

Morfometría geométrica como herramienta para la identificación de morfotipos de *Brachionus plicatilis* en la laguna de Sontecomapan

Marcela Ivonne Benítez Díaz Mirón,¹ Gabriela Garza Mouriño, María Elena Castellanos Páez, Rubén Alonso Contreras Tapia y Venus Jiménez Castañeda

Resumen. *Brachionus plicatilis* ha contribuido al desarrollo exitoso de la larvicultura marina y salobre, sin embargo, por ser un complejo críptico los estudios sobre su ecología y distribución son de gran interés. En este trabajo, se determinó la presencia del complejo *B. plicatilis* en salinidades desde 0 hasta 26 en las zonas de influencia marina intermedia y baja, posteriormente se aislaron 3 morfotipos y se establecieron los cultivos monoclonales hasta alcanzar la fase exponencial. La evaluación biométrica se realizó con el analizador de imágenes Image Pro Plus. El análisis geométrico morfométrico se generó sobre 22 puntos de referencia con el software MorphoJ. Las tallas observadas para las cepas 1, 2 y 3 fueron: $185.3 \pm 22.2\mu\text{m}$, $191.7 \pm 17.1\mu\text{m}$ y $182.9 \pm 27.7\mu\text{m}$, respectivamente. El uso del análisis geométrico morfométrico permitió discriminar entre las cepas provenientes de baja salinidad y aquellas de mayor tolerancia, aun cuando el análisis biométrico no arrojó diferencias significativas en las variables estudiadas.

Palabras clave: Rotíferos; *Brachionus*; Especies crípticas; Morfometría geométrica.

Abstract. *Brachionus plicatilis* has contributed to the successful development of marine and brackish larviculture; however, because it is a cryptic complex, studies on its ecology and distribution are of great interest. In this work, the presence of the *B. plicatilis* complex was determined in salinities from 0 to 26, in the zones of intermediate and low marine influence, subsequently 3 morphotypes were isolated and monoclonal cultures were established until reaching the exponential phase. Biometric evaluation was performed with the Image Pro Plus image analyzer. The morphometric

¹ Laboratorio de Rotiferología y Biología Molecular de Plancton, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, e-mail: mbenitez@correo.xoc.uam.mx

geometric analysis was generated on 22 landmarks with the MorphoJ software. The sizes observed for strains 1, 2 and 3 were: $185.3 \pm 22.2\mu\text{m}$, $191.7 \pm 17.1\mu\text{m}$ and $182.9 \pm 27.7\mu\text{m}$ respectively. The use of morphometric geometric analysis allowed to discriminate between strains from low salinity and those with higher tolerance, even when the biometric analysis did not show significant differences in the variables studied.

Keywords: Rotifera; Brachionus; Cryptic species; Geometric morphometry.

INTRODUCCIÓN

Los rotíferos de la clase Monogononta son componentes muy importantes en los ecosistemas de agua dulce y salobre. Entre ellos se encuentra el complejo *Brachionus plicatilis*, el cual como fuente de alimento ha contribuido al desarrollo exitoso de la larvicultura marina y salobre (Pan *et al.*, 2022). Sin embargo, en algunas especies de peces cultivables, el tamaño de la boca de la larva es una fuerte limitante para su alimentación (e.g. 50 a 300 μm), sumado a la falta de desarrollo del sistema digestivo que impide la correcta asimilación del alimento formulado (Morales-Ventura *et al.*, 2004), factores que han motivado estudios sobre la ecología y distribución del complejo *B. plicatilis*, así como el efecto de las condiciones ambientales para mejorar sus cultivos y entender cómo los gradientes ambientales afectan la dinámica de sus poblaciones y su biogeografía (Lowe *et al.*, 2007).

El complejo *Brachionus plicatilis* durante mucho tiempo fue considerado como una especie cosmopolita, pero hoy en día se reconocen al menos 14 especies crípticas, con tres clados profundamente divergentes y morfológicamente diferentes (Ciros-Pérez *et al.*, 2001a; Ciro-Pérez *et al.*, 2001b; Gómez, 2005). La mayoría de estas especies han sido categorizadas de acuerdo con el análisis morfológico, biométrico y molecular de las cepas colectadas alrededor del mundo (Campillo *et al.*, 2005). Así, los análisis filogenéticos son la herramienta más adecuada para delimitación entre especies crípticas, entendiendo como tales, aquellos complejos formados por especies relacionadas filogenéticamente que han sido clasificadas como una sola especie nominal, debido a que morfológicamente son indistinguibles (Bickford *et al.*, 2007). El estudio de la forma en los rotíferos ha sido evaluado para determinar los cambios fenotípicos en la apariencia, causados por uno o varios mecanismos, incluyendo los polimorfismos inducidos por las condiciones físicas del medio [e. g. *Brachionus caudatus* (Araujo y Hagiwara, 2005; Athibai y Sanoamuang, 2008)]; los polimorfismos inducidos por la dieta [e. g. *Asplancha* (Gilbert, 1976)], los polimorfismos inducidos por el depredador [e. g. *Brachionus hava-*

naensis, *B. rubens*, *B. patulus*, *B. macracanthus* y *B. calyciflorus* (Nandini *et al.*, 2003)], los polimorfismos que eclosionan de los quistes y el enanismo en los machos (Wallace *et al.*, 2006). No obstante, la salinidad es uno de los factores que han sido identificados como factor clave en la especialización ecológica de algunas poblaciones (Campillo *et al.*, 2010), e incluso se ha demostrado la plasticidad fenotípica en respuesta a la salinidad (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012).

El objeto de esta investigación es aportar la caracterización morfométrica de los morfotipos del complejo *Brachionus plicatilis* presentes en la Laguna de Sontecomapan, en el estado de Veracruz, México, como información básica que permita la selección de cepas locales para su empleo masivo en la crianza de especies nativas o de importancia comercial. Se analiza la variabilidad morfológica de tres cepas del rotífero *Brachionus plicatilis* aisladas en diferentes salinidades, para identificar si existen cambios en la morfología de tres cepas cuando son cultivadas en una misma salinidad, y se proporciona información sobre el crecimiento poblacional en condiciones controladas de cultivo.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA, MÉTODOS Y TÉCNICAS

Área de estudio

Sontecomapan es una laguna costera de agua salobre de 932 hectáreas y con una profundidad media de 1.5 metros, ubicada entre el volcán San Martín Tuxtla y la serranía de Santa Marta (Vázquez *et al.*, 2004). La laguna y sus manglares conforman el sitio RAMSAR 1342, y se incluyen dentro de la zona de amortiguamiento de la Reserva de la Biósfera de los Tuxtlas, considerada por la CONABIO como zona prioritaria para la conservación en México. El clima en la porción que alberga a la laguna es de tipo Am(f), que se caracteriza por presentar un régimen de lluvias de verano con influencia de monzón. Su porcentaje de lluvia invernal es mayor a 10% (con respecto al total anual). Este subtipo cálido-húmedo es el predominante en la vertiente del Golfo de México, extendiéndose desde la costa hasta los 900 m de altitud (Soto, 2004).

