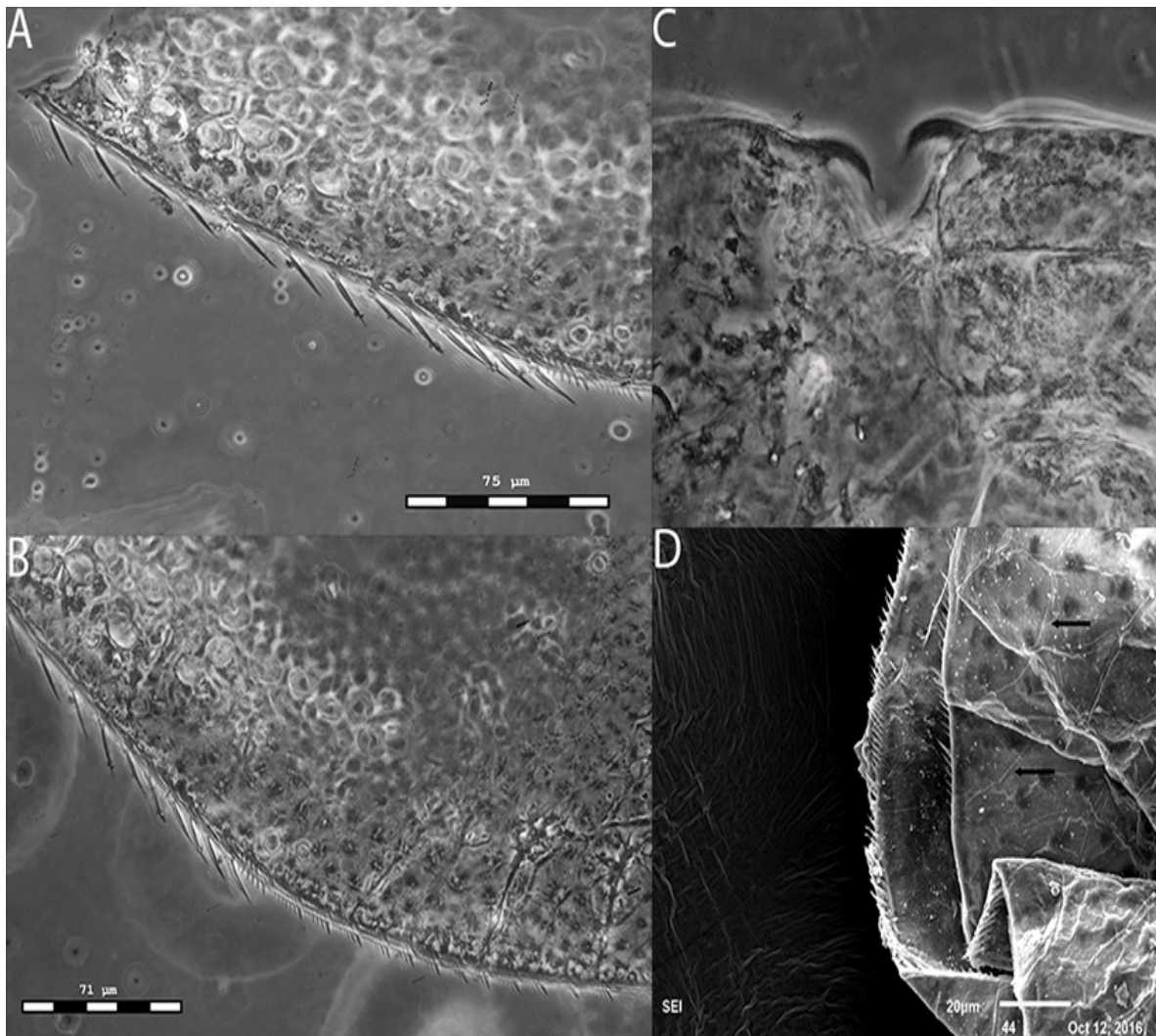


Figura 10. *Moina* cf. *micrura* 1. Durango, México. A. Valvas con espinas marginales; B. Grupos organizados de espinas, margen ventral; C. Par de ganchos para las setas natatorias de *Moina* cf. *micrura* 1, margen dorsal; D. Superficie valvar con esclerotizaciones en forma de cuadrícula.

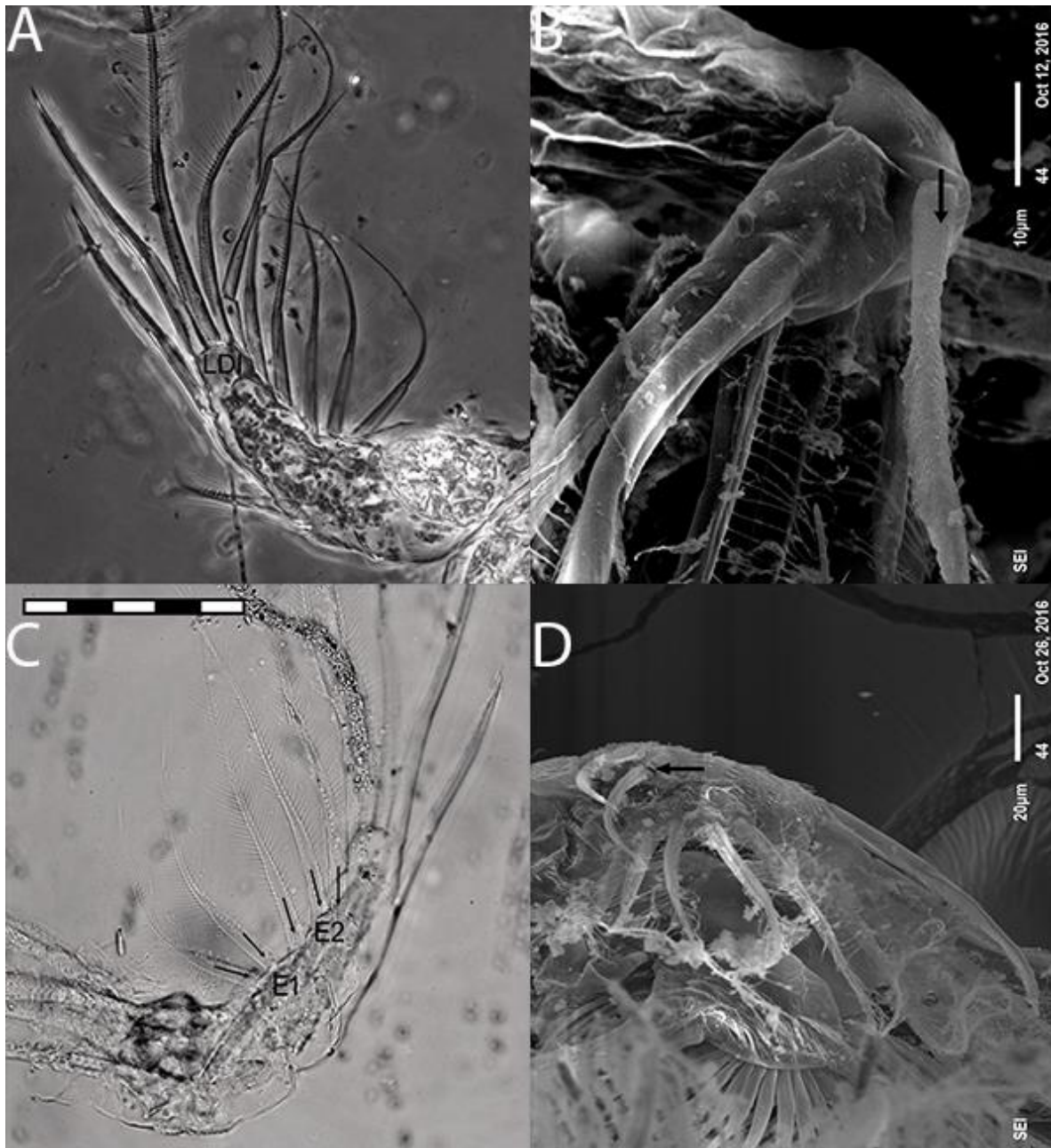


Figura 11. *Moina* cf. *micrura* 1. Chihuahua, México. A. Toracópodo I, LDI con seta anterior y dos setas largas; B. Endito 3 con seta anterior única fuertemente esclerotizada; C. Endito 1 con tres setas posteriores y endito 2 con dos setas; D. Gancho eyectores de diferente tamaño (flecha en la foto).

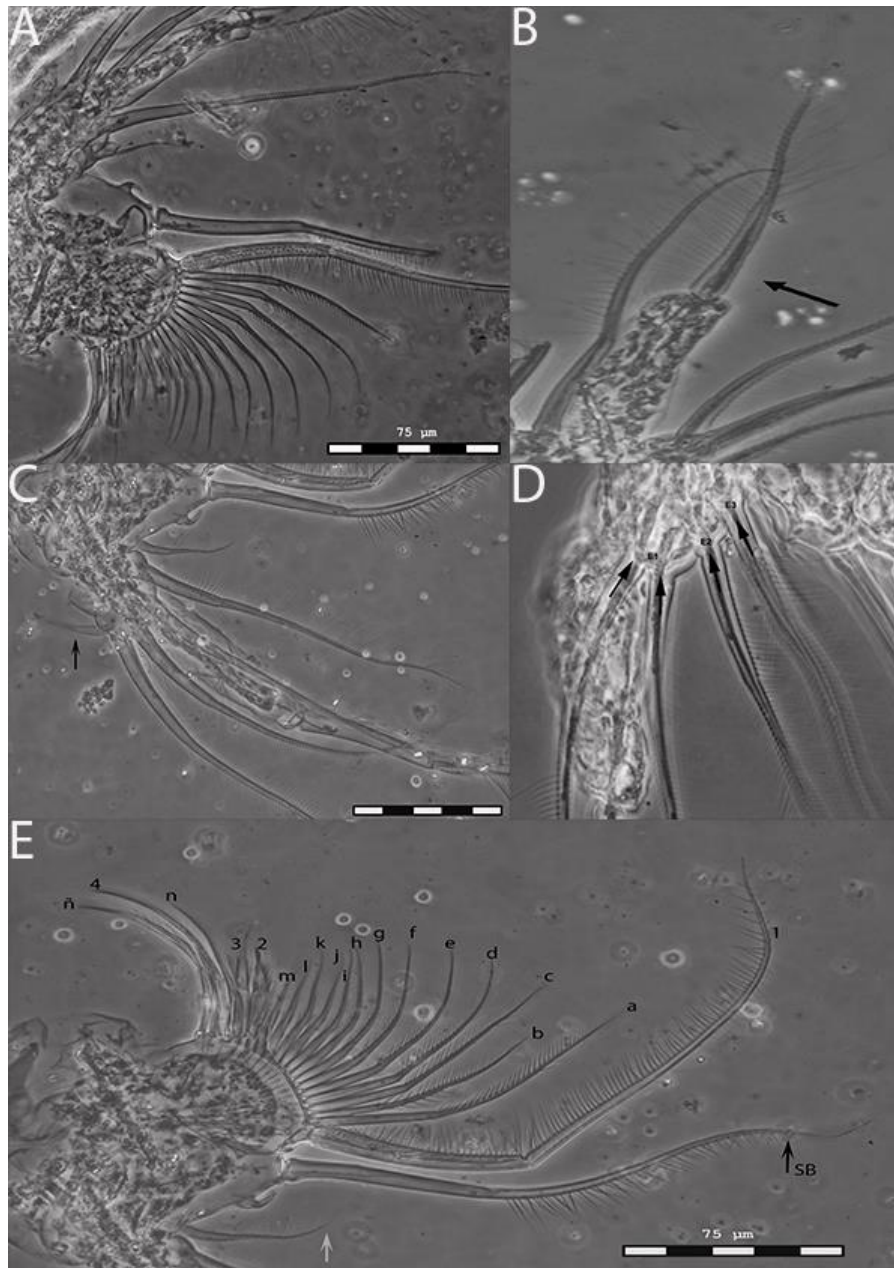


Figura 12. *Moina cf. micrura* 1. Chihuahua, México. A. Toracópodo II; B. Exopodito con seta larga setulada; C. Seta gruesa lateral en la base del exopodito; D. Tres enditos con setas posteriores fijas setuladas (E1: 2 setas, E2 y E3: 1 seta); E. Seta delgada cerca de la gnathobase (flecha gris), seguido de esto sensilia curvada, seta de batido (SB) señalada por flecha negra. Seta larga señalada como 1, setas posteriores en la placa filtradora (a-ñ), y 4 setas anteriores (1-4).

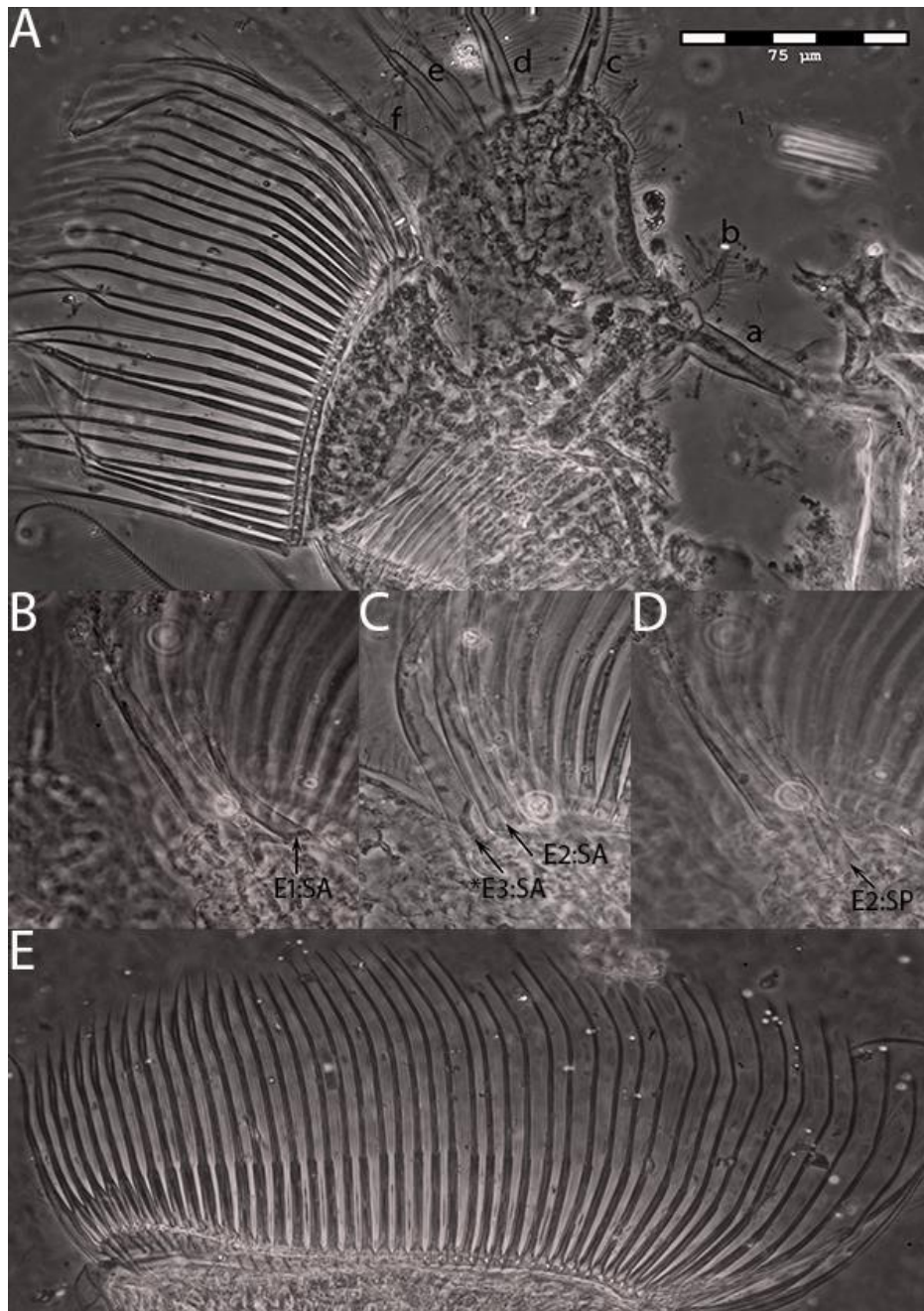


Figura 13. *Moina cf. micrura* 1. Chihuahua, México. A. Toracópodo III con 4 setas distales (c-f) y 2 setas laterales (a-b); B. Endito 1 con seta anterior (E1: SA), parte distal interna; C. Endito 2 con seta anterior (E2: SA) y otra seta posterior (E2: SP), parte distal interna; ubicada en la Fig. D. Por último, el endito 3 con seta anterior, parte distal interna; señalada por un asterisco en la Fig. C; E. Gnatobase con 40 a 45 setas.

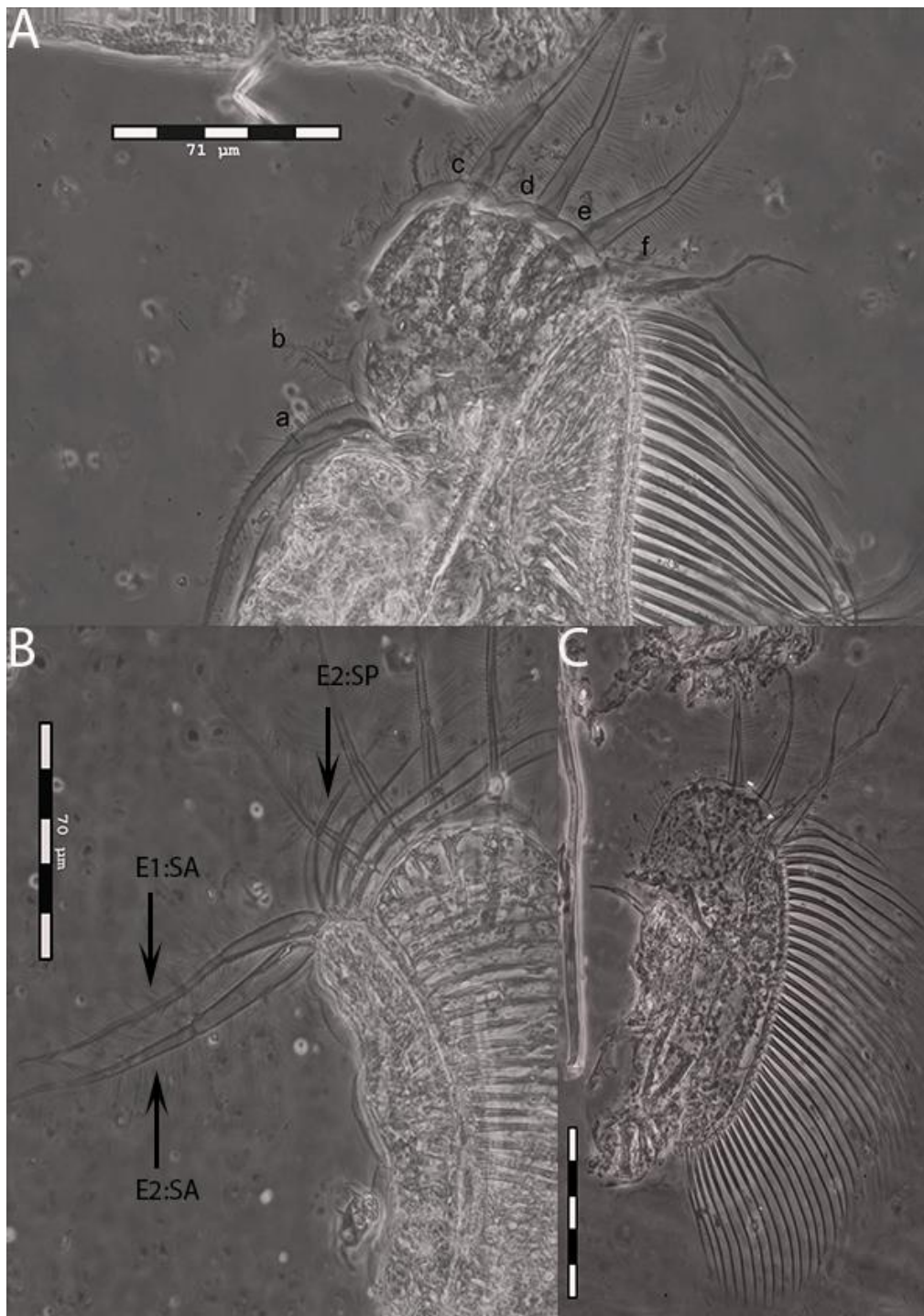


Figura 14. *Moina cf. micrura* 1. Durango, México. A. Toracópodo IV con setas distales (c-f) y setas laterales (a-b); B. Endito 1 con una seta anterior (E1: SA), parte distal interna; Endito 2 con una seta anterior (E2:SA) y una seta posterior (E2: SP), parte distal interna; C. Gnatobase con 30 a 35 setas.

