



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas
Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva
Programa de doctorado de Biodiversidad y Biología Evolutiva

ECOLOGÍA Y EVOLUCIÓN DE LA REPRODUCCIÓN SEXUAL EN POBLACIONES DE *BRACHIONUS PLICATILIS*

NOHEMI DIMAS FLORES

TESIS DOCTORAL

Marzo 2023



Director: Dr. Jorge Ciroso Pérez
Tutor: Dr. Antonio Camacho González



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Programa de doctorado de *Biodiversidad y Biología Evolutiva*

Ecología y evolución de la reproducción

sexual en poblaciones de *Brachionus*

plicatilis

Nohemi Dimas Flores

2023

Director: Dr. Jorge Ciros Pérez

Tutor: Dr. Antonio Camacho González

Tesis titulada Ecología y evolución de la reproducción sexual en poblaciones de *Brachionus plicatilis*, presentada por NOHEMI DIMAS FLORES para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia.

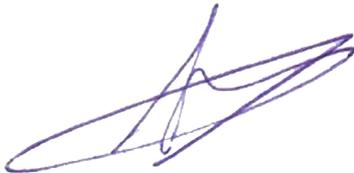
Tesis dirigida por el Dr. Jorge Ciros Pérez, profesor titular de la carrera de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y bajo tutela del Dr. Antonio Camacho González, catedrático del departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nohemi Dimas Flores', with a large, stylized flourish at the end.

Fdo.: Nohemi Dimas Flores

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jorge Ciros Pérez', with a large, stylized flourish at the end.

Fdo.: Dr. Jorge Ciros Pérez

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Antonio Camacho González', with a large, stylized flourish at the end.

Fdo.: Dr. Antonio Camacho González

Financiamiento.

Este trabajo fue financiado con subvenciones del Ministerio de Educación y Ciencia de España (CGL2006-07267, CGL2006-27069-E/BOS, CGL2007-29830-E/BOS); una subvención de la National Science Foundation de Estados Unidos de América (NSF 0412674) y cofinanciado en parte con fondos FEDER, Unión Europea (CGL2015 65422-P). Nohemi Dimas Flores contó con el apoyo de una beca doctoral (171031) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México.

*Para Juanita y Miguel
por creer siempre en mí,
por motivar mi triunfo*

Agradecimientos

El trabajo experimental de esta tesis lo realicé en el Laboratorio de Ecología Evolutiva del Institut Cavanilles Biodiversitat i Biologia Evolutiva, gracias por permitirme hacerlo en sus instalaciones y bajo su supervisión académica. Es difícil hacer un listado de las personas que contribuyeron de alguna manera en las tareas necesarias para el desarrollo de este trabajo de tesis, desde el financiamiento y el espacio físico de trabajo, hasta los que dedicaron horas al trabajo físico y a la revisión de los textos que conforman los capítulos de este trabajo. Gracias, a todos ustedes, mi respeto y profundo agradecimiento.

 Mi gente cercana sabe lo que significa y ha significado este proyecto, sin su amistad y sin su amor esto no sería posible. Su compañía y apoyo ha sido lo más importante para mí. En mi mente y mi corazón crecen cada día.

 Jorge y Toni, mi agradecimiento eterno por su paciencia y apoyo.

"We do not even in the least know the final cause of sexuality; why new beings should be produced by the union of the two sexual elements, instead of by a process of parthenogenesis. The whole subject is as yet hidden in darkness..."

Charles Darwin, 1862

Ecología y evolución de la reproducción sexual en poblaciones de *Brachionus plicatilis*

CONTENIDO

	Pag.
Resumen	1
Capítulo 1	9
Introducción general	
Capítulo 2	39
Material y Metodologías generales	
Capítulo 3	47
Selección de una baja inversión sexual en un rotífero partenogenético cíclico	
Capítulo 4	71
Evidenciando el costo de la reproducción sexual en el rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	
Capítulo 5	91
¿La diversidad genética reduce la competencia?	
Capítulo 6	115
Discusión general y conclusiones	
Referencias	139

Listado de figuras y tablas

Figuras

Figura 1.1. Los organismos asexuales tienen una doble ventaja demográfica, pueden producir el doble de descendientes (hembras) que los organismos sexuales (modificada de Gibson *et al.*, 2017).

Figura 1.2. Ciclo de vida generalizado de los rotíferos monogonotes. La respuesta al estímulo inductor (proteína inductora de la reproducción sexual, MIP) puede ser negativa y el ciclo asexual partenogenético se mantiene. Si el estímulo inductor es lo suficientemente alto, las descendientes se considerarán sexuales. Si estas hembras no son fertilizadas darán origen a huevos de machos. Los machos podrán fecundar a las hembras jóvenes, quienes tendrán embriones diapáusicos. Los huevos diapáusicos necesitan de un estímulo inductor, ambiental, para salir de la dormancia (modificado de Ciro-Pérez, 2001).

Figura 3.1. Distribución de frecuencias de la densidad poblacional durante la aparición del primer macho en clones aislados de Poza Sur en 15 muestreos a lo largo de un período de crecimiento planctónico. Se indica el número de clones (n).

Figura 3.2. Densidad poblacional en la aparición del primer macho durante el período de estudio (del 29 de septiembre de 2006 al 20 de abril de 2007). Los valores son promedios entre clones; las barras de error son \pm SE.

Figura 3.3. Heredabilidad en sentido amplio (H^2) durante el período de estudio (29 de septiembre de 2006 al 20 de abril de 2007).

Figura 4.1. Diagrama del experimento de tabla de vida. La cohorte inicial (generación F_0 = 45 hembras) se originó a partir de huevos diapáusicos provenientes de diez cuerpos de agua salobres españoles. Las hembras F_0 se mantuvieron en condiciones de jardín común. Sus descendientes (generación F_1) se transfirieron diariamente a una placa multipocillos y se les permitió proliferar asexualmente, estas fueron clasificadas como sexuales o asexuales dependiendo del tipo de descendencia (generación F_2).

Figura 4.2. Correlaciones entre los rasgos de la historia de vida estimados a partir de una cohorte de 45 hembras madre del rotífero *B. plicatilis*, provenientes de diez cuerpos de agua españoles. Los círculos negros son los

datos de la descendencia total; los círculos blancos corresponden solo a datos para descendientes asexuales.

Figura 4.3. Supervivencia y fecundidad de 45 hembras genéticamente diversas de *B. plicatilis*, de diez cuerpos de agua españoles. La supervivencia individual está ordenada, la más corta se observa en la parte superior, la más larga en la parte inferior. La escala de grises está asociada a una mayor o menor fecundidad.

Figura 5.1. A. Diseño de los contenedores experimentales divididos en dos partes iguales por una malla Nytal de 30 μm . B. Cultivos de *B. plicatilis* en el diseño experimental utilizado: (1) la misma población monoclonal (MC) en ambos lados del recipiente; (2) una población MC en un lado y una población policlonal (PC) en el otro; y (3) una población PC en ambos lados.

Figura 5.2. Dinámica poblacional (hembras ml-1) de ocho clones de *B. plicatilis* creciendo en cultivos monoclonales (*i. e.*, MC(MC)).

Figura 5.3. Análisis de componentes principales (ACP) de los parámetros de la dinámica poblacional de rotíferos correspondientes a las poblaciones experimentales MC(MC) y MC(PC). A. Localización de los clones en el espacio, definida por los componentes principales uno (CP1; 34,2 % de la varianza explicada) y dos (CP2; 27,6 % de la varianza explicada) (MC = círculos negros; MC creciendo junto a un PC = círculos blancos). B. Pesos factoriales de las variables en los ejes del ACP. r = tasa intrínseca de crecimiento, K = capacidad de carga, RS = tasa de mixis integrada para el período de crecimiento completo, RSe = tasa de mixis integrada para el período exponencial de crecimiento, D = producción total de huevos diapáusicos, D/HS producción de huevos diapáusicos por hembra sexual

Tablas

Tabla 1.1. Ubicación geográfica de los cuerpos de agua de donde provinieron los clones utilizados, según Google Earth. Se indica el tipo de muestra de donde se extrajeron los organismos y/o huevos diapáusicos. Se indican los autores que registraron la presencia de *B. plicatilis*: a) Gómez *et al.*, 1995; b) Gómez *et al.*, 2002; c) Ortells *et al.*, 2000; d) García-Roger *et al.*, 2006a; y e) Montero-Pau *et al.*, 2017.

Tabla 1.2. Características generales de los cuerpos de agua estudiados. Se indica la fuente bibliográfica de donde se obtuvo la información: a) Cirujano *et al.*, 1988; b) Fernández *et al.*, 1990; c) Gómez, 1996; d) Moreno & Quintana, 1997; e) Alonso, 1998; f) Millán *et al.*, 2001; g) Rodrigo *et al.*,

2002; h) García-Roger *et al.* (2006); i) Franch-Gras *et al.*, 2018. El área está delimitada por la zona húmeda, según el BOE-A-2019-2841, a menos que se indique otra fuente.

Tabla 3.1. ANOVA anidado de las densidades (log hembras L^{-1}) en las que apareció el primer macho.

Tabla 3.2. ANOVA anidado de la densidad en la aparición del primer macho (log-hembras L^{-1}) y tipo de clon (SBD = sexo en baja densidad, SAD = sexo en alta densidad) como efecto principal.

Tabla 4.1. Media y error estándar de los rasgos de historia de vida (RHV) de una cohorte de 45 hembras de *B. plicatilis* provenientes de huevos diapáusicos de diez cuerpos de agua salobres españoles. Estos RHV se calcularon agrupando los valores individuales de cada hembra.

Tabla 4.2. Análisis de MLG de los efectos en el número de descendientes producidos por una cohorte de 45 hembras madre de *B. plicatilis*.

Tabla 5.1. Media y error estándar de los parámetros obtenidos de la dinámica poblacional de *B. plicatilis* en cuatro condiciones experimentales. Tratamiento monoclonal MC(MC), $n = 8$; tratamiento monoclonal/policlonal MC(PC), $n = 8$; tratamiento policlonal/monoclonal PC(MC), $n = 8$; y tratamiento policlonal PC(PC), $n = 4$.

Tabla 5.2. ANOVAs de una y dos vías sobre los parámetros de la dinámica poblacional de *B. plicatilis*. En los ANOVAs de dos vías, el tratamiento es un factor fijo con dos niveles: MC(MC) (*i. e.*, cultivo monoclonal) y MC(PC) (*i. e.*, cultivo monoclonal que crece junto con un cultivo policlonal), y clon es un efecto aleatorio con ocho niveles. ^a las pruebas son matemáticamente dependientes.

Tabla 5.3. Heredabilidad en sentido amplio (H^2) y pruebas t de cada parámetro poblacional estimado. Las pruebas t fueron realizadas sobre la media global de todos los cultivos monoclonales (MC; $n = 16$) y policlonales (PC; $n = 12$).

Resumen

Esta tesis aborda un tema básico de la biología, la reproducción sexual, rasgo que es crucial en la ecología de las poblaciones y en la evolución de las especies que incluyen el sexo en su ciclo de vida. Sin embargo, es paradójico que sea el tipo de reproducción más extendido entre los eucariontes, presente en el 99.9 % de estos, ya que tiene asociados múltiples costos inmediatos, lo que, teóricamente, la hacen una estrategia desventajosa desde el punto de vista de la eficiencia biológica. La importancia del sexo en un ciclo de vida se puede abordar ya sea estudiando sus costos o sus beneficios. Si se toman en cuenta los costos, estos deben implicar una reducción en la eficiencia de los organismos, y si se consideran los beneficios, se deben buscar ventajas adaptativas que superen los costos en los que se incurre. La investigación sobre el mantenimiento de la reproducción sexual se ha abordado desde diferentes aproximaciones, tanto en el campo de la ecología como en el de la biología molecular utilizando estudios teóricos y empíricos. Entre las explicaciones de la importancia adaptativa del sexo más importantes se reconocen dos grandes grupos, las hipótesis mutacionales y las hipótesis ecológicas.

Esta tesis se basa en la investigación de los procesos ecológicos y poblacionales que se relacionan con el mantenimiento evolutivo del sexo en un partenogenético cíclico, que combina la reproducción asexual y sexual en un mismo ciclo de vida. Las especies con este ciclo de vida no se escapan del costo del sexo, a pesar de que supuestamente aprovechan lo mejor de ambos modos reproductivos, *i. e.*, a través de la partenogénesis

obtienen una reproducción rápida, mientras que, a través del sexo, la ventaja evolutiva de la recombinación y la producción de estructuras diapáusicas. El marco teórico y la relevancia del proyecto se detallan en el Capítulo 1.

El rotífero monogononte (Rotifera: Monogononta) *Brachionus plicatilis* tiene un ciclo de vida partenogenético cíclico, en el que una hembra partenogenética puede tener descendientes con características asexuales o sexuales. Además, un determinado genotipo puede tener diferente proporción de descendencia sexual (tasa de mixis), la cual ha sido considerada como una medida de la inversión sexual. También se sabe que el inicio de ciclo sexual es inducido principalmente por un factor denso-dependiente (la proteína inductora de la mixis) que puede variar con el tiempo en la población, y que está relacionada con respuestas desde tempranas hasta tardías (propensión sexual), además, también se considera como una medida de su inversión sexual y, por lo tanto, como una aproximación del costo del sexo. Entonces, el análisis de hembras individuales, o de genotipos creciendo clonalmente, hacen que las mediciones de los niveles de sexualidad puedan ser contrastados simultáneamente con los de la asexualidad. La variación en la inversión sexual en estos rotíferos tiene consecuencias directas en las dinámicas del crecimiento clonal, dado que, una vez que una hembra que ingresa al grupo de hembras sexuales ya no contribuye al crecimiento clonal porque producirá machos o, si es fertilizada, producirá huevos diapáusicos. Por lo tanto, la reproducción sexual en poblaciones de rotíferos monogonontes representa un compromiso entre el crecimiento poblacional actual y la

supervivencia a largo plazo, a través de la producción de huevos diapáusicos.

Así, el objetivo general de esta tesis fue la caracterización del costo que supone la existencia de diferentes niveles de propensión y tasas de mixis, y el análisis de algunas consecuencias de dicha variabilidad en el ciclo de vida del partenogénico cíclico *B. plicatilis*. Para ello se realizaron estudios de campo y experimentales, de tal forma que se diseñaron tres objetivos particulares que se abordaron a detalle en sendos capítulos (Capítulos 3-5). Además las metodologías generales y procedimientos comunes se detallan en el Capítulo 2.

En el Capítulo 3, se presenta la investigación que condujo a resolver el primer objetivo particular, en el que se parte del supuesto de que el costo del sexo opera a lo largo de la temporada de crecimiento planctónico anual (objetivo 1). Así que, se analizó la variabilidad heredable en la propensión sexual en una población de *B. plicatilis* que habita Poza Sur, un ambiente temporal en la región mediterránea española. Para alcanzar el objetivo, se realizaron 15 colectas de rotíferos durante una temporada planctónica completa. De las muestras colectadas, se estimó la tasa de mixis y la densidad de la población natural. También, se extrajeron miles de hembras para estimar en laboratorio su propensión sexual, *i. e.*, la densidad de los clones cuando apareció el primer macho. Se asumió que las hembras tienen una alta propensión al sexo cuando en el cultivo aparece el primer macho a una densidad clonal baja. Los resultados demostraron que existe una variabilidad heredable en el rasgo, y que hubo una selección de clones con una baja propensión a la reproducción sexual, los cuales incrementaron

en frecuencia durante el periodo de actividad planctónica. Lo anterior se explica por las ventajas a corto plazo de su propensión sexual baja ya que tuvieron mayor eficiencia al seguir reproduciéndose partenogénicamente hasta hacerse más frecuentes, demostrando una evasión del costo del sexo. Estos resultados demuestran la inestabilidad inherente del ciclo de vida partenogénico cíclico, donde es probable que ocurra la pérdida de la sexualidad debido a sus costos altos a corto plazo. Sin embargo, dada la vinculación de la reproducción sexual y la diapausa, un clon que no puede responder al estímulo del inicio de la reproducción sexual, estaría condenado a la extinción, ya que no podría generar huevos diapáusicos, que son la única manera de supervivencia a largo plazo en ambientes con cambios ambientales interanuales importantes.

En el Capítulo 4, se evaluaron la variabilidad de la inversión sexual y su relación con los rasgos de la historia de vida en una población de hembras genéticamente distintas (objetivo 2). En este capítulo se asume que las hembras de rotífero que tienen diferente proporción de descendencia sexual (tasa de mixis de las hembras) son equivalentes en el resto de sus rasgos de historia de vida. Por lo tanto, bajo la suposición de *todo lo demás es igual*, los genotipos femeninos que invierten más en hijas sexuales durante la temporada de crecimiento planctónico tendrían tasas más lentas de crecimiento clonal. Por lo que, se analizó si esos genotipos compensan su tasa de mixis mayor con una fecundidad y/o una supervivencia mayor. Se estudiaron 45 genotipos (clones) de *B. plicatilis* establecidos a partir de huevos de diapausa aislados del sedimento de diez cuerpos de agua salobres españoles. Utilizando un experimento de tabla de vida, se estimó la tasa de mixis en estos genotipos, y se evaluaron varios

rasgos, como la esperanza de vida, éxito reproductivo de por vida, tiempo de generación y la tasa intrínseca de crecimiento. Los resultados mostraron que hay una falta de correlación entre la tasa de mixis y cualquier otro rasgo. Ni la fecundidad, ni la supervivencia compensaron la mayor inversión en hijas sexuales, por lo tanto, se concluye que la suposición de *todo lo demás es igual* es cierta, confirmando que el sexo es costoso en *B. plicatilis*. Además, se encontró una correlación negativa entre la tasa de mixis y el éxito reproductivo calculado para la descendencia asexual, dejando también en evidencia el costo de producir hijas sexuales.

Así, tanto una propensión en inducción temprana (Capítulo 3) como una tasa de mixis alta (Capítulo 4) son rasgos que representan un costo elevado del sexo. Ambos rasgos se ajustan al compromiso planteado sobre la inversión sexual en *B. plicatilis* en el corto plazo, los cuales provocan una reducción en las tasas de crecimiento planctónico. Además, se encontró un efecto de la edad, de modo que, una mayor inversión en sexo ocurre a edades más tempranas (Capítulo 4), lo cual, también, representaría un freno a la proliferación asexual de esos genotipos, al menos en condiciones ideales de laboratorio. Entonces, invertir poco en hijas sexuales, tener una propensión sexual baja y comenzar su reproducción en edades tardías proporcionarían ventajas para la reproducción partenogenética.

En el Capítulo 5, se analiza la hipótesis de que cualquier ventaja intrínseca del sexo asociada a la generación de diversificación podría reforzar el mantenimiento de la reproducción sexual a corto plazo (objetivo 3). Se ha considerado que la variación fenotípica en el uso diferencial de los recursos generaría una reducción en la competencia intraespecífica en

poblaciones genéticamente diversas si se comparan con poblaciones genéticamente uniformes. Para probar esta hipótesis, se compararon poblaciones experimentales policlonales vs. monoclonales del rotífero *B. plicatilis* creciendo por separado y en competencia. De las diferentes poblaciones se extrajeron muestras diarias para estimar las dinámicas poblacionales y calcular los siguientes componentes de eficiencia: tasa intrínseca de crecimiento; capacidad de carga; tasa de mixis poblacional; producción de huevos diapáusicos por hembra sexual y la producción total de huevos. Las dinámicas poblacionales de ambos tipos de cultivos fueron muy similares, resultados que demuestran que no hubo una disminución de la competencia intraespecífica, ni un aumento en la eficiencia promedio por un uso diferencial de recursos. Así, es probable que *B. plicatilis* sea generalista en el uso de recursos y que, esta condición esté correlacionada con el rango amplio de ambientes en los que habita la especie. Entre los resultados destaca la existencia de una correlación negativa entre la capacidad de carga y la tasa de mixis de la población durante la fase de crecimiento exponencial, lo cual pone en evidencia el costo del sexo durante el crecimiento. De acuerdo con esto, es de esperarse que, en una población donde se invierta más en hembras sexuales, se vea comprometida la densidad poblacional que se puede alcanzar.

Entonces, en esta tesis se presenta evidencia de que no existe una compensación cuando se invierte más en sexo en *B. plicatilis*, por lo que, se discutió la importancia de la vinculación de la reproducción sexual con la función ecológica de la diapausa, como una explicación alternativa para el mantenimiento del sexo a largo plazo que, además, está ligado con la generación de diversidad genética, que se verá representada en el banco de

huevos de resistencia, por lo que la diapausa representa una ventaja intrínseca del sexo que refuerza el mantenimiento de la reproducción sexual a largo plazo.

Finalmente, en el Capítulo 6 se discuten de manera general los resultados presentados a lo largo de la tesis y se enumeran las principales conclusiones que se alcanzaron. En suma, los resultados obtenidos contribuyen con evidencia empírica sobre los costos del sexo y de algunas de sus consecuencias ecológicas, lo que impacta, al menos en parte, a la teoría evolutiva del mantenimiento del sexo en un partenogenético cíclico.

Capítulo 1

Introducción general

Para que ocurra la evolución de un carácter en una población por selección es necesario que los individuos sean eficientes, es decir, que sean capaces de sobrevivir y reproducirse, el resultado dependerá de la intensidad de las presiones de selección que actúan sobre el rasgo y de la naturaleza de su variación genética (Maynard-Smith, 1998). Está ampliamente aceptado que la variabilidad heredable es un requisito clave para que ocurra la evolución por selección natural; las fuentes esenciales de cambio son la mutación y la recombinación, ésta última favorecida, principalmente, por la reproducción sexual (Futuyma, 2005; Lampert & Sommer, 2007).

La reproducción sexual y la paradoja del sexo

La reproducción sexual es un proceso fundamental que tiene consecuencias moleculares, individuales, poblacionales e implicaciones evolutivas en todos los niveles de organización ecológica (Stearns, 1985; Colegrave, 2002; McDonald *et al.*, 2016). Los estudios sobre el origen y mantenimiento del sexo permanecen vigentes hasta hoy, pues no hay un consenso sobre los cómo y por qué, conservándose como uno de los temas más desafiantes en evolución (Stearns, 1985; Kondrashov, 1988; West *et al.*, 1999; Lehtonen *et al.*, 2012; Hörandl *et al.*, 2020; MacPherson *et al.*, 2023), al grado que, Bell (1982) sugirió que el sexo es la reina de los problemas en biología evolutiva.

A continuación, se presenta el marco teórico general en el que se sustenta esta tesis, comienza con una reseña histórica breve, también se plantean algunos de los costos y beneficios del sexo que dan contexto al trabajo de investigación y a la realización de los experimentos sobre un modelo biológico particular.

La reproducción sexual es casi universal en los eucariontes pues se presenta en el 99.9 % de sus especies (Otto, 2009; Ashman *et al.*, 2014). La reproducción sexual implica que el material genético de dos ancestros diferentes se fusiona en un único descendiente (Maynard-Smith, 1998). En esta tesis se utilizará la palabra sexo como referencia a un ciclo de vida donde se combinan la singamia, que implica la fusión de dos gametos haploides diversificados provenientes de distintos progenitores, y la meiosis, durante la cual, los genomas parentales se recombinan, generando gametos genotípicamente únicos. En comparación, la asexualidad implica la producción de descendencia a partir de células individuales derivadas mitóticamente y donde los descendientes son genéticamente idénticos en ausencia de mutación (Kondrashov, 1993; Martens *et al.*, 2009). Aunque debe señalarse que existen variaciones complejas, y versiones específicas de la reproducción sexual (véase, p. e., Vreeburg *et al.*, 2016) que no se abordarán en este estudio. Cabe aclarar que, el modelo de estudio utilizado en esta tesis, el rotífero monogononte *Brachionus plicatilis*, es una especie que se reproduce sexualmente durante una parte de su ciclo de vida.

La reproducción sexual tiene asociados múltiples costos inmediatos para los organismos que la presentan, lo que, teóricamente,

la hacen una estrategia desventajosa en la mayoría de las situaciones, por lo tanto, es paradójico que sea el tipo de reproducción más diseminado entre los organismos multicelulares (Williams, 1975; Maynard-Smith, 1978; Bell, 1982; Stearns, 1987; West *et al.*, 1999; Hartfield & Keightley, 2012; Hörandl *et al.*, 2020).

La prevalencia del sexo ha intrigado a los biólogos durante mucho tiempo, el mismo Charles Darwin (en Zimmer, 2009) escribió en 1862: "*no sabemos la causa final de la sexualidad; ¿por qué los nuevos seres deberían ser producidos por la unión de los dos elementos sexuales?... El tema está aún oculto en la penumbra*". Desde entonces, se han planteado varias hipótesis que buscan explicar por qué el sexo está tan extendido entre los seres vivos. Uno de los primeros pensadores en analizar el tema fue el biólogo evolutivo August Weismann quien sugirió en 1886 que la reproducción sexual reorganiza el material genético aumentando la varianza de la eficiencia entre los individuos, lo que genera un aumento de la eficiencia de la selección y, por lo tanto, una mayor eficiencia promedio en la población (Mooney, 1995; Burt, 2000).

A partir de esta idea se plantearon otras hipótesis, entre ellas las clásicas ideas de Fisher (1930; en Hartfield & Keightley, 2012), que propone que los organismos sexuales pueden combinar alelos selectivamente ventajosos en el mismo individuo, y la de Müller (1932; en Hartfield & Keightley, 2012), que plantea que la acumulación de mutaciones es irreversible, por lo que en poblaciones finitas de asexuales se van perdiendo aleatoriamente genotipos eficientes,

además de que se acumulan mutaciones deletéreas (el denominado trinquete de Müller), mientras los genotipos sexuales sortean su acumulación a través de la recombinación, debido a que no pasan todas las mutaciones a todos sus descendientes. Entonces, la recombinación por reproducción sexual favorece que las mutaciones perjudiciales se eliminen de manera más eficiente y aumenta la velocidad a la que se pueden fijar los alelos favorables que aceleran el proceso evolutivo (Maynard-Smith, 1971, 1976; Barton, 2010). Sin embargo, surgió una controversia alrededor de los mecanismos planteados, pues las supuestas ventajas adaptativas involucradas asumían una selección a nivel grupal, en el que las especies sexuales se adaptarían rápidamente y podrían persistir a los cambios ambientales y sería menos probable que se extinguieran. Por el contrario, las especies asexuales serían callejones evolutivos sin salida, dado que no podrían eliminar la carga mutacional y, además, solo podrían adaptarse a una parte del rango ecológico de la especie parental (Maynard-Smith, 1971, 1976; 1998; Vrijenhoek, 1979; Stearns, 1985). Por lo que, si los asexuales surgen a tasas bajas y tienen un alto índice de extinción, esto implicaría una frecuencia baja de las especies asexuales (Brookfield, 1999). Entonces, el sexo conllevaría el beneficio a largo plazo y a nivel de grupo, dadas sus mayores tasas de adaptación y a la purga de mutaciones deletéreas (Stearns, 1985). Aunque la selección grupal es una explicación controversial, se ha planteado que el sexo es una de las pocas adaptaciones generadas por este tipo de selección (Maynard-Smith, 1978; Burt, 2000; Futuyma, 2010; Meirmans & Strand, 2010). Sin embargo, este tema aún se mantiene en discusión (véase, p. e., Gorelick & Heng, 2011).

No obstante, la falta de generalidad de las explicaciones sobre la evolución del sexo, la poca evidencia empírica sobre las ideas planteadas, además del tema cuestionable de la selección grupal, estimuló que en los años setenta y ochenta del siglo pasado se escribieran extensos tratados, abordándolo, ahora, desde las ventajas de la selección a nivel individual. Algunos de estos textos clásicos son: “The evolution of sex” (Williams, 1975); “Sex and evolution” (Maynard-Smith, 1978); “The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality” (Bell, 1982); “The evolution of sex and its consequences” (Sterns, 1987). En estos textos, además de discutir la viabilidad de las ideas de Fisher y Müller, también se plantean propuestas de estudio, además de metodologías que se podrían implementar para analizar las ventajas y los costos de la reproducción sexual y de la recombinación, pero bajo el escenario de la selección natural y a través de la eficiencia diferencial de los individuos. Posteriormente, otros autores, a través de análisis comparados, presentan evidencias que respaldan o rechazan dichas propuestas (véase, p. e., las revisiones de Stearns, 1990; Meirmans & Strand, 2010; Neiman *et al.*, 2018).

Los costos del sexo

Aunque se puede abordar el significado evolutivo del mantenimiento del sexo ya sea estudiando por un lado los costos y por el otro sus beneficios, Gibson *et al.* (2017) sugieren que un punto de partida decisivo para abordar el tema es estimar los costos. La primera compilación de los costos reconocidos que genera la reproducción sexual fue realizada por Lewis (1987), aunque se pueden revisar revisiones más recientes en Lehtonen *et al.* (2011) y Meirmans *et al.*

(2012). Para empezar, habría que considerar que el costo del sexo significa una reducción en la eficiencia de los organismos que presentan este tipo de reproducción en su historia de vida (Lewis, 1987; Stearns, 1990; Meirmans *et al.*, 2012).

El costo más reconocido del sexo, desde el punto de vista numérico, es el costo de los machos, el cual fue planteado por Maynard-Smith (1971, 1978). En las especies diploides anisogámicas, la mitad de la inversión en reproducción se destina a la función masculina, pero los machos no contribuyen energéticamente a la producción de descendencia, son las hembras las que pagan solas este gasto. Los machos (a falta de cuidado paterno) solo contribuyen con información genética. También se le conoce como el “doble costo del sexo” debido a que, si se compara el desempeño entre una hembra sexual y una mutante asexual, bajo el supuesto “todo lo demás es igual”, los dos tipos de hembras serían igualmente fecundas, entonces la hembra asexual invertiría todo su presupuesto reproductivo en hijas clonales con el doble de eficiencia que las hembras sexuales que producirían constantemente el mismo número de descendencia, pero la mitad masculina y la otra mitad femenina (Fig. 1.1). En este contexto, si sólo se considera la ventaja numérica, una población de asexuales debería conducir a la extinción de la población sexual en pocas generaciones en competencia (Maynard-Smith, 1978). Los costos de la inversión sexual se abordan en las investigaciones realizadas en los Capítulos 3 y 4.

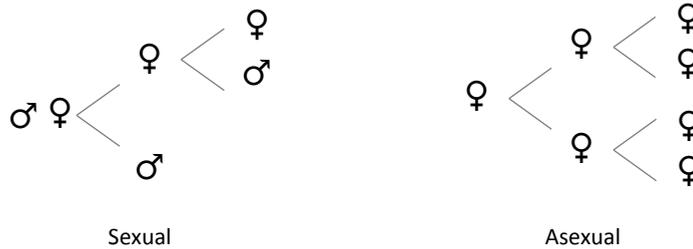


Figura 1.1. Los organismos asexuales tienen una doble ventaja demográfica, pueden producir el doble de descendientes (hembras) que los organismos sexuales (figura modificada de Gibson *et al.*, 2017).

Hay que considerar que también se ha propuesto que el costo de los machos puede ser menos del doble, siempre y cuando se presente algún tipo de compensación, por ejemplo, el cuidado de las crías y/o de la hembra por parte del macho (Maynard-Smith, 1978), o si hay un sesgo a una menor producción de machos (Lively, 1990). Aunque también puede ser más del doble si se suma el conflicto sexual (Ranking *et al.*, 2011; Lehtonen *et al.*, 2012), o si se toman en cuenta los costos energéticos asociados con el apareamiento, en cuyo caso se requeriría una ventaja selectiva más fuerte para explicar la existencia del sexo (Gibson *et al.*, 2017). A pesar de la popularidad del concepto del doble costo del sexo, se ha señalado que asumirlo a rajatabla puede ser excesivo y, en realidad, debe ser tomado con precaución, pues hay que tomar en cuenta el contexto biológico y considerar que los resultados pueden ser dependientes del taxón estudiado (Lewis, 1987; Lehtonen *et al.*, 2012).

Además del costo de los machos en el corto plazo, las hembras sexuales solo contribuyen con la mitad de sus genes a cada cigoto, desde el punto de vista de la contribución genética, mientras que una hembra

asexual transmite intacto el 100 % de sus genes a sus descendientes (William & Mitton, 1973; Williams, 1975), a este costo también se le ha llamado como el costo de la dilución del genoma o el costo de la meiosis (Lewis, 1987) pero, en ocasiones, ha sido confundido con el doble costo del sexo (Meirmans *et al.*, 2012). Existen otros muchos costos que se han documentado, por ejemplo, la fragmentación de combinaciones de genes durante la recombinación, donde se pierden combinaciones de alelos que ya han demostrado ser eficientes ante el ambiente local, entonces, los nuevos descendientes podrían presentar una reducción en la eficiencia (Mainard-Smith, 1978; Lewis, 1987; Stearn, 1990; West *et al.*, 1999). Por otro lado, están los costos energéticos del apareamiento en la búsqueda de pareja, el cortejo, la defensa o señalización de territorios, la cópula, etc. (Daly, 1978; Lewis, 1987; Parker, 2006). Aunque Lehtonen *et al.* (2012) mencionan que son dificultades que acarrear principalmente los machos y que no influyen directamente en el éxito reproductivo de las hembras, por lo que, los descalifica como un costo del sexo. Sin embargo, Lewis (1987) y Rowe (1993), consideran que cualquier retraso en la reproducción de las hembras cuenta como un costo. Por ejemplo, la disminución de la probabilidad en los encuentros sexuales puede ser costosa y puede verse influida por el tamaño de la población, que equivale al costo de la densidad mínima, o a la combinación entre el tiempo invertido y la elección de pareja (Lewis, 1987; Snell & Garman, 1986; Real, 1990).

La variedad de costos reconocidos genera la duda de cuál es la importancia de cada uno de ellos por separado, o de si hay una mezcla compleja de costos, por lo tanto, la expresión final dependerá de la

suma y, de restar, si existen, beneficios compensatorios, por lo que hay que prestar atención en no subestimar todos los elementos implicados (Lewis, 1987; Lehtonen *et al.*, 2012). Aunque no es claro cómo se combinan los costos, y estos son difíciles de evaluar empíricamente, no cabe duda de que son significativos (Stelzer, 2017). Es importante recordar que, no todas las características de las especies sexuales son universales, por ejemplo, el conflicto sexual, el cuidado parental, la formación de estructuras diapáusicas, etc., las cuales son dependientes de la historia evolutiva de cada especie (Stelzer, 2015).

De acuerdo con Lehtonen *et al.* (2012) existen tres desafíos metodológicos para la medición de los costos del sexo, el primero (como ya se menciona arriba) consiste en que no hay una sola forma de evaluar la diferencia neta de la eficiencia de los organismos que invierten o no en sexo, dada la mezcla compleja de costos; el segundo es que no siempre se hace la comparación entre sistemas reproductivos comparables; el tercero es que hay un desafío en evaluar los costos en una escala de tiempo adecuada, pues el efecto de la selección puede verse reflejado en la tasa de crecimiento en una generación o en varias generaciones. En esta tesis se utilizó como modelo de estudio un partenogenético cíclico que, dadas sus características, puede superar los tres desafíos planteados.

Las ventajas del sexo

Otra forma de aproximarse a los estudios de la evolución del sexo es considerar los beneficios que operan a corto o largo plazo y que compensen la inversión sexual, para los que se han considerado

hipótesis mutacionales y ecológicas. Con estas hipótesis se busca un mecanismo realista y general que proporcione respuestas plausibles a la interrogante del mantenimiento del sexo (Maynard-Smith, 1978; Kondrashov, 1988, 1993; Butlin, 2002; Meirmans & Strand, 2010). Aunque también se ha planteado que no existe una respuesta única y que, en la evolución del sexo, en realidad pueden intervenir mecanismos tanto mutacionales como ecológicos de manera simultánea (West *et al.*, 1999; Neiman *et al.*, 2017, 2018; MacPherson *et al.*, 2023). En particular, las hipótesis de una compensación ecológica resultan atractivas porque permiten ser puestas a prueba con relativa sencillez, ya que operan en una escala temporal actual. Esta tesis está enfocada a analizar en tiempo ecológico los costos y las ventajas de la diversificación producto del sexo.