Estrategia de muestreo

Las estaciones de muestreo fueron seleccionadas dependiendo de la influencia de los aportes de agua dulce y marinos de la siguiente manera: una estación con gran influen-

cia marina (La Boya), dos zonas de mezcla con aporte de agua dulce (La Palma, Río Basura), una zona de baja profundidad, en la orilla del manglar y sin aportes de agua (El Fraile), y en dos puntos centrales de la laguna (Costa Norte y Frente al Cocal); así mismo las épocas en que se realizaron los muestreos y que corresponden a las temporadas de lluvias y secas de los años 2017 y 2018.

Parámetros físicos y químicos

Las estaciones seleccionadas fueron geo-referenciadas con un GPS marca Garmin II (Tabla y figura 1), posteriormente se tomaron muestras de agua de los biotopos de superficie y de fondo. Se determinó para cada biotopo: el pH, con un potenciómetro de campo Centronics Modelo 49, de ± 0.01 de precisión; temperatura con un termómetro de mercurio de $50^\circ\text{C} \pm 0.1$ de precisión, oxígeno disuelto por el método de Winkler (Strickland y Parsons, 1972); la profundidad y la transparencia fueron determinadas con un disco de Secchi de 25 cm de diámetro.

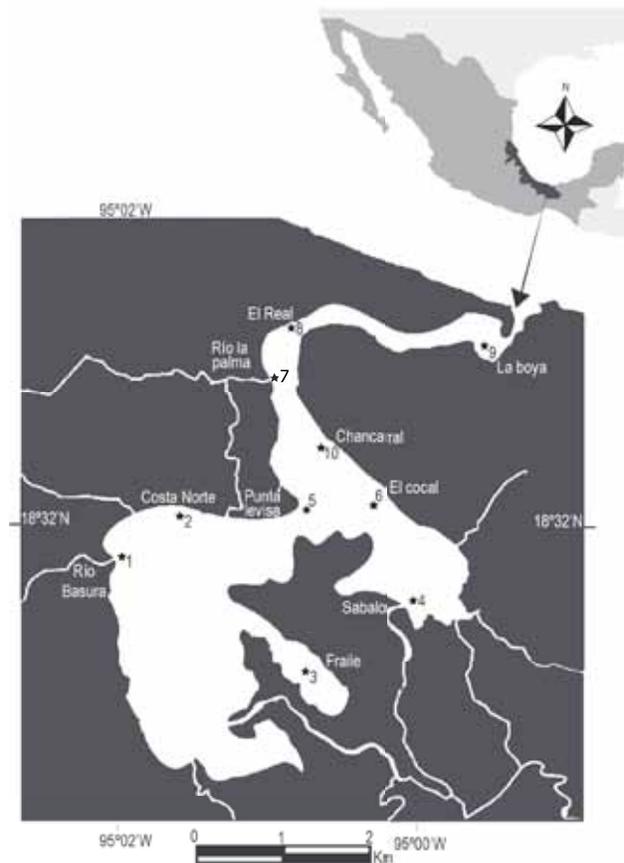
Tabla 1. Georreferenciación de las estaciones de muestreo en la laguna de Sontecomapan

No.	Estación	Localización	
1	Río Basura	N 18° 31'41.3"	W 95° 02'06.8"
2	Costa Norte	N 18° 32'04.9"	W 95° 01'20.7"
3	El Fraile	N 18° 30'51.7"	W 95° 00'39.5"
4	El Sábalo	N 18° 32'09.8"	W 95° 00'49.2"
5	Punta Levisa	N 18° 32'10.0"	W 95° 00'49.3"
6	El Cocal	N 18° 32'21.2"	W 95° 00'24.8."
7	La Palma	N 18° 32'55.2"	W 95° 01'02.1."
8	El Real	N 18° 33'19.3"	W 94° 00'51.7"
9	La Boya	N 18° 33'02.5"	W 94° 59'27.0"

Colecta de material biológico

La obtención de los especímenes para los análisis morfométricos se realizó bombeando 50 litros de agua con una bomba Whale (17 litros por minuto de potencia), por duplicado, posteriormente fueron filtradas a través de una luz de malla de 50 μm , las 2 muestras fueron fijadas y concentradas en frascos estériles de 30 ml con una solución de formol al 4% final. Con el fin de obtener individuos vivos para el establecimiento de cultivos clonales, se realizó un arrastre de 1 minuto a un nudo de velocidad, con una red para zooplancton de 60 μm de luz de malla, la muestra fue concentrada en un litro de agua y se mantuvo a temperatura ambiente hasta el momento del aislamiento.

Figura 1. Estaciones de muestreo dentro de la laguna de Sontecomapan



Aislamiento y cultivo

De las muestras de arrastre se separaron 4 hembras de 3 morfotipos (12 ejemplares), encontradas en las estaciones Costa Norte, el Fraile y el Cocal. Cada hembra fue colocada individualmente en 2 ml de agua de mar esterilizada (filtrada con sistema de jeringa Millex de 0.22 μm) y diluida con agua destilada a la salinidad en la que fueron encontrados. Los cultivos permanecieron a una temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Posteriormente fueron escalonados partiendo de una densidad inicial de 1 ind·ml⁻¹ hasta alcanzar una densidad de 50 ind·ml⁻¹, la duración del periodo de aclimatación fue de 10 días. Una vez que los cultivos se estabilizaron, fueron aclimatados a las condiciones de cultivo durante 20 días y cultivados por 30 días más. Los clones seleccionados fueron alimentados con un cultivo monoespecífico de la microalga *Chlorella marina* a una densidad de 2.77×10^6 cel·ml⁻¹; el medio de cultivo se cambió diariamente para mantener la concentración del alimento, a una salinidad de 6 y temperatura constante de 25°C (Castellanos-Páez *et al.*, 1999). Una vez que el cultivo alcanzó su fase exponencial, se fijaron los ejemplares con formol al 4% final y se realizaron los montajes semipermanentes para la obtención de las fotomicrografías.