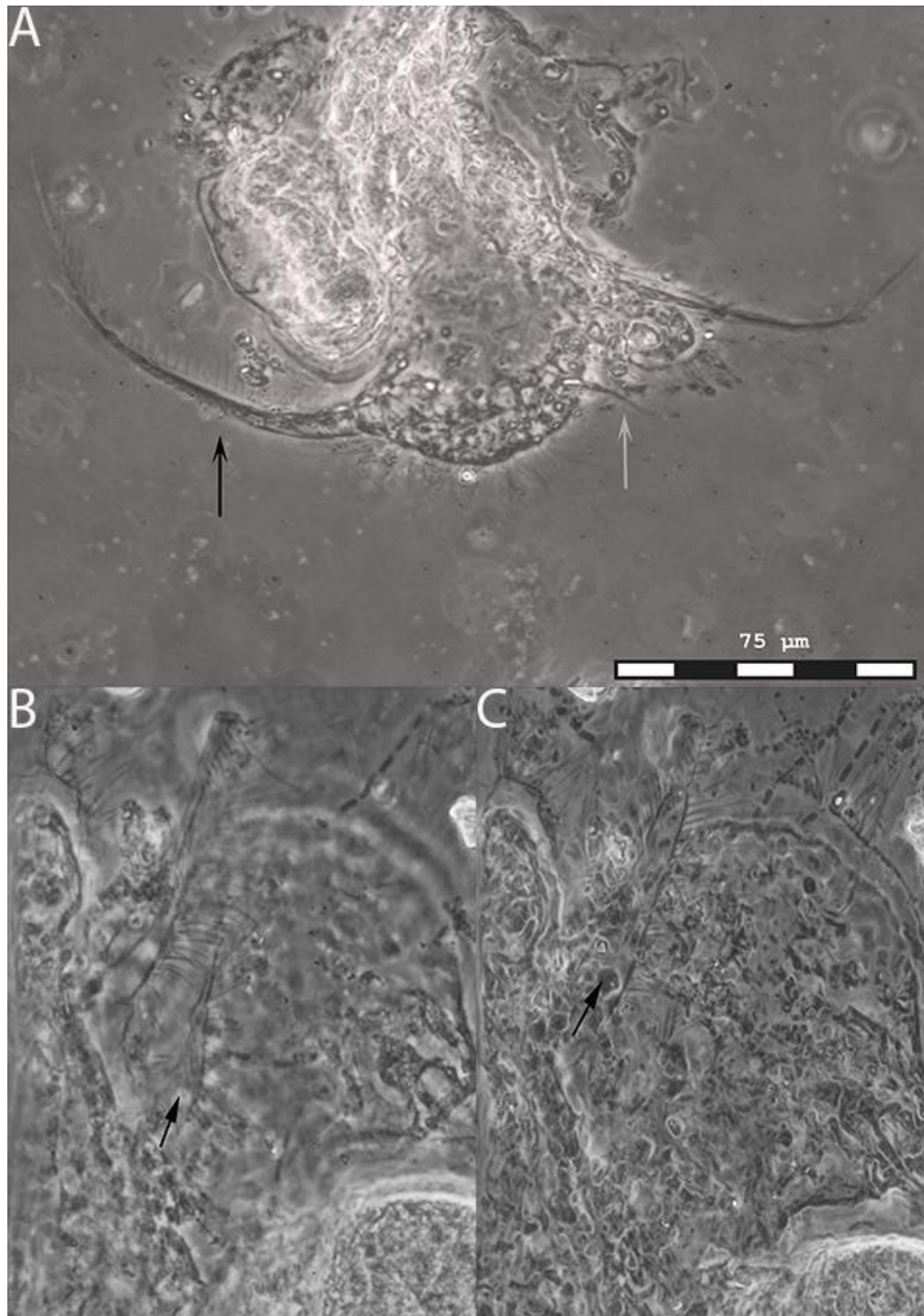


Figura 15. *Moina cf. micrura* 1. Chihuahua, México. A. Toracópodo V, exopodo provisto de una seta larga distal (señalada por una flecha negra) y una pequeña seta apical (señalada por una flecha gris); B. Endopodito provisto de una seta corta y C. una seta larga.

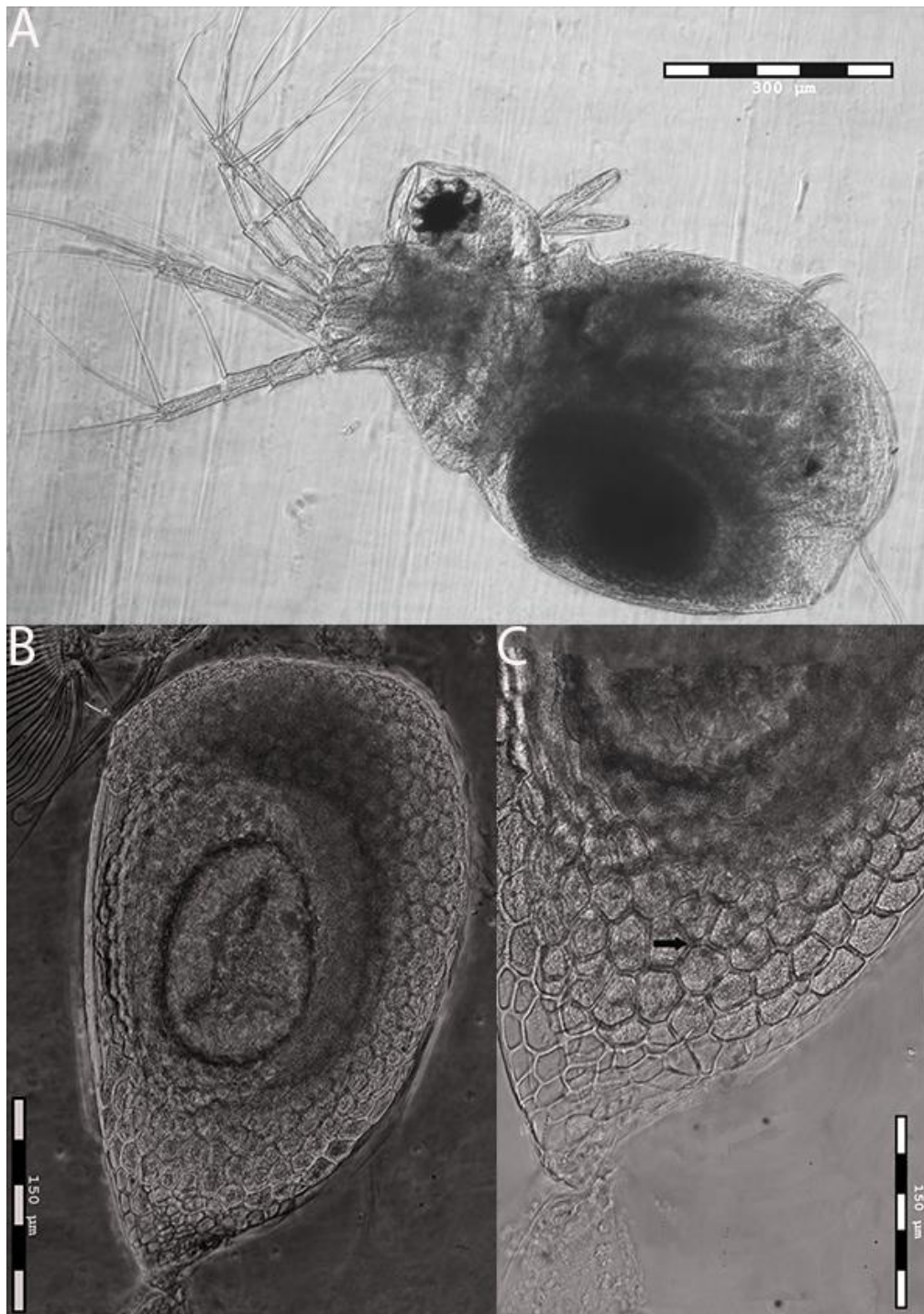


Figura 16. *Moina cf. micrura* 1. Durango, México. A. Hembra Ehipial. B. Superficie del Ehipio con un huevo y reticulación marcada superficial; C. Patrón de células semi circulares aplanadas, interconectadas unas con otras señaladas por una flecha, margen ventral y dorsal

Taxonomía

Phylum Arthropoda

Clase Branchiopoda

Orden Anomopoda Sars, 1865

Familia Moinidae Goulden, 1968

Genero Moina Baird, 1850

Moina cf. micrura 2

(Figuras 17 – 28)

Descripción de la hembra

Hembra partenogenética adulta: Largo: 0,57 mm a 0,9 mm (n=40). Cuerpo casi redondeado en vista lateral, altura: 0,3 mm - 0,55 mm y radio (Altura/longitud = 0,52-0,71 mm) (Fig. 17), altura máxima en la porción media-posterior, dependiendo del número de embriones. No posee pelos ni espinas en la cabeza. El dorso de las valvas es fuertemente convexo, y en la mayoría de las hembras se eleva ligeramente por encima del margen dorsal de la cabeza. El ángulo postero-dorsal está bien definido. El margen posterior de las valvas es más o menos recto finalizando con margen ventral ampliamente convexa. La superficie de las valvas posee esclerotizaciones fuertes, con puntos amarillos. Los organismos diseccionados eran de color amarillo quemado con epibiontes asociados.

Cabeza: Similar a *Moina cf. micrura 1*

Anténula (Fig. 18): Gruesas, largas y casi cilíndricas con una longitud de 100 a 167 micras. Posee sétulas largas en la cara posterior (Fig. 18A) e hileras transversales de dentículos o micro espinas más pequeñas y dispersas que en *Moina cf. micrura 1* en la cara anterior, observables exclusivamente mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Fig. 18B). Seta sensorial

delgada ubicada ligeramente hacia la parte proximal de la mitad distal y surgiendo de la cara lateral (Fig. 18C). Extremo distal con una hilera de espinas gruesas y pequeñas (Fig. 18D). Nueve estetascos cortos de tamaño ligeramente diferente (Fig.18E).

Labro: Similar a *Moina cf. micrura* 1

Antenas (Figura 20): Segmento basal grande (Basipodito) largo de 200 - 250 micras. En la superficie dorsal y ventral presenta hileras de espinas menos esclerotizadas de tamaño irregular, pero con pelos muy largos y más pronunciados, arreglados en hileras que en *Moina cf. micrura* 1 (Fig. 19A). En la parte distal presenta unas pequeñas protuberancias, así como en la cara lateral del segmento cerca de donde se inserta el endopodito (flecha en Fig. 19B). Internamente posee 3 setas sensoriales, una distal y dos proximales, de diferente longitud (Fig. 19C). En la parte proximal interna del basipodito se encuentran 2 setas, una larga (150 - 240 micras) y otra corta (90 - 150 micras) (Fig. 19C-D), con una proporción respecto al basipodito de 1,3 - 1 veces y 2,2 - 1,6 veces. En la parte distal del basipodito se encuentra 1 seta larga (140 - 200 micras) (Fig. 19E), con una proporción respecto al basipodito de 1,4 - 1,2 veces. Por ultimo posee una espina distal del lado externo del basipodito observable exclusivamente por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM) (Fig. 19F).

Antenas natatorias alargadas, exopodito con 4 segmentos ligeramente más corto que el endopodito, el cual presenta 3 segmentos (Fig. 20A). Los segmentos de las ramas poseen hileras transversales de diminutas espinas (Fig. 20B), más pequeñas y dispersas que en *Moina cf. micrura* 1. Fórmula antenal es similar a la de *Moina cf. micrura* 1, solo se diferencia en que el segmento 1 de la rama del exopodito no se observa una espina claramente diferenciada (Fig. 20C). Setas 0-0-1-3 / 1-1-3, espinas 0-1-0-1 / 1-1-1. En ambas ramas antenales hay tres setas

largas y apicales natatorias, todas con segmento basal y distal, armadas bilateralmente con largas y finas setas. Las setas laterales poseen las mismas características.

Postabdomen (Figura 21A): Parte distal con forma cónica, ensanchado en la parte proximal. Margen ventral casi recto con diminutas espínulas formando filas transversales (señaladas con una flecha gris en la Fig. 21A). En vista lateral una hilera de 5-6 dientes plumosos grandes, tres menos que en *Moina* cf. *micrura* 1 (señaladas con una flecha negra en la Fig. 21A). Distalmente se presenta un diente bidentado lateral, siempre con la rama distal significativamente más larga que la rama proximal (Fig. 21C). Setas natatorias más largas que el postabdomen, su parte basal no tiene sétulas y su parte distal posee setas finas ubicadas bilateralmente (Fig. 21B).

Garra postabdominal larga y recurvada, con punta afilada y puntiaguda hacia el extremo distal. La parte ventral proximal de la garra tiene una hilera de 5-6 espinas afiladas, cuatro menos que en *Moina* cf. *micrura* 1, denominados “Basaldorn” (señalado por una flecha negra en la Fig. 21C). El lado dorsal de la garra tiene una hilera de espinas finas más cortas que en *Moina* cf. *micrura* 1 que se extienden desde su base hasta la punta, ligeramente más pequeñas hacia la parte distal (señalado por una flecha gris en la Fig. 21C).

Valvas (Figura 22 A-D): Grandes y subovoidales, con 10 a 20 espinas a lo largo del margen ventral (Fig. 22A). Posterior a la última espina, se observan grupos organizados de 8 a 15 espinas. En cada grupo se pueden apreciar de 5 a 10 miembros de espinas con poca diferencia en tamaño, por lo que los grupos no son del todo claros (Fig. 22B). En la parte dorsal de las valvas existe un par de ganchos curvados (Fig. 22C), uno por cada valva. Las superficies de las valvas presentan esclerotizaciones diferentes a *Moina* cf. *micrura* 1, estas son marcadas de forma rectangular y círculos redondos de color amarillo vistos en el microscopio óptico (Fig. 22D).

Toracópodos

Toracópodo I (Figura 23): Comparte morfológicamente las mismas estructuras descritas en *Moina cf. micrura* 1 y por lo tanto no se encontraron diferencias para su descripción.

Toracópodo II (Figura 24): Comparte morfológicamente las mismas estructuras descritas en *Moina cf. micrura* 1. La diferencia se encuentra que tiene de 8 a 13 setas posteriores en la “placa filtradora” de la gnatobase.

Toracópodo III (Figura 25): Comparte morfológicamente las mismas estructuras descritas en *Moina cf. micrura* 1. La diferencia se encuentra en que el exopodito grande y plano mide de 65-130 micras y las setas encontradas en su gnatobase oscilan de 35 a 45.

Toracópodo IV (Figura 26): Comparte morfológicamente las mismas estructuras descritas en *Moina cf. micrura* 1. La diferencia se encuentra en que el exopodito grande y plano mide de 32-80 micras y las setas encontradas en su gnatobase oscilan de 14 a 30.

Toracópodo V (Figura 27): Similar a *Moina cf. micrura* 1

Hembra Efipial (Fig. 28A): Efipio maduro con un solo huevo y reticulación celular marcada en toda la superficie del caparazón. En la margen ventral y dorsal un marcado patrón de células semi circulares de diferente tamaño globosas, interconectadas unas con otras, dejando entre ellas espacios con proyecciones delgadas (Fig. 32B).

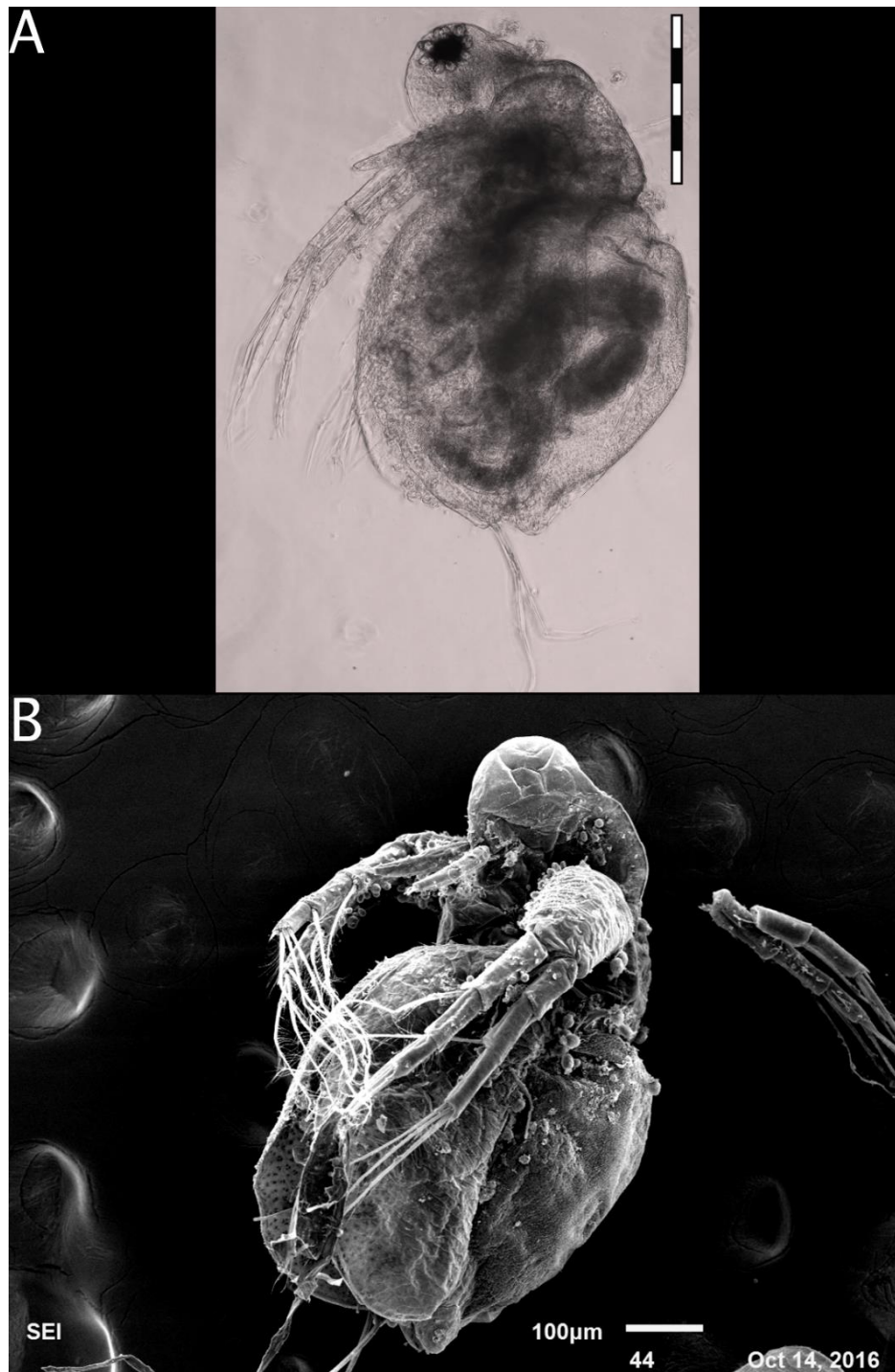


Figura 17. *Moina cf. micrura* 2. Estado de México. A. Fotografía microscopio óptico. Hembra partenogenética. México. Habito, vista lateral. B. Microfotografía electrónica de barrido (SEM) de hembra partenogenética. México. Habito, vista lateral.