En el contexto ecológico de las poblaciones, las ventajas intrínsecas del sexo ocurrirían a corto plazo por la generación de descendencia diversificada, lo que reforzaría el mantenimiento de la reproducción sexual a través de generar diferenciación fenotípica (Williams, 1975; Bell, 1985; Meirmans & Strand, 2010). Por ejemplo, ventajas de la variabilidad en rasgos implicados en interacciones bióticas, como la disminución del efecto de los depredadores, dado que algunos descendientes deberían de evadir mejor la acción de sus enemigos naturales (incluidos los parásitos), especializados en atacar a los fenotipos más vulnerables (Hamilton, 1980; Hamilton *et al.*, 1990; Lively *et al.*, 1990). Esta hipótesis se centra en la variación temporal de una presión ambiental biótica sobre una población diversificada, la cual tiene bastante apoyo empírico como un mecanismo explicativo de la

persistencia a largo plazo del sexo (Decaestecker *et al.*, 2007; Neiman & Koskella, 2009; Lively & Morran, 2014). Aunque reconocer que este mecanismo actúa en poblaciones naturales no significa que el sexo haya evolucionado por esta razón.

Por otro lado, también, desde un contexto ecológico, Williams (1975) planteó una idea en la que se priorizan las ventajas individuales y su variabilidad sobre la disminución del efecto negativo de la competencia por recursos. Si los organismos sexuales producen descendientes que son genéticamente variables, parte de esa variabilidad podría estar correlacionada con su expresión fenotípica y reflejarse en su desempeño en el ambiente (Bulmer, 1980; Bell, 1982; Case & Taper, 1986; Koella, 1988; Song *et al.*, 2011). Desde esta perspectiva, la variación genética presente pudiera estar asociada a una diferenciación de nichos y, en consecuencia, sobre la variación en el uso de recursos entre los individuos, lo que significaría que algunos genotipos tendrían mayor probabilidad de ser eficientes en las interacciones competitivas entre hermanos, o incluso en la competencia con individuos no relacionados por parentesco (Bell, 1985; Doncaster *et al.*, 2000; Crutsinger *et al.*, 2006; Kotowska, 2010). Entonces, de acuerdo con esta idea, en un conjunto diversificado de individuos de origen sexual la competencia se debilitaría como resultado de la diversificación de nichos (p. e., por el uso diferencial de recursos), mientras que, los niveles de competencia y su resultado serían diferentes si la competencia es entre los individuos sexuales y asexuales, así como en la competencia dentro de cada grupo (Doncaster *et al.*, 2000; Tag *et al.*, 2005a; Tag *et al.*, 2005a, 2005b). Entre las hipótesis ecológicas que

ayudan a explicar la evolución del sexo también se ha considerado el efecto de la complejidad de las condiciones abióticas y su interacción con los individuos, por ejemplo, si están expuestos a entornos novedosos, constantes, o fluctuantes, y si esto ocurre espacial o temporalmente (Hestmark *et al.*, 1992; Becks & Agrawal 2010; Song *et al.*, 2011; Lively & Morran, 2014; Franch-Gras *et al.*, 2017; Pierre *et al.*, 2022). Como puede intuirse, en los modelos ecológicos donde los factores ambientales determinan las presiones de selección, la ventaja no la da el sexo *per se*, sino la diversidad genotípica resultante (Simon *et al.*, 2002). Las ventajas de la diversificación en la competencia se analizarán en el Capítulo 5 de esta tesis.

El modelo biológico y la estrategia reproductiva

Como ya se había mencionado, es importante encontrar un modelo biológico adecuado en el que se puedan evaluar los costos y las ventajas del sexo en el que, además, se pueda hacer una comparación verdaderamente equivalente (Lehtonen *et al.*, 2012). En esta tesis, se utilizaron rotíferos monogonontes (Filo Rotifera, Clase Monogononta) que tienen la capacidad de invertir tanto en la reproducción sexual como en la asexual en el mismo ciclo de vida (Birky & Gilbert, 1971; Nogrady *et al.*, 1993).

Primero, hay que aclarar que es lo que implica la partenogénesis. Los organismos con este ciclo de vida tienen descendientes que serán genéticamente idénticos a ellos (a menos que ocurra mutación), ya que fueron producidos por reproducción asexual, sin la necesidad de gametos masculinos, entonces, las poblaciones de

estos organismos estarán compuestas exclusivamente por hembras. Los animales partenogenéticos representan apenas el uno por ciento del total de los animales, se han descrito en algunos vertebrados (peces, lagartos y anfibios) pero, mayoritariamente, en invertebrados (insectos, caracoles, lombrices, nemátodos, platelmintos, crustáceos y rotíferos bdelloideos) (Cuellar, 1977; Bell, 1982; Avise *et al.*, 1992; Mark-Welch & Meselson, 2000; Simon *et al.*, 2003). Segundo, hay que tener en cuenta que existen variaciones de como ocurre la partenogénesis. Cuando sólo se producen machos se le denomina arrenotoquia, o anfitoquia cuando engendran hembras y machos, o telitoquia cuando solo tienen descendencia femenina. La partenogénesis telitóquica es la más común, y puede ser: (a) automítica, si durante la gametogénesis ocurre meiosis y hay la autofecundación de un óvulo haploide con un cuerpo polar haploide que da origen a una hembra diploide y, (b) apomítica o ameiótica, sin meiosis, donde los ovocitos son diploides y darán origen a una hembra clonal (Mainard-Smith, 1986; Avise *et al.*, 1992; De Meeûs *et al.*, 2007). En esta tesis, nos interesa la partenogénesis apomítica (productora de hembras) que se combina con la producción de machos generados en el mismo ciclo de vida (Birky & Gilbert, 1971; De Meeûs *et al.*, 2007). A este ciclo de vida complejo donde la sexualidad es facultativa, se le conoce como partenogénesis cíclica, la cual puede tener sus propias variantes dependiendo de la especie que se trate, por ejemplo, en el caso de trematodos, áfidos y cladóceros, el modelo general implica que los organismos se someten a varias rondas de reproducción clonal seguidas de uno o varios eventos sexuales alternándose entre generaciones (Innes & Singleton, 2000; Simon *et al.*,

2002; Rouger *et al.*, 2016). En el caso de los rotíferos monogonontes una sola hembra partenogenética puede tener diferente porcentaje de descendencia sexual y asexual (Serra & King, 1999; Stelzer, 2011; Snell, 2017) (véase, aquí abajo, una descripción detallada de este ciclo de vida).

El costo del sexo y la partenogénesis cíclica

Se ha considerado que, evolutivamente hablando, los partenogenéticos cíclicos combinan las ventajas de los dos tipos reproductivos (Lynch & Gabriel, 1983; Simon *et al.*, 2002). La ventaja selectiva de la fase partenogenética radica en que tienen el potencial de generar grandes poblaciones de individuos genéticamente idénticos, mientras que la fase sexual tiene la ventaja de la generación de progenie diversa combinada con la eliminación de las mutaciones deletéreas (Snell, 1987; Green & Noakes, 1995; Decaestecker *et al.*, 2009). Adicionalmente, en los invertebrados acuáticos que tienen este ciclo de vida, el resultado del sexo es la formación de estructuras o formas diapáusicas capaces de resistir condiciones ambientales adversas (Brendonck & De Meester, 2003; Stelzer & Lehtonen, 2016). Sin embargo, a pesar de tener lo mejor de ambos modos reproductivos, solo hay unas 15.000 especies animales distribuidas en seis grupos taxonómicos que son partenogenéticos cíclicos (Hebert, 1987). Quizás, es porque la partenogénesis cíclica tiene restricciones evolutivas, con implicaciones fisiológicas y citogenéticas que han evitado una mayor presencia entre los diferentes linajes (Hebert, 1987; Rispe *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2002).

Si consideramos el costo del sexo en organismos partenogenéticos cíclicos podemos hacer varios supuestos, por ejemplo, si en una población los organismos se puede reproducir sexual o asexualmente, de acuerdo con Maynard-Smith (1978), sería sorprendente que no existiera variación genética y que algún individuo no pudiera suprimir completamente el sexo, si esto fuera ventajoso a corto plazo, la ventaja numérica de dicho nuevo asexual debería conducir a la fijación rápida de este tipo reproductivo debido a los costos en el corto plazo del sexo (Bulmer, 1982). La posibilidad de que, eventualmente, se puede perder la parte sexual, puede entenderse como una inestabilidad en el ciclo de vida de los partenogenéticos cíclicos (Burt, 2000; Peck & Waxman, 2000; Serra & Snell, 2009). Por lo que, este sería también el caso de los rotíferos monogonontes que se utilizaron en esta tesis. La inestabilidad de la combinación de la reproducción sexual coexistiendo con reproducción asexual se ha puesto en evidencia en poblaciones experimentales de rotíferos, donde se ha observado una selección en contra de los individuos con reproducción sexual debido a los altos costos en que incurren (Boraas, 1983; Bennett & Boraas, 1989; Fussmann *et al.*, 2003). Sin embargo, en poblaciones naturales esto no ocurre de manera frecuente pues el sexo es prevalente, por lo tanto, el mantenimiento del sexo en poblaciones con sexo facultativo debe ser explicado por algún factor más fuerte que continúa operando (Kondrashov, 1988; Simon *et al.*, 2002).

El supuesto del doble costo del sexo no ocurre igual en los partenogenéticos cíclicos como en otros linajes, dado que solo presentan sexo ocasionalmente, aunque ocurre dentro del mismo ciclo

de vida, por lo cual, teóricamente, el sexo debería tener un costo menor (Charlesworth, 1980; Green & Noakes, 1995; Hurts & Pecks, 1996; D'Souza *et al.*, 2010). Aun así, este grupo de organismos no queda exento del costo implícito durante su fase sexual, por lo que se prevé que el costo ocurra en algún momento de su ciclo reproductivo (Bulmer, 1982). Además, los genotipos individuales de una especie con sexo facultativo pueden variar en su inversión sexual, *i. e.*, en su propensión sexual, momento de la inducción, porcentaje de la descendencia sexual y la duración de los episodios sexuales (véase, p. ej., Tessier & Cáceres, 2004; Campillo *et al.*, 2009), lo cual da pie a suponer costos diferenciales según la combinación de los diferentes niveles de inversión o por una combinación de ellos.

El costo del sexo en los rotíferos monogonontes

En los rotíferos monogonontes las hembras pueden variar en sus niveles de inversión sexual, tanto en el momento de inicio del sexo, *i. e.*, su propensión sexual, medido como la densidad en la que se observa la aparición de machos (Aparici *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2005; Franch-Gras *et al.*, 2017; Tarazona *et al.*, 2017), así como en la proporción de descendientes sexuales que pueden producir, *i. e.*, la tasa de mixis (Snell, 1987; Serra & King, 1999, Serra *et al.*, 2005). Por lo que, por un lado, una alta propensión sexual sería indicativa de un inicio temprano del sexo, donde, una hembra que inicie la vía sexual cuando exista una densidad poblacional baja frenará su potencial de crecimiento clonal de manera temprana, mientras que aquellas hembras que respondan a un umbral poblacional alto, es decir, de manera tardía, se verían beneficiadas al haber alcanzado una mayor densidad clonal (Aparici *et al.*, 2001; Serra *et*

al., 2005). Así, en condiciones naturales, estas últimas se vería favorecidas dadas las ventajas a corto plazo de la asexualidad, aumentando su frecuencia en la población. Sin embargo, en las hembras en las que se induce el sexo de manera temprana, a pesar de producir una cantidad baja de huevos diapáusicos, su apuesta a largo plazo estará asegurada. Por el contrario, en las hembras tardías, la posibilidad de que ocurra alguna eventualidad a lo largo de la temporada de crecimiento plantónico anual podría evitar que alcancen a producir huevos diapáusicos y se vería comprometida la apuesta a largo plazo (Snell, 1987; Carmona *et al.*, 1995; Serra & King, 1999; Serra & Snell, 2009). De este compromiso se desprende la hipótesis que se analiza en el Capítulo 3, en el que se aborda la selección de una menor propensión en reproducción sexual en una población natural de rotíferos. Por otro lado, una tasa de mixis alta también tendría consecuencias considerables en las dinámicas del crecimiento clonal y poblacional, dado que, una vez que una hembra ingresa al grupo de hembras sexuales, ya no contribuye al crecimiento de su clon, porque ahora producirá machos o, si es fertilizada, huevos diapáusicos (Snell, 1987; Serra *et al.*, 2005). Entonces, en este ciclo de vida no hay un costo directo de producir machos, el costo ocurre a través de producir hijas sexuales (Serra & King, 1999), compromiso que se discute en el Capítulo 4. Por lo tanto, la reproducción sexual en poblaciones de rotíferos monogonontes representa un compromiso entre el crecimiento poblacional actual y la supervivencia a largo plazo, a través de la producción de huevos diapáusicos (Snell, 1987; Serra & King, 1999; Serra *et al.*, 2005; Serra &

Snell, 2009; Stelzer & Lehtonen, 2016), compromiso que se analiza en el Capítulo 5 de esta tesis.

Los rotíferos del género *Brachionus* (Orden Ploima, Familia Brachionidae) son un excelente modelo en estudios tanto poblacionales como evolutivos (p. ej., Fussmann *et al.*, 2007; Snell, 2014; Declerck & Papakostas, 2017; Stelzer, 2017). Las especies pertenecientes a los complejos de *B. plicatilis* y *B. calyciflorus* han sido las más estudiadas de todos los monogonontes (Declerck & Papakostas, 2017). Existen múltiples ventajas que los hacen ideales como modelos de estudio, por ejemplo, son de tamaño pequeño y tienen tiempos de generación cortos, lo que facilita el estudio de las dinámicas poblacionales tanto en la naturaleza como en el laboratorio, por lo que es relativamente sencillo analizar sus rasgos de historia de vida en una escala de tiempo adecuada. También, son capaces de clonarse de forma natural, lo que facilita su manipulación experimental. Además, como ya se mencionó, los genotipos individuales pueden variar en su inversión sexual, lo que permite una gama amplia de variación fenotípica a diferencia de linajes con sexo obligado o con asexualidad obligada (Stelzer & Lehtonen, 2016). Williams & Mitton (1973) sugieren que la clave del significado evolutivo del sexo como una adaptación a corto plazo puede buscarse en aquellas poblaciones que practican regularmente la reproducción tanto sexual como asexual, como es el caso del organismo modelo utilizado en esta tesis.

Una de las aproximaciones empíricas más exitosas para abordar el estudio del mantenimiento de la reproducción sexual ha sido a través del análisis de las violaciones del supuesto “todo lo demás es igual”, sin

embargo, generalmente, se han comparado las historias de vida de linajes sexuales vs. asexuales (Scheiner & Yampolsky, 1998; Innes *et al.*, 2000; Helden & Dixon, 2002; Wolinska & Lively, 2008; Stelzer, 2011). Por lo que, en esta tesis, se tomó la alternativa de evaluar los costos del sexo a través de la comparación de los rasgos de historia de vida en hembras partenogenéticas cíclicas individuales (Corley & Moore, 1999). Entonces, bajo el supuesto de “todo lo demás es igual”, se esperaría que los genotipos que invierten más en descendencia sexual (tasa de mixis alta) tengan tasas de crecimiento clonal más lentas, pues deben de pagar los costos del sexo. Sin embargo, la suposición podría no cumplirse si dichos genotipos tienen una mayor fecundidad y/o supervivencia, lo que compensaría sus costos por medio de mecanismos a corto plazo (mayor eficiencia durante la fase asexual, como se ha reportado en otros partenogenéticos cíclicos; véase, p. e., Innes *et al.*, 2000). En el Capítulo 4 de esta tesis se desarrollarán los experimentos para probar el supuesto de “todo lo demás es igual” en genotipos de rotíferos monogonotes que presentan variabilidad en sus tasas de mixis.

La ventaja de la variabilidad en los rotíferos monogonotes

Como se mencionó previamente, existe una relación entre el modo reproductivo, la estructura poblacional y el mantenimiento de la variación genética en las poblaciones naturales (Bell, 1982; Hebert, 1987). La existencia de variabilidad en el grado de inversión sexual entre individuos plantea la necesidad de explicar cuáles son los mecanismos responsables para el mantenimiento de esta y, si estos mecanismos logran compensar el costo del sexo, por ejemplo, a través de la relajación de los efectos de la competencia intrapoblacional dada la

diversidad genética en la población (véase, p. e., Tagg *et al.*, 2005a, 2005b). De acuerdo con esta idea, la competencia intraespecífica que ocurriría en clones de rotíferos monogonontes que proceden de un banco de huevos diapáusicos (que, por definición, son genotipos diferentes), debería relajarse, ya que se esperaría que fenotípicamente también fuesen diferentes, por ejemplo, en sus capacidades para hacer un uso diferencial de los recursos. Bajo este supuesto, se esperaría que una población diversa (policlonal) tenga una mayor amplitud de nicho, lo que podría relajar la competencia intraespecífica en comparación a una población que se originó asexualmente (monoclonal). El análisis comparado de la eficiencia en competencia por recursos entre poblaciones genéticamente diversas vs. no diversas durante su crecimiento poblacional se aborda en el Capítulo 5 de esta tesis.

Modelo de estudio: Brachionus plicatilis

En una temporada de crecimiento planctónico anual, el ciclo de vida en *Brachionus* inicia con la eclosión (a partir de huevos diapáusicos) de hembras asexuales (con un modo reproductivo partenogenético, donde cada genotipo se copia sin recombinación, este tipo de reproducción produce un crecimiento poblacional rápido, los huevos de estas hembras son subitáneos y se desarrollan en hembras asexuales diploides (Fig. 1.2). Posteriormente, cuando aumenta la densidad poblacional, las mismas hembras liberan una señal química que estimula a algunas de ellas a producir ovocitos haploides que, si maduran, se pueden desarrollar como machos o, si son fertilizados tempranamente, darán lugar a huevos con embriones diapáusicos femeninos diploides, con lo

que se reiniciará el ciclo (Gilbert, 1963; Birky & Gilbert, 1971; Wallace & Smith, 2009; De Paggi *et al.*, 2020).

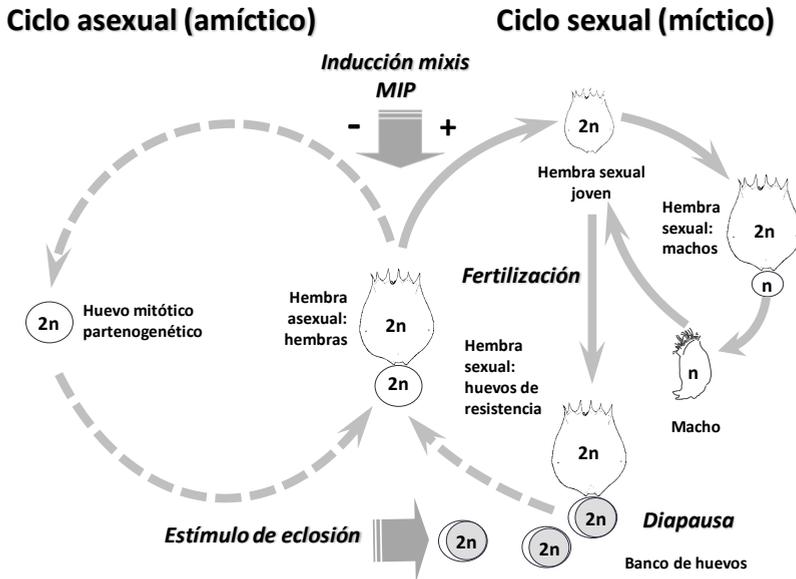


Figura 1.2. Ciclo de vida generalizado de los rotíferos monogonontes. La respuesta al estímulo inductor (proteína inductora de la mixis o reproducción sexual, MIP) puede ser negativa y el ciclo asexual partenogénético se mantiene. Si el estímulo inductor es lo suficientemente alto, las descendientes tendrán características sexuales. Si estas hembras no son fertilizadas sus ovocitos darán origen a huevos de machos. Los machos podrán fecundar a los ovocitos de las hembras jóvenes, quienes tendrán huevos diapáusicos asexuales, que para salir de la dormancia deben recibir un estímulo ambiental (modificado de Ciro-Pérez, 2001).

La determinación del tipo de hembra sexual o asexual ocurre durante la ovogénesis, antes de que el huevo salga de la cavidad corporal de la madre (Gilbert, 2017). Las hembras partenogénicas producen ovocitos de uno en uno durante su período reproductivo, pero el destino del tipo sexual del embrión, depende de la concentración de la señal química inductora a la que esté expuesta la madre (Gilbert, 2007). La naturaleza de los factores que inducen el sexo en el género

Brachionus se ha estudiado ampliamente (Gilbert, 1963; Hino & Hirano, 1976; Snell & Boyer, 1988; Carmona *et al.*, 1993; Stelzer & Snell, 2003). La señal ambiental más importante que puede inducir la reproducción sexual en *Brachionus* es una proteína inductora de la reproducción sexual o mixis (MIP, por sus siglas en inglés; Snell *et al.*, 2006), que se complementa con una proteína de reconocimiento de pareja (MRP, por sus siglas en inglés), que es una glicoproteína ubicada en la superficie del cuerpo de la hembra (Snell *et al.*, 1995; Snell & Stelzer, 2005). La MRP está codificada por la familia de genes *mrp-b*, que puede ser específica de especie (Snell *et al.*, 2009; Gribble *et al.*, 2011; Gribble & Mark Welch, 2012; Jezkova *et al.*, 2022).

La inducción sexual en las especies de *Brachionus* es denso-dependiente (Gilbert, 1963; Hino & Hirano, 1976; Snell & Boyer, 1988; Carmona *et al.*, 1993; Stelzer & Snell, 2003), por lo que se requiere que la proteína inductora del sexo (MIP) se vaya acumulando en el medio hasta alcanzar un cierto umbral, lo que dispara la respuesta sexual en algunas de las hembras (Snell *et al.*, 2006; Snell, 2017). Así, la estimación de la densidad poblacional en la que se dispara el inicio de la fase sexual tiene importancia tanto ecológica como evolutiva (propensión sexual), pues afecta la eficiencia de los genotipos, tanto en la probabilidad de dejar estructuras de diapausa, como en la generación de variabilidad genética potencial que quedarán en el banco de huevos diapáusicos (King, 1980; Serra *et al.*, 2004). Dado que la estimación de la MIP es muy compleja, dada su naturaleza química, se suele utilizar la densidad poblacional umbral en la cual se observa la aparición de machos en el medio, o la aparición de hembras con huevos de macho como

aproximaciones del inicio de la reproducción sexual, y de su propensión sexual (Aparici *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2019).

Existe un dimorfismo sexual muy marcado en los monogonotes, los machos haploides son más pequeños que las hembras, no presentan una loriga rígida, en la cabeza tienen setas sensoriales, tienen el sistema digestivo atrofiado y tienen un pie corto no funcional, además, tienen una gran capacidad de movimiento para la búsqueda de las hembras. En *B. plicatilis*, los machos realizan movimientos de reconocimiento alrededor de la hembra con la corona ciliar, la cópula suele ocurrir por el tegumento de la cabeza de la hembra (Gilbert, 1974; Epp & Lewis, 1979; Wallace *et al.*, 2015).

Las hembras sexuales y partenogenéticas no son diferentes morfológica ni fisiológicamente, excepto por el tipo de descendencia que producen (Birky & Gilbert, 1971). Entonces, en *B. plicatilis* se puede reconocer la sexualidad de las hembras por el tipo de huevos que acarrearán junto al pie (Sudzuki, 1957). Los huevos subitáneos de hembra y macho tienen una cubierta delgada y se pueden reconocer por el tamaño contrastante entre ellos, los huevos de machos son más pequeños y apenas representan una pequeña proporción del huevo de hembra. Por otra parte, los huevos de diapáusicos tienen tres capas de diferente material, la exterior es gruesa y el tamaño es mucho mayor que el que tienen los huevos subitáneos de hembra (Gilbert, 1974).

Como ya se ha mencionado, en *Brachionus*, la reproducción sexual está asociada con la producción de huevos diapáusicos, los cuales tienen una función ecológica importante ya que, este tipo de huevo

pueden sobrevivir a la desecación y a otras condiciones adversas, permaneciendo viables durante años o incluso décadas en los sedimentos del mismo cuerpo de agua donde se generaron (Gilbert, 1974; Marcus *et al.*, 1994; Kotani *et al.*, 2001; Brendonck & De Meester, 2003; García-Roger *et al.*, 2006a) o bien, funcionando como estructuras de dispersión potencial a otros ambientes (Ricci, 2001; Wallace & Smith, 2016; Moreno *et al.*, 2019). La posibilidad de eclosión de los huevos del sedimento depende de su tiempo de permanencia y de las características del ambiente en el que estuvieron almacenados (Marcus *et al.*, 1994; García-Roger *et al.*, 2006b; Hairston & Fox, 2009).

Cuando los huevos diapáusicos se acumulan entre los sedimentos forman un banco de huevos, que representa una colección de variantes genéticas producidas en diferentes temporadas, dado que no todos eclosionan de manera inmediata después de ser producidos (Gómez & Carvalho, 2000; Schröder, 2005). El banco de huevos diapáusicos tiene características similares a las de los bancos de semillas, como su alta diversidad genética potencial (King & Snell, 1977; Hairston & Fox, 2009) la cual está asociada a la incertidumbre ambiental y a la duración del hábitat (Spencer *et al.*, 2001; Franch-Gras *et al.*, 2017). El banco de huevos de resistencia puede tener un impacto en la estructura genética de la población y las dinámicas evolutivas (Ellner & Hairston, 1994; Brendonck & De Meester, 2003; Hairston & Fox, 2009). Como se describió previamente, los huevos diapáusicos son importantes ecológica y evolutivamente hablando pues, a nivel poblacional su producción implica un costo a corto plazo, que se ha denominado como el costo de la latencia (Snell, 1987; Serra & Snell, 2009), pero que le

permite una supervivencia a largo plazo, entre temporadas. De manera que, el número total de huevos diapáusicos producidos por un clon durante la estación de crecimiento puede ser considerado como una medida de su eficiencia (Snell, 1977; Serra & King, 1999).

Actualmente, se sabe que *B. plicatilis* pertenece a un complejo de especies crípticas, puesto que la morfología entre las especies catalogadas dentro del grupo no es suficiente para su separación específica (Fu *et al.*, 1991a, 1991b; Gómez & Snell, 1996). Para su identificación son necesarias diferentes herramientas como: el reconocimiento sexual, características ecológicas y/o herramientas moleculares (Ciros-Pérez *et al.*, 2001b; Campillo *et al.*, 2005; Suatoni *et al.*, 2006; Fontaneto *et al.*, 2015). Hasta el momento, se han determinado formalmente al menos quince especies en el mundo dentro de este complejo de especies (Mills *et al.*, 2017).

Las características del complejo de especies de *B. plicatilis* coinciden con las del género, tienen una forma ovoide donde destaca la corona, el tronco y el pie). Están cubiertos por una loriga semirrígida que brinda protección a los órganos. La loriga alcanza longitudes de entre 100-400 μm . La corona ciliar se presenta en la región anterior de la cabeza, y se proyecta hacia la parte superior de la loriga que, en el margen dorsal anterior tiene tres pares simétricos de espinas. En la región ventral posterior tienen una apertura de la cual sale un pie retráctil con dos dedos cortos (De Paggi *et al.*, 2020). Las características de la especie que se estudia en esta tesis corresponden con las características descritas en Cirós-Pérez *et al.* (2001b) para *B. plicatilis*

sensu stricto, es decir, tiene una loriga ovoide en forma de pera, con una longitud de ~300 μm y ~230 μm de ancho, las espinas dorsales triangulares son de base ancha, pero con un margen exterior sigmoide, ambos rasgos resultan diacríticos para su identificación taxonómica.

En el caso de esta especie, se sabe que vive en simpatria con otras especies del complejo en los cuerpos de agua estudiados (Gómez *et al.*, 1995; Ortells, 2000; Gómez *et al.*, 2002; Montero-Pau, 2011). Aunque es posible identificarla y separarla por su morfología de las especies *B. ibericus* y *B. rotundiformis* con las que suele coexistir (Ciros-Pérez *et al.*, 2001b) no es posible hacerlo cuando coexiste con *B. manjavacas*, donde es necesario utilizar técnicas moleculares, ya que la superposición de caracteres morfológicos es muy alta (Campillo *et al.*, 2005; Fontaneto, 2007).

Los rotíferos del género *Brachionus* se caracterizan por tener una corona ciliar que, además de servirle para la natación, les permite generar corrientes que dirigen las partículas alimenticias potenciales hacia la boca (Walker, 1981; Wallace & Smith, 2009). Son capaces de discriminar entre partículas nutritivas (microalgas) y partículas inertes (Vadstein *et al.*, 1993) y pueden capturar o desviar de manera diferencial las posibles células alimenticias según su densidad y el tamaño de partícula (Starkweather, 1995). Dado que se encuentran en una amplia gama de hábitats, durante mucho tiempo, se les consideró polívoros capaces de alimentarse de bacterias y algas picoplanctónicas (Gilbert, 2022). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que, a pesar de que, si son polívoros, su capacidad de alimentarse de

partículas muy pequeñas como las bacterias es ineficiente, y que presentan una selectividad por tallas específicas relacionadas con el tamaño del cuerpo y que además es específico de especie (Rothhaupt, 1988, 1990; Vadstein *et al.*, 1993). Además del tamaño de los recursos, se ha descrito que la calidad nutricional y movilidad de las microalgas son determinantes en la capacidad de alimentación de las especies de *Brachionus* (Korstad *et al.*, 1989; Baer *et al.*, 2008).

Los rotíferos del género *Brachionus* son un componente importante del zooplancton, habitan en ambientes acuáticos dulceacuícolas, en aguas marinas costeras y en cuerpos de agua salinos continentales permanentes o temporales, (Walker, 1981; Wallace, 2002), aunque en general, son frecuentes en sistemas temporales que sólo son adecuados una parte del ciclo anual (Gómez *et al.*, 1995; Gabaldón *et al.*, 2017; Walsh *et al.*, 2014). Las especies que han sido más estudiadas, son las del complejo *B. plicatilis* de lagos españoles, que se caracterizan por tener una alta variabilidad estacional (véase, p. e., Serra *et al.*, 1993; Carmona *et al.*, 1995; Aparici *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2000; Aparici *et al.*, 2001; Ciroso-Pérez *et al.*, 2001a, 2001b; Ortells *et al.*, 2000; Campillo *et al.*, 2011; Franch-Gras *et al.*, 2017; Walczyńska & Serra, 2022).

Justificación y objetivos y organización de la tesis

El marco teórico que se ha presentado hasta aquí trata de contextualizar el análisis de los costos del sexo, particularmente en los organismos partenogenéticos cíclicos, que combinan la reproducción sexual y asexual por lo que, es plausible utilizar una aproximación de estudio

ecológico para poder analizar las consecuencias evolutivas del sexo utilizando este tipo de modelo biológico. Así, dadas las peculiaridades de esta especie de rotífero partenogenético cíclico, *Brachionus plicatilis*, y sobre la base de los antecedentes de investigación que existen sobre ella, es posible evaluar de manera robusta los costos del sexo y la ventaja de la diversificación generada por el sexo en el uso de recursos.

Así, el objetivo general de esta tesis fue la caracterización del costo que supone la existencia de diferentes niveles de propensión y tasas de mixis, y el análisis las consecuencias de dicha variabilidad en el ciclo de vida del partenogenético cíclico *B. plicatilis*. Para ello se realizaron estudios de campo y experimentales. Así, para alcanzar este objetivo, se diseñaron tres objetivos particulares.

El objetivo 1 implicó caracterizar la propensión en reproducción sexual de *B. plicatilis*, así como sus consecuencias, durante un ciclo anual planctónico. Se asumió la existencia de una variabilidad heredable en los niveles de inversión sexual y, dados los costos a corto plazo del sexo, la posible pérdida de la reproducción sexual a lo largo del periodo planctónico, donde una menor propensión a la reproducción sexual debería representar una ventaja a corto plazo.

En el objetivo 2, se evaluaron los niveles de inversión sexual a través de su tasa de mixis y su relación con los rasgos de la historia de vida en una población de hembras genéticamente distintas. Se asumió que bajo el supuesto de “todo lo demás es igual”, los clones con una mayor inversión en reproducción sexual compensarían los costos del sexo con una mayor eficiencia en otros rasgos de su historia de vida.

Finalmente, el objetivo 3 buscó evaluar si la diversidad clonal, resultado de la reproducción sexual, disminuye la competencia intraespecífica en el uso de recursos. Se asumió una ventaja hipotética de la ampliación de nicho como efecto positivo de la diversificación por la recombinación generada por el sexo en poblaciones experimentales policlonales vs. monoclonales.

De acuerdo con lo anterior, la tesis se organizó en capítulos como se describe a continuación. En este Capítulo 1 se ha desarrollado un marco teórico en el que se exponen el contexto histórico de la paradoja del sexo, los costos del sexo, el uso de los partenogénicos cíclicos como modelos de estudio, y se justifica la selección de *B. plicatilis* como modelo para realizar estudios de la evolución y los costos del sexo. En el Capítulo 2, se presentan las metodologías generales y los procedimientos comunes que se utilizaron a lo largo de la tesis para alcanzar los tres objetivos específicos. En el Capítulo 3, se presenta el trabajo realizado para dar cumplimiento al objetivo 1 donde se caracterizaron los niveles de propensión de reproducción sexual de miles de clones provenientes de una población natural de *B. plicatilis*, muestreada quincenalmente durante cinco meses, y en los que se determinó la variabilidad heredable en la propensión sexual en condiciones estandarizadas de laboratorio. Se analiza y discute la existencia de una selección de clones con baja propensión en reproducción sexual, así como su aumento en su frecuencia debido a ventajas a corto plazo en una población natural. En el Capítulo 4, se describe la investigación realizada *ad hoc* del objetivo 2, donde se evalúan los costos de la tasa de mixis en una colección de genotipos de

B. plicatilis y su efecto en otros rasgos de la historia de vida. Se discute si los clones con alta tasa de mixis compensan sus costos con una mayor eficiencia, y el compromiso entre la tasa de mixis y el éxito reproductivo. En el Capítulo 5, se describen los resultados obtenidos de la investigación realizada para alcanzar el objetivo 3, donde se evalúa si la diversidad genética, resultado de la reproducción sexual, tiene algún efecto en los componentes de eficiencia en experimentos de crecimiento poblacional entre poblaciones experimentales de *B. plicatilis* genéticamente diversas vs. genéticamente uniformes, cuando estas poblaciones crecen separadas o en interacción entre ellas, y también, se presentan resultados sobre el compromiso entre una mayor tasa de mixis y la capacidad de carga.

Por último, en el Capítulo 6, se presenta una discusión general que complementa las discusiones detalladas realizadas en los Capítulos 3-5, y se enumera las principales conclusiones obtenidas de esta tesis. Cabe mencionar que, los Capítulos 3 al 5 corresponden a artículos que fueron publicados en revistas indizadas de circulación internacional (Anexo 1).

Capítulo 2

Material y metodologías generales

En este capítulo se describen los métodos generales que coinciden en más de un experimento y que fueron necesarios para alcanzar los objetivos del trabajo de tesis, por ejemplo, se explica el origen y establecimiento de los genotipos utilizados, la extracción de los huevos de resistencia, el cultivo de los rotíferos *B. plicatilis*, su identificación específica, los cultivos de soporte para alimentación, etc. Por otro lado, los métodos y procedimientos experimentales que son específicos para alcanzar cada objetivo se describen en cada capítulo (Capítulos 3 al 5), según corresponde.

Como ya se ha indicado en el Capítulo 1, los objetivos específicos fueron tres. Para cumplir el objetivo 1, se realizaron: a) bioensayos de reconocimiento de la propensión sexual durante una temporada de crecimiento planctónico en una población natural, b) se estimó la tasa de mixis y la densidad en la población natural, y c) se hicieron bioensayos de reproducción sexual en clones seleccionados para comprobar si la estabilidad de la propensión a la reproducción sexual se mantenía. Para alcanzar el objetivo 2, se realizó un experimento de tabla de vida en un jardín común para estimar la tasa de mixis y su relación con los rasgos de la historia de vida en una cohorte de la especie *B. plicatilis*. Para cumplir el objetivo 3, se realizó un experimento entre poblaciones genéticamente diversas vs. poblaciones monoclonales, en el

que se estimaron los componentes de eficiencia durante las dinámicas de crecimiento poblacional.

