

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Zoología y Antropología Física



TESIS DOCTORAL

Relaciones filogenéticas y procesos evolutivos del género
"Astyanax" Baird & Girard, 1854 (Teleostei,
Characiformes) en Mesoamérica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Claudia Patricia Ornelas García

DIRECTOR:

José Ignacio, dir Doadrio Villarejo

Madrid, 2015

26899437

T597.5 (728)
ORN
rel



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5329971244



Facultad de Ciencias Biológicas
Dep. de Zool. y Antropología Física

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CSIC mncn
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
cienciasnaturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Museo Nacional de Ciencias Naturales

Relaciones filogenéticas y procesos evolutivos del género *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei, Characiformes) en Mesoamérica

Memoria presentada por CLAUDIA PATRICIA ORNELAS GARCÍA para optar al grado de

Doctor en Biología

Vº Bº Director de Tesis
Dr. Ignacio Doadrio Villarejo



1017409

Madrid, Enero de 2011

*a Carlos
y a mi familia
Gracias*

AGRADECIMIENTOS

De antemano reconozco que por más que quisiera, las siguientes líneas no serán suficientes para expresar mi gratitud y cariño a las personas que han compartido conmigo este proyecto, el cual en algunas ocasiones parecía inalcanzable y ahora veo con nostalgia.

Comienzo por mi director de tesis Ignacio Doadrio, al cual le agradezco sus enseñanzas no sólo en el ámbito profesional sino también en lo que me ha dejado para la vida. Así mismo le agradezco las conversaciones de su querida España que me han permitido conocerla mejor y valorar su queso manchego, entre otras muchas cosas.

Así mismo durante este camino he conocido a gente a la que le agradezco la oportunidad de haber podido trabajar con ellos, quiero agradecer al Dr. Diethard Tautz por su apoyo en el laboratorio, y por las discusiones científicas que contribuyeron a mejorar esta tesis, así como a Markus Bastir con el que he tenido la oportunidad de colaborar y me ha introducido al mundo de la morfología geométrica.

Quiero agradecer a mi grupo de trabajo (el equipo Doadrio), el cual ha sido como una familia en España, de cada uno de ellos me llevo fabulosos recuerdos y les estaré siempre agradecida por su ayuda y cariño.

Le agradezco de manera especial a Lourdes Alcaraz (Lourditas!!!!) por ser mi maestra en el laboratorio, además de agradecerle por todos esos momentos en el despacho, nuestros ratos del café y la ferias medievales en la ciudad de Cervantes, sabes que del otro lado del charco siempre habrá un tequilita esperándolos y al día siguiente unos buenos chilaquiles. También le agradezco a Silvi por todos esos momentos que hemos compartido, nos hemos recorrido muchos kilómetros juntas y espero que así siga siendo. A las dos les estoy muy agradecida por todo su apoyo, y por ser mis intérpretes en la compleja lengua española. Así mismo agradezco a Fer por esas risas que nos echamos en el despacho y fuera de éste. A nuestro Felipe, con el que hemos alargado el artículo solo por la tristeza de terminarlo, gracias por estar siempre dispuesto a escuchar y dar un consejo.

Le agradezco a Paloma Caudevilla por su ayuda constante y siempre hacer más fácil vivir en Madrid, además por su apoyo en los momentos difíciles. Así como a Paloma Garzón

a la que le agradezco su cariño y los momentos compartidos. A Obe por ayudarnos siempre y hacer más divertidas las salidas al campo.

A Mario por compartir con Carlos y conmigo tan buenos momentos, por estar siempre allí para recordarnos de dónde venimos y porque no, resaltar su folklore, buenas pláticas han surgido en estos años, en las que de vez en cuando hemos arreglado el mundo que parecía andar cojo.

Le agradezco a Guaci, que siempre estaba dispuesta a echarme una mano, y por esas cenas con un buen mole, a Chiara mi chef estrella con la que he compartido alegrías, unos cuantos bailes y unas buenas costillas charras, a Carina con la que me he divertido en el despacho y me llevó a comer el mejor bacalhau lusitano, a Ernesto que compartió con nosotros los momentos más vertiginosos de la tesis. A la Raque con la que me he divertido tantas veces, reír contigo siempre es fácil. A Regi por toda su ayuda y apoyo, a Gary por esas barbacoas y momentos de reflexión. A Rafa por esos buenos recorridos gastronómicos y estar dispuesto a dar un consejo, a Anabel por todas las veces que tuvo la paciencia de enseñarme. A Borja, por la frase de ¡viva México!, y por compartir su experiencia. A Sol por estar siempre allí del otro lado del skype, y a mi prima Moni por ser ella.

Como no podía ser para menos, le agradezco a la gente del museo que me ha brindado todo su cariño, apoyo y ayuda en tantos momentos, con ellos he disfrutado, reído, de todo, a todos ellos gracias: Federico Abascal, Iván Acevedo, Marina Alcobendas, Paul Bloor, David Buckley, Patricia Cabezas, Marta Calvo, Claudia Castellanos, Cristina Grande, Jorge Gutiérrez, Amparo Hidalgo, Iker Irisarri, Isabel López-Rull, David Osca, Ana Isabel Polo, Annie Machordom, Iñigo Martínez, Ursula Ramírez, Mari Jose Ruiz, Carlos Toledo, Alejandro Zaldivar y tantos otros.

Además quiero agradecer a la gente que fuera de casa han sido un gran apoyo, Inka, Juan Carlos, Rick, Anjia, Rainer, Vendula, Peter, Reachel, Guy, Arley y Melody.

Por último quiero agradecer a los que sin ellos nada de esta tesis hubiera sido posible, son mis pilares más fuertes, mi familia, Carlos, mis padres, Patricia y Tomás y mi hermana Dulce María, les agradezco el haber estado allí conmigo siempre.

***“variants arise in natural populations which in turn give rise to varieties and subspecies until finally the most distinct of them reach species level”
E. Mayr, 1982***

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Orden Characiformes	16
1.2 Relaciones filogenéticas de los Carácidos	19
1.3 El género <i>Astyanax</i>	25
1.4 Procesos de Diversificación	27
1.5 Biogeografía	30
1.6 Referencias	32
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo General	37
2.2. Objetivos Particulares	37
3. CAPÍTULO I. La historia evolutiva del género <i>Astyanax</i> Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) en Mesoamérica reveló múltiples homoplasias morfológicas	39
3.1 Introducción	40
3.2 Métodos	45
3.2.1 Colecta de Material	45
3.2.2 Extracción de ADN y secuenciación	47
3.2.3 Análisis de los datos	48
3.2.4 Reloj molecular y tiempos de divergencia	50
3.3 Resultados	53
3.3.1 Reconstrucción filogenética	53
3.3.2 Estructura geográfica dentro de las agrupaciones filogenéticas mayores	55
3.4 Discusión y Conclusiones	65
3.4.1 Sistemática de los géneros <i>Astyanax</i> y <i>Bramocharax</i>	65
3.4.2 Reloj molecular y tiempos de divergencia	67
3.4.3 Implicaciones biogeográficas	71
3.4.4 Hipótesis de la dispersión en el origen del género <i>Astyanax</i> en Mesoamérica	71

3.4.5 Principales eventos vicariantes en las poblaciones de <i>Astyanax</i> de Mesoamérica	74
3.4.6 Otros patrones biogeográficos	75
4. CAPÍTULO II. Divergencia Adaptativa y Evolución en Paralelo en el género <i>Astyanax</i> Baird & Girard (1854) del Lago Catemaco (México)	96
4.1 Introducción	97
4.2. Métodos	104
4.2.1 Muestreo y determinación taxonómica	104
4.2.2 Morfometría geométrica	105
4.2.3. Análisis estadísticos de Morfometría geométrica	108
4.2.4 Extracción de ADN y secuenciación	109
4.2.5 Análisis molecular y su correlación con la morfología	110
4.2.6 Demografía Histórica	114
4.3 Resultados	117
4.3.1 Análisis de morfología geométrica	117
4.3.2 Análisis moleculares y su correspondencia con la morfología	122
4.3.3 Demografía histórica	128
4.4 Discusión y conclusiones	133
4.4.1 Análisis de morfometría geométrica	133
4.4.2 Estructura genética mitocondrial y su correspondencia con la morfología	136
4.4.3 Historia demográfica	138
5. CAPÍTULO III. ¿Puede ser Rastreada la Especiación Ecológica a través de Marcadores Neutrales?	148
5.1 Introducción	149
5.2 Métodos	154
5.2.1 Colecta de material y su determinación taxonómica	154
5.2.2 Extracción de ADN y Secuenciación	156
5.2.3 Variación genética, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	157
5.2.4 Probando la reducción del flujo genético entre morfotipos	158
5.3. Resultados	163
5.3.1 Variación genética, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	163
5.3.2 Análisis de la estructura jerárquica y agrupamiento genético de las	167

poblaciones	
5.4 Discusión y Conclusiones	178
6. DISCUSIÓN GENERAL	192
6.1 Relaciones filogenéticas	193
6.2 Historia biogeográfica de los carácidos Mesoamericanos	194
6.3 Principales eventos de vicarianza en el género <i>Astyanax</i>	199
6.4 Otros patrones biogeográficos	200
6.5 Procesos de diversificación del género <i>Astyanax</i> en Mesoamérica	201
6.6 La estructura mitocondrial revela la evolución en paralelo del fenotipo <i>Bramocharax</i> en el Lago Catemaco	205
6.7 Especiación Ecológica Vs Radiación Adaptativa	207
7. CONCLUSIONES	214
7. CONCLUSIONS	217

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se compone de tres capítulos de investigación en los cuales se evaluó la historia evolutiva del género *Astyanax* en diferentes niveles. El primer capítulo es el estudio de las relaciones filogenéticas entre las especies presentes en Mesoamérica y se propusieron hipótesis biogeográficas para la región. En el segundo capítulo se aborda la divergencia adaptativa, utilizando como modelo el Lago Catemaco para el cual se han descrito dos formas altamente diferenciadas morfológicamente, donde la forma más especializada se había descrito originalmente como un género distinto. En este sentido se estudió la diferenciación morfológica y mitocondrial de los dos morfotipos intralacustres así como su correspondencia. Por último, el tercer capítulo correspondió a la evaluación de la hipótesis de especiación ecológica, para lo que se estudio la presencia de flujo genético entre morfotipos divergentes, utilizando como modelo el sistema del Lago Catemaco, antes mencionado. A continuación se presenta un resumen detallado para cada uno de los capítulos antes descritos:

Capítulo I

Mesoamérica corresponde a una de las regiones más complejas geográficamente, principalmente debido a su historia geológica. Esta complejidad ha resultado en interesantes procesos biogeográficos que han configurado la distribución y diversidad de la fauna de la región. El género *Astyanax* representa un modelo útil para evaluar las hipótesis biogeográficas, ya que es uno de los grupos de peces de agua dulce con mayor diversidad y

más ampliamente distribuidos en el continente. Para el presente estudio se han utilizado datos moleculares de genes mitocondriales y nucleares para evaluar las relaciones filogenéticas dentro del género en Mesoamérica y desarrollar una hipótesis biogeográfica que explique su distribución actual.

Se analizó el gen mitocondrial completo Citocromo *b* (*Cytb*) en 210 individuos de 147 localidades y para un sub-grupo de individuos representativos de los principales linajes fueron analizados tres genes mitocondriales (*Cytb*, 16S, and *COI*) y un gen nuclear (*RAG1*), obteniendo similares topologías entre ambos análisis. Se recuperaron seis grupos con una estructura geográfica congruente. Las poblaciones del norte de Mesoamérica y la parte norte de Centro América formaron un grupo monofilético, mientras que la parte media de Centro América mostró evidencias de una rápida radiación en donde no fue posible resolver la relaciones entre sus linajes. La parte más al sur de Centro América presentó una estructura fragmentada en sus linajes, con taxa geográficamente restringidos y mostrando altos niveles de divergencia molecular. Todos los individuos analizados que correspondían al género *Bramocharax* se agruparon con linajes simpátricos de *Astyanax* (incluso en algunos casos con poblaciones alopátricas de *Astyanax*), con menos de un 1% de divergencia entre ambos géneros. Estos resultados corroboran la naturaleza homoplásica de las especializaciones tróficas asociadas a los ecomorfotipos de *Bramocharax*, los cuales han evolucionado a partir de diferentes e independientes linajes dentro del género *Astyanax*. En el presente estudio se observó una mayor diversidad taxonómica comparada con estudios filogenéticos previos en el género *Astyanax*. La colonización de Mesoamérica

por *Astyanax* fue previa al cierre final del Istmo de Panamá (3.3 Ma), explica el alto grado de divergencia encontrado en la parte Sur de Centro América. Con base en las relaciones filogenéticas, la colonización de la parte norte de Mesoamérica pudo haberse dado en dos episodios independientes, con un proceso de recambio de linajes en la mayor parte de México. Nuestros resultados soportaron múltiples e independientes orígenes de las variaciones morfológicas de *Astyanax*, por lo tanto el morfotipo asociado al género *Bramocharax* representa una adaptación trófica recurrente. Las estimas obtenidas de la aplicación de un reloj molecular mostraron que *Astyanax* puede ser tan antiguo en Mesoamérica como ~8 Ma (Mioceno), lo cual implicaría la presencia de una conexión terrestre conectando Sur América y Centro América previa al cierre definitivo del Istmo de Panamá (~3.3 Ma).

Capítulo II

El género *Astyanax* Baird & Girard (1854) se caracteriza por una alta plasticidad fenotípica, siendo el caso más estudiado la forma cavernícola, *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853). Otros ejemplos de la plasticidad fenotípica se han descrito para el género *Astyanax* relacionados a recurrentes adaptaciones tróficas. Uno de estos ejemplos se ha observado en el lago de Catemaco, en el Selva de Los Tuxtlas al sureste de México, donde la especie *Astyanax aeneus* (Günther, 1860) muestra dos ecotipos, los cuales han sido asignados en la literatura científica como diferentes géneros. La forma generalista correspondería con *A. aeneus* (ampliamente distribuida fuera del lago) y la más especializada con *Bramocharax caballeroi* Contreras-Balderas and Rivera-Teillery, 1985. En el presente estudio se analizaron 210 individuos

con morfología geométrica, examinando la variación en el cuerpo, tanto del tamaño como la forma entre los ecotipos de carácidos del Lago Catemaco. También se analizó la estructura mitocondrial mediante la secuenciación de 305 individuos del gen Citocromo *b* (*Cytb*). Los resultados mostraron que ambos ecotipos difirieron de forma significativa, y dichas diferencias en la forma se encuentran en la configuración espacial de la cabeza, tanto en su forma como en su orientación, así como en la profundidad del cuerpo. Por otro lado, se observaron dos linajes mitocondriales en simpatria en el Lago Catemaco con menos de 1% de divergencia entre ellos, sin embargo estos no presentaron una congruencia entre la diferenciación mitocondrial y fenotípica, lo que señala al ecotipo *Bramocharax* como una convergencia trófica en dos linajes independientes. El sistema presente en el Lago Catemaco puede representar una gran oportunidad para el estudio de la evolución en paralelo, en particular de las adaptaciones tróficas en los peces y que las diferencias observadas en los ecotipos pueden reducir la competencia intraespecífica por los recursos mediante la modificación de la morfología trófica, la forma del cuerpo, y la conducta alimentaria.

Capítulo III

La competencia por los recursos puede conducir a la divergencia fenotípica y promover el aislamiento reproductivo entre los individuos, jugando un papel importante en la diversificación biológica, especialmente en ausencia de aislamiento geográfico. En este sentido la especiación ecológica puede corresponder a presiones de selección las cuales favorecen fenotipos

extremos, presumiblemente adaptados a hábitats específicos. Los Characiformes pueden ser un buen modelo para el estudio de la divergencia adaptativa, donde la mayoría de las especies más divergentes se caracterizan por presentar adaptaciones ecológicas, siendo un mecanismo evolutivo importante para el grupo. Nuestro modelo de estudio corresponde con dos morfotipos bien diferenciados *Astyanax* Vs. *Bramocharax* que se encuentran en simpatria en el Lago de Catemaco y donde las diferencias morfológicas principales podrían estar asociadas con caracteres tróficos potencialmente relacionados con la divergencia ecológica. Tal divergencia morfológica podría favorecer la reducción del flujo genético entre las formas especializadas, promoviendo la especiación. En el presente estudio evaluamos, con los genotipos para 12 microsatélites el flujo genético entre las poblaciones adaptados a diferentes hábitats y se contrastó con una población alopátrica altamente divergente (> 5% de divergencia del ADNmt). Con nuestros resultados no se encontró una diferenciación genética entre los cuatro grupos analizados combinando la forma y los datos de ADN mitocondrial. Más aún, los valores de diferenciación fueron considerablemente inferiores a lo que se ha reportado anteriormente en otros sistemas de adaptación trófica ($F_{ST} < 0.001$). Por otra parte en el AMOVA jerárquico no encontramos correspondencia entre los morfotipos + ADNmt, y la diferenciación molecular obtenida con los microsatélites, sólo siendo significativas las diferencias dentro de las poblaciones, las cuales también explicaron la mayor proporción de la varianza (8.54%). Finalmente en el análisis de agrupamiento sólo se encontraron diferencias genéticas entre las poblaciones alopátricas, sin observarse diferencias entre los morfotipos o linajes presentes en el lago, más aún el flujo

genético fue asimétrico, donde el linaje 1 de morfotipo *Astyanax* correspondió a la población donadora para el resto de grupos presentes en el lago, siendo la única que mostró valores significativos de migración. La presencia de flujo genético entre las morfologías divergentes fue interpretado como un proceso de plasticidad fenotípica, sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de haya especiación ecológica, la cual no ha sido posible detectar con marcadores neutrales como ha sido reportado por estudios previos.

SUMMARY

This doctoral PhD. Thesis consists of three research chapters which assessed the evolutionary history of the genus *Astyanax* at different levels. In the first chapter we study the phylogenetic relationships among species in Mesoamerica and biogeographical hypotheses were proposed for the region. Second chapter deals with adaptive divergence, using Lake Catemaco as the study model, where two morphotypes highly differentiated have been described, and where the more specialized form was originally described as a distinct genus. In this regard, we studied the mitochondrial and morphological differentiation and its correspondence. Finally, the third chapter we test ecological speciation hypothesis, asking for the presence of gene flow between divergent morphs, using as a model the Lake Catemaco system above mentioned. Below is a detailed summary for each of the chapters described:

Chapter I

Mesoamerica is one of the world's most complex biogeographical regions, mostly due to its complex geological history. This complexity has led to interesting biogeographical processes that have resulted in the current diversity and distribution of fauna in the region. The fish genus *Astyanax* represents a useful model to assess biogeographical hypotheses because it is one of the most diverse and widely distributed freshwater fish groups in the New World. We used mitochondrial and nuclear DNA to evaluate phylogenetic relationships within the genus in Mesoamerica, and to develop historical biogeographical hypotheses to explain its current distribution. Analysis of the entire mitochondrial Cytochrome *b* (*Cytb*) gene in 210 individuals from 147 localities

and of a subset of individuals for three mitochondrial genes (*Cytb*, 16S, and *COI*) and a single nuclear gene (*RAG1*) yielded similar topologies, recovering six major groups with significant phylogeographic structure. Populations from North America and Upper Central America formed a monophyletic group, while Middle Central America showed evidence of rapid radiation with incompletely resolved relationships. Lower Central America lineages showed a fragmented structure, with geographically restricted taxa showing high levels of molecular divergence. All *Bramocharax* samples grouped with their sympatric *Astyanax* lineages (in some cases even with allopatric *Astyanax* populations), with less than 1% divergence between them. These results suggest a homoplastic nature to the trophic specializations associated with *Bramocharax* ecomorphs, which seem to have arisen independently in different *Astyanax* lineages. We observed higher taxonomic diversity compared to previous phylogenetic studies of the *Astyanax* genus. Colonization of Mesoamerica by *Astyanax* before the final closure of the Isthmus of Panama (3.3 Mya) explains the deep level of divergence detected in Lower Central America. The colonization of Upper Mesoamerica apparently occurred at two independent episodes, with lineage turnover over a large part of the region. Our results support multiple independent origins of morphological traits in *Astyanax*, whereby the morphotype associated with *Bramocharax* represents a recurrent trophic adaptation. Molecular clock estimates indicate that *Astyanax* was present in Mesoamerica during the Miocene (~8 Mya), which implies the existence of an incipient land-bridge connecting South America and Central America before the final closure of the Isthmus of Panama (~3.3 Mya).

Chapter II

The *Astyanax* Baird & Girard (1854) fish genus is characterized by a high phenotypic plasticity, being the most studied case the troglitic species *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853). Other examples of phenotypic plasticity have been described for the genus *Astyanax* like recurrent trophic-adapted phenotypes. One of these examples has been observed in Lake Catemaco, located in the rainforest of Los Tuxtlas in the southeastern from Mexico, where the *Astyanax aeneus* (Günther, 1860) species shows two ecotypes, usually assigned in the scientific literature as two different genera. A generalist form assigned as *A. aeneus* and a more specialized one, *Bramocharax caballeroi* Contreras-Balderas and Rivera-Teillery, 1985. Through geometric morphometrics of 210 individuals, we examined variation in body size and shape among ecotypes in the characids from Catemaco Lake. We also analyzed the mitochondrial genetic structure using Cytochrome *b* (*Cytb*) sequences of 305 individuals. Results showed that *characids* ecotypes were significantly different and the shape differences were located at the spatial configuration of *landmarks* related to the shape and orientation of the head and body depth. While two different mitochondrial lineages were found within of Catemaco Lake, with less than 1% of divergence, we did not found congruence between mitochondrial and phenotypic differentiation, showing a convergence of the specialized phenotype in both lineages. We argue that characids from Catemaco Lake could be a good candidate for studying parallel evolution of trophic traits in fish and that differences observed in biotypes may reduce

resource competition through modification of trophic morphology, body shape, and feeding behavior.