Crecimiento poblacional

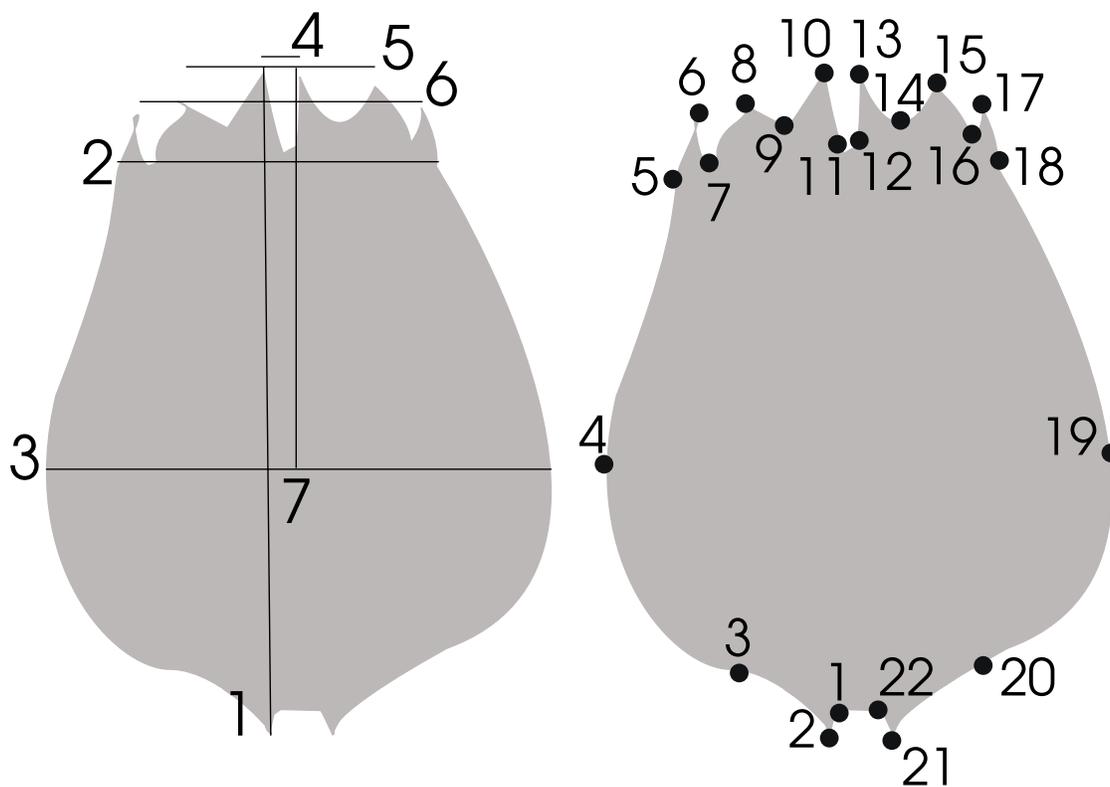
De los cultivos previamente aclimatados, fueron seleccionadas tres de las cepas aisladas y se colocaron 50 hembras juveniles de cada linaje de *Brachionus plicatilis* en frascos transparentes estériles con 50 ml de medio de cultivo, es decir, a una densidad inicial de 1 ind·ml⁻¹, con tres réplicas para cada linaje, 9 cultivos en total. Se mantuvieron en condiciones constantes de alimento (2.77×10^6 cel·ml⁻¹), temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), salinidad (6 ups), y fotoperiodo (12 O:12 L) durante 14 días. Diariamente se realizó el conteo total de 3 alícuotas de 1 ml de cada cultivo.

Caracterización morfométrica

Se separaron los ejemplares de cada uno de los morfotipos del complejo utilizando un microscopio estereoscópico Nikon SMZ 800. En el caso de las muestras de ambiente natural se aplicaron baños de formol para eliminar las impurezas adheridas. Posteriormente, se montaron permanentemente y se etiquetaron siguiendo las especificaciones establecidas

para la Colección de Rotíferos México. Las preparaciones permanentes para la evaluación morfométrica fueron analizadas con un microscopio óptico Olympus BX50, con el objetivo 10x, hasta lograr una magnificación de 100 veces el tamaño real de cada rotífero. Los ejemplares que reunieron las características para ser medidos fueron fotografiados con una cámara Magna FIRE de 5.1 megapíxeles en alta resolución; cada fotomicrografía fue almacenada con el código de la muestra de la que fue obtenida o con el código de la cepa correspondiente. La evaluación morfométrica de la lorica se realizó con un analizador de imágenes Image Pro Plus® Versión 4.5.1.22 de Media Cybernetics, y la calibración de píxeles con una regleta de calibración de 0.01mm Olympus en el microscopio óptico BX 50 de Olympus, con un objetivo plan acromático 10x. Las imágenes fueron analizadas de acuerdo con el protocolo de medición que se muestra en la figura 2.

Figura 2. (Izquierda). Protocolo de medición para la caracterización morfométrica con el software Image Pro Plus v 7.1. (Derecha). Protocolo de digitalización de puntos de referencia (*landmarks*) con el software tpsDig



Análisis geométrico morfométrico

De las fotografías obtenidas se seleccionaron 20 para cada cepa, considerando que todos los puntos de referencia fueran claramente visibles, y se generó un archivo de imagen en formato TPS con el programa tpsUtil (Rohlf, 2005c), versión 1.34, para cada una de las cepas; posteriormente, se digitalizaron 22 puntos de referencia (*landmarks*) en el programa tpsDig2 versión 2.04 (Rohlf, 2005a), tal como se muestra en la figura 2.

El análisis geométrico morfométrico se efectuó con el software MorphoJ (Klingenberg, 2011). Las configuraciones, definidas por los puntos de referencia, fueron trasladadas, giradas y estandarizadas a un valor centroide (raíz cuadrada de la suma de las varianzas de los puntos de referencia del centro de las coordenadas cartesianas X y Y), y alineadas a través de un análisis general de Procrusto (GPA) (Rohlf y Slice, 1990).

Para determinar la existencia de diferencias entre las formas y de explorar su importancia, se realizó un análisis de la deformación relativa (equivalente al análisis de componentes principales), sobre las configuraciones superpuestas (Rohlf, 2005b). Finalmente, para la visualización de las variaciones morfológicas en un espacio euclidiano como redes de deformación se empleó el software MorphoJ (Klingenberg, 2011).

RESULTADOS

Descripción del comportamiento de las variables ambientales

La laguna de Sontecomapan recibe aportes de agua dulce provenientes del continente, además de presentar una influencia permanente de la marea en las estaciones cercanas a la boca de comunicación con el mar. Así, dependiendo de la hora del día y de la temporada se puede encontrar gran variabilidad en la profundidad y en la salinidad de algunas estaciones; en la tabla 2 se muestran los valores promedio y el rango observado durante los muestreos. Debido a la estratificación durante la influencia diurna de las mareas y al volumen del caudal de agua dulce que ingresa a la laguna, pueden presentarse diferencias significativas entre biotopos, temporadas y estaciones de muestreo, sin embargo, se reportan los valores globales como indicadores de la distribución del complejo *B. plicatilis* en la laguna.