Poblaciones de estudio: origen de los genotipos

En esta tesis se utilizaron organismos de la especie biológica *B. plicatilis sensu stricto* (véase la descripción en el Capítulo 1) provenientes de diez cuerpos de agua salinas de España (Poza Sur, acrónimo: TOS; Hoya Turnera: HTU; Hoya Monte: HMT; Ontalafía: ONT; Hoya Yerba: HYB; Hoya Rasa: HYR; Saladar: SLD; Hondo Sur: HOS; Salobralejo: SAL y Turies: TUR). La selección de estos sistemas se basó en investigaciones anteriores donde se había registrado la presencia de la especie (Gómez *et al.*, 1995; Ortells *et al.*, 2000; García-Roger *et al.*, 2006a; Montero-Pau *et al.*, 2017). Para cumplir con el objetivo 1, se colectaron organismos vivos de Poza Sur y a la par se fijaron muestras cualitativas y cuantitativas. Para cumplir el objetivo 2, se obtuvieron clones eclosionados de huevos de resistencia de los diez cuerpos de agua, mientras que, los clones para los experimentos del objetivo 3 se extrajeron de huevos provenientes de Poza Sur (Tabla 1.1).

Los cuerpos de agua de donde provinieron los clones son, en general, ambientes salinos, someros, de pequeñas dimensiones y están sometidos a los cambios climáticos típicos de la región mediterránea española (Cirujano *et al.*, 1988; Franch-Gras *et al.*, 2017).

Tabla 1.1. Ubicación geográfica de los cuerpos de agua de donde provinieron los clones utilizados, según Google Earth (<https://earth.google.com/>). Se indica el tipo de muestra de donde se extrajeron los organismos y/o huevos diapáusicos. Se indican los autores que registraron la presencia de *B. plicatilis*: a) Gómez *et al.*, 1995; b) Gómez *et al.*, 2002; c) Ortells *et al.*, 2000; d) García-Roger *et al.*, 2006a; y e) Montero-Pau *et al.*, 2017.

Nombre	Acrónimo	Localización	Muestra de <i>B. plicatilis</i>
Hoya del Monte	HMT	38°50'44.87"N 1°26'38.70"E	Huevos de sedimentos ^e
Hondo Sur	HOS	38°10'00.4"N 0°44'00.7"E	Huevos de sedimentos ^{c, d}
Hoya Rasa	HYR	38°47'04.5"N 1°25'37.2"E	Huevos de sedimentos ^{d, e}
Hoya Turnera	HTU	38°46'31.0"N 1°24'39.1"E	Huevos de sedimentos ^e
Hoya Yerba	HYB	38°46'46.02"N 1°26'6.60"E	Huevos de sedimentos ^e
Ontalafía	ONT	38°43'16.6"N 1°46'16.9"E	Huevos de sedimentos ^e
Salobralejo	SAL	38°54'51.5"N 1°28'10.0"E	Huevos de sedimentos ^{b, c, d, e}
El Saladar	SLD	38°46'22.9"N 1°25'50.2"E	Huevos de sedimentos ^{b, c, e}
Turies	TUR	42°14'17.0"N 3°06'38.1"E	Huevos de sedimentos ^b
Poza Sur	TOS	40° 08' 42"N 0° 10' 03" E	Huevos de sedimentos ^{a, b, c, d} Organismos vivos Organismos fijados

Los lagos mediterráneos someros se caracterizan por la imprevisibilidad de sus aportes de agua y de su variabilidad física y composición química, además de estar altamente influenciados por su tamaño y profundidad (Blondel & Aronson, 1999; Quintana *et al.*, 2006). En la Tabla 1.2 se presentan algunas características de los diez cuerpos de agua registradas por varios autores, estos han sido clasificados como

semipermanentes cuando retienen algo de agua y pueden secarse durante una sequía extrema, o como estacionales si se llenan y se desecan cíclicamente cada año (García-Roger *et al.*, 2006a).

Tabla 1.2. Características generales de los cuerpos de agua estudiados. Se indica la fuente bibliográfica de donde se obtuvo la información: a) Cirujano *et al.*, 1988; b) Fernández *et al.*, 1990; c) Gómez, 1996; d) Moreno & Quintana, 1997; e) Alonso, 1998; f) Millán *et al.*, 2001; g) Rodrigo *et al.*, 2002; h) García-Roger *et al.*, 2006a; i) Franch-Gras *et al.*, 2018. El área está delimitada por la zona húmeda, según el BOE-A-2019-2841, a menos que se indique otra fuente.

Cuerpo de agua	Área (ha)	Profundidad (m)	Salinidad g/L ⁻¹	Patrón hídrico
HMT	7,62	12,9 ^h	9,4 ⁱ	Estacional ^b
HOS	228,0 ^g	0,6-1,0 ^g	11,0 ^g	Semipermanente ^h
HYR	10,020	<1 ^h	28 ^h -37,0 ⁱ	Estacional ^h
HTU	1,87	–	3,0 ⁱ	–
HYB	2,60	> 1m	5,03 ⁱ	Estacional ^b
ONT	71,82	1.0 ^f	5,4 ^f	Estacional ^f
SAL	47,69	≥ 1 ^h	6,3 ⁱ -17,4 ^h	Semipermanente ^h
SLD	9,27	<1 ^e	Salina ^a	Estacional ^a
TOS	0,00001 ^c	1,0 ^c	10-33 ^h	Estacional ^h
TUR	–	Somero ^d	0,64-44 ^d	–

Establecimiento de clones a partir de huevos diapáusicos

Los huevos diapáusicos depositados en los sedimentos son una mezcla potencial de diferentes especies, que incluyen diversos genotipos de varias generaciones y pueden sobrevivir en estado latente durante años o décadas (Marcus *et al.*, 1994; Kotani *et al.*, 2001; García-Roger *et al.*, 2006a, 2006b).

Los huevos diapáusicos se aislaron del sedimento utilizando la técnica de flotación en sacarosa líquida (Onbé, 1978; Gómez & Carvalho, 2000). Se resuspendieron 10 g de sedimento (peso húmedo) en 45 mL de solución de sacarosa ($1,75 \text{ mol L}^{-1}$) en tubos de centrifuga de 50 mL de capacidad. La mezcla se centrifugó durante 5 min a 12,6 RCF (unidades de fuerza centrífuga relativa). Los huevos que flotaron por la diferencia de densidad se concentraron usando una malla de $30 \mu\text{m}$. Los huevos putativos de *B. plicatilis* se seleccionaron bajo un microscopio estereoscopio Olympus (Olympus Corp., Tokio, Japón) de acuerdo con su morfología, tamaño (Ciros-Pérez *et al.*, 2001b) y si exhibían aspecto saludable (García-Roger *et al.*, 2006a)

Los huevos se seleccionaron al azar y se colocaron individualmente en placas de 96 pocillos (NuncTM) con $200 \mu\text{L}$ de agua marina artificial y en condiciones ambientales adecuadas para una máxima eclosión. En el caso del experimento de competencia (Capítulo 5) se eclosionaron a 15 g L^{-1} y con una iluminación de $150\text{-}170 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; mientras que para el experimento de historias de vida (Capítulo 4) se eclosionaron a 6 g L^{-1} , y una iluminación de $\sim 35 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Ambas condiciones fueron adecuadas para la eclosión de los neonatos necesarios para realizar los experimentos. La eclosión de los huevos se verificó a intervalos de 12 h.

Medio de cultivo, condiciones experimentales y alimentación

Los rotíferos capturados vivos o eclosionados de huevos de resistencia se cultivaron en condiciones óptimas en agua de mar artificial (Instant Ocean; Aquarium Systems, Sarrebourg Cedex, Francia). Los organismos

del experimento de selección (objetivo 1) y los de competencia (objetivo 3) crecieron a una salinidad de 12 g L^{-1} y a 18 °C de temperatura y en iluminación constante (PAR: aprox. $35 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Mientras que los individuos del experimento de historias de vida (objetivo 2) fueron cultivados en agua a una salinidad de 15 g L^{-1} y a 20 °C de temperatura, bajo iluminación constante de $150\text{-}170 \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Los rotíferos fueron alimentados con diferentes microalgas y a diferentes concentraciones, dependiendo del experimento (véanse los métodos específicos en los Capítulos 3 al 5). Las microalgas utilizadas difieren en tamaño, movilidad y calidad nutricional (Korstad *et al.*, 1989; Brown, 1991) a continuación se mencionan algunas de sus características y procedencia. *Tetraselmis suecica* (ovoide móvil, diámetro esférico equivalente [DEE] = $9 \text{ } \mu\text{m}$) proveniente de la Colección de Microalgas Marinas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Cádiz, España, *Isocrysis galbana* (esférica móvil, DEE = $5 \text{ } \mu\text{m}$), *Nannochloris atomus* (esférica no móvil, DEE = $2,5 \text{ } \mu\text{m}$), y *Nannochloropsis oculata* (esférica no móvil, DEE = $2 \text{ } \mu\text{m}$; cepas CCAP 927/1, CCAP 251/7, CCAP 849/7, respectivamente), procedentes de la Colección de algas y protozoos de la Asociación Escocesa de Ciencias del Mar, Oban, Escocia.

Las especies de microalgas se mantuvieron creciendo de forma individual y de manera exponencial en cultivos semicontinuos (tasa de dilución: $0,6\text{-}0,65 \text{ día}^{-1}$), el medio de cultivo consistió de agua de mar artificial (Instant Ocean®, Aquarium Systems) enriquecido con medio f/2 (Guillard & Ryther, 1962). Esta forma de cultivo permitió suministrar

alimentos de calidad constante a los rotíferos durante los experimentos. Las condiciones de salinidad, luz y temperatura fueron iguales a las de los cultivos de los rotíferos de cada experimento.

La densidad de las microalgas se estimó mediante curvas de calibración de densidad frente a la absorción considerando la extinción de luz de longitud de onda de 750 nm. La equivalencia del contenido de carbono por célula en las microalgas se estimó con un analizador elemental de conductividad térmica EA 1108 CHNS-O (Fisons Instruments), utilizando la técnica de combustión instantánea.

Identificación específica

Debido que *B. plicatilis* pertenece a un complejo de especies crípticas (Gómez *et al.*, 2000; Suatoni *et al.*, 2006), la identificación debe hacerse de manera cuidadosa tanto a nivel morfológico, como genético. En Poza Sur, *B. plicatilis* cohabita en simpatria con *B. ibericus* y *B. rotundiformis*. (Gómez *et al.*, 1995; Ortells *et al.*, 2003), pero, afortunadamente, su identificación puede hacerse de manera muy precisa, ya que la forma y tamaño del cuerpo lo permiten (Ciros-Pérez *et al.*, 2001b). Sin embargo, en los otros cuerpos de agua puede coexistir con la especie críptica *B. manjavacas*, la cual es imposible de discernir morfológicamente (Campillo *et al.*, 2005). Para la identificación fue necesario realizar un análisis de PCR-RFLP de fragmentos de citocromo c oxidasa subunidad I (COI) siguiendo el procedimiento estandarizado de Campillo *et al.* (2005), obtenidos de los clones establecidos para el experimento de historias de vida (objetivo 2).

Determinación del tipo sexual

La identificación del tipo reproductivo de los rotíferos puede realizarse a partir de la observación de las características de los huevos que acarrear las hembras. Los huevos asexuales son grandes y de color marrón claro, los huevos sexuales no fertilizados, que darán lugar a machos, son pequeños y de color marrón claro, mientras que los huevos sexuales fertilizados, que entrarán en diapausa, son grandes, de color marrón oscuro y con una cubierta gruesa (Carmona *et al.*, 1995). Por otro lado, para determinar el tipo reproductivo de las hembras sin huevo, estas se colocaron individualmente en pocillos (placa de poliestireno, NuncTM de 96 pocillos) que contenían 150 μ L de medio de cultivo (véanse detalles arriba), y se dejaron reproducir partenogénicamente en las condiciones generales de cultivo de cada experimento. Según el tipo de descendencia generada, fueron clasificadas como asexuales (que producen descendencia femenina) o sexuales (que producen descendencia masculina o huevos diapáusicos).

Capítulo 3

Selección de una baja inversión sexual en un rotífero partenogenético cíclico

Introducción

Como ya se mencionó en la Introducción general (Capítulo 1), la reproducción sexual juega un papel crítico en la estructura genética, en las tasas de adaptación y, en última instancia, en la evolución de una población (Bell, 1982; Hebert, 1987; Becks & Agrawal, 2012). Sin embargo, se ha determinado que sus costos son muy elevados, si consideramos un sistema de reproducción sexual vs. uno asexual, el primer tipo es muy costoso, debido a que se asignan recursos a la producción de machos, que no contribuyen al crecimiento de la población y solo fertilizan a las hembras (Maynard-Smith, 1971, 1978). Dada la aparición de individuos asexuales en las poblaciones, su ventaja numérica por el tipo de reproducción llevaría al predominio del rasgo y su fijación en la población (Burt, 2000; Peck & Waxman, 2000). Las especies con ciclos de vida complejos como la partenogénesis cíclica, tampoco se escapan del costo del sexo a pesar de que supuestamente aprovechan lo mejor de ambos modos reproductivos (Lynch & Gabriel, 1983; Simon *et al.*, 2002), pero, conservan la ventaja evolutiva de la recombinación y, al mismo tiempo, minimizan el costo de producir machos durante su fase asexual. Sin embargo, no están exentos de la aparición de mutantes asexuales y se abre la posibilidad de la pérdida de la fase sexual.

Los rotíferos partenogenéticos cíclicos como los monogonontes constituyen un buen modelo de estudio para investigar los principales factores responsables del mantenimiento del sexo (Peck & Waxman, 2000). Son invertebrados de pequeño tamaño (50–2000 μm) que viven en hábitats acuáticos y húmedos, a la fecha se conocen más de 1500 especies (Wallace *et al.*, 2006; Wallace & Smith, 2009). Constituyen una parte sustancial del zooplancton continental y gracias a sus tasas reproductivas altas, a menudo alcanzan densidades poblacionales elevadas (incluso, hasta 1000 individuos L^{-1}), y desempeñan una función primordial en las redes alimentarias acuáticas (Armengol *et al.*, 2001; Wallace & Smith, 2009). En latitudes templadas, las poblaciones de rotíferos son típicamente temporales, en muchos casos colonizan anualmente la columna de agua (temporada de crecimiento planctónico) al eclosionar los huevos diapáusicos de los sedimentos del lago (Gilbert, 1974; Pourriot & Snell, 1983) y pueden pasar múltiples generaciones durante la temporada del crecimiento poblacional. Como ocurre en la población de *B. plicatilis* que habita en Poza Sur y que ya ha sido analizada a lo largo de un ciclo anual (Carmona *et al.*, 1995).

El ciclo de vida de los rotíferos del género *Brachionus* (véanse detalles en el Capítulo 1; Fig. 1.2) implica un período de reproducción exclusivamente asexual, seguido de un período de inducción sexual en el que coexisten descendientes asexuales y sexuales (Gilbert, 1963; Snell & Boyer, 1988; Carmona *et al.*, 1993, 1994; Stelzer & Snell, 2003, 2006). Se ha demostrado que en *Brachionus* la inducción sexual es denso-dependiente, donde se necesitan alrededor de 0,1 individuos por mililitro para que algunas hembras tengan descendencia sexual

(Timmermeyer & Stelzer, 2006). Las hembras sexuales pueden generar machos, o huevos de resistencia, estos últimos podrían eclosionar después de un período de diapausa obligatorio o no (Hagiwara & Hino, 1989; Martínez-Ruiz & García-Roger, 2015), siempre y cuando las condiciones ambientales en la columna de agua sean adecuadas, reiniciando así una nueva temporada de crecimiento.

Entonces, el costo del sexo que opera dentro de la temporada de crecimiento anual está asociado a la producción de hembras sexuales, es decir, el costo de la latencia (Serra & King, 1999; Serra & Snell, 2009). Considerando el compromiso entre la reproducción sexual y asexual discutido en detalle en el Capítulo 1, podríamos hacer algunos supuestos. Por ejemplo, un clon de *Brachionus* podría iniciar su reproducción sexual a una densidad poblacional baja, es decir, cuando la concentración de la proteína inductora de la reproducción sexual (MIP) es baja. Esto conllevaría a un período prolongado de reproducción sexual durante el período de crecimiento planctónico anual, lo que resultaría en una tasa lenta de crecimiento clonal. Hay que recordar que, debido a la asociación entre la reproducción sexual y la latencia, ninguna de las hembras sexuales contribuye al crecimiento efectivo del clon, ya que solo producen machos o huevos diapáusicos. Por lo tanto, un clon que tuviera una propensión en reproducción sexual baja para iniciar el sexo y solo pudiera hacerlo a una densidad alta, se seleccionaría a favor durante la temporada de crecimiento, ya que evitaría el costo del sexo, y proliferaría rápidamente, incluso si esta característica implica una menor producción de huevos diapáusicos en comparación con la estrategia alternativa. Sin embargo, dado que la supervivencia a la próxima

temporada de crecimiento planctónico solo es posible a través de los huevos de diapausa, la selección entre años seleccionaría en contra al clon con baja inversión en sexo (Aparici *et al.*, 2001).

En este Capítulo, se aborda la hipótesis de que existe una variación heredable para la propensión en reproducción sexual en una población natural de un rotífero partenogenético cíclico, lo que puede conducir a una selección a corto plazo de clones con baja propensión sexual durante el período de crecimiento anual (es decir, el período en que la especie está presente en el plancton). Por lo que, se estudió la población del rotífero *B. plicatilis* que habita el estanque mediterráneo Poza Sur. En esta especie ya se ha registrado la variación genética en varios rasgos de reproducción sexual (Campillo *et al.*, 2009) y el momento en que ocurre la reproducción sexual (Aparici *et al.*, 2001). Además, existe una vasta base de datos ecológicos para la población de estudio (p. e., Gómez *et al.*, 1995), incluidos los períodos de crecimiento planctónico anuales (Gómez *et al.*, 1995; Ortells *et al.*, 2003) y, se sabe que los períodos de reproducción sexual son largos (Carmona *et al.*, 1995; Aparici *et al.*, 2002).

Métodos particulares

Colecta de clones

Se estudió la población de *B. plicatilis* del estanque Poza Sur del Prat de Cabanes Torreblanca, la cual se presenta en la columna de agua de septiembre a mayo (Gómez *et al.*, 1995; Ortells *et al.*, 2003). Se colectaron muestras cada ~15 días durante una temporada de crecimiento planctónico, desde el 29 de septiembre de 2006 hasta el 11

de mayo de 2007, momento en el que ya no se detectaron rotíferos (hasta 20.000 L muestreados). En cada muestreo se obtuvieron muestras de zooplancton vivo a través de lances horizontales con una red de malla de 30 μm de apertura de poro. Las muestras fueron resuspendidas en aprox. 1 L de agua del estanque para transportarlas al laboratorio. Además, se obtuvieron tres muestras cuantitativas de zooplancton en el punto medio y en los extremos este y oeste del eje más corto del estanque (siguiendo la dirección dominante del viento). Cada una de estas muestras se obtuvo filtrando 3 L de agua a través de una malla 30 μm , el material retenido se fijó con formaldehído con una concentración final del 4 %.

Determinación del patrón de propensión sexual en un ciclo anual

La propensión a la reproducción sexual en las hembras aisladas de *B. plicatilis* se estudió siguiendo el procedimiento modificado descrito en la literatura (Carmona *et al.*, 1993; Aparici *et al.*, 2001; Stelzer & Snell, 2003, 2006). De las muestras vivas de cada muestreo, en un lapso de ~4 h desde su recolección en el campo, se aislaron ~200 hembras de *B. plicatilis* con ayuda de un microscopio estereoscópico. Los rotíferos se colocaron individualmente en placas Petri con 60 mL de medio de cultivo (véanse, Capítulo 2) con una densidad de 500.000 células mL^{-1} de la microalga *Tetraselmis suecica* como alimento.

Desde el momento en que las hembras se aislaron en la placa Petri, comenzó un período de cultivo pre-experimental para: (1) replicar asexualmente los clones y (2) controlar las condiciones ambientales maternas que podrían afectar el tipo reproductivo de la descendencia.

Para el bioensayo se utilizó el criterio de la tercera generación cultivada en condiciones controladas (Stelzer & Snell, 2006). Por lo tanto, dos días después del aislamiento de las hembras iniciales (generación F_0), se transfirieron individualmente tres hijas asexuales portadoras de un sólo huevo de cada clon a placas Petri con 40 mL de medio fresco, y se dejaron reproducir. Para el bioensayo de la propensión a la reproducción sexual, después de dos días, se aisló una hembra recién nacida de cada placa (tres réplicas por clon) y se transfirió a un pocillo (placa Nunc™ de poliestireno de 24 pocillos) que contenía 0,5 mL de medio de cultivo. A estas neonatas se les permitió crecer y reproducirse, mientras se les monitoreaba cada 12 h, esperando la aparición del primer macho en cada cultivo. En esos momentos se registraron tanto la densidad y el tiempo de la primera aparición de machos (Aparici *et al.*, 2001). Lo que permitió estudiar la variación genética en la propensión a la reproducción sexual entre los diferentes clones. Cuando el primer macho aparece en el cultivo de laboratorio a densidades clonales bajas, es indicio de una alta propensión al sexo (*i. e.*, una alta inversión sexual). Se llevaron a cabo un total de 5.474 bioensayos como resultado de combinar 15 fechas de muestreo, un promedio de 158 ± 18 clones por evento de muestreo (entre 108 y 177 clones) y un promedio de $\sim 2,3$ repeticiones por clon.

Estimación de la tasa de mixis y la densidad poblacional

Para estimar la tasa de mixis se estimó la proporción de hembras sexuales en la población natural en cada evento de muestreo, para esto, de la muestra viva, se aislaron individualmente otras ~ 300 hembras en placas de 96 pocillos de *B. plicatilis* con ayuda de un microscopio

estereoscópico. Se determinó el tipo sexual de las hembras siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 2.

Las tres muestras cuantitativas de zooplancton fijadas sirvieron para contar las hembras de *B. plicatilis* y calcular su densidad poblacional (N_i) en cada evento de muestreo (i). Se estimó un promedio ponderado de la densidad con los recuentos de los tres puntos de muestreo del estanque (puntos medio, este y oeste); dados los resultados obtenidos, para el recuento del punto medio se asignó el doble del peso respecto de los otros dos puntos de muestreo. Siguiendo el procedimiento de Carmona *et al.* (1995), se calculó la inversión integrada en descendencia sexual de acuerdo con la Ecuación 1 con las estimaciones de la tasa de mixis y la densidad poblacional:

$$\frac{\sum_i d_i (m_i N_i + m_{i+1} N_{i+1})/2}{\sum_i d_i (N_i + N_{i+1})/2}$$

Ecuación 1

donde m_i y N_i son, la tasa de mixis y la densidad de la población, respectivamente, en el i -ésimo evento de muestreo y d_i es el número de días de i a $i + 1$.

Estabilidad de la propensión a la reproducción sexual en el laboratorio

De todos los clones analizados, se seleccionaron aquellos que exhibieron la aparición del primer macho en las densidades poblacionales más bajas y altas, denominados de aquí en adelante como SBD (sexo en baja densidad) y SAD (sexo en alta densidad), respectivamente, y se mantuvieron en cultivo de laboratorio para evaluar la estabilidad en su propensión a la reproducción sexual. Los bioensayos de reproducción

sexual se repitieron con 14 clones SBD y con 15 clones SAD cinco meses después de que finalizara el programa de muestreo. Los bioensayos siguieron el procedimiento descrito anteriormente, excepto que se realizaron en 15 mL de medio a 20 °C.

Análisis estadísticos

De los bioensayos de propensión a la reproducción sexual, se registró la densidad poblacional en la que apareció el primer macho y se transformó logarítmicamente (densidad-log). Con estos datos, se realizó un ANOVA anidado, donde el evento de muestreo se consideró como efecto fijo y clon como efecto aleatorio, anidado en el evento de muestreo. Se calculó la heredabilidad en sentido amplio (H^2) a partir del componente genético de la varianza (es decir, entre clones y la variación total dentro y entre clones) para cada evento de muestreo siguiendo el procedimiento descrito en Lynch & Walsh (1998) para organismos clonales.

Se realizaron análisis de correlación de Pearson con los datos de la densidad-log de la población natural contra la tasa de mixis en el campo, el promedio de la densidad-log en la aparición del primer macho y la H^2 . También, se realizaron análisis de regresión con la fecha de muestreo frente a la variación del promedio de la densidad-log en la aparición del primer macho y la heredabilidad.

Las diferencias entre los clones SBD y SAD se probaron con un ANOVA de efectos fijos sobre la densidad-log observada en la aparición del primer macho, analizando el efecto de tipo de clon (SBD o SAD), y

clon anidado dentro de tipo de clon. Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS, versión 14.0 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU).

Resultados

Población natural

La densidad poblacional natural de *B. plicatilis* en Poza Sur varió de 0,17 a 2.280 hembras L⁻¹, y presentó una tendencia a la baja durante el período de estudio del 29 de septiembre de 2006 al 11 de abril de 2007 (Fig. 3.1). La tasa de mixis más elevada se registró en el primer evento de muestreo (38 %), y disminuyó en el transcurso del estudio. En cinco de los seis últimos muestreos no se observaron hembras sexuales, periodo en que se registró una densidad poblacional inferior a 3 hembras L⁻¹.

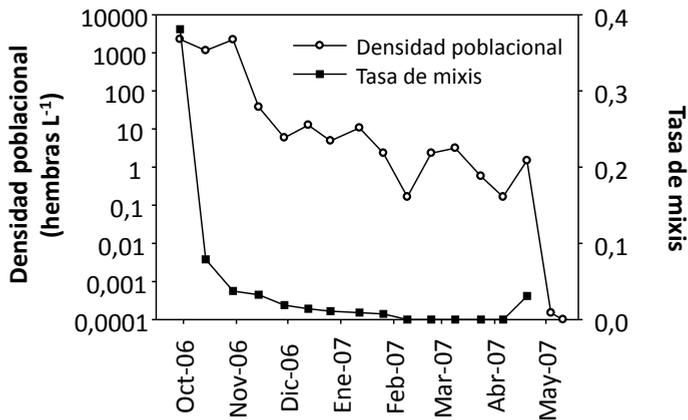


Figura 3.1. Densidad poblacional (log hembras L⁻¹) y tasa de mixis poblacional (proporción de hembras sexuales) de *B. plicatilis* en Poza Sur durante el periodo de estudio (del 29 de septiembre de 2006 al 20 de abril de 2007). Los muestreos consecutivos posteriores al 20 de abril de 2007 presentaron una densidad poblacional inferior a 5×10^{-5} hembras L⁻¹.

La tasa de mixis se correlacionó significativamente con la densidad poblacional ($r = 0,64$, $t_{13} = 2,98$, $P = 0,005$). La relación entre el número integrado de hembras sexuales y el número integrado de hembras totales (es decir, la estimación de la tasa de mixis integrada en la población) fue de 0,130.

Propensión en reproducción sexual

Los resultados de la propensión a la reproducción sexual en clones aislados de la población de *B. plicatilis* de Poza Sur mostraron una amplia variabilidad, que fue de 4 a 477 hembras ml L⁻¹ (promedios entre las réplicas). En cuanto al tiempo en que apareció el primer macho este fue de 2,5 a 10 días (promedio entre las réplicas). Estas densidades difirieron significativamente entre los clones dentro de evento de muestreo, así como entre los eventos de muestreo (Tabla 3.1). Estos resultados muestran que hay una variación genética en este rasgo y cambios en el componente genético de la densidad a la que se producen los machos.

Tabla 3.1. ANOVA anidado de las densidades (log-hembras L⁻¹) en las que apareció el primer macho.

Fuente de variación	SC	g. l.	CM	Valor F
Evento de muestreo	145,63	14	10,40	122,01*
Clon (evento de muestreo)	219,49	2359	0,09	2,67*
Error	107,89	3100	0,04	-

* $P < 0,001$.

La frecuencia de los clones que tuvieron densidades poblacionales altas cuando ocurre la primera aparición del primer macho fue aumentando durante la temporada de crecimiento

planctónico (Fig. 3.1); por ejemplo, el clon con la densidad más alta se aisló al final de la temporada de crecimiento planctónico, el 6 de abril de 2007. Consistentemente, la densidad poblacional cuando apareció el primer macho aumentó a más del doble durante la temporada de crecimiento, y presentó una relación positiva con el evento de muestreo (Fig. 3.2, $r^2 = 0,36$, $F_{1,13} = 7,18$, $P = 0,019$), cabe mencionar que también se obtuvieron resultados significativos cuando se usaron todos los clones o todas las réplicas, en lugar de los promedios. Además, la densidad poblacional promedio cuando apareció el primer macho se correlacionó negativamente con la densidad poblacional en el campo ($r = -0,57$, $t_{13} = -2,47$, $P = 0,014$).

Heredabilidad

La heredabilidad en sentido amplio de la densidad poblacional en la primera aparición del primer macho estimada en el laboratorio varió de 0,18 a 0,57, y mostró un incremento del doble en su valor durante el período de muestreo (Fig. 3.3, $r^2 = 0,32$, $F_{1,13} = 6,16$, $P = 0,027$). También se observó que la heredabilidad se correlacionó negativamente con la densidad poblacional registrada en el campo ($r = -0,50$, $t_{13} = -2,06$, $P = 0,030$).

Estabilidad de la propensión sexual

Los resultados del experimento de la estabilidad de la propensión a la reproducción sexual realizado en clones con sexo en baja densidad (SBD) y en alta densidad (SAD) presentaron diferencias significativas entre los dos tipos de clones, después de ser mantenidos durante cinco meses

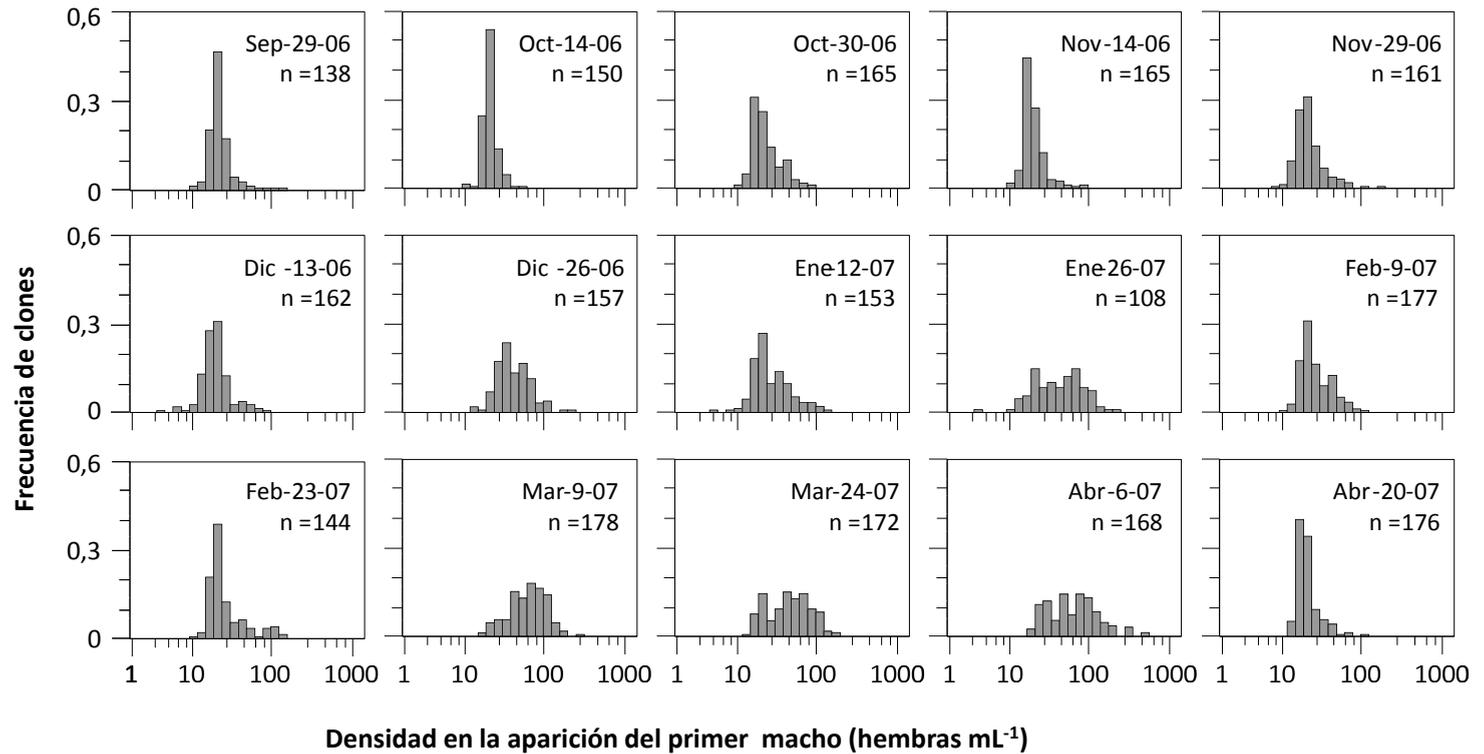


Figura 3.1. Distribución de frecuencias de la densidad poblacional durante la aparición del primer macho en clones aislados de Poza Sur en 15 muestreos a lo largo de un período de crecimiento planctónico. Se indica el número de clones (*n*).

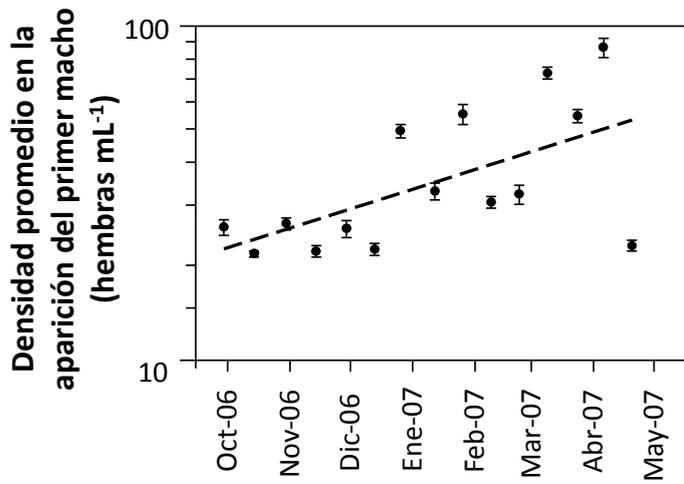


Figura 3.2. Densidad poblacional en la aparición del primer macho durante el período de estudio (del 29 de septiembre de 2006 al 20 de abril de 2007). Los valores son promedios entre clones; las barras de error son \pm SE.

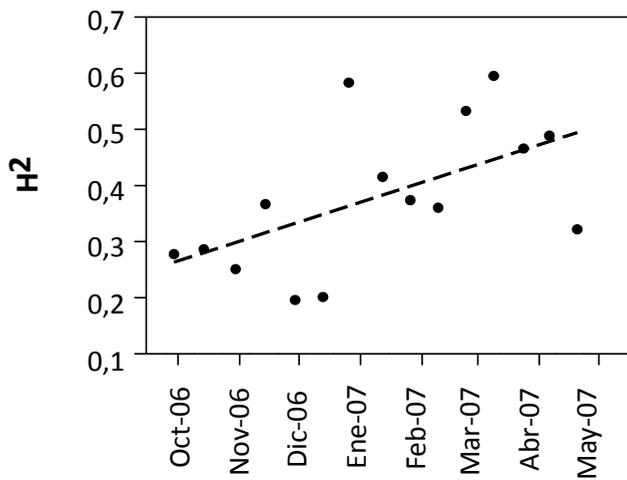


Figura 3.3. Heredabilidad en sentido amplio (H^2) durante el período de estudio (29 de septiembre de 2006 al 20 de abril de 2007).

bajo condiciones de laboratorio (Tabla 3.2). Sin embargo, las densidades en la aparición del primer macho registrada en este análisis fueron más bajas que las observadas en los mismos clones justo después de su aislamiento del campo. El promedio de los clones SBD fue de $8 \pm 1,8$ hembras mL^{-1} , con un rango de 2,2–30 hembras mL^{-1} , mientras que los clones SAD tuvieron un promedio de $31,7 \pm 9,2$ hembras mL^{-1} , con un rango de 7,8–149,7 hembras mL^{-1} .