Competition for resources could drive phenotypic divergence and promotes reproductive isolation, playing an important role in biological diversification, particularly in the absence of geographical isolation. In this sense the ecological speciation could occur when selection pressures favor extreme phenotypes, presumably adapted to particular habitats. The Characiformes could be a good model for study adaptive divergence, where the most extreme diverging species are characterized by present ecological adaptations, being an important evolutionary mechanism in the group. Our study model corresponds with two well differentiated morphs *Astyanax* Vs. *Bramocharax* which co-occur in Catemaco Lake, a lagoon in the Mexican rain forest, and where the main morphological differences could be associated with trophic characters potentially related to ecological divergence. Such morphological divergence might favor reduced gene flow between morphotypes, promoting speciation. Using 12 microsatellite loci genotypes, we specifically assess whether gene flow is reduced between populations in different selective environments and contrasted to an allopatric highly divergent population (>5% of mtDNA divergence). We found no genetic differentiation between the four groups analyzed in the present study combining morphs and the mtDNA data. Even more the differentiation values were considerably lower than what has been previously reported to other trophic – adapted morphs ($F_{ST} < 0.001$). Moreover in the hierarchical AMOVA we found no correspondence between the morphs + lineages combination, and the molecular differentiation,

only being significant the differences within populations and explaining the higher amount of variance (8.54%). Finally in the clustering analysis we only found genetic differences between the allopatric populations, not observing differences between the morphotypes or lineages present in the Lake, moreover asymmetric gene flow was observed, being the mitochondrial lineage 1 of *Astyanax* morphs the donor population to the rest of groups present in the lake, and being the only one which showed significant migration values. We interpret the presence of gene flow between divergent morphologies as phenotypic plasticity process; however we cannot refuse the possibility of ecological speciation which could not be traced by our neutral markers, as has been suggested by other studies.

Chapter III

Competition for resources could drive phenotypic divergence and promote reproductive isolation between individuals, playing an important role in biological diversification, especially in the absence of geographical isolation. In this sense ecological speciation may occur when selection pressures favors extreme phenotypes, presumably adapted to different habitats. The Characiformes could be a good model to study adaptive divergence, where most extreme morphological differentiated species are characterized by present ecological adaptations, being an important evolutionary mechanism for the group. Our study model include two distinct morphotypes *Astyanax* Vs *Bramocharax* that co-occur in Lake Catemaco, a lagoon in the Mexican rainforests, where major morphological differences could be associated with

trophic traits potentially related to ecological divergence. Such morphological divergence might reduce gene flow between the specialized morphotypes, promoting speciation. Using 12 microsatellites loci, we evaluate the presence of gene flow between morphotypes, adapted to different habitats and contrasted with a highly divergent allopatric population (> 5% ML divergence of mtDNA). We found no genetic differentiation among the four groups analyzed (combining morphology and mtDNA data). The differentiation values were considerably lower than what has been reported previously in other trophic - adapted systems ($F_{ST} < 0.001$). Moreover, in the hierarchical AMOVA we found no correlation between morphotypes or mtDNA and nuclear differentiation, where only within populations differences, were significant and accounted for most of the variance (8.54%). Finally, in the clustering analysis we found only genetic differences between allopatric populations, without differences between morphs or lineages present in the lake. Asymmetric gene flow was detected, where the lineage 1 of *Astyanax* morphotype corresponded to the donor population, whose migration rates were the only ones significant. We interpret the presence of gene flow between divergent morphologies as a phenotypic plasticity process, however, we cannot rule out the possibility of ecological speciation, which has not been possible to trace with our neutral markers as has been reported in previous studies.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Orden Characiformes

El orden Characiformes se compone de peces estenoalinos cuya distribución actual comprende, principalmente, África y la región Neotropical, a excepción del género *Astyanax*, en el cual la especie *A. mexicanus* llega hasta el sur de la región Neártica (Figura 1).



Figura 1. Distribución del orden Characiformes.

Aunque actualmente los Characiformes son considerados peces dulceacuícolas, al parecer hay controversia en cuanto a si en sus orígenes también lo fueron. Es posible que el orden, e incluso la familia Characidae, tengan origen Gondwánico debido a la presencia de aléstitidos o carácidos tipo aléstitidos, en África y en el Sur de América, respectivamente [1]. Sin embargo los fósiles más antiguos de un Characiforme verdadero son del Cretácico

Introducción General

tardío, en Sudán, correspondiente al Cenomaniense (≈ 97 millones de años) [1]. En América del Sur se conocen registros fósiles de la Pajcha Pata (Bolivia), en la formación del Molino, los cuales corresponden al Cretácico tardío, Maastrichthiense medio (≈ 68.4 millones de años), donde los representantes para la familia Characidae pertenecen a las subfamilias Tetragonopterinae y Serrasalminae, sin embargo aparecen mezclados con peces marinos por lo que recomiendan futuros estudios que permitan esclarecer el paleoambiente de estos organismos [2].

En Perú se cuentan con registros fósiles de la Laguna Umayo para las mismas subfamilias que en Bolivia, y los cuales pertenecen al Paleoceno tardío y al Eoceno temprano (Thanetiense e Ypresiense) entre 55.9 a 53.4 millones de años [3]. En Argentina se cuentan con registros del Cuaternario para la subfamilia Serrasalminae, que al parecer de acuerdo a la presencia de otros vertebrados y moluscos correspondería a un hábitat exclusivamente dulceacuícola [4].

En África el registro fósil de un Characiforme proviene del Cenozoico, Paleoceno inferior (≈ 65 millones de años), en Marruecos [5]. Donde para las familias Hepsetidae y Characidae, los fósiles más antiguos encontrados se presentan en África y la Península Arábiga (Thaytiniti) pertenecientes al Oligoceno inferior (≈ 34 millones de años). Así mismo el paleoambiente asociado a estos fósiles se corresponde con hábitat dulceacuícolas [1, 2].

Sin embargo existen otros registros fósiles del mismo periodo, Cenomaniense, en Portugal (*Lusitanichthys*) y del Eoceno (\approx 54 millones de años) del sur de Francia que al parecer estarían más relacionados con ambientes marinos y salobres respectivamente, los cuales desaparecieron rápidamente, quizás por razones climáticas [5-7].

Lo anterior también ha sido tema de discusión actualmente utilizando las filogenias moleculares, ya que se ha observado que algunas familias Africanas (Hepsetidae, Alestidae) se unen con otras Americanas (Ctenolucidae, Lebiasinidae) [8] (Figura 2), y las cuales corresponden a familias que se originaron posteriormente a la separación entre África y América.

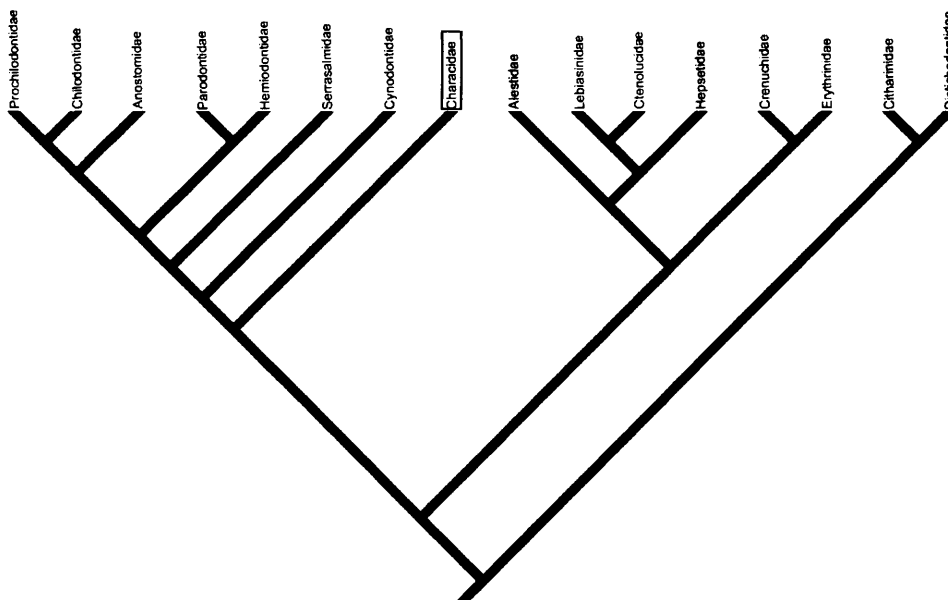


Figura 2. Relación entre las familias de Characiformes Africanas (resaltadas en negro) y Americanas de Calcagnotto *et al.* (2005). El rectángulo corresponde a la familia Characidae.

De acuerdo con Calcagnotto *et al.* (2005), propone que posiblemente esta relación se dio por una dispersión inter - Continental, por medios marinos de las familias Ctenolucidae, Lebiasinidae, Crenuchidae y Erythrinidae y la extinción de la familia Citharinidae en Sur América. Esto involucraría un proceso de expansión de este grupo más complejo hace aproximadamente 100 millones de años, considerando múltiples eventos de dispersión y vicarianza.

Gayet *et al.* (2003), propone que el origen del Orden pudo ser en Pangea (~65 Ma), de ser así el grupo podría ser considerado como estrictamente dulceacuícola, y la distribución fósil podría ser explicada. Aún así contempla la posibilidad de una dispersión, por ancestros tolerantes a la salinidad que pudieron cruzar el Mar de Thetis y pasar a través del Océano Atlántico durante el Cretácico cuando éste todavía era estrecho.

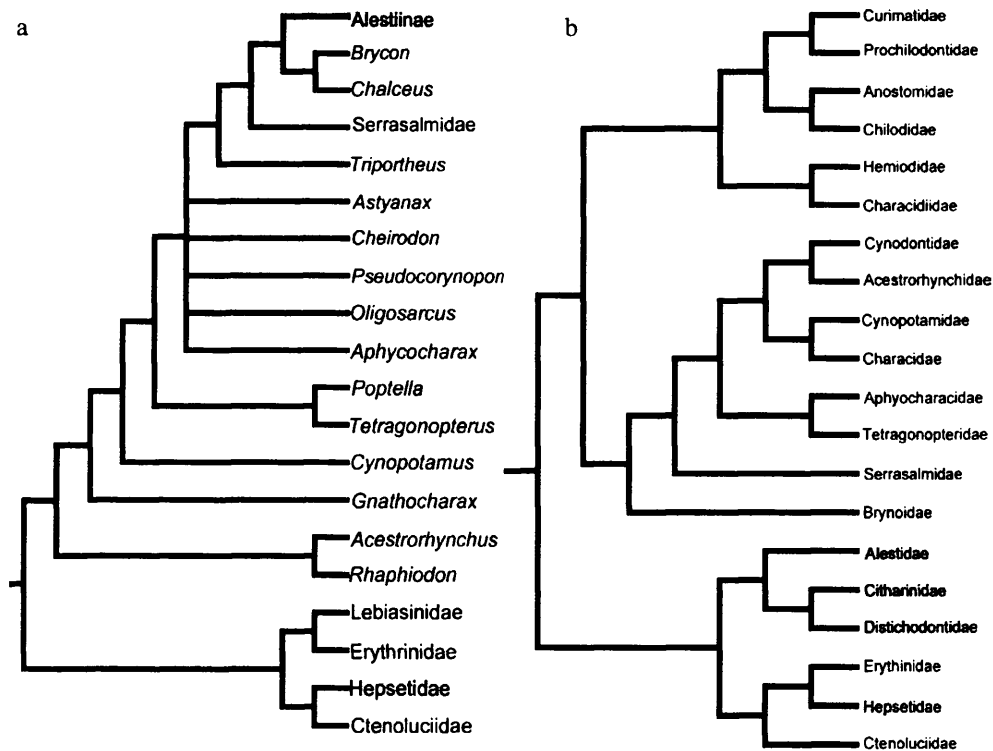
1. 2. Relaciones filogenéticas de los carácidos

El orden Characiformes cuenta con más de 1600 especies descritas incluidas en 16 familias, de las cuales cuatro son endémicas de África (200 especies) y el resto son endémicas de América (más de 1,200 especies) [8]. El género *Astyanax* se incluye dentro de la familia Characidae, la cual cuenta con más de 1000 especies descritas, siendo una de las cuatro familias más diversas dentro de teleósteos. Dicha diversidad se encuentra representada mayoritariamente por fauna Neotropical cuya distribución abarca desde el sur de USA hasta la parte norte de la Patagonia (Argentina). Actualmente esta

Introducción General

familia carece de una diagnosis filogenética y su clasificación taxonómica está sujeta a cambios constantes.

La mayoría de los estudios filogenéticos dentro del orden Characiformes en donde se incluye a la familia Characidae, se basan caracteres morfológicos: [8-12], sin embargo sus interrelaciones no han sido completamente resueltas, siendo comunes las contradicciones entre topologías (figura 3), más aún algunos autores han cuestionado la monofilia de la familia [13].



Introducción General

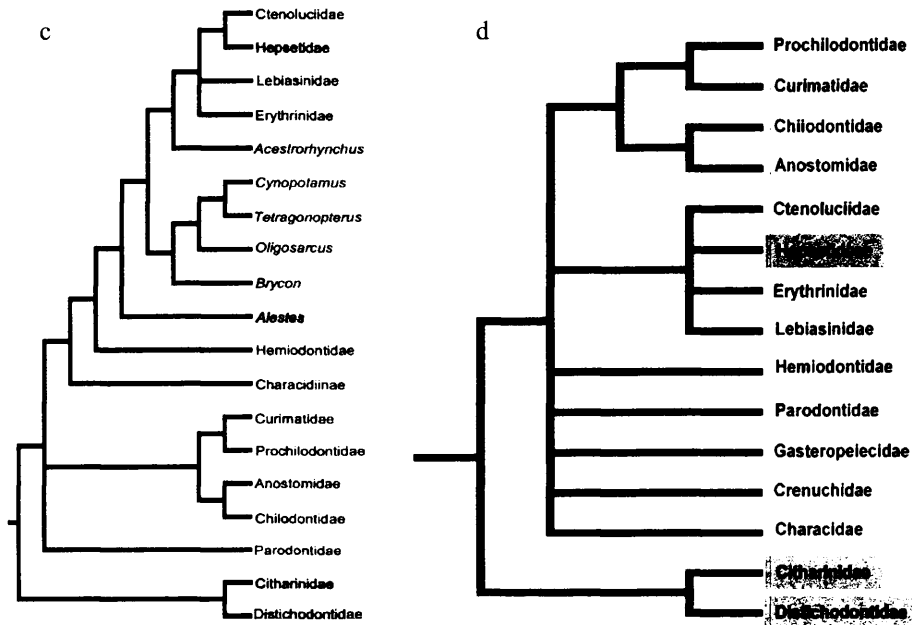


Figura 3. Relaciones filogenéticas propuestas para el orden Characiformes; a) Lucena 1993, b) Uj, 1990, c) Buckup, 1990 d) Ortí y Vari, 1997. Los grupos resaltados en negro corresponden a las familias Africanas.

En una revisión hecha para la familia Characidae [14], se reconocen 88 géneros, sin embargo la mayoría de estos géneros carecen de una diagnosis filogenética y en casos particulares han sido considerados explícitamente como parafiléticos [ej. *Astyanax* (de Eigenmann, 1917; a Abilhoa and Duboc, 2007)].

Las relaciones filogenéticas entre los géneros Neotropicales presentes en Mesoamérica no escapan de la incertidumbre taxonómica presente en el resto de la familia. Más aún, actualmente no existe un estudio filogenético donde se incluyan todos los géneros presentes en esta región.

Las dos aproximaciones más recientes, que incluyen una mayor representación de la diversidad presente en la familia han sido llevadas a cabo

Introducción General

utilizando marcadores moleculares así como caracteres morfológicos [8, 11]. En el trabajo de Calcagnotto *et al.* (2005), se incluyen un total de 3.6 kbp de cuatro genes nucleares y dos mitocondriales, para 124 taxa. En este estudio no es incluido *Bramocharax* en el análisis, y el género *Astyanax* no se recupera como monofilético. Además, *Hyphessobrycon*, el género más diverso dentro de la familia junto con *Astyanax*, se agrupa con este último, y con otros cuatro géneros (*Astyanacinus*, *Inpaichthys*, *Moenkhausia* and *Hemigrammus*; Figura 4).

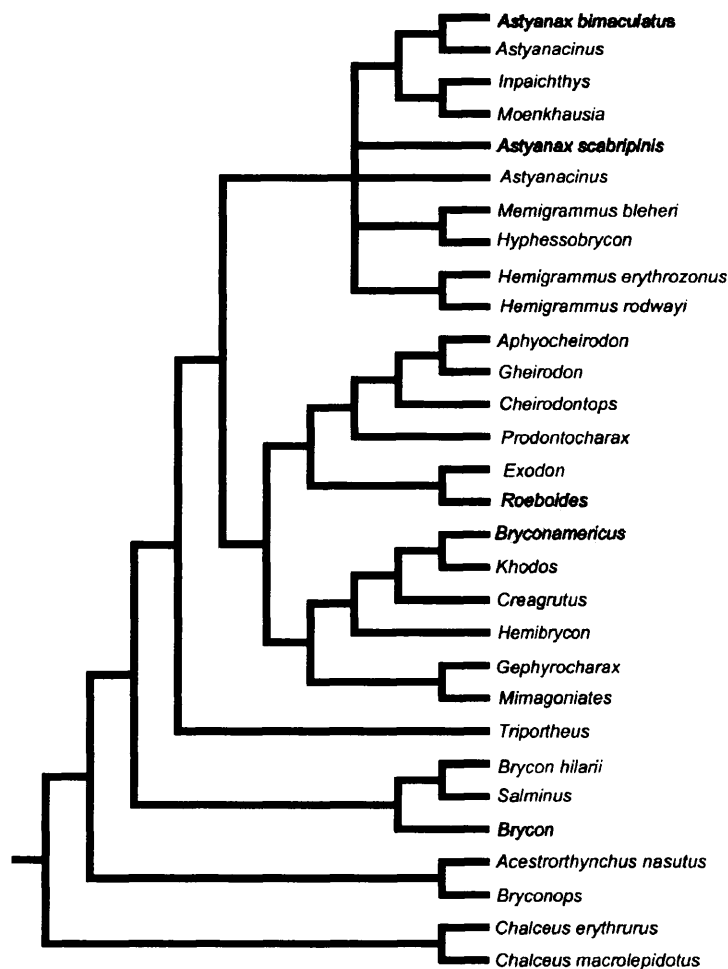


Figura 4. Topología consenso de Máxima Parsimonia modificada de Calcagnotto *et al.* (2005). Los cuatro representan los grupos de carácidos Mesoamericanos.

Así mismo el trabajo llevado a cabo por Mirande (2009), coincide con el trabajo previo en que el género *Astyanax* no se recupera como monofilético con base en caracteres morfológicas, aunque en este caso se agrupa con *Markiana*, *Psellogrammus*, y algunas especies de *Bryconamericus* e *Hyphessobrycon*. Así mismo recupera un clado “*Bramocharax*” en el cual se incluyen los géneros *Bramocharax*, *Oligosarcus* y un género nuevo. Sin embargo, el autor menciona que no siempre se recuperaron por separado estos últimos tres géneros los cuales algunas veces se agruparon con el género *Astyanax* (Figura 5).

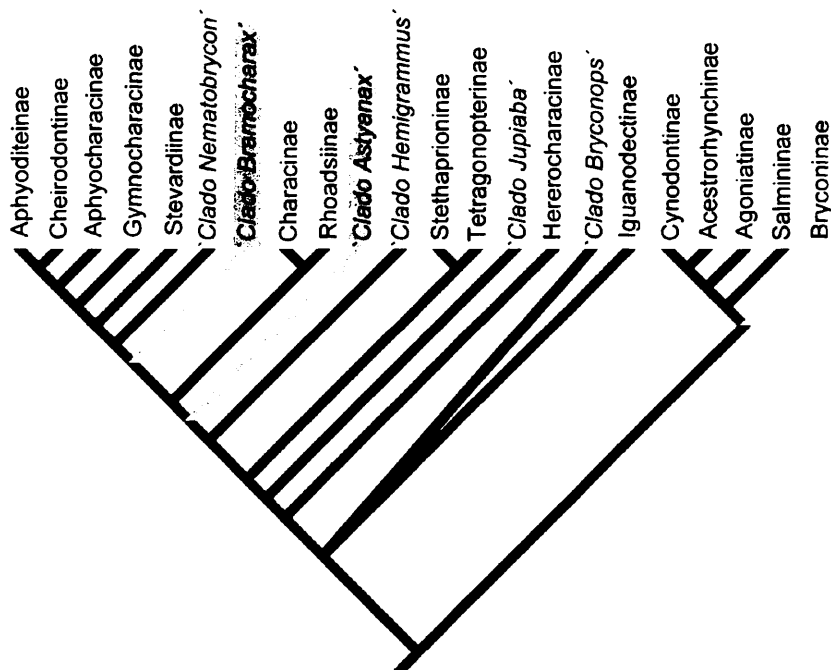


Figura 5. Topología consenso de Máxima Parsimonia modificada de Mirande (2009). Los cuatros representan los grupos de carácidos Mesoamericanos.

Introducción General

Por lo anterior resulta claro que la clasificación taxonómica y sus relaciones filogenéticas, tanto dentro del orden Characiformes como dentro de la familia Characidae, requieren de futuros análisis en los que se puedan incluir un mayor número de representantes de todos los géneros dentro de la familia y a su vez con una buena representación geográfica que permita el entendimiento de la historia evolutiva del grupo.

1. 3. El género *Astyanax*

Dentro de la familia Characidae, que se distribuye en América, el género *Astyanax* resulta conspicuo debido a su amplia distribución, la cual abarca desde el río Negro en el Norte de la Patagonia (*Astyanax eigenmanniorum*), Argentina, hasta la cuenca del Bravo – Conchos (*Astyanax mexicanus*) al sur del estado de Texas en Norteamérica [14]. Considerando lo anterior este género es de peculiar interés debido a que su gran capacidad de dispersión y adaptación a diversos hábitats, lo cual le ha permitido pasar por dos de las más importantes barreras para los peces de agua dulce y en general a los vertebrados.

Estas barreras son: el Istmo de Panamá, el cual ha sido considerado como una zona de Gran Intercambio Americano [15], y ha sido de particular interés para los biogeógrafos, debido a que es en esta zona donde se permitió el intercambio de flora y fauna entre Sur y Norte América. La segunda barrera geográfica corresponde a la mejor conocida como zona de transición entre las regiones Neártica y Neotropical, esta zona se encuentra en el parte central de México, en el cinturón volcánico Transmexicano [16, 17].