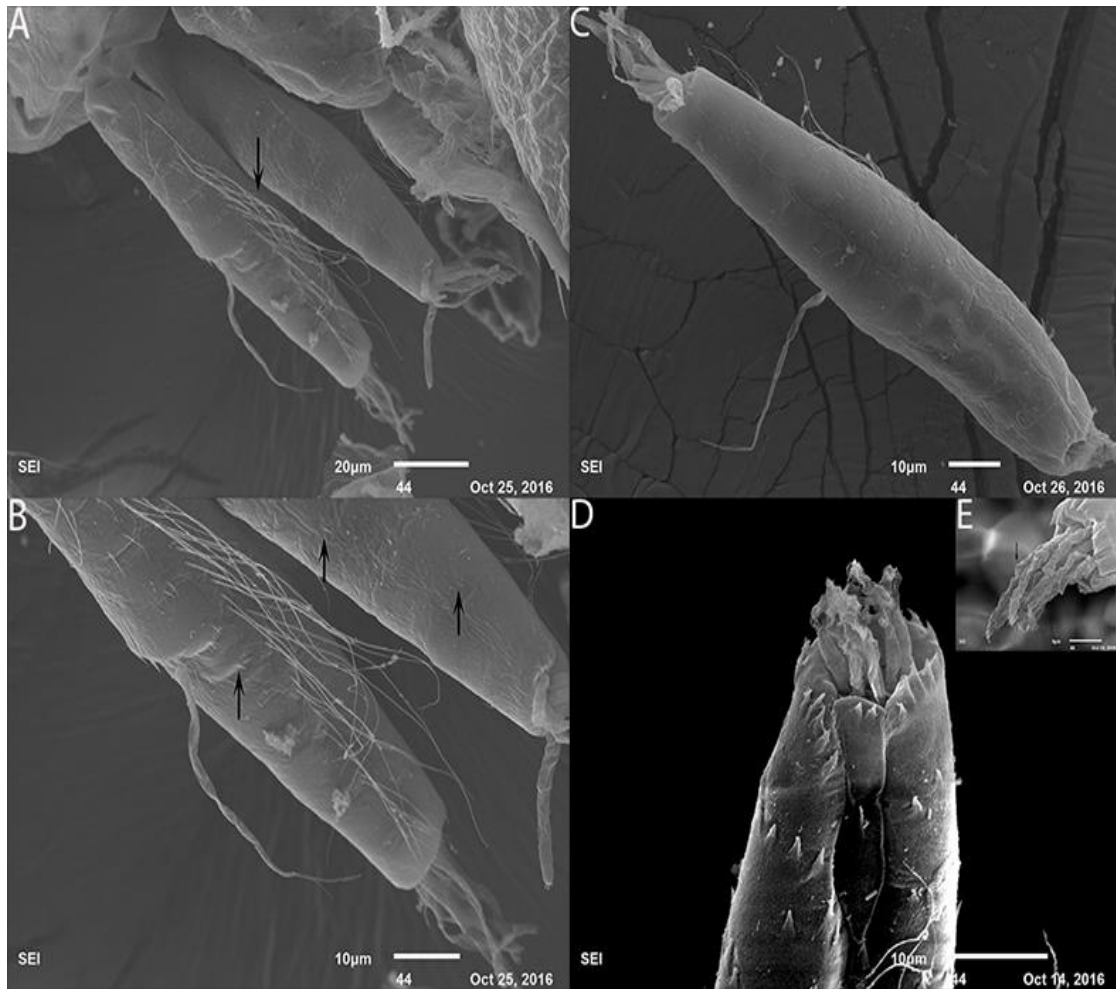


Figura 18. *Moina cf. micrura* 2. Estado de México. A. Anténulas con sétulas largas, cara posterior; B. Hileras transversales de micro espinas, cara anterior. Visto en SEM; C. Anténula con seta sensorial ubicada hacia la parte proximal de la mitad distal y surgiendo de la cara lateral; D. Hilera de espinas dispuestas en la base del extremo distal; E. Nueve estetascos cortos de tamaño ligeramente diferente.

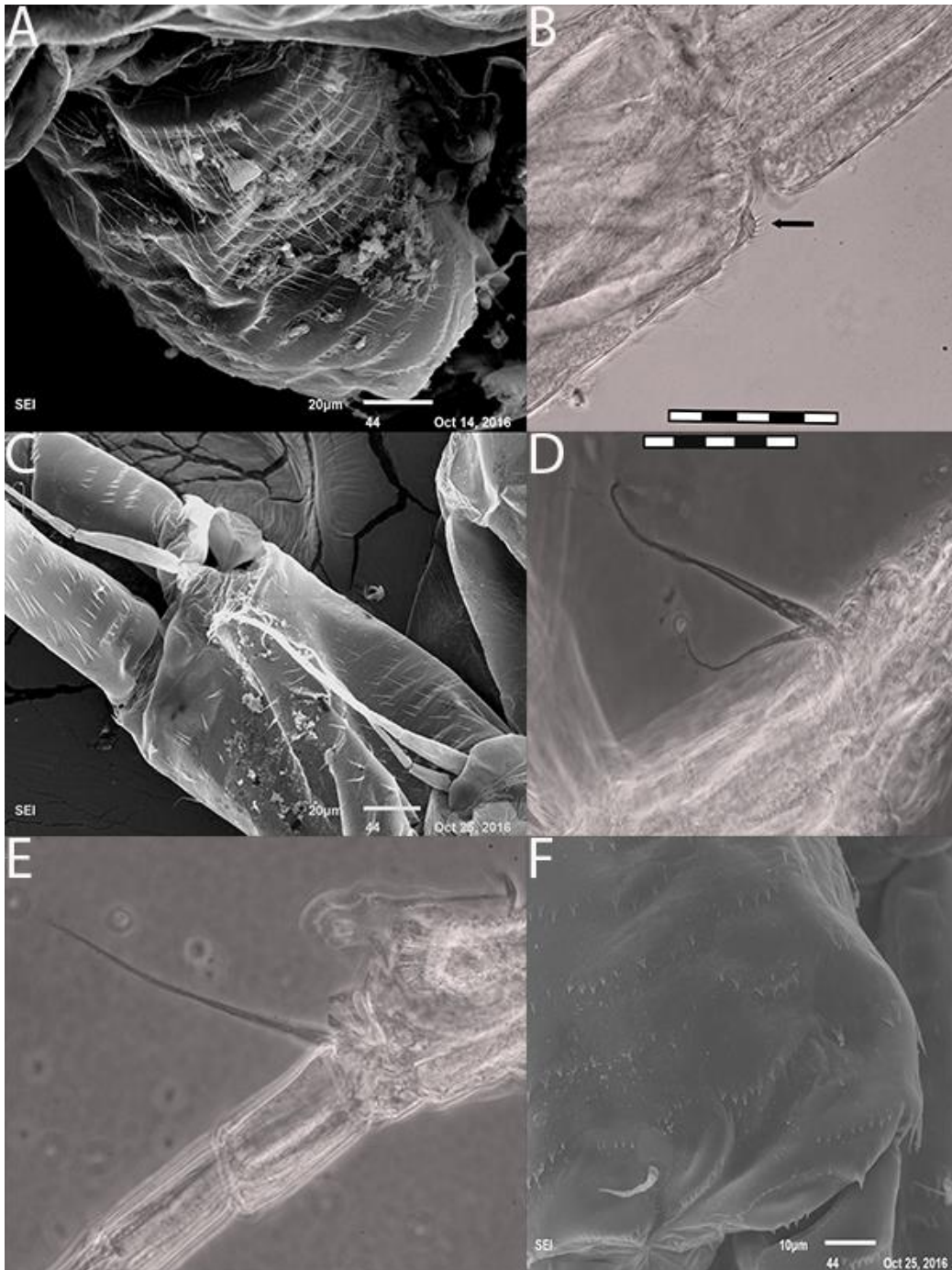


Figura 19. *Moina cf. micrura 2*. Estado de México. A. Basipodito con hileras de espinas esclerotizadas y pelos pronunciados alrededor; B. Protuberancia en la parte distal del basipodito, cara lateral; C. Tres setas sensoriales del basipodito; D. Seta larga y seta corta proximal del basipodito; E. Seta larga distal del basipodito; F. Espina corta distal del basipodito, cara lateral.

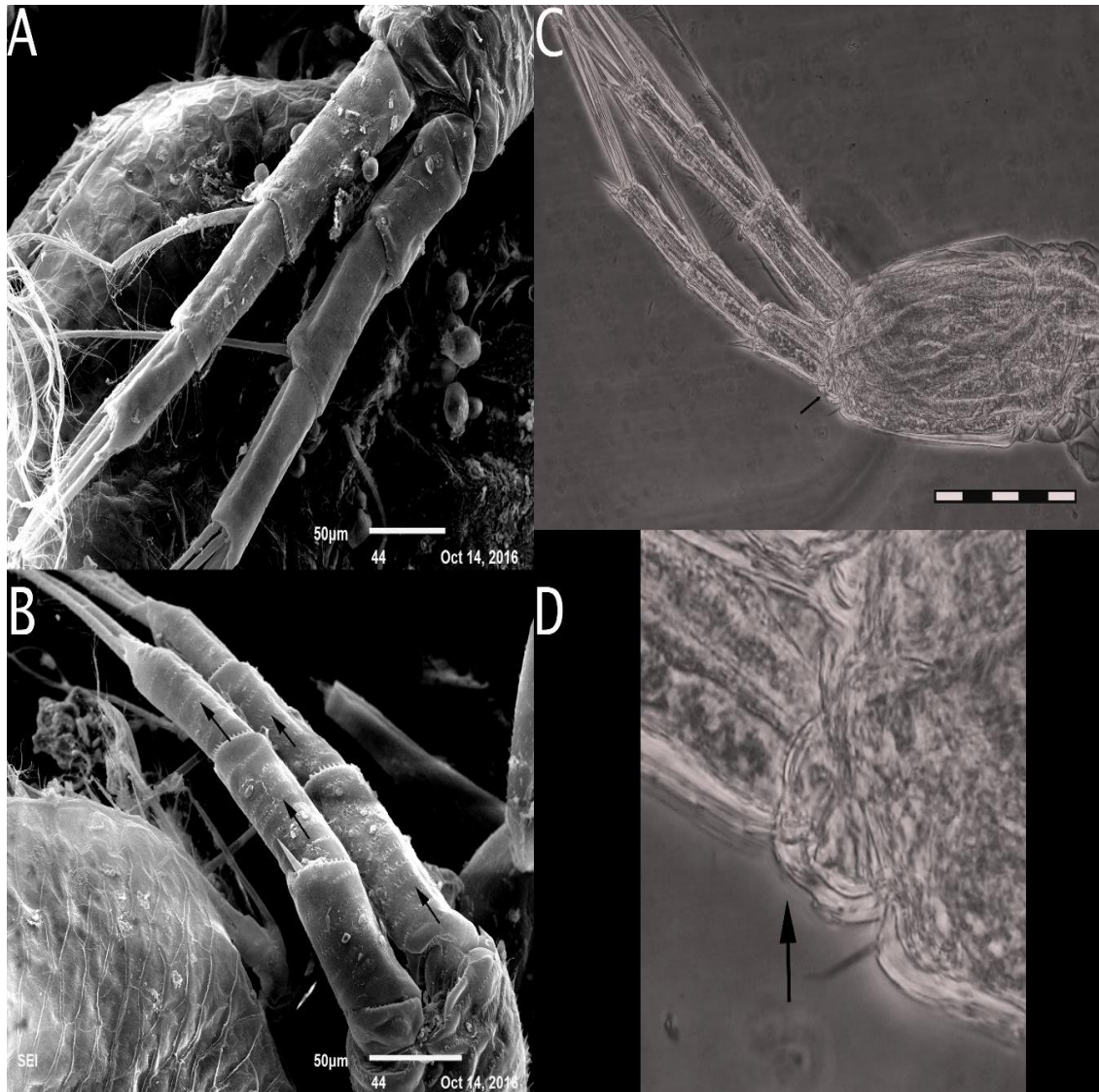


Figura 20. *Moina cf. micrura* 2. Estado de México. A. Antenas natatorias; B. Hilera de espinas pequeñas en los segmentos del exópodo y endópodo; C. Antenas con el segmento del exopodito ausente de espina; D. Acercamiento de la espina del segmento 1 del exopodito (0-1-0-1) (señalada por una flecha negra).

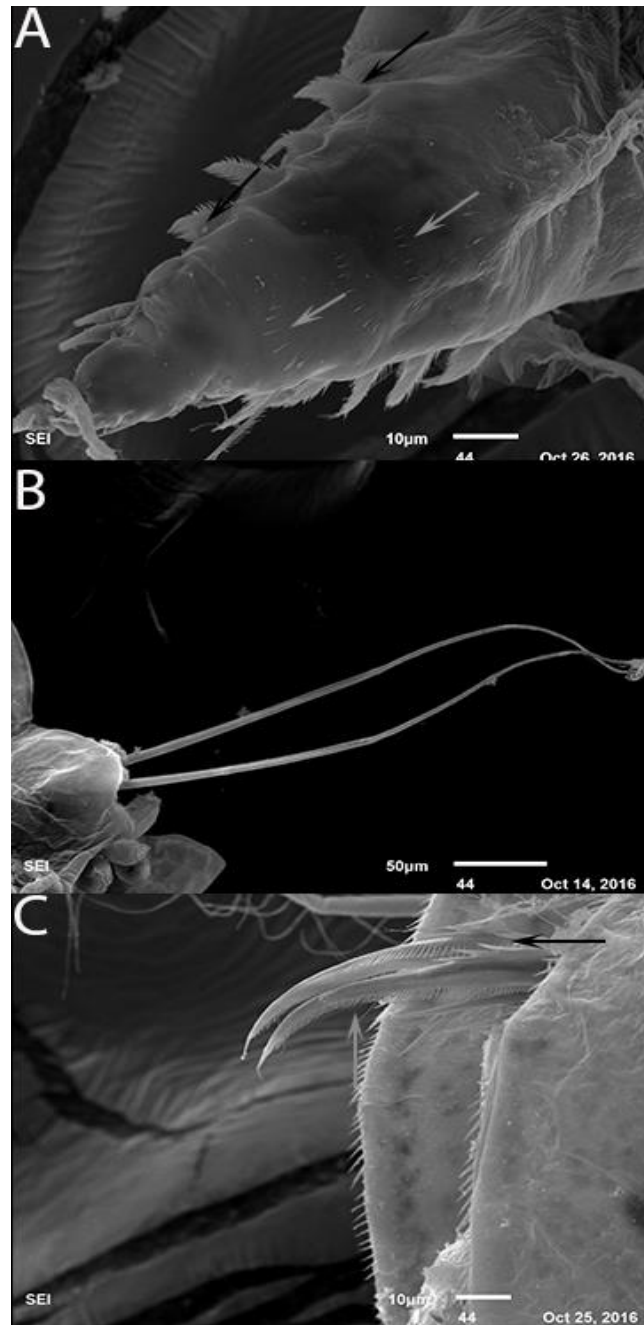


Figura 21. *Moina cf. micrura* 2. Estado de México. A. Postabdomen, vista dorsal, con hileras de espínulas (señaladas por una flecha gris) y dientes plumosos, vista lateral (señalado por una flecha negra); B. Setas natatorias; C. Garra postabdominal con hileras denominadas “Basaldorn” (señaladas con una flecha negra) e hilera de espinas finas y cortas desde la base hasta la punta, vista dorsal (señaladas por una flecha gris).

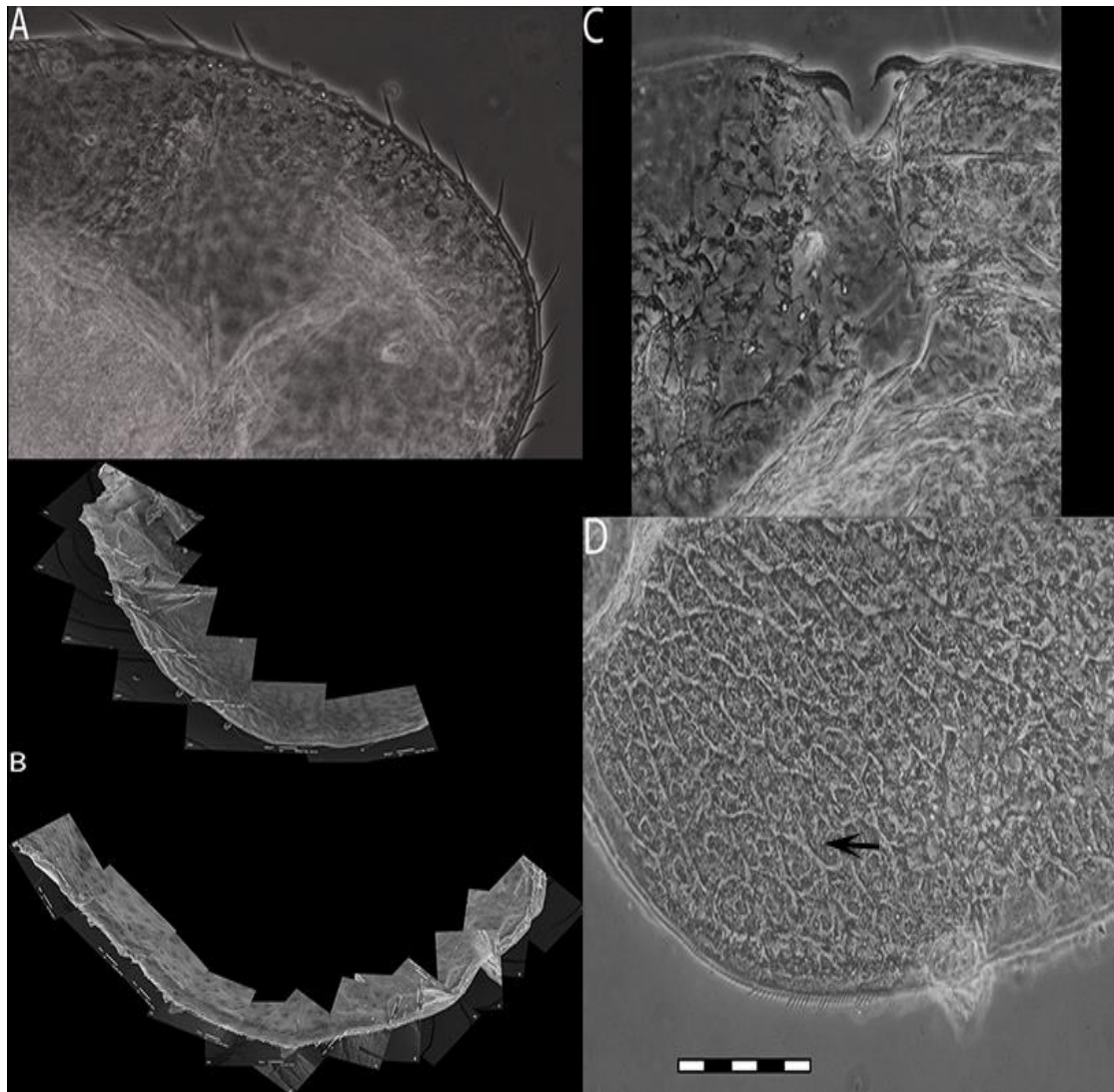


Figura 22. *Moina cf. micrura 2*. Estado de México. A. Valvas con espinas marginales; B. Grupos poco diferenciados de espinas, margen ventral; C. Ganchos de las setas natatorias de *Moina cf. micrura 2*, margen dorsal; D. Superficie valvar con esclerotizaciones en forma de rectangular.

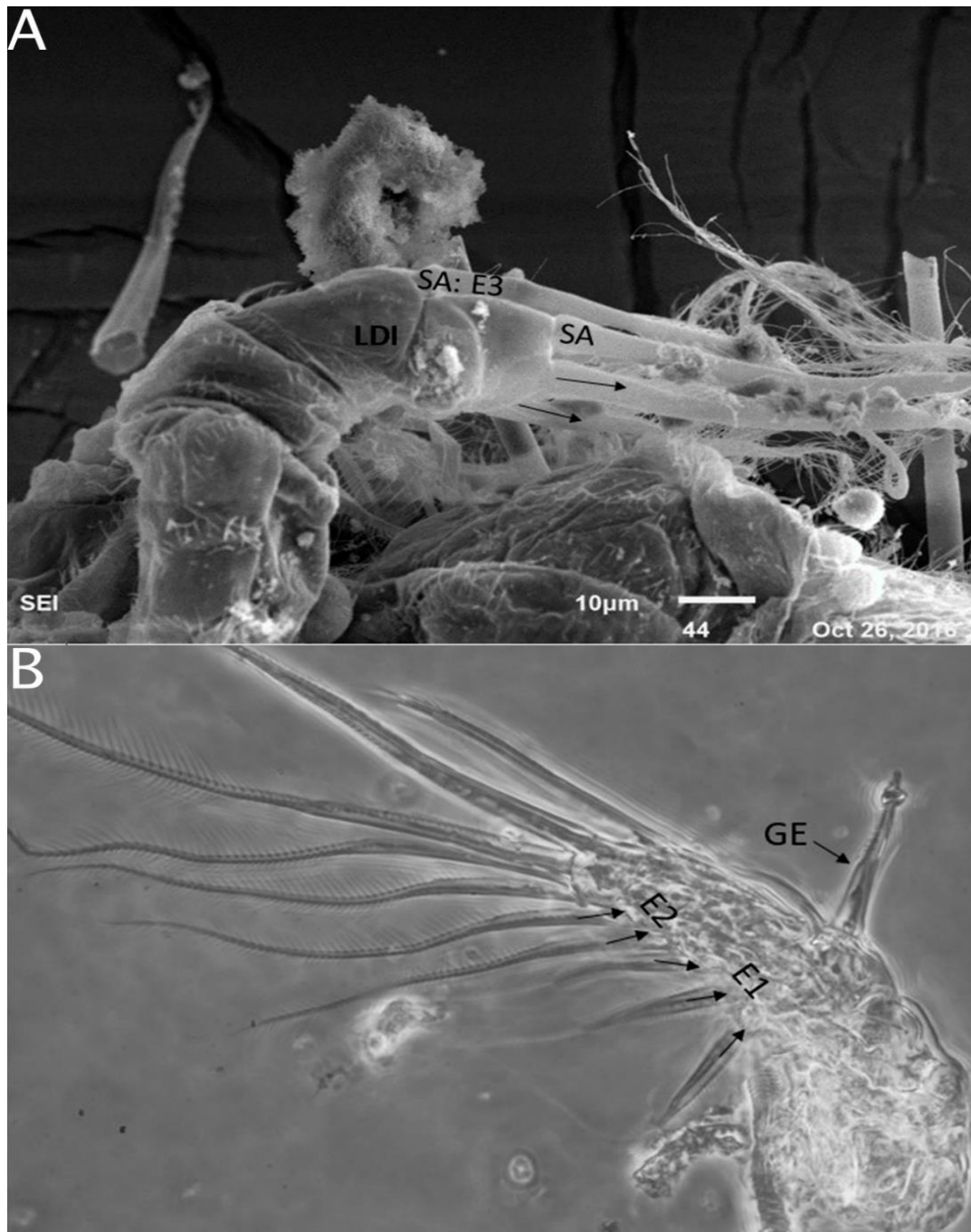


Figura 23. *Moina cf. micrura* 2. Estado de México. A. Toracópodo I, LDI con seta anterior (SA) y dos setas largas (señaladas por una flecha negra), Endito 3 con una seta anterior única fuertemente esclerotizada (SA: E3); B. Endito 1 con tres setas posteriores y endito 2 con dos setas; y ganchos eyectores de diferente tamaño (GE).