Tabla 3.2. ANOVA anidado de la densidad en la aparición del primer macho (log-hembras L^{-1}) y tipo de clon (SBD = sexo en baja densidad, SAD = sexo en alta densidad) como efecto principal.

Fuente de variación	SC	g. l.	CM	Valor-F
Tipo de clon	7,62	1	7,62	310,89*
Clon (tipo de clon)	9,41	27	0,35	14,21*
Error	1,96	80	0,03	-

* $P < 0,001$.

Discusión

Durante este estudio, la población de *B. plicatilis* que habita Poza Sur estuvo presente en la columna de agua en otoño, invierno y primavera, con las densidades más bajas durante primavera. Este patrón es consistente con lo observado en estudios previos (Gómez *et al.*, 1995; Aparici *et al.*, 2002; Lapesa, 2004). Poza Sur, generalmente, se seca durante el verano, y aunque la población alcanzó la densidad más alta el 29 de septiembre de 2006 (es decir, el primer evento de muestreo), esta fecha debería estar muy cercana al momento de la recolonización de la columna de agua reportada en estudios anteriores (Gómez *et al.*, 1995;

Aparici *et al.*, 2002), por lo tanto, es muy probable que el programa de muestreo haya abarcado toda la temporada de crecimiento planctónico.

La tasa de mixis se correlacionó positivamente con la densidad poblacional, lo cual está de acuerdo con un mecanismo dependiente de la densidad, donde el sexo se induce cuando los rotíferos producen una señal química que se acumula en el ambiente. La tasa de mixis integrada de la población de *B. plicatilis* durante todo el período de crecimiento (0,130) es muy similar al valor (0,124) estimado en un estudio previo (Carmona *et al.*, 1995). De acuerdo con estos hallazgos, la población de *B. plicatilis* en Poza Sur tuvo un período prolongado de reproducción sexual (Carmona *et al.*, 1995; Aparici *et al.*, 2002). El cual debería brindar una oportunidad para que ocurra la selección de clones con baja inversión en sexo en el corto plazo, lo que se ajusta a la hipótesis que se planteó en este capítulo de la tesis, es decir, la aparición del primer macho a una densidad poblacional alta es indicativa de una baja propensión en reproducción sexual, ya que el crecimiento partenogenético durará más tiempo.

Esta densidad poblacional cuando aparece el primer macho cuantificada en el laboratorio y que es indicativa de la inversión sexual, (expresada como su propensión sexual) debería ser diferente a la que se observa en las poblaciones naturales, la cual suele ser mucho más baja, debido, en parte, a que en el laboratorio las condiciones ambientales controladas favorecen tasas de crecimiento más altas que ayudan a que existan densidades poblacionales máximas (Carmona *et al.*, 1995;

Schröder, 2001), a pesar de esto, se espera que ambas densidades estén correlacionadas.

Los resultados de heredabilidad registradas en esta tesis demuestran que la población de *B. plicatilis* que habita Poza Sur presenta variabilidad genética en su propensión a la reproducción sexual, lo cual coincide con la evidencia descrita en esta misma población previamente. Aparici *et al.* (2001) detectaron una variación heredable en la propensión a iniciar el sexo entre clones provenientes de huevos diapáusicos aislados del sedimento en este cuerpo de agua. También se detectó una variación heredable en los niveles de reproducción sexual en otro estudio sobre la adaptación local de seis poblaciones naturales de *B. plicatilis*, que incluyó a Poza Sur (Campillo *et al.*, 2009). La variabilidad heredable en la inversión sexual ha sido observada en otras especies. Por ejemplo, en un estudio sobre la dinámica evolutiva de poblaciones experimentales de *B. calyciflorus* creciendo en cultivos de flujo continuo (quemostatos), se encontró que la población fundadora presentaba una variación genética para la propensión a reproducirse sexualmente (Fussmann *et al.*, 2003). En otros partenogénéticos cíclicos, como los cladóceros que habitan en ambientes efímeros se ha descrito que existe una variación en la inversión en reproducción sexual (p. e., Ruvinsky *et al.*, 1986; Larsson, 1991; Innes & Dunbrack, 1993; Innes & Singleton, 1994; Deng, 1996; Innes *et al.*, 2000). Además, otros estudios experimentales con cladóceros sugieren que la variabilidad observada tiene un componente genético significativo (Innes & Dunbrack, 1993; Innes & Singleton, 1994; Innes *et al.*, 2000). También, en el caso de áfidos partenogénéticos

cíclicos, se ha descrito que existen diferentes niveles de inversión en sexo dentro de la misma población (Rispe *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos aquí muestran niveles altos de heredabilidad para la propensión en reproducción sexual. Sin embargo, la heredabilidad en sentido amplio medida en el laboratorio, donde se controla el ruido ambiental, es probablemente mucho más alta que la que debe ocurrir en el campo. Aunque el procedimiento pre-experimental que se realizó buscaba minimizar los efectos maternos, aun así, pudieron presentarse y aumentar las estimaciones de heredabilidad, dado que se sabe que los efectos maternos se pueden prolongar por varias generaciones después de la eclosión del huevo diapáusico en otra especie del género *Brachionus* (Gilbert, 2002, 2003; Seudre *et al.*, 2020). Aunque también hay que considerar que las hembras recién nacidas de estos huevos tienen características reproductivas particulares que difieren de las hembras partenogénicas (Gilbert & Schröder, 2004). A pesar de estas circunstancias, es probable que la heredabilidad en sentido amplio sea biológicamente significativa en la población de *B. plicatilis* de Poza Sur y se presente de manera similar en la naturaleza, creando así una oportunidad para que actúe la selección natural. Además, se debe tener en cuenta que, durante la temporada de crecimiento planctónico, el genoma de una hembra de rotífero es heredado en su totalidad por sus hijas, por lo tanto, la selección trabaja sobre la variabilidad genética total. Por lo tanto, la heredabilidad en sentido amplio, más que la heredabilidad en sentido estricto, en este caso, es la medida de la variabilidad genética que tiene

sentido para la selección natural (Lynch & Walsh, 1998). Adicionalmente, se probó que la variabilidad genética en la propensión a la reproducción sexual se mantuvo estable después de cinco meses desde el aislamiento de los clones, al analizar dos subconjuntos de clones que presentaron valores extremos de densidad en su inducción sexual (*i. e.*, SBD y SAD) justo después de su aislamiento del campo.

Los resultados sugieren que la propensión genética a reproducirse sexualmente en la población de *B. plicatilis* disminuye con el tiempo. Es importante resaltar que, esta fue la primera vez que se puso en evidencia este patrón de selección en una serie de tiempo en una población natural de organismos partenogenéticos cíclicos. Según el análisis de regresión, la densidad promedio en la aparición del primer macho, medida después de controlar los factores ambientales, aumentó de 22,4 a 56,7 hembras L⁻¹ en 204 días. Esto sugiere una selección de una baja propensión en sexo durante la temporada de crecimiento planctónico. La aparición de machos en densidades poblacionales altas en entre los clones podría explicarse por varias razones: (1) si la tasa de producción de la señal química que dispara el inicio del sexo (es decir, la MIP) es baja. Si fuera así, los clones SAD detectados en el laboratorio podrían tener una inversión sexual alta en la naturaleza, siempre y cuando los clones conoespecíficos coexistentes produjeran la MIP en lugar de ellos, a una mayor velocidad. En este caso, la ventaja selectiva de los clones SAD en el campo podría ser el ahorro del costo de la producción de la MIP, con lo que esta ventaja favorecería el dominio del rasgo de una baja propensión sexual en la población. Sin embargo, es más probable que el mecanismo que provoque una alta densidad en la

primera aparición de machos implique, (2) una baja capacidad de respuesta a la MIP, resultado de la presencia de alelos que afecten a los receptores de la MIP. Este otro mecanismo implicaría una gran ventaja a corto plazo al evitar el costo del sexo. Por ejemplo, si consideramos que el costo del sexo en los rotíferos, durante una estación de crecimiento planctónico, puede ser cuantificado como la proporción de hembras sexuales, entonces, p. e., un clon con una tasa de mixis del 10 % proliferaría a una velocidad 10 % menor que un clon asexual dada su menor capacidad de respuesta a la MIP. Alternativamente, (3) el aumento en la frecuencia de clones SAD durante la temporada de crecimiento planctónico podría estar reflejando la selección de clones adaptados al hacinamiento, es decir, que estos clones indujeran el sexo cuando alcanzan su densidad clonal máxima que coincidiría con las densidades poblacionales naturales altas. Sin embargo, esta interpretación no es consistente con el hallazgo de la correlación negativa entre la densidad en la aparición del primer macho y la densidad poblacional en el campo.

De acuerdo con lo anterior, la evidencia de una disminución en la propensión genética para iniciar el sexo en una población natural durante la temporada de crecimiento planctónico respalda la hipótesis de que la selección de clones con baja propensión en sexo debe ser importante. Entonces, si existe una variación genética para la inversión sexual, el compromiso entre reproducción sexual y asexual (Snell, 1987; Serra & King, 1999) se evidencia con el incremento en la frecuencia de clones con baja inversión sexual a lo largo del tiempo.

Ya que la propagación clonal en estos organismos depende de la reproducción asexual, la selección de una reproducción asexual exclusiva puede ser posible en las poblaciones en las que el período de reproducción sexual es lo suficientemente largo, dado que el sexo tiene un costo elevado. De acuerdo con esta predicción, se ha observado una pérdida irreversible de reproducción sexual en cultivos de laboratorio de rotíferos (Boraas, 1983; Bennet & Boraas, 1989; Fussmann *et al.*, 2003; Stelzer, 2008). La pérdida de sexo también se ha registrado en áfidos y cladóceros (p. e., Hebert, 1987; Moran, 1992; Colbourne & Hebert, 1996; Simon *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayoría de las poblaciones de rotíferos solo habitan los cuerpos de agua durante períodos restringidos a lo largo del año, cuando las condiciones ambientales son adecuadas. En estas poblaciones temporales, como ocurre con frecuencia en cladóceros y áfidos, las estructuras diapáusicas producidas sexualmente son necesarias para sobrevivir entre las estaciones de crecimiento. La necesidad de estructuras de resistencia actúa en oposición al régimen selectivo que ocurre durante la temporada de crecimiento, proporcionando así una ventaja importante sólo a corto plazo para el mantenimiento del sexo (Simon *et al.*, 2002).

El aumento en el promedio de la densidad en la aparición del primer macho durante la temporada de crecimiento planctónico parece estar relacionado con el aumento en la varianza de este parámetro. Los genotipos que presentaron una alta densidad a la aparición del primer macho fueron indetectables al comienzo de la temporada de crecimiento planctónico, pero aumentaron en frecuencia conforme avanzó el tiempo. En consecuencia, la heredabilidad en sentido amplio

también aumentó durante el período de estudio, que sería lo esperado si la selección favoreciera a genotipos que inicialmente fueran muy raros. Sin embargo, es sorprendente que, a pesar de que la inversión sexual es elevada en esta población (p. e., se observó una tasa de mixis de hasta 38 %), lo cual puede representar un costo muy alto, y la que la heredabilidad para la variación en la inversión sexual detectada en el laboratorio fue alta, no se observara una disminución mucho mayor en la propensión genética para la reproducción sexual. Esta situación podría ser explicada de varias maneras. En primer lugar, como se mencionó antes, probablemente sobreestimamos la heredabilidad expresada en el campo. En segundo lugar, pudo ser probable que el período de selección para la baja inversión en sexo no fue lo suficientemente largo, y la selección solo ocurrió cuando la población de *B. plicatilis* se encontraba reproduciendo sexualmente, entonces, el periodo de selección fue más corto que el periodo completo de crecimiento planctónico, como se observó en campo. En tercer lugar, si los genotipos con una alta propensión sexual (SBD) tuvieran una tasa de mixis baja, reducirían el costo del sexo asociado, aunque respondan temprano a la MIP. Sin embargo, Seudre *et al.* (2020) describen que algunos de los clones que ellos analizaron respondieron a densidades bajas en la primera aparición de machos y coincidían con presentar una tasa de mixis alta, lo cual implica un costo alto. En caso de que se cumplieran algunos de estos tres supuestos, la selección contra una menor capacidad de respuesta a la MIP podría ser más débil de lo esperado. Finalmente, también se ha documentado que la diversidad clonal disminuye a lo largo del período de crecimiento planctónico en la población de *B. plicatilis* de Poza Sur

(Gómez & Carvalho, 2000), además, de que la diversidad genética baja se ha asociado con temporadas largas de crecimiento planctónico en otras poblaciones de *Brachionus* (Ortells *et al.*, 2006). Entonces, se esperaría que los genotipos que inician el sexo a bajas densidades poblacionales, es decir, al inicio del período de crecimiento planctónico, produzcan huevos diapáusicos genéticamente más diversos que los que retrasan el sexo. Esto permite que los primeros retengan de manera más efectiva las ventajas que ofrece la recombinación y compensen parcialmente el costo alto del sexo (véase, p. e., de Bell, 1982; Hurst & Peck, 1996; West *et al.*, 1999; Tagg *et al.*, 2005).

Una pregunta que surge de los resultados de este estudio es, ¿cómo se mantiene la variabilidad genética en el rasgo de la propensión al sexo en una población de rotíferos a largo plazo? Primero, hay que considerar que una población temporal de partenogenéticos cíclicos se puede concebir como un conjunto de variantes genéticas con posibilidades de reproducción sexual, los cuales producirán huevos diapáusicos por recombinación lo que conducirá a la variabilidad en diversos rasgos, de estos genotipos solo algunos eclosionarán en la siguiente temporada de crecimiento (*i. e.*, los clones tienen generaciones sexuales discretas) (Gómez & Carvalho, 2000). Dado que la producción de huevos depende tanto de su propensión sexual ante el nivel umbral de la MIP, así como de su la tasa de mixis, se esperaría que evolucione un patrón optimizado dependiendo del escenario ecológico (Serra *et al.*, 2004). Sin embargo, el análisis teórico de la producción de huevos diapáusicos ha demostrado que se puede mantener una diversidad genética sustancial en hábitats con una duración

impredecible de las estaciones (Spencer *et al.*, 2001). Entonces, se puede conjeturar que la variación en la duración del período de crecimiento planctónico entre años puede ser la causa de la variación subyacente en la propensión genética para el sexo que tiene *B. plicatilis* en Poza Sur. Hay que tener en cuenta que este estanque se encuentra en el área mediterránea, que se caracteriza por una alta variación temporal en las condiciones ecológicas (Blondel & Aronson, 1999) y que se magnifican por su tamaño pequeño. Dicha incertidumbre ambiental debe afectar las condiciones bióticas (competidores y depredadores) y abióticas (salinidad, temperatura, etc.) que permiten el crecimiento de estos rotíferos. En este escenario, una alta propensión al sexo sería ventajosa si la duración de la temporada de crecimiento fuera inesperadamente corta en un año determinado y, viceversa, una propensión baja al sexo aumentaría los beneficios en años con una temporada de crecimiento más larga.

El sexo en partenogenéticos cíclicos está vinculado a una función ecológica, es decir, la diapausa y la capacidad de resistir las condiciones adversas, este hecho modifica el régimen selectivo en el mantenimiento del sexo. La pérdida de sexo se ve favorecida cuando no es necesario entrar en diapausa, mientras que los períodos adversos promueven el mantenimiento del sexo. La obligatoriedad de soportar condiciones adversas proporciona una restricción en el mantenimiento del sexo, independientemente de la diversidad genética o cualquier otra ventaja que el sexo pueda ofrecer.

Capítulo 4

Evidenciando el costo de la reproducción sexual en el rotífero *Brachionus plicatilis*

Introducción

En este Capítulo se analiza el supuesto de *todo lo demás es igual*. Considerando la idea original de que la reproducción sexual es costosa debido a la producción de machos, entonces, una población de asexuales tendría una doble ventaja de eficiencia sobre sus contrapartes sexuales (Maynard-Smith, 1971, 1978; Williams, 1975; Bell, 1982). En el supuesto de *todo lo demás es igual*, si las hembras sexuales y asexuales tienen historia de vida equivalentes, el costo del sexo sería evidente (Jokela *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 2017), a menos que existan violaciones al supuesto.

Algunas investigaciones han reportado que las hembras asexuales tienen un éxito reproductivo menor o una mayor tasa de mortalidad que las hembras sexuales, implicando un menor costo que lo predicho por el supuesto mencionado (p. e., Roth, 1974; Lamb & Willey, 1979; Wetherington *et al.*, 1987; Corley & Moore, 1999; Kramer & Templeton, 2001; Neiman, 2004; Kearney & Shine, 2005). No obstante, la base de estas diferencias entre los tipos reproductivos aún no se comprende del todo (Lehtonen *et al.*, 2012). Algunos estudios empíricos sugieren algunas explicaciones como constricciones del desarrollo asociadas con la reproducción asexual, presiones selectivas divergentes sobre los linajes sexuales y asexuales que dan como resultado diferentes estrategias

reproductivas, susceptibilidad a la acumulación de mutaciones perjudiciales, y a la incapacidad de generar descendencia genéticamente distinta o novedosa en asexuales. Además, hay que tener en cuenta que estos mecanismos explicativos dependen del sistema biológico que se estudia.

La medición directa del costo del sexo es un desafío (Gibson *et al.*, 2017), por eso, la mayoría de los estudios empíricos realizados han abordado indirectamente el tema poniendo a prueba el supuesto *todo lo demás es igual*, comprobando si difieren las características de la historia de vida entre las hembras sexuales y asexuales. Por lo que, esta será la aproximación utilizada en este capítulo, pero en un modelo biológico con reproducción partenogenética cíclica.

Considerando que en el ciclo de vida de los rotíferos monogonontes la reproducción sexual requiere la producción de hembras sexuales que no contribuyen al crecimiento inmediato de la población, ya que producen machos o huevos de diapausa, se prevé que si el supuesto de *todo lo demás es igual* ocurre, entonces, los monogonontes incurrirán en el doble costo del sexo durante la fase sexual de su ciclo de vida (Serra & Snell, 2009). Esto puede ocurrir como resultado de la expectativa de que solo la mitad de las hembras sexuales producirá huevos de diapausa (Aparici *et al.*, 1998, 2002). Los organismos partenogenéticos cíclicos son útiles para evaluar el supuesto costo del sexo porque proporcionan un sistema biológico en el que ambos modos de reproducción coexisten en la misma población (Green & Noakes, 1995; Simon *et al.*, 2002; Wolinska & Lively, 2008; Stelzer, 2015). Además, en muchos partenogenéticos cíclicos en los que la transición de la

sexualidad a la asexualidad obligada es reciente, permite la comparación entre ambos linajes (p. e., Lynch, 1984; Decaestecker *et al.*, 2009; Serra & Snell, 2009; Stelzer, 2011, 2015). Sin embargo, en contraste con el desarrollo teórico importante, los estudios empíricos sobre el costo del sexo en los organismos partenogenéticos cíclicos son escasos. Algunos estudios empíricos han probado el supuesto de *todo lo demás es igual* mediante la comparación de los rasgos de la historia de vida de partenogenéticos cíclicos contra otros modos reproductivos. Por ejemplo, (1) partenogenéticos cíclicos vs. linajes asexuales obligados en el rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766 (Stelzer, 2011), en el áfido *Sitobion avenae* Fabricio 1975 (Helden & Dixon, 2002) y en el cladócero *Daphnia pulex* Leydig 1860 (Scheiner & Yampolsky, 1998; Innes *et al.*, 2000; Wolinska & Lively, 2008), y (2) los dos modos anteriores de reproducción vs. linajes asexuales que mantienen la capacidad de producir machos en *D. pulex* (Wolinska & Lively, 2008). Los resultados de estas comparaciones arrojaron conclusiones contrastantes. Un par de estudios mostraron que los partenogenéticos cíclicos y los asexuales obligados no presentan diferencias en su supervivencia y fecundidad (Scheiner & Yampolsky, 1998; Stelzer, 2011), mientras que en otros se reporta que los partenogenéticos cíclicos tienen menor (Wolinska & Lively, 2008) o mayor fecundidad (Innes *et al.*, 2000) que sus contrapartes asexuales. Es importante señalar que varios de estos estudios fueron complementados con experimentos pareados de competencia donde fueron cultivados juntos organismos con los diferentes modos reproductivos (Wolinska & Lively, 2008; Stelzer, 2011; Innes & Ginn, 2014). Los resultados experimentales también fueron diversos. Por ejemplo, los linajes asexuales invadieron y desplazaron a los organismos

partenogenéticos cíclicos de *B. calyciflorus*, mientras que en *D. pulex* se observó lo contrario. Estos resultados contrastantes sugieren que el costo de sexo podría variar ampliamente entre taxones (Meirmans *et al.*, 2012). Por lo tanto, estimar el costo es un punto de partida decisivo para abordar la paradoja del sexo en cualquier especie o grupo de especies (Gibson *et al.*, 2017).

Además de los enfoques basados en la comparación de linajes independientes que poseen diferentes modos reproductivos, una alternativa es comparar hembras partenogenéticas cíclicas individuales (Corley & Moore, 1999). Los rotíferos partenogenéticos cíclicos ofrecen un sistema único para abordar el costo del sexo, porque las hembras individuales conservan la capacidad de invertir simultáneamente tanto en la reproducción sexual como en la asexual (Gilbert, 1974; Schröder, 2005). Recordemos que la cuantificación de la proporción de hembras sexuales producidas (tasa de mixis) es una de las formas de medir la inversión en sexo (Serra & Snell, 2009). Se sabe que la tasa de mixis en *Brachionus* es extremadamente variable entre clones que representan diferentes genotipos (p. e., Snell & Boyer, 1988; Carmona *et al.*, 1994, 1995, 2009; Gilbert, 2002; Schröder & Gilbert, 2004; Gilbert & Schröder, 2007; Gilbert & Diéguez, 2010; Stelzer, 2017). La expectativa bajo el supuesto de *todo lo demás es igual* es que los genotipos que invierten más en hijas sexuales durante la temporada de crecimiento planctónico tendrán tasas más lentas de crecimiento clonal. Sin embargo, la suposición podría no cumplirse si dichos genotipos tienen una mayor fecundidad y/o supervivencia, como se ha reportado en otros partenogenéticos cíclicos (p. e., Innes *et al.*, 2000).

En este capítulo, se realizaron experimentos diseñados específicamente para evaluar la suposición de *todo lo demás es igual* mediante el análisis de los rasgos de la historia de vida (RHV) de hembras con genotipos individuales que comparten el mismo modo de reproducción (partenogénesis cíclica), utilizando al rotífero *Brachionus plicatilis* O. F. Müller 1786. La variabilidad en la inversión sexual entre diferentes clones en poblaciones naturales de la especie está bien documentada (Aparici *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2009; Campillo *et al.*, 2011; Franch-Gras *et al.*, 2017) de modo que se espera que los genotipos estudiados inviertan de manera diferente en reproducción sexual.

Para evaluar la existencia de diferencias en las historias de vida, se realizó un experimento de tabla de vida dinámica, donde se siguió una cohorte de hembras madre de *B. plicatilis* (*i. e.*, nacidas de huevos diapáusicos) para probar si los genotipos que invierten más en hijas sexuales (*i. e.*, productoras de machos y productoras de huevos diapáusicos) pueden compensar esta inversión al tener una mayor fecundidad y/o supervivencia. Se analizó la inversión sexual y su correlación con otros rasgos de la historia de vida estimados a partir de los cálculos de la tabla de vida. Se parte del supuesto que, si la inversión en la reproducción sexual no está correlacionada positivamente con los parámetros mencionados, quiere decir que no hay compensación y, por lo tanto, el sexo tendrá un costo y la explicación del mantenimiento del sexo debería ser explicado por otros beneficios compensatorios.

Métodos particulares

Diseño experimental y establecimiento de clones

Para el analizar las historias de vida se realizó un experimento de tabla de vida de cohorte con hembras neonatas eclosionadas de huevos diapáusicos de *B. plicatilis* provenientes de diez cuerpos de agua españoles (1-6 genotipos por cuerpo de agua; véanse detalles en el Capítulo 2). Con este diseño se buscó que la cohorte tuviera la variabilidad genética intrínseca de la especie, ya que estos huevos representan genotipos individuales por ser producto de reproducción sexual.

Estudio de los rasgos de la historia vital en clones con diferente asignación en reproducción sexual

Se realizó un experimento de tabla de vida con una cohorte de 45 genotipos de *B. plicatilis* (generación F_0 ; véase la Fig. 4.1). El experimento de jardín común comenzó transfiriendo individualmente cada neonata (*i. e.*, la hembra madre, ≤ 12 h de edad) a una placa Petri con 15 mL de medio de cultivo ($0,07$ hembras mL^{-1}) que contenía una concentración de algas equivalente a 8 mg C L^{-1} (~ 42.000 células mL^{-1}), concentración que está muy por encima del nivel de limitación de recursos (Ciros-Pérez *et al.*, 2001a). Los cultivos experimentales que contenían una hembra madre se colocaron al azar en el interior de cámaras húmedas (recipientes con tapa de $30 \times 40 \times 10$ cm, con un fondo de papel humedecido con agua destilada). Para favorecer la mezcla de las algas y del medio, los recipientes se pusieron sobre un agitador orbital (~ 28 rpm) a 20 °C y en oscuridad. Los cultivos se revisaron cada 24 h para registrar la supervivencia de las hembras originales (F_0), hacer el recuento de sus hijas (F_1) y transferirlas para saber su tipo sexual (en la generación F_2 ; Fig. 4.1).

Diariamente, se renovó el 15 % del cultivo con medio fresco con alimento. Cabe aclarar que, dado que la densidad de la madre y sus descendientes (generaciones $F_0 + F_1$) fue continuamente baja en los cultivos ($<0,67$ hembras mL^{-1}) y el medio de cultivo se renovaba parcialmente, la concentración del alimento en los cultivos nunca estuvo limitado durante el experimento. Por otro lado, la renovación parcial del medio de cultivo permitió que el factor inductor del sexo (MIP; proteína inductora de la reproducción sexual) se acumulara en el cultivo permitiendo que se alcanzara el nivel umbral necesario para que ocurriera la inducción sexual en las hijas. Para determinar el tipo sexual de cada hembra F_1 se siguió el procedimiento descrito en los métodos generales (Capítulo 2) para clasificarlas como asexuales o sexuales, según su descendencia. El experimento terminó cuando todas las hembras de la cohorte murieron.

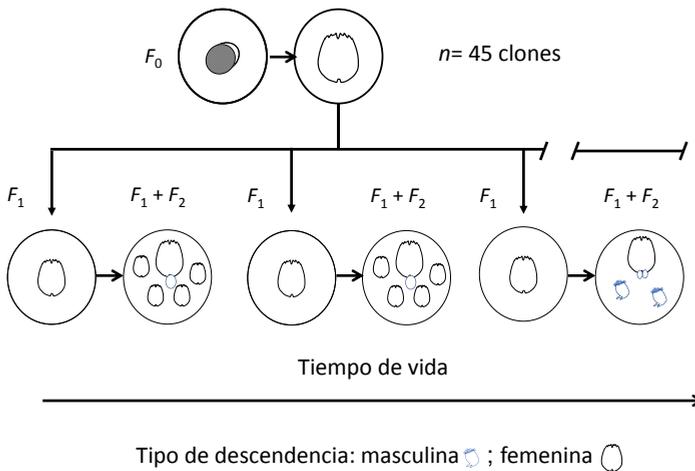


Figura 4.1. Diagrama del experimento de tabla de vida. La cohorte inicial (generación $F_0 = 45$ hembras) se originó a partir de huevos diapáusicos provenientes de diez cuerpos de agua salinos españoles. Las hembras F_0 se mantuvieron en condiciones de jardín común. Sus descendientes (generación F_1) se transfirieron diariamente a una placa multipocillos y se les permitió proliferar asexualmente, estas fueron clasificadas como sexuales o asexuales dependiendo del tipo de descendencia (generación F_2).

Parámetros de las historias de vida

Los datos registrados del experimento de la tabla de vida se utilizaron para calcular individualmente para cada hembra madre los siguientes rasgos de su historia de vida (*RHV*): esperanza de vida (e_0 ; edad media que pueden alcanzar los individuos), éxito reproductivo de por vida (*ER*; número de descendientes en el periodo reproductivo), tiempo de generación (*TG*; la media ponderada de edad del nacimiento de sus hijas), tasa intrínseca de crecimiento de cohorte (r ; aproximación a la tasa intrínseca de crecimiento poblacional) y tasa de mixis, como una medida de la inversión sexual (*TM*; proporción de descendencia sexual total de cada hembra madre). Además, también se calculó la edad específica en que inicia la producción de hijas sexuales y asexuales. En cuanto al éxito reproductivo, se calcularon dos medidas diferentes: (1) para la descendencia total (ER_{total}) y (2) solo para las hijas asexuales (ER_{asex}). El tiempo de generación se calculó con la siguiente ecuación:

$$TG = \left(\sum_x (x + 0.5) f_x \right) / \left(\sum_x f_x \right) \tag{Ecuación 2}$$

donde x = edad de la hembra madre en cada evento de observación y f_x = número de descendientes producido desde la edad x hasta la edad $x + 1$. Se calcularon tres medidas diferentes de *TG*: (1) para la descendencia total (TG_{total}), (2) para hijas asexuales (TG_{asex}) y (3) para las hijas sexuales (TG_{sex}). Cuando se utilizan en los resultados las opciones (2) o (3), se indica explícitamente. La tasa intrínseca de crecimiento (r) se calculó a partir de los registros diarios de fecundidad de cada hembra madre mediante la

resolución de la ecuación de Euler-Lotka (Ecuación 3) utilizando la herramienta Microsoft Excel Solver:

$$1 = \sum e^{-r(x+0.5)} n_x$$

Ecuación 3

donde n_x es la descendencia producida desde la edad x hasta la edad $x + 1$ (Birch, 1948). La estimación de este valor de r como la tasa intrínseca de crecimiento poblacional debe tomarse con precaución dado que, en primer lugar, para interpretar este valor, se parte del supuesto de que la cohorte (en este caso, una sola hembra) y su descendencia son muestras de una misma población ideal. En segundo lugar, como el interés del estudio es el costo del sexo a corto plazo, las hijas asexuales y sexuales se consideraron equivalentes, por lo que esta estimación fue, en el mejor de los casos, la tasa intrínseca de crecimiento potencial (es decir, la tasa de aumento que debería tener una población o genotipo si no hubiese inversión en descendencia sexual; véase, Montero-Pau *et al.*, 2014). En tercer lugar, la condición fisiológica de una hembra madre se espera que sea diferente de la de su descendencia, en este caso, al menos por el hecho de que proviene de un huevo diapáusico. Sin embargo, se espera que esta estimación del valor de r sea una métrica compuesta correlacionada con la eficiencia de cada genotipo.

Con el fin de evitar sesgos debido a la correlación entre la esperanza de vida del individuo y la probabilidad de pérdida accidental durante la manipulación experimental, las hembras que se perdieron (en total seis hembras madre, en los días seis y siete) fueron incluidas en los análisis como datos censurados, utilizando el método de sustitución de la

media (véase, Little & Rubin, 2002; Enders, 2010). Es decir, se asumió que, después de haber perdido a la hembra, ésta habría tenido los mismos parámetros demográficos que el promedio del resto de las hembras madre de la cohorte.

Análisis estadísticos

Para probar la hipótesis de *todo lo demás es igual*, se analizaron las relaciones entre la tasa de mixis vs. cada parámetro de la historia de vida (e_0 , ER , TG y r), mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson, utilizando el paquete estadístico SPSS v.19.0 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU). Además, se exploraron otras correlaciones por pares entre RHV . Los efectos posibles debidos a las diferencias de los factores población y tiempo de almacenamiento de los huevos diapáusicos en los RHV se descartaron ($P > 0,05$; en todos los casos) previo a los análisis realizados por medio de modelos lineales generalizados (MLG), asumiendo diferentes distribuciones de errores y funciones de enlace dependiendo de cada RHV (*i. e.*, distribución de errores de Poisson y \log como función de enlace para éxito reproductivo y período reproductivo; distribución gaussiana de errores y función de enlace de identidad para esperanza de vida, tiempo de generación y tasa de mixis). Además, se analizó el factor edad de los sedimentos de cada población de la cual fueron aislados los clones experimentales para descartar su efecto sobre los RHV . Los resultados confirmaron que no hubo efecto significativo de este factor.

Finalmente, para analizar la relación entre la edad específica de inversión en la reproducción sexual y la edad de la hembra, se realizó otro MLG del número de descendientes (F_1) producidos por las hembras madre

como la variable de respuesta y se asumió una distribución de Poisson de los errores con *log* como función de enlace. La edad de la hembra, tipo de descendencia (sexual o asexual) y su interacción fueron introducidos como factor de efectos fijos. Todos los análisis MLG se implementaron utilizando la función *glm* del paquete *stats* en el software estadístico R v.3.1.1 (R Development Core Team, 2014).

Resultados

Parámetros de la historia de vida

La tasa de mixis de las hembras de la cohorte promedió un 0,09 (rango de 0 a 0,333). No todas las hembras madre tuvieron hijas sexuales, solamente el 62 %. Para esta fracción de hembras, la cantidad de descendencia sexual fue mucho menos abundante ($3,3 \pm 0,4$ hembras) que la asexual ($20,5 \pm 0,9$ hembras). Los valores promedio de los RHV obtenidos para la cohorte de *B. plicatilis* se muestran en la Tabla 4.1.

La Figura 4.2 muestra las relaciones por parejas entre los RHV. En cuanto a la evaluación del supuesto *todo lo demás es igual* (i. e., en el que las hembras sexuales y asexuales son equivalentes en sus rasgos de historia de vida y, por lo tanto, la inversión sexual es costosa), primero, se observa una variabilidad en la tasa de mixis de 0 a 0,333; segundo, la tasa de mixis no se correlacionó significativamente con ningún otro rasgo de la historia de vida considerando la descendencia total F_1 (Fig. 4.2 a-c), lo que indica que más sexo no favorece la e_0 o el ER_{total} de las hembras madre. De acuerdo con esto, también se observó una falta de correlación entre la tasa intrínseca de crecimiento y la tasa de mixis (Pearson $r = -0,09$, $P = 0,55$; datos no representados gráficamente), el valor de r osciló entre 0,696 y

0,921 entre las hembras madre sin inversión en reproducción sexual, y varió de 0,676 y 0,883 en aquellas madres con una inversión mayor a 0,150. Es decir, las hembras que invierten más en hijas sexuales no producen más hijas asexuales que compensen la producción de las hijas sexuales. Sin embargo, la tasa de mixis se correlacionó negativamente con el ER_{asex} (Pearson $r = -0,68$, $P < 0,001$; Fig. 4.2 a), lo que pone en evidencia un compromiso. Por otro lado, se presentó una correlación positiva, débil, pero significativa entre la e_0 y el TG_{total} (Pearson $r = 0,31$, $P < 0,05$; Fig. 4.2 f), aunque la correlación no se presentó cuando se utilizaron los resultados de TG_{asex} (Pearson $r = 0,26$, $P = 0,08$) o con los datos de TG_{sex} (Pearson $r = 0,20$, $P = 0,32$).

Tabla 4.1. Media y error estándar de los rasgos de historia de vida (*RHV*) de una cohorte de 45 hembras de *B. plicatilis* provenientes de huevos diapáusicos de diez cuerpos de agua salobres españoles. Estos *RHV* se calcularon agrupando los valores individuales de cada hembra.