Tabla 2. Características físicas y químicas observadas en la laguna de Sontecomapan en dos temporadas de muestreo

Temporada	Sequía			Lluvia		
	Promedio	Min	Máx	Promedio	Min	Máx
Profundidad (cm)	103.7	35	205	134.5	61	220
Transparencia (cm)	73	31	115	78.4	45	120
Temperatura (°C)	27.7	23.4	31.2	26.7	21.8	30.3
Salinidad	15.5	2.0	36	11	0	27
pH	7.3	6.11	8.23	7.2	6.34	8.14
Oxígeno disuelto (mg.L ⁻¹)	6.1	2.23	8.81	7.22	2.3	8.0
Nitratos (mg.L ⁻¹)	0.4	0	1.7	0.9	0	2.0
Nitritos (mg.L ⁻¹)	0.011	0.001	0.054	0.008	0.001	0.015
Amonio (mg.L ⁻¹)	0.5	0.02	4.2	0.4	0.01	4.2

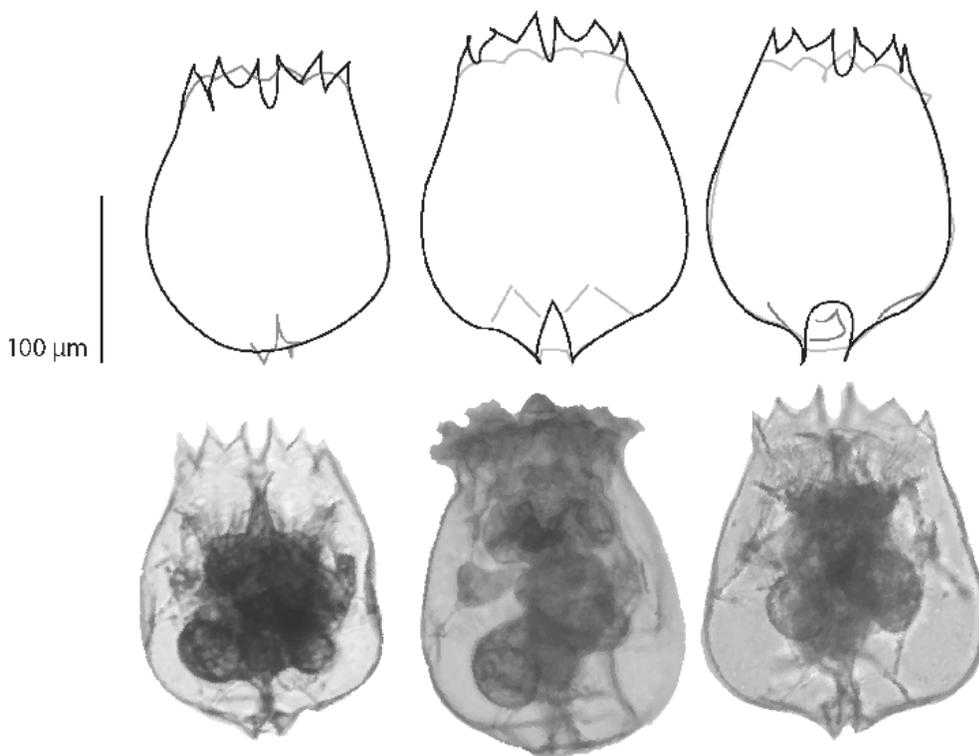
Distribución y abundancia de los morfotipos del complejo *Brachionus plicatilis*

Los ejemplares del complejo *Brachionus plicatilis* encontrados en la laguna se presentaron en un rango de salinidad de 0 a 25. En la temporada de sequía del 2017, se presentó la mayor densidad de rotíferos del complejo, alcanzando 64.66 ind·ml⁻¹, en la estación Frente al Cocal. Durante las temporadas de lluvias del 2017 y 2018 y de sequía del mismo año, se observaron densidades con un promedio menor a 2 ind·ml⁻¹ en las estaciones La Palma, Costa Norte y Río Basura. En todas las estaciones se encontraron coexistiendo cuando menos dos de los morfotipos estudiados. Se identificaron 6 morfotipos diferentes y se numeraron de forma consecutiva; los morfotipos 1, 2, 3 y 4 fueron colectados en el 2017, observando las siguientes densidades: 14.66, 7.33, 10.66 y 20.33 ind·ml⁻¹, respectivamente, mientras que los morfotipos 5 y 6, colectados en el 2018, alcanzaron densidades máximas de 12.66 y 20 ind·ml⁻¹. En general, las mayores abundancias fueron observadas en los morfotipos de mayor tamaño (1, 4 y 6), en las zonas de influencia marina intermedia y baja, predominantemente en el biotopo de superficie.

Descripción de los morfotipos del complejo *Brachionus plicatilis* cultivados en laboratorio y caracterización biométrica

La cepa 1 fue aislada de la estación el Cocal, con una influencia marina intermedia. Por su talla, y en lo que se refiere a las descripciones del complejo *Brachionus plicatilis*, es del tipo de *Brachionus rotundiformis*, de cuerpo blando, con tres pares de espinas antero-dorsales triangulares y puntiagudas, las espinas centrales son ligeramente más cortas que el resto (Figura 3). La lorica ventral presenta dos pares de lóbulos. La forma del quiste es arriñonada y no es expulsado de la hembra. En las condiciones de cultivo experimentadas, se observó durante todo el desarrollo la presencia de hembras cargando hasta 7 huevos de machos, por lo que se puede decir que es una cepa de reproducción predominantemente sexual.

Figura 3. Arriba: dibujos de línea con cámara lúcida de las cepas cultivadas. Izquierda, cepa 1. Centro, cepa 2. Derecha, cepa 3. Abajo: fotografías de las cepas cultivadas



La cepa 2, aislada de la estación Costa Norte, es muy similar a las descritas como *Brachionus plicatilis*, con lorica suave en forma de pera, lorica ventral y dorsal fusionadas. La lorica dorsal presenta tres pares de espinas triangulares, de tamaño similar, espinas medias de base ancha, lorica dorsal lobulada. Esta cepa presenta antenas siempre visibles y son de cuerpo transparente por lo que se puede observar fácilmente la musculatura. En condiciones de cultivo constantes a 25 °C no se observa la presencia de machos, por lo que se desconoce si expulsa los quistes o permanecen dentro de la madre. Es característico de esta cepa que al fijar los individuos, 80% de ellos no contrae la corona (Figura 3).

La cepa 3 corresponde al tipo *Brachionus plicatilis*, con lorica suave en forma de pera, lorica ventral y dorsal fusionadas, la lorica dorsal presenta tres pares de espinas triangulares de tamaño similar; la base de las espinas medias es amplia y terminan en punta, muy similares a las de la cepa 1, no obstante, se distingue de la cepa dos dado que la profundidad de las espinas centrales es mayor, la lorica dorsal presenta una mayor curvatura, por lo que las espinas laterales se aprecian mejor en el enfoque de la lorica ventral. La lorica ventral presenta dos lóbulos hacia los bordes externos que rebasan la apertura de la corona y dos lóbulos centrales terminados en punta. La cloaca en la placa dorsal tiene forma cuadrada y es muy amplia, en la placa ventral es de tipo triangular, tal como se aprecia en la figura 3. Esta cepa presentó crecimiento muy rápido a 25 °C, y no se observaron machos.