El género *Astyanax* se caracteriza por presentar una alta plasticidad morfológica y gran capacidad de especialización en aspectos tróficos, lo que ha contribuido a considerarlo como un grupo de gran complejidad evolutiva así como en sus patrones biogeográficos [13, 18-22]. Actualmente por ser peces primarios (no tolerantes a la salinidad), se consideran un buen modelo en los estudios de biogeografía histórica ya que su dispersión es muy limitada a rutas

Introducción General

terrestres, así mismo su dispersión entre cuencas que existan cambios paleogeográficos importantes, así como anastomosis o capturas de ríos.

El género *Astyanax* ha sido objeto de un gran número de estudios en los últimos diez años con diferentes fines [13, 20, 23-25]. Muchos de estos trabajos se han centrado en aspectos evolutivos derivados de la existencia de poblaciones epigeas e hipogeas, mostrando estas últimas interesantes adaptaciones a los medios subterráneos como la pérdida de pigmentación en el cuerpo y la reducción o degeneración del ojo, entre otras. Sin embargo, estudios genéticos han demostrado que frente a las grandes adaptaciones morfológicas de las poblaciones subterráneas su diferenciación genética es escasa [19, 21, 22]. Además, en recientes trabajos llevados a cabo [26, 27], se observó que el albinismo en los organismos troglobíticos de las cuevas del Pachón y el Molino, en San Luis Potosí, eran el resultado de una convergencia a nivel molecular, en el gen que codifica para este carácter (*Oca2*), así como en otros vertebrados (ratones y humanos).

Por otro lado estudios considerando las secuencias de ADN mitocondrial, en el género *Astyanax* proponen que las poblaciones hipogeas han derivado de múltiples eventos de colonización e hibridación, lo cual ha producido la convergencia en características troglobíticas a partir de diferentes grupos [19, 21, 22, 28].

Considerando la taxonomía tradicional, basada en caracteres morfológicos el género *Astyanax* (Baird & Girard, 1854), comprende más de

107 especies válidas y es junto con *Hyphesobrycon* (105 especies) el género más diverso entre los Characiformes [14, 29]. Sin duda en cuanto a su morfología, este grupo también es bastante complejo, ya que adaptaciones fenotípicas, por lo general asociadas con hábitos alimentarios así como a características ambientales (como en el caso de los organismos troglobíticos), por lo general no se correlacionan con un aislamiento reproductivo, tanto pre como post cigótico [19, 21-23, 25, 28]. Por lo anterior no es sorprendente que el género en los últimos años haya presentado innumerables cambios en su nomenclatura. Para México, se han descrito seis especies del género *Astyanax*. Sin embargo, como lo menciona Contreras-Balderas y Lozano-Vilano (1988), hay una incongruencia en los límites biogeográficos para las especies y en algunos casos si se trata de especies o subespecies.

Es por esto que el género resulta interesante debido, que aunque presenta una gran diversidad fenotípica, aparentemente, no se corresponde con la diversidad genética, y por lo tanto no se cuenta con un aislamiento reproductivo entre poblaciones morfológicamente diferentes.

1. 4. Procesos de diversificación

Darwin se refirió al origen de las especies como “el misterio de los misterios”, y a pesar de décadas de estudio, aún no se ha llegado a un consenso acerca de los procesos involucrados que expliquen la diversidad existente. Sin duda el concepto de especie ha generado un intenso debate (por ejemplo ver las últimas revisiones [30-32]). Darwin propone que la especiación

estaría enmarcada por un lado por los procesos que la generan y a su vez la selección natural que terminaría por eliminar a aquellos organismos que no sean capaces de adaptarse a su entorno.

Aunque es posible que existan muchas otras clasificaciones, la especiación puede asociarse a los procesos de aislamiento que la generan: geográficos (simpatria, alopatria, peripatria o parapatria) o ecológicos (exclusión competitiva, "oportunidad ecológica", desplazamiento del carácter) [33, 34]. Así mismo la complejidad evolutiva de un grupo suele tener a menudo una interacción de diferentes procesos [33], ya que en los casos de especiación simpátrica o peripátrica es muy posible que involucren procesos adaptativos, mientras que en la especiación por vicarianza o parapatria no necesariamente [35], e.g. la especiación simpátrica puede estar relacionada con la divergencia adaptativa por lo tanto a la diferenciación ecológica [36].

Sin embargo, este supuesto no justifica que exista necesariamente una relación entre el modo de especiación geográfica y el proceso evolutivo subyacente [35]. Más aún, un problema obvio es que la distribución actual de dos especies hermanas no es necesariamente un indicador fiable de la distribución histórica de las mismas, siendo uno de los principales argumentos en contra de la especiación simpátrica ya que es necesario probar que el proceso de especiación no se dio en alopatria y que posteriormente al expandirse las dos especies se co-distribuyen [35].

Introducción General

Por otro lado, uno de los paradigmas de la biología evolutiva actual radica en el papel de la selección natural como motor de la especiación [37], siendo prioritario el entendimiento de cómo y por qué los organismos se diversifican concentrando la investigación en sus bases genéticas y ecológicas [38]. Tanto la selección natural y sexual actúan como un bucle de retroalimentación positiva, reforzado por la adaptación local por selección sexual de un rasgo seleccionado, dando como resultado que las poblaciones diverjan y finalmente formen especies distintas. Bajo este supuesto esperaríamos encontrar machos que presenten ornamentos, como aletas brillantes que a su vez están relacionados con una buena adaptación a las condiciones ambientales locales [39].

La mayoría de los grupos dentro de la familia Characidae son morfológicamente conservados, sin embargo las fuentes importantes de variación suelen estar relacionadas con la dieta y eventos de miniaturización, que a menudo resultan caracteres homoplásicos [10, 40].

En particular en los carácidos los eventos de miniaturización se han reportado en diferentes grupos (Weitzman and Fink, 1983; Buckup, 1993), siendo este tipo de proceso evolutivo comúnmente correlacionado con la disminución de varias características, tales como el sistema nervioso (por ejemplo, la línea lateral) y sistema óseo (por ejemplo, huesos infraorbitarios) [40, 41].

Otros modelos de especiación, en los que se excluye a los modelos ecológicos, están relacionados con la geografía, entre los que se incluyen la deriva genética en poblaciones estables [42], la deriva a través de eventos fundador y cuellos de botella poblacionales [43], así como la fijación de mutaciones ventajosas en poblaciones alopátricas [44].

Sin duda uno de los principales mecanismos por el cual se produce la diversificación es la geografía a través del origen de una barrera que impide el flujo genético produciendo una divergencia de las dos poblaciones divididas (vicarianza), o mediante el establecimiento de nuevas poblaciones a través de una expansión de la distribución de un grupo (peripatría) [45].

1. 5. Biogeografía

Los carácidos de América del Norte son un grupo interesante para biogeógrafos, en parte porque su patrón de distribución podría ser el resultado de una combinación de eventos de dispersión y vicarianza (Myers 1938, 1967). Por otra parte, los carácidos son uno de los dos grupos más ampliamente distribuidos en el continente americano y su dispersión está restringida a cuencas dulce acuícolas, siendo limitada su dispersión por medios marinos.

Uno de los primeros estudios que incluyeron una hipótesis biogeográfica de los carácidos de norte América fue llevada a cabo por Rosen (1975). En dicha hipótesis Rosen sugirió que la distribución actual de los carácidos en América Central podría ser el resultado de una reciente expansión (no antes

Introducción General

del Cuaternario) como ya había sido sugerido antes por Myers (1938, 1967), o una expansión más antigua a través de un, no consolidado, istmo "Costa Rica y Panamá" durante el Oligoceno. La primera posibilidad podría explicar su ausencia en las islas antillanas y la segunda posibilidad ha sido sugerido para *Hyphessobrycon* (Bussing, 1976). Rosen (1975) sugirió que los dos *Astyanax* y *Bramocharax* concuerdan con una hipótesis de una fauna "relictual", que podría coincidir con una conexión antigua entre el Norte y Sur América. En este sentido, la hipótesis de una conexión reciente ha sido apoyada para el género *Astyanax* utilizando el reloj molecular (Strecker *et al.* 2004).

La mayoría de los trabajos publicados consideran que el género *Astyanax* presenta evidencias de múltiples expansiones hacia norte América [22, 46]. Además de las hipótesis de dispersión, eventos vicariantes han sido propuestos como dentro de la historia evolutiva del género en la cladogénesis. El Eje Neovolcánico Transversal es una de las barreras que son consideradas como eventos vicariantes que han dividido a los linajes de *Astyanax* [22].

1.6. Referencias

1. Otero O, Gayet M: **Palaeoichthyofaunas from the Lower Oligocene and Miocene of the Arabian Plate: palaeoecological and palaeobiogeographical implications.** *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 2001, **165**(1-2):141-169.
2. Gayet M, Marshall LG, Sempere T, Meunier FJ, Cappetta H, Rage JC: **Middle Maastrichtian vertebrates (fishes, amphibians, dinosaurs and other reptiles, mammals) from Pajcha Pata (Bolivia). Biostratigraphic, palaeoecologic and palaeobiogeographic implications.** *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 2001, **169**(1-2):39-68.
3. Sigé B, Sempere T, Butler Robert F, Marshall Larry G, Crochet J-Y: **Age and stratigraphic reassessment of the fossil-bearing Laguna Umayo red mudstone unit, SE Peru, from regional stratigraphy, fossil record, and paleomagnetism.** *Geobios*, **37**(6):771-794.
4. Fucks E, Aguirre M, Deschamps CM: **Late Quaternary continental and marine sediments of northeastern Buenos Aires province (Argentina): Fossil content and paleoenvironmental interpretation.** *Journal of South American Earth Sciences* 2005, **20**(1-2):45-56.
5. De la Peña Zarzuelo A: **Estudio de los Teleosteos de las cuencas continentales terciarias de la Península Ibérica.** Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1993.
6. Gayet M: **Considération sur la Phylogénie et la paléobiogéographie des Ostariophysaires.** *Geobios* 1982, **Mémoire spécial 6**(12):39-52.
7. Gayet M, Sempere T, Cappetta H, Jaillard E, Lévy A: **La présence de fossiles marins dans le Crétacé terminal des Andes centrales et ses conséquences paléogéographiques.** *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleocology* 1993, **102**:283-319.
8. Calcagnotto D, Schaefer SA, DeSalle R: **Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences.** *Mol Phylogen Evol* 2005, **36**(1):135-153.
9. Buckup PA: **Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical Characidiin fishes (Characiformes, Ostariophysi).** *Cladistics* 1993, **9**(3):305-341.

10. Lucena CAS: **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos**. Universidade de São Paulo, Brasil; 1993.
11. Mirande JM: **Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes)**. *Cladistics* 2009, **25**(6):574-613.
12. Uj A: **Etude comparative de l'osteologie cranienne des poissons de la famille des Characidae et son importance phylogenetique**. Université de Geneve; 1990.
13. Ortí, G. y R. Vari. 1997. **Characiformes. Tetras, piranhas, hatchetfishes, headstanders, pencilfishes, and their relatives**. The Tree of Life Web Project. <http://tolweb.org/Characiformes/15062/1997.01.27>.
14. Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Pezzi Da Silva JF, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA *et al*: **Genera Incertae Sedis in Characidae**. In: *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edited by Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ. Porto Alegre Brasil: EDIPUCRS; 2003: 106-168.
15. Bermingham E, Martin AP: **Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America**. *Mol Ecol* 1998, **7**(4):499-517.
16. Ferrari L, Conticelli S, Vaggelli G, Petrone CM, Manetti P: **Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt**. *Tectonophysics* 2000, **318**:161-185.
17. Huidobro L, Morrone JJ, Villalobos JL, Alvarez F: **Distributional patterns of freshwater taxa (fishes, crustaceans and plants) from the Mexican Transition Zone**. *J Biogeogr* 2006, **33**(4):731-741.
18. Contreras-Balderas S, Lozano-Vilano ML: **Problemas nomenclaturales de las formas mexicanas del género Astyanax (Pisces: Characidae)**. *Zoología Informa* 1988, **38**:1-13.
19. Dowling TE, Martasian DP, Jeffery WR: **Evidence for Multiple Genetic Forms with Similar Eyeless Phenotypes in the Blind Cavefish, Astyanax mexicanus**. *Mol Biol Evol* 2002, **19**(4):446-455.
20. Orti G, Meyer A: **The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences**. *Syst Biol* 1997, **46**(1):75-100.

Introducción General

21. Strecker U, Bernatchez L, Wilkens H: **Genetic divergence between cave and surface populations of Astyanax in Mexico (Characidae, Teleostei).** *Mol Ecol* 2003, **12**(3):699-710.
22. Strecker U, Faundez VH, Wilkens H: **Phylogeography of surface and cave Astyanax (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data.** *Mol Phylogen Evol* 2004, **33**(2):469-481.
23. Jeffery WR: **Cave fish as a model system in evolutionary developmental biology.** *Developmental Biology* 2001, **231**:1-12.
24. Montgomery JC, Coombs S, Baker CF: **The Mechanosensory Lateral Line System of the Hypogean form of Astyanax Fasciatus.** *Environ Biol Fish* 2001, **62**(1):87-96.
25. Jeffery WR: **Regressive Evolution in Astyanax Cavefish.** *Annu Rev Genet* 2009, **43**(1):25-47.
26. Protas M, Conrad M, Gross JB, Tabin C, Borowsky R: **Regressive Evolution in the Mexican Cave Tetra, Astyanax mexicanus.** *Curr Biol* 2007, **17**(5):452-454.
27. Protas ME, Hersey C, Kochanek D, Zhou Y, Wilkens H, Jeffery WR, Zon LI, Borowsky R, Tabin CJ: **Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism.** *Nat Genet* 2006, **38**(1):107-111.
28. Wilkens H, Strecker U: **Convergent evolution of the cavefish Astyanax (Characidae, Teleostei): genetic evidence from reduced eye-size and pigmentation.** *Biol J Linn Soc* 2003, **80**(4):545-554.
29. Eschmeyer WN: **Catalog of fishes. Updated database version of June 2007.** In: *FishBase*. 2007.
30. Hey J: **On the failure of modern species concepts.** 2006, **21**(8):447-450.
31. Wiley EO: **The Evolutionary Species Concept Reconsidered.** *Syst Biol* 1978, **27**(1):17-26.
32. de Queiroz K: **Ernst Mayr and the modern concept of species.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**(Suppl 1):6600-6607.
33. Barraclough T: **Revealing the factors that promote speciation.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 1998, **353**(1366):241.
34. Barraclough TG, Nee S: **Phylogenetics and speciation.** *Trends Ecol Evol* 2001, **16**(7):391-399.

35. Losos JB, Glor RE: **Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation**. *Trends Ecol Evol* 2003, **18**(5):220-227.
36. Schluter D: **Ecological Causes of Adaptive Radiation**. *The American Naturalist* 1996, **148**:S40-S64.
37. Darwin C: **On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life**. *New York: D Appleton* 1859.
38. Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, Cruickshank T, Schlichting CD, Moczek AP: **Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation**. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* 2010, **25**(8):459-467.
39. Mank JE: **Sexual Selection and Darwin's Mystery of Mysteries**. *Science* 2009, **326**(5960):1639-1640.
40. Weitzman SH, Fink WL: **Relationships of the Neon Tetras, a Group of South American Freshwater Fishes (Teleostei, Characidae) with Comments on the Phylogeny of the New World Characiforms**. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 1983, **150**(6):339-395.
41. Buckup PA: **The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi)**. *Zool J Linn Soc* 1993, **108**(3):225-245.
42. Wright S: **Breeding structure of populations in relation to speciation**. *Am Nat* 1940, **74**(752):232-248.
43. Mayr E: **Change of genetic environment and evolution**. *Evolution as a Process* 1954:157 - 180.
44. Muller HJ: **Bearings of the Drosophila work on systematics**. In: *The new systematics*. Edited by Huxley JS. London: Oxford University Press; 1940: 185-268.
45. Mayr E: **Animal species and evolution**: Harvard University Press; 1963.
46. Dowling TE, Tibbets CA, Minckley WL, Smith GR: **Evolutionary relationships of the plagopterins (Teleostei : Cyprinidae) from cytochrome b sequences**. *Copeia* 2002(3):665-678.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis consistió en evaluar los patrones y procesos de diversificación, de un género de carácidos americanos (*Astyanax*: Actinopterygii) en un área geológicamente compleja como lo es Mesoamérica. Para ello se utilizaron herramientas moleculares para proponer hipótesis filogenéticas y biogeográficas. Así mismo se estudiaron los mecanismos evolutivos involucrados en la diversificación del género *Astyanax*, utilizando como modelo el complejo de especies presente en el Lago Catemaco (Veracruz, México), en donde se analizó la correspondencia entre la divergencia morfológica y sus bases genéticas.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Proponer una hipótesis filogenética robusta para el género *Astyanax* utilizando una matriz de datos en la que se combinan marcadores nucleares y mitocondriales
2. Proponer una hipótesis biogeográfica para la fauna de peces de Mesoamérica, incluyendo la importancia relativa de la geología histórica y los factores climáticos
3. Evaluar el papel de la divergencia adaptativa en el sistema *Astyanax/Bramocharax* presente en el Lago Catemaco, comparando la correspondencia entre la diferenciación morfológica y molecular

4. Probar estadísticamente la señal filogenética en los datos morfométricos analizados
5. Evaluar la presencia de eventos de convergencia evolutiva, así como su relación con la historia demográfica
6. Evaluar el flujo génico en el sistema de carácidos presente en el Lago Catemaco, utilizando 12 loci nucleares entre morfotipos divergentes, con el fin de probar si el proceso de especiación ecológica.

3. CAPÍTULO I

La historia evolutiva del género *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) en Mesoamérica reveló múltiples homoplasias morfológicas

“la evolución filética no produce ningún incremento de diversidad, tan sólo la transformación de una cosa en otra”

J. Gould 1980

3. 1. INTRODUCCIÓN

Mesoamérica es una de las regiones biogeográficas más complejas en el mundo [1-5]. Dicha complejidad está reflejada en la confluencia entre la biota Neártica y Neotropical así como una larga historia de actividad geológica, que se que se extiende desde el Mioceno hasta el presente, debido a contantes modificaciones en la configuración de las placas tectónicas presentes en el área (Cocos, América del Norte, el Pacífico y las placas del Caribe) [6, 7] lo cual ha generado barreras y a su vez puentes que han moldeado la distribución de los peces de agua dulce [8-13]. Por ejemplo, durante el Plioceno (~ 3,3 millones de años) el cierre del estrecho de Panamá ha sido propuesto como una de las causas más importantes de intercambio faunístico entre las regiones Neártica y Neotropical [14]. Así mismo cambios climáticos también han sido sugeridos como posibles causas de ciertos patrones en la distribución de peces Mesoamericanos [15]. Para poder distinguir entre los efectos climáticos y geológicos se requiere, información tanto filogenética así como los límites geográficos de las especies estudiadas [9, 16-20].

Es así como se ha dado especial atención en el entendimiento del número y la fecha en la que se dieron las colonizaciones de Mesoamérica por los peces de agua dulce desde América del Sur: aspecto que aún hoy en día permanece controvertido [8, 13, 21-23]. Una de las teorías más aceptadas apoyan dos eventos de colonización: 1) un episodio antiguo (70 - 80 millones de años) a través de un arco asociado a una formación incipiente de las Antillas (Proto-Antillano) y 2) un episodio más reciente, durante el Cenozoico a través

de dos rutas; por un lado por las Antillas y/o a través del corredor continental correspondiente al Istmo de Panamá [14, 24, 25].

Con los datos moleculares se ha sugerido que la colonización de Mesoamérica por peces de agua dulce primarios (cuya dispersión está restringida a rutas de agua dulce, exclusivamente [22]) fue durante el Mioceno, en diferentes eventos entre 4 y 7 Ma [12, 13, 17, 23]. Sin embargo estas fechas son incongruentes con los registros geológicos, los cuales proponen una conexión entre Sur América y Centroamérica mucho más reciente, que es hasta que se tiene registro del cierre del Istmo de Panamá (3.3 millones de años). Eventos más antiguos de colonización hacia la parte norte del continente se han postulado para los peces de agua dulce secundarios (toleran la dispersión por agua salobres [22]), por ejemplo, principios y mediados del Mioceno (12.7 a 23 millones de años) para la colonización de la familia Synbranchidae [13], y entre 14-24 Ma, para cíclidos heroinides (Cichlidae) (10 Ma en los linajes Mesoamericanos) y entre 4-20 Ma para rivulidos (Rivulidae) [23].

La ausencia de géneros de peces primarios de Mesoamérica (por ejemplo, *Hypopomus*, *Pimelodella*, *Rhamdia* y *Roeboides*) en las Antillas, representa un argumento en contra de una colonización ancestral a través del arco Proto-Antillano. En su lugar, apoya una ruta de la colonización a través un puente incipiente formado durante la formación gradual del Istmo de Panamá [12, 17], en un lapso de tiempo de 3-20 Ma, aunado con los cambios en el nivel del mar que han sido reportados [26]. Esto es apoyado en estudios

Historia evolutiva del género *Astyanax* en Mesoamérica

moleculares de artrópodos [27], anfibios [28], y especies marinas presentes en ambos lados del Istmo de Panamá [29].

En contra parte en peces de agua dulce primarios ha sido apoyada una colonización más reciente de Mesoamérica a través del Estrecho de Panamá, con base en estudios filogeográficos de carácidos (por ejemplo, *Brycon*, *Bryconamericus*, *Eretmobrycon* y *Cyphocharax*). Estos estudios indican expansiones rápidas recurrentes de Sur América durante el Plioceno ~ 3,3 Ma [15].

En este sentido el género *Astyanax* proporciona un modelo ideal para investigar la importancia relativa de vicarianza y dispersión en los patrones biogeográficos. Esto es en parte porque está ampliamente distribuido en toda la región [30-29], y debido a que su dispersión se limita a las rutas de agua dulce y depende, por consiguiente, de la formación de conexiones terrestres.

Considerando que por lo general es asumido un origen Gondwánico (América del Sur) para Characiformes [31-33], apoyado por el registro fósil [34], podemos asumir que la presencia de la familia Characidae en América del Norte es consecuencia de la dispersión.

El género *Astyanax* comprende más de 107 especies reconocidas, y es, junto con el género *Hyphesobrycon* (105 especies), el género más diverso de los Characiformes [35, 36]. Por otra parte, *Astyanax* cuenta con la distribución más amplia de los carácidos americanos, ocupando desde el

Neártico (Río Colorado en Texas y Nuevo México) hasta el Neotrópico (Río Negro en la Patagonia) [35].