Rasgos de la historia de vida	Promedio \pm EE	Rango
Éxito reproductivo de por vida (<i>ER</i>)		
ER_{total}	23,9 \pm 0,5	13,3 – 28,0
ER_{asexual}	21,9 \pm 0,6	9,3 – 28,0
Tiempo de generación (<i>TG</i> , días)		
TG_{total}	4,51 \pm 0,04	4,0 – 5,1
TG_{asex}	4,55 \pm 0,04	3,9 – 5,3
TG_{sex}	4,05 \pm 0,09	3,2 – 5,5
Tasa intrínseca de crecimiento (días ⁻¹)	0,791 \pm 0,009	0,676 – 0,921
Tasa de mixis	0,087 \pm 0,015	0 – 0,33
Esperanza de vida (días)	9,2 \pm 0,3	6,5 – 15,5
Periodo reproductivo (días)	5,1 \pm 0,1	4,0 – 6,0

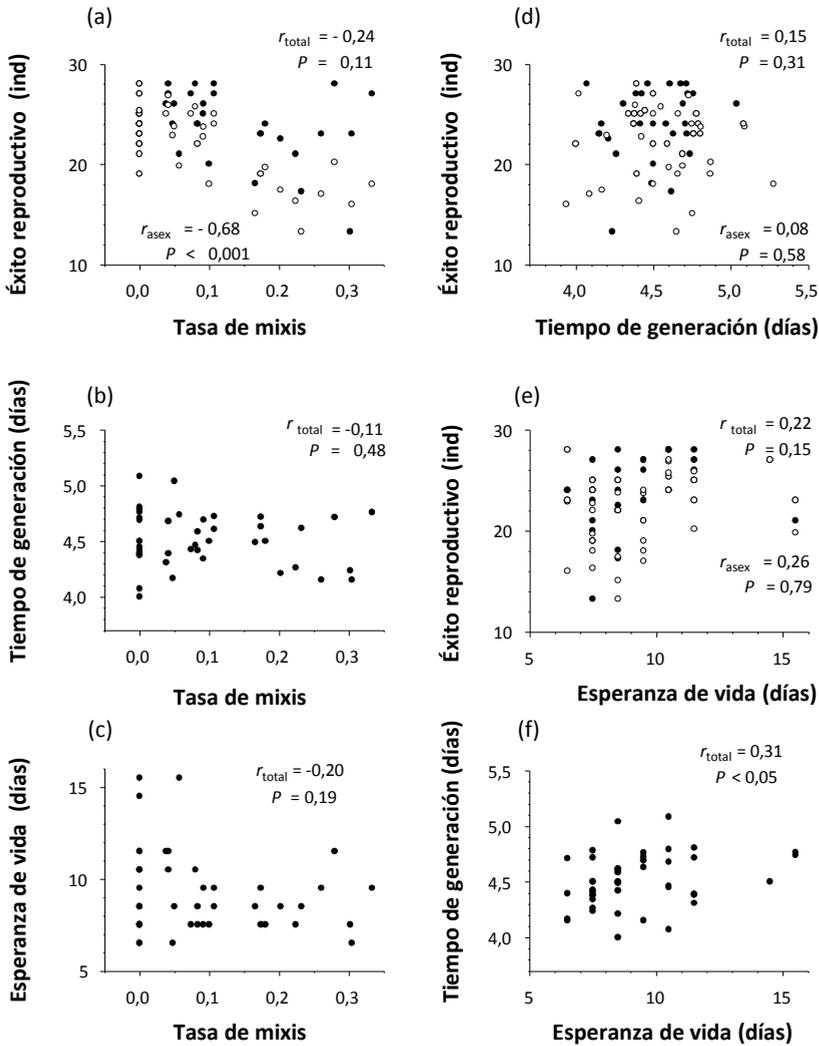


Figura 4.2. Correlaciones entre los rasgos de la historia de vida estimados a partir de una cohorte de 45 hembras madre del rotífero *B. plicatilis*, provenientes de diez cuerpos de agua españoles. Los círculos negros son los datos de la descendencia total; los círculos blancos corresponden solo a datos para descendientes asexuales. La inversión sexual corresponde a la tasa de mixis.

La Figura 4.3 muestra que casi todas las hembras tuvieron un periodo post-reproductivo, lo que es consistente con la falta de una correlación significativa entre la e_0 y el ER_{total} y el ER_{asex} (Fig. 4.2e).

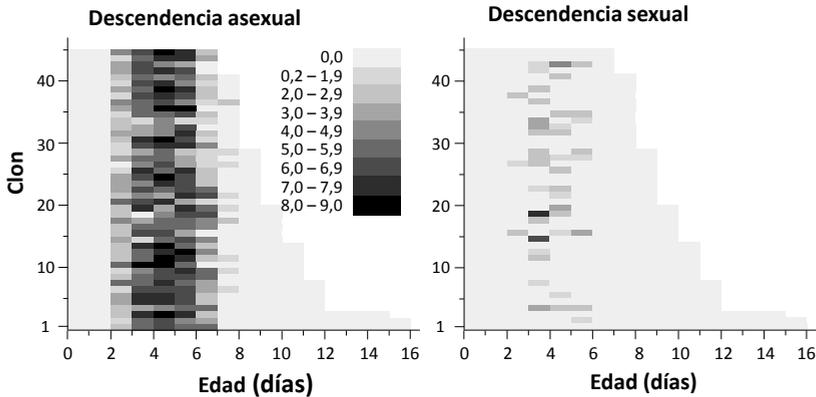


Figura 4.3. Supervivencia y fecundidad de 45 hembras genéticamente diversas de *B. plicatilis*, de diez cuerpos de agua españoles. La supervivencia individual está ordenada, la más corta se observa en la parte superior, la más larga en la parte inferior. La escala de grises está asociada a una mayor o menor fecundidad.

Según el análisis MLG (Tabla 4.2), hubo un efecto significativo tanto de la edad de la hembra madre ($P < 0,001$), el tipo de descendientes sexuales o asexuales producidos en la F_1 ($P < 0,001$), así como de la interacción entre la edad y el tipo de descendencia ($P = 0,008$). Lo anterior también se observa en la comparación visual en los gráficos, donde se muestra la fecundidad femenina según la supervivencia individual y el tipo de descendencia asexual y sexual que tuvieron (Fig. 4.3). Los patrones de fecundidad difieren claramente dependiendo del tipo de descendencia en la F_1 , las hijas sexuales fueron producidas un poco antes ($TG = 4,08 \pm 0,04$ d) que las hijas asexuales ($TG = 4,57 \pm 0,09$ d) y durante un tiempo más corto (4 días frente a 6 días de período reproductivo).

Tabla 4.2. Análisis de MLG de los efectos en el número de descendientes producidos por una cohorte de 45 hembras madre de *B. plicatilis*.

Efecto	<i>g. l.</i>	χ^2	Valor de <i>P</i>
Edad	1, 538	1676,86	< 0,001
Tipo de descendencia	1, 537	850,53	< 0,001
Edad × Tipo de descendencia	1, 536	843,42	0,008

Discusión

El costo del sexo es evidente cuando se comparan los RHV entre hembras partenogénicas cíclicas de *B. plicatilis* que ostentan variación en la proporción de descendientes sexuales producidas, considerada una medida de la inversión sexual. La falta de correlación entre la tasa de mixis y cualquier otro RHV estudiado implica que, una mayor inversión en el sexo no es compensada con una mayor esperanza de vida, o un mejor éxito reproductivo. Por lo tanto, nuestros datos experimentales apoyan la hipótesis de que el sexo es costoso en estos rotíferos. Dados estos resultados, cabe la duda de si el diseño experimental tuvo un poder estadístico adecuado. Sin embargo, es poco probable que fuese inadecuado, ya que las correlaciones que encontramos entre la tasa de mixis y los RHV estudiados, aunque no significativas, fueron negativas, es decir, lo contrario de lo que se esperaría si existiera compensación.

Los RHV estudiados fueron similares independientemente de la inversión en la descendencia sexual de los genotipos estudiados, lo cual respalda la suposición de la equivalencia en sus historias de vida. Estos hallazgos coinciden con otro estudio de tabla de vida realizado por Stelzer (2011), donde comparó hembras partenogénicas cíclicas y asexuales obligadas originadas del mismo genotipo materno en el rotífero *B.*

calyciflorus, y donde el supuesto de *todo lo demás es igual* se cumplió en las tasas de crecimiento poblacionales. Este hallazgo también coincide con estudios realizados con otros modelos biológicos (p. e., Jokela *et al.*, 1997; Crummett & Wayne, 2009; Gibson *et al.*, 2017; Schlupp *et al.*, 2010), incluidos otros partenogenéticos cíclicos (Scheiner & Yampolsky, 1998; Wolinska & Lively, 2008). Sin embargo, la equivalencia en los rasgos de la historia de vida entre hembras sexuales y asexuales no es la regla general (véase las revisiones de, p. e., Lehtonen *et al.*, 2012; Meirmans *et al.*, 2012; Stelzer, 2015). El contraste de resultados entre estos estudios indica que el costo del sexo podría ser dependiente de ciertos *RHV* y de la especie, y que el mantenimiento del sexo podría ser más dependiente de la especie de lo que se asumía anteriormente (West *et al.*, 1999; Meirmans & Strand, 2010; Meirmans *et al.*, 2012). Inclusive, un beneficio del sexo específico del linaje podría neutralizar cualquier costo preexistente del sexo (Stelzer, 2015).

La ausencia de una compensación entre la tasa de mixis y los *RHV* estudiados pone indirectamente en evidencia el costo del sexo en *B. plicatilis* y se necesita de otros factores compensatorios alternativos que expliquen su mantenimiento en este rotífero partenogenético cíclico. Se puede suponer que, como en otros organismos sexuales facultativos, las hembras de rotíferos que invierten poco en descendencia sexual podrían reducir el costo del sexo mientras mantienen casi todas las ventajas del sexo (Green & Noakes, 1995; Peck & Waxman, 2000; D'Souza & Michiels, 2010; Stelzer & Lehtonen, 2016). Aun así, en algunos estudios con rotíferos sometidos a condiciones heterogéneas vs. homogéneas se ha descrito que las tasas más altas de sexo evolucionan en entornos heterogéneos y novedosos, es decir el sexo es lo suficientemente ventajoso en este tipo de

ambientes para solventar su costo inherente (Becks & Agrawal, 2010, 2012).

Como era de esperar, la inversión en reproducción sexual fue variable entre los genotipos estudiados. Hay que recordar que las hembras madre fueron mantenidas en un experimento de jardín común, y que esta técnica busca minimizar la variación ambiental y exponer si existe un componente genético subyacente. Entonces, la variabilidad observada plantea la pregunta de por qué se incurren en diferentes costos del sexo. La explicación evidente, en este tipo de rotíferos, puede centrarse en el hecho de que el sexo está ligado directamente con la producción de huevos diapáusicos, debido a que existe una presión de selección fuerte para sobrevivir a los períodos ambientales adversos (véase, p. e., Tarazona *et al.*, 2017). Entonces, esta interacción entre el sexo y la diapausa debería reducir los costos (Serra & Snell, 2009; Stelzer, 2015; Stelzer & Lehtonen, 2016). Además, dado que los huevos diapáusicos son el resultado de la recombinación sexual, también se espera una relación entre la variación genética y la inversión en el sexo, y se asume que esta variación genética sería ventajosa a largo plazo para hacer frente a las novedades ambientales (Becks & Agrawal, 2012; Lehtonen *et al.*, 2012; Stelzer & Lehtonen, 2016).

La mayoría de las investigaciones que hacen uso del supuesto de que *todo lo demás es igual* se ha centrado en las comparaciones entre linajes dentro de una especie que tiene diferentes modos de reproducción (Kondrashov, 1993; Hurst & Peck, 1996; Neiman *et al.*, 2010). Sin embargo, estas comparaciones han suscitado algunas críticas. Por ejemplo, puede haber efectos confundidos debido a diferencias en el origen, antecedentes

genéticos, historias ambientales y evolutivas entre las hembras asexuales y sexuales objeto de las comparaciones, incluso si pertenecen o no a la misma población (Jokela *et al.*, 1997; Corley & Moore, 1999; Kramer & Templeton, 2001; Simon *et al.*, 2003; Allen & Lynch, 2008; Stelzer, 2011). Con la utilización del modelo biológico estudiado en esta tesis, adoptamos un enfoque diferente, pues en lugar de comparar linajes partenogenéticos cíclicos vs. asexuales, se compararon directamente los RHV de hembras de rotíferos individuales con capacidad diferente para producir hijas sexuales y asexuales analizadas en un entorno experimental favorable común (Stelzer, 2015; Ram & Hadany, 2016). Este enfoque facilita la interpretación de la comparación entre hembras que son equivalentes y que tienen inversiones en el sexo diferentes.

De acuerdo con los resultados de este capítulo, el éxito reproductivo total fue igual entre las hembras de rotífero individuales, independientemente de las tasas de mixis que presentaron. Por lo tanto, se deduce que una mayor inversión sexual tiene como consecuencia una disminución importante en la producción de hijas asexuales, como lo demuestra la correlación negativa que se observó entre la tasa de mixis y el éxito reproductivo calculado para la descendencia asexual. Este compromiso es básico, ya que la eficiencia de las estrategias sexual y asexual de un genotipo no son independientes, sino que están comprometidas, ya que se contraponen entre sí en la historia de la vida de los rotíferos partenogenéticos cíclicos, lo cual ha sido ampliamente analizado desde el punto de vista teórico (Snell, 1987; Serra & Carmona, 1993; Serra & King, 1999; Stelzer, 2005). Por lo tanto, los costos del sexo causan un compromiso entre el crecimiento actual de la población por la

proliferación asexual (clonal) y la persistencia de la población a largo plazo a partir de los huevos diapáusicos, producidos sexualmente. Este compromiso puede afectar a los patrones óptimos de reproducción sexual, los cuales han sido correlacionados con las características del hábitat (Carmona *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 2004; Campillo *et al.*, 2011; Franch-Gras *et al.*, 2017). A pesar de que existen pocos estudios que han abordado el supuesto de *todo lo demás es igual* en ambientes naturales (p. e., Jokela *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 2016, 2017), los resultados que se encontraron en este capítulo en experimentos de laboratorio son consistentes con la selección de los genotipos que tienen menor propensión al sexo a lo largo de una temporada de crecimiento poblacional de *B. plicatilis* en condiciones naturales, descrita en el capítulo anterior (Capítulo 3).

Como se ha resaltado previamente, el inicio del sexo en el género de rotíferos *Brachionus* es inducido por un factor proteínico inductor de la reproducción sexual (MIP) que se correlaciona con la densidad poblacional (en inglés, *quorum sensing*) (Stelzer & Snell, 2003; Snell *et al.*, 2006; Kubanek & Snell, 2008), aunque la inducción sexual también puede depender de otros factores endógenos (Hagiwara *et al.*, 2005; Gilbert & Schröder, 2007; Gilbert, 2007). Un factor endógeno que afecta la inversión en sexo, y que ha sido estudiado ampliamente, es la edad de la madre. El resultado de que una mayor inversión sexual ocurre a edades más tempranas es un patrón que se ha encontrado en otros estudios con especies del complejo *B. plicatilis* (Lubzens & Minkoff, 1988; Carmona *et al.*, 1994), del complejo *B. calyciflorus* (Pourriot & Rougier, 1976, 1977; Rougier & Pourriot, 1977; Rougier *et al.*, 1977) y en la especie *B. rubens* (Pourriot & Rougier, 1976; Pourriot *et al.*, 1986; Fussmann *et al.*, 2007). En cambio,

otros estudios mostraron un patrón diferente en el que la producción de hijas sexuales no disminuye a medida que las madres envejecían (Gilbert & Schröder, 2007) o incluso, se ha reportado que no hay efecto de la edad (Pourriot & Rougier, 1978; Gilbert & Schröder, 2007). Estas diferencias se han atribuido a la variación genética entre los clones y las especies, las diferencias entre la edad y los cambios en la producción de la MIP, o por su capacidad de respuesta a la MIP, o de ambos (Gilbert & Schröder, 2007). El efecto de la edad de la madre en la inversión sexual fue diferente entre los genotipos que se estudiaron en este capítulo. Según las predicciones teóricas, el momento de la producción de las hijas sexuales influye en el costo del sexo en los rotíferos, de modo que, en un periodo de reproducción sexual el producir descendencia sexual al final de la vida minimizaría el costo del sexo, en comparación con una producción temprana (Stelzer, 2011). Esto tendría consecuencias en la capacidad competitiva de los genotipos clonales durante la temporada de crecimiento planctónico si presentan diferentes patrones de producción de descendencia sexual, condiciones que se analizaron con mayor detalle en el siguiente capítulo (Capítulo 5).

Capítulo 5

¿La diversidad genética reduce la competencia?

Introducción

La diversidad genética puede tener un efecto positivo en la eficiencia promedio de una población al reducir la competencia intraespecífica a través del aumento de la amplitud de nicho (Bell, 1985; Cheplick, 1992; Tagg *et al.*, 2005a). Esta reducción en la competencia intraespecífica podría esperarse si los genotipos que componen una población genéticamente diversa difieren en el uso de los recursos, lo que conduciría a que los recursos potenciales sean utilizados de manera más eficiente cuando se compara con una población genéticamente homogénea (Vrijenhoek, 1979; Tilman, 1999; Swanson *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2008). La reproducción sexual promueve una mayor diversidad genética lo que, hipotéticamente, tendría beneficios a corto plazo (Maynard-Smith, 1978; Bell, 1985; Koella, 1988). Además, las ventajas de la variación genética dentro de las poblaciones son relevantes para comprender el mantenimiento de la variabilidad genética dada la competencia en poblaciones naturales (p. e., Svanbäck & Bolnick, 2007) como se ha planteado para los partenogenéticos cíclicos (Hebert, 1987; Carvalho, 1994).

La relación entre la diversidad genética y la competencia intraespecífica ha sido estudiada empleando diferentes organismos mediante la comparación de diferentes rasgos de historia de vida entre

individuos de origen sexual y asexual, o a través del análisis de las diferencias entre grupos genéticamente diversos vs. genéticamente homogéneos en una sola especie. Se han reportado resultados contradictorios hasta la fecha. Algunos estudios demostraron que, una alta diversidad genética favorece el rendimiento de genotipos individuales aumentando su supervivencia, fecundidad y/o crecimiento individual (p. e., ascidias –Aguirre & Marshall, 2011-; peces –Moav & Wohlfarth, 1974; Griffiths & Armstrong, 2001-; crustáceos –Weeks & Sassaman, 1990-; saltamontes –Caesar *et al.*, 2010-; moscas –Pérez-Tomé & Toro, 1982; Martin *et al.*, 1988-; pastos –Kelley, 1989-; árboles –Boyden *et al.*, 2008-). Sin embargo, otros estudios detectaron poca evidencia de la ventaja de la diversidad genética (plantas –Willson *et al.*, 1987-; escarabajos –Garcia & Toro, 1992-) e incluso, se han registrado resultados negativos (plantas –Willson *et al.*, 1987-; escarabajos –Jasienski *et al.*, 1988-; Garcia & Toro, 1992-; hierbas anuales –Burt & Bell, 1992-; renacuajos –Jasienski, 1988-). Por lo tanto, para una mejor comprensión de las relaciones entre la diversidad genética y la competencia intraespecífica se necesita más evidencia empírica.

Los invertebrados partenogenéticos cíclicos son organismos modelo que reúnen los requisitos para evaluar fácilmente si la diversidad genética tiene implicaciones al regular la intensidad de las interacciones ecológicas (Simon *et al.*, 2002; Fussmann, 2011), como la competencia intraespecífica, ya que son de tamaño pequeño y tienen tiempos de generación cortos, lo que facilita el estudio de las dinámicas poblacionales en el laboratorio. También, son capaces de

clonarse de forma natural, y se puede comparar la dinámica de las poblaciones homogéneas (*i. e.*, compuestas de un genotipo clonal único) y la dinámica de las poblaciones genéticamente diversas (*i. e.*, compuestas por un conjunto de clones).

Brachionus plicatilis tiene muchas características convenientes para analizar si la diversidad genética favorece el crecimiento, la reproducción y la capacidad competitiva en poblaciones con diversos genotipos. En primer lugar, su taxonomía está bien establecida (Ciros-Pérez *et al.*, 2001a) y la diversidad genética de sus poblaciones naturales se ha estudiado exhaustivamente (Gómez & Carvalho, 2000; Gómez *et al.*, 2000; Campillo *et al.*, 2009), además, se ha demostrado que existen diferencias ecológicas significativas en los rasgos de la historia de vida entre clones de las poblaciones de esta especie de rotífero (Aparici *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2009; Campillo *et al.*, 2010). En segundo lugar, los clones se pueden fundar fácilmente eclosionando huevos diapáusicos recolectados del sedimento de los lagos, obteniendo una colección de individuos genéticamente variables presentes en la naturaleza. En tercer lugar, los cultivos de laboratorio iniciados a partir de unos pocos individuos pueden alcanzar la capacidad de carga en unos cuantos días cuando acontece la competencia por limitación de recursos.

El objetivo de este capítulo consistió en probar la hipótesis de que la competencia intraespecífica disminuye con el aumento de la diversidad genética. Con este objetivo, se compararon algunos componentes de eficiencia que se estimaron entre poblaciones

experimentales de *B. plicatilis* genéticamente diversas (*i. e.*, compuestas por un conjunto de ocho genotipos) vs. homogéneas (*i. e.*, compuestas por un solo genotipo clonal), cuando estas poblaciones crecieron por separado y en competencia. La predicción de la que se parte es que, las poblaciones genéticamente diversas podrían tener valores más altos en los componentes de eficiencia respecto las poblaciones homogéneas si existiera una relajación de la competencia como resultado de la diferencia entre los genotipos.

Métodos particulares

Se sabe que la población de *B. plicatilis* en Poza Sur presenta una variabilidad genética importante en términos de su heterocigosidad, la cual varía de 0,45 a 0,51 en marcadores genéticos de microsatélites (Gómez & Carvalho, 2000; Campillo *et al.*, 2009), de acuerdo con esto, en los experimentos realizados en este capítulo se manipuló la variabilidad genética utilizando diferentes genotipos individuales provenientes de Poza Sur con el fin de explorar los resultados de la competencia entre poblaciones experimentales con diversidad genética diferente.

Diseño experimental y establecimiento de los clones

Se eclosionaron 60 huevos diapáusicos, los cuales representan genotipos únicos y diferentes entre sí. De las hembras eclosionadas, 32 nacieron alrededor de las 48 h y, de éstas, se seleccionaron al azar ocho que se cultivaron en placas de Petri con 60 mL de medio de cultivo. Un día después, se cambiaron a medio fresco y, dos días después, sus hijas (1-3 neonatas) se transfirieron individualmente a

placas Petri nuevas con 60 mL de medio, mientras que las madres se descartaron. Este proceso fue repetido hasta la sexta generación cuando se alcanzaron 80 hembras por clon. Este procedimiento evitó la acumulación de la MIP y, por lo tanto, la inducción de la reproducción sexual gracias a que se mantuvo la densidad de la población por debajo de 0,07 hembras mL⁻¹ (Aparici *et al.*, 1996).

Los contenedores experimentales utilizados fueron construidos de manera similar a los de Tagg *et al.* (2005a). Estos consistieron en recipientes de plástico (diámetro = 11 cm; altura = 12 cm) divididos longitudinalmente en dos partes iguales y separados por una malla Nyltal con un tamaño de poro de 30 µm (Fig. 5.1 A).

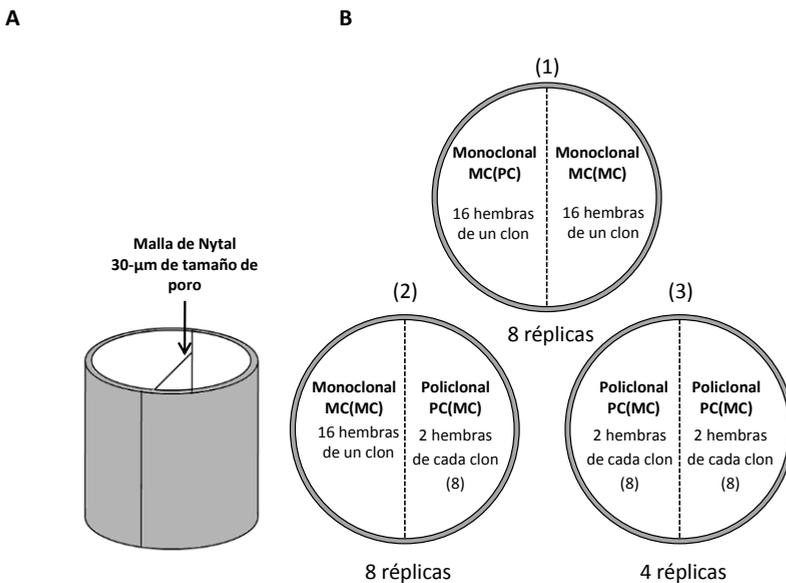


Figura 5.1. **A.** Diseño de los contenedores experimentales divididos en dos partes iguales por una malla Nyltal de 30 µm. **B.** Diseño experimental utilizado en cultivos de *B. plicatilis*: **(1)** la misma población monoclonal (MC) en ambos lados del recipiente; **(2)** una población MC en un lado y una población policlonal (PC) en el otro; y **(3)** una población PC en ambos lados.

El uso de la malla evitó que los individuos y los huevos se movieran de una parte del contenedor a la otra, dado que, las hembras de *B. plicatilis* miden en promedio $300 \times 225 \mu\text{m}$ y los machos $130 \times 80 \mu\text{m}$, mientras que los huevos de menor tamaño (*i. e.*, de machos) en su eje más corto miden alrededor de $50 \mu\text{m}$. Aunque el tamaño de poro de la malla si permitía la mezcla libre del medio de cultivo y de las algas, confirmado en observaciones preliminares. De tal manera que, las poblaciones colocadas en cada uno de los dos lados del contenedor compartían los recursos, pero los organismos permanecían separados físicamente y, por lo tanto, podían ocurrir interacciones competitivas sin restricciones.

En el diseño experimental se utilizaron dos tipos de poblaciones, una monoclonal y la otra policlonal (Fig. 5.1 B). La población monoclonal (MC), se estableció a partir de 16 hembras jóvenes del mismo clon, genéticamente idénticas, mientras que la población policlonal (PC), genéticamente diversa, se estableció a partir de dos hembras jóvenes de cada clon. Se utiliza el término población experimental para el conjunto de rotíferos que crecen en una de las mitades del contenedor. Se crearon tres tipos de cultivos experimentales (Fig. 5.1 B): (1) la misma población MC en ambos lados del contenedor (es decir, un solo clon en todo el contenedor); (2) una población MC en un lado y una población PC en el otro, y (3) la población PC en ambos lados. La diversidad genética aumenta en los cultivos experimentales del 1 al 3. Se realizaron ocho réplicas por tratamiento (uno por clon) para los cultivos experimentales 1 y 2, y cuatro repeticiones para los cultivos experimentales 3. La dinámica de

las poblaciones fue monitoreada de forma independiente en ambos lados del contenedor. Esto produjo cuatro conjuntos de datos: MC(MC), con 16 dinámicas poblacionales (2 lados del contenedor por 8 clones); MC(PC), 8 dinámicas poblacionales (una por clon); PC(MC), 8 dinámicas poblacionales (una por clon); y PC(PC), con 8 dinámicas poblacionales (2 lados por 4 réplicas). Es importante tener en cuenta que las dinámicas MC(MC), PC(MC) y MC(PC) no se replicaron dentro de los clones. Para cada conjunto de datos mencionado anteriormente, las iniciales antes de los paréntesis se refieren a la población de interés en un lado del contenedor, y las iniciales entre paréntesis se refieren a la población competidora creciendo en el otro lado.

Las poblaciones experimentales se iniciaron introduciendo 16 hembras en cada lado del contenedor (véase arriba) en 600 mL de medio de cultivo. Todos los cultivos experimentales se iniciaron al mismo tiempo y se colocaron aleatoriamente en una cámara climática a 18° C, en oscuridad, sobre un agitador orbital a ~28 rpm. Se colectaron diariamente de manera sincrónica 45 mL de cada sección del contenedor (*i. e.*, 15 % del volumen total) con pipetas de alto volumen. El volumen extraído se reemplazó con medio fresco y microalgas como alimento (8 mg C L⁻¹; véanse los detalles en el Capítulo 2). Cuando la densidad de las muestras recolectadas era inferior a 0,2 hembras mL⁻¹, durante los primeros días del experimento, las hembras fueron devueltas al cultivo una vez que se contabilizaron y clasificaron según su tipo sexual. Cuando las densidades fueron mayores, las hembras no fueron devueltas al contenedor. Para mejorar la estimación de la frecuencia de los tipos reproductivos de las

hembras, de cada muestra se aislaron hasta 18 hembras sin huevos, y se cultivaron individualmente para determinar su tipo de descendencia (véanse detalles en el Capítulo 2). El resto de las muestras se preservaron con una solución de Lugol al 4 % y, posteriormente, las hembras fueron contadas y clasificadas según su tipo reproductivo. Los cultivos fueron monitoreados durante 15 días. Los parámetros de eficiencia registrados fueron: (1) el número de hembras no ovígeras, (2) el número de hembras ovígeras en función del tipo de huevos que acarreaban (Carmona *et al.*, 1995), es decir, asexual de hembra, sexual no fertilizado de macho, o sexual fertilizado y diapáusicos, y (3) el número de huevos diapáusicos, tanto los transportados por las hembras, como aquellos desprendidos y encontrados en el fondo del contenedor.

Parámetros de la dinámica poblacional

Para caracterizar a las poblaciones de rotíferos se establecieron las siguientes series de tiempo: (1) la densidad de las hembras, (2) la fracción de hembras clasificadas como sexuales y (3) la densidad de huevos diapáusicos. Cuando la misma población experimental estaba en ambos lados del contenedor [p. e., MC1(MC1)], se calculó una sola serie de tiempo para evitar la pseudoreplicación, para esto, se sumaron los recuentos de los dos lados del contenedor. Los componentes de eficiencia biológica que se estimaron y que resumen la dinámica de cada serie de tiempo fueron: (1) la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r), (2) la capacidad de carga (K), (3) la tasa de mixis integrada para el período de crecimiento completo, que constituye una sola medida de la inversión en reproducción sexual, (4)

la tasa de mixis integrada para el período de crecimiento exponencial, (5) la producción de huevos diapáusicos por hembra sexual, y (6) la producción total de huevos diapáusicos. La tasa intrínseca de crecimiento se estimó mediante una regresión de mínimos cuadrados usando la ecuación $\ln N_t = \ln N_0 + rt$, donde N_t y N_0 son las densidades de rotíferos (hembras por mL^{-1} en los días t y t_0), t es el tiempo (en días) y r la tasa intrínseca de crecimiento (día^{-1}). La regresión se realizó con los datos del período de crecimiento exponencial, es decir, de los días 3 al 7, este período se estimó mediante la inspección visual de las dinámicas poblacionales. La capacidad de carga se estimó como el valor más alto de densidad, obtenido del promedio de tres densidades consecutivas.

Las estimaciones de la tasa de mixis integrada de todo el periodo y el de la fase de crecimiento exponencial se calcularon a partir del conjunto de datos de los períodos correspondientes siguiendo la Ecuación 1 (Carmona *et al.*, 1995; véase el Capítulo 3). La producción de huevos diapáusicos se estimó extrapolando el recuento de la última muestra (45 mL) al volumen total y sumando la cantidad de huevos diapáusicos removidos de las muestras anteriores. Para estimar la producción total de huevos diapáusicos, la suma final se dividió por el número inicial de hembras (*i. e.*, 16 individuos), de modo que la producción de huevos diapáusicos fue por hembra inicial. Para estimar la producción de huevos diapáusicos por hembra sexual, la suma final de huevos se dividió por el número integrado de hembras sexuales. Este último parámetro es un valor compuesto de los otros parámetros (*i. e.*, no es matemáticamente independiente).

Análisis estadísticos

Se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) para probar la importancia de los efectos sobre los componentes de eficiencia de las poblaciones. Se realizaron ANOVAs de dos vías sin replicas (Sokal & Rohlf, 1995) para analizar las diferencias entre las poblaciones experimentales y para probar la variación entre los clones. Los efectos fueron: población experimental (MC(PC) vs. MC(MC) como efecto fijo y clon con ocho niveles como efecto aleatorio. Este ANOVA es un diseño de bloques al azar, donde los clones son los bloques y los tratamientos son los dos tipos de poblaciones experimentales. En consecuencia, las fuentes de varianza son: (1) tratamiento (población), (2) bloques (clon) y (3) el error/residual. La obtención de un efecto significativo del tratamiento significa que la población experimental afecta el componente de eficiencia correspondiente, mientras que un efecto significativo de bloque implica que los clones muestran variación en su respuesta para el parámetro de población ensayado. En consecuencia, la variación entre clones (*i. e.*, genética) puede ser estimada a partir de los cuadrados medios de los bloques y los cuadrados medios del error. Debido a la falta de réplicas, no fue posible calcular las interacciones entre los dos factores. Para cada componente de eficiencia se estimó una media general y su error estándar utilizando este diseño. A partir del mismo análisis, se calculó la heredabilidad en sentido amplio (H^2) como el cociente entre la varianza genética (*i. e.*, la varianza entre clones) y la varianza fenotípica (*i. e.*, la varianza total) siguiendo el procedimiento para organismos clonales descrito en Lynch & Walsh (1998). Para comparar las poblaciones policlonales PC(MC) vs. PC(PC)

se realizó un ANOVA de una vía (Sokal & Rohlf, 1995). También se estimó una media general y su error estándar para cada componente de eficiencia utilizando este diseño. Las medias generales estimadas para las poblaciones monoclonales y policlonales de ambos diseños se compararon mediante pruebas *t* asumiendo varianzas desiguales. Se exploraron las relaciones entre los componentes de eficiencia de los tratamientos MC utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y un análisis de componentes principales (ACP), después de probar la normalidad de los datos. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS v.14.0 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU).

Resultados

Dinámicas poblacionales

Las dinámicas poblacionales de todos los cultivos mostraron un comportamiento sigmoide, como era de esperarse cuando hay competencia por recursos limitados (véase, p. e., las curvas de los cultivos monoclonales en la Fig. 5.2).

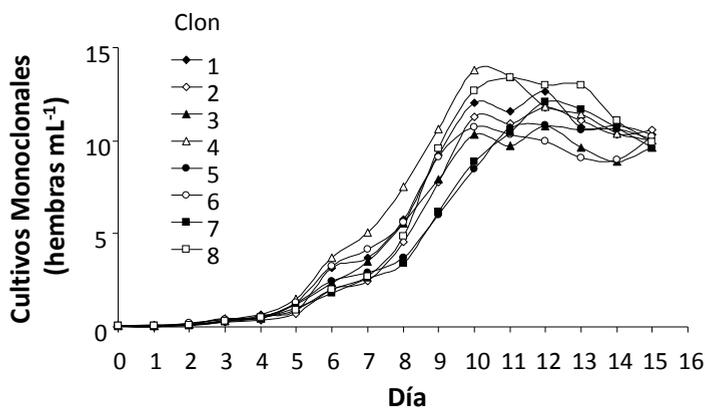


Figura 5.2. Dinámica poblacional (hembras mL^{-1}) de ocho clones de *B. plicatilis* creciendo en cultivos monoclonales [*i. e.*, MC(MC)].

Además, la capacidad de carga (K) fue muy similar en todos los tratamientos (Tabla 5.1) y no se detectaron diferencias estadísticas significativas para ningún efecto fijo [i. e., MC(MC) vs. MC(PC); PC(PC) vs. PC(MC); medias generales de MC vs. PC] (Tabla 5.2).

Tabla 5.1. Media y error estándar de los parámetros obtenidos de la dinámica poblacional de *B. plicatilis* en cuatro condiciones experimentales. Tratamiento monoclonal MC(MC), $n = 8$; tratamiento monoclonal/policlonal MC(PC), $n = 8$; tratamiento policlonal/monoclonal PC(MC), $n = 8$; y tratamiento policlonal PC(PC), $n = 4$.