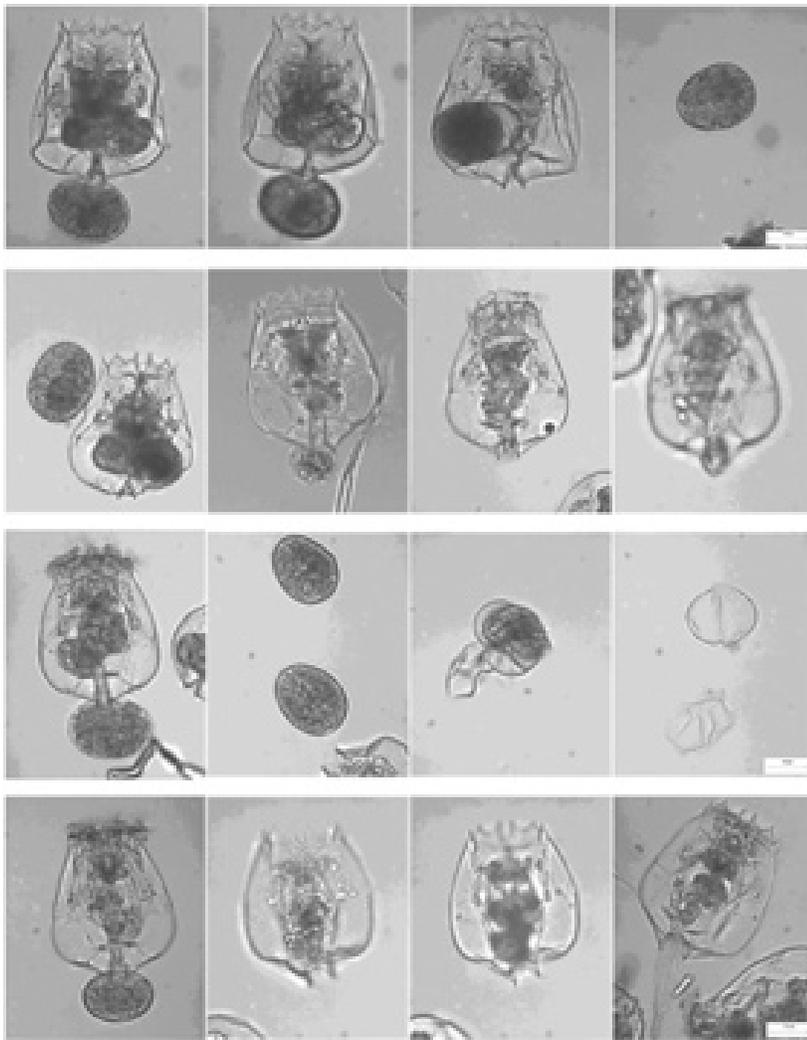
Las tres cepas presentaron una gran similitud en talla para todos los caracteres evaluados, tal como se aprecia en la Tabla 3. Las tallas observadas permiten clasificar las cepas de la laguna de Sontecomapan como pequeñas y medianas con respecto al rango de tallas a nivel mundial.

Tabla 3. Análisis biométrico para cada una de las cepas de *B. plicatilis*

Parámetro	Cepa 1 Promedio ± DE (µm)	Cepa 2 Promedio ± DE (µm)	Cepa 3 Promedio ± DE (µm)
1. Longitud de la lorica	185.3 ± 22.2	191.7 ± 17.1	182.9 ± 27.7
2. Ancho de la corona	94.7 ± 8.5	96.5 ± 9.6	95.5 ± 13.8
3. Ancho máximo	146.3 ± 18.2	150.5 ± 14.6	139.3 ± 21.6
4. Distancia entre espinas centrales	15.8 ± 2.4	16.3 ± 2.1	15.8 ± 2.5
5. Distancia entre espinas medias	57.7 ± 6.2	63.1 ± 4.9	59.6 ± 7.1
6. Distancia entre espinas laterales	89.21 ± 9.4	94.8 ± 7.0	88.6 ± 8.1
7. Longitud de espinas centrales hasta ancho máximo	129.6 ± 20.6	130.5 ± 13.7	119.7 ± 16.8

En la figura 4 se ilustran los individuos más comunes de las tres cepas cultivadas en laboratorio, sus quistes, sus huevos y patrón de ruptura, así como la apariencia general de las hembras ovígeras, con la corona contraída y expuesta.

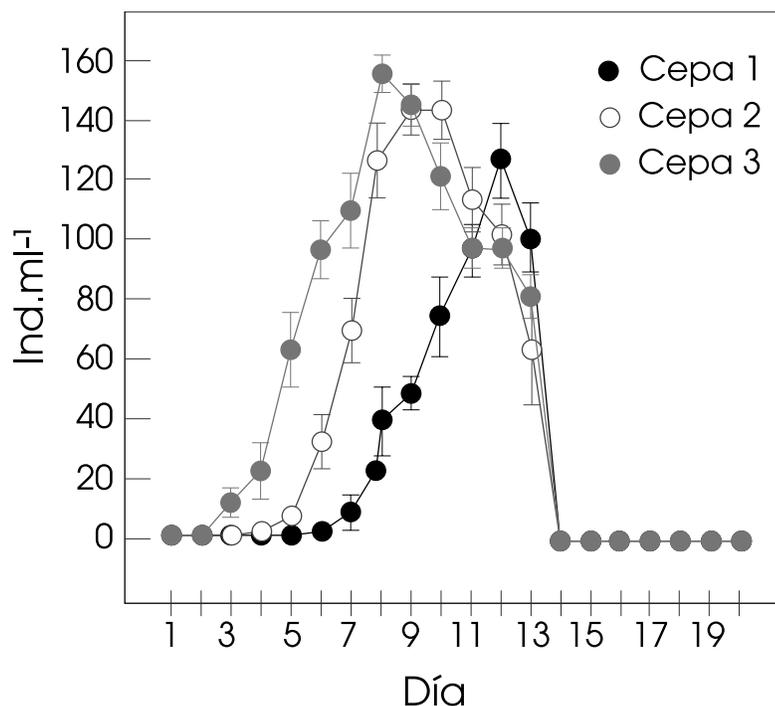
Figura 4. Mosaico comparativo de ejemplares representativos de cada una de las cepas. De arriba hacia abajo, primera hilera corresponde a cepa 1, hileras 2 y 3 corresponden a cepa 2, e hilera 4 corresponde a la cepa 3



Evaluación del crecimiento poblacional de tres cepas de *Brachionus plicatilis*

El crecimiento poblacional observado para cada una de las tres cepas aisladas y cultivadas en el laboratorio se ilustra en la figura 5; se aprecia que la cepa de más lento crecimiento fue la cepa 1, mientras que la de más rápido crecimiento fue la cepa 3. La cepa 1 inició el crecimiento exponencial hasta el séptimo día y presentó una mortalidad elevada de los juveniles inoculados, aun cuando habían sido aclimatados a las condiciones de cultivo; la cepa dos inició el crecimiento exponencial en el quinto día del cultivo, y la cepa tres logró la mayor densidad al iniciar el crecimiento exponencial desde el tercer día del cultivo.