En estudios filogenéticos, así como filogeográficos previos [37, 38] de *Astyanax* utilizaron un pequeño número de muestras procedentes de México, Belice y Guatemala, y no se encontró una congruencia geográfica entre algunos grupos recuperados filogenéticamente (es decir, las poblaciones analizadas de Yucatán y Belice no fueron las más estrechamente relacionadas a pesar de su proximidad geográfica). Un patrón similar fue reportado para poblaciones troglobíticas, las cuales divergían fuertemente de las poblaciones de la superficie geográficamente más cercanas, formando dos linajes independientes [39]. El patrón antes mencionado se atribuyó a por lo menos dos colonizaciones independientes a Mesoamérica desde Sur América durante el Pleistoceno.

Previamente se estimó, con base en la aplicación de un reloj molecular estricto, aplicando una tasa de divergencia de 1.5% por millón de años [40] para el gen citocromo *b*, que la colonización de *Astyanax* hacia Mesoamérica ocurrió hace ~ 3.1 Ma (entre 1.8 y 4.5 millones de años), que coincide con el cierre del estrecho de Panamá (3.3 millones de años) [38]. Sin embargo, el muestreo incompleto (sólo se incluyeron algunas muestras de la parte superior de Centroamérica y México) podría dar lugar a algunas interpretaciones erróneas. Por lo que el presente estudio ofrece la oportunidad de llevar a cabo un análisis filogeográfico robusto con base en un muestreo más exhaustivo

incluyendo una mayor área, por lo tanto debería proporcionar nuevos conocimientos sobre la historia evolutiva del género.

Por otro lado el género *Astyanax* se caracteriza por presentar una elevada plasticidad fenotípica y por tanto presenta una elevada capacidad para adaptarse a diversos hábitats [37, 39, 41-43]. Así mismo, en otros grupos de peces se ha observado de forma similar a *Astyanax* una alta diferenciación morfológica asociada a la adaptación a nuevos hábitats, la cual en términos generales concuerda con la divergencia genética [44-46]. En el género *Astyanax* se ha prestado una especial atención a la evolución de los mecanismos de desarrollo y adaptación a entornos cavernícolas [37, 39, 41], pero menos atención se le ha dado a las adaptaciones ecológicas en otros hábitats, asociadas a la plasticidad morfológica. En este sentido, el género *Bramocharax*, el cual se encuentra co-distribuido con el género *Astyanax*, se caracteriza por una notable especialización trófica, incluidas las diferencias en el número de dientes premaxilares, la presencia de diastemas en los dientes superiores, así como las diferencias en la forma y el número de caninos presentes en: el premaxilar, la maxila y el dentario, observando en algunas especies (*B. caballeroi* y *B. baileyi*) estados intermedios con las especies simpátricas de *Astyanax* [47-49].

En este capítulo se utilizaron las secuencias de ADN mitocondrial y nuclear para desarrollar una hipótesis filogenética robusta para *Astyanax* y *Bramocharax*. Esto nos permite poner a prueba la hipótesis biogeográfica para la fauna de peces de Mesoamérica, incluyendo la importancia relativa de la geología histórica y los factores climáticos.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Colecta de Material

Un total de 210 ejemplares fueron analizados, incluyendo ejemplares de los géneros *Astyanax* y *Bramocharax* de 141 localidades desde Panamá a la frontera entre México y EE.UU. (Figura 1) [véase el Apéndice 1]. Los especímenes correspondieron a 10 especies de *Astyanax*: *A. aeneus*, *A. altior*, *A. armandoi*, *A. fasciatus*, *A. jordani*, *A. mexicanus*, *A. nasutus*, *A. nicaraguensis*, *A. orthodus* y *A. petenensis*, y tres especies del género *Bramocharax*: *B. caballeroi*, *B. dorioni* y *B. bransfordii*. Las muestras de *Astyanax bimaculatus* (de Argentina), *Astyanax fasciatus* (secuencia de GenBank de Brasil) y *Roebooides bouchellei* (de El Salvador) fueron utilizados como grupos externos en el presente estudio. Se recolectaron individuos de las localidades tipo de la mayoría de las especies (10 especies nominales) descritas para Mesoamérica, la mayoría de ellas consideradas como válidas por la última revisión nominal llevada a cabo por Lima *et al* (2003) [36]. Las muestras fueron colectadas con pesca eléctrica y redes de arrastre con diámetros mayores a 8 mm, los ejemplares colectados fueron etiquetados de forma individual y tejidos (trozos de músculo, aletas caudal o pélvicas) fueron conservados en DMSO / EDTA [50], o en etanol al 95%. Para la obtención posterior de ADN.

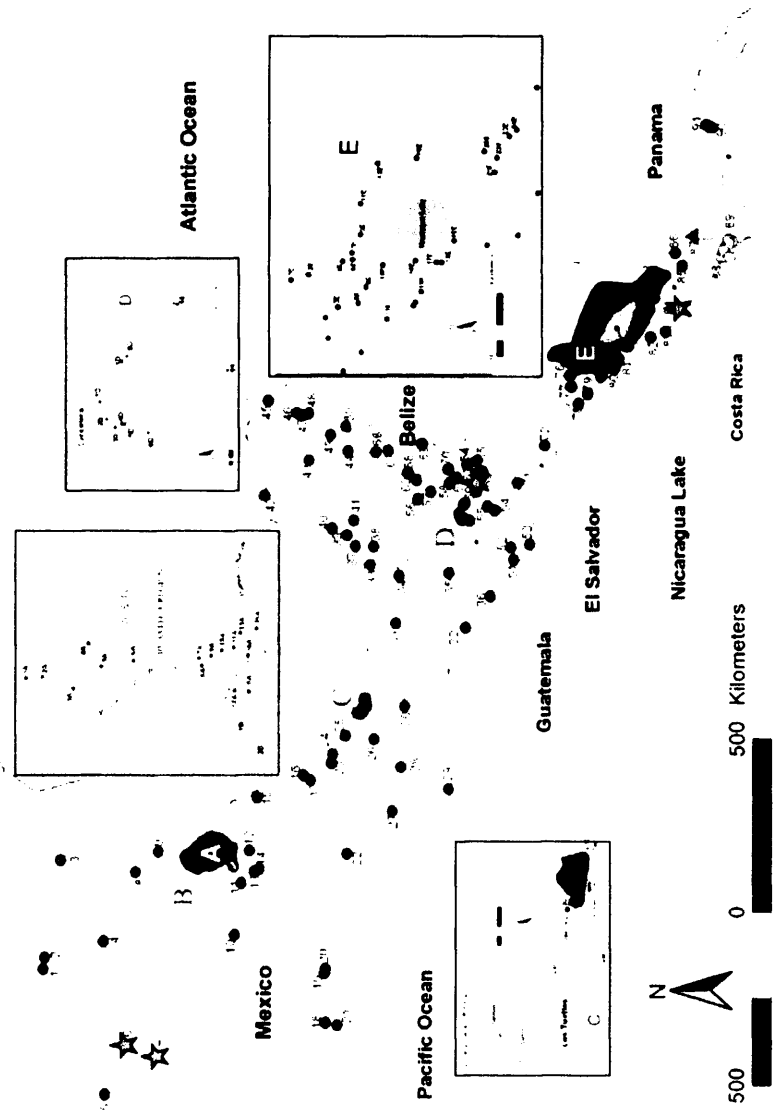


Figura 1. Mapa de las localidades muestreadas en Mesoamérica. Los seis grupos obtenidos en nuestra filogenia están representados por los diferentes colores. Las estrellas representan las localidades o cuencas donde fueron encontrados diferentes linajes en simpatria.

Los ejemplares completos fueron preservados posteriormente en formol al 10% y depositados en las colecciones ictiológicas del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, España (MNCN) y la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México (UMSNH) [véase Apéndice 1].

3.2.2 Extracción de ADN y secuenciación

El ADN genómico fue aislado utilizando el protocolo estándar de extracción de fenol/cloroformo [51] y fue almacenado a 4 °C. Se amplificaron los siguientes fragmentos: el gen completo Citocromo *b* (*Cytb*) con una longitud de 1140 pares de bases (pb) y 16S ARNr (552 pb) y la citocromo oxidasa I (*COI*) (655 pb). También se amplificó el tercer exón del gen activador de la recombinación 1 (*RAG1*) (1512 pb). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en 25µL, y cada reacción contuvo 0.4 µM de cada cebador, 0.2 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂ y 1.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Biotools). PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 94 ° C (2 min.), 35 ciclos de 94 ° C (45 sec.), región específica Tm ° C (1 min.), 72 ° C (90 sec.), y 72 ° C (5 min), para la mayoría de amplificaciones (ver Tabla 1), con la excepción del gen *RAG1* para los que seguimos las condiciones de PCR descritas en [52].

Tabla 1. Cebadores utilizados de los genes y fragmentos *RAG1*, *16S*, *COI*, and *Cytb*: (a) amplificación y (s) secuenciación.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Ref.
<i>RAG1</i>	<i>RAG1</i> (a, s) <i>RAG5</i> (s) <i>RAG9</i> (a, s)	AGCTGTAGTCAGTAYCAC AARATG TRGAGTCACACAGACTGC AGA GTGTAGAGCCAGTGRTGY TT	58*	1512	[53].
Citocromo oxidasa (<i>COI</i>)	<i>FISHF1</i> (a, s) <i>FISHR1</i> (a)	TCAACCAACCACAAAGAC ATTGGCAC TAGACTTCTGGGTGGCCA AAGAATCA	54	655	[54]
Citocromo <i>b</i> (<i>Cytb</i>)	<i>Glu- F</i> (a, s) <i>Thr- R</i> (a, s) <i>CbCHR</i> (a, s)	GAAGAACCACCGTTGTTA TTCAA ACCTCCRATCTYCGGATT ACA TTARTCCGGCTGGGWTN TTTG	48 48	1140	[55] Este estudio
<i>16S</i>	<i>16SAR</i> (a, s) <i>16SBR</i> (a)	CGCCTGTTTATCAAAAAC AT CCGGTCTGAACTCAGATC ACGT	46	552	[56].

* La PCR se llevó a cabo para los primeros 10 ciclos: de 58 °C a 53 °C (-0.5 °C cada ciclo), seguido por 25 ciclos a 53 °C.

Los productos de la PCR fueron verificados en geles de agarosa al 1% para confirmar la amplificación, posteriormente los productos se purificaron utilizando el kit EXOSAP-IT PCR Product Clean-Up (Usb) o precipitándolos con etanol. Ambos sentidos de los fragmentos amplificados fueron secuenciados (ver Tabla 1) en un secuenciador automático ABI 3700 DNA (SECUGEN servicio de secuenciación).

3.2.3 Análisis de los datos

Los cromatogramas y los alineamientos fueron verificados visualmente. La saturación de las sustituciones de transiciones y transversiones se comprobó graficando la cifra absoluta de los cambios por codones contra distancias corregidas para los genes codificantes. La reconstrucción filogenética se llevó a cabo utilizando la inferencia bayesiana (BI) en el

programa MrBayes ver. 3.1.2 [57]. Se utilizó Modeltest 3.7 [58] para calcular el mejor modelo de sustitución por fragmentos, en el caso del *Cytb* se calculó los diferentes modelos de sustitución por codones, mientras que para *RAG1*, *16S* y *COI* se calculó para los fragmentos completos, utilizando el Criterio de Información Bayesiano (BIC) [58] [Véase Apéndice 2]. El análisis de BI se realizó para dos conjuntos de datos de la siguiente manera: (1) Para el conjunto completo de datos con el gen *Cytb* con distintos modelos de ajuste por codones (2) utilizando los tres fragmentos mitocondriales (*Cytb*, *COI* y *16S*) y el *RAG1* con un modelo de sustitución para cada fragmento.

Los análisis BI se llevaron a cabo haciendo dos corridas independientes con cuatro cadenas de Metropolis para un total de 10 millones de generaciones, con la cual fue estimada la distribución de la probabilidad posterior. Los primeros 10.000 árboles fueron descartados (*burn-in*). El programa Tracer v1.4 [59] se utilizó para evaluar la convergencia de las dos corridas y para determinar el número de árboles para descartar (*burn-in*).

Las secuencias obtenidas también se analizaron por el método de máxima parsimonia (MP) en PAUP * 4.0 b10 [60], ver. NONA 2.0 [61] y WINCLADA ver. 1.00.08 [62]. El análisis de MP en PAUP y NONA / WINCLADA se llevó a cabo bajo la estrategia de búsqueda heurística. El apoyo estadístico para clados recuperados se evaluó mediante *bootstrap* (1000 pseudo-replicas). Se aplicaron diferentes pesos de transversiones y transiciones según el criterio empírico obtenido en PAUP * 4.0 b10 [60]. Los análisis se llevaron a cabo para los dos conjuntos de datos de manera similar que para el BI.

En el primer análisis fueron utilizadas las secuencias para el gen mitocondrial completo *Cytb* (estando representados la mayoría de las especies y poblaciones de los géneros *Astyanax* y *Bramocharax* de Mesoamérica), con el fin de inferir las relaciones filogenéticas entre el mayor número de poblaciones comprendidas en el área de estudio. Mientras que en el segundo análisis se utilizó una matriz de datos combinada con los cuatro fragmentos estudiados, *Cytb*, 16S, *COI* y *RAG1* (para los que sólo un subconjunto de las especies/poblaciones) con el fin de evaluar las relaciones entre los principales linajes identificados en el análisis previo.

3.2.4 Reloj molecular y tiempos de divergencia

Se utilizó la matriz del *Cytb* para calcular el reloj molecular ya que entre otras razones, contiene el mayor número de ejemplares analizados, así como es posible llevar a cabo comparaciones de estimas llevadas a cabo en estudios previos alternativa que no sería posible utilizando la matriz combinada en la que además se incluyen dos genes mitocondriales y un nuclear para los cuales no han sido reportadas tasas de divergencia.

La tasa de heterogeneidad en el conjunto de datos se evaluó mediante la prueba de la tasa de cambio de verosimilitud (*likelihood ratio test* –LRT-) [63, 64]. Las LRTs se estimaron comparando el logaritmo del valor de verosimilitud para cada topología usando para calcularlas el criterio de máxima verosimilitud (*maximum likelihood* –ML-) (los modelos de sustitución fueron obtenidos con

Modeltest), mientras se forzó un reloj molecular del logaritmo del valor de verosimilitud de la topología recuperada, así mismo se calculó el mismo valores de verosimilitud pero esta vez sin forzar el reloj molecular. El estadístico de la prueba de la tasa de cambio de verosimilitud es el doble de la diferencia entre los dos logaritmos de verosimilitud. Este dato se compara con una distribución χ^2 [65].

Debido a que la hipótesis de un reloj molecular fue rechazada, se llevó a cabo una aproximación no paramétrica de la tasa de divergencia (*non-parametric rate smoothing approach* –NPRS-) para estimar los tiempos de divergencia utilizando el r8s [64] para calcular la divergencia entre los taxones. La NPRS relaja el supuesto del reloj molecular mediante la aplicación de los mínimos cuadrados suavizados de las estimas de las tasas de sustitución.

Se calcularon los errores estándar para las estimas de divergencia utilizando el procedimiento descrito previamente, y ejecutado por los scripts de Perl en el r8s toolkit proporcionado por Torsten Eriksson [66]. Los primeros 100 conjuntos de datos generados al azar fueron creados a partir de la matriz original del conjunto de datos del *Cytb* con el programa de Mesquite v. 2.01 [67]. Las longitudes de las ramas fueron recalculadas para cada conjunto de datos programados previamente en PAUP utilizando los parámetros originales de ML. Los árboles resultantes, con las longitudes de ramas se importaron es el r8s. Se implementó el algoritmo TN (Newton Truncado).

Historia evolutiva del género *Astyanax* en Mesoamérica

Hemos constreñido el reloj molecular considerando dos puntos de la topología (ver figura 6). En primer lugar, el grupo interno (el nodo 1, Figura 6) se calibró con el aislamiento de la cuenca de Maracaibo, como resultado de la formación de la Sierra de Perijá y los Andes de Mérida entre 8-12 Ma [7, 68, 69]. Además, en este nodo también se utilizó el registro fósil más antiguo de un carácido (*Colossoma macropomum*, 15 millones de años) que se tiene precedente para el sistema del río Magdalena [70]. Esto nos permitió determinar los valores mínimos y máximos para este nodo 1 (siendo el límite inferior 8 y 15 Ma como el superior). La segunda constricción correspondió al cierre definitivo del eje neovolcánico transversal mexicano (ENTM) siendo entre 3-6 Ma (nodo 6 en la Figura 6) [71, 72].

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Reconstrucción filogenética

Se secuenciaron tres genes mitocondriales (*Cytb*, *COI* y *16S*), y un gen nuclear (*RAG1*), dando un total de 3.862 caracteres (2.350 mitocondriales y 1512 nucleares) [ver el Apéndice 1].

El gen *RAG1* fue el más conservador de los genes analizados (Tabla 2) [ver el Apéndice 2]. Entre los genes del ADN mitocondrial, el *Cytb* fue el más variable, aunque el *COI* también mostró altos niveles de variabilidad mientras el *16S* fue el menos variable. Considerando en conjunto la información mitocondrial y nuclear, 931 sitios fueron variables, con 448 (~ 11%) siendo parsimoniosamente informativos.

Tabla 2. Caracterización molecular de los grupos de datos para cada gen.

Gen	Tamaño (pb)	SV	PI	% PI	CI	RI
<i>Cytb</i>	1140	505	298	26.14	0.58	0.85
<i>COI</i>	655	137	93	14.19	0.46	0.64
<i>16S</i>	555	74	19	3.42	0.52	0.61
<i>RAG1</i>	1512	215	38	2.51	0.56	0.07
Todos	3862	931	448	11.09	0.73	0.61

Pb = pares de bases, *SV*= Sitios variables, *PI*= caracteres parsimoniosamente informativos, *CI*= índice de consistencia, *RI*= índice de retención.

Las topologías recuperadas por los métodos de máxima parsimonia (MP) y de inferencia bayesiana (BI) para los datos del *Cytb* (Figura 2) y el conjunto de datos combinados fueron similares. Además, los resultados de ambos fueron concordantes y las discrepancias se limitaron a las topologías de los árboles en los Clados III y IV del Grupo I (la población de Máquinas se

agrupó con la de Montebello en la topología del *Cytb* pero con Polochic-Grijalva-Usumacinta, en el conjunto de datos combinados).

La matriz de datos combinados fue útil para resolver los nodos basales, generalmente influyendo en la obtención de valores más altos de soporte y proporcionando una mayor resolución filogenética. Por esta razón, la descripción de los grupos de más alto nivel se basa en la topología obtenida con el conjunto de datos combinados. Todos los análisis apoyan la polifilia de *Bramocharax*, dado que las especies de *Bramocharax* eran hermanas de diferentes clados de *Astyanax* (Figura 2), haciendo *Astyanax* parafilético.

Se identificaron seis grandes grupos filogenéticos con altos valores de soporte y probabilidades posteriores significativas (Figuras 2 y 5). Las divergencias entre los grupos se dan en la Tabla 3 [ver Apéndice 3]. Grupos V y VI corresponden a la región de Chagres (Panamá) y a las cuencas Lagarto-Puntarenas de Costa Rica en la parte sur de Centroamérica (Centroamérica baja), respectivamente. Los Grupos II a IV constituyen la parte media de Centroamérica (Centroamérica central) y el Grupo I corresponde con la región norte de Centroamérica (Centroamérica alta) y México. Estos grupos no se solapan geográficamente a excepción del I con el II y el II con el III [ver el Apéndice 4, con un esquema de los clados filogenéticos]. Sus relaciones no se resuelven con el *Cytb* o el conjunto de datos combinados (3.8 Kbp).

Tabla 3. Distancias genéticas en porcentajes entre los siete grupos obtenidos en la filogenia (por debajo de la diagonal las distancias no corregidas p ; por encima de la diagonal las distancias corregidas por el modelo de sustitución $K81uf$).

	Entre grupos						Dentro	
	1	2	3	4	5	6	p	$K81uf$
Grupo I	-	5.74	5.68	4.77	6.44	6.37	2.84	3.25
Grupo II	4.65	-	5.4	4.73	6.1	5.89	2.51	2.86
Grupo III	4.64	4.4	-	4.58	6.79	5.58	0.79	0.82
Grupo IV	4.05	4.03	3.91	-	5.45	5.27	0	0
Grupo V	5.19	4.91	5.41	4.51	-	7.05	0.23	0.23
Grupo VI	5.08	4.77	4.57	4.41	5.6	-	0	0

3.3.2 Estructura geográfica dentro de las agrupaciones filogenéticas mayores

GRUPO I (México y Centroamérica alta)

Cuatro Clados fueron recuperados dentro del Grupo I (Figura 2 y 3). El Clado I incluía a la mayoría de las poblaciones de México y Alta América Central (Guatemala y Belice). Los Clados II-IV incluyeron menos poblaciones con una distribución fragmentada sobre la distribución del Clado I.

Dentro del Clado I se identifica una estructura geográfica correspondiente a los siguientes cuatro linajes: El Linaje **Id**, de la región de Chiapas, México, fue el linaje hermano del Linaje **Ie** de la región de Candelaria y de un par de linajes (**Ia** y **Ib**) que ocupan una región amplia desde la Península de Yucatán a la cuenca del Bravo-Conchos.

El Linaje **Ia** incluyó a individuos de *A. mexicanus* y la especie troglobítica *A. jordani*, ambas del norte de México. Este linaje se dividió en dos sublinajes. El primero de ellos incluyó muestras de la cuenca Bravo-Conchos, en la parte más al norte de la distribución de *Astyanax*, y las cuencas del

Mezquital y Nazas - Aguanaval. El segundo sublinaje agrupó a las poblaciones de las cuencas de Pánuco, Tuxpan, Nautla y San Fernando-Soto La Marina, incluyendo la mayoría de las poblaciones troglobíticas de la región de la Huasteca (véase la región A en la Figura 1). Por lo tanto, este último sublinaje incluye a *A. mexicanus* y la especie nominal cavernícola, *A. jordani*.

El Linaje **Ib** contiene a *Astyanax* y *Bramocharax* del sur del ENTM y Belice. Se divide a su vez en cuatro sublinajes. Se extiende desde la Laguna de la Media Luna (cuenca del Pánuco, México) a la cuenca de Mopán (Belice) en la vertiente atlántica, y de la cuenca Armería - Coahuayana a la cuenca del Balsas (ambos en México) en la vertiente del Pacífico.