Condición experimental	MC(MC)	MC(PC)	PC(MC)	PC(PC)
Tasa intrínseca de crecimiento, d^{-1}	0,63 (0,02)	0,64 (0,04)	0,65 (0,04)	0,65 (0,02)
Capacidad de carga, hembras mL^{-1}	11,55 (0,40)	11,86 (0,47)	10,44 (0,48)	11,19 (0,12)
Tasa de mixis, periodo exponencial	0,37 (0,04)	0,42 (0,04)	0,38 (0,02)	0,38 (0,02)
Tasa de mixis, periodo completo	0,51 (0,04)	0,50 (0,04)	0,51 (0,01)	0,51 (0,01)
Producción de huevos diapáusicos, huevos/hembras sexuales	0,15 (0,02)	0,15 (0,02)	0,15 (0,01)	0,16 (0,10)
Producción total de huevos, huevos/hembras iniciales	0,38 (0,07)	0,37 (0,04)	0,36 (0,03)	0,39 (0,03)

Tabla 5.2. ANOVAs de una y dos vías sobre los parámetros de la dinámica poblacional de *B. plicatilis*. En los ANOVAs de dos vías, el tratamiento es un factor fijo con dos niveles: MC(MC) (*i. e.*, cultivo monoclonal) y MC(PC) (*i. e.*, cultivo monoclonal que crece junto con un cultivo policlonal), y clon es un efecto aleatorio con ocho niveles. ^a las pruebas son matemáticamente dependientes.

Parámetro	ANOVA de dos vías				ANOVA de una vía			
	Fuente de variación	F	g. l.	P	Fuente de variación	F	g. l.	P
Tasa intrínseca de crecimiento, d ⁻¹	MC(MC) vs. MC(PC)	0,21	1, 7	0,66	PC(PC) vs. PC(MC)	0,01	1, 10	0,93
	Clon	3,57	7, 7	0,06				
Capacidad de carga, hembras mL ⁻¹	MC(MC) vs. MC(PC)	0,98	1, 7	0,36	PC(PC) vs. PC(MC)	1,23	1, 10	0,29
	Clon	6,64	7, 7	0,01				
Tasa de mixis, periodo exponencial ^a	MC(MC) vs. MC(PC)	2,66	1, 7	0,15	PC(PC) vs. PC(MC)	0,05	1, 10	0,83
	Clon	6,50	7, 7	< 0,01				
Tasa de mixis, periodo completo ^a	MC(MC) vs. MC(PC)	0,03	1, 7	0,88	PC(PC) vs. PC(MC)	0,58	1, 10	0,47
	Clon	18,54	7, 7	< 0,01				
Producción de huevos diapásicos, huevos/hembras sexuales	MC(MC) vs. MC(PC)	0,25	1, 7	0,64	PC(PC) vs. PC(MC)	0,06	1, 10	0,82
	Clon	20,55	7, 7	< 0,01				
Producción total de huevos, huevos/hembra inicial	MC(MC) vs. MC(PC)	0,04	1, 7	0,84	PC(PC) vs. PC(MC)	0,47	1, 10	0,51
	Clon	23,15	7, 7	< 0,01				

Tabla 5.3. Heredabilidad en sentido amplio (H^2) y pruebas t de cada parámetro poblacional estimado. Las pruebas t fueron realizadas sobre la media global de todos los cultivos monoclonales (MC; $n = 16$) y policlonales (PC; $n = 12$).

Parámetro	H^2	Pruebas t sobre las medias globales			
		Fuente de variación	t	g. l.	P
Tasa intrínseca de crecimiento, d^{-1}	0,57	MC vs. PC	0,49	13	0,63
Capacidad de carga, hembras mL^{-1}	0,73	MC vs. PC	2,13	12	0,05
Tasa de mixis, periodo exponencial ^a	0,71	MC vs. PC	0,29	16	0,78
Tasa de mixis, período de completo ^a	0,92	MC vs. PC	0,28	9	0,79
Producción de huevos diapásicos/hembras sexuales	0,91	MC vs. PC	1,34	13	0,2
Producción total de huevos, huevos/hembra inicial	0,93	MC vs. PC	0,92	13	0,38

La capacidad de carga (K) de los cultivos policlonales no fue más alta que la observada en los cultivos monoclonales, contrario al resultado que se esperaría si la diversidad condujera a una disminución de la competencia. Del mismo modo, las tasas intrínsecas de crecimiento (r) y los parámetros relacionados con la reproducción sexual tuvieron valores muy similares en todos los tratamientos (Tabla 5.1) y el tipo de población experimental no afectó de manera significativa los parámetros de eficiencia (Tabla 5.2). En contraste, todos los parámetros de las dinámicas poblacionales variaron de forma significativa entre los clones, excepto la tasa intrínseca de crecimiento, donde las diferencias fueron significativas marginalmente (Tabla 5.2). La heredabilidad en sentido amplio (un índice de variabilidad genética total) fue significativamente mayor que cero para todos los parámetros de

eficiencia estudiados, y su rango fue de 0,57 a 0,93 (Tabla 5.3), con un promedio de 0,80 para todos los rasgos.

Para explorar la variación entre clones detectada por el ANOVA de dos vías, se realizó un ACP utilizando los parámetros de eficiencia como variables y los conjuntos de datos de las 16 dinámicas poblacionales correspondientes a los clones (*i. e.*, en MC) como casos; entonces, para cada clon, se utilizaron dos dinámicas poblacionales [MC(MC) y MC(PC)]. La Figura 5.3 muestra los resultados para los dos primeros componentes, que representan el 62,1 % de la varianza total. Los dos casos del mismo clon (*i. e.*, cuando el clon creció solo y cuando el clon creció junto a un cultivo policlonal), tendieron a estar muy juntos (Fig. 5.3 A), lo que es consistente con la detección de un efecto del factor clon en las pruebas de ANOVA. El primer componente (34,3 % de varianza explicada) se correlacionó de manera negativa con la tasa de mixis en el período de crecimiento exponencial y con la tasa de mixis para el período de crecimiento completo; además, se correlacionó positivamente con la producción de huevos diapáusicos por parte de las hembras sexuales, con la producción total de huevos diapáusicos y con la capacidad de carga. El segundo componente (27,8 % de varianza explicada) se correlacionó negativamente con la producción de huevos diapáusicos por hembra sexual y se correlacionó positivamente con la tasa intrínseca de crecimiento y la capacidad de carga.

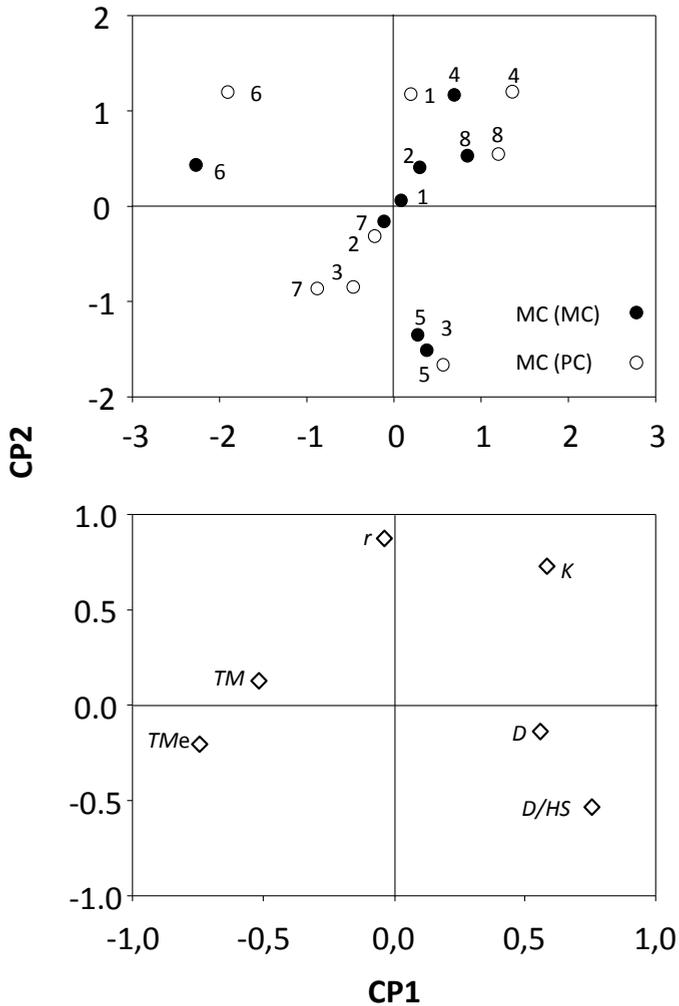


Figura 5.3. Análisis de componentes principales (ACP) de los parámetros de la dinámica poblacional de rotíferos correspondientes a las poblaciones experimentales MC(MC) y MC(PC). **A.** Localización de los clones en el espacio, definida por los componentes principales uno (CP1; 34,2 % de la varianza explicada) y dos (CP2; 27,6 % de la varianza explicada) (MC = círculos negros; MC creciendo junto a un PC = círculos blancos). **B.** Pesos factoriales de las variables en los ejes del ACP. r = tasa intrínseca de crecimiento, K = capacidad de carga, TM = tasa de mixis integrada para el período de crecimiento completo, TMe = tasa de mixis integrada para el período exponencial de crecimiento, D = producción total de huevos diapásicos, D/HS = producción de huevos diapásicos por hembra sexual.

Además, se encontró una correlación positiva entre la capacidad de carga y la tasa intrínseca de crecimiento ($r = 0,53$, g. l. = 14, $P < 0,05$), y se encontró una correlación negativa entre la capacidad de carga y la tasa de mixis integrada para el período de crecimiento exponencial ($r = -0,50$, g. l. = 14, $P < 0,05$).

Discusión

Las poblaciones experimentales de *B. plicatilis* con mayor diversidad genética no presentaron efectos detectables en los componentes de eficiencia medidos. Los cultivos policlonales (*i. e.*, genéticamente diversos) mostraron una dinámica poblacional similar a los cultivos monoclonales, y no se detectó ninguna diferencia estadística, independientemente de la combinación experimental. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este capítulo no apoyan la hipótesis de que las poblaciones genéticamente diversas de estos rotíferos tienen una mayor eficiencia a corto plazo con respecto de las poblaciones genéticamente homogéneas, las cuales crecieron en condiciones ambientales constantes, con limitación de recursos y en ausencia de otras interacciones interespecíficas. Si la diversidad genética estuviera asociada a una disminución de la competencia en el uso de recursos, se podría esperar un efecto positivo en la eficiencia, es decir, una ampliación del nicho ecológico dependiente de la diversidad de genotipos. Aunque la combinación de recursos utilizada en los experimentos de este capítulo no es una representación real de los recursos que utilizan las poblaciones de rotíferos en la naturaleza, las cuatro especies de algas que se suministraron a las poblaciones experimentales tenían diferente tamaño, movilidad y

calidad nutricional, y deberían ser lo bastante distintas como para permitir que algunos de los genotipos de esta especie de rotífero mostraran un uso diferencial de estos recursos disponibles. También se podría cuestionar si el conjunto de clones utilizado fue lo bastante diverso como para poder detectar un efecto notable; sin embargo, estos clones experimentales se originaron a partir de huevos diapáusicos resultado de reproducción sexual (*i. e.*, genotipos únicos), y que fueron recolectados al azar de una población que alberga una gran diversidad genética (Gómez & Carvalho, 2000; Campillo *et al.*, 2009). Por ejemplo, se han observado diferencias en rasgos importantes de la historia de vida entre clones de la misma especie (Aparici *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2009; Campillo *et al.*, 2010; véanse, Capítulos 3 y 4). Esto coincide con los resultados de los clones experimentales analizados en este capítulo, los cuales presentaron una diversidad genética importante en componentes de eficiencia ecológica relevantes, como lo evidencia la alta heredabilidad encontrada en todos los parámetros demográficos estudiados. Aunque la ausencia del efecto de un factor es difícil de demostrar, la alta similitud en los componentes de eficiencia en poblaciones monoclonales y policlonales sugiere que el efecto de la diversidad genética en la disminución de la competencia es, cuando mucho, baja en esta población de *B. plicatilis*.

Estudios previos hacían plausible la hipótesis de que la repartición de nicho fuese importante entre genotipos de *B. plicatilis*, ya que algunos resultados sugerían que la selección de recursos es dependiente del tamaño, la movilidad o la toxicidad del alimento

(Chotiyaputta & Hirayama, 1978; Hotos, 2002; Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados de los experimentos de este capítulo sugieren que los genotipos de *B. plicatilis* son consumidores generalistas y, aunque se necesita un análisis adicional que incluya más genotipos y diferentes poblaciones, la polifagia de esta especie (Hino & Hirano, 1980; Walker, 1981; Hansen *et al.*, 1997), tal vez, no está relacionada con la diversidad clonal. Por otro lado, actualmente se sabe que el taxón *B. plicatilis* es un complejo de especies crípticas, que incluye a la especie que se estudia aquí, *B. plicatilis sensu stricto* (Gómez *et al.*, 2002; Suatoni *et al.*, 2006). Entonces, el supuesto clásico de que *B. plicatilis* es un consumidor generalista podría deberse a que se han mezclado datos de alimentación que en realidad pertenecen a diferentes especies del complejo. Sin embargo, los resultados de los experimentos de este capítulo apoyan la idea de que *B. plicatilis sensu stricto*, después de todo, si tiene una dieta generalista, aun cuando ya se ha resuelto la taxonomía de esta especie. Otros estudios de competencia también sugieren un nicho relativamente amplio en el uso de recursos entre especies crípticas del complejo *B. plicatilis* donde se observó una amplia superposición de dietas (Ciros-Pérez *et al.*, 2001a). Entonces, la polifagia de *B. plicatilis* se correlaciona con el rango ecológico amplio que tiene esta especie dados los ambientes en los que habita (Gómez *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 1998; Ortells *et al.*, 2000; Lowe *et al.*, 2005, 2007), lo que sugiere que, *B. plicatilis* es un generalista capaz de hacer frente a la alta variabilidad temporal en los estanques efímeros y lagos donde habita.

En resumen, se puede hipotetizar que los genotipos de *B. plicatilis* han sido seleccionados por tener nichos amplios. Esto se opone tanto a la diferenciación de nicho dependiente del genotipo, como a la ventaja sustancial de la diversidad genética en la disminución de la competencia dentro de la población. Otros autores han encontrado resultados similares en otros organismos modelo. Por ejemplo, en el caso de la lombriz de tierra partenogenética *Octalasion tyrtaeum*, en la que diferentes genotipos coexisten sin un uso diferencial de los recursos (Jaenike *et al.*, 1980; Jaenike & Selander, 1985). Aunque en contraste, otros estudios han encontrado un desempeño superior en poblaciones compuestas por diferentes genotipos (Weeks, 1995; Koelewijn, 2004; Crutsinger *et al.*, 2006; Caesar *et al.*, 2010; Kotowska *et al.*, 2010). Además, en otro partenogenético cíclico zooplanctónico (*i. e.*, *Daphnia pulex*), se observó una disminución de la competencia intraespecífica en poblaciones policlonales en comparación con poblaciones monoclonales (Tagg *et al.*, 2005a, b).

La variación observada en los componentes de eficiencia entre los clones de *B. plicatilis* fue altamente significativa y, lo que es más importante para los objetivos de este capítulo y de la tesis, es que, la variación ocurre en rasgos relacionados con la reproducción sexual. Esto último es consistente con la heredabilidad significativa y la diferenciación poblacional encontrada en la misma especie por otros autores (Aparici *et al.*, 2001; Campillo *et al.*, 2009). Considerando que, la variación entre clones fue analizada con un ANOVA de dos vías sin replicación, es importante tener en cuenta

que, el término del error en este tipo de análisis representa: (1) la variación no explicada por los efectos (es decir, los factores clon y tratamiento) y (2) la variación debida a la interacción entre los efectos principales, ya que se supone un modelo aditivo. Esto implica que el estadístico F y la varianza entre clones podrían estar subestimada (se subestimarían si existe interacción), y la prueba de los efectos significativos del factor perdería potencia, implicando que, posiblemente, no se detecten los efectos que estén realmente presentes en los datos. Por lo tanto, la conclusión de que existe una variación entre los clones debe tomarse de manera conservadora.

La existencia de un compromiso con base genética entre la tasa de mixis (una medida integrada de la proporción en hijas sexuales en el tiempo) y la capacidad de carga no es sorprendente (véase p. e. Li & Niu, 2015). Este compromiso se esperaría porque una baja inversión en sexo favorece la proliferación partenogenética, lo que a su vez daría como resultado una mayor densidad poblacional, lo que tendría consecuencias poblacionales puesto que, tanto la densidad poblacional como la tasa de mixis contribuyen a la cantidad de huevos diapáusicos que se producen en una estación de crecimiento. Aunque no se encontró una relación estadística entre la producción de huevos y la tasa de mixis, se espera que una tasa de mixis moderada tenga un efecto positivo en la producción de huevos diapáusicos al permitir que se alcance una capacidad de carga alta (Snell, 1987; Serra & Carmona, 1993; Serra & King, 1999; Gilbert, 2002; Serra *et al.*, 2005; Lever *et al.*, 2021).

La existencia de variación genética relacionada con la reproducción sexual en las poblaciones plantea la interrogante de cómo se mantiene esta variación en la naturaleza. El régimen selectivo que actúa sobre la reproducción sexual en poblaciones de rotíferos naturales es bastante conocido (Stelzer, 2005; Ortells *et al.*, 2006; Serra & Snell, 2009; Carmona *et al.*, 2009), se sabe que las poblaciones de rotíferos habitan de manera temporal en la columna de agua y necesitan de los huevos diapáusicos (producidos sexualmente) para sobrevivir entre las estaciones de crecimiento. Por lo tanto, los cambios ambientales anuales en el hábitat pueden repercutir en la variación de la duración de las estaciones de crecimiento, en consecuencia, implicaría un régimen fluctuante en los patrones de inversión sexual. Los años con una estación de crecimiento corta seleccionarían una inversión sexual alta, con el efecto secundario de una densidad clonal máxima con valores bajos, y en los años con una estación de crecimiento larga tendrían el efecto contrario, como se mostró en el Capítulo 3. Entonces, si la selección fluctuante está operando, el banco de huevos diapáusicos estaría compuesto por una mezcla de genotipos con diferentes patrones de inversión sexual (Berg, 2005; Gómez, 2005).

La disminución de la competencia por recursos se ha propuesto como una ventaja a corto plazo para el mantenimiento del sexo, ya que, se espera que la recombinación disminuya la competitividad entre hermanos. La disminución en la competencia sería relevante si la dispersión de la descendencia es poca, o cuando se producen genotipos raros con nichos peculiares (Maynard-Smith,

1978; Bell, 1985; Koella, 1988). Sin embargo, en este caso, no se encontró evidencia de una menor competencia intraespecífica en los experimentos realizados con poblaciones de rotíferos genéticamente diversos. La descendencia producida sexualmente en rotíferos partenogenéticos cíclicos aparece, generalmente, al comienzo de la temporada de crecimiento planctónico, cuando la columna de agua está siendo colonizada por individuos eclosionados de huevos diapáusicos, lo que coincide con una diversidad clonal alta, por lo tanto, se esperaría que la competencia por los recursos sea baja. Más adelante en la temporada de crecimiento, la diversidad genética se vería erosionada (Gómez *et al.*, 1995; Ortells *et al.*, 2006), y la competencia intraespecífica aumentaría. Por lo tanto, en este ciclo de vida, el momento en el que la competencia debería ser mayor, dada la baja diversidad fenotípica, y el momento en que la diversidad genética es la más alta, generada por el sexo, no coinciden. Por lo cual, según los resultados de este capítulo es poco probable que la competencia confiera una ventaja selectiva sustancial a corto plazo para una mayor propensión al sexo; por el contrario, en el supuesto de que el sexo resultara en huevos que eclosionan subitáneamente (*i. e.*, que se desarrollan sin diapausa) sería adaptativo y se seleccionarían para periodos con densidades poblacionales altas. Aunque de manera general, se ha descrito que en la mayoría de las especies de rotíferos monogonontes, los huevos producidos sexualmente retrasan su eclosión (*i. e.*, diapausa obligada; Hagiwara & Hino, 1989) en comparación con los huevos producidos asexualmente (*i. e.*, subitáneos), en la actualidad, también se ha

comprobado que no es necesario un periodo prolongado de latencia después de la producción de huevos en diapausa (Scheuerl & Stelzer, 2013; Martínez-Ruiz & García-Roger, 2015).

Entonces, dados los resultados obtenidos, la diversidad genética alta, aparente, no tiene un efecto en la relajación de la competencia, sin embargo, dado que el sexo y la diapausa están vinculados en los rotíferos partenogenéticos cíclicos, la selección a corto plazo para el mantenimiento de la diapausa puede funcionar de manera indirecta en el mantenimiento del sexo generando ventajas a largo plazo a través de la diversificación (Serra & Snell, 2009; Walsh, 2013).

Capítulo 6

Discusión general y conclusiones

Esta tesis abordó un problema básico de la biología, la reproducción sexual, que es crucial para entender la ecología y evolución de las poblaciones y las especies que incluyen el sexo en su ciclo de vida. Así, en esta tesis se caracterizaron varios rasgos de la reproducción sexual para tener una mejor comprensión de su mantenimiento y de las consecuencias de la variabilidad que se genera, utilizando como modelo de estudio un rotífero monogononte con un ciclo de vida partenogenético cíclico. El planteamiento del proyecto parte de la base de que, el enigma de porqué prevalece la reproducción sexual en los eucariontes continua en debate desde que se planteó formalmente por Weismann en 1886 y, se mantiene como una cuestión central en la biología evolutiva pues, hasta ahora, no hay un consenso sobre los mecanismos que explican su mantenimiento entre diversos sistemas biológicos (Hartfield & Keightley, 2012; Hörandl *et al.*, 2020; MacPherson *et al.*, 2023). Esta paradoja aparente se mantiene, porque a la reproducción sexual se le han asociado una cantidad alta de costos, que van desde la asignación de energía en la producción de machos que no contribuyen al crecimiento de la población, hasta los numerosos costos asociados al esfuerzo reproductivo, entre otros (Maynard-Smith, 1978; Bell, 1985; Lewis, 1987; véase Capítulo 1).

En esta tesis, se utilizó al rotífero monogononte *Brachionus plicatilis*, que combina la reproducción sexual y asexual en su ciclo de vida (Gilbert, 1963; Wallace & Smith, 2009), en el cual, se analizaron diversos parámetros relacionados con la reproducción sexual, sus costos y efectos, estudiando una población natural, así como a través de la experimentación en condiciones controladas de laboratorio. Además, se exploraron algunas consecuencias ecológicas de la diversificación generada por el sexo en poblaciones experimentales en competencia por recursos.

La existencia de un compromiso teórico entre la reproducción sexual y asexual en el ciclo de vida de los partenogénéticos cíclicos (Snell, 1987; Serra & King, 1999) sirvió de base para el planteamiento de los objetivos de esta tesis. Se sabe que algunas hembras de *B. plicatilis* tienen diferentes niveles de inversión sexual, ya sea como su propensión a responder al factor inductor del sexo, o por la variación en sus tasas de mixis que reflejan diferentes porcentajes de producción de hembras sexuales. En cualquiera de los dos casos, la producción de hembras sexuales representa el costo del sexo en este ciclo de vida, ya que el sexo compromete el crecimiento clonal (Snell, 1987; Serra & Snell, 2009).

Considerando el compromiso de la inversión sexual en los rotíferos monogonontes, se espera que exista un efecto sobre la selección de individuos que incurran en un costo sexual menor a corto plazo, hipótesis que se analizó en el Capítulo 3, donde se demostró que existe una selección de clones de baja propensión a la

inducción sexual a lo largo de un ciclo de crecimiento planctónico en la población de *B. plicatilis* que habita en Poza Sur. Por otro lado, en el Capítulo 4 se trabajó con la hipótesis para analizar el supuesto de que aquellos individuos que invierten más en sexo (tasas de mixis) podrían compensar su costo a través del incremento de su fecundidad en descendencia asexual y/o en su supervivencia, lo que optimizaría su crecimiento clonal, hipótesis que no se comprobó, al contrario, se describió que no existe una compensación. Sin embargo, los resultados expusieron que la producción de hembras sexuales es costosa dado que se cumple el supuesto de que *todo lo demás es igual* en los rasgos de historia de vida de hembras individuales, excepto la inversión en descendencia sexual. Otra forma en que se podrían compensar los costos del sexo sería a través de las ventajas de la generación de diversidad genética y por lo tanto de diferenciación fenética que pudiera hacer frente a las condiciones ambientales diversas, por ejemplo, en el uso diferencial de recursos que permitiría la relajación de la competencia intrapoblacional, hipótesis que se analizó en el Capítulo 5, en el cual se documentó que el desempeño de las poblaciones genéticamente diversas y no diversas fue muy similar, por lo que no quedó en evidencia ninguna ventaja competitiva favorecida por el incremento de la diversidad clonal.

En el análisis de la propensión de la inducción sexual en la población natural de *B. plicatilis* que habita Poza Sur (Capítulo 3) se determinó que la reproducción sexual ocurre en un periodo de tiempo lo suficientemente prolongado, abarcando casi toda la

temporada de crecimiento planctónico. Además, se comprobó la existencia de un efecto denso-dependiente de la tasa de mixis, el cual debería estar asociado al aumento en la producción de la señal química inductora del sexo (Carmona *et al.*, 1993; Stelzer & Snell, 2003). Una respuesta diferencial entre las hembras de rotífero en el umbral a la señal inductora pone en evidencia el conflicto del sexo en este ciclo de vida, ya que algunos genotipos podrán responder antes o después al estímulo, lo cual generaría costos muy distintos (Serra *et al.*, 2005; Stelzer, 2011). Todos estos elementos, en conjunto, brindaron el escenario para probar la hipótesis de que la selección actúa a corto plazo en los clones con baja propensión sexual.

Así, a lo largo del periodo de crecimiento planctónico se comprobó la existencia de una variabilidad heredable en la propensión sexual en la población natural. Esta variabilidad en la propensión sexual en *B. plicatilis* se ha descrito en varias ocasiones en experimentos y en poblaciones naturales diferentes (Gabaldón & Carmona, 2015; Franch-Gras *et al.*, 2017; Seudre *et al.*, 2020). Además, también se detectó una alta heredabilidad en todos los parámetros demográficos relevantes en los experimentos de competencia entre poblaciones con diferentes niveles de diversidad genética realizados en el Capítulo 5. La heredabilidad en sentido amplio expone la relación entre la variación entre clones y la variación total dentro y entre ellos, entonces, los hallazgos que encontramos en esta tesis son indicativos del potencial evolutivo de los rasgos asociados a la reproducción sexual y de los rasgos demográficos como componentes importantes de la eficiencia, es

decir, ya que la variabilidad de dichos rasgos tiene bases genéticas, entonces, son susceptibles de ser seleccionados (Fussmann *et al.*, 2003; Herbers, 2010; Dagg, 2016). De igual manera, aunque no se midió la heredabilidad en el Capítulo 4, la variabilidad observada en otros rasgos de la historia de vida revela un componente genético, dado que, al utilizar la técnica de jardín común, la cual controla las condiciones ambientales en los experimentos, expone las diferencias individuales subyacentes. Hay que considerar que la variación es un requisito para que ocurra la selección natural, pero es necesario que al menos una parte de esa variabilidad sea heredable y relevante en términos de eficiencia (Futuyma, 2005; Lampert & Sommer, 2007).

El resultado más importante que se encontró en el Capítulo 3 fue que durante una estación de crecimiento planctónico se observó un aumento en la frecuencia de fenotipos con una propensión sexual tardía, es decir, la aparición del primer macho en los cultivos ocurrió cuando las densidades poblacionales fueron altas, lo cual implica que la proliferación asexual de estos clones se prolongó por más tiempo, en contraste con clones con una inducción temprana, es decir, que presentaron machos en densidades poblacionales bajas y adelantaron la producción de hembras sexuales. Por lo tanto, se comprobó por primera vez en una población natural que, los rotíferos monogonontes son susceptibles a pagar el costo del sexo cuando se analizan a lo largo de un ciclo de crecimiento planctónico anual, y que se encuentran en un proceso de selección constante dada la variabilidad del ambiente (Bulmer, 1982; Fussmann *et al.*, 2003).

La selección de genotipos con baja propensión sexual corresponde totalmente con las predicciones teóricas del compromiso que existe entre la producción de hembras sexuales y asexuales, donde el resultado de una reproducción tardía les da una ventaja numérica, que podría llevar, incluso, a que estos fenotipos dominaran la población dadas sus ventajas a corto plazo (Snell, 1987; Serra & King, 1999; Serra *et al.*, 2005), sin embargo, esto ocurriría siempre y cuando la estación de crecimiento fuera lo suficientemente larga. Esta situación se ha observado en experimentos en quimostatos, donde hay una selección en contra de los genotipos con mayor inversión sexual y donde se favorece la fijación de fenotipos asexuales a largo plazo (véase, p. e., Fussmann *et al.*, 2003). La posibilidad de la pérdida de la sexualidad de un partenogénico como *B. plicatilis* observada en la naturaleza (Capítulo 3) y la evidencia de la pérdida de la sexualidad en los quimostatos son un indicativo inequívoco de la inestabilidad del sexo en este ciclo de vida (Serra & Snell, 2009). Sin embargo, en hábitats naturales temporales no se ha observado una pérdida importante de la sexualidad o de una pérdida permanente en los rotíferos monogonontes, lo cual podría explicarse dado que la supervivencia entre años está ligada a la producción de huevos diapáusicos sexuales de manera obligada (Schröder, 2005; García-Roger *et al.*, 2019).

Las frecuencias relativas de los fenotipos que responden de manera diferencial a la inducción sexual que componen una población están influidas, principalmente, por factores ambientales (King & Serra, 1998). La inducción sexual temprana o tardía de las

hembras depende de la concentración de la proteína inductora del sexo, que es dependiente de la densidad poblacional y de la capacidad de respuesta de los individuos. Esta variación en la respuesta puede ser producto de la variabilidad genética en la producción o la quimiorrecepción de la proteína inductora de la reproducción sexual (Snell *et al.*, 2006). Según los resultados encontrados en el Capítulo 3, lo más probable es que las hembras aisladas en los volúmenes experimentales pequeños, aunque produzcan la señal química para desencadenar la mixis, no responden a las concentraciones de la proteína presentes en los pocillos, como consecuencia de que podrían existir alteraciones en los receptores involucrados en la detección de la proteína. Esto sería congruente con lo observado en la naturaleza, donde es probable que los genotipos que se inducen sexualmente a densidades poblacionales altas no coincidieron con los niveles umbrales del factor inductor necesarios y continuaron proliferando partenogenéticamente hasta que aumentó su frecuencia en la población. Los diferentes patrones de inducción podrían ser una respuesta adaptativa a las señales químicas determinadas por la densidad poblacional (Serra *et al.*, 2005).

La variabilidad fenotípica observada en el Capítulo 3 incluyó hembras con una inducción sexual temprana, rasgo que sería favorable si la duración de las condiciones ambientales adecuadas en las que ocurre el crecimiento planctónico fuese corta, además, si sumamos que, estos genotipos pueden generar un mayor porcentaje de hijas sexuales (véase, Seudre *et al.*, 2020), estos asegurarían al

menos la producción de unos cuantos huevos de resistencia, aunque el costo sería alto en términos de proliferación partenogenética. Por el contrario, en el otro extremo, los genotipos con una propensión sexual tardía serían favorecidos si la temporada planctónica fuera larga, siempre y cuando coincidan con las densidades poblacionales umbrales que inducen la reproducción sexual. De lo contrario la reproducción sexual muy tardía (*i. e.*, a densidades altas) podría ser subóptima al no poder producir huevos diapáusicos y, al final, serían eliminados de la población (Snell, 1987; Serra & King, 1999; Fussmann *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2005). Los diferentes patrones de inducción e inversión sexual podrían ser una respuesta adaptativa a la variabilidad ambiental (Schröder, 2005; Campillo *et al.*, 2009; Franch-Gras *et al.*, 2019), tema que se discutirá más adelante.

El estudio detallado de los rasgos de la historia de vida de *B. plicatilis* en el laboratorio (Capítulo 4) puso en evidencia el costo del sexo. Los rasgos de las historias de vida de las hembras estudiadas fueron equivalentes, excepto en el nivel de inversión sexual. La falta de correlación entre la tasa de mixis y los otros rasgos en los genotipos estudiados implican que una mayor producción de descendencia sexual no es compensada en algún rasgo asociado a una mayor fecundidad y/o supervivencia. La ausencia de compensación es una medida indirecta de que hay un costo del sexo, mientras que el resto de los parámetros son equivalente, es decir *todo lo demás es igual* (Maynard-Smith, 1971, 1978) por lo que, una hembra que invierte más en sexo compromete la producción de hijas asexuales y, por lo tanto, del crecimiento clonal puesto que estos

rasgos no son independientes ya que se contraponen entre sí en el ciclo de vida de los rotíferos partenogenéticos cíclicos (Snell, 1987; Serra & Carmona, 1993; Serra & King, 1999; Stelzer, 2005, 2011).

Así, una mayor inversión en términos de la producción de hembras sexuales es más costoso, lo cual tendría un resultado similar a presentar una propensión en inducción temprana como la descrita en la población natural analizada en el Capítulo 3. Ambos casos se ajustan al compromiso planteado sobre la inversión sexual en los partenogenéticos cíclicos (Snell, 1987; Serra & King, 1999). Entonces, invertir poco o tener una propensión sexual baja, proporcionarían ventajas para la reproducción partenogenética. Por el contrario, una propensión sexual alta y/o tasas de mixis elevadas representarían estrategias costosas en *B. plicatilis* en el corto plazo, provocando una reducción en sus tasas de crecimiento, compromiso que se comprobó a través de la correlación negativa entre la tasa de mixis y el éxito reproductivo calculado para la descendencia asexual (Capítulo 4). Además de estos dos parámetros de historia de vida, es importante considerar que, aunque se observó en condiciones controladas de laboratorio, la edad promedio en la cual las hembras inician la producción de hijas sexuales ocurre en edades tempranas, lo cual maximizaría el costo del sexo, ya que también representaría un freno a la proliferación asexual de esos genotipos, y tendría consecuencias en su capacidad competitiva, tanto durante la temporada de crecimiento planctónico (Capítulo 3) como en los experimentos de competencia entre clones con diferentes niveles de inversión sexual,

lo que se comprobó dada la correlación negativa entre la inversión sexual y la capacidad de carga poblacional (Capítulo 5).

Entonces, es probable que, no solo la propensión en inversión sexual, sino también la tasa de mixis y la edad a la cual se producen las hijas sexuales expliquen, en parte, el aumento de la frecuencia de genotipos que no pagan estos costos durante la temporada de crecimiento en la población natural analizada en el Capítulo 3. Sin embargo, a pesar de que se comprobó que el sexo es costoso en el corto plazo, podemos suponer que se compensa con las ventajas de la supervivencia a largo plazo (Schröder, 2005; García-Roger *et al.*, 2019), o por la recombinación genética que puede generar variabilidad fenotípica en los descendientes, lo que sería ventajoso ante diferentes presiones ambientales, tanto bióticas como abióticas (Williams, 1975; Bell, 1985; Meirmans & Strand, 2010).

Así, la equivalencia en los rasgos de las historias de vida en hembras individuales, excepto en algunos rasgos sexuales, exhibe la importancia del sexo en el corto plazo en el ciclo de vida de los partenogenéticos cíclicos que habitan en ambientes temporales, altamente variables. El análisis detallado de los parámetros de historia de vida permitió evaluar la eficiencia individual y su posible contribución a las generaciones futuras (Roff, 1993; Stearns, 1992; Stelzer, 2011) y el papel que juegan en su desempeño en los ambientes que habitan. Así, la diversidad observada en los diferentes componentes de eficiencia entre los clones de *B. plicatilis*, a lo largo de los Capítulos 3 y 4, debería ser importante para explicar su

desempeño. Se ha hipotetizado que cualquier ventaja intrínseca del sexo asociada a la generación de diversificación reforzaría el mantenimiento de la reproducción sexual a corto plazo (Meirmans & Strand, 2010), por ejemplo, a través de una ventaja en las interacciones bióticas como la competencia, a través del uso diferencial de los recursos entre los diferentes genotipos (Bulmer, 1980; Case & Taper, 1986; Tagg *et al.*, 2005a, 2005b). Sin embargo, los resultados obtenidos de las interacciones competitivas entre poblaciones policlonales (genéticamente diversas) y poblaciones monoclonales (no diversas) no mostraron ninguna ventaja asociada al uso diferencial de recursos. Las dinámicas poblacionales de ambos tipos de cultivos fueron muy similares, al contrario de lo que se esperaba, un efecto positivo en la eficiencia de los cultivos policlonales.