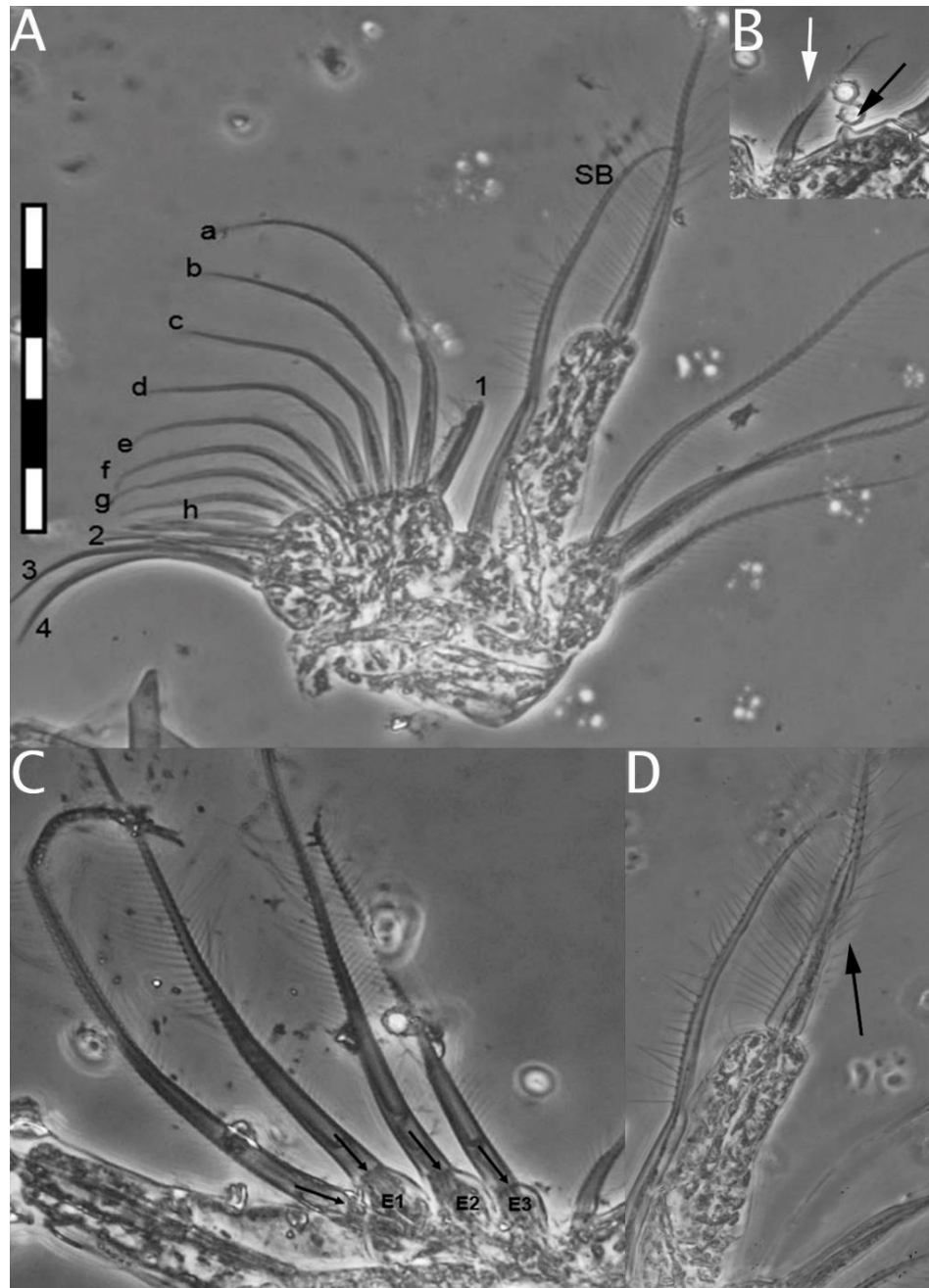


Figura 24. Moina cf. micrura 2. Michoacán, México. A. Toracópodo II; seta de batido (SB). Seta larga señalada como 1, setas posteriores en la placa filtradora (a-h), y 4 setas anteriores (1-4); B. Acercamiento de la seta gruesa lateral en la base del exopodito (flecha blanca) y la sensilia (flecha gris); C. Tres enditos con setas posteriores fijas setuladas (E1: 2 setas, E2 y E3: 1 seta); D. Exopodito con seta larga setulada bilateral.

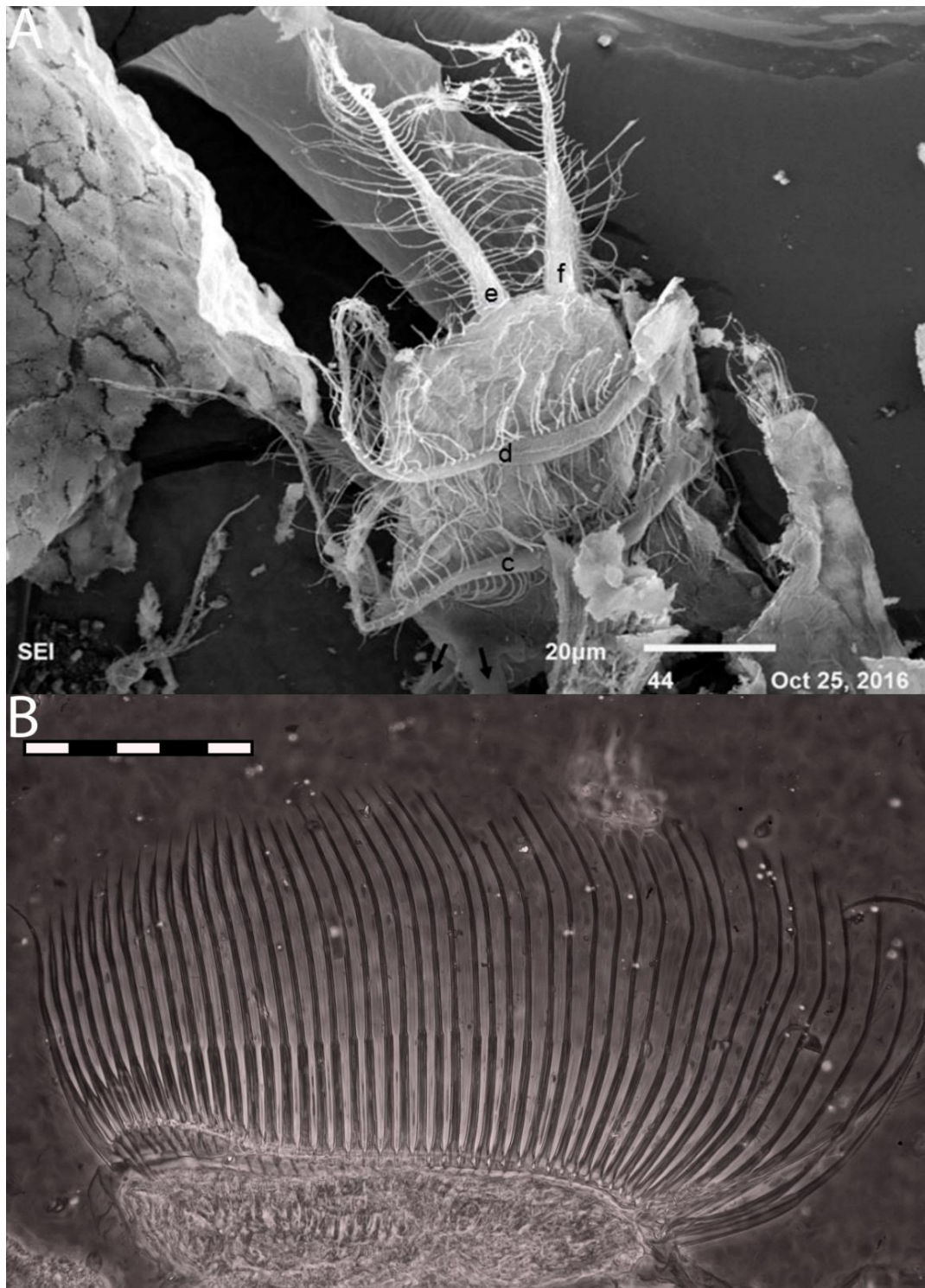


Figura 25. *Moina cf. micrura 2*. Estado de México. A. Toracópodo III con 4 setas distales (c-f) y 2 setas laterales (señaladas por una flecha negra); B. Gnatobase con 35 a 45 setas.

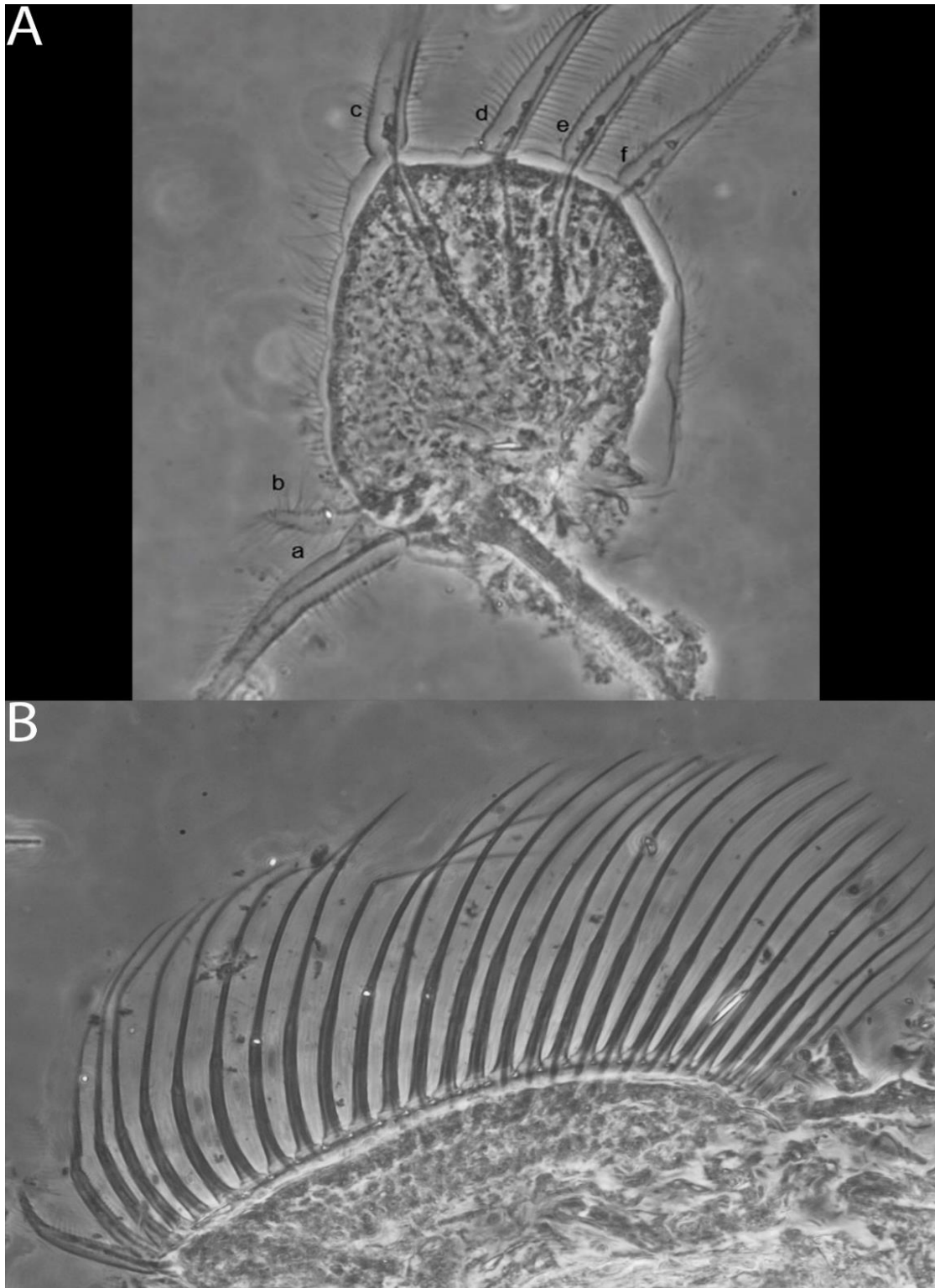


Figura 26. *Moina cf. micrura 2* Estado de México. A. Toracópodo IV con 4 setas distales (c-f) y 2 setas laterales (a-b); B. Gnatobase con 14 a 30 setas.

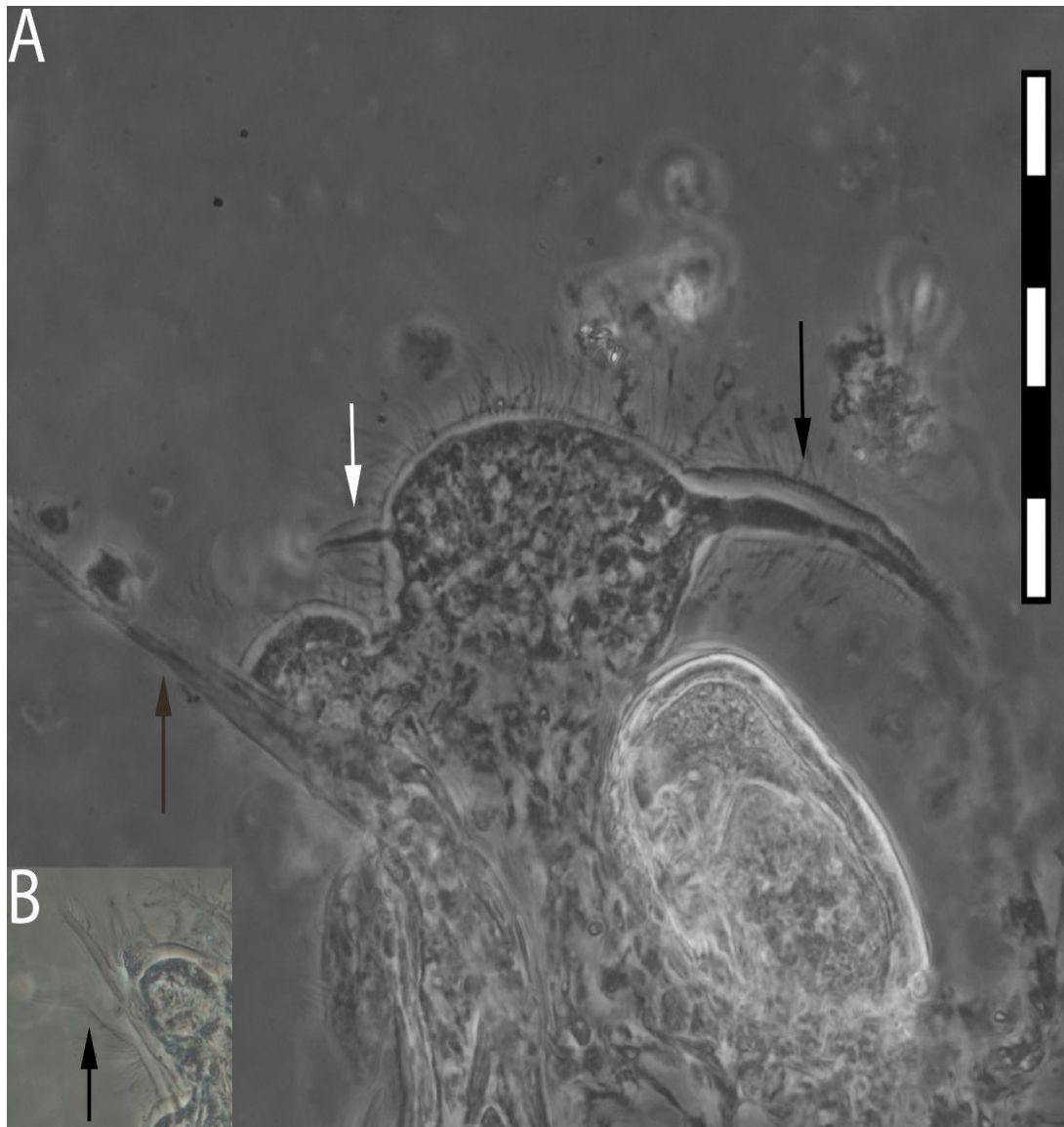


Figura 27. *Moina cf. micrura* 2. Puebla, México. A. Toracópodo V, exopodo provisto de una seta larga distal (señalada por una flecha negra), una pequeña seta apical (señalada por una flecha blanca); y endopodito provisto de una seta larga (señalada por una flecha negra), una pequeña seta apical (señalada por una flecha blanca); y endopodito provisto de una seta larga (señalada por una flecha gris) B. Acercamiento del endopodito provisto de una seta corta (señalada por una flecha negra).

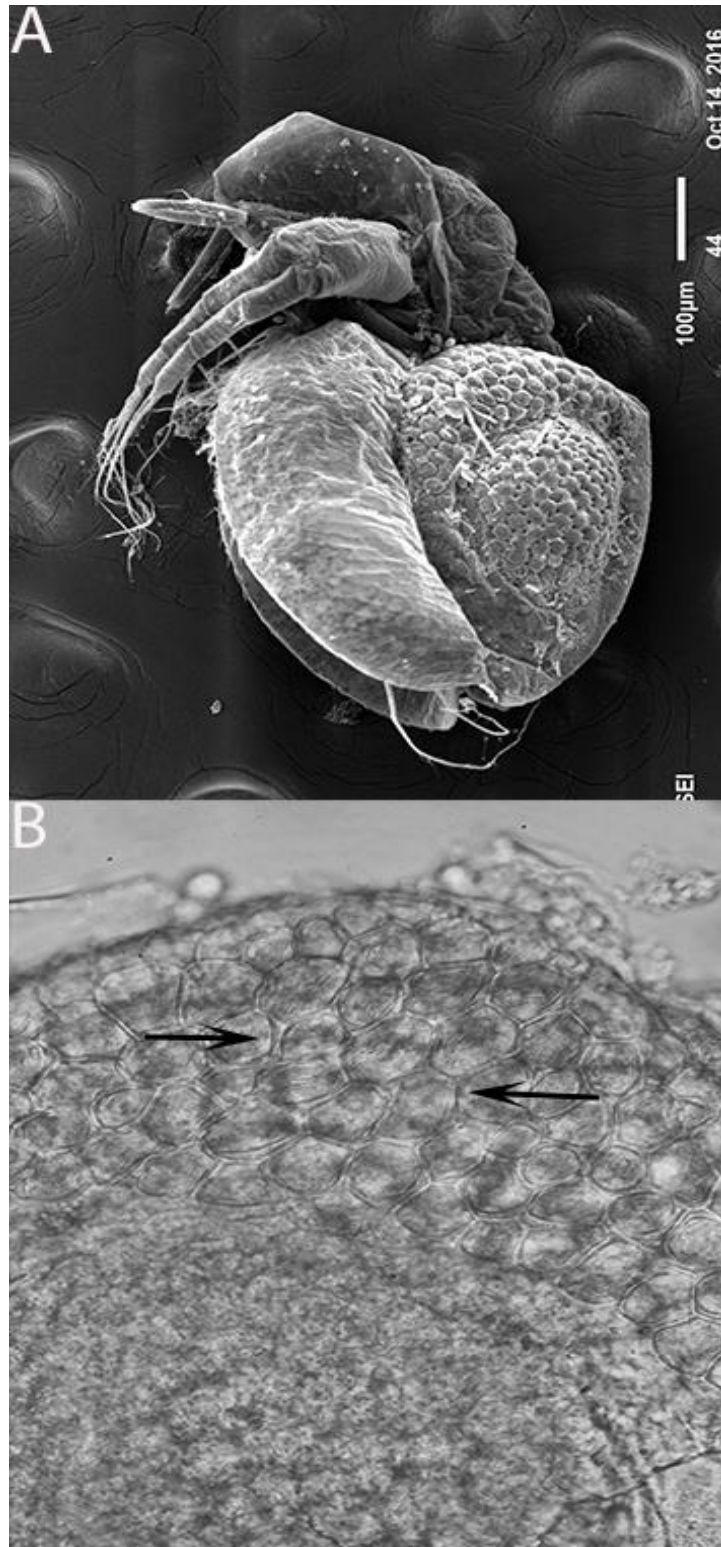


Figura 28. *Moina cf. micrura* 2. Estado de México. A. Hembra Efipial. B. Patrón de células semi circulares globosas, margen ventral y dorsal.