Figura 5. Crecimiento poblacional de las tres cepas seleccionadas de *Brachionus plicatilis*

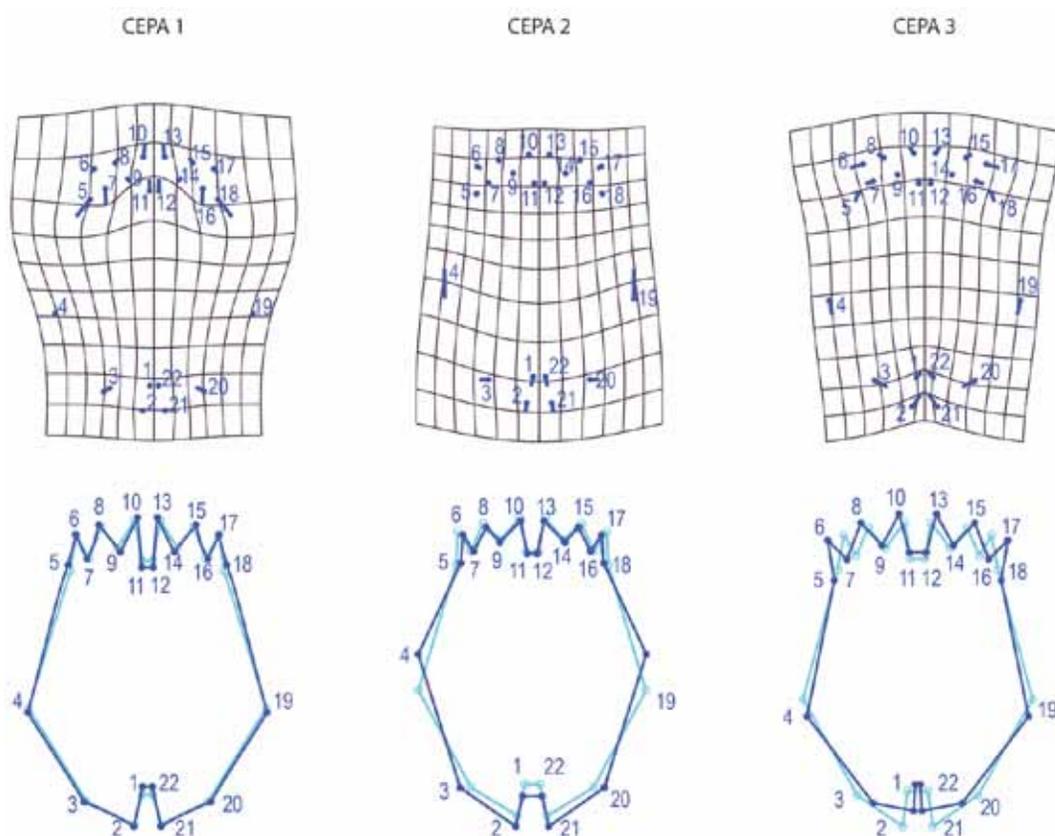


Las densidades máximas fueron alcanzadas a diferente velocidad por cada una de las cepas. La cepa 1 alcanzó su máxima densidad (130.56 ± 16.24 ind.ml⁻¹) hasta el doceavo día, mientras que las cepas 2 y 3 alcanzaron su máxima densidad en el noveno día (147.89 ± 10.74 y 159.56 ± 8.67 ind.ml⁻¹, respectivamente).

Análisis de las cepas con morfometría geométrica

Las mallas de transformación para cada una de las cepas, elaboradas a partir de las matrices de covarianza (Figura 6), muestran en forma de puntos la ubicación inicial para cada punto de referencia, así como pequeñas líneas asociadas a ellos, que representan la variabilidad observada para cada una de las coordenadas de los puntos de referencia. Así mismo, se muestran las diferencias entre la forma inicial y la forma objetivo, de acuerdo con el modelo generado por el análisis geométrico morfométrico a partir de las matrices de covarianza.

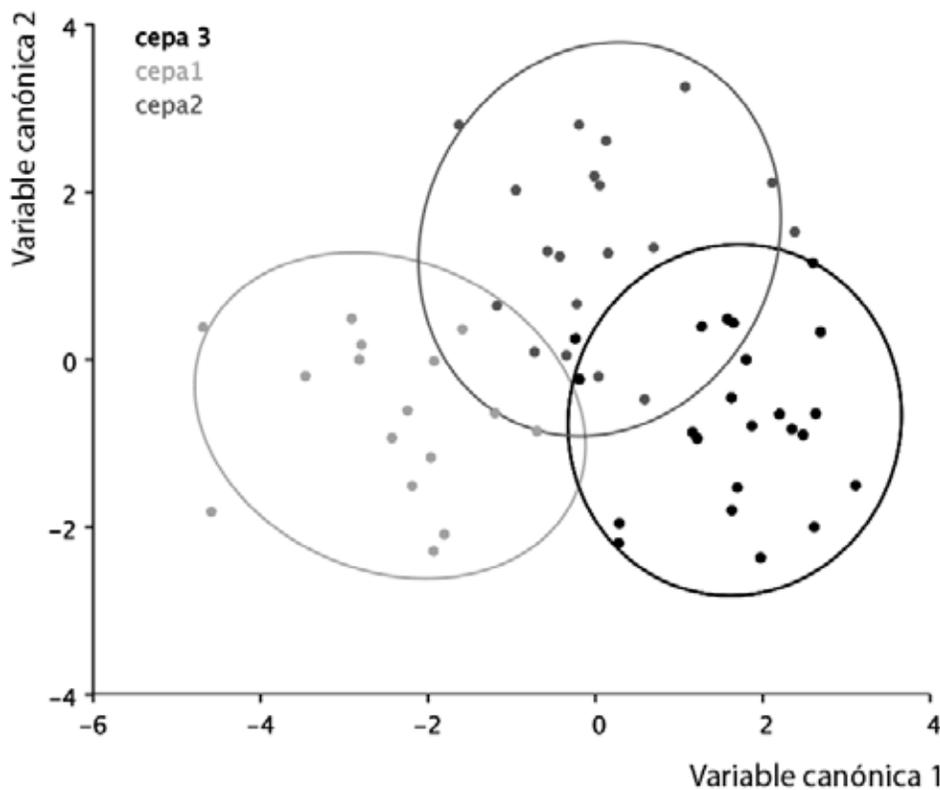
Figura 6. Arriba, mallas de transformación en donde las marcas en forma de paleta representan el punto de partida y la variabilidad para cada una de las coordenadas de referencia o landmark. Abajo, representación lineal entre las formas observadas y las formas esperadas calculadas en función de las matrices de covarianza



Las mallas de transformación y los puntos de referencia ilustrados en forma de paleta ponen en evidencia la variabilidad en la forma de cada una de las cepas, es así como se observa en la cepa 1 una mayor variabilidad en el tamaño de las espinas, mientras que en la cepa 2 la conformación de la lorica es más cambiante en cuanto a la posición del ancho máximo y la apertura de la cloaca, lo que sugiere la presencia de hembras en diferente estado de maduración reproductiva. Finalmente, las diferencias en la apertura de las espinas y en general en la conformación de la lorica es mucho más evidente en la cepa 3.

El análisis biométrico realizado no permite emplear de manera singular ninguno de los caracteres evaluados para separar los morfotipos, ya que se presentaron superposiciones de talla entre ellos (Tabla 3), sin embargo, cuando se realiza el análisis geométrico morfométrico, se hacen evidentes los cambios en la forma de la lorica, permitiendo la distinción entre cada una de las cepas cultivadas (Figura 7).