Aunque hay evidencia de que *B. plicatilis* tiene un espectro amplio en el tamaño de las partículas que consume, se ha descrito que se alimenta preferentemente de manera selectiva de presas de tamaños en un rango óptimo (Hansen *et al.*, 1997; Gilbert, 2022). De hecho, los resultados obtenidos en el Capítulo 5 sugieren que los genotipos de *B. plicatilis* son consumidores polífagos dentro del rango de recursos disponibles en el experimento, lo cual se opone a la hipótesis de una diferenciación de nicho dependiente del genotipo, lo que relajaría la competencia. Este resultado es relevante para explicar la dinámica de crecimiento planctónico en la población natural (Capítulo 3), dado que el momento en el que se da la mayor diversidad genética al inicio de la temporada, resultado de la eclosión

de rotíferos desde el banco de huevos diapáusicos (Gómez *et al.*, 1995; Ortells *et al.*, 2006) que, además, está asociado con la mayor densidad poblacional, no corresponde con la mayor presión competitiva. Por lo tanto, esto sugiere que la competencia *per se* no confiere una ventaja sustancial a corto plazo para que promueva la diversificación a través de la reproducción sexual (Capítulo 5). La característica de ser un consumidor generalista en el uso de recursos de *B. plicatilis* puede estar correlacionado con el rango amplio de ambientes en los que habita la especie (Gómez *et al.*, 1995; Ortells *et al.*, 2006; Franch-Gras *et al.*, 2017, 2019) donde, teóricamente, una dieta diversa tendría ventajas ecológicas, puesto que sus recursos también podrían estar influenciados por un ambiente con condiciones fluctuantes.

Aunque la diversidad genética entre los clones de las poblaciones policlonales no se relacionó con el uso diferencial de recursos, sí se relacionó con otros parámetros, por ejemplo, con la tasa de mixis, la producción de huevos de resistencia, la tasa intrínseca de crecimiento y la capacidad de carga, rasgos poblacionales que están altamente correlacionados con la eficiencia de la especie. La existencia de una correlación negativa entre la capacidad de carga y la tasa de mixis durante la fase de crecimiento exponencial es especialmente notable, dados los objetivos de esta tesis, la cual evidencia claramente el costo del sexo. De acuerdo con esto, es de esperarse que en una población que invierta más en hembras sexuales se comprometa la densidad poblacional que puede alcanzar, lo que, además, tendría consecuencias en la cantidad de

huevos diapáusicos que se pueden producir. Teóricamente, una tasa de mixis moderada de descendencia sexual tiene un efecto positivo en la producción de huevos al permitir que se alcance una capacidad de carga alta (Snell, 1987; Serra & Carmona, 1993; Serra & King, 1999; Gilbert, 2002; Serra *et al.*, 2005).

El compromiso de una inversión en descendencia sexual observado en los diferentes capítulos de esta tesis, puede ser contrapuesta de manera directa con la necesidad de la producción de los huevos diapáusicos, ya que representarían la única forma eficiente de sobrevivir a condiciones ambientales adversas y, eventualmente, reclutarse a la siguiente estación de crecimiento planctónico (Gilbert, 1974; King & Snell, 1977), por lo que la diapausa representa una ventaja intrínseca del sexo que refuerza el mantenimiento de la reproducción sexual a largo plazo (Serra & Snell, 2009; Stelzer, 2015; Stelzer & Lehtonen, 2016).

La optimización del sexo en rotíferos ha sido estudiada a través de sus efectos en la producción de huevos diapáusicos (Serra & Carmona, 1993; Aparici *et al.*, 1996; Serra & King, 1999) y se ha demostrado que debe involucrar diversos rasgos de la reproducción sexual, como el momento de inducción, la tasa de mixis, la edad de la madre, entre otros factores. El sexo en *B. plicatilis* y otros partenogenéticos cíclicos tienen una doble función, la diapausa y la generación de variabilidad genotípica, que se gana tras la recombinación (Gilbert, 1974; King & Snell, 1977). Por lo que, los patrones de cuando ocurre la reproducción sexual a lo largo de una

temporada de crecimiento planctónico también tienen efectos en los niveles de diversidad genética de la descendencia. Por ejemplo, las hembras que inducen la reproducción sexual de manera temprana tenderán a generar niveles más altos de diversidad entre su progenie en comparación con aquellas que se inducen de manera tardía (King, 1980; Gómez & Carvallo, 2000). Además, se ha descrito que una mayor inversión sexual también genera una mayor diversidad genética, por lo que, se esperaría que los descendientes puedan enfrentar mejor las condiciones heterogéneas y novedosas del ambiente cuando las presiones adaptativas son fuertes (Becks & Agrawal, 2010, 2012).

La diversidad genética quedará representada en los huevos diapáusicos depositados en los sedimentos, que son una mezcla de huevos producidos en años diferentes, ya que no todos eclosionan en la siguiente estación de crecimiento, lo que contribuye al aumento de variabilidad genética potencial de la población. Así, es fácil explicar por qué el banco de huevos puede tener un impacto en la estructura genética de la población y en sus dinámicas evolutivas (Ellner & Hairston, 1994; Brendonck & De Meester, 2003; Hairston & Fox, 2009).

La variabilidad genética en los rasgos sexuales, como la propensión sexual observada en miles de organismos en el Capítulo 3 en la población natural de Poza Sur, desde temprana hasta tardía (inducción sexual iniciada desde 4 hasta 477 hembras mL⁻¹), así como la variabilidad en la inversión en descendientes sexuales (0 a 33 %)

analizada en 45 genotipos en el experimento de tablas de vida (Capítulo 4), y la variación de rasgos de eficiencia poblacional en los experimentos de competencia (Capítulo 5), puede ser explicada, en parte, por la selección de los diferentes genotipos que ha ocurrido ante las condiciones ambientales que han actuado como presiones evolutivas en los cuerpos de agua donde habitan (Campillo *et al.*, 2009; Walsh, 2013; Franch-Gras *et al.*, 2017) que, en esta tesis, corresponden a ambientes acuáticos someros, altamente variables, que se desecan en verano, característicos de la región mediterránea (Blondel & Aronson, 1999; Quintana *et al.*, 2006). Por lo que, la existencia de genotipos con rasgos diversos en su reproducción sexual será dependiente de su eficiencia para hacer frente a las fluctuaciones ambientales (Warner & Chesson, 1984; Stelzer & Lehtonen, 2016), entonces, el mantenimiento de una variabilidad genética alta y la coexistencia de fenotipos diferentes podría ser explicada por la selección fluctuante (Spencer *et al.*, 2001; Bell, 2010). Lo que se ajusta a los patrones descritos en los niveles de inversión sexual de *B. plicatilis* que dependen de los cambios en la duración de las temporadas adecuadas para el crecimiento planctónico en los cuerpos de agua que habita (Campillo *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que existe una correlación positiva de la propensión sexual con el grado de previsibilidad ambiental y que, los genotipos que tienen una propensión sexual temprana tienen una estrategia de bajo riesgo en temporadas impredeciblemente cortas (Serra & King, 1999; Tarazona *et al.*, 2017). Por otro lado, en estudios de laboratorio se ha demostrado la evolución rápida de poblaciones

de rotíferos sometidas a regímenes de hidroperíodo corto, que evolucionaron a una mayor inversión en sexo y diapausa (Smith & Snell, 2012), y a una propensión sexual temprana cuando fueron sometidas a un régimen de fluctuación ambiental (Tarazona *et al.*, 2017). Entonces, el sexo puede facilitar la adaptación para habitar ambientes temporales, espacialmente variables y complejos (Becks & Agrawal, 2010, 2012; Luijckx *et al.*, 2017; MacPherson *et al.*, 2022). Así, todo indica que la variación ambiental es de suma importancia actuando como una presión de selección sobre los rasgos sexuales en *B. plicatilis* y otros partenogénéticos cíclicos, lo que explica la posibilidad de la coexistencia de genotipos con diferentes niveles de propensión sexual (de tempranos hasta tardíos) y de diferente inversión en hijas sexuales (de poca o mucha) como las observadas a lo largo de esta tesis, por lo que, la reproducción sexual, que genera huevos de diapausa y variabilidad genética, compensaría los costos del sexo en rotíferos que habitan en ambientes temporales y/o estocásticos (Stelzer & Lehtonen, 2016).

Consideraciones finales

En suma, los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen con evidencia empírica sobre los costos del sexo y de algunas de sus consecuencias ecológicas, lo que impacta, al menos en parte, a la teoría evolutiva del mantenimiento del sexo en un partenogénético cíclico. Específicamente, el análisis de los patrones de variabilidad genética en la propensión a la reproducción sexual mostró, por primera vez, una tendencia de la pérdida de la sexualidad a lo largo de un ciclo planctónico en una población natural de *B. plicatilis*

(Capítulo 3). Además, se ha puesto en evidencia el costo del sexo a través de la correlación negativa que se observó entre la inversión sexual y el éxito reproductivo calculado para la descendencia asexual (Capítulo 4), y a partir de la correlación negativa de una mayor inversión sexual y de la capacidad de carga poblacional (Capítulo 5), lo que se explica a través del compromiso entre la inversión en descendientes sexuales y la producción de descendientes asexuales, y la ventaja a corto plazo observada en los clones con menor propensión sexual durante un crecimiento planctónico anual (Capítulo 3).

Es relevante señalar que, la selección de genotipos con menor propensión genética al sexo dada su mayor eficiencia a corto plazo (Capítulo 3), observada a lo largo de un ciclo de crecimiento planctónico en la población natural de Poza Sur, da cuenta de un proceso de evolución ocurrida en escala ecológica, a la que se le ha denominado evolución rápida (Fussmann *et al.*, 2003; Hairston *et al.*, 2005). Sin embargo, es importante considerar que, la ventaja de una menor propensión a la reproducción sexual, al mismo tiempo, podría conducir a una probable extinción de este tipo de genotipos al final de la temporada. Además, si esta selección ocurre año con año en este tipo de ambientes que presentan alta variabilidad ecológica, podría dar lugar a un proceso de evolución fluctuante a nivel local, pero también, probablemente, asociada con variación espacial entre ambientes contrastantes (p. e., una temporalidad corta vs. larga, o más o menos predecibles interanualmente), a nivel regional (véase, p. e., Franch-Gras *et al.*, 2017; Tarazona *et al.*, 2017), lo que explicaría

la diversidad genética alta observada en los rasgos sexuales y poblacionales estudiados de esta especie a lo largo de la tesis.

Entonces, en esta tesis se presenta evidencia de que no existe una compensación cuando se invierte más en sexo en *B. plicatilis*, por lo que, se discutió la importancia de la vinculación de la reproducción sexual con la función ecológica de la diapausa, como una explicación alternativa para el mantenimiento del sexo a largo plazo que, además, está ligado con la generación de diversidad genética, que se verá representada en el banco de huevos de resistencia (Schröder, 2005; García-Roger *et al.*, 2019).

Brachionus plicatilis resultó ser un modelo de estudio ideal para el análisis del costo del sexo y algunas de sus consecuencias. Así, los rasgos elegidos para alcanzar los objetivos de la tesis fueron suficientes para poner en evidencia el compromiso que existe entre la inversión en reproducción asexual vs. sexual. Sin embargo, dada la interacción compleja entre los rasgos, sería deseable que, sobre la base de estos resultados, en investigación futuras, se analice la estimación de la propensión en descendencia sexual (véase, Capítulo 3), de manera simultánea con la inversión sexual (véase, Capítulo 4) para estimar de manera más precisa el costo del sexo entre los diferentes genotipos, para revelar si los clones con mayor propensión también invierten en una mayor tasa de mixis (véase, p. e., Seudre *et al.*, 2020), lo que revelaría la existencia de un costo del sexo aún mayor en el corto plazo pero que pudiera tener ventajas si las

temporadas de crecimiento planctónico fuesen impredeciblemente cortas.

Entonces, dados los resultados obtenidos en esta tesis bajo condiciones experimentales benignas (p. e., recursos de buena calidad nutricional y concentraciones altas), en los que no se observó una compensación de la inversión sexual, otro aspecto que podría explorarse para obtener información adicional es la respuesta de la reproducción asexual ante la fluctuación de los recursos (Hinz *et al.*, 2017; MacPherson *et al.*, 2021; Lever *et al.*, 2021), esto sobre la base de que, la variación fenotípica producto del sexo, proporcionaría una ventaja selectiva en ambientes que fluctúan aleatoriamente (Pierre *et al.*, 2022), y que en la actualidad, se sabe que la fluctuación ambiental (ya sean predecibles o impredecibles) actúa como una presión importante que determina la selección de rasgos sexuales y que puede tener un efecto importante en el ciclo de vida de este partenogenético cíclico (Tarazona *et al.*, 2017; Franch-Gras *et al.*, 2017, 2019).

Conclusiones

En esta tesis se abordó un tema básico de la biología, la reproducción sexual, rasgo que es crucial en la ecología y evolución de las poblaciones y de las especies que combina la reproducción asexual y sexual en un mismo ciclo de vida, como lo son los rotíferos monogonotes. En suma, los resultados obtenidos contribuyen con evidencia empírica sobre los costos del sexo y de algunas de sus consecuencias ecológicas, lo que impacta, al menos en parte, a la

teoría evolutiva del mantenimiento del sexo en un partenogenético cíclico. A partir de los resultados generados a lo largo de la tesis, se puede concluir que:

1. Existe evidencia de una variabilidad heredable en los diferentes rasgos estudiados en *B. plicatilis*, se describió una variación en la propensión a la inducción sexual en clones provenientes de un ambiente natural (Poza Sur; Prat de Cabanes-Torreblanca) colectados durante un ciclo anual (Capítulo 3), así como en los componentes de eficiencia poblacional en genotipos provenientes del mismo cuerpo de agua, creciendo en cultivos experimentales sujetos a competencia por recursos (Capítulo 5). También, se documentó la variabilidad clonal en los rasgos de historia de vida de diversos genotipos provenientes de diez poblaciones que habitan en cuerpos de agua españoles, y que fueron estudiados en experimentos de tabla de vida (Capítulo 4). Dado que la variabilidad de dichos rasgos tiene bases genéticas, entonces, son susceptibles de ser seleccionados y, por lo tanto, son relevantes desde el punto de vista ecológico y evolutivo.
2. El aumento en la frecuencia de clones con baja propensión sexual a lo largo del ciclo de crecimiento planctónico indica que existe una selección de genotipos con baja inversión sexual en el corto plazo (Capítulo 3). La baja propensión sexual de estos clones les confiere una ventaja numérica dada su mayor reproducción partenogenética. En contraparte, aquellos genotipos que presentan una propensión sexual elevada tienen consecuencias ecológicas al invertir más temprano en la

producción de descendientes sexuales, frenando su potencial de crecimiento clonal, lo que pone en evidencia el costo del sexo.

3. La selección de clones con baja inversión en reproducción sexual pone de manifiesto la inestabilidad del sexo en el ciclo de vida de este partenogenético cíclico, donde la pérdida de la sexualidad es probable que ocurra debido a sus costos a corto plazo (Capítulo 3). Sin embargo, una pérdida importante de la sexualidad en esta especie no ha sido documentada en ambientes naturales.
4. La selección de clones con una menor propensión sexual y con un mayor potencial de crecimiento partenogenético a lo largo de una temporada de crecimiento planctónico, pone de manifiesto el proceso de selección en tiempo ecológico, y por lo tanto de evolución rápida en una población natural (Capítulo 3).
5. Se puso en evidencia que los rasgos de la historia de vida entre diferentes genotipos de esta especie de rotífero fueron equivalentes, excepto en el nivel de inversión sexual, es decir se cumple la suposición de *todo lo demás es igual* (Capítulo 4). Entonces, se concluye que, aquellos individuos que invierten más en sexo no son capaces de compensarlo a través del incremento de su fecundidad y/o supervivencia. Por lo que, se evidencia que el sexo es costoso en *B. plicatilis*, lo que explica la falta de correlación entre la inversión sexual y cualquier otro rasgo de la historia de vida.
6. El desempeño de las poblaciones genéticamente diversas (policlonales) y no diversas (monoclonales) de rotíferos

eclosionados de huevos diapáusicos fue muy similar en los rasgos de eficiencia poblacional en experimentos de competencia por recursos, por lo que, se evidenció que la variabilidad generada por la recombinación sexual no parece brindar una ventaja en el uso diferencial de recursos, lo que implica que no se observó evidencia de una reducción de la competencia en poblaciones genéticamente diversas (Capítulo 5).

7. Se encontró variabilidad en su nivel de inversión sexual en los diferentes genotipos cultivados en condiciones de laboratorio que se correlacionó con la capacidad de carga (Capítulo 5), lo que sugiere que, a mayor inversión en descendencia sexual se frena el crecimiento poblacional y, como consecuencia, se alcanza una menor densidad poblacional, lo que también evidencia el costo del sexo en este rotífero partenogenético cíclico.
8. De acuerdo con los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis, en los que se demostró el costo del sexo, pero no se halló evidencia de la existencia de una compensación ni en fecundidad ni en supervivencia, o en alguna ventaja, resultado de la diversidad genética, en el uso diferencial de recursos en condiciones de competencia, es evidente que se requiere de explicaciones alternativas que den cuenta del beneficio del sexo que justifique su mantenimiento. En el caso de *B. plicatilis* y otros partenogenéticos cíclicos, es indudable la necesidad de producir huevos diapáusicos por vía sexual que garanticen su

supervivencia cuando las condiciones ambientales son adversas, lo que garantizaría el mantenimiento del sexo a largo plazo.

Los resultados empíricos generados con esta tesis contribuyen a incrementar el entendimiento de los efectos ecológicos y evolutivos que favorecen el mantenimiento de la reproducción sexual en un partenogenético cíclico.

Referencias

- Aguirre, J. D., & Marshall, D. J. (2012). Does genetic diversity reduce sibling competition? *Evolution*, *66*(1), 94–102.
- Allen, D. E., & Lynch, M. (2008). Both costs and benefits of sex correlate with relative frequency of asexual reproduction in cyclically parthenogenic *Daphnia pulicaria* populations. *Genetics*, *179*(3), 1497–1502.
- Alonso, M. (1998). Las lagunas de la España peninsular. *Limnetica*, *15*(1), 176.
- Aparici, E., Carmona, M. J., & Serra, M. (1996). Polymorphism in bisexual reproductive patterns of cyclical parthenogens. A simulation approach using a rotifer growth model. *Ecological Modelling*, *88*(1–3), 133–142.
- Aparici, E., Carmona, M. J., & Serra, M. (2001). Intrapopulation variability for mixis initiation in *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, *446/447*, 45–50.
- Aparici, E., Carmona, M. J., & Serra, M. (2002). Evidence for an even sex allocation in haplodiploid cyclical parthenogens. *Journal of Evolutionary Biology*, *15*(1), 65–73.
- Armengol, X., Boronat, L., Camacho, A., & Wurtsbaugh, W. A. (2001). Grazing by a dominant rotifer *Conochilus unicornis* Rousselet in a mountain lake: in situ measurements with synthetic microspheres. *Hydrobiologia*, *446/447*, 107–114.
- Ashman, T. L., Bachtrog, D., Blackmon, H., Goldberg, E. E., Hahn, M. W., Kirkpatrick, M., ... & Vamosi, J. C. (2014). Tree of sex: a database of sexual systems. *Sci Data*, *1*, 140015.
- Avise, J. C., Quattro, J. M., & Vrijenhoek, R. C. (1992). Molecular clones within organismal clones: mitochondrial DNA phylogenies and the evolutionary histories of unisexual vertebrates. *Evolutionary Biology*, *26*, 225–246.
- Baer, A., Langdon, C., Mills, S., Schulz, C., & Hamre, K. (2008). Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* “Cayman” using polystyrene latex beads. *Aquaculture*, *282*(1–4), 75–82.
- Barton, N. H. (2010). Mutation and the evolution of recombination. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1544), 1281–1294.

- Becks, L., & Agrawal, A. F. (2010). Higher rates of sex evolve in spatially heterogeneous environments. *Nature*, *468*, 89–92.
- Becks, L., & Agrawal, A. F. (2012). The evolution of sex is favoured during adaptation to new environments. *PLoS Biology*, *10*(5), e1001317.
- Bell, G. (1982). *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. Croom Helm, London; University of California Press, Berkeley.
- Bell, G. (1985). Two theories of sex and variation. *Experientia*, *41*, 1235–1245.
- Bell, G. (2010). Fluctuating selection: the perpetual renewal of adaptation in variable environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1537), 87–97.
- Bennett, W. N., & Boraas, M. E. (1989). A demographic profile of the fastest growing metazoan: a strain of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Oikos*, 365–369.
- Berg, L. M. (2005). Fluctuating selection, egg banks and population genetic structure in cyclically parthenogenetic species. *Hydrobiologia*, *549*, 287–295.
- Birch, L. (1948). The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *The Journal of Animal Ecology*, *17*, 15–26.
- Birky Jr, C. W., & Gilbert, J. J. (1971). Parthenogenesis in rotifers: the control of sexual and asexual reproduction. *American Zoologist*, *11*(2), 245–266.
- Blondel, J., & Aronson, J. (1999). *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*. Oxford University Press, Oxford.
- BOE–A–2019–2841. 2019. Dirección General de Biodiversidad y Calidad Ambiental. Inventario español de zonas húmedas 59 nuevos humedales de la Comunidad Autónoma de Castilla–La Mancha. No. 51. [https://www.boe.es/eli/es/res/2018/10/09/\(7\)](https://www.boe.es/eli/es/res/2018/10/09/(7)).
- Boraas, M. E. (1983). Population dynamics of food-limited rotifers in two-stage chemostat culture 1, 2. *Limnology & Oceanography*, *28*(3), 546–563.
- Boyden, S., Binkley, D., & Stape, J. L. (2008). Competition among Eucalyptus trees depends on genetic variation and resource supply. *Ecology*, *89*(10), 2850–2859.

- Brendonck, L., & De Meester, L. (2003). Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 491, 65–84.
- Brookfield, J. F. Y. (1999). Explanation and prediction and the maintenance of sexual reproduction. *Journal of Evolutionary Biology*, 12, 1017–1019.
- Brown, M. R. (1991). The amino–acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145(1), 79–99.
- Bulmer, M. G. (1980). The sib competition model for the maintenance of sex and recombination. *Journal of Theoretical Biology*, 82(2), 335–345.
- Bulmer, M. G. (1982). Cyclical parthenogenesis and the cost of sex. *Journal of Theoretical Biology*, 94(1), 197–207.
- Burt, A. (2000). Perspective: sex, recombination, and the efficacy of selection, was Weismann right? *Evolution*, 54(2), 337–351.
- Burt, A., & Bell, G. (1992). Tests of sib diversification theories of outcrossing in *Impatiens capensis*: effects of inbreeding and neighbor relatedness on production and infestation. *Journal of Evolutionary Biology*, 5(4), 575–588.
- Butlin, R. (2002). The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 311–317.
- Caesar, S., Karlsson, M., & Forsman, A. (2010). Diversity and relatedness enhance survival in color polymorphic grasshoppers. *PLoS ONE*, 5(5), e10880.
- Campillo, S., García–Roger, E. M., Carmona, M. J., & Serra, M. (2011). Local adaptation in rotifer populations. *Evolutionary Ecology*, 25, 933–947.
- Campillo, S., García–Roger, E. M., Carmona, M. J., Gómez, A., & Serra, M. (2009). Selection on life-history traits and genetic population divergence in rotifers. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(12), 2542–2553.
- 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. In: Herzig, A., Gulati, R. D., Jersabek, C. D., May, L. (eds). Rotifera X. Developments in Hydrobiology. Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 181–187
- Carmona, M. J., Dimas–Flores, N., García–Roger, E. M., & Serra, M. (2009). Selection of low investment in sex in a cyclically parthenogenetic rotifer. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(10), 1975–1983.

- Carmona, M. J., Gomez, A., & Serra, M. (1995). Mictic patterns of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller in small ponds. In: Ejsmont-Karabin, J., Pontin, R.M. (eds). Rotifera VII. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 109,365–371.
- Carmona, M. J., Serra, M. & Miracle, M. R. (1994). Effect of population density and genotype on life–history traits in the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 182(2), 223–235.
- Carmona, M. J., Serra, M., & Miracle, M. R. (1993). Relationships between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. In: Gilbert, J. J., Lubzens, E., Miracle, M. R. (eds). Rotifer Symposium VI. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia* 256/257, 145–152.
- Carvalho, G. R. (1994). Evolutionary genetics of aquatic clonal invertebrates: concepts, problems and prospects. *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, 291–323.
- Case, T. J., & Taper, M. L. (1986). On the coexistence and coevolution of asexual and sexual competitors. *Evolution*, 40(2), 366–387.
- Charlesworth, B. (1980). The cost of sex in relation to mating system. *Journal of Theoretical Biology*, 84(4), 655–671.
- Cheplick, G. P. (1992). Sibling competition in plants. *Journal of Ecology*, 80, 567–575.
- Chotiayaputta, C., & Hirayama, K. (1978). Food selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* feeding on phytoplankton. *Marine Biology*, 45, 105–111.
- Ciros-Pérez, J. (2001). Exclusión y coexistencia entre especies gemelas de rotíferos: mecanismos subyacentes. Tesis doctoral. Universitat de València).
- Ciros-Pérez, J., Carmona, M. J., & Serra, M. (2001a). Resource competition between sympatric sibling rotifer species. *Limnology & Oceanography*, 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*, 23, 1311–1328.
- Cirujano, S., Montes, C., & García, L. (1988). Los humedales de la provincia de Albacete: una panorámica general. Al-Basit: *Revista de Estudios Albacetenses*, (24), 77–95.

- Colbourne, J. K., & Hebert, P. D. (1996). The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1337), 349–360.
- Colegrave, N. (2002). Sex releases the speed limit on evolution. *Nature*, 420, 664–666.
- Corley, L. S., & Moore, A. J. (1999). Fitness of alternative modes of reproduction: developmental constraints and the evolutionary maintenance of sex. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1418), 471–476.
- Crummett, L. T., & Wayne, M. L. (2009). Comparing fecundity in parthenogenetic versus sexual populations of the freshwater snail *Campeloma limum*: Is there a two-fold cost of sex? *Invertebrate Biology*, 128(1), 1–8.
- Crutsinger, G. M., Collins, M. D., Fordyce, J. A., Gompert, Z., Nice, C. C., & Sanders, N. J. (2006). Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem process. *Science*, 313(5789), 966–968.
- Cuellar, O. (1977). Animal parthenogenesis: a new evolutionary–ecological model is needed. *Science*, 197(4306), 837–843.
- Dagg, J. (2016). On recognizing the paradox of sex. *Philosophy, Theory, and Practice in Biology*, 8 (20160629), 1–17
- Daly, M. (1978). The cost of mating. *The American Naturalist*, 112(986), 771–774.
- De Meeûs, T., Prugnolle, F., & Agnew, P. (2007). Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(11), 1355–1372.
- De Paggi, S. B. J., Wallace, R., Fontaneto, D., & Marinone, M. C. (2020). Phylum rotifera. In Thorp, H. J. & Covich, A. P. *Freshwater invertebrates*. Academic Press
- Decaestecker, E., De Meester, L., & Mergeay, J. (2009). Cyclical parthenogenesis in *Daphnia*: sexual versus asexual reproduction. In: Schön, I., Martens, K., & Dijk, P. (eds). *Lost Sex*. Springer, Dordrecht, pp 295–316.
- Decaestecker, E., Gaba, S., Raeymaekers, J. A., Stoks, R., Van Kerckhoven, L., Ebert, D., & De Meester, L. (2007). Host–parasite ‘Red Queen’ dynamics archived in pond sediment. *Nature*, 450(7171), 870–873.

- Declerck, S. A., & Papakostas, S. (2017). Monogonont rotifers as model systems for the study of micro-evolutionary adaptation and its eco-evolutionary implications. *Hydrobiologia*, 796, 131–144.
- Deng, H. W. (1996). Environmental and genetic control of sexual reproduction in *Daphnia*. *Heredity*, 76(5), 449–458.
- Doncaster, C. P., Pound, G. E., & Cox, S. J. (2000). The ecological cost of sex. *Nature*, 404(6775), 281–285.
- D'Souza, T. G., & Michiels, N. K. (2010). The costs and benefits of occasional sex: theoretical predictions and a case study. *Journal of Heredity*, 101(suppl_1), S34–S41.
- Ellner, S., & Hairston Jr, N. G. (1994). Role of overlapping generations in maintaining genetic variation in a fluctuating environment. *The American Naturalist*, 143(3), 403–417.
- Enders, C. K. (2010). Applied Missing Data Analysis. The Guilford Press, New York.
- Epp, R. W., & Lewis Jr, W. M. (1979). Sexual dimorphism in *Brachionus plicatilis* (Rotifera): evolutionary and adaptive significance. *Evolution*, 33(3), 919–928.
- Fernández, M. J., Charco, G. J., & Picazo, T. J. (1990). Estructura fenológica de la comunidad de aves acuáticas en el endorreísmo del sureste de Albacete. Al-Basit: *Revista de Estudios Albacetenses*, (27), 87–100.
- Fontaneto, D., Flot, J. F., & Tang, C. Q. (2015). Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. *Marine Biodiversity*, 45(3), 433–451.
- Fontaneto, D., Giordani, I., Melone, G., & Serra, M. (2007). Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia*, 583, 297–307.
- Franch-Gras, L., García-Roger, E. M., Franch, B., Carmona, M. J., & Serra, M. (2017). Quantifying unpredictability: a multiple-model approach based on satellite imagery data from Mediterranean ponds. *PLoS ONE*, 12(11), e0187958.
- Franch-Gras, L., Hahn, C., García-Roger, E. M., Carmona, M. J., Serra, M., & Gómez, A. (2018). Genomic signatures of local adaptation to the degree of environmental predictability in rotifers. *Scientific reports*, 8(1), 1–14.
- Franch-Gras, L., Tarazona, E., García-Roger, E. M., Carmona, M. J., Gómez, A., & Serra, M. (2019). Rotifer adaptation to the unpredictability of the growing season. *Hydrobiologia*, 844, 257–273.

- Fu, Y., Hirayama, K., & Natsukari, Y. (1991a). Genetic divergence between S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* OF Müller. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 151(1), 43–56.
- Fu, Y., Hirayama, K., & Natsukari, Y. (1991b). Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* OF Müller. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 151(1), 29–41.
- Fussmann, G. F. (2011). Rotifers: excellent subjects for the study of macro- and microevolutionary change. *Hydrobiologia*, 662, 11–18.
- Fussmann, G. F., Ellner, S. P., & Hairston Jr, N. G. (2003). Evolution as a critical component of plankton dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1519), 1015–1022.
- Fussmann, G. F., Kramer, G., & Labib, M. (2007). Incomplete induction of mixis in *Brachionus calyciflorus*: patterns of reproduction at the individual level. *Hydrobiologia*, 593, 111–119.
- Futuyma, D. J. (2005). *Evolution*. Third. edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts U.S.A
- Gabaldón, C., Fontaneto, D., Carmona, M. J., Montero-Pau, J., & Serra, M. (2017). Ecological differentiation in cryptic rotifer species: what we can learn from the *Brachionus plicatilis* complex. *Hydrobiologia*, 796, 7–18.
- Gabaldón, C., Serra, M., Carmona, M. J., & Montero-Pau, J. (2015). Life-history traits, abiotic environment and coexistence: the case of two cryptic rotifer species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 465, 142–152.
- García, C., & Toro, M. A. (1992). Sib competition in *Tribolium*: a test of the elbow-room model. *Heredity*, 68(6), 529–536.
- García-Roger, E. M., Carmona, M. J., & Serra, M. (2006a). Patterns in rotifer diapausing egg banks: density and viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336(2), 198–210.
- García-Roger, E. M., Carmona, M. J., & Serra, M. (2006b). Hatching and viability of rotifer diapausing eggs collected from pond sediments. *Freshwater Biology*, 51(7), 1351–1358.
- García-Roger, E. M., Lubzens, E., Fontaneto, D., & Serra, M. (2019). Facing adversity: dormant embryos in rotifers. *The Biological Bulletin*, 237(2), 119–144.
- Gibson, A. K., Delph, L. F., & Lively, C. M. (2017). The two-fold cost of sex: experimental evidence from a natural system. *Evolution Letters*, 1(1), 6–15.

- Gibson, A. K., Xu, J. Y., & Lively, C. M. (2016). Within-population covariation between sexual reproduction and susceptibility to local parasites. *Evolution*, *70*(9), 2049–2060.
- Gilbert, J. J. (1963). Mictic female production in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Journal of Experimental Zoology*, *153*(2), 113–123.
- Gilbert, J. J. (1974). Dormancy in rotifers. *Transactions of the American Microscopical Society*, 490–513.
- Gilbert, J. J. (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer: a multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshwater Biology*, *47*(9), 1633–1641.
- Gilbert, J. J. (2003). Environmental and endogenous control of sexuality in a rotifer life cycle: developmental and population biology. *Evolution & Development*, *5*(1), 19–24.
- Gilbert, J. J. (2007). Induction of mictic females in the rotifer *Brachionus*: oocytes of amictic females respond individually to population-density signal only during oogenesis shortly before oviposition. *Freshwater Biology*, *52*(8), 1417–1426.
- Gilbert, J. J. (2017). Non-genetic polymorphisms in rotifers: environmental and endogenous controls, development, and features for predictable or unpredictable environments. *Biological Reviews*, *92*(2), 964–992.
- Gilbert, J. J. (2022). Food niches of planktonic rotifers: Diversification and implications. *Limnology & Oceanography*, *67*(10), 2218–2251.
- Gilbert, J. J., & Dieguez, M. C. (2010). Low crowding threshold for induction of sexual reproduction and diapause in a Patagonian rotifer. *Freshwater Biology*, *55*(8), 1705–1718.
- Gilbert, J. J., & Schröder, T. (2004). Rotifers from diapausing, fertilized eggs: unique features and emergence. *Limnology & Oceanography*, *49*(4part2), 1341–1354.
- Gilbert, J. J., & Schröder, T. (2007). Intraclonal variation in propensity for mixis in several rotifers: variation among females and with maternal age. *Hydrobiologia*, *593*, 121–128.
- Gómez, A. (1996). Ecología genética y sistemas de reconocimiento de pareja en poblaciones simpátricas de rotíferos. Tesis doctoral. Universitat de València).
- Gómez, A. (2005). Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation. In: Herzig, A., Gulati, R. D., Jersabek, C. D.,

- May, L. (eds). Rotifera X. Developments in Hydrobiology. Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 546, 83–99
- Gómez, A., & Carvalho, G. R. (2000). Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. *Molecular Ecology*, 9(2), 203–214.
- Gómez, A., & Snell, T. W. (1996). Sibling species and cryptic speciation in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Journal of Evolutionary Biology*, 9(6), 953–964.
- Gómez, A., Serra, M., Carvalho, G. R., & Lunt, D. H. (2002). Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, 56(7), 1431–1444.
- Gómez, Á., Temprano, M., & Serra, M. (1995). Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats. *Journal of Evolutionary Biology*, 8(5), 601–622.
- Gorelick, R., & Heng, H. H. (2011). Sex reduces genetic variation: a multidisciplinary review. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 65(4), 1088–1098.
- Green, R. F., & Noakes, D. L. (1995). Is a little bit of sex as good as a lot? *Journal of Theoretical Biology*, 174(1), 87–96.
- Gribble, K. E., & Mark Welch, D. B. (2012). The mate recognition protein gene mediates reproductive isolation and speciation in the *Brachionus plicatilis* cryptic species complex. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 1–17.
- Gribble, K. E., Snell, T., & Mark Welch, D. B. (2011). Gene and protein structure of the mate recognition protein gene family in *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *Hydrobiologia*, 662, 35–42.
- Griffiths, S. W., & Armstrong, J. D. (2001). The benefits of genetic diversity outweigh those of kin association in a territorial animal. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1473), 1293–1296.
- Guillard, R. R., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229–239.
- Hagiwara, A., & Hino, A. (1989). Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. In: Ricci, C., Snell, T.W., King, C.E. (eds). Rotifer

- Symposium V. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 52, 415–421.
- Hagiwara, A., Kadota, Y., & Hino, A. (2005). Maternal effect by stem females in *Brachionus plicatilis*: effect of starvation on mixis induction in offspring. *Hydrobiologia*, 546, 275–279.
- Hairston Jr, N. G., & Fox, J. A. (2010). Egg banks. plankton of inland Waters. Elsevier. San Diego, C. A., pp 247–254.
- Hairston Jr, N. G., Ellner, S. P., Geber, M. A., Yoshida, T., & Fox, J. A. (2005). Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecology Letters*, 8(10), 1114–1127.
- Hamilton, W. D. (1980). Sex versus non–sex versus parasite. *Oikos*, 282–290.
- Hamilton, W. D., Axelrod, R., & Tanese, R. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3566–3573.
- Hansen, B., Wernberg–Møller, T., & Wittrup, L. (1997). Particle grazing efficiency and specific growth efficiency of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 215(2), 217–233.
- Hartfield, M., & Keightley, P. D. (2012). Current hypotheses for the evolution of sex and recombination. *Integrative Zoology*, 7(2), 192–209.
- Hebert, P. D. N. (1987). Genotypic characteristics of cyclic parthenogens and their obligately asexual derivatives. In: Stearns, S. C. (ed). *The Evolution of Sex and its Consequences*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 175–195.
- Helden, A. J., & Dixon, A. F. G. (2002). Life-cycle variation in the aphid *Sitobion avenae*: costs and benefits of male production. *Ecological Entomology*, 27(6), 692–701.
- Herbers, J. M. (2010). Evolution: Fundamentals. In: Breed, M. D., & Moore, J. (eds). *Encyclopedia of animal behavior*. Elsevier. London, pp 670–678.
- Hestmark, G. (1992). Sex, size, competition and escape—strategies of reproduction and dispersal in *Lasallia pustulata* (Umbilicariaceae, Ascomycetes). *Oecologia*, 92, 305–312.
- Hino, A., & Hirano, R. (1976). Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. I. Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 42(10), 1093–1099.