4.2. Diferencias morfológicas entre los complejos *moina cf. micrura 1* y *moina cf. micrura 2* de México

Diagnóstico diferencial: La descripción morfológica entre *Moina cf. micrura 1* y *Moina cf. micrura 2* mexicanas se encuentran detalladamente en la Anexo 2. Las principales diferencias observadas para estos dos grupos se encuentran en:

(1) El tamaño corporal a nivel morfométrico entre los dos grupos muestran diferencias significativas en la proporción altura corporal/longitud (A/L) para *Moina cf. micrura 1* y *Moina cf. micrura 2* (Test: Man Whitney, $p= 0,049$). (2) La superficie de las anténulas, donde la cara anterior presenta micro espinas muy diferenciadas para *Moina cf. micrura 1* (**Fig. 6C**) y levemente presentes para *Moina cf. micrura 2* (**Fig. 18B**). (3) La seta sensorial de *Moina cf. micrura 2* (**Fig. 18C**) está ubicada más cerca de la parte distal de la anténula, y es tan larga que llegaría a la punta de la anténula si se direcciona hacia arriba, dicho patrón, es contrario al observado en *Moina cf. micrura 1* (**Fig. 6A, D**). (4) La superficie del basipodito en *Moina cf. micrura 1* presentó espinas fuertemente esclerotizadas con respecto a las de *Moina cf. micrura 2*, asimismo, los pelos que rodean esta estructura son muchos más largos y pronunciados para *Moina cf. micrura 2* (**Fig. 19A**) respecto a los observados en *Moina cf. micrura 1* (**Fig. 7A**). (5) La longitud del basipodito y de sus setas localizadas en el segmento basal y terminal revelaron grados de solapamiento para estos dos grupos, pero se observó que las medidas mayores en esta estructura se alcanzaron en *Moina cf. micrura 2* (Long basipodito: 200-250 μm , SPL: 150-240 μm , SPC: 90-1520 μm) respecto a *Moina cf. micrura 1* (Long basipodito: 212-240 μm , SPL: 125-180 μm , SPC: 80-120 μm). (6) En la superficie de las antenas natatorias, los segmentos de las dos ramas con hileras de espinas se observaron claros y organizados en *Moina cf. micrura 1*

(Fig. 8C), patrón contrario en *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 20B). (7) La fórmula antenal reveló la presencia de una espina diferenciada en el segmento uno del exopodito en *Moina* cf. *micrura* 1 (Fig. 8B), estando ausente en *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 20C, D). (8) En el margen ventral de las valvas se observan grupos de espinas incrementando ascendentemente en *Moina* cf. *micrura* 1 (Fig. 10B), patrón contrario observado en *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 22B), donde la diferenciación de los grupos no es clara. (9) En la superficie de las valvas se logró apreciar que las esclerotizaciones se muestran de manera diferente para estos dos grupos, exhibiéndose para *Moina* cf. *micrura* 1 (Fig. 10D) en forma de cuadrícula y para *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 22D) en forma rectangular. (10) El rango de setas posteriores encontradas en la placa filtradora de la gnatobase en el toracópodo II, es mayor en *Moina* cf. *micrura* 1 (Fig. 12E, a-ñ) (13 a 15) que lo observado en *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 24A, a-h) (8 a 13). Este patrón se cumple para el rango de setas encontradas en el toracópodo III y IV, encontrándose siempre más setas en la gnatobase de *Moina* cf. *micrura* 1 (Fig. 13E / Fig. 14C) (40-45) (30-35) respecto a *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 25B / Fig. 26B) (35-45) (14-30). (11) En el postabdomen de los organismos de este estudio se encontraron diferencias en el número de dientes plumosos: *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 211A) tuvo la menor cantidad (5 a 6) respecto a *Moina* cf. *micrura* 1 (Fig. 9B) (7 a 9). Este mismo patrón se observó para el número de espinas del “Basaldorn” en la garra postabdominal de *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 21C) (5 a 6) respecto a *Moina* cf. *micrura* 1 (Fig. 9E) (6 a 10). Por último, (12) La comparación de las superficies efipiales en las especies reveló patrones diferentes señalando que ninguno de ellos se asemeja entre ellos mismos, mostrando células aplanadas en *Moina* cf. *micrura* 1 (Fig. 16B, C) y células globosas para *Moina* cf. *micrura* 2 (Fig. 28A, B).

Finalizando, *Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2 presentan en común: (1) Depresión supra ocular. (2) Angulo postero-dorsal. (3) Ojo compuesto. (4) Ausencia de pelos y espinas en

la cabeza. (5) El exopodito es ligeramente más corto que el endopodito. (6) Poseen igual fórmula antenal para las setas. (7) Comparten las mismas características para los toracopodos I y V.

4.3. Diferencias morfológicas entre los complejos *moina cf. micrura 1*, *moina cf. micrura 2* mexicanas y *moina micrura s. str.* de república checa

Diagnóstico diferencial: La descripción morfológica entre *Moina cf. micrura 1*, *Moina cf. micrura 2* y *Moina micrura s. str.* se encuentran detalladamente en el Anexo 2. Las principales diferencias observadas para estos dos grupos se encuentran en:

(1) El tamaño corporal entre las tres especies, reveló rangos de solapamiento, pero aun así se permitió diferenciar a *Moina micrura s. str.* como la especie más pequeña respecto a *Moina cf. micrura 1* y *Moina cf. micrura 2*. (2) La longitud de las anténulas de *Moina micrura s. str.* (70-87 μm), destacándose que son mucho más cortas y pequeñas en estos organismos, respecto a las especies de *Moina cf. micrura 1* (133-150 μm) y *Moina cf. micrura 2* (100-167 μm). (3) La superficie de las anténulas, en donde la cara anterior presenta micro espinas muy diferenciadas para *Moina cf. micrura 1* (**Fig. 6C**), poco diferenciadas para *Moina micrura s. str.*, (**Lamina 2A**) y levemente presentes para *Moina cf. micrura 2* (**Fig. 18B**). (4) La seta sensorial de *Moina cf. micrura 2* (**Fig. 18C**) está ubicada más cerca de la parte distal de la anténula, y es tan larga que llegaría a la punta de la anténula si se direcciona hacia arriba, Dicho patrón, es contrario al observado en *Moina cf. micrura 1* (**Fig. 6A, D**) y *Moina micrura s. str.* (**Lamina 2A**) (5) La superficie del basipodito en *Moina cf. micrura 1* (**Fig. 7A**) presentó espinas fuertemente esclerotizadas con respecto a las de *Moina cf. micrura 2* (**Fig. 19A**) y *Moina micrura s. str.* Es importante señalar la ausencia de pelos en los organismos de *Moina micrura s. str.* (**Lamina 2C**,

D), analizados. **(6)** La longitud del basipodito y de sus setas localizadas en el segmento basal y terminal fueron menores en *Moina micrura* s. str (No datos), por lo tanto, su proporción respecto al basipodito fue considerablemente mucho mayor a lo establecido en *Moina* cf. *micrura* 1 (Long basipodito: 212-240 μm , SPL: 125-180 μm , SPC: 80-120 μm) y *Moina* cf. *micrura* 2 (Long basipodito: 200-250 μm , SPL: 150-240 μm , SPC: 90-1520 μm). Es de resaltar que *Moina micrura* s. str. (**Lamina 2C**), denotó una seta sensorial menos respecto a las determinadas en el basipodito de *Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2. **(7)** En la superficie de las antenas natatorias, los segmentos ramales con hileras de espinas se observaron claros y organizados en *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 8C**), patrón contrario en *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 20B**) y *Moina micrura* s. str. (**Lamina 2C**), **(8)** La fórmula antenal reveló la presencia de una espina diferenciada en el segmento uno del exopodito en *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 8B**), ella estuvo ausente en *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 20C, D**) y *Moina micrura* s. str (**Lamina 2C**). Además, las observaciones experimentales indicaron la presencia de una espina en el segmento uno y dos del endopodito de *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 8A**) y *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 20A, B**), ausente en *Moina micrura* s. str (**Lamina 2A**). **(9)** El rango de grupos de espinas pequeñas observadas en el margen ventral de las valvas es menor en *Moina micrura* s. str. (7-10), respecto a *Moina* cf. *micrura* 1 (8-13) y *Moina* cf. *micrura* 2 (8-15). **(10)** En el margen ventral de las valvas se observan grupos de espinas incrementando ascendentemente en *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 10B**) y *Moina micrura* s. str (**Lamina 1C**), patrón contrario observado en *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 22B**), donde la diferenciación de los grupos no es clara. **(11)** En la superficie de las valvas se logró apreciar que las esclerotizaciones se muestran de manera diferente, exhibiéndose para *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 10D**) en forma de cuadrícula, para *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 22D**) en forma rectangular y por último para *Moina micrura* s. str (**Lamina 1C**) en forma poligonal. **(12)**

Un diagnóstico importante observado en *Moina micrura* s. str., es la ausencia de la seta gruesa que sale del lado lateral de la base del exopodito; presente en *Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2. (13) El rango de setas posteriores encontradas en la placa filtradora de la gnatobase en el toracópodo II, es mayor en *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 12E, a-ñ**) (13 a 15) que lo observado en *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 24A, a-h**) (8 a 13) y con un valor intermedio en *Moina micrura* s. str (Elías-Gutiérrez, dibujo no publ) (12-14). (14) La longitud del exopodito de los toracópodos III y IV es menor en *Moina micrura* s. str (**Lamina 4D / Lamina 5A**), seguido por *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 25B / Fig. 26B**) que mostro un valor intermedio y finalizando con un valor mayor en *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 13E / Fig. 14C**). Este mismo patrón se observó en el número de setas presentes en la gnatobase de cada toracópodo. (15) En el postabdomen de los organismos de este estudio se determinó un incremento en el número de dientes plumosos: *Moina micrura* s. str (**Lamina 1G**) (4-5), tuvo la menor cantidad, *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 21A**) (5-6) mostró un valor intermedio y el mayoritario fue establecido en *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 9B**) (7-9). Fue sobresaliente que la garra postabdominal de todos los especímenes analizados mostró el mismo patrón de incremento establecido en el número de dientes plumosos. (16) Es importante destacar que en *Moina micrura* s. str (**Lamina 1H**) se observó pecten basal y medio en la garra postabdominal que estuvo ausente en *Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2. Por último, (17) La comparación de las superficies efipiales en las especies reveló patrones diferentes, mostrando células aplanadas en *Moina* cf. *micrura* 1 (**Fig. 16B, C**), células globosas para *Moina* cf. *micrura* 2 (**Fig. 28A, B**) y células hexagonales en *Moina micrura* s. str (**Lamina 6A**).

Así mismo, *Moina micrura* s. str., comparte las mismas estructuras en común mencionadas anteriormente para *Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2.

4.4. Análisis de la secuencia nucleotídica del marcador mitocondrial citocromo oxidasa subunidad i (620 pb) (coi) del grupo *moina micrura*: *moina cf. micrura 1*, *moina cf. micrura 2* y *moina micrura s. str.*, obtenido de la base de datos bold

De la base de datos Barcode of life (BOLD, www.boldsystems.org) se obtuvieron un total de 80 secuencias de la COI, con una longitud media de 650 nucleótidos: Para *Moina cf. micrura 1* (31 secuencias); *Moina cf. micrura 2* (39 secuencias) y *Moina micrura s. str.* (10 secuencias).

Las herramientas analíticas integradas por BOLD nos mostraron que la divergencia intraespecífica media para *Moina cf. micrura 1* fue de 0,36%, mientras que su máxima divergencia fue de 1,81%. En el caso de *Moina cf. micrura 2* la divergencia intraespecífica fue de 0,06%, y la máxima fue de 0,22%. La divergencia interespecífica media entre las especies *Moina cf. micrura 1* y *Moina cf. micrura 2* fue de 10,27%, y su máxima divergencia fue de 10,71%. (Anexo 3).

En el caso de *Moina micrura s. str.* la divergencia intraespecífica fue de cero, indicando que no presenta ninguna variación. Así mismo, la divergencia interespecífica para los tres grupos (*Moina cf. micrura 1*, *Moina cf. micrura 2* y *Moina micrura s. str.*) es de 14,08% (Anexo 4).

El contenido de GC para *Moina cf. micrura 1* oscila entre 33.89% y 34.61%. La composición media para este complejo fue: G 17,93% (SE = 0,04), C 16,2% (SE = 0,02), A 27,12% (SE = 0,02) y T 38,72% (SE = 0,03). Por el contrario, el contenido de GC para *Moina cf. micrura 2* oscila entre 34.95% y 35.61%. La composición media para este complejo fue: G 17,43% (SE = 0,04), C 17,59% (SE = 0,02), A 28,57% (SE = 0,02) y T 36,41% (SE = 0,03). Así mismo, el contenido de GC para *Moina micrura s. str.*, es de 35.56%. La composición media para este complejo fue: G 17,63% (SE = 0), C 17,9% (SE = 0), A 27,3% (SE = 0) y T 37,1% (SE = 0).

El árbol ID mostró tres grupos bien definidos, el primero compuesto exclusivamente por individuos de *Moina micrura* s. str del estanque Sadka en la República checa (BIN: ACK2252), el segundo representado por *Moina* cf. *micrura* 2 (BIN: AAB9662) y el tercero está dado por *Moina* cf. *micrura* 1 (BIN: AAB1056); estos dos grupos pertenecen a diferentes localidades de México (Ver Anexo 5).

En la Figura 29 podemos observar las diferencias morfológicas más importantes obtenidas en el análisis morfológico relacionadas a nuestros grupos de trabajo. Así mismo, se puede apreciar que *Moina* cf. *micrura* 1 posee más divergencia, respecto a *Moina* cf. *micrura* 2 y *Moina micrura* s. str., es decir posee más haplotipos, que seguramente con el pasar del tiempo llegaran a ser especies diferentes.

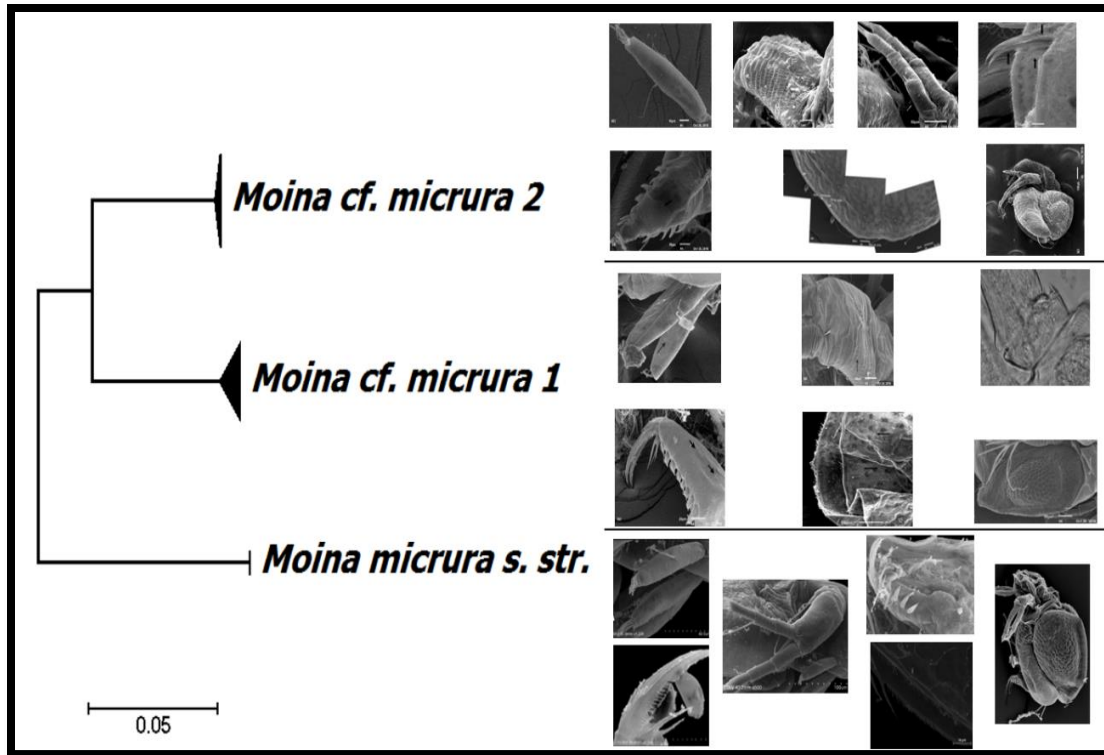


Figura 29. Árbol Vecino más cercano (ID Árbol) utilizando el modelo de distancias (K2P) del gen COI, de la especie *Moina cf. micrura* disponibles en BOLD junto con las diferencias morfológicas obtenidas en cada grupo.

5. Discusion

El complejo de *Moina micrura* (Kurz 1874), es uno de los grupos más difíciles de diferenciar correctamente, debido a que presenta una gran plasticidad fenotípica (Petrušek et al., 2004), en los caracteres usados para el reconocimiento de estas especies, no existe material tipo para su comparación, el lugar en donde fue descrita ha sido altamente modificado y, está registrada en casi todo el mundo por lo que ha sido catalogada como una especie cosmopolita. Debido a esto, se ha hecho algunas revisiones de la familia Monoidae, como la descrita por Goulden (1968)

donde se registra siete especies sinonimizadas con *Moina micrura*, y la de Bekker et al., (2016) donde presenta cinco sinonimias más para este grupo. Esta complejidad taxonómica, nos permitió buscar los caracteres que tuvieran un mínimo de variación al momento de comparar el grupo *Moina* cf. *micrura* 1 de las localidades de Durango y Chihuahua, con *Moina* cf. *micrura* 2 de Estado de México, Michoacán y Puebla.

Basados en la literatura y en los resultados observados en nuestro estudio, se sugiere que las dos poblaciones encontradas en las localidades mexicanas (*Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2) no pertenecen realmente a *Moina micrura* s str, ya que poseen una distribución geográfica restringida, gran variabilidad morfológica en algunos de los caracteres observados (longitud del habito, la longitud del basipodito y sus setas asociadas, el efipio y el postabdomen), que podrían ser adaptaciones en respuesta al medio ambiente (Petrušek et al., 2004), tal como ha sido explicado para otros cladóceros como el género *Daphnia* (Castiglioni et al., 2008).

Igualmente, este trabajo demuestra que desde un punto de vista de la taxonomía integrativa, es posible establecer que *Moina micrura* (Kurz 1874) en lugar de ser una especie cosmopolita, es más bien un complejo de especies estrechamente relacionadas, presunción que ya había sido hecha por otros autores como Petrušek et al., (2004) que fueron los primeros en cuestionarse este cosmopolitismo dentro del grupo basados en experimentos de hibridación y caracteres moleculares con el gen mitocondrial 12S, y por Elías-Gutiérrez, et al., (2008a) que encontraron una divergencia genética con el gen mitocondrial COI para los tres grupos mexicanos trabajados en su estudio (*Moina micrura* 1, *Moina micrura* 2 y *Moina micrura* 3), revelando que posiblemente se tratara de un complejo de especies relacionadas. Estos resultados han sido corroborados por nuestros análisis morfológicos y genéticos para nuestras poblaciones de *Moina* cf. *micrura* mexicanas.

De igual manera el concepto del no cosmopolitismo en cladóceros se ha venido trabajando desde hace más de 30 años, cuando Frey (1982,1987) postuló esta teoría en la mayor parte de los cladóceros. Desde ese momento, estudios basados en datos morfológicos y/o moleculares han corroborado esta idea (Hudec 1990; Petrussek et al., 2004; Elías-Gutiérrez et al., 2008a; Belyaeva & Derek, 2009; Juracka et al., 2010; Sharma et al., 2014; Popova et al., 2016).

Es así que son pocas las especies de cladóceros que presentan distribuciones geográficas amplias (Crease et al., 2012). Y estos últimos patrones de distribución han podido resultar de la expansión postglacial, dispersión a largo plazo de las especies, donde las aves son los vectores más probables, e introducciones antropogénicas (Petrussek et al., 2004; Popova et al., 2016).

El género *Moina* posiblemente se diversificó desde la era mesozoica, pues existen epítipos atribuidos a este grupo en Mongolia en un estrato que corresponde a la época del Jurásico/Cretácico (Smirnov, 1992). Sin embargo, algunos autores sugieren que las raíces del grupo "*micrura*" se remontan hasta el paleozoico (Korovchinsky, 2006). Y se sabe que *Moina micrura* (Kurz 1874) es de las pocas especies que conforman un grupo emparentado en diferentes continentes, pudiendo este patrón intercontinental ser explicado por la deriva continental de Pangea, y los cambios desde la diferenciación antigua que dieron lugar a zonas y rangos adaptativos donde surgió la especiación y los patrones cambiantes de distribución (Bekker et al., 2016).