Figura 7. Análisis canónico de variables, muestra el resultado del análisis de la forma y la diferencia entre cepas con un intervalo de confianza de 95 %



Discusión

Las especies de rotíferos suelen estar irregularmente distribuidas espacial y temporalmente en su hábitat (Zhou *et al.*, 2009), por ello no sorprende que las densidades más altas del complejo se localizaran en la estación El Fraile, caracterizada por tener baja profundidad, mayor temperatura y ningún aporte de agua dulce; es un área semicerrada rodeada de mangle por lo que no tiene corrientes constantes que dispersen el zooplancton.

Entre los factores más estudiados para explicar la distribución espacial y estacional de los rotíferos, se encuentran las diferencias en la estructura de las comunidades de macrófitas, los recursos alimenticios, la depredación, la competencia y otras formas de interacciones biológicas, así como las interacciones particulares entre los factores físicos y químicos (Arora y Mehra, 2009). De éstos, la temperatura es la que tiene el efecto más profundo en el crecimiento poblacional de los rotíferos, ya que a temperaturas más elevadas, se incrementa la proporción de huevos por hembra y se reduce el tiempo que tardan en eclosionar (Sarma *et al.*, 2005). Por otra parte, el rango óptimo de temperatura para la mayoría de las especies de braquionidos es de 20 a 30 °C, considerando que la temperatura más baja en la laguna de Sontecomapan fue de 23.5 °C y la más alta de 31.2 °C, es posible encontrar poblaciones de rotíferos la mayor parte del año y aunque están expuestos a una gran variedad de cambios en su ambiente físico, químico y biótico, algunos de estos cambios pueden ser menores y la población puede ajustarse por aclimatación, migración vertical o modificando su comportamiento (Walczyńska y Sobczyk, 2022). Sin embargo, cuando los cambios ambientales son más severos, promueven la selección natural actuando como fuerzas modeladoras de la historia evolutiva de las especies estudiadas, impactando en la estructura ecológica y genética de las poblaciones (Deng *et al.*, 2022). En este contexto, el desafío para la ecología sigue siendo entender cuáles son los factores que hacen posible la coexistencia de especies similares, del mismo modo cuáles de ellos afectan en la organización de las comunidades y en la biodiversidad (Ciros-Pérez *et al.*, 2004).

El complejo *Brachionus plicatilis* se presenta alrededor del mundo en gran variedad de tallas, que van de 106.19 a 342.5 μm de largo, y de 85.96 a 245 μm de ancho, con una proporción largo/ancho de 0.94 a 2.06 (Suatoni *et al.*, 2006), característica que determina su elegibilidad como alimento inicial de gran cantidad de especies de peces y crustáceos (Romero-Romero y Yúfera, 2012). Es bien reconocido que, como especie críptica, las diferencias fenotípicas pueden ser escasas, sin embargo, cuando se requiere implementar un cultivo masivo, la sobreposición de tallas resulta de particular importancia cuando las diferencias entre cepas se refieren al potencial productivo, debido a esto se debe realizar la caracterización completa cuando se aíslan cepas de ambiente natural.

Antes de que se considerara como complejo de especies crípticas, se determinó el rango de salinidad óptima para la reproducción asexual entre 10 y 25 (Lubzens, 1987), sin embargo, el efecto directo de la salinidad en las tasas reproductivas depende del genotipo, el cual está adaptado a un rango óptimo de salinidad. En este trabajo, las cepas fueron aisladas de una zona de baja influencia marina, por lo que se cultivaron en la misma salinidad en la que se colectaron. No obstante, la cepa 1 presentó reproducción bisexual, es decir, su crecimiento poblacional fue generado tanto por hembras mícticas como amícticas, observando así, la presencia de machos, de quistes y de hembras partenogénicas. El desarrollo de reproducción sexual, bajo las condiciones ofrecidas, implica que dicha cepa no debe ser cultivada en estas condiciones cuando se requieren grandes cantidades de rotíferos como alimento vivo, ya que el número de quistes producidos por una hembra (1-8) es significativamente más pequeño que el número de huevos partenogénicos (18-23) producidos asexualmente, además de que los quistes no eclosionan inmediatamente, lo que resulta en una menor producción de rotíferos (Lubzens *et al.*, 2001). Los patrones mícticos, como el observado en la cepa 1, son frecuentes en las poblaciones de campo como un mecanismo de adaptación para sobrevivir en hábitats muy variables (Snell, 2011). No obstante, esta cepa podría emplearse para la producción masiva de quistes para la preservación por largos periodos o para iniciar cultivos masivos. La cepa 3 fue la que alcanzó la mayor densidad ($159 \text{ ind} \cdot \text{ml}^{-1}$), por lo que las condiciones ambientales y de alimentación en las que se mantuvieron los cultivos pueden ser empleadas para la producción de biomasa para su uso como alimento vivo.

En busca de proveer cultivos de rotíferos a un costo razonable para alimentar a las larvas de peces y crustáceos, es importante producir suficiente biomasa de rotíferos, reducir el costo de producción, mejorar la estabilidad de los cultivos y cultivar la cepa del tamaño adecuado para la especie que se desee alimentar.

La selección de cepas es importante para la práctica del cultivo masivo, pues los rotíferos tienen características específicas en tamaño y crecimiento poblacional y es probable que la resistencia al estrés, durante los cultivos masivos o durante los procesos de conservación, sea diferente entre cada cepa. Si se considera que dichas características son de gran importancia en larvicultura, es importante el desarrollo de técnicas que permitan identificar entre las especies que forman el complejo *Brachionus plicatilis*. Sin embargo, los métodos moleculares siguen estando fuera del alcance de las prácticas acuícolas en México. En este contexto, fue que se propuso el análisis morfométrico en combinación con la evaluación del crecimiento poblacional para seleccionar y caracterizar las cepas con potencial productivo.