Este grupo es un buen ejemplo de la plasticidad morfológica exhibida en bajos niveles de diferenciación genética [véase el Apéndice 3]. El primer sublinaje incluyó a *Astyanax fasciatus* proveniente de las cuencas contempladas entre Puente Nacional y Grijalva - Usumacinta (incluyendo las de Papaloapan y Coatzacoalcos) en la vertiente atlántica, y las poblaciones de las localidades tipo de *A. armandoi* y *A. altior* (Palenque, en la cuenca Grijalva - del Usumacinta y el Cenote de Noc-Ac en la Península de Yucatán, respectivamente). Ambos son sinónimos de *A. fasciatus* [36, 73]. También se encontraron haplotipos compartidos o de baja divergencia [Ver Apéndice 3] entre los taxa simpátricos *Bramocharax caballeroi* y *A. fasciatus* en el lago de Catemaco (ver región C, Los Tuxtlas, en la Figura 3). Además, estas distancias fueron menores a las observadas entre algunas poblaciones de *Astyanax*.

Historia evolutiva del género *Astyanax* en Mesoamérica

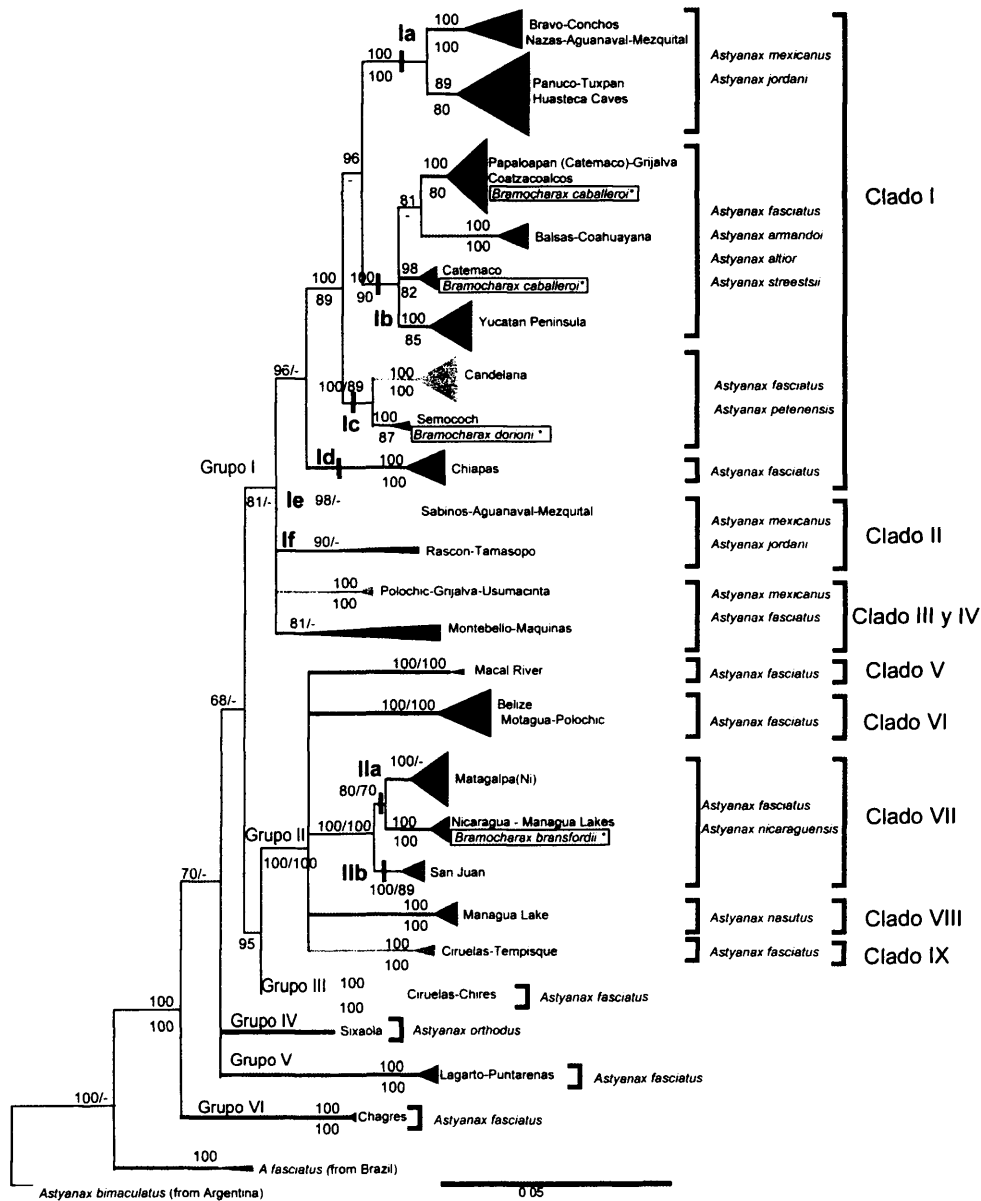


Figura 2. Árbol bayesiano y de Máxima Parsimonia para *Astyanax* y *Bramocharax* (éste indicado por cuadros). También se muestran las especies que se consideran válidas de acuerdo a Lima *et al.* [36]. Los asteriscos dobles indican probabilidades posteriores (BI) ≥ 0.95 o valores de *bootstrap* (MP) ≥ 90 ; un asterisco identifica valores entre 0.89 y 0.80 o 89 y 80. La definición de los Clados se basó en el árbol del conjunto de datos combinado (ver figura 5).

Historia evolutiva del género *Astyanax* en Mesoamérica

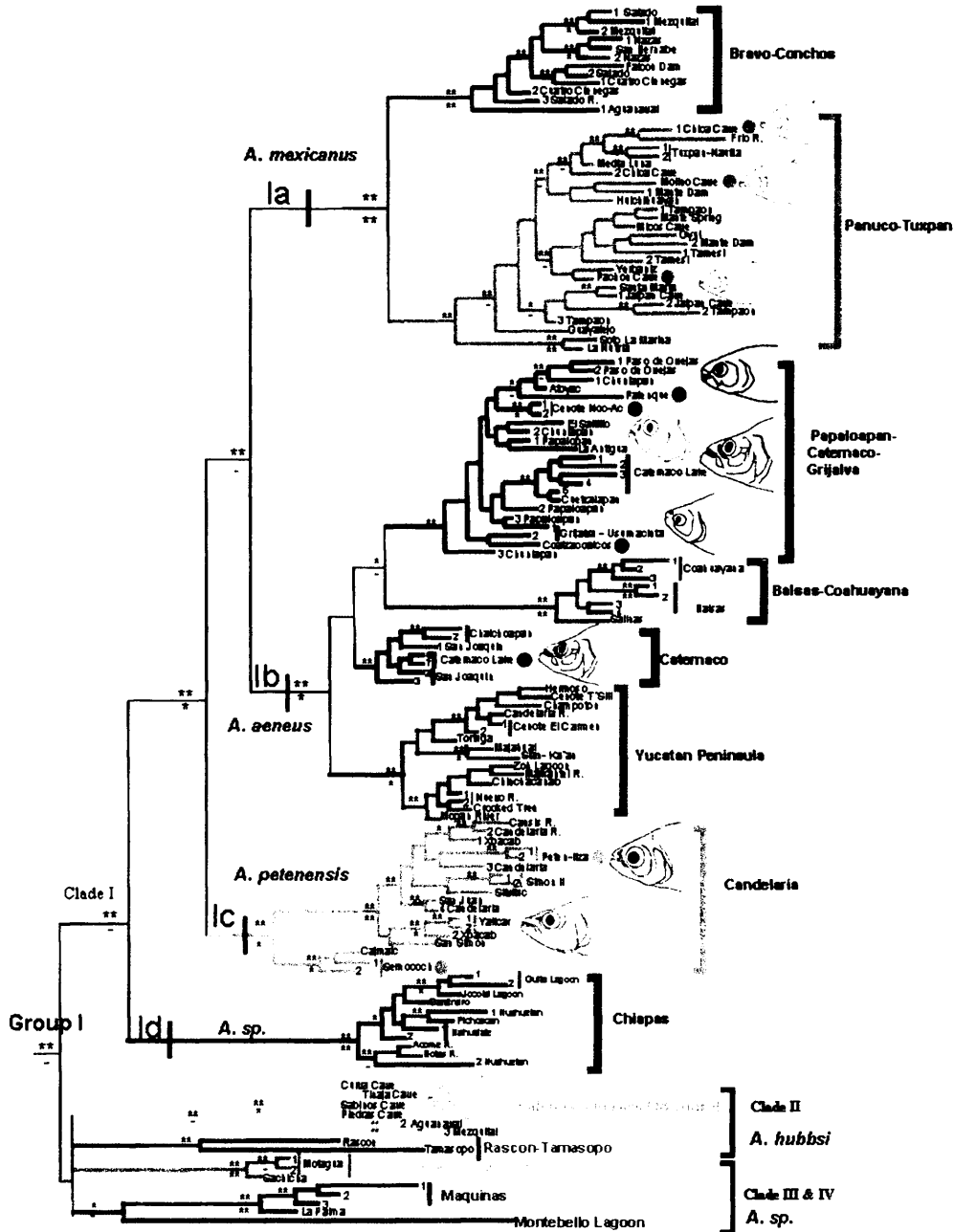


Figura 3. Árbol parcial para el Grupo I de Inferencia Bayesiana y Máxima Parsimonia para *Astyanax* y *Bramocharax* basado en el gen *Cytb*. Los asteriscos dobles indican probabilidades posteriores (BI) ≥ 0.95 o valores de *bootstrap* (MP) ≥ 90 ; un asterisco identifica valores entre 0.89 y 0.80 o 89 y 80. Los círculos representan localidades tipo. La definición de los clados se basó en el árbol del conjunto de datos combinados.

Historia evolutiva del género *Astyanax* en Mesoamérica

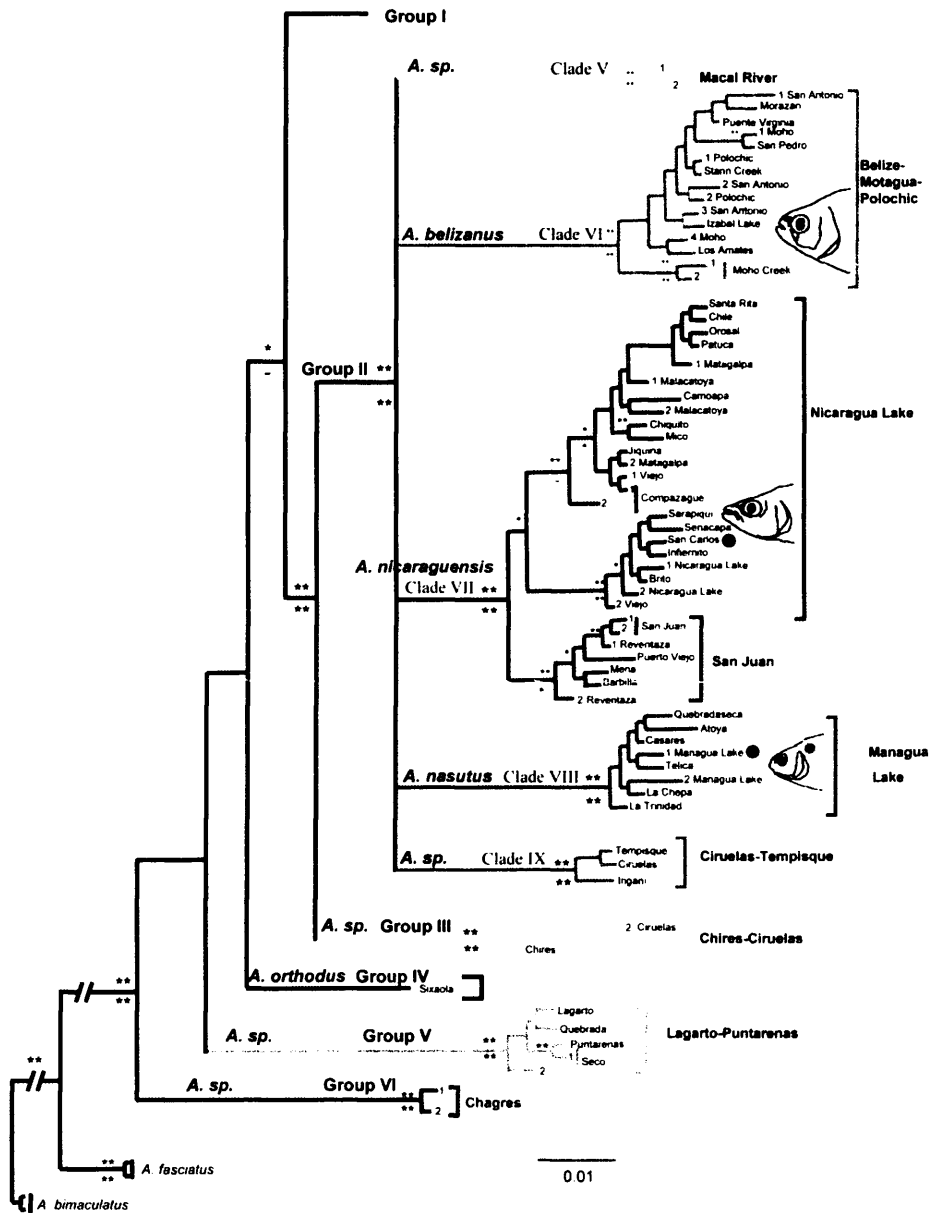


Figura 4. Árbol parcial para los Grupos II-IV de Inferencia Bayesiana y Máxima Parsimonia para *Astyanax* y *Bramocharax* basado en el gen *Cytb*. Los asteriscos dobles indican probabilidades posteriores (BI) ≥ 0.95 o valores de *bootstrap* (MP) ≥ 90 ; un asterisco identifica valores entre 0.89 y 0.80 o 89 y 80. Los círculos representan localidades tipo. La definición de los clados se basó en el árbol del conjunto de datos combinados (ver figura 5).

Historia evolutiva del género *Astyanax* en Mesoamérica

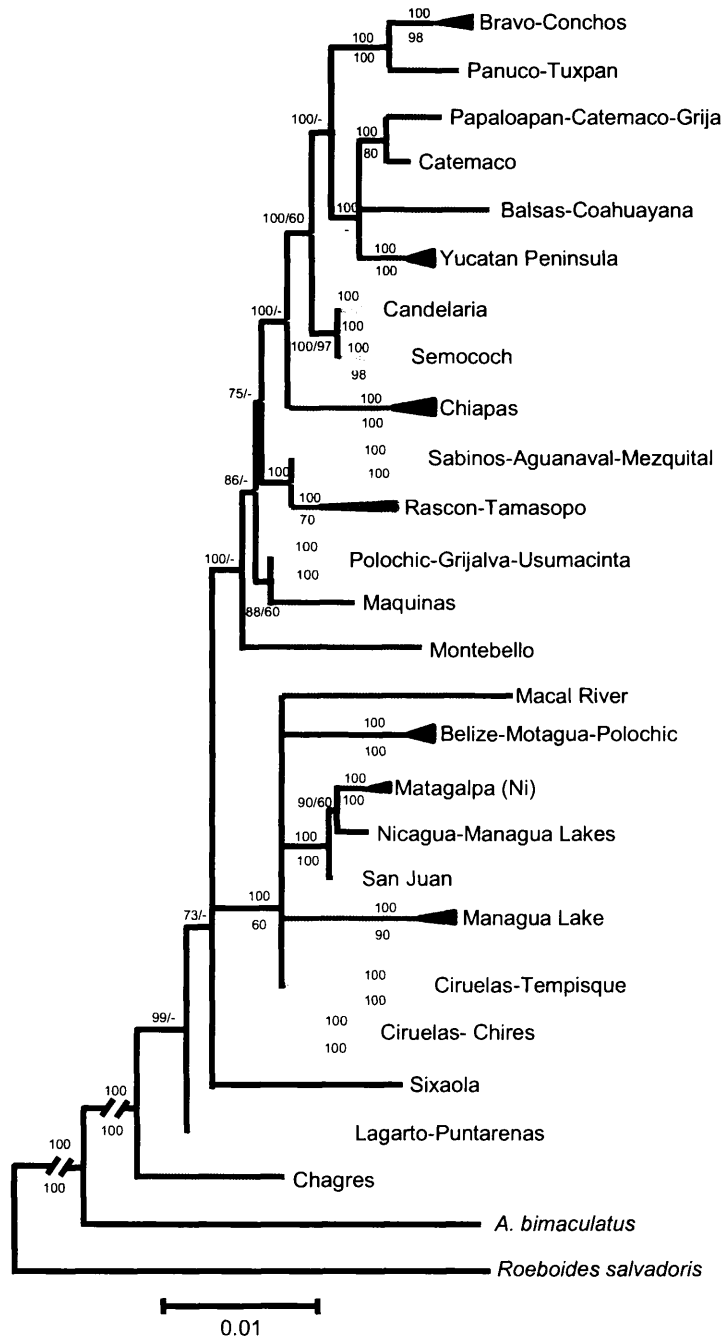


Figura 5. Árbol filogenético resumido para *Astyanax* y *Brachycharax* estimado con Inferencia Bayesiana y Máxima Parsimonia usando el subconjunto de datos (*Cytb*+*COI*+16S y *RAG1*). Se muestran las probabilidades posteriores y valores de *bootstrap*.

El segundo sublinaje (Catemaco) fue un clado limitado a la región de los Tuxtlas (lagos Chalchoapan y Catemaco, en la Figura 1), y a morfotipos compuestos por *A. fasciatus* y *B. caballeroi*, con diferencias genéticas muy bajas e incluso con haplotipos compartidos (Figuras 2 y 5) [ver Apéndice 3]. El tercer sublinaje incluyó a *A. fasciatus*, sobre todo de poblaciones provenientes de la vertiente del Pacífico (de la cuenca de Coahuayana a la de Balsas), y una sola población de *A. mexicanus* de la cuenca de Laguna de Media Luna, en la vertiente Atlántica (Figura 1). El sublinaje cuarto ("Península de Yucatán", Figura 2) incluye a *A. fasciatus* de los cenotes de Yucatán (México), Belice y las cuencas Nuevo (Belice) y las cuencas Mopán y Candelaria (Guatemala).

El **Linaje Ic**, (región D, Figura 1) incluyó poblaciones de la vertiente atlántica: *Astyanax fasciatus* de la localidad tipo de *A. petenensis* (Lago Petén – Itzá, Península de Yucatán, considerado un sinónimo de *A. mexicanus sensu* Lima *et al.* [36]) y *A. fasciatus* de la región cárstica de Candelaria en Guatemala. Este linaje incluyó a *Bramocharax dorioni* de la localidad tipo (río Semococh). Al igual que en otros casos de simpatria entre *Bramocharax* y *Astyanax*, estos dos morfotipos mostraron niveles bajos de diferenciación genética (menos 0.5%) [ver Apéndice 3].

El **Linaje Id** (Chiapas) agrupó a las poblaciones de la vertiente Pacífico de *A. fasciatus* (Figura 1) desde la cuenca de Pichoacán (Oaxaca, México) a la Laguna El Jococal (El Salvador), incluyendo la costa de Guatemala, con divergencias genéticas muy baja dentro del clado.

El **Clado II** consistió de dos linajes (**le** e **If**; divergencia media $D_{K81ur} = 2,13\% \pm 1,21$). El linaje **le** (referido como "Sabinos-Aguanaval-Mezquital") agrupó a morfotipos troglobíticos (*A. jordani*) de las cuevas de Las Piedras, Tinaja, La Curva, y Sabinos (localidad tipo de *A. hubbsi*, sinónimo de *A. jordani sensu* Lima *et al.* [36]) con las poblaciones habitantes en la superficie de *A. mexicanus* provenientes de las cuencas Mezquital y Nazas - Aguanaval, con un bajo nivel de diferenciación entre las poblaciones de superficie y cuevas (valor medio $D_{K81ur} = 1,4 \pm 0,9\%$).

El **Linaje If** incluyó las poblaciones de *A. mexicanus* del valle de Rascón y Tamasopo en la cuenca del Pánuco. Este linaje mostró divergencias muy altas en relación al resto de los linajes de este grupo, y a las poblaciones más cercanas geográficamente [ver el Apéndice 3].

El **Clado III** agrupó las poblaciones de la vertiente Atlántica de *A. fasciatus* de las cuencas de La Palma y Máquinas (véase la región de Los Tuxtlas, en la Figura 1) con los de la cuenca alta del río Polochic (río Cahabón) y la cuenca del Grijalva-Usumacinta.

El **Clado IV** incluyó las poblaciones de las Lagunas de Montebello ("Montebello"), en el sureste de México. Este grupo se agrupó con las poblaciones de Máquinas y La Palma en el análisis separado de *Cytb*, pero esta agrupación no fue confirmada por el análisis combinado de información nuclear y mitocondrial (Figuras 3 y 5).

GRUPO II (Centroamérica Central)

El análisis filogenético no pudo resolver las relaciones entre los cinco Clados principales recuperados en el Grupo II (figuras 2 y 4). Este grupo se distribuye ampliamente en centro América Media, desde Belice hasta Costa Rica (región E, Figura 1).

El **Clado V** incluyó *A. fasciatus* de la cuenca del Macal (Belice). Éste Clado mostró divergencias muy altas con respecto a los otros Clados del Grupo II ($D_{K81uf} = 3,6\% \pm 1,39$).

El **Clado VI** ("Belice-Polochic-Motagua") incluye poblaciones de la vertiente atlántica de *A. fasciatus*, de la cuenca del Moho (Belice), y de Guatemala, aguas abajo de la cuenca del Polochic hasta la cuenca Puente Virginia (Figura 4).

El **Clado VII** comprende dos linajes (**Ila** y **Ilb**). El Lineage **Ila** incluyó a *Astyanax nicaraguensis* y *Bramocharax bransfordii*. Al igual que en otros clados que contienen ambos morfotipos, hubo un bajo nivel de diferenciación genética entre ellos ($D_{K81uf} = 0,9\% \pm 0,61$). Este linaje se distribuye desde la cuenca de Jigüina hasta la cuenca del Sarapiquí (Nicaragua) en la vertiente del Atlántico, e incluyó poblaciones de los grandes lagos de Nicaragua (Managua y Nicaragua, la región E, figuras 1 y 4) y las cuencas Senacapa y Brito (Nicaragua) en la vertiente del Pacífico. El Linaje **Ilb** agrupó a *A. fasciatus* del Lago Nicaragua y la cuenca de San Juan (Nicaragua), así como las cuencas Barbilla y Reventaza de la vertiente atlántica de Costa Rica.