- Hino, A., & Hirano, R. (1980). Relationship between body size of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the maximum size of particles ingested. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46(10) 1217–1222.
- Hinz, C., Ahlrichs, W. H., & Bininda-Emonds, O. R. (2017). Phenotypic influences on the reproductive strategy of the facultative sexual rotifer *Brachionus rubens* (Monogononta). *Organisms Diversity & Evolution*, 17(4), 779–788.
- Hörandl, E., Bast, J., Brandt, A., Scheu, S., Bleidorn, C., Cordellier, M., & Dunthorn, M. (2020). Genome evolution of asexual organisms and the paradox of sex in eukaryotes. In: Pontarotti, P. (eds). In: *Evolutionary Biology A Transdisciplinary Approach*, Springer, pp 133–167.
- Hotos, G. N. (2002). Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algal species with various cell volumes and cell densities. *Aquaculture Research*, 33, 949–957.
- Hotos, G. N. (2002). Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algal species with various cell volumes and cell densities. *Aquaculture Research*, 33(12), 949–957.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11(6), 609–623.
- Hurst, L. D., & Peck, J. R. (1996). Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(2), 46–52.
- Innes, D. J., & Dunbrack, R. L. (1993). Sex allocation variation in *Daphnia pulex*. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(4), 559–575.
- Innes, D. J., & Ginn, M. (2014). A population of sexual *Daphnia pulex* resists invasion by asexual clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1788), 20140564.
- Innes, D. J., & Singleton, D. R. (1994). Variation in reproduction and sex allocation among clones of *Daphnia pulex*. In: Beaumont A. R. (ed). *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman and Hall, London. pp. 325–342.
- Innes, D. J., & Singleton, D. R. (2000). Variation in allocation to sexual and asexual reproduction among clones of cyclically parthenogenetic *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society*, 71(4), 771–787.

- Innes, D. J., Fox, C. J., & Winsor, G. L. (2000). Avoiding the cost of males in obligately asexual *Daphnia pulex* (Leydig). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1447), 991–997.
- Jaenike, J., & Selander, R. K. (1985). On the coexistence of ecologically similar clones of parthenogenetic earthworms. *Oikos*, 44: 512–514.
- Jaenike, J., Parker Jr, E. D., & Selander, R. K. (1980). Clonal niche structure in the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum*. *The American Naturalist*, 116(2), 196–205.
- Jasienski, M. (1988). Kinship ecology of competition: size hierarchies in kin and nonkin laboratory cohorts of tadpoles. *Oecologia*, 77: 407–413.
- Jasiński, M., Korzeniak, U., & Łomnicki, A. (1988). Ecology of kin and nonkin larval interactions in *Tribolium* beetles. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22, 277–284.
- Jezkova, I., Serra, M., Ortells, R., & Montero, J. (2022). Genetic variability of the mating recognition gene in populations of *Brachionus plicatilis*. *Diversity*, 14(3), 155.
- Jokela, J., Lively, C. M., Dybdahl, M. F., & Fox, J. A. (1997). Evidence for a cost of sex in the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecology*, 78(2), 452–460.
- Kearney, M., & Shine, R. (2005). Lower fecundity in parthenogenetic geckos than sexual relatives in the Australian arid zone. *Journal of evolutionary biology*, 18(3), 609–618.
- Kelley, S. E. (1989). Experimental studies of the evolutionary significance of sexual reproduction. V. A field test of the sib-competition lottery hypothesis. *Evolution*, 43(5), 1054–1065.
- King, C. E., & Snell, T. W. (1977). Sexual recombination in rotifers. *Heredity*, 39(3), 357–360.
- King, C. E., 1980. The genetic structure of zooplankton populations. In: Kerfoot, W. C. (ed). *Evolution and ecology of zooplankton communities*. University Press. Hanover New England. pp. 315–328.
- Koelewijn, H. P. (2004). Sibling competition, size variation and frequency-dependent outcrossing advantage in *Plantago coronopus*. *Evolutionary Ecology*, 18, 51–74.
- Koella, J. C. (1988). The tangled bank: the maintenance of sexual reproduction through competitive interactions. *Journal of Evolutionary Biology*, 1(2), 95–116.

- Kondrashov, A. S. (1988). Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, 336(6198), 435–440.
- Kondrashov, A. S. (1993). Classification of hypotheses on the advantage of amphimixis. *Journal of Heredity*, 84(5), 372–387.
- Korstad, J., Olsen, Y., & Vadstein, O. (1989). Life history characteristics of *Brachionus plicatilis* (Rotifera) fed different algae. *Hydrobiologia*, 186(1), 43–50.
- Kotani, T., Ozaki, M., Matsuoka, K., Snell, T. W., & Hagiwara, A. (2001). Reproductive isolation among geographically and temporally isolated marine *Brachionus* strains. In: Sanoamuang, L., Segers, H., Shiel, R.J., Gulati, R.D. (eds). Rotifera IX. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 153, 283–290.
- Kotowska, A. M., Cahill Jr, J. F., & Keddie, B. A. (2010). Plant genetic diversity yields increased plant productivity and herbivore performance. *Journal of Ecology*, 98(1), 237–245.
- Kramer, M. G., & Templeton, A. R. (2001). Life-history changes that accompany the transition from sexual to parthenogenetic reproduction in *Drosophila mercatorum*. *Evolution*, 55(4), 748–761.
- Kubaneck, J., & Snell, T. W. (2008). Quorum sensing in rotifers. In Winans, S. C., & Bassler B. L. (eds). Chemical Communication Among Bacteria. American Society of Microbiology Press, Washington, pp 453–461.
- Lamb, R. Y., & Willey, R. B. (1979). Are parthenogenetic and related bisexual insects equal in fertility? *Evolution*, 33(2), 774–775.
- Lampert, W., & Sommer, U. (2007). Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams. Second edition. Oxford University Press, Oxford.
- Lapasa, S. (2004). Efecto de la depredación por invertebrados sobre poblaciones simpátricas de especies crípticas de rotíferos. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Larsson, P. (1991). Intraspecific variability in response to stimuli for male and ephippia formation in *Daphnia pulex*. In: Kořínek, V., Frey, D.G. (eds). Biology of Cladocera. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 71, 281–290
- Lehtonen, J., Jennions, M. D., & Kokko, H. (2012). The many costs of sex. *Trends in Ecology & Evolution* 27(3), 172–178.
- Lever, J., Drapes, S., Hall, M. D., & Booksmythe, I. (2021). Condition-dependent sexual reproduction is driven by benefits, not costs of sex. *Behavioral Ecology*, 32(6), 1372–1379.

- Lewis W. M. (1987). The cost of sex. In: Stearns, S. C. (ed) *The evolution of sex and its consequences*. Springer, Germany. pp 33–57.
- Little, R. J. A., & Rubin, D. B. (2002). *Statistical Analysis with missing data*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken USA.
- Lively, C. M. (1990). Male allocation and the cost of biparental sex in a parasitic worm. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 22, 93–107.
- Lively, C. M., & Morran, L. (2014). The ecology of sexual reproduction. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(7), 1292–1303.
- Lively, C. M., Craddock, C., & Vrijenhoek, R. C. (1990). Red Queen hypothesis supported by parasitism in sexual and clonal fish. *Nature*, 344(6269), 864–866.
- Lowe, C. D., Kemp, S. J., Bates, A. D., & Montagnes, D. J. S. (2005). Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Marine Biology*, 146, 923–929.
- Lowe, C. D., Kemp, S. J., Diaz–Avalos, C., & Montagnes, D. J. S. (2007). How does salinity tolerance influence the distributions of *Brachionus plicatilis* sibling species? *Marine Biology*, 150, 377–386.
- Lubzens, E., & Minkoff, G. (1988). Influence of the age of algae fed to rotifers (*Brachionus plicatilis* OF Müller) on the expression of mixis in their progenies. *Oecologia*, 75, 430–435.
- Luijckx, P., Ho, E. K. H., Gasim, M., Chen, S., Stanic, A., Yanchus, C., ... & Agrawal, A. F. (2017). Higher rates of sex evolve during adaptation to more complex environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(3), 534–539.
- Lynch, M. (1984). The genetic structure of a cyclical parthenogen. *Evolution*, 38, 186–203.
- Lynch, M., & Gabriel, W. (1983). Phenotypic evolution and parthenogenesis. *The American Naturalist*, 122(6), 745–764.
- Lynch, M., & Walsh, B. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Assocs., Inc., Sunderland, M. A.
- MacPherson, B., Scott, R., & Gras, R. (2022). Using individual–based modeling to investigate whether fluctuating resources help to explain the prevalence of sexual reproduction in animal species. *Ecological Informatics*, 68, 101499.

- Marcus, N. H., Lutz, R., Burnett, W., & Cable, P. (1994). Age, viability, and vertical distribution of zooplankton resting eggs from an anoxic basin: evidence of an egg bank. *Limnology & Oceanography*, *39*(1), 154–158.
- Mark Welch, D. B., & Meselson, M. (2000). Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, *288*(5469), 1211–1215.
- Martens, K., Loxdale, H. D., & Schön, I. (2009). The elusive clone – in search of its true nature and identity. In: Schön, I., Martens, K. & Dijk, P. (eds). *Lost Sex*. Springer, Dordrecht, pp 187–200
- Martin, M. J., Pérez-Tomé, J. M., & Toro, M. A. (1988). Competition and genotypic variability in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, *60*(1), 119–123.
- Martínez-Ruiz, C., & García-Roger, E. M. (2015). Being first increases the probability of long diapause in rotifer resting eggs. *Hydrobiologia*, *745*, 111–121.
- Maynard-Smith, J. (1971). What use is sex? *Journal of Theoretical Biology*, *30*(2), 319–335.
- Maynard-Smith, J. (1976). A short-term advantage for sex and recombination through sib-competition. *Journal of theoretical biology*, *63*(2), 245–258.
- Maynard-Smith, J. (1978). *The Evolution of Sex*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maynard-Smith, J. (1998). *Evolutionary Genetics*, 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- McDonald, M. J., Rice, D. P., & Desai, M. M. (2016). Sex speeds adaptation by altering the dynamics of molecular evolution. *Nature*, *531*(7593), 233–236.
- Meirmans, S., & Strand, R. (2010). Why are there so many theories for sex, and what do we do with them? *Journal of Heredity*, *101*(suppl_1), S3–S12.
- Meirmans, S., Meirmans, P. G., & Kirkendall, L. R. (2012). The costs of sex: facing real-world complexities. *The Quarterly Review of Biology*, *87*(1), 19–40.
- Millán, A., Moreno, J. L., & Velasco, J. (2001). El estudio faunístico y ecológico de los coleópteros y heterópteros acuáticos de las lagunas de Albacete (Alboraj, Los Patos, Ojos de Villaverde, Ontalafia y Pétrola). *Sabuco: Revista de Estudios Albacetenses*, (1), 43–94.

- Mills, S., Alcántara–Rodríguez, J. A., Ciros–Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Galindo, K. H., ... & Walsh, E. J. (2017). Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, 796, 39–58.
- Moav, R., & Wohlfarth, G. W. (1974). Magnification through competition of genetic differences in yield capacity in carp. *Heredity*, 33(2), 181–202.
- Montero–Pau, J., Gabaldón, C., Carmona, M. J., & Serra, M. (2014). Measuring the potential for growth in populations investing in diapause. *Ecological modelling*, 272, 76–83.
- Montero–Pau, J., Ramos–Rodríguez, E., Serra, M., & Gómez, A. (2011). Long–term coexistence of rotifer cryptic species. *PLoS ONE*, 6(6), e21530.
- Montero–Pau, J., Serra, M., & Gómez, A. (2017). Diapausing egg banks, lake size, and genetic diversity in the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller (Rotifera, Monogononta). *Hydrobiologia*, 796, 77–91.
- Mooney, S. M. (1995). H. J. Muller and R. A. Fisher on the evolutionary significance of sex. *Journal of the History of Biology*, 28(1), 133–149.
- Moran, N. A. (1992). The evolution of aphid life cycles. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 321–348.
- Moreno, A. R., & Quintana, P. X. (1997), Del Parc, A. E. L. Z. Seguiment de la qualitat de les aigües a la zona del parc natural dels Aiguamolls de l'alt empordà. Consorci de la Costa Brava Girona. <https://www.cacbgi.cat/wp-content/uploads/2021/02/Avaluacio-de-la-Qualitat-Ecologica-Aigues-PNAE-96-97.pdf>
- Moreno, E., Pérez–Martínez, C., & Conde–Porcuna, J. M. (2019). Dispersal of rotifers and cladocerans by waterbirds: seasonal changes and hatching success. *Hydrobiologia*, 834, 145–162.
- Neiman, M. (2004). Physiological dependence on copulation in parthenogenetic females can reduce the cost of sex. *Animal Behaviour*, 67: 811–822.
- Neiman, M., & Koskella, B. (2009). Sex and the red queen. In: Schön, I., Martens, K. & Dijk, P. (eds). *Lost Sex*. Springer, Dordrecht, pp 133–159.
- Neiman, M., Hehman, G., Miller, J. T., Logsdon Jr, J. M., & Taylor, D. R. (2010). Accelerated mutation accumulation in asexual lineages of a freshwater snail. *Molecular Biology and Evolution*, 27(4), 954–963.
- Neiman, M., Lively, C. M., & Meirmans, S. (2017). Why sex? A pluralist approach revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(8), 589–600.

- Neiman, M., Meirmans, P. G., Schwander, T., & Meirmans, S. (2018). Sex in the wild: How and why field-based studies contribute to solving the problem of sex. *Evolution*, 72(6), 1194–1203.
- Nogrady, T., R. L. Wallace & T. W. Snell, 1993. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world, Volume 4: Rotifera. SPB Academic Publishing. Collegaville Minn.
- Onbé, T. (1978). Sugar flotation method for sorting the resting eggs of marine cladocerans and copepods from sea–bottom sediment. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44, 1411.
- Ortells, R., Gómez, A., & Serra, M. (2003). Coexistence of cryptic rotifer species: ecological and genetic characterisation of *Brachionus plicatilis*. *Freshwater Biology*, 48(12), 2194–2202.
- Ortells, R., Gómez, A., & Serra, M. (2006). Effects of duration of the planktonic phase on rotifer genetic diversity. *Archiv für Hydrobiologie*, 167(1–4), 203–216.
- Ortells, R., Snell, T. W., Gómez, A., & Serra, M. (2000). Patterns of genetic differentiation in resting egg banks of a rotifer species complex in Spain. *Archiv für Hydrobiologie*, 149, 529–551.
- Otto, S. P. (2009). The evolutionary enigma of sex. *The American Naturalist*, 174(S1), S1–S14.
- Parker, G. A. (2006). Sexual conflict over mating and fertilization: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1466), 235–259.
- Peck, J. R., & Waxman, D. (2000). What's wrong with a little sex? *Journal of Evolutionary Biology*, 13(1), 63–69.
- Pérez-Tomé, J. M., & Toro, M. A. (1982). Competition of similar and non-similar genotypes. *Nature*, 299(5879), 153–154.
- Pierre, J. S., Stoeckel, S., & Wajnberg, E. (2022). The advantage of sex: Reinserting fluctuating selection in the pluralist approach. *Plos ONE*, 17(8), e0272134.
- Pierre, J. S., Stoeckel, S., & Wajnberg, E. (2022). The advantage of sex: Reinserting fluctuating selection in the pluralist approach. *Plos ONE*, 17(8), e0272134.
- Pourriot, R., & Rougier, C. (1976). Influence de l'âge des parents sur la production de femelles mictiques chez *Brachionus calyciflorus* (Pallas) et *B. rubens* Ehr. (Rotifère). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Série D*, 283, 1497–1500.

- Pourriot, R., & Rougier, C. (1977). Effets de la densité de population et du groupement sur la reproduction de *Brachionus calyciflorus* (Pallas) [Rotifère]. *Annales de Limnologie*, 13(2), 101–113.
- Pourriot, R., & Rougier, C. (1978). Influences Conjuguée Du Groupement Et De La Qualité De La Nourriture Sur La Reproduction De *Brachionus Plicatilis* OF Müller (Rotifère). *Netherlands Journal of Zoology*, 29(2), 242–264.
- Pourriot, R., & Snell, T. W. (1983). Resting eggs in rotifers.
- Pourriot, R., Rougier, C., & Benest, D. (1986). Qualité de la nourriture et contrôle de la mixis chez le Rotifère *Brachionus rubens*, Ehr. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 111(1–2), 105–111.
- Pourriot, R., Snell, T.W. (1983). Resting eggs in rotifers. In: Pejler, B., Starkweather, R., Nogrady, T. (eds). Biology of Rotifers. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 55, 213–224.
- Quintana, X. D., Boix, D., Badosa, A., Brucet, S., Compte, J., Gascón, S., López-Flores, R., Sala, J., & Moreno-Amich, R. (2006). Community structure in mediterranean shallow lentic ecosystems: size-based vs. taxon-based approaches. *Limnetica*, 25(1–2), 303–320.
- R v.3.1.1 (2014). R Development Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ram, Y., & Hadany, L. (2016). Condition-dependent sex: who does it, when and why? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1706), 20150539.
- Rankin, D. J., Dieckmann, U., & Kokko, H. (2011). Sexual conflict and the tragedy of the commons. *The American Naturalist*, 177(6), 780–791.
- Real, L. (1990). Search theory and mate choice. I. Models of single-sex discrimination. *The American Naturalist*, 136(3), 376–405.
- Ricci, C. (2001). Dormancy patterns in rotifers. *Hydrobiologia*, 446, 1–11.
- Rispe, C., Bonhomme, J., & Simon, J. C. (1999). Extreme life-cycle and sex ratio variation among sexually produced clones of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). *Oikos*, 254–264.
- Rispe, C., Pierre, J. S., Simon, J. C., & Gouyon, P. H. (1998). Models of sexual and asexual coexistence in aphids based on constraints. *Journal of Evolutionary Biology*, 11(6), 685–701.
- Rodrigo, M. A., Armengol-Díaz, X., Oltra, R., Dasí, M. J., & Colom, W. (2001). Environmental variables and planktonic communities in two ponds of

- El Hondo wetland (SE Spain). *International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology & Marine Biology*, 86(3), 299–315.
- Roff, D. (Ed.). (1993). *Evolution of life histories: theory and analysis*. Springer Science & Business Media. New York.
- Roth, L. M. (1974). Reproductive potential of bisexual *Pycnoscelus indicus* and clones of its parthenogenetic relative, *Pycnoscelus surinamensis*. *Annals of the Entomological Society of America*, 67(2), 215–223.
- Rothhaupt, K. O. (1990). Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species. *Limnology & Oceanography*, 35(1), 16–23.
- Rothhaupt, K. O. (1988). Mechanistic resource competition theory applied to laboratory experiments with zooplankton. *Nature*, 333(6174), 660–662.
- Rouger, R., Reichel, K., Malrieu, F., Masson, J. P., & Stoeckel, S. (2016). Effects of complex life cycles on genetic diversity: cyclical parthenogenesis. *Heredity*, 117(5), 336–347.
- Rougier, C. L. Pourriot, R., & Clément, P. (1977). Determination of mixis in *Brachionus*. *Archiv für Hydrobiologie Beiheft Ergebnisse der Limnologie*, 8, 163–166.
- Rougier, C. L., & Pourriot, R. (1977). Aging and control of the reproduction in *Brachionus calyciflorus* (Pallas) (Rotatoria). *Experimental Gerontology*, 12(3–4), 137–151.
- Rowe, L. (1994). The costs of mating and mate choice in water striders. *Animal Behaviour*, 48(5), 1049–1056.
- Ruvinsky, A. O., Perelygin, A. A., Lobkov, Y. I., & Belyaev, D. K. (1986). Factors organising and maintaining polymorphism in a cyclic parthenogenetic species: *Daphnia pulex*. *Heredity*, 57(1), 15–22.
- Scheiner, S. M., & Yampolsky, L. Y. (1998). The evolution of *Daphnia pulex* in a temporally varying environment. *Genetics Research*, 72(1), 25–37.
- Scheuerl, T., & Stelzer, C. P. (2013). Patterns and dynamics of rapid local adaptation and sex in varying habitat types in rotifers. *Ecology & Evolution*, 3(12), 4253–4264.
- Schlupp, I., Taebel–Hellwig, A., & Tobler, M. (2010). Equal fecundity in asexual and sexual mollies (Poecilia). *Environmental Biology of Fishes*, 88, 201–206.

- Schröder, T. (2001). Colonising strategies and diapause of planktonic rotifers (Monogononta, Rotifera) during aquatic and terrestrial phases in a floodplain (Lower Oder Valley, Germany). *International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology & Marine Biology*, 86(6), 635–660.
- Schröder, T. (2005). Diapause in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*, 546, 291–306.
- Schröder, T., & Gilbert, J. J. (2004). Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapause in the life cycle of monogonont rotifers: intraclonal, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Functional Ecology*, 18(3), 458–466.
- Serra, M., & Carmona, M. J. (1993). Mixis strategies and resting eeg production of rotifers living in temporally-varying habitats. In: Gilbert, J. J., Lubzens, E., Miracle, M.R. (eds). Rotifer Symposium VI. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 83,117–126.
- Serra, M., & King, C. E. (1999). Optimal rates of bisexual reproduction in cyclical parthenogens with density-dependent growth. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(2), 263–271.
- Serra, M., & Snell, T. W. (2009). Sex Loss in Monogonont Rotifers. In: Schön, I., Martens, K., Dijk, P. (eds). *Lost Sex*. Springer, Dordrecht, pp 281–294.
- Serra, M., Gómez, A., & Carmona, M. J. (1998). Ecological genetics of *Brachionus* sympatric sibling species. In: Wurdak, E., Wallace, R., Segers, H. (eds). Rotifera VIII. A Comparative Approach. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 134, 373–384
- Serra, M., Snell, T. W., & Gilbert, J. J. (2005). Delayed mixis in rotifers: an adaptive response to the effects of density-dependent sex on population growth. *Journal of Plankton Research*, 27(1), 37–45.
- Serra, M., Snell, T. W., & Gilbert, J. J. (2005). Delayed mixis in rotifers: an adaptive response to the effects of density-dependent sex on population growth. *Journal of Plankton Research*, 27(1), 37–45.
- Serra, M., Snell, T. W., & King, C. E. (2004). The timing of sex in cyclically parthenogenetic rotifers. In Moya, A., & Font, E. (eds). *Evolution: From Molecules to Ecosystems*. Oxford University Press, Oxford, pp 135–146.
- Seudre, O., Vanhoenacker, E., Mauger, S., Coudret, J., & Roze, D. (2020). Genetic variability and transgenerational regulation of investment in

- sex in the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 33(1), 112–120.
- Simon, J. C., Delmotte, F., Risper, C., & Crease, T. (2003). Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79(1), 151–163.
- Simon, J. C., Risper, C., & Sunnucks, P. (2002). Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(1), 34–39.
- Snell, T. W. (1987). Sex, population dynamics and resting egg production in rotifers. *Hydrobiologia*, 144(2), 105–111.
- Snell, T. W. (2014). Rotifers as models for the biology of aging. *International Review of Hydrobiology*, 99(1–2), 84–95.
- Snell, T. W. (2017). Analysis of proteins in conditioned medium that trigger monogonont rotifer mictic reproduction. *Hydrobiologia*, 796(1), 245–253.
- Snell, T. W., & Boyer, E. M. (1988). Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 124(2), 73–85.
- Snell, T. W., & Garman, B. L. (1986). Encounter probabilities between male and female rotifers. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 97(3), 221–230.
- Snell, T. W., & Stelzer, C. P. (2005). Removal of surface glycoproteins and transfer among *Brachionus* species. In: Herzig, A., Gulati, R. D., Jersabek, C. D., May, L. (eds). Rotifera X. Developments in Hydrobiology. Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 181, 267–274
- Snell, T. W., Kubanek, J., Audra, B. P., Kim, J., Hicks, M. K., & Stelzer, C. P. (2006). A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Marine Biology*, 149(4), 763–773.
- Snell, T. W., Rico-Martínez, R., Kelly, L. N., & Battle, T. E. (1995). Identification of a sex pheromone from a rotifer. *Marine Biology*, 123, 347–353.
- Snell, T. W., Shearer, T. L., Smith, H. A., Kubanek, J., Gribble, K. E., & Mark Welch, D. B. (2009). Genetic determinants of mate recognition in *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *BMC Biology*, 7(1), 1–12.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1995). Biometry. Freeman & Co. New York.
- Song, Y., Drossel, B., & Scheu, S. (2011). Tangled Bank dismissed too early. *Oikos*, 120(11), 1601–1607.

- Spencer, M., Colegrave, N., & Schwartz, S. S. (2001). Hatching fraction and timing of resting stage production in seasonal environments: effects of density dependence and uncertain season length. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(3), 357–367.
- SPSS. V.14.0. Inc. SPSS for Windows SPSS Inc, Chicago, IL.
- SPSS. V.19.0. Inc. SPSS for Windows SPSS Inc, Chicago, IL.
- Starkweather, P. L. (1995). Near–coronal fluid flow patterns and food cell manipulation in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. In: Ejsmont–Karabin, J., Pontin, R.M. (eds). Rotifera VII. Developments in Hydrobiology, Springer, Dordrecht. *Hydrobiologia*, 109, 191–195
- Stearns, S. C. (1985). The evolution of sex and the role of sex in evolution. *Experientia*, 41(10): 1231–1235.
- Stearns, S. C. (1990). The evolutionary maintenance of sexual reproduction: the solutions proposed for a longstanding problem. *Journal of Genetics*, 69(1), 1–10.
- Stearns, S. C. (1992). The evolution of life histories. Oxford University press, Oxford.
- Stearns, S. C. (ed.). (1987). The Evolution of Sex and its Consequences. Birkhaeuser Verlag, Basel.
- Stelzer, C. P. (2005). Evolution of rotifer life histories. *Hydrobiologia*, 546, 335–346.
- Stelzer, C. P. (2008). Obligate asex in a rotifer and the role of sexual signals. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1), 287–293.
- Stelzer, C. P. (2011). The cost of sex and competition between cyclical and obligate parthenogenetic rotifers. *The American Naturalist*, 177(2), E43–E53.
- Stelzer, C. P. (2015). Does the avoidance of sexual costs increase fitness in asexual invaders? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29), 8851–8858.
- Stelzer, C. P. (2017). Life history variation in monogonont rotifers. In: Hagiwara, A., & T. Yoshinaga (eds). Rotifers Series. Springer, Singapore. *Fisheries Science*, 89–109.
- Stelzer, C. P., & Lehtonen, J. (2016). Diapause and maintenance of facultative sexual reproductive strategies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1706), 20150536.

- Stelzer, C. P., & Snell, T. W. (2003). Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnology & Oceanography*, *48*(2), 939–943.
- Stelzer, C. P., & Snell, T. W. (2006). Specificity of the crowding response in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Limnology & Oceanography*, *51*(1), 125–130.
- 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*, *41*(1), 86–98.
- Sudzuki, M. (1957). Studies on the egg-carrying types in Rotifera. II. *Genera Brachionus and Keratella*. *Zoological Magazine, Tokyo*, *66*, 11–20.
- Svanbäck, R., & Bolnick, D. I. (2007). Intraspecific competition drives increased resource use diversity within a natural population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1611), 839–844.
- Swanson, B. O., Gibb, A. C., Marks, J. C., & Hendrickson, D. A. (2003). Trophic polymorphism and behavioral differences decrease intraspecific competition in a cichlid, *Herichthys minckleyi*. *Ecology*, *84*(6), 1441–1446.
- Tagg, N., Doncaster, C. P., & Innes, D. J. (2005). Resource competition between genetically varied and genetically uniform populations of *Daphnia pulex* (Leydig): does sexual reproduction confer a short-term ecological advantage? *Biological Journal of the Linnean Society*, *85*(1), 111–123.
- Tagg, N., Innes, D. J., & Doncaster, C. P. (2005). Outcomes of reciprocal invasions between genetically diverse and genetically uniform populations of *Daphnia obtusa* (Kurz). *Oecologia*, *143*, 527–536.
- Tarazona, E., García-Roger, E. M., & Carmona, M. J. (2017). Experimental evolution of bet hedging in rotifer diapause traits as a response to environmental unpredictability. *Oikos*, *126*(8), 1162–1172.
- Tessier, A. J., & Cáceres, C. E. (2004). Differentiation in sex investment by clones and populations of *Daphnia*. *Ecology Letters*, *7*(8), 695–703.
- Tilman, D. (1999). The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology*, *80*(5), 1455–1474.
- Timmermeyer, N., & Stelzer, C. P. (2006). Chemical induction of mixis in the rotifer *Synchaeta tremula*. *Journal of Plankton Research*, *28*(12), 1233–1239.

- Vadstein, O., Øie, G., & Olsen, Y. (1993). Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, *255*, 261–267.
- Vreeburg, S., Nygren, K., & Aanen, D. K. (2016). Unholy marriages and eternal triangles: how competition in the mushroom life cycle can lead to genomic conflict. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1706), 20150533.
- Vrijenhoek, R. C. (1979). Factors affecting clonal diversity and coexistence. *American Zoologist*, *19*(3), 787–797.
- Walczyńska, A., & Serra, M. (2014). Inter- and intraspecific relationships between performance and temperature in a cryptic species complex of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, *734*, 17–26.
- Walczyńska, A., & Serra, M. (2022). Body size variability across habitats in the *Brachionus plicatilis* cryptic species complex. *Scientific Reports*, *12*(1), 6912.
- Walker, K. F. (1981). 13. A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786. *Hydrobiologia*, *81*, 159–167.
- Wallace, R. L. (2002). Rotifers: exquisite metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, *42*(3), 660–667.
- Wallace, R. L., & Smith, H. (2009). Rotifera. In: Likens, G. E. (ed.). *Encyclopedia of Inlands Waters*. Elsevier, Oxford, pp 698–703.
- Wallace, R. L., Snell, T. W., & Smith, H. A. (2015). Phylum rotifera. In Thorp, H. J. & Covich, A. P. *Freshwater invertebrates*. Academic Press, pp 225–271.
- Wallace, R. L., Snell, T. W., Ricci, C., & Nogrady, T. (2006). *Rotifera 1: Biology, Ecology and Systematics*. Backhuys Publishers, Leiden.
- Walsh, E. J., Smith, H. A., & Wallace, R. L. (2014). Rotifers of temporary waters. *International Review of Hydrobiology*, *99*(1–2), 3–19.
- Walsh, M. R. (2013). The link between environmental variation and evolutionary shifts in dormancy in zooplankton. *Integrative and Comparative Biology*, *53*(4), 713–722.
- Wang, L., Yan, T., Yu, R., & Zhou, M. (2005). Experimental study on the impact of dinoflagellate *Alexandrium* species on populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae*, *4*(2), 371–382.
- Warner, R. R., & Chesson, P. L. (1985). Coexistence mediated by recruitment fluctuations: a field guide to the storage effect. *The American Naturalist*, *125*(6), 769–787.

- Weeks, S. C. (1995). Comparisons of life–history traits between clonal and sexual fish (Poeciliopsis: Poeciliidae) raised in monoculture and mixed treatments. *Evolutionary Ecology*, 9, 258–274.
- Weeks, S. C., & Sassaman, C. (1990). Competition in phenotypically variable and uniform populations of the tadpole shrimp *Triops longicaudatus* (Notostraca: Triopsidae). *Oecologia*, 82, 552–559.
- West, S. A., Lively, C. M., & Read, A. F. (1999). A pluralist approach to sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(6), 1003–1012.
- Wetherington, J. D., Katora, K. E., & Vrijenhoek, R. C. (1987). A test of the spontaneous heterosis hypothesis for unisexual vertebrates. *Evolution*, 41(4), 721–731.
- Williams, G. C. (1975). *Sex and Evolution*. Princeton University Press, New Jersey.
- Williams, G. C., & Mitton, J. B. (1973). Why reproduce sexually? *Journal of Theoretical Biology*, 39(3), 545–554.
- Willson, M. F., Hoppes, W. G., Goldman, D. A., Thomas, P. A., Katusic–Malmborg, P. L., & Bothwell, J. L. (1987). Sibling competition in plants: an experimental study. *The American Naturalist*, 129(2), 304–311.
- Wolinska, J., & Lively, C. M. (2008). The cost of males in *Daphnia pulex*. *Oikos*, 117(11), 1637–1646.
- Zhou, W., Tang, X., Qiao, X., Wang, Y., Wang, R., & Feng, L. (2009). Ingestion of *Brachionus plicatilis* under different microalgae conditions. *Chinese Journal of Oceanology & Limnology*, 27(3), 473.
- Zimmer, C. (2009). Origins. On the origin of sexual reproduction. *Science*, 324, 1254–1256.

Anexo 1

Artículos publicados en revistas especializadas, indizadas de circulación internacional:

1. Carmona, M. J., Dimas-Flores, N., García-Roger, E. M., & Serra, M. (2009) Selection of low investment in sex in a cyclically parthenogenetic rotifer. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(10): 1975-1983.
doi:10.1111/j.1420-9101.2009.01811.x
2. Dimas-Flores, N., Serra, M. & Carmona, M. J. (2013). Does genetic diversity reduce intraspecific competition in rotifer populations? *Hydrobiologia*, 705: 43-54.
doi: 10.1007/s10750-012-1378-4
3. Dimas-Flores, N., Serra, M., García-Roger, E. M. & Carmona M. J. (2019). Evidencing the cost of sexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 844: 243-255.
doi/10.1007/s10750-019-3906 y