Conclusiones

Los morfotipos encontrados en la laguna de Sontecomapan pueden ser clasificados como medianos y pequeños, con respecto al resto de las cepas caracterizadas alrededor del mundo. Debido a su mayor sensibilidad a la variación de la forma, el método de morfometría geométrica es una herramienta poderosa que brinda resultados más claros que las mediciones convencionales para caracterizar las cepas, cuyos datos biométricos se sobrepone. La evaluación del crecimiento poblacional resultó una herramienta efectiva para la selección de cepas, ya que al ser cultivadas bajo las mismas condiciones fue posible observar procesos de reproducción sexual en la cepa 1, que remarcó las diferencias en cuanto a su tolerancia a las condiciones ecológicas de las que fue aislada. Las cepas 2 y 3 alcanzaron su pico de densidad máxima en el noveno día de cultivo, siendo de $147.89 \pm 10.74 \text{ ind}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $159.56 \pm 8.6 \text{ ind}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, mientras que la cepa 1 alcanzó su densidad máxima ($130.56 \pm 16.24 \text{ ind}\cdot\text{ml}^{-1}$) hasta el doceavo día de cultivo. Por lo tanto, la cepa 1 se recomienda para la producción y conservación de quistes y se sugiere determinar las condiciones óptimas para evitar la reproducción sexual y lograr cultivos masivos exitosos. La cepa 3 se recomienda para la producción de biomasa, dada su mayor velocidad de desarrollo y reproducción predominantemente asexual.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara-Rodríguez, J. A., Ciros-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Serrania-Soto, C., Piedra-Ibarra, E. (2012). "Local adaptation in populations of a *Brachionus* group *plicatilis* cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico", *Freshwater Biology*, 4(57): 728-740.
- Araujo, A., Hagiwara, A. (2005). "Screening methods for improving rotifer culture quality", *Hydrobiologia*, 1-3(546): 553-558.
- Arora, J., Mehra, N. K. (2009). "Seasonal dynamics of zooplankton in a shallow eutrophic, man-made hyposaline lake in Delhi (India): role of environmental factors", *Hydrobiologia*, 1(626): 27-40.
- Athibai, S., Sanoamuang, L. O. (2008). "Effect of temperature on fecundity, life span and morphology of long- and short-spined clones of *Brachionus caudatus* f. *apsteini* (Rotifera)", *International Review of Hydrobiology*, 6(93): 690-699.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Meier, P. K., R., Winker, K., Ingram, K. K., Das, I. (2007). "Cryptic species as a window on diversity and conservation", *Trends Ecol Evol*, 3(22): 148-155.

- Campillo, S., E. García-Roger, M. J. Carmona, Serra, M. (2010). "Local adaptation in rotifer populations", *Evolutionary Ecology*, 4(25): 933-947.
- Campillo, S., García-Roger, E. M., Martínez-Torres, D., Serra, M. (2005). "Morphological stasis of two species belonging to the L-morphotype in the *Brachionus plicatilis* species complex", *Hydrobiologia*, 1(546): 181-187.
- Castellanos-Páez, M. E., Garza-Mourino, G., Marañon-Herrera, S. (1999). "Aislamiento, caracterización, biología y cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (OF Muller)". En *Libros de Texto*. México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
- Ciros-Pérez, J., Carmona, M. J., Lapesa S., Serra, M. (2004). "Predation as a factor mediating resource competition among rotifer sibling species", *Limnol. Oceanogr*, 1(48): 40-50.
- Ciros-Pérez, J., Carmona, M. J., Serra, M. (2001^a). "Resource competition between sympatric sibling rotifer species", *Limnol. Oceanogr*, 6(46): 1511-1523.
- Ciros-Pérez, J., Gómez, A., Serra, M. (2001b). "On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp.", *Journal of Plankton Research*, 12(23): 1311-1328.
- Deng, Z., Yang, W., Blair, D., Hu W., Yin, M. (2022). "Diversity of *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera) in inland saline waters from China: Presence of a new mitochondrial clade on the Tibetan Plateau", *Molecular phylogenetics and evolution*, (171): 107457.
- Gilbert, J. J. (1976). "Selective cannibalism in the rotifer *Asplanchna sieboldi*: contact recognition of morphotype and clone", *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 9(73): 3233-3237.
- Gómez, A. (2005). "Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation", *Hydrobiologia*, (546): 83-89.
- Klingenberg, C. P. (2011). "MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics", *Mol Ecol Resour*, 2(11): 353-357.
- Lowe, C., Kemp, S., Díaz-Avalos, C., Montagnes, D. (2007). "How does salinity tolerance influence the distributions of *Brachionus plicatilis* sibling species?", *Marine Biology*, 3(150): 377-386.
- Lubzens, E. (1987). "Raising rotifers for use in aquaculture", *Hydrobiologia*, (147): 245-255.
- Lubzens, E., Zmora, O., Barr, Y. (2001). "Biotechnology and aquaculture of rotifers", *Hydrobiologia*, (446/447): 337-353.
- Morales-Ventura, J., Nandini, S., Sarma, S. S. S. (2004). "Functional responses during the early larval stages of the charal fish *Chirostoma riojai* (Pisces: Atherinidae) fed rotifers and cladocerans", *J. Appl. Ichthyol*, (20): 417-421.

- Nandini, S., Pérez-Chávez, R., Sarma, S. S. S. (2003). "The effect of prey morphology on the feeding behaviour and population growth of the predatory rotifer *Asplanchna sieboldi*: a case study using five species of *Brachionus* (Rotifera)", *Freshwater Biology*, 12(48): 2131-2140.
- Pan, Y., Dahms, H., Hwang, J., Souissi, S. (2022). "Recent trends in live feeds for marine larviculture: a mini review", *Frontiers in Marine Science*, 9(1-9).
- Rohlf, F. J. (2005a). "Tps Dig, version 2.04", *Ecology and Evolution*, SUNY at Stony Brook.
- Rohlf, F. J. (2005b). "Tps Relative warps version 1.42", *Ecology and Evolution*, SUNY at Stony Brook.
- Rohlf, F. J. (2005c). "Tps utility program version 1.33", *Ecology and Evolution*, SUNY at Stony Brook.
- Rohlf, F. J., Slice, D. (1990). "Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks", *Systematic Zoology*, 1(39): 40-59.
- Romero-Romero, S., Yúfera, M. (2012). "Contribution of gut content to the nutritional value of *Brachionus plicatilis* used as prey in larviculture", *Aquaculture*, 364-365): 124-129.
- Sarma, S. S. S., Gulati, R. D., Nandini, S. (2005). "Factors Affecting Egg-ratio in Planktonic Rotifers", *Hydrobiologia*, 1(546): 361-373.
- Snell, T. W. (2011). "A review of the molecular mechanisms of monogonont rotifer reproduction", *Hydrobiologia*, 1(662): 89-97.
- Soto, M. (2004). "El clima". En *Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra* (195-199). Xalapa: Instituto de Ecología, A. C., Unión Europea.
- Strickland, J. D. H., Parsons, T. R. (1972). "A practical handbook of seawater analysis", *Fish. Res. Bd. Can.*, (167): 1-311.
- Suatoni, E., Vicario, S., Rice, S., Snell, T., Caccone, A. (2006). "An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: the rotifer *Brachionus plicatilis*", *Molecular phylogenetics and evolution*, 1(41): 86-98.
- Vázquez, G., Díaz-Pardo, E., Gutiérrez-Hernández, A., Doadrio, I. de Sostoa, A. (2004). "Los ríos y los lagos", En *Los Tuxtlas. El Paisaje de la Sierra* (211-229). Xalapa: Instituto de Ecología, A. C., Unión Europea.
- Walczyńska, A., Sobczyk, M. (2022). "Experimental Evolution Shows Body Size Decrease in Response to Hypoxia, with a Complex Effect on Plastic Size Response to Temperature", *The Biological Bulletin*, 243(2): 272-281.
- Wallace, R. L., Snell, T. W., Ricci, C., Nogrady, T. (2006). "Rotifera: biology, ecology and systematics". En *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*, Kenobi Productions, 299.