El **Clado VIII** incluyó a *A. fasciatus* de los afluentes del Pacífico de Nicaragua y *A. nasutus* de la Cuenca del Lago Managua (figura 4).

El **Clado IX** incluyó a *A. fasciatus* de un área muy restringida que comprende las cuencas de Ciruelas y del Tempisque en la vertiente del Pacífico de Costa Rica ("Ciruelas-Tempisque", Figura 4).

Centroamérica baja

En la región de Centroamérica Baja se observaron cuatro grandes grupos (grupos III-VI) que se caracterizan por intervalos de distribución más restringidos en relación a los grupos I y II. El **Grupo III** comprende las poblaciones de *A. fasciatus* de las cuencas Ciruelas y Chires en la vertiente del Pacífico de Costa Rica (figuras 1 y 2). Dos haplotipos muy divergentes ($D_{K81uf} = 2,5\%$) (que corresponden a los Grupos II y III) se encontraron en simpatria en la cuenca Ciruelas (figuras 1 y 2).

El **Grupo IV** incluyó una población única y bien diferenciada de *A. orthodus* de la cuenca del Sixaola en la vertiente atlántica de Costa Rica. El **Grupo V** incluyó a las poblaciones de *A. fasciatus* del Pacífico, desde la cuenca de Puntarenas (Costa Rica) hasta la cuenca del Lagarto, en la frontera Panamá-Costa Rica. El **Grupo VI** incluyó a *A. fasciatus* de la región de Chagres, en la vertiente atlántica de Panamá.

3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

3.4.1 Sistemática de los géneros *Astyanax* y *Bramocharax*

Nuestro análisis no soporta la monofilia de *Bramocharax*, que ha sido propuesto anteriormente con base en análisis morfológicos [47-49]. Por otra parte, muestras de *Bramocharax* estuvieron presentes en dos de los siete clados principales de *Astyanax*, con bajos niveles de diferenciación genética cuando ambos morfotipos fueron encontrados en simpatria (por ejemplo, en el lago de Catemaco, donde se encontraron haplotipos compartidos entre los individuos de ambos géneros). La diferenciación era reducida igualmente a partes iguales entre las poblaciones alopátricas de *Bramocharax* y *Astyanax*.

El género *Astyanax* ha sido considerado como monofilético para Mesoamérica [38], pero polifilético en América del Sur, sobre la base de los análisis moleculares [31]. Nuestros resultados apoyan la monofilia de *Astyanax* en Mesoamérica sólo si se tiene en cuenta a las especies de *Bramocharax* como morfotipos de *Astyanax* y dentro del intervalo de su plasticidad fenotípica. Esta hipótesis es apoyada por la baja divergencia genética entre las muestras de *Bramocharax* y *Astyanax*, y la evidencia de la evolución recurrente del morfotipo *Bramocharax* dentro de *Astyanax* (Figura 1). Este morfotipo se asocia con especializaciones tróficas en hábitats lacustres, lo que sugiere que es el resultado de convergencias morfológicas a condiciones ecológicas similares; patrones similares se han demostrado en otros peces de agua dulce [38, 39, 43, 47, 74]. Si la hipótesis de "convergencias recurrentes" se considera correcta, entonces la taxonomía de *Bramocharax* necesita ser

revisada y los mecanismos evolutivos que dan lugar a estas homoplasias morfológicas necesitan de una investigación posterior. Nuestros análisis cuestionan la utilidad de los caracteres tróficos para la taxonomía (por ejemplo, la forma de los dientes o la modificación de la mandíbula), como ya se ha observado por Rosen [49] al respecto de los estados morfológicos intermedios entre *Astyanax fasciatus* y *Bramocharax bailey*.

Otras incidencias de convergencias morfológicas se encontraron en morfotipos troglobíticos de *Astyanax jordani* (que ha sido señalado por autores anteriores [38, 39, 75]), proporcionando evidencia adicional de adaptaciones independientes a los hábitats troglobíticos (en por lo menos dos momentos diferentes, Figura 6).

La presencia de convergencias morfológicas recurrentes en *Astyanax* [75, 76] hace que la delimitación de las especies y géneros sea difícil. Así, la falta de congruencia entre las relaciones filogenéticas descubiertas en este estudio y las anteriores clasificaciones taxonómicas de *Astyanax* y *Bramocharax* de Mesoamérica no es sorprendente [36, 38, 77]. Además, nuestros resultados no son coherentes con la idea de que *Astyanax* (incluyendo las muestras de México y Alto Centroamérica) es una especie única (es decir, *A. fasciatus*), como se ha propuesto anteriormente [38].

Aunque no se consideró como un objetivo principal de este estudio, sí se propone una nomenclatura taxonómica provisional de las poblaciones de *Astyanax* de Mesoamérica [ver Apéndice 1]. La nomenclatura propuesta se

basa en grupos monofiléticos bien definidos, altas divergencias genéticas con *Cytb* (más de 2% K81uf), y en congruencia con la distribución geográfica. Para asignar los nombres de las especies se han priorizado las descripciones de especies anteriores y el diagnóstico con los rasgos morfológicos. En los casos en que los linajes monofiléticos no pudieron ser asignados a una especie válida, se asignaron a su propio grupo monofilético como *Astyanax sp.*

3.4.2 Reloj molecular y tiempos de divergencia

Los análisis realizados por el método de verosimilitud penalizada en r8s a partir de secuencias de *Cytb* se calibraron usando los siguientes eventos: 1) el levantamiento Mérida - Perijá, alrededor de 8 -12 Ma, 2) la presencia de fósiles de *Colossoma macropomum* en la cuenca de Magdalena (de por lo menos 15 millones de años) y 3) la formación del ENTM alrededor de 3-6 Ma (Figura 6) [71]. El análisis mostró una tasa promedio de divergencia del 0.8% por millón de años con el modelo de evolución *K81uf* (Figura 6). Si bien esto es similar a las tasas de divergencia reportadas para otros peces [Cichlidae (0.7%) [23], Cobitidae (0.68%) [78] (Tabla 4) y ligeramente inferior a la de los peces ciprínidos (1.05%) [39], es mucho menor que tasas anteriores de reloj molecular (usando fragmentos del mismo gen) propuestos para *Astyanax* (divergencias de 1.5% K2P) [38]. De forma parcial, esta diferencia en la tasa de divergencia estimada es la causa de la discrepancia entre nuestro estudio y las anteriores interpretaciones biogeográficas e históricas de *Astyanax* (Tabla 5) [38].

Tabla 4. Resumen de las fechas estimadas de los principales eventos geológicos en Mesoamérica basados en relojes moleculares aplicados en peces de agua dulce tanto primarios como secundarios.

Géneros	Genes	Calibración %/Ma	Evento geológico	Fecha estimada del evento
<i>Roeboides</i> , <i>Hypopomus</i> y <i>Pimelodella</i> * [8]	ATP6&8	1.3% K2P		4-7 Ma Mioceno/Plioceno
<i>Astyanax</i> * [38]	Cytb	1.5% K2P		3 Ma Plioceno
<i>Rhamdia</i> * [12]	Cytb + ATP6&8	1.3% K2P 1.5% (Cytb) HKY85		2.5-2.9 Ma Clado <i>guatemalensis</i> 6.5-5.6 Ma Clado <i>laticauda</i> Mioceno/Plioceno
<i>Brycon</i> , <i>Bryconamericus</i> , <i>Eretmobycon</i> y <i>Cyphocharax</i> * [15]	ATP6&8	3.6% Ks	Colonización de Mesoamérica desde América del Sur	< 3.1 Ma Plioceno/Pleistoceno
<i>Synbranchus</i> y <i>Ophisternon</i> ** [13]	Cytb + ATP6&8	1.3% (ATP6&8) K2P 1.5% (Cytb) TrN+G		12.7 - 23 Ma Mioceno
<i>Cichlidae</i> ** [23]	Cytb	0.7% p		10 Ma Mioceno
<i>Rivulus</i> ** [79], recalculado [23]	Cytb	1% p		18-20 Ma Mioceno
Poeciliidae [80]	ADNmt y genes nucleares	Mateos (2002) calibration		Antes del cierre del Istmo de Panamá Cretaceo/Mioceno
<i>Poeciliopsis</i> ** [11]	Cytb	1-2% K2P	ENTM	8-16 Ma a 2.8-6.4 Ma Mio-Pliocene

*Peces primarios, ** peces secundarios. p = Distancias no corregidas.

Tabla 5. Fechas estimadas con el análisis de r8s así como las desviaciones estándar de dichas estimas para los nodos. En negrita se encuentran las edades que fueron utilizadas en el análisis para constreñir las estimas. *p* = distancias no corregidas, ML = distancias *K81uf*. Valores mínimos y máximos se dan entre paréntesis. Los asteriscos señalan los valores significativos $p \leq 0.05$.

Nodo	Punto de Calibración	Edades estimadas		
		Reloj Molecular estricto 0.8%/Ma	Reloj Molecular Relajado NPPRS con r8s Ma 95% de intervalo de confianza	Reloj Molecular Relajado 1.05%/Ma
1	Formación de la Sierra de Merida-Perijá 8-12 Ma Registro fósil de un carácido en el río Magdalena <i>Colossoma macropomum</i> 15 Ma	24.6 ML (18.-23)	32.3 ML (23.7-42.8)	15
		11 <i>p</i> (9.8 – 12.4)	14.6 <i>p</i> (12.8-16.3)	
2	Colonización de Mesoamérica	7.7 ML (6.36-9.32) 5.5 <i>p</i> (4.9-6.4)	10.05 ML (8.35-12.23) 7.3 <i>p</i> (6.4-8.5)	7.9 SD 0.165 (7.8-8.1)
3	Falla de Motagua-Polochic	4.6 ML (2.9-7.9) 3.7 <i>p</i> (2.5-5.7)	6 ML (3.8-10) 4.9 <i>p</i> (3.3-7.5)	7.1* SD 0.34 (6.0-7.8)
4	Radiación en los linajes del norte de Mesoamérica	3.8 ML (2.6-2) 3.1 <i>p</i> (1.9-4.8)	4.83 ML (2.7-8.2) 4.1 <i>p</i> (2.5-6.3)	6.7* SD 0.37 (5.7-7.5)
5	Radiación Centroamericana	3.7 ML (2.6-2) 3.1 <i>p</i> (1.9-4.8)	5 ML (0.2-7.42) 4.2 <i>p</i> (0.2-5.5)	6.9* SD 0.39 (5.9-7.7)
6	ENTM 3-6 Ma	3.6 ML (2.3-5.4) 3.07 <i>p</i> (2.2-4.3)	4.7 ML (3.1-7) 4.03 <i>p</i> (2.8-5.7)	5.25* SD 0.37 (4.4-6.2)

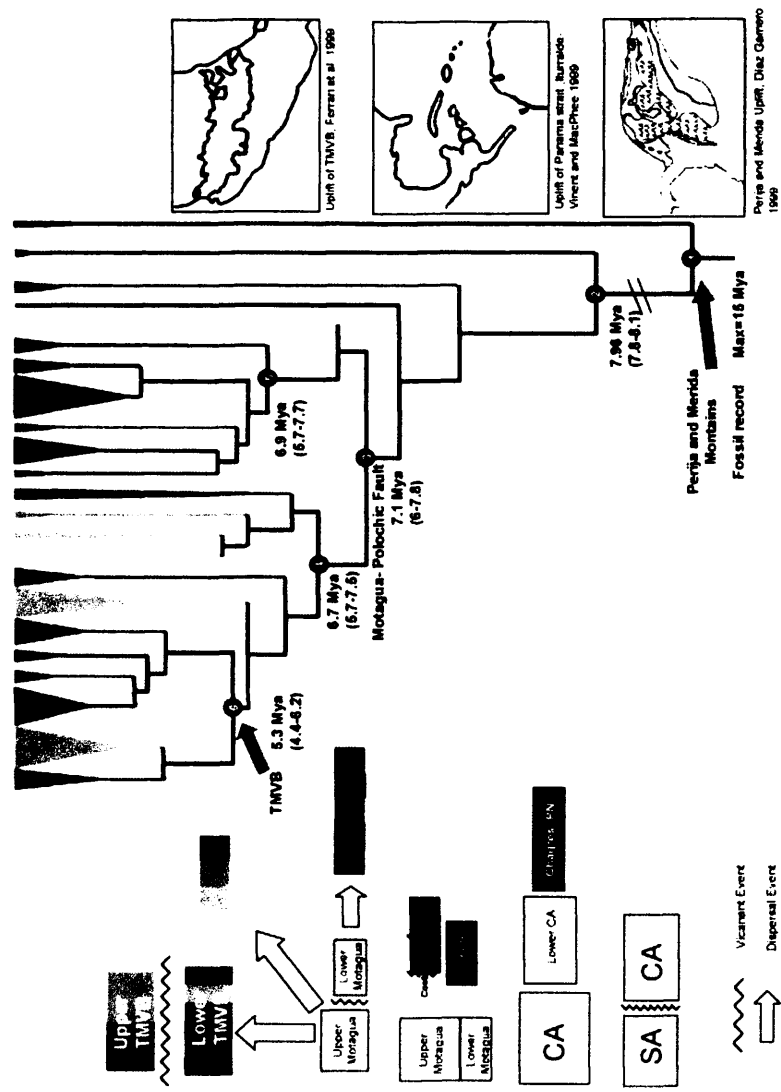


Figura 6. Árbol ultramétrico obtenido con el gen mitocondrial *Cytb* por el método de NPRS no-paramétrico. Los puntos de calibración son indicados por las flechas, el nodo 1 se corresponde con el levantamiento de la Sierra de Perijá y las montañas de Mérida Díaz de Gamaro [68]. Así mismo para el nodo 1 se utilizó el registro fósil (*Colossoma macropomum*, 15 Ma) [70]. El nodo 6 fue construido a la formación del Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (ENTM=TMVB) Ferreri et al. [71]. Los eventos vicariantes principales se muestran en el diagrama así como los eventos de dispersión.

3.4.3 Implicaciones biogeográficas

En este estudio se ha encontrado un patrón filogeográfico de estructuración norte a sur. Los grupos filogenéticos principales en su mayoría no se solaparon, con la excepción de los grupos I y II, que se superponían en la parte superior de la cuenca del Polochic, y los grupos II y III, que se superponían en la cuenca Ciruelas de Costa Rica. Este patrón norte-sur es similar a lo reportado para otros peces de agua dulce [12, 13, 23]. La observación de los linajes en simpatria de *Astyanax* se puede explicar en términos de solapamiento de nicho y recambio de linajes, similar al propuesto en los modelos biogeográficos de otros carácidos en Mesoamérica [15].

La falta de estructuración filogenética de *Astyanax* en Centroamérica central (incluso con el subconjunto de datos de 3.8 Kbp) puede explicarse por una colonización más reciente acompañada de una radiación rápida alrededor de 6.9 Ma (Tabla 5); este patrón ha sido observado en otros peces de agua dulce de la región [12, 13, 15, 23, 81].

3.4.4 Hipótesis de la dispersión en el origen del género *Astyanax* en Mesoamérica

La evidencia presentada en este trabajo es congruente con la hipótesis generalizada de un origen sudamericano para *Astyanax* y otros carácidos de América Central [15, 31, 34]. Esto es apoyado por la observación de que los linajes provenientes de Centroamérica baja estaban más estrechamente

Historia evolutiva del género *Astyanax* en Mesoamérica

relacionados con muestras de América del Sur provenientes de Brasil y Argentina. Teniendo en cuenta la tasa de calibración basada en la divergencia del *Cytb* en grupos de peces (1.09% / mi distancias *HKY*) [23, 39, 78] y la tasa media del 0.8%/Ma, observada aquí del análisis de datación en *r8s* (Figura 6 y Tabla 5), los niveles de divergencia de las poblaciones del Sur y Centro América implican para *Astyanax* un período de colonización o expansión a Mesoamérica desde América del Sur de alrededor de 7.8-8.1 Ma, antes de la elevación final del Istmo de Panamá ~ 3.3 Ma [7, 21, 82]. La inclusión de más muestras de *Astyanax* a ambos lados de la Sierra del Perijá y los Andes de Mérida en estudios posteriores, podría mejorar este escenario de datación.

La colonización de Mesoamérica antes del cierre del estrecho de Panamá en el Cenozoico tardío, no es congruente con los datos geológicos, ni con otros estudios de otros géneros de carácidos (*Brycon*, *Bryconamericus*, *Eretmobrycon* y *Cyphocharax*) [15], incluyendo un trabajo previo de *Astyanax* [38], los cuales proponen que el cierre del estrecho ~ 3,3 Ma representó la primera oportunidad para la colonización de Centroamérica desde América del Sur.

Una colonización anterior de Mesoamérica se ha propuesto para otros peces de agua dulce (Tabla 4) [12, 13, 17, 23]. Por ejemplo, eventos antiguos de colonización han sido propuestos para la familia Poeciliidae (modelo Cretácico - Rosen [24]) [80] y las familias Cichlidae, Rivulidae y Synbranchidae (Mioceno – GAARlandia, modelo propuesto por Iturralde-Vinent y MacPhee [7]) [12, 13, 17, 23]. Sin embargo y en contraste con *Astyanax*, estas familias

también se encuentran en las islas del Caribe, y dado que son peces secundarios, podría haber cruzado a través de un paso poco profundo entre América del Sur y Centroamérica durante el Mioceno [13, 21, 23].

Tiempos de divergencia similares a los encontrados en este estudio han sido reportados en otros estudios moleculares de la fauna primaria de agua dulce [12, 17]. Por ejemplo, el modelo de Bermingham y Martin [17], que con base en la filogeografía comparada de tres géneros [*Roeboides* (Characidae), *Pimelodella* (Pimelodidae) e *Hypopomus* (Hypopomidae)], propone una colonización de Mesoamérica entre 4 y 7 Ma, antes del cierre definitivo del Istmo de Panamá (~ 3.3 Ma). Por otra parte, *Rhamdia* parece haber colonizado Mesoamérica en dos episodios diferentes, uno de ellos antes del cierre del Istmo de Panamá (6.5 a 5.6 Ma, grupo *R. laticauda*) [12]. Estas estimaciones están de acuerdo con este estudio, y coinciden las hechas para otra fauna de peces de agua dulce primarios y secundarios [12, 23, 78], así como con los tiempos de divergencia de grupos de invertebrados (9 Ma en pseudoescorpiones) [27] y fósiles foraminíferos bentónicos (8 Ma) [83].

En este estudio se ha encontrado evidencia de un patrón biogeográfico único que incluye la existencia de múltiples oleadas de expansión del grupo I (Clados II al V) de *Astyanax* en la parte superior de la falla Polochic-Motagua (región de México y Chiapas). Estos clados tienen una distribución limitada pero superpuesta en la del Clado I, y en general ocupan ambientes ecológicos relativamente estables (manantiales o lagos), que pueden ser menos afectados por modificaciones climáticas. Procesos como el solapamiento de nicho y el

intercambio de linajes podrían explicar este patrón, excepto en los hábitats estables en los que dos linajes se encuentran en simpatria (linajes la del Clado I y Clado II en la región de la Huasteca, y en las cuencas del Mezquital y Nazas-Aguanaval).

3.4.5 Principales eventos vicariantes en las poblaciones de *Astyanax* de Mesoamérica

Los eventos de vicarianza del género *Astyanax* en Mesoamérica se dieron durante el Plioceno/Mioceno (4-8 Ma), y se produjeron antes los de Centroamérica baja (Panamá y Costa Rica, principalmente) que en el resto de Mesoamérica.

Un patrón de distribución geográfica restringida en Centroamérica baja (Grupos IV-VI) es coherente con una pronunciada fragmentación geográfica, a consecuencia de movimientos tectónicos [7, 21], que finalmente llevaron al cierre del Estrecho de Panamá ~ 3.3 Ma. Bermingham y Martin [17] han propuesto una fragmentación múltiple de la distribución durante el Mioceno en los patrones de la diversidad de otros taxa de fauna primaria de agua dulce. Con los datos de este estudio, fue posible identificar cinco eventos vicariantes en Centroamérica baja (Figura 6). Éstos están relacionados con cambios en los niveles eustáticos del mar (5-8 Ma) [26] y a la formación de barreras biogeográficas interoceánicas [83] durante el Mioceno medio o tardío (hace 8 Ma).

En la porción norte de Centroamérica, la actividad volcánica principal fue producida por el Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (ENTM). Esta región se vio afectada por períodos de intensa actividad geológica desde hace 3 a 12 Ma, aunque alguna actividad volcánica se sigue produciendo hoy en día [71, 72, 84]. La estructuración geográfica, que es evidente en el Clado I de *Astyanax*, indica que el ENTM constituyó una barrera geográfica eficaz durante su desarrollo en el Mioceno tardío 4-6 Ma (Figura 6). Estas fechas son congruentes con la geología de la región y estudios anteriores con varios grupos de vertebrados [1, 5, 10, 85-87].

3.4.6 Otros patrones biogeográficos

Otros patrones biogeográficos se obtuvieron para las zonas bajas y centro de Centroamérica, mismos que no pueden ser explicados por las barreras geológicas, pero éstas concuerdan con las principales regiones biogeográficas propuestas para otros peces de agua dulce [15, 23, 88].

En este sentido nuestros resultados son en términos generales coincidentes con la regionalización para la ictiofauna llevada a cabo por Bussing [14] en Mesoamérica con algunos cambios en los límites de algunas de ellas. Es así que nuestro Modelo es compatible con su propuesta de la Región del Istmo, pero con un patrón de fragmentación similar al reportado para otros peces de agua dulce primarios [12, 15, 17]. Además, en este estudio se ha encontrado evidencia de algunos clados de *Astyanax* provenientes de Belice y Guatemala (Clados VII y VIII en la Figura 4) incluidos en el grupo de

Centroamérica (Grupo II), y no con la península de Yucatán [14], un patrón compartido con cíclidos Mesoamericanos [23].