El concepto de cosmopolitismo en invertebrados de agua dulce ha sido explicado en gran parte por la dificultad de distinguir entre especies hermanas (Bohonak & Jenkins, 2003). Y los grupos ricos en especies (*Cerodaphnia*, *Diaphanosoma*, *Moina*, *Chydoridae* y *Macrothricidae*), y especies consideradas ampliamente distribuidas han salido por lo tanto del interés de los taxónomos (Petrussek et al., 2012).

5.1. Morfología

Con respecto a la morfología, la falta de una descripción detallada de todos los caracteres, que además incluya las diferentes etapas del ciclo vital (hembras partenogenéticas, epipiales y machos), ha dado lugar a identificaciones erróneas que agrupan diferentes especies bajo un mismo nombre (Bekker et al., 2016; Popova et al., 2016).

Las especies del grupo *Moina micrura* trabajadas en este estudio, comparten algunos caracteres morfológicos con otras especies del género. Por ejemplo, *Moina* cf. *micrura* 1 es similar a *Moina dumonti* en la estructura general de su cuerpo, pero se diferencian en los 3-5 peines debajo de la garra y la espinulación de las valvas (Kotov et al., 2005). *Moina* cf. *micrura* 2 es parecida a *Moina ephemeralis*, diferenciándose en el diente bidentado del postabdomen donde las ramas son de igual longitud y en la espinulación de las valvas (Hudec, 1997).

En la actualidad no hay homologías claras de los toracópodos de los Moínidos con otros anomópodos (Elmoor-Loureiro et al., 2005), debido a esto, se utilizaron descripciones detalladas propuestas por otros autores (Martinez-Jeronimo et al., 2004; Kotov et al., 2005; Padhye & Dumont, 2014).

El análisis morfológico corrobora que el toracópodo I de *Moina* cf. *micrura* 1, *Moina* cf. *micrura* 2 posee 4 enditos en el lado interno de la extremidad tal y como mencionó Alonso (1996). Como información general, en Daphnidos y Moínidos no se produce una gnatobase clara para esta estructura, al contrario, este es reemplazado por el endito 1 (Cannon 1933; Kotov et al., 2005; Dumont 2016). Distalmente se encuentran los enditos 2,3 y 4 fusionados en el cuerpo de la extremidad llamada corno (Dumont, 2016), cada uno con 2-3 setas especializadas que en Daphnidos y Moínidos limpian el detritus de la superficie interna de las valvas y/o del

toracópodo II. Cannon (1933) sugiere que el movimiento de las setas del toracópodo I produce corrientes que mueven el alimento hacia la boca. La seta anterior única y rígida antepenúltimo, está ausente en algunas especies de *Moina* (*Moina oryzae* y *Moina minuta*) (Kotov et al., 2005; Elmoor-Loureiro, 2005), pero este es un carácter usado para distinguir al grupo “*micrura*” (Smirnov, 1976; Kotov et al., 2005). Así mismo, Dumont (2016) en su estudio del toracópodo I, registra que la homología del IDL (Lóbulo distal interno) y ODL (Lóbulo distal externo) para los Anomópodos es incierta. Por último, el toracópodo I presenta un par de ganchos eyectores que es un carácter compartido por la mayoría de los Anomópodos.

El toracópodo II, puede ser uno de los caracteres más informativos para el grupo, debido a que tanto en estructura como en función es bastante variado dentro de los Anomópodos (Elmoor-Loureiro, 2005). *Moina* cf. *micrura* 1, *Moina* cf. *micrura* 2 y *Moina micrura* s. str., comparten un largo lóbulo que es considerado de homología poco clara (Kotov et al., 2005). Así mismo, encontramos que las setas posteriores de la gnatobase eran variables en los organismos mexicanos, observando para *Moina* cf. *micrura* 1 de 13-15 setas y en *Moina* cf. *micrura* 2 de 10-13 setas, diagnóstico importante ya que no cumple lo señalado por Kotov et al (2005), donde sugieren que en los moínidos existe un número estable de setas. Aunque Dumont (2016) en su análisis rápido de este toracópodo comenta que existe una variación en el número de setas para los Daphnidos, Anomópodos y Dumontidos, concluyendo que esta estructura es menos diagnóstica que el toracópodo I. Esto solo sugiere la necesidad inmediata de un mayor estudio, reconocimiento y comparación de esta estructura en las diferentes familias.

Los toracópodos III y IV en Moínidos y Daphnidos deben ser analizados en conjunto, ya que poseen apariencia y funciones similares (Elmoor-Loureiro, 2005). *Moina* cf. *micrura* 1, *Moina* cf. *micrura* 2 y *Moina micrura* s. str., comparten su forma laminar, contrario a lo observado en

los Ctenopoda (Cannon, 1933); igualmente este toracópodo está principalmente representado por la gnatobase, como se observa en otras especies de Moínidos (Elmoor-Loureiro, 2005). La longitud del exopodito en esta estructura como el número de setas en la placa filtradora difiere en *Moina cf. micrura* 1, *Moina cf. micrura* 2 y *Moina micrura* s. str., característica compartida por otras familias (Fryer 1991; Kotov et al., 2005). En el toracópodo III, se distinguen levemente los enditos, sobresaliendo el endito 3, pero en el toracópodo IV, los enditos se encuentran fusionados, siendo muy complicada la diferenciación clara de las estructuras. Kotov et al., (2005) proponen en base a otros trabajos que, las setas de los enditos son homólogas a las setas en los Quidoridos y Macrotrícidos.

El toracópodo V, en Moínidos y Daphnidos tiene la función de cerrar y/o abrir la cámara filtradora para permitir el flujo de agua a través de los toracópodos restantes (Fryer, 1991). *Moina cf. micrura* 1, *Moina cf. micrura* 2 y *Moina micrura* s. str., son similares en esta estructura, con setas en el borde de la extremidad como en muchos Chydoridae (Smirnov, 1971).

Finalmente, el epipio de *Moina cf. micrura* 1, *Moina cf. micrura* 2 y *Moina micrura* s. str., difiere, como sucede en otros grupos de Daphnidos reconocidos como especies crípticas (Juracka et al., 2010). La superficie epipial del grupo “*micrura*” es diferente, siendo un carácter morfológico importante y revelador para la identificación de especies y sub especies dentro de los cladóceros (Lu, 2001).

Comparando las hembras partenogénicas de *Moina cf. micrura* 1, *Moina cf. micrura* 2 y *Moina micrura* s. str., se encontró que es difícil discernir morfológicamente estas especies dentro del grupo “*micrura*” basado en la literatura existente hasta el momento. Debido a que algunos caracteres tomados en cuenta para ese trabajo no se han descrito antes para este grupo.

La superficie y la longitud de las anténulas, la superficie, longitud y proporción del basipodito y de las setas encontradas en el segmento basal y/o terminal, la longitud de los toracopodos III y IV, entre otros, han sido caracteres que en descripciones anteriores para el grupo “*micrura*” no se han observado y parecen ser de gran importancia taxonómica, ya que en nuestro trabajo revelan diferencias significativas entre las especies mexicanas y la especie europea. Esto demuestra la importancia de nuevos caracteres que merecen ser tomados en cuenta en las descripciones taxonómicas.

Por lo tanto, para una diferenciación más exacta de este grupo es necesario la designación de un neotipo con todos los caracteres posibles que aclaren la taxonomía confusa de “*micrura*”, teniendo en cuenta que todo el material de su descripción original ya no existe (Internacional Code of Zoological Nomenclature 2000). Así mismo, las poblaciones de machos son necesarias en el estudio, ya que ellos reportan caracteres más valiosos que las hembras partenogénicas (Popova et al., 2016), debido a que los cambios que se presentan en ellos son más notorios y muestran un desarrollo más claro de los caracteres sexuales (Elías-Gutiérrez et al., 2008b).

5.2. Código de barras

En este trabajo se emplearon distintos enfoques complementarios para dilucidar el estado taxonómico de las poblaciones de *Moina* cf. *micrura* 1 y *Moina* cf. *micrura* 2, que, de acuerdo a criterios morfológicos limitados, pertenecen a *Moina micrura* s. str de Republica Checa, pero estos especímenes están separados por una distancia de alrededor de 10.000 km entre ellas.

Para esto, se aplicó la técnica de códigos de barras de ADN basados en la variación de nucleótidos en un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), que ha demostrado

ser una potente herramienta en la identificación de microcrustáceos de agua dulce y se está convirtiendo en una técnica estándar para resolver problemas en especies crípticas (Hebert et al., 2003; Costa et al., 2007).

En este estudio se encontró un promedio de 34,16% de G+C para *Moina* cf. *micrura* 1, 35,02% para *Moina* cf. *micrura* 2 y 35,56% para *Moina micrura* s. str., lo que nos indica que la región genética examinada (COI) es relativamente baja en Guaninas y Citosinas y/o rica en Adeninas y Timinas (65,84%, 64,98% y 64,44%). Patrón similar observado en *Daphnia pulex* donde el contenido de A+T en los genes codificantes de proteínas del ADN mitocondrial son del 62% (Crease T, 1999). Los contenidos A+T del 40% al 60% son los considerados como los más frecuentes, sin embargo, entre las especies el contenido de A+T puede variar debido a diferentes presiones ambientales (Glöckner, 2000).

Así mismos, en nuestro caso, los códigos de barras detectaron más del 10% de divergencia genética entre las especies “*micrura*” de las diferentes poblaciones de México, para las tres especies en estudio se detectó una divergencia genética superior al 14%, indicando la presencia de especies diferentes. Este resultado se asemeja a lo registrado por Elías-Gutiérrez et al., (2008a) que reporta en su estudio una divergencia genética entre especies de cladóceros del 17,64%. Así mismo, Costa et al., 2007, encuentra divergencias genéticas cercanas al 18% entre especies de crustáceos, siendo el valor más alto registrado para cualquier otro grupo de animales, donde Hebert et al., (2003, 2004) registra una variación del 6,1% para lepidópteros, 7,93% para las aves y 9,93% para los peces (Ward et al., 2005).

Nuestros resultados corroboran como en muchos otros estudios genéticos en cladóceros y/o en otros grupos como copépodos y rotíferos que muchas especies consideradas cosmopolitas son

posiblemente crípticas, más bien con distribuciones restringidas (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2008; García-Morales & Elías-Gutiérrez, 2013; Karanovic, 2015).

6. Conclusiones

Este estudio encontró diferencias morfológicas significativas entre las especies de *Moina* cf. *micrura* mexicanas y *Moina micrura* s str., de Republica Checa, corroborando los análisis moleculares que separaron estas especies como tres grupos diferentes con una divergencia mayor al 10%. Por lo tanto, *Moina micrura* s str., de Europa, es una especie diferente morfológica y molecularmente a las especies que habitan en las diferentes localidades de México.

Los análisis moleculares junto con los análisis morfológicos revelaron que *Moina micrura* considerada una especie cosmopolita, es de hecho un grupo de especies. Sin embargo, es necesario la designación de un neotipo claro para *Moina micrura* s str., que no solo use la herramienta molecular, sino plantee descripciones morfológicas detalladas como las que se presentaron en este estudio, considerando hembras partenogenéticas, hembras efipiales y machos, permitiendo así realizar comparaciones que comprendan todas las fases de su ciclo vital, de acuerdo con el reciente planteamiento de la taxonomía integrativa.

Este tipo de estudios integrales, que incluyen datos moleculares con un gen estandarizado como el COI, y una descripción detallada de diferentes caracteres morfológicos representan un enfoque completo y actualizado para explorar la taxonomía confusa de diferentes grupos con especies crípticas, como la especie presentada en este trabajo.

Referencias Bibliograficas

- Alonso, M. (1996). *Crustacea, Branchiopoda* (Vol. 7). Madrid: Fauna Iberica.
- Anderson, T. F. (1951). Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *New York Academy of Sciences Transactions*, 130-134.
- Bekker, E. I., Karabanov, D., Galimov, Y., & Kotov, A. (2016). DNA Barcoding Reveals High Cryptic Diversity in the North Eurasian Moina Species (Crustacea: Cladocera). *PlosOne*, 1-19.
- Belyaeva, M., & Derek, T. (2009). Cryptic species within the Chydorus sphaericus species complex (Crustacea: Cladocera) revealed by molecular markers and sexual stage morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 534-546.
- Bohonak, A., & Jenkins, D. (2003). Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecol. Lett.*, 783-796.
- Cannon, H. (1933). On the feeding mechanism of the Branchiopoda. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 267-339.
- Castiglioni, M., Collins, P., & Paggi, J. (2008). Ciclomorfosis inducida por detergente en Daphnia magna. *FABICIB*, 137-148.
- Conde-Porcuna, J., Ramos-Rodríguez, E., & Morales-Baquero, R. (2004). El zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lenticos. *Ecosistemas*, 23-29.
- Costa, F. O., deWaard, J., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R., Hajibabaei, M., & Hebert, P. (2007). Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 272-295.

- Cousyn, C., De Meester, L., Colbourne, J., Brendonck, L., & V.F. (2001). Rapid, local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6256-6260.
- Crease, T. (1999). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*, 89-99.
- Crease, T., Omilian, A. R., Costanzo, K. S., & Taylor, D. J. (2012). Transcontinental phylogeography of the *Daphnia pulex* species complex. *PlosOne*, 7.
- Crittenden, R. N. (1981). Morphological characteristics and dimensions of the filter structures from three species of *Daphnia* (Cladocera). *Crustaceana*, 233-248.
- Dumont, H. (2016). Phylogenetic insights into the Anomopoda, mainly derived from a comparative study of trunk limb 1. *Crustaceana*, 307-319.
- Elías-Gutiérrez, M. (2000). *Microcrustáceos zooplanctónicos y litorales del sureste de México. El colegio de la frontera Sur. Informe final SNIB-CONABIO proyecto S050. México D.F.*
- Elías-Gutiérrez, M., & Sarma, S. S. (1999). *Zooplankton de sistemas acuáticos epicontinentales mexicanos en la región central de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores Iztacala. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. H112. México, D.F.*
- Elias-Gutierrez, M., & Valdez-Moreno, M. (2008). A new cryptic species of *Leberis* Smirnov 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiologica*, 63-74.
- Elías-Gutiérrez, M., Martínez Jerónimo, F., Ivanova, N. V., Valdez-Moreno, M., & Herbert, P. D. (2008). DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*, 1-42.
- Elías-Gutiérrez, M., Nieto, G., & Garfias-Espejo, T. (2004). Pulgas de agua. Pequeños monstruos dulceacuícolas. *Ciencia y Desarrollo*, 16-21.

- Elías-Gutiérrez, M., Suárez Morales, E., Gutiérrez Aguirre, M. A., Silva Briano, M., Granados Ramírez, J. G., & Garfias Espejo, T. (2008). *Cladocera y Copepoda de las aguas continentales de México*. MÉXICO: Semarnat.
- Elmoor-Loureiro, L. M. (2005). As patas dos cladóceros: descrição e importância taxonômica. *Limnotemas*, 1-22.
- Elmoor-Loureiro, Santangelo, J., Lopes, P., & Bozelli, R. (2010). A new report of *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Cladocera, Anomopoda) in South America. *Braz. J. Biol.*, 225-226.
- Figuerola, J., Green, A., & Santamaría, L. (2002). Comparative dispersal effectiveness of wigeongrass seeds by waterfowl wintering in south-west Spain: quantitative and qualitative aspects. *Journal of Ecology*, 989-1001.
- Folmer, O. M., Black, W., Hoeh, R. L., & Vrijenhoek, R. (2004). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 294-299.
- Forró, L., Korovchinsky, N., Kotov, A., & Petrusek, A. (2008). Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hidrobiologia*, 177-184.
- Frey, D. (1982). Questions concerning cosmopolitanism in Cladocera. *Hydrobiologia*, 484-502.
- Frey, D. (1987). The taxonomy and biogeography of the Cladocera. *Hydrobiologia*, 5-7.
- Fryer, G. (1991). *Functional morphology and the adaptive radiation of the Daphniidae (Branchiopoda: Anomopoda)*. London: Phil. Trans. Roy. Soc.
- García-Morales, A., & Elías-Gutiérrez, M. (2013). DNA barcoding of freshwater Rotifera of Mexico: evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecology Resources*, 1097-1107.
- Glöckner, G. (2000). Large scale sequencing and analysis of AT rich eukaryote genomes. *Current Genomics*, 289-299.

- Góngora-Landeros, E., Uría-Galicia, E., Martínez-Jerónimo, F., & López-Villegas, E. (2010). Descripción Histológica de la Cámara Incubatriz de *Moina hutchinsoni* (Brem, 1937). *Int. J. Morphol.*, 1025-1030.
- Goulden, C. E. (1968). *The Systematics and Evolution of the Moinidae* (Vol. 58). Europa: Transactions of the American Philosophical Society. Obtenido de <http://links.jstor.org/sici?sici=0065-9746%281968%292%3A58%3A6%3C1%3ATSAEOT%3E2.0.C0%3B2-V>
- Gutiérrez-Aguirre, M. A., Cervantes-Martínez, A., & Elías-Gutiérrez, M. (2014). An example of how barcodes can clarify cryptic species: The case of the calanoid copepod *Mastigodiptomus albuquerqueensis*. *PlosOne*, 9.
- Hajibabaei, M., Dewaard, J. R., Ivanova, V. N., Ratnasingham, S., Dooh, T. R., Kirk, L. S., . . . Hebert, P. (2005). Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1959-1967.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, S96-S99.
- Hudec, I. (1990). *Moina weismanni* Ishikawa, 1896 (Cladocera, Moinidae) in Central Europe. *Hydrobiologia*, 33-42.
- Hudec, I. (1997). *Moina ephemeralis* n.sp. from Central Europe. *Hydrobiologia*, 55-61.
- Innes, D., & Singleton, D. (2000). Variation in allocation to sexual and asexual reproduction among clones of cyclically parthenogenetic *Daphnia pulex* (Crustacea:Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 771-787.
- Ivanova, N. V., Dewaard, J. R., & Hebert, P. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology*, 998-1002.
- Jeffery, Elías-Gutiérrez, M., & Adamowicz, S. (2011). Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *PlosOne*, 1-9.

- Juracka J.P., Sacherová, V., Dobiášovská, I., Bovsková, D., Novosadová, Z., Korínek, V., & Petrusek, A. (2016). Simplification of preparation techniques for scanning electron microscopy of Cladocera: preparing filtering limbs and ephippia for efficient studies of ultrastructure. *Crustaceana*, 47-62.
- Juracka, P., Korínek, V., & Petrusek, A. (2010). A new Central European species of the *Daphnia curvirostris* complex, *Daphnia hrbaceki* sp. nov. (Cladocera, Daphniidae). *Zootaxa*, 1-22.
- Karanovic, I. (2015). Barcoding of ancient lake ostracods (Crustacea) reveals cryptic speciation. *PlosOne*, 10.
- Kimura, M. (1980). A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies. *Journal of Molecular Evolution*, 111-120.
- Korovchinsky, N. (2006). The Cladocera (Crustacea: Branchiopoda) as a relict group. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 109-124.
- Kotov, A. (1999). Morphology and variability of *Ilyocryptus agilis* Kurz, 1878 and *I. cuneatus* Stiter, 1988 from Laker Glubokoe, Moscow Area, Central Russia (Anomopoda: Branchiopoda). *Arthropoda Selecta*, 3-22.
- Kotov, A. A., Elías-Gutiérrez, M., & Granados-Ramírez, J. G. (2005). *Moina Dumonti* sp. nov. (Cladocera, Anomopoda, Moinidae) from southern Mexico and Cuba, with comments on Moinid limbs. *Crustaceana*, 41-57.
- Kotov, A., Forró, L., Korovchinsky, N., & Petrusek. (2013). Crustacea-Cladocera checkList. *World Wide Web electronic publication*, 1-38.
- Krishnan, M., & Chockalingam, S. (1989). Toxic and sublethal effects of endosulfan and carbaryl on growth and egg production of *Moina micrura kurz* (Cladocera: Moinidae). *Environmental Pollution*, 319-326.
- Kumar, S., Tamura, K., & Masatoshi, N. (2004). MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 150-163.

- Lu, K.-H. (2001). Morphology and ultrastructure of the ehippia of some Cladocera (Crustacea). *Current Zoology*, 565-572.
- Martinez-Jeronimo, F., Elias-Gutierrez, M., & Suarez-Mora, E. (2004). A redescription of *Moina hutchinsoni*, a rare Cladoceran (Branchiopoda: Anomopoda) found in remnants of a mexican saline lake, with notes on its life history. *JOURNAL OF CRUSTACEAN BIOLOGY*, 232-245.
- Martínez-Jerónimo, F., Rodríguez-Estrada, J., & R., V.-C. (2007). Effect of culture density and volume on *Moina micrura* (Kurz, 1874) reproduction, and sex ratio in the progeny. *Hydrobiologia*, 69-73.
- Miracle, M. R., & Nandini, S. (2011). Endocrine disrupting effects, at different temperatures, on *Moina micrura* (Cladocera: Crustacea) induced by carbendazim, a fungicide. *Hydrobiologia*, 155-170.
- Montellano-Rosales, H., & Mendoza-Vallejo, H. (1994). Manual de Laboratorio de Biología del Desarrollo. En *Biología del Desarrollo* (págs. 5-13). IPN, ENCB.
- Montiel-Martínez, A., Ciro-Pérez, J., E, O.-M., & M, E.-G. (2008). Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiptomus garciai* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species. *Journal of Plankton Research*, 1079-1093.
- Montoliu, L., M. R. M. , & Elias-Gutierrez, M. (2015). Using DNA barcodes to detect non-indigenous species : the case of the Asian copepod *Mesocyclops pehpeiensis* Hu , 1943 (Cyclopidae) in two regions of the world. *Crustaceana*, 1323-1338.
- Nédli, J., Luc De Meester , Ágnes Major , & Klaus Schwenk . (2014). Salinity and depth as structuring factors of cryptic divergence in *Moina brachiata* (Crustacea: Cladocera). *Fundam. Appl. Limnol.*, 69-85.
- Ortiz, M., González , E., & Peñaherrera, C. (2006). Depredación de peces sobre el zooplancton en tres embalses neotropicales con distintos estados tróficos. *Interciencia*, 517-524.
- Padhye, S. M., & Dumont, H. J. (2014). *Moina hemanti* sp. nov., a new species of the genus *Moina* s.l. (Branchiopoda: Anomopoda) from Pune, India. *Zootaxa*, 561-570.

- Paggi, J. (2004). Importancia de la fauna de "Cladóceros" (Crustácea, Branchiopoda) del Litoral Fluvial Argentino. *INSUGEO*, 239-246.
- Petrusek, A. (2002). Moina (Crustacea: Anomopoda, Moinidae) in the Czech Republic: a review. *Acta Soc. Zool. Bohem*, 213-220.
- Petrusek, A., Martin, C., & Audenaert, E. (2004). Large intercontinental differentiation of *Moina micrura* (Crustacea: Anomopoda): one less cosmopolitan cladoceran? *Hydrobiologia*, 73-81.
- Petrusek, A., Thielsch, A., & Schwenk, K. (2012). Mitochondrial sequence variation suggests extensive cryptic diversity within the Western Palearctic *Daphnia longispina* complex. *Limnol Oceanogr*, 1838-1845.
- Popova, E., Petrusek, A., Korinek, V., Mergeay, J., Bekker, E., Karabanova, D., . . . Kotov, A. (2016). Revision of the Old World *Daphnia* (Ctenodaphnia) similis group (Cladocera: Daphniidae). *Zootaxa*, 001-040.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. (2013). A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*, 8.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 1-10.
- Rodríguez-Estrada, J., V.-C. R., & M.-J. F. (2003). Efecto de la temperatura y tipo de alimento en el cultivo de *Moina micrura* (Kurz, 1874) (Anomopoda: Moinidae) en condiciones de laboratorio Effect of temperature and type of food on the growth of *Moina micrura* (Kurz, 1874) (Anomopoda: Moinidae). *Hidrobiología*, 239-246.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 406-425.
- Sarma, S., Nandini, S., & Gulati, R. (2005). Life history strategies of cladocerans: comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia*, 315-333.

- Sharma, P., Elías-Gutiérrez, M., & Kobayashi, T. (2014). Identification of common Cladocerans and Calanoids in two south Australian reservoirs using DNA barcoding and morphological analysis: an integrative approach. *Crustaceana*, 50-161.
- Smirnov, N. (1976). *Macrothricidae and Moinidae of the world fauna*. Russian: Fauna SSSR, (n.s.), Rakoobraznye.
- Smirnov, N. (1992). Mesozoic Anomopoda (Crustacea) from Mongolia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 97-116.
- Smirnov, N. N. (1971). *Chydoridae of the world fauna* (Vol. 1). Russian: Fauna SSSR, (n.s.), Rakoobraznye.
- Thouvenot, A., Richardot, M., Debroas, D., & Devaux, J. (1999). Bacterivory of metazooplankton, ciliates and flagellates in a newly flooded reservoir. *Journal of Plankton Research*, 1659-1679.
- Trejo-Albarrán, R., Granados-Ramírez, J., Gómez-Márquez, J., Gómez-Márquez, B., & Gómez-Márquez, J. (2014). Variación del cladocero *Daphnia laevis* Birge, 1879 en el lago Zempoala, Morelos, Mexico. *Mesoamericana*, 25-38.
- Ward, R., Zemplak, D., Innes, B., Last, P., & Hebert, P. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 1847-1857.
- Wong, C. K. (1989). Effects of cadmium on the feeding behaviour of the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*. *Chemosphere*, 1681-1687.

Apéndices

Apéndice A. Localidades de recolección, fecha de colecta y números de acceso de la base de datos de bold que representan los tres grupos estudiados.

ID MUESTRA (BOLD)	COMPLEJO	PAIS	LOCALIDAD	SITIO EXACTO	FECHA DE COLECTA
ZPLMX167	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Chihuahua	Km 44 Parral-Jiménez	04-Oct-2004
ZPLMX168	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Chihuahua	Km 44 Parral-Jiménez	05-Oct-2004
ZPLMX261	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX269	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Salvador Dgo Limnetica	03-Oct-2004
ZPLMX270	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Salvador Dgo Limnetica	03-Oct-2004
ZPLMX272	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Salvador Dgo Limnetica	03-Oct-2004
ZPLMX273	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Santa Teresita III A	03-Oct-2004
ZPLMX276	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Santa Teresita III A	03-Oct-2004
ZPLMX277	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Santa Teresita III A	03-Oct-2004
ZPLMX284	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX285	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX286	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX287	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX288	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Santa Teresita III A	03-Oct-2004
ZPLMX290	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Santa Teresita III A	03-Oct-2004
ZPLMX361	<i>Moina</i> cf. <i>micrura</i> 1	México	Durango	Salvador Dgo Limnetica	03-Oct-2004

ID MUESTRA (BOLD)	COMPLEJO	PAIS	LOCALIDAD	SITIO EXACTO	FECHA DE COLECTA
ZPLMX362	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Durango	Salvador Dgo Limnetica	03-Oct-2004
ZPLMX363	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Durango	Salvador Dgo Limnetica	03-Oct-2004
ZPLMX365	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Durango	Salvador Dgo Limnetica	03-Oct-2004
ZPLMX366	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Km 44 Parral-Jiménez	04-Oct-2004
ZPLMX367	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Km 44 Parral-Jiménez	04-Oct-2004
ZPLMX368	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Km 44 Parral-Jiménez	04-Oct-2004
ZPLMX369	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Km 44 Parral-Jiménez	04-Oct-2004
ZPLMX370	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Km 44 Parral-Jiménez	04-Oct-2004
ZPLMX371	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Km 44 Parral-Jiménez	04-Oct-2004
ZPLMX372	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX373	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX374	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX375	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX376	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX377	<i>Moina cf. micrura 1</i>	México	Chihuahua	Fin carretera Chihuahua B	04-Oct-2004
ZPLMX147	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	La Goleta	15-Jul-2005
ZPLMX153	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cuitzeo	18-Jul-2005
ZPLMX154	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cuitzeo	18-Jul-2005
ZPLMX188	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cerca Salamanca	18-Jul-2005
ZPLMX339	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	La Goleta	15-Jul-2005
ZPLMX340	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	La Goleta	15-Jul-2005
ZPLMX341	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	La Goleta	15-Jul-2005
ZPLMX342	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	La Goleta	15-Jul-2005
ZPLMX343	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cuitzeo	18-Jul-2005
ZPLMX344	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cuitzeo	18-Jul-2005
ZPLMX345	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cuitzeo	18-Jul-2005
ZPLMX346	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cuitzeo	18-Jul-2005
ZPLMX347	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cuitzeo	18-Jul-2005
ZPLMX348	<i>Moina cf. micrura 2</i>	México	Michoacán	Cuitzeo	18-Jul-2005

ID MUESTRA (BOLD)	COMPLEJO	PAIS	LOCALIDAD	SITIO EXACTO	FECHA DE COLECTA
ZMXII026	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Puebla	Valsequillo	23-May-2007
ZMXII050	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Puebla	Valsequillo	23-May-2007
HE-405	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Estado de México	Presa Ignacio Ramírez	22-Jun-2011
HE-406	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Estado de México	Presa Ignacio Ramírez	22-Jun-2011
HE-407	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Estado de México	Presa Ignacio Ramírez	22-Jun-2011
HE-405.1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Estado de México	Presa Ignacio Ramírez	22-Jun-2011
HE-406.1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Estado de México	Presa Ignacio Ramírez	22-Jun-2011
HE-407.1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Estado de México	Presa Ignacio Ramírez	22-Jun-2011
HE-619	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Estado de México	Presa Ignacio Ramírez, Litoral	22-Jun-2011
HE-619.1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	México	Estado de México	Presa Ignacio Ramírez, Litoral	22-Jun-2011
EES620	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES622	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES623	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES624	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES626	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES627	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES628	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES629	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES614	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013
EES615	<i>Moina micrura</i>	R. Checa	Ovčáry y Nové Dvory	Estanque Sadka	13-Ago-2013

Apéndice B. Diferencias morfológicas de las hembras partenogenéticas y efipiales de los complejos moina cf. *Micrura* 1, moina cf. *Micrura* 2 y moina *micrura* s. Str. Un signo de interrogación (?) Hace referencia a la información que falta.

Colectores	Manuel Elías, Tania Garfias, 2004	Elias-Gutierrez, Martha Valdez, 2005. Fernando Aguilar Vázquez, 2007 Elias-Gutierrez, Alma E. García-Morales & Sergio Cohuo-Duran, 2011	María Rosa Miracle
Caracteres	<i>Moina cf. micrura</i> 1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	<i>Moina micrura</i> s. str
Habito			
Tamaño (Long- Altura)	L: 0,65 - 0,85 mm A: 0,45 - 0,55 mm (A/L): 0,47-0,67 mm	L: 0,57 - 0,9 mm A: 0,3 - 0,55 mm (A/L): 0,52-0,71 mm	L: 0,44 - 0,76 mm A: 0,54 - 0,68 ?
Anténulas (A1) Superficie			
Gruesas, largas y casi cilíndricas.	+	+	Cortas y pequeñas
Longitud	133 - 150 micras	100 – 167 micras	70 -87 micras
En la cara anterior con dentículos (micro espinas)	Muy pronunciado	Poco pronunciados	Presentes
Seta sensorial en el medio	1/3 más abajo que arriba	2/3 más arriba que abajo	1/3 más abajo que arriba
9 estetascos unos más largos que otros	X	X	X
Basipodito Superficie			
Hileras transversales de espinas esclerotizadas,	Espinass fuertemente esclerotizadas y pelos poco pronunciados	Espinass débilmente esclerotizadas y pelos largos muy pronunciados	Espinass pequeñas y pelos ausentes

Colectores	Manuel Elías, Tania Garfias, 2004	Elias-Gutierrez, Martha Valdez, 2005. Fernando Aguilar Vázquez, 2007 Elias-Gutierrez, Alma E. García-Morales & Sergio Cohuo-Duran, 2011	María Rosa Miracle
Caracteres	<i>Moina cf. micrura</i> 1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	<i>Moina micrura</i> s. str
de tamaño irregular y pelos presente			
Longitud	212 – 240 micras	200 – 250 micras	125 – 150 micras
Numero de setas sensoriales (incluyendo la espina Distal)	4	4	3
Setas bifurcadas	3	3	2
Segmento Basal			
Numero de setas proximales	2	2	2
Longitud Seta proximal larga (SPL)	125 - 180 micras	150 – 240 micras	62,5 micras
/	/	/	/
Seta proximal corta (SPC)	80 - 120 micras	90 – 150 micras	32,5 micras
Proporción SPL respecto al basipodito	1,6 veces - 1,3 veces	1,3 veces – 1 vez	2 veces
/	/	/	/
SPC respecto al basipodito	2,6 veces - 2 veces	2,2 veces – 1,6 veces	3,9 veces
Espina distal	12 – 20 micras	Vista solo en SEM	Vista solo en SEM
Segmento Terminal			
Longitud seta distal larga (SDL)	115 - 160 micras	140 – 200 micras	?
Proporción SDL respecto al basipodito	1,8 -1,5 veces	1,4 – 1,2 veces	?

Colectores	Manuel Elías, Tania Garfias, 2004	Elias-Gutierrez, Martha Valdez, 2005. Fernando Aguilar Vázquez, 2007 Elias-Gutierrez, Alma E. García-Morales & Sergio Cohuo-Duran, 2011	María Rosa Miracle
Caracteres	<i>Moina cf. micrura</i> 1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	<i>Moina micrura</i> s. str
Espina distal corta	12 - 20 micras	Vista solo en SEM	Vista solo en SEM
Antenas natatorias (A2) Superficie			
Ramas de la A2 con hileras de espinas	Claras y organizadas	Diminutas y dispersas	Diminutas y organizadas además posee setas largas y finas
Ramas de la A2 Formula antenal			
Setas	0-0-1-3 / 1-1-3	0-0-1-3 / 1-1-3	0-0-1-3 / 1-1-3
Espinas	1-1-0-1 / 1-1-1	0-1-0-1 / 1-1-1	0-1-0-1 / 0-0-1
Valvas Margen ventral			
Número de grupos de espinas pequeñas	Rango de 8 – 13	Rango de 8 – 15	Rango de 7 – 10
Grupos incrementando ascendentemente	X	No guardan proporción, diferenciación poco clara de los grupos	X
Espinas formando una fila uniforme	Rango de 13 – 17	Rango de 10 – 20	Rango de 14 – 16
Esclerotizaciones de las valvas	Forma de cuadrícula y círculos de color amarillo	Forma rectangular y círculos de color amarillo	Forma poligonal fuertemente pronunciado
Toracópodo II			
Seta gruesa sobresaliendo del lado lateral de la base del exopodo	Presente	Presente	Ausente

Colectores	Manuel Elías, Tania Garfias, 2004	Elias-Gutierrez, Martha Valdez, 2005. Fernando Aguilar Vázquez, 2007 Elias-Gutierrez, Alma E. García-Morales & Sergio Cohuo-Duran, 2011	María Rosa Miracle
Caracteres	<i>Moina cf. micrura</i> 1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	<i>Moina micrura</i> s. str
Número de enditos presentes en la estructura	3	3	3
Número de setas posteriores (placa filtradora de la gnatobase)	Rango de 13 a 15	Rango de 8 a 13	Rango de 12 a 14
Toracópodo III			
Longitud exopodito grande y plano	120 – 130 micras	65 – 130 micras	52 – 62 micras
Gnatobase			
Numero de setas	40 a 45	35 a 45	28 a 29
Toracópodo IV			
Longitud exopodito pequeño y plano	50 – 80 micras	32 – 80 micras	37 – 45 micras
Gnatobase			
Numero de setas	30 a 35	14 a 30	22
Postabdomen Margen ventral			
Numero de dientes plumosos o triangulares	Rango de 7 a 9	Rango de 5 a 6	Rango de 4 a 5
Garra postabdominal			
Numero de espinas ventrales encima de la garra “Basaldorn”	Rango de 6 a 10	Rango de 5 a 6	Rango de 4 a 5
Pecten			
Numero de espinas delgadas	Ausente	Ausente	Rango de 5 a 8

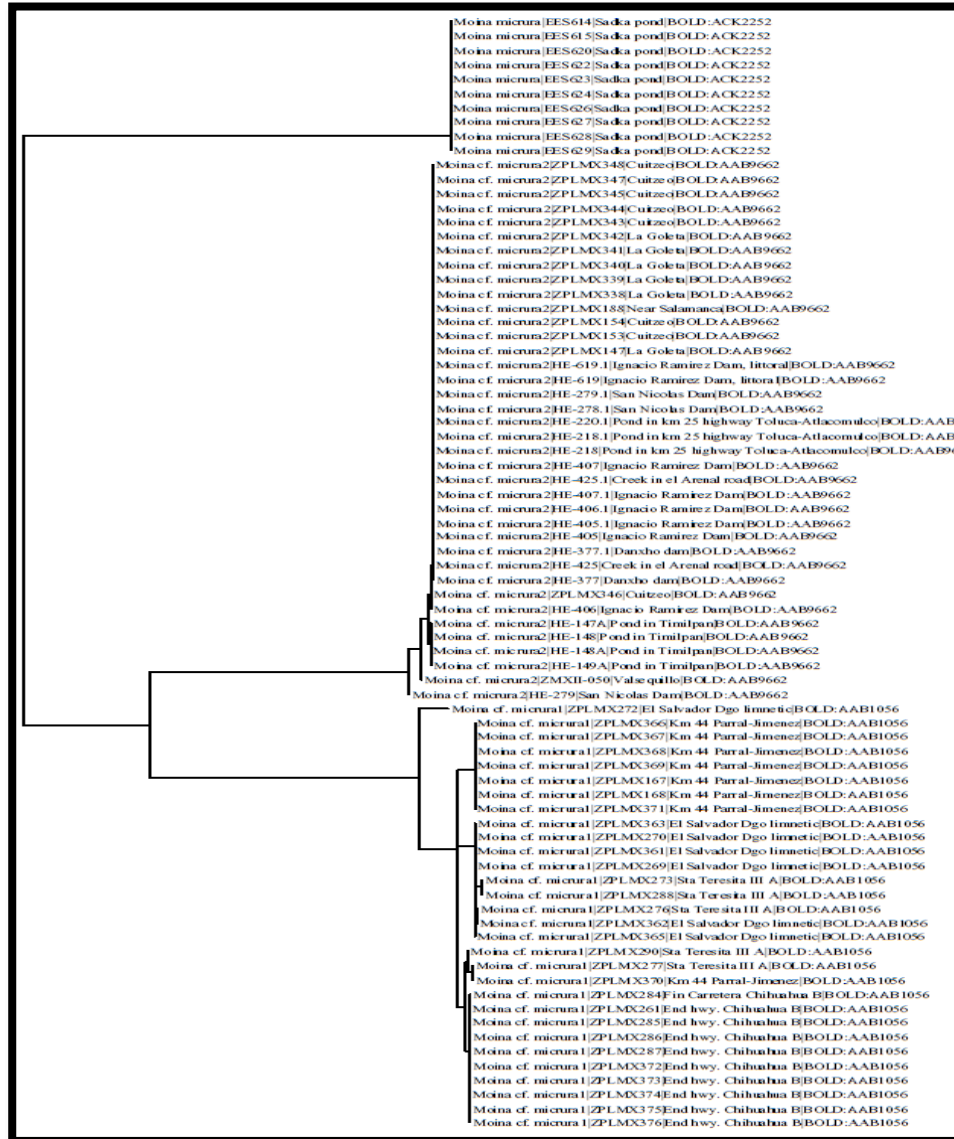
Colectores	Manuel Elías, Tania Garfias, 2004	Elias-Gutierrez, Martha Valdez, 2005. Fernando Aguilar Vázquez, 2007 Elias-Gutierrez, Alma E. García-Morales & Sergio Cohuo-Duran, 2011	María Rosa Miracle
Caracteres	<i>Moina cf. micrura</i> 1	<i>Moina cf. micrura</i> 2	<i>Moina micrura</i> s. str
en el pecten basal			
Numero de espinas gruesas y fuertes en el pecten medio	Ausente	Ausente	Rango de 8 a 12
Efipio			
Superficie ventral y dorsal	Patrón de células semi circulares de diferente tamaño aplanado.	Patrón de células semi circulares de diferente tamaño globoso.	Patrón marcado de células hexagonales reticuladas.

Apéndice C. Divergencias genéticas (k2p) en diferentes niveles taxonómicos para las especies moina cf. Micrura 1 y moina cf. Micrura 2. Secuencias seleccionadas para el análisis 70.