Los linajes de Chiapas y Nicaragua (linaje **Id** en la Figura 4) no llegan a la costa del Pacífico de Costa Rica, sino que tienen su límite sur en El Salvador. Siendo así mismo la distribución de los linajes de la Región de San Juan diferente de la propuesta por Bussing [14], abarcando desde la cuenca del Barbilla (Costa Rica) hasta Belice, en la vertiente Atlántica, y en la vertiente Pacífica de la Cuenca del Río Grande a la cuenca de Ciruelas en el Golfo de Nicoya (Costa Rica). Este patrón ha sido encontrado previamente por otros autores [23, 88].

Por último, fueron inferidos tiempos de la separación entre los Grupos I y II de entre 6 y 7.8 Ma (Tabla 5). Estos Grupos coinciden geográficamente con la falla Polochic-Motagua [6], considerada como una región de transición para otros grupos de peces de agua dulce [13, 23]. Además, se observó la presencia de dos linajes bien diferenciados de *Astyanax* en simpatria en la cuenca del Polochic (Clade IV en el Grupo I y Clado V en el Grupo II), una observación que no ha sido reportada para otros carácidos [15]. Este patrón puede explicarse en términos de captura de ríos, de forma que el tributario del río Cahabón pudo haberse desviado hacia el río Polochic, a consecuencia de la actividad tectónica (relacionada con la Sierra de Chiapas [89]), separando así el río Cahabón del Grijalva-Usumacinta (IV Clado en el Grupo I). Este fenómeno ha sido propuesto antes para el género *Rhamdia* [12].

3.5 REFERENCIAS

1. Contreras-Balderas S, H. O, Lozano-Vilano ML: **Punta de Morro, an interesting barrier for distributional patterns of Continental fishes in North and Central Veracruz, Mexico.** *Publ Biol Fac Cienc Biol Univ Autóm Nuevo Leon México* 1996, **16**:37-42.
2. Dominguez-Dominguez O, Martinez-Meyer E, Zambrano L, De Leon GP-P: **Using Ecological-Niche Modeling as a Conservation Tool for Freshwater Species: Live-Bearing Fishes in Central Mexico.** *Conserv Biol* 2006, **20**(6):1730-1739.
3. Huidobro L, Morrone JJ, Villalobos JL, Alvarez F: **Distributional patterns of freshwater taxa (fishes, crustaceans and plants) from the Mexican Transition Zone.** *J Biogeogr* 2006, **33**(4):731-741.
4. Morrone JJ: **Biogeographical regions under track and cladistic scrutiny.** *J Biogeogr* 2002, **29**(2):149-152.
5. Zaldivar-Riveron A, Leon-Regagnon V, de Oca ANM: **Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences.** *Mol Phylogen Evol* 2004, **30**(1):38-49.
6. Guzman-Speziale M, Valdes-Gonzalez C, Molina E, Gomez JM: **Seismic activity along the Central America Volcanic Arc: Is it related to subduction of the Cocos plate?** *Tectonophysics* 2005, **400**(1-4):241-254.
7. Iturralde-Vinent MA, MacPhee RDE: **Paleogeography of the Caribbean region: Implications for cenozoic biogeography.** *Bulletin of the American Museum of Natural History* 1999(238):1-95.
8. Bermingham E, Martin AP: **Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America.** *Mol Ecol* 1998, **7**(4):499-517.
9. Martin AP, Bermingham E: **Systematics and evolution of lower Central American cichlids inferred from analysis of cytochrome b gene sequences.** *Mol Phylogen Evol* 1998, **9**(2):192-203.

10. Mateos M: **Comparative phylogeography of livebearing fishes in the genera *Poeciliopsis* and *Poecilia* (Poeciliidae : Cyprinodontiformes) in central Mexico.** *J Biogeogr* 2005, **32**(5):775-780.
11. Mateos M, Sanjur OI, Vrijenhoek RC: **Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae : Cyprinodontiformes).** *Evolution* 2002, **56**(5):972-984.
12. Perdices A, Bermingham E, A. M, Doadrio I: **Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America.** *Mol Phylogen Evol* 2002, **25**:172-189.
13. Perdices A, Doadrio I, Bermingham E: **Evolutionary history of the synbranchid eels (Teleostei: Synbranchidae) in Central America and the Caribbean islands inferred from their molecular phylogeny.** *Mol Phylogen Evol* 2005, **37**(2):460-473.
14. Bussing WA: **Patterns of distribution of the Central American ichthyofauna.** In: *The Great American Biotic Interchange*. Edited by Stehli FG, Webb SD. New York: Plenum Press, New York; 1985: 453-473.
15. Reeves RG, Bermingham E: **Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish.** *Biol J Linn Soc* 2006, **88**(2):235-255.
16. Avise JC: **Molecular Markers, Natural History and Evolution.** New York, NY. ; 1994.
17. Bermingham E, Martin AP: **Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing sharded history to infer the evolutionary landscape of lower Central America.** *Mol Ecol* 1998, **7**:499-518.
18. Joseph L, Moritz C, Hugall A: **Molecular Support for Vicariance as a Source of Diversity in Rain-Forest.** *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 1995, **260**(1358):177-182.
19. Patton JL, Dasilva MNF, Malcolm JR: **Gene Genealogy and Differentiation among Arboreal Spiny Rats (Rodentia, Echimyidae) of the Amazon Basin - a Test of the Riverine Barrier Hypothesis.** *Evolution* 1994, **48**(4):1314-1323.

20. Templeton AR, Routman E, Phillips CA: **Separating Population-Structure from Population History - a Cladistic-Analysis of the Geographical-Distribution of Mitochondrial-DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma-Tigrinum***. *Genetics* 1995, **140**(2):767-782.
21. Coates A, Oblando JA: **The geologic evolution of the Central America Isthmus**. In: *Evolution and Environmental in Tropical America*. Edited by Jackson JBC, Budd AF, Coates AG. Chicago: Chicago University Press, Chicago; 1996: 21-56.
22. Myers GS: **Derivation of Freshwater Fish Fauna of Central America**. *Copeia* 1966(4):766-&.
23. Concheiro Perez GA, Rican O, Orti G, Bermingham E, Doadrio I, Zardoya R: **Phylogeny and biogeography of 91 species of herolne cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene**. *Mol Phylogen Evol* 2007, **43**(1):91-110.
24. Rosen DE: **Vicariance Model of Caribbean Biogeography**. *Systematic Zoology* 1975, **24**(4):431-464.
25. Rosen DE: **Vicariant patterns and historical explanation in biogeography**. *Systematic Zoology* 1978, **27**:159-188.
26. Haq BU, Hardenbol J, Vail PR: **CHRONOLOGY OF FLUCTUATING SEA LEVELS SINCE THE TRIASSIC**. *Science* 1987, **235**(4793):1156-1167.
27. Zeh JA, Zeh DW, Bonilla MM: **Phylogeography of the harlequin beetle-riding pseudoscorpion and the rise of the Isthmus of Panama**. *Mol Ecol* 2003, **12**(10):2759-2769.
28. Crawford AJ, Smith EN: **Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae : Eleutherodactylus) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes**. *Mol Phylogen Evol* 2005, **35**(3):536-555.
29. Marko PB: **Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama**. *Mol Biol Evol* 2002, **19**(11):2005-2021.

30. Baird SF, Girard CF: **Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U. S. and Mexican Boundary Survey, and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U. S. A.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1854:24-29.
31. Calcagnotto D, Schaefer SA, DeSalle R: **Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences.** *Mol Phylogen Evol* 2005, **36**(1):135-153.
32. **Characiformes. Tetras, piranhas, hatchetfishes, headstanders, pencilfishes, and their relatives**
33. Otero O, Gayet M: **Palaeoichthyofaunas from the Lower Oligocene and Miocene of the Arabian Plate: palaeoecological and palaeobiogeographical implications.** *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 2001, **165**(1-2):141-169.
34. Gayet M, Marshall LG, Sempere T, Meunier FJ, Cappetta H, Rage JC: **Middle Maastrichtian vertebrates (fishes, amphibians, dinosaurs and other reptiles, mammals) from Pajcha Pata (Bolivia). Biostratigraphic, palaeoecologic and palaeobiogeographic implications.** *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 2001, **169**(1-2):39-68.
35. Eschmeyer WN: **Catalog of fishes. Updated database version of June 2007.** In: *FishBase*. 2007.
36. Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Pezzi Da Silva JF, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA *et al*: **Genera Incertae Sedis in Characidae.** In: *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edited by Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ. Porto Alegre Brasil: EDIPUCRS; 2003: 106-168.
37. Strecker U, Bernatchez L, Wilkens H: **Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei).** *Mol Ecol* 2003, **12**(3):699-710.
38. Strecker U, Faundez VH, Wilkens H: **Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data.** *Mol Phylogen Evol* 2004, **33**(2):469-481.

39. Dowling TE, Martasian DP, Jeffery WR: **Evidence for Multiple Genetic Forms with Similar Eyeless Phenotypes in the Blind Cavefish, *Astyanax mexicanus***. *Mol Biol Evol* 2002, **19**(4):446-455.
40. Zardoya R, Doadrio I: **Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids**. *J Mol Evol* 1999, **49**(2):227-237.
41. Jeffery WR: **Cave fish as a model system in evolutionary developmental biology**. *Developmental Biology* 2001, **231**:1-12.
42. Lozano-Vilano ML, Contreras-Balderas S: ***Astyanax arandoi*, n. sp. from Chiapas, Mexico (Pisces, Ostariophysi: Characidae) with a Comparison to the nominal species *A. aeneus* and *A. mexicanus***. *Univ Cienc* 1990, **7**:95-107.
43. Paulo-Maya J: **Análisis morfométrico del género *Astyanax* (Pisces: Characidae) en México**. México, D. F. : Instituto Politécnico Nacional; 1994.
44. Bernatchez L, Chouinard A, Lu GQ: **integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study**. *Biol J Linn Soc* 1999, **68**(1-2):173-194.
45. Brunner PC, Douglas MR, Osinov A, Wilson CC, Bernatchez L: **Holarctic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences**. *Evolution* 2001, **55**(3):573-586.
46. Danley PD, Kocher TD: **Speciation in rapidly diverging systems: lessons from Lake Malawi**. *Mol Ecol* 2001, **10**(5):1075-1086.
47. Valdez-Moreno ME: **A checklist of the freshwater ichthyofauna from El Peten and Alta Verapaz, Guatemala, with notes for its conservation and management**. *Zootaxa* 2005(1072):43-60.
48. Rosen DE: **A New Tetragonopterine Characid Fish From Guatemala**. *American Museum Novitates* 1970(2435):1-17.
49. Rosen DE: **Origin of the Characid Fish Genus *Bramocharax* and Description of a Second, More Primitive, Species in Guatemala**. *American Museum Novitates* 1972(2500):1-21.

50. Seutin G, White BN, Boag PT: **Preservation of Avian Blood and Tissue Samples for DNA Analyses**. *Canadian Journal of Zoology- Revue Canadienne De Zoologie* 1991, **69**(1):82-90.
51. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Laboratory; 1989.
52. Quenouille B, Bermingham E, Planes S: **Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences**. *Mol Phylogen Evol* 2004, **31**(1):66-88.
53. Quenouille B, Bermingham E, Planes S: **Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei : Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences**. *Mol Phylogen Evol* 2004, **31**(1):66-88.
54. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN: **DNA barcoding Australia's fish species**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 2005, **360**(1462):1847-1857.
55. Zardoya R, Doadrio I: **Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications**. *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 1998, **265**(1403):1365-1372.
56. Palumbi S, Martin AP, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G: **The Simple Fool's Guide to PCR**, vol. Special publication, 2.0 edn. Honolulu: University Hawaii Press; 1991.
57. Huelsenbeck JP, Ronquist F: **MrBayes: Bayesian inference of phylogeny**. *Bioinformatics* 2001, **17**:754-755.
58. Posada D, Crandall KA: **MODELTEST: testing the model of DNA substitution**. *Bioinformatics* 1998, **14**(9):817-818.
59. Rambaut A, Drummond A: **Tracer [computer program]**. In., 1.4 edn: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer;>; 2007.
60. Swofford DL: **PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. In. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 1998.
61. Goloboff PA: **NONA. Noname (a bastard son of Pee-Wee)** In., 2.0 (32 bit version) edn. New York Program and documentation. Computer

- program distributed by J.M. Carpenter, Department of Entomology, American Museum of Natural History New York, 1993; 1993.
62. Nixon KC: **Winclada (BETA)**. In., 0.9.9 edn. New York: Published by the author, ITHACA, NY.; 1999.
63. Goldman N: **Simple Diagnostic Statistical Tests of Models for DNA Substitution**. *J Mol Evol* 1993, **37**(6):650-661.
64. Sanderson MJ: **A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy**. *Mol Biol Evol* 1997, **14**(12):1218-1231.
65. Huelsenbeck JP, Rannala B: **Phylogenetic methods come of age: Testing hypotheses in an evolutionary context**. *Science* 1997, **276**(5310):227-232.
66. **r8s bootkit 2**. http://www.bergianska.se/index_forskning_soft.html
67. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis V. 2.01**
68. Díaz de Gamero ML: **The changing course of the Orinoco River during the Neogene: A review**. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 1996, **123**(1-4):385-402.
69. Lundberg JG: **The temporal context for the diversification of Neotropical Fishes**. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edited by Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. Porto Alegre, Brasil EDIPUCRS; 1998: 49-68.
70. Lundberg JG, Machadoallison A, Kay RF: **Miocene Characid Fishes from Colombia - Evolutionary Stasis and Extirpation**. *Science* 1986, **234**(4773):208-209.
71. Ferrari L, Lopez-Martinez M, Aguirre-Diaz G, Carrasco-Nunez G: **Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central Mexico: From the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt**. *Geology* 1999, **27**(4):303-306.
72. Ferrari L, Tagami T, Eguchi M, Orozco-Esquivel MT, Petrone CM, Jacobo-Albarran J, Lopez-Martinez M: **Geology, geochronology and tectonic setting of late Cenozoic volcanism along the southwestern Gulf of Mexico: The Eastern Aikaine Province revisited**. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 2005, **146**(4):284-306.

73. Jelks HJ, Walsh SJ, Burkhead NM, Contreras-Balderas S, Díaz-Pardo E, Hendrickson DA, Lyons J, Mandrak NE, McCormick F, Nelson JS *et al*: **Conservation Status of Imperiled North American Freshwater and Diadromous Fishes**. *Fisheries* 2008, **8**(33):372-407.
74. Contreras-Balderas S, Lozano-Vilano ML: **Problemas nomenclaturales de las formas mexicanas del género *Astyanax* (Pisces: Characidae)**. *Zoología Informa* 1988, **38**:1-13.
75. Protas ME, Hersey C, Kochanek D, Zhou Y, Wilkens H, Jeffery WR, Zon LI, Borowsky R, Tabin CJ: **Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism**. *Nat Genet* 2006, **38**(1):107-111.
76. Wilkens H, Strecker U: **Convergent evolution of the cavefish *Astyanax* (Characidae, Teleostei): genetic evidence from reduced eye-size and pigmentation**. *Biol J Linn Soc* 2003, **80**(4):545-554.
77. Miller R: **Freshwater Fishes of México**, vol. 1. Chicago: The University of Chicago Press; 2005.
78. Doadrio I, Perdices A: **Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (Cobitis, cobitidae) based on cytochrome b sequence data**. *Mol Phylogen Evol* 2005, **37**(2):484-493.
79. Murphy WJ, Thomerson JE, Collier GE: **Phylogeny of the neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences**. *Mol Phylogen Evol* 1999, **13**(2):289-301.
80. Hrbek T, Seckinger J, Meyer A: **A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes**. *Mol Phylogen Evol* 2007, **43**(3):986-998.
81. Murphy WJ, Collier GE: **Phylogenetic relationships within the aplocheiloid fish genus Rivulus (Cyprinodontiformes, Rivulidae): Implications for Caribbean and Central American biogeography**. *Mol Biol Evol* 1996, **13**(5):642-649.
82. Bartoli G, Sarnthein M, Weinelt M, Erlenkeuser H, Garbe-Schonberg D, Lea DW: **Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation**. *Earth Planet Sci Lett* 2005, **237**(1-2):33-44.

83. Collins L, Coates A, Berggren W, Aubry M, Zhang J: **The late Miocene Panama isthmian strait.** *Geology* 1996, **24**(8):687-690.
84. Ferrari L: **Avances en el conocimiento de la Faja Volcánica Transmexicana durante la última década.** *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 2000, **53**:84-92.
85. Mateos M, Sanjur OI, Vrijenhoek RC: **Historical Biogeography of the Livebearing Fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes).** *Evolution* 2002, **56**:972-984.
86. Mulcahy DG, Mendelson JR: **Phylogeography and Speciation of the Morphologically Variable, Widespread Species *Bufo valliceps*, Based on Molecular Evidence from mtDNA.** *Mol Phylogen Evol* 2000, **17**(2):173-189.
87. Mulcahy DG, Morrill BH, Mendelson JR: **Historical biogeography of lowland species of toads (*Bufo*) across the Trans-Mexican Neovolcanic Belt and the Isthmus of Tehuantepec.** *J Biogeogr* 2006, **33**(11):1889-1904.
88. Smith SA, Bermingham E: **The biogeography of lower Mesoamerican freshwater fishes.** *J Biogeogr* 2005, **32**(10):1835-1854.
89. Guzman-Speziale M: **Active seismic deformation in the grabens of northern Central America and its relationship to the relative motion of the North America-Caribbean plate boundary.** *Tectonophysics* 2001, **337**(1-2):39-51.

APÉNDICE 1. Sitios de muestreo de Mesoamérica. Las especies válidas corresponden a la revisión hecha por Lima et al. [36], especies originales corresponden a la descripción original, o a las asignaciones taxonómicas previas a la revisión de Lima et al. [36] y especies propuestas corresponde a nuestra propuesta taxonómica. Código para los cuerpos de agua R= Río, C= Cenote A=Lagunas, L=Lagos y S=manantial.

Mapa	Taxa	Especies sensu		Especies		Cuerpo de Agua	N
		Lima et al 2005	Nombre de los Linajes en el árbol (Figuras 2-5)	propuestas por este estudio	originales		
1	Cuatro Ciénegas	<i>A. mexicanus</i>	Bravo-Conchos-Aguanaval-Mezquital	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Cuatro Ciénegas A	2
2	Salado R. (1)	<i>A. mexicanus</i>	Bravo-Conchos-Aguanaval-Mezquital	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Canifo de la Montaña R	3
3	Falcon Dam	<i>A. mexicanus</i>	Bravo-Conchos-Aguanaval-Mezquital	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Falcon Dam	1
4	San Bernabe	<i>A. mexicanus</i>	Bravo-Conchos-Aguanaval-Mezquital	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	San Bernabe S	1
5	Nazas	<i>A. mexicanus</i>	Bravo-Conchos-Aguanaval-Mezquital	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	El Cuarto S	2
6	Aguanaval (2)	<i>A. mexicanus</i>	Aguanaval-Mezquital-Sabinos	<i>A. hubbsi</i>	<i>A. mexicanus</i>	Peñon Blanco	1
6	Aguanaval (1)	<i>A. mexicanus</i>	Bravo-Conchos-Aguanaval-Mezquital	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Peñon Blanco	1
7	Mezquital (3)	<i>A. mexicanus</i>	Aguanaval-Mezquital-Sabinos	<i>A. hubbsi</i>	<i>A. mexicanus</i>	San Juan S	1
7	Mezquital	<i>A. mexicanus</i>	Bravo-Conchos-Aguanaval-Mezquital	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	San Juan S	2
8	La Nutria R.	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	La Nutria R	1
9	Soto La Marina	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Guemez R	1
10	Santa Maria River	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Santa Maria R	1
11	Coahuayana (1)	<i>A. mexicanus</i>	Balsas-Coahuayana	<i>A. aeneus</i>	<i>A. mexicanus</i>	La Media Luna A	1
12	Huichihuayan	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Huichihuayan R	1
13	Tampaon	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Jalpan R	3
14	Jalpan Cave	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Jalpan Cave	2
15	Atoyac	<i>A. fasciatus</i>	Coatzacoalcos-Bramocharax caballeroi	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Atoyac R	1
16	Tuxpan - Nautla	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Bobo R	1
17	Tuxpan - Nautla	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Dos Arroyos R	1
18	Coahuayana (2)	<i>A. fasciatus</i>	Balsas-Coahuayana	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Tamazula R	1
19	Balsas (3)	<i>A. fasciatus</i>	Balsas-Coahuayana	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Cupatzio R	1
20	Balsas (4)	<i>A. fasciatus</i>	Balsas-Coahuayana	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Parque Uruapan	1

Historia evoiva e género anax en Mesoamérica

Mapa	Taxa	Especies sensu Lima et al 2005	Nombre de los linajes en el árbol (Figuras 2-5)	Especies		Cuerpo de Agua	N
				propuestas por este estudio	Especies originales		
21	Coahuayana (3)	<i>A. fasciatus</i>	Balsas-Coahuayana	<i>A. aeneus</i>	<i>A. fasciatus</i>	Tamazula R	1
22	Balsas (1)	<i>A. mexicanus</i>	Balsas-Coahuayana	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Izamatitlan R	1
23	La Antigua	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijaiva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Puente Nacional R	1
24	Paso de Ovejas	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijaiva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Tolome R	2
25	Máquinas	<i>A. fasciatus</i>	Máquinas	<i>A. sp. Novo 2</i>	<i>A. aeneus</i>	Máquinas R	3
26	Papaloapan (1)	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijaiva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio Papaloapan	1
27	Balsas (2)	<i>A. fasciatus</i>	Balsas-Coahuayana	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Salado R	1
28	Salinas R.	<i>A. fasciatus</i>	Balsas-Coahuayana	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio Grande	1
29	Pichoacan	<i>A. fasciatus</i>	Chiapas	<i>A. sp. Novo 1</i>	<i>A. aeneus</i>	Pichoacan R	1
30	Coatzacoalcos	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijaiva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. aeneus</i>	<i>A. strepsisilii</i> *	Rio Grande R	1
31	Grijaiva - Usumacinta (2)	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijaiva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Ojo de Agua S	1
32	Sardintero	<i>A. fasciatus</i>	Chiapas	<i>A. sp. Novo 1</i>	<i>A. aeneus</i>	El Sardintero R	1
33	Grijaiva - Usumacinta (1)	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijaiva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	San Antonio R	1
34	Palenque	<i>A. armadori</i> *	Motobello	<i>A. aeneus</i>	<i>A. armadori</i> *	Chacamax R	1
35	Montebello L.	<i>A. fasciatus</i>	Chiapas	<i>A. sp. Novo 3</i>	<i>A. aeneus</i>	Montebello A	1
36	Huehuetlan	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. sp. Novo 1</i>	<i>A. aeneus</i>	Huehuetlan R	2
37	Mamantel R.	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Mamantel R	1
38	Candelaria R.	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Candelaria R	1
39	Xbacab (1)	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria-Bramocharax doriori	<i>A. pelenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	Xbacab C	1
39	Xbacab (2)	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria-Bramocharax doriori	<i>A. pelenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	Xbacab C	1
40	Champton	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Champton A	1
41	Silvituc	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria-Bramocharax doriori	<i>A. pelenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	Silvituc A	1
42	Cenote de Noc - Ac	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijaiva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. aeneus</i>	<i>A. allioi</i> *	Noc - Ac C	2
43	Chinchancanab	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Chinchancanab A	1
44	Zoh Lagoon	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Zoh A	1
45	Cenote El Carmen	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	El Carmen C	2
46	Cenote T'Sill	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	T'Sill A	1