Espeziez	Divergencia	n	Taxa	Comparación	Min Dist (%)	Medi a Dist (%)	Max Dist (%)	Se (%)
<i>Moina cf. micrura 1</i>	Intraespecifica	31	1	465	0	0,36	1,81	0
<i>Moina cf. micrura 2</i>		39	1	741	0	0,06	0,22	0
<i>Moina cf. micrura 1</i>	Interespecifica	70	1	1209	9,3	10,27	10,71	0
<i>Moina cf. micrura 2</i>								

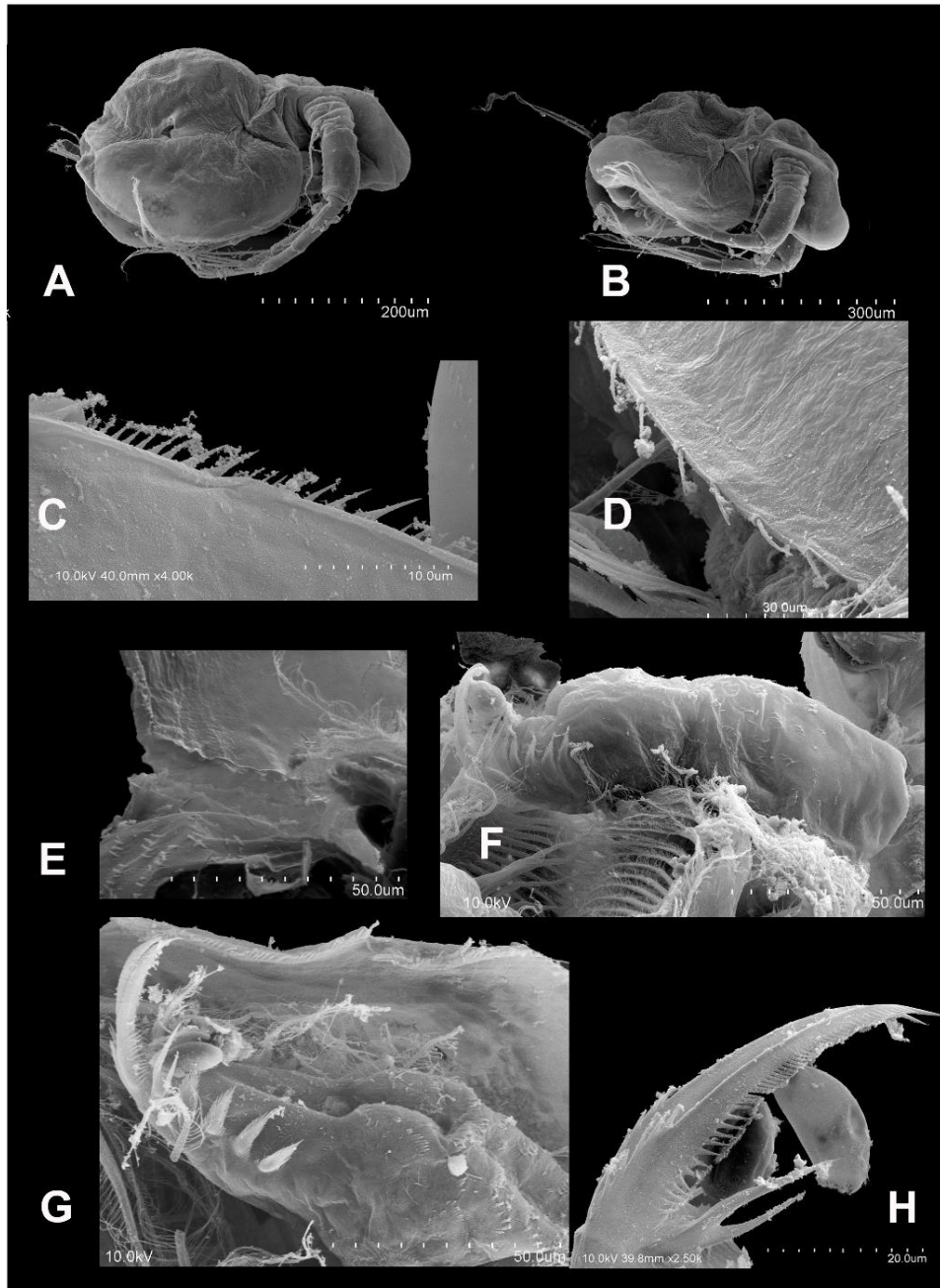
*El mínimo, la media (con el error estándar SE) y la máxima distancia de secuencias de COI entre parejas encontradas entre los individuos dentro de las especies, entre individuos pertenecientes a diferentes especies dentro de los géneros para las especies *Moina cf. micrura 1* y *Moina cf. micrura 2* de México

Apéndice E. Árbol vecino más cercano (id árbol) utilizando el modelo de distancias (k2p) del gen *coi*, de la especie *moina* cf. *Micrura* disponibles en bold. El primer grupo hace referencia a *moina micrura* s. Srt., el segundo grupo hace referencia a *moina* cf. *Micrura* 2 y el último grupo hace referencia a *moina* cf. *Micrura* 1

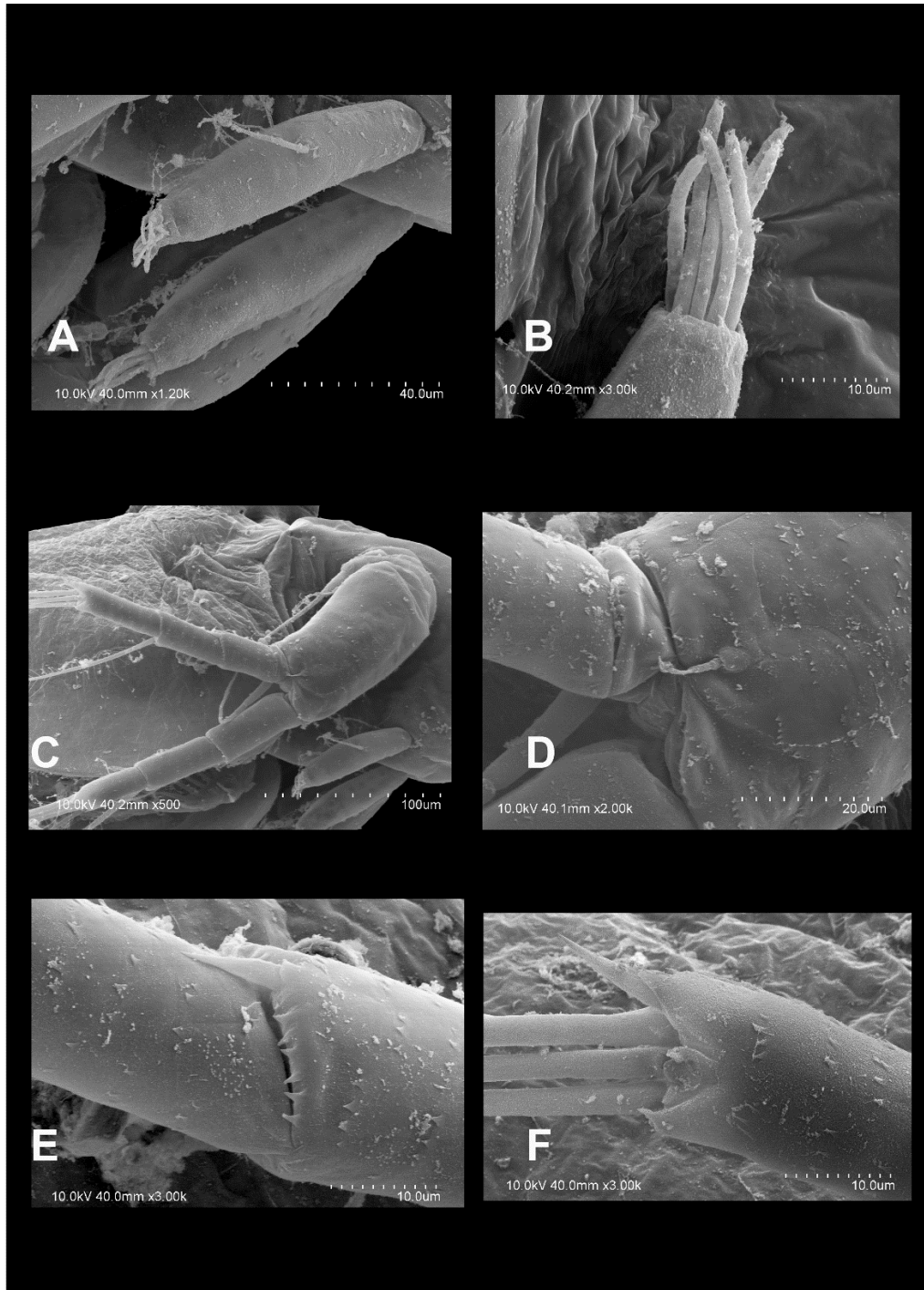


Láminas de microscopía electrónica de barrido de los caracteres diagnósticos de *Moina micrura* s. str. (Datos no publicados, prohibido reproducir).

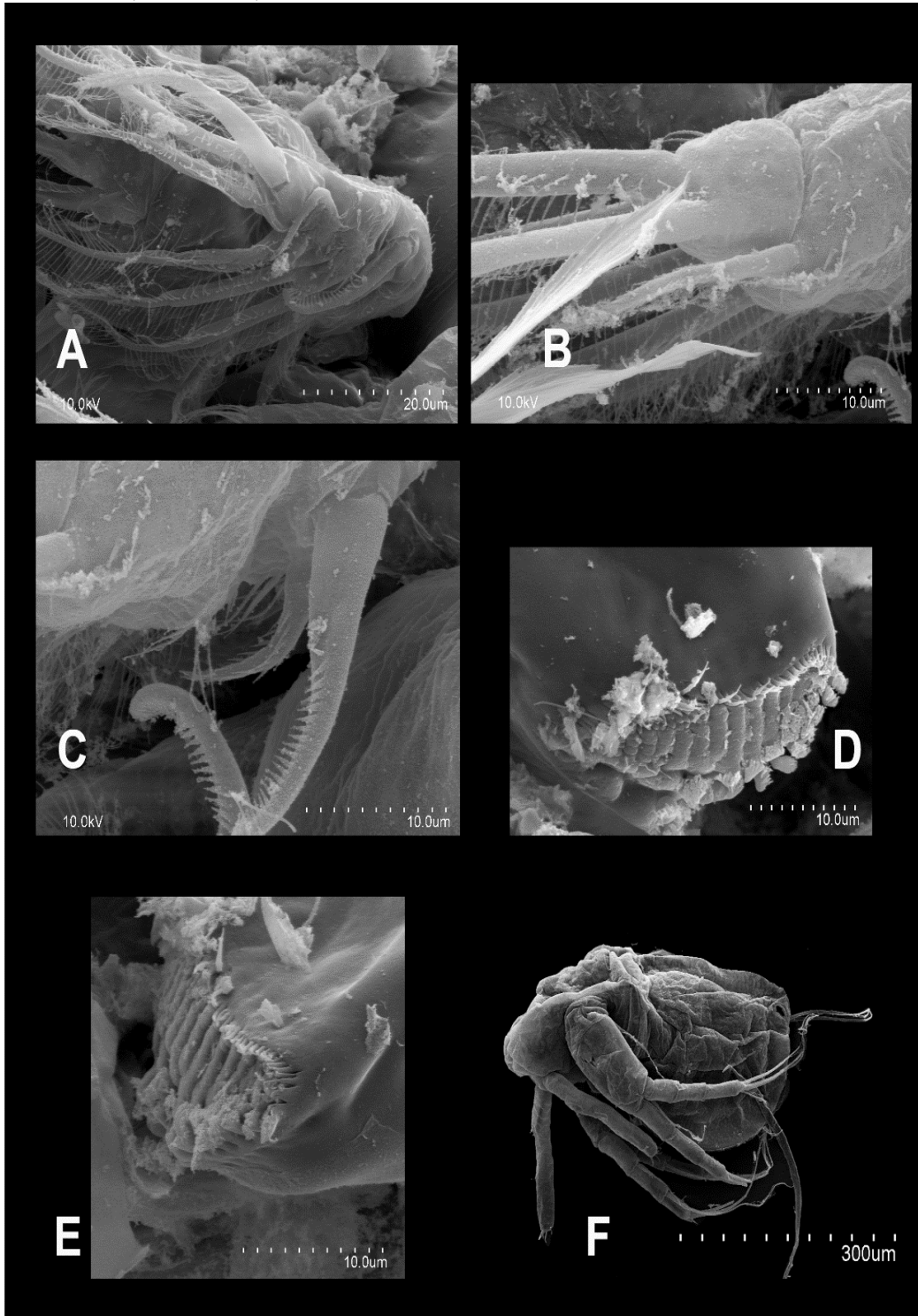
Lamina 1. *Moina micrura* s. str. Lago Sadka. Hembra partenogenética. A, B. Habito; C. Espinulación en grupos de la valva, margen posterior; D. Margen ventral de la valva; E. Parte dorsal interna del margen de la valva; F. Postabdomen, vista lateral; G. Postabdomen, vista ventrolateral; H. Garra y espina bifurcada.



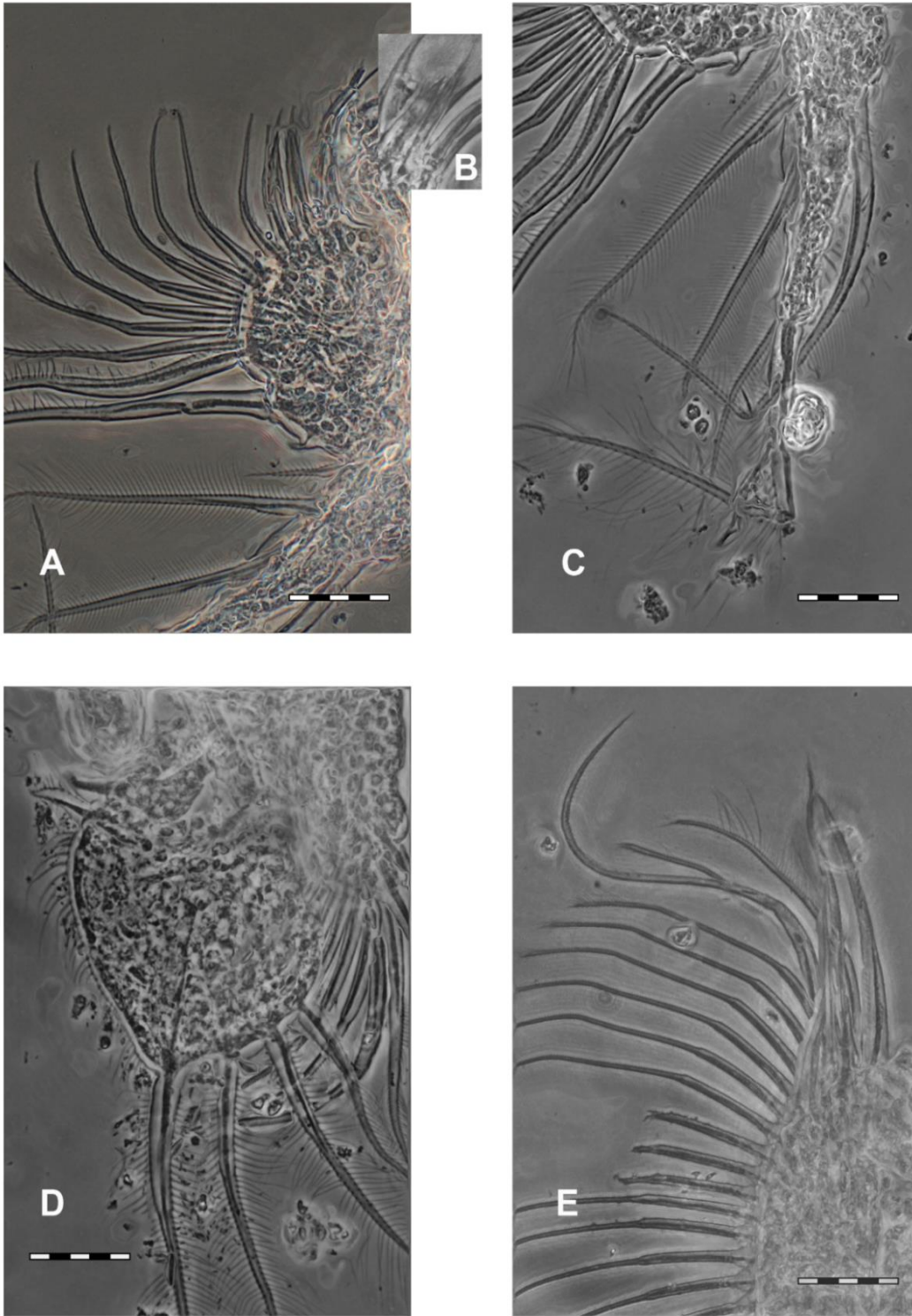
Lamina 2. *Moina micrura s. str.* Lago Sadka. Hembra partenogenética. A. Anténula, vista lateral; B. Punta de la anténula (A1) con estetascos; C. Antena II; D. Basipodito de la AII con seta distal; E. Espina en el primer segmento del endopodito; F. Espina y setas en la punta distal del tercer segmento del endopodito.



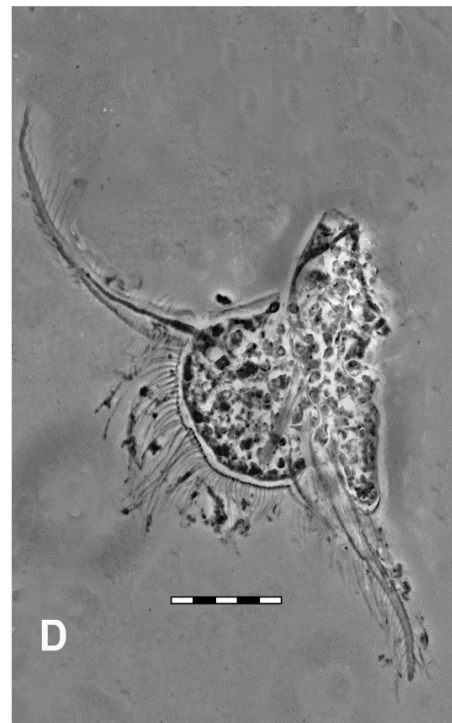
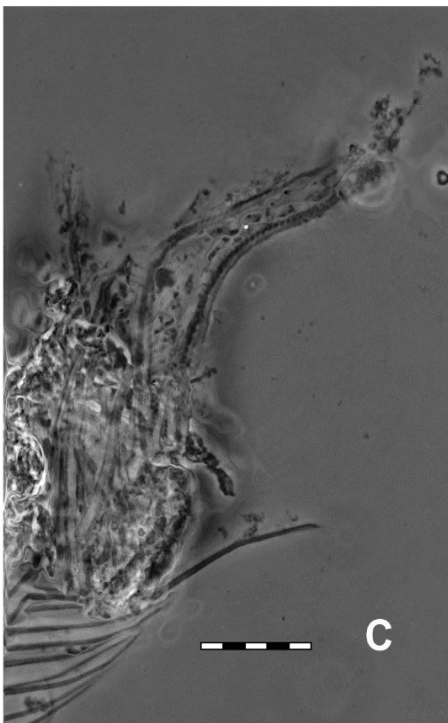
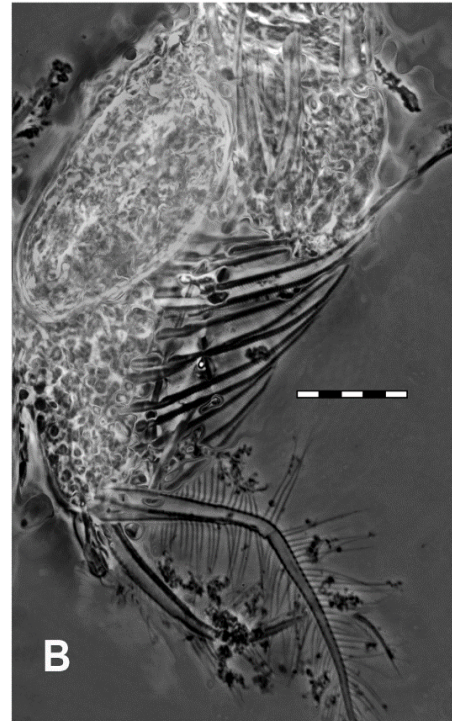
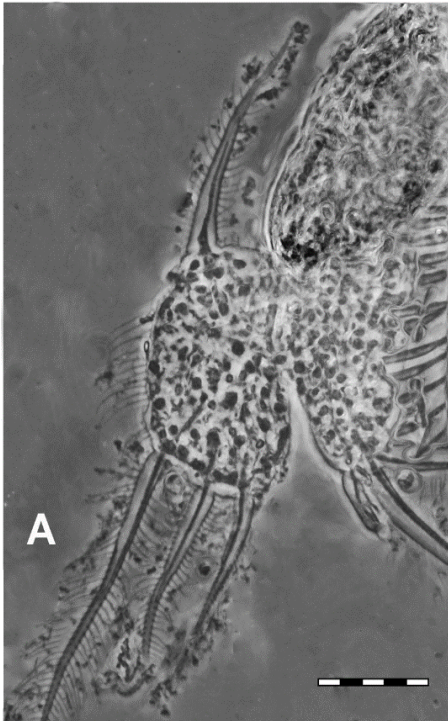
Lamina 3. *Moina micrura* s. str. Lago Sadka. Hembra partenogenética. A. Toracópodo I; B. Parte distal del endito 4; C. Toracópodo I, ganchos eyectores; D. Mandíbula izquierda; E. Mandíbula derecha; F. Macho, Habito.



Lamina 4. *Moina micrura* s. str. Lago Sadka. Hembra partenogenética. A. Toracópodo II; B. Detalles del toracópodo II (setas esquina basal); C. Toracópodo II, exopodito y seta bilateral; D. Toracópodo III, exopodito; E. Toracópodo III, parte distal interior.



Lamina 5. *Moina micrura* s. str. Lago Sadka. Hembra partenogenética. A. Toracópodo IV, exopodito; B. Toracópodo IV, parte distal interna; C. Toracópodo IV, parte de la gnatobase; D. Toracópodo V, exopodito.



Lamina 6. *Moina micrura* s. str. Lago Sadka. Hembra efipial. A. Hábito, efipio con un huevo. Superficie cubierta con patrón hexagonal.