Mapa	Taxa	Especies sensu Lima et al 2005	Nombre de los Linajes en el árbol (Figuras 2-5)	Especies propuestas por este estudio	Especies originales	Cuerpo de Agua	N
47	Tortuga	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Tortuga C	1
48	Sian - Ka'an	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Sian Ka'an C	1
49	Hermoso	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Hermoso C	1
50	Majahual	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Majahual	1
51	Nahuate	<i>A. fasciatus</i>	Chiapas	<i>A. sp. Novo 1</i>	<i>A. microphthalmus</i>	Pachipa R	2
52	Bolas R.	<i>A. fasciatus</i>	Chiapas	<i>A. sp. Novo 1</i>	<i>A. microphthalmus</i>	Bolas R	1
53	Acome R.	<i>A. fasciatus</i>	Chiapas	<i>A. sp. Novo 1</i>	<i>A. microphthalmus</i>	Chifle R	1
54	Morazan	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio Morazan	1
55	Jeronimo R.	<i>A. fasciatus</i>	Polochic-Grijalva-Usumacinta	<i>A. sp. Novo 9</i>	<i>A. aeneus</i>	Jeronimo R	1
56	Peten-liza (1)	<i>A. mexicanus</i>	Candelaria-Bramocharax dorioni	<i>A. petenensis</i>	<i>A. petenensis*</i>	Lago Peten-liza L	1
56	Peten-liza (2)	<i>A. mexicanus</i>	Candelaria-Bramocharax dorioni	<i>A. petenensis</i>	<i>A. petenensis*</i>	Lago Peten-liza L	1
57	San Juan/Peten	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria-Bramocharax dorioni	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	San Juan/Peten R	1
58	Cansis R.	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria-Bramocharax dorioni	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio Cansis	1
59	Cahabón R.	<i>A. fasciatus</i>	Polochic-Grijalva-Usumacinta	<i>A. sp. Novo 9</i>	<i>A. aeneus</i>	Cahabon R	1
60	Mopan River	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio Mopan	1
61	San Pedro	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio San Pedro	1
62	Izabal Lake	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Izabal L	1
63	Los Amates	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Los Amates R	1
64	Polochic (1)	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Amatillo R	1
64	Polochic (2)	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Chahuacal R	1
65	Puente Virginia	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Puente Virginia R	1
66	Nuevo	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio Nuevo	2
67	Crooked Tree	<i>A. fasciatus</i>	Yucatan Peninsula	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Crooked Tree A	1
68	Macal	<i>A. fasciatus</i>	Macal River	<i>A. sp. Novo 4</i>	<i>A. aeneus</i>	Macal R	2
69	Stann Creek	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Staan Creek	1
70	Moho	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Moho R	2
70	Moho Creek	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	Moho Creek	2
70	San Antonio	<i>A. fasciatus</i>	Belize-Motagua-Polochic	<i>A. belizanus</i>	<i>A. aeneus</i>	San Antonio R	3
71	Guija L.	<i>A. fasciatus</i>	Chiapas	<i>A. sp. Novo 1</i>	<i>A. aeneus</i>	La Guija A	2
72	Jocotal L.	<i>A. fasciatus</i>	Chiapas	<i>A. sp. Novo 1</i>	<i>A. aeneus</i>	Jocotal A	1

IS OTTA EVO VA E G NERO S ANAX EN ESCAM RICA

Mapa	Taxa	Especies sensu Lima et al 2005		Nombre de los Linajes en el árbol (Figuras 2-5)	Especies propuestas por este estudio		Especies originales		Cuerpo de Agua	N
		<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>		<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>				
76	Quebradaseca	<i>A. nasutus</i>		Managua Lake	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	Quebradaseca R	1
77	La Chepa	<i>A. nasutus</i>		Managua Lake	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	La Chepa R	1
78	Atoya	<i>A. nasutus</i>		Managua Lake	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	Atoya R	1
79	Telica	<i>A. nasutus</i>		Managua Lake	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	Telica R	1
80	La Trinidad	<i>A. nasutus</i>		Managua Lake	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	La Trinidad R	1
81	Casares	<i>A. nasutus</i>		Managua Lake	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i>	Casares R	1
82	Irigany	<i>A. fasciatus</i>		Ciruelas-Tempisque	<i>A. sp. Novo 6</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Irigany R	1
83	Tempisque	<i>A. fasciatus</i>		Ciruelas-Tempisque	<i>A. sp. Novo 6</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Colorado R	1
84	Ciruelas (2)	<i>A. fasciatus</i>		Ciruelas-Chires	<i>A. sp. Novo 5</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Ciruelas R	1
84	Ciruelas	<i>A. fasciatus</i>		Ciruelas-Tempisque	<i>A. sp. Novo 6</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Ciruelas R	2
85	Reventaza	<i>A. fasciatus</i>		San Juan	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Reventaza R	2
86	Barbilla R.	<i>A. fasciatus</i>		San Juan	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Barbilla R	1
87	Sixaola	<i>A. orthodus</i>		Sixaola	<i>A. orthodus</i>	<i>A. orthodus</i>	<i>A. orthodus</i>	<i>A. orthodus</i>	Sixaola R	1
88	Chires	<i>A. fasciatus</i>		Ciruelas-Chires	<i>A. sp. Novo 5</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Chires R	1
88	Piedras Blancas	<i>A. fasciatus</i>		Ciruelas-Chires	<i>A. sp. Novo 5</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Piedras Blancas R	1
89	Lagarto	<i>A. fasciatus</i>		Lagarto-Puntarenas	<i>A. sp. Novo 7</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Lagarto R	1
89	Puntarenas	<i>A. fasciatus</i>		Lagarto-Puntarenas	<i>A. sp. Novo 7</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Puntarenas	1
89	Quebrada	<i>A. fasciatus</i>		Lagarto-Puntarenas	<i>A. sp. Novo 7</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Quebradaseca R	1
89	Seco R. (1)	<i>A. fasciatus</i>		Lagarto-Puntarenas	<i>A. sp. Novo 7</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Seco R	2
90	Chagres (2)	<i>A. fasciatus</i>		Chagres	<i>A. sp. Novo 8</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Chagres R	1
91	Chagres (1)	<i>A. fasciatus</i>		Chagres	<i>A. sp. Novo 8</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Pipeline R	1
10A	Tinaja Cave	<i>A. jordani</i>		Aguanava-Mezquitla-Sabinos	<i>A. hubbsi</i>	<i>A. jordani</i>	<i>A. jordani</i>	<i>A. jordani</i>	Tinaja Cave	1
10E	Malacatoya R.	<i>A. nicaraguensis</i>		Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Malacatoya R	2
11A	Piedras Cave	<i>A. jordani</i>		Aguanava-Mezquitla-Sabinos	<i>A. hubbsi</i>	<i>A. jordani</i>	<i>A. jordani</i>	<i>A. jordani</i>	Piedras Cave	1
11E	Chile	<i>A. nicaraguensis</i>		Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Chile R	1
12A	Micos Cave	<i>A. jordani</i>		Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. jordani</i>	<i>A. jordani</i>	<i>A. jordani</i>	Micos Cave	1
12E	Mico R.	<i>A. nicaraguensis</i>		Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Mico R	1

Mapa	Taxa	<i>A. jordani</i>	Aguanaval-Mezquitil-Sabinos	<i>A. hubbsi</i>	<i>A. jordani</i>	Curva Cave	1
		Especies sensu Lima et al 2005	Nombre de los Linajes en el árbol (Figuras 2-5)	Especies propuestas por este estudio	Especies originales	Cuerpo de Agua	N
13A	Curva Cave	<i>A. jordani</i>	Aguanaval-Mezquitil-Sabinos	<i>A. hubbsi</i>	<i>A. jordani</i>	Curva Cave	1
13E	Santa Rita R.	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Santa Rita R	1
14A	Media Luna L.	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Puente La Raya R	1
14E	Nicaragua L. (2)	<i>A. aeneus</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Lago Nicaragua	1
15A	Frio River	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Frio R	1
15E	Camopa	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Camopa R	1
16A	Chica Cave (2)	<i>A. jordani</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. jordani</i>	Chica Cave	1
16A	Chica Cave (1)	<i>A. jordani</i> *	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. jordani</i> *	Chica Cave	1
16E	Chiquito R.	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Chiquito R	1
16E	Nicaragua L. (3)	<i>Bramocharax bransfordii</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>Bramocharax bransfordii</i>	Lago Nicaragua	1
17E	Nicaragua L.	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Lago Nicaragua	1
18E	Brito	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Brito R	1
19E	Mena	<i>A. fasciatus</i>	San Juan	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. aeneus</i>	Mena R	1
1A	Molino Cave	<i>A. jordani</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. jordani</i> *	Molino Cave	1
1B	Rascon	<i>A. mexicanus</i>	Rascon-Tamasopo	<i>A. hubbsi</i>	<i>A. mexicanus</i>	El Ahuaje S	1
1C	La Palma River	<i>A. fasciatus</i>	Máquinas	<i>A. sp. Novo 2</i>	<i>A. aeneus</i>	La Palma R	1
1D	Candelaria R. (2 - 4)	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria-Bramocharax doriani	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	Candelaria R	3
1E	Orosal	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Orosal R	1
20E	San Juan	<i>A. fasciatus</i>	San Juan	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. aeneus</i>	San Juan River R	2
21E	Infiernito	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Rio Infiernito	1
22E	San Carlos	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	San Carlos R	1
23E	Puerto Viejo	<i>A. fasciatus</i>	San Juan	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. aeneus</i>	Puerto Viejo R	1
24E	Sarapiquí	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Sarapiquí R	1
2A	Guayatejo	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Guayatejo R	1

is orna evo Iva e g nero s anax en escoam rica

Mapa	Taxa	Especies		Nombre de los linajes en el árbol (Figuras 2-5)	propuestas por este estudio	Especies originales	Cuerpo de Agua	N
		<i>A. hubbsi</i>	<i>A. mexicanus</i>					
2B	Tamasopo	<i>A. mexicanus</i>	Rascon-Tamasopo				Tamasopo A	1
2C	Papaloapan (3)	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijalva-Coatzacoalcos- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Salmas R	1
2D	San Simon	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria- <i>Bramocharax doroni</i>	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio San Simon	1
2E	Jiquina	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Jiquina R	1
3A	Tamesi	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	El Limón R	2
3C	El Saltillo R.	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijalva-Coatzacoalcos- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	El Saltillo R	1
3D	Simon II (1)	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria- <i>Bramocharax doroni</i>	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio San Simon	1
3D	Simon II (2)	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria- <i>Bramocharax doroni</i>	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio San Simon	1
3E	Senacapa	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Senacapa R	1
4A	Mante Spring	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	El Nacimiento S	1
4C	Papaloapan (2)	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijalva-Coatzacoalcos- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Xoteapan R	1
4D	Yalcar (1)	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria- <i>Bramocharax doroni</i>	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Candelaria-Yalcar R	1
4E	Comapazague (1)	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Comapazague R	2
5A	Pachon C.	<i>A. jordani</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Pachon Cave	1
5C	Catemaco L. (6 and 7)	<i>Bramocharax caballeroi</i> *	Catemaco- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. antrobius</i> *	Catemaco L	2
5C	Catemaco L. (1-3 and 4)	<i>Bramocharax caballeroi</i> *	Papaloapan (Catemaco) -Grijalva-Coatzacoalcos- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>Bramocharax caballeroi</i> *	Catemaco L	4
5D	Yalcar (2)	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria- <i>Bramocharax doroni</i>	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Candelaria-Yalcar R	1
6A	Mante Dam (1)	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Mante Dam	2
6C	Chalchoapan L.	<i>A. fasciatus</i>	Catemaco- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Chalchoapan L	2
6D	Sachicha	<i>A. fasciatus</i>	Polochic-Grijalva-Usumacinta	<i>A. sp. Novo 9</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Arroyo Sachicha R	1
7A	Yerbaniz	<i>A. jordani</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. jordani</i>	Yerbaniz Cave	1
7C	San Joaquin R. (1 and 3)	<i>A. fasciatus</i>	Catemaco- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	San Joaquin R	2
7C	San Joaquin R. (2)	<i>A. fasciatus</i>	Catemaco- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>Bramocharax caballeroi</i> *	San Joaquin R	1
7C	Catemaco L. (4)	<i>A. fasciatus</i>	Papaloapan (Catemaco) -Grijalva-Coatzacoalcos- <i>Bramocharax caballeroi</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	San Joaquin R	1
7D	Chajmaic	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria- <i>Bramocharax doroni</i>	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Rio Chajmaic	1

Mapa	Taxa	Especies sensu Lima et al. 2005	Nombre de los Linajes en el árbol (Figuras 2-5)	Especies propuestas por este estudio	Especies originales	Cuerpo de Agua	N
7E	Viejo	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Viejo R	2
8A	Oyul	<i>A. mexicanus</i>	Panuco-Tuxpan-Huasteca Caves Papaloapan (Catemaco) -Grijalva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. mexicanus</i>	<i>A. mexicanus</i>	Oyul Dam	1
8C	Cuetzalapan	<i>A. fasciatus</i>	Candelaria-Bramocharax doriani	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Cuetzalapan R	1
8D	Semococh (2)	<i>A. fasciatus</i> <i>Bramocharax doriani</i> *	Candelaria-Bramocharax doriani	<i>A. petenensis</i>	<i>A. aeneus</i> <i>Bramocharax doriani</i> *	Semococh R	1
8D	Semococh (1)	<i>A. nasutus</i> *	Managua Lake	<i>A. petenensis</i>	<i>A. petenensis</i>	Semococh R	1
8E	Managua Lake	<i>A. nasutus</i> *	Managua Lake	<i>A. nasutus</i>	<i>A. nasutus</i> *	San Antonio R	2
9A	Sabinos Cave	<i>A. jordani</i>	Aguanaval-Mezquitil-Sabinos Papaloapan (Catemaco) -Grijalva- Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. hubbsi</i>	<i>A. hubbsi</i> *	Sabinos Cave	1
9C	Chuniapan	<i>A. fasciatus</i>	Coatzacoalcos-Bramocharax caballeri	<i>A. aeneus</i>	<i>A. aeneus</i>	Chuniapan R	3
9E	Matagalpa (2)	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Matagalpa R	2
9E	Matagalpa (1)	<i>A. nicaraguensis</i>	Nicaragua Lake	<i>A. nicaraguensis</i>	<i>A. nicaraguensis</i>	Matagalpa R	1
	<i>A. bimaculatus</i>	<i>A. bimaculatus</i>	Ourgroup	<i>A. bimaculatus</i>	<i>A. bimaculatus</i>	Argentina	1
	<i>A. fasciatus</i> (1)	<i>A. fasciatus</i>	Ourgroup	<i>A. fasciatus</i>	<i>A. fasciatus</i>	Brazil	2

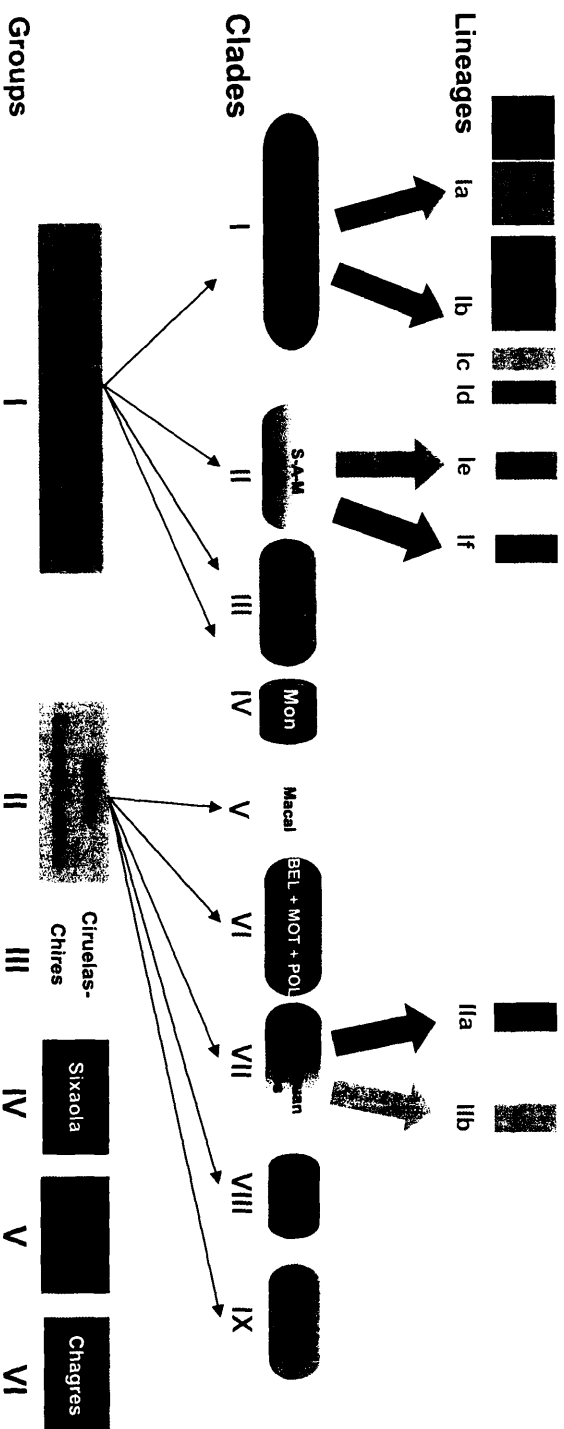
APÉNDICE 2. Parámetros del análisis de Máxima Verosimilitud (ML) estimado para cada gen con Modeltest [58]. Parámetros de ML calculados por Modeltest [58], utilizando el criterio de información bayesiano (BIC): I = Porcentaje de sitios invariables, Γ = Gamma, relación Ti / Tv = transición / transversión.

Modelo (BIC)	Genes mitocondriales				Gen Nuclear				
	Cyt b Codones	Cyt b	COI	16S	RAI1 Codones	RAI2 Codones	RAI3 Codones		
Frecuencias de las bases	Primeras K80+ Γ	Segundas HKY	Terceras TN+ Γ	K81uI+ Γ	TN+ Γ	K80+I	Primeras F81	Segundas K80	Terceras HKY+I
	A=0.25 C=0.25 G=0.25 T=0.25	A=0.21 C=0.26 G=0.14 T=0.39	A=0.26 C=0.27 G=0.16 T=0.31	A=0.29 C=0.27 G=0.12 T=0.31	A=0.26 C=0.27 G=0.16 T=0.31	A=0.25 C=0.25 G=0.25 T=0.25	A=0.27 C=0.22 G=0.32 T=0.19	A=0.25 C=0.25 G=0.25 T=0.25	A=0.18 C=0.31 G=0.31 T=0.20
Matriz de sustitución	R(θ) = 1 R(θ) = 6.4	R(θ) = 1 R(θ) = 5.3	R(θ) = 1 R(θ) = 27	R(θ) = 1 R(θ) = 29	R(θ) = 1 R(θ) = 27	R(θ) = 1 R(θ) = 2.39	R(θ) = 1 R(θ) = 1	R(θ) = 1 R(θ) = 2.3	R(θ) = 1 R(θ) = 3.8
	R(θ) = 1 R(θ) = 1 R(θ) = 6.4	R(θ) = 1 R(θ) = 1 R(θ) = 5.3	R(θ) = 1 R(θ) = 1 R(θ) = 10	R(θ) = 3 R(θ) = 3 R(θ) = 28	R(θ) = 1 R(θ) = 1 R(θ) = 10	R(θ) = 1 R(θ) = 1 R(θ) = 2.39	R(θ) = 1 R(θ) = 1 R(θ) = 1	R(θ) = 1 R(θ) = 2.3 R(θ) = 1	R(θ) = 1 R(θ) = 1 R(θ) = 3.8
I	0	0	0	0.3252	0	0.881	0	0	0.8555
Γ	0.3364	0	0.0702	0.6837	0.0702	2.39	0	2.2899	3.7808
Ti/Tv	6.4211	5.3353							

APÉNDICE 3. Distancias genéticas entre los linajes en porcentaje (debajo de la diagonal, sin corregir las divergencias secuencia de p, por encima de la diagonal, distancias corregidas ML *K81ur*).

Linaje	Entre Linajes																								Dentro de los Linajes	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	24	P	ML	
Grupo I	NMme	2.1	3.2	3.8	2.7	2.9	3.5	4.1	4.3	4.1	4.5	5.4	5.2	5.3	6.2	5.5	5.3	6.1	5.5	4.9	5.4	6	14.8	0.71	0.74	
	GNfa	3.1	3.8	2.7	2.9	3.2	4.1	4.5	4.3	4.6	5.2	5.2	5.1	6	5.5	5.3	5.9	5.2	4.6	5.8	5.6	14.4	0.92	0.96	0.92	
	GSar	3.6	3.5	1.9	1.6	2.5	3.5	3.7	3.2	3.7	4.7	4.2	4.1	5.1	4.6	4.7	4.7	4.3	3.8	4.8	4.8	13.7	0.55	0.57	0.55	
	PCae	4.4	4.5	2.1	1.7	2.4	3.5	4.4	4.3	3.8	4.3	5.3	5	4.9	6.2	5.6	5.5	5.7	5.2	4.5	5.3	5.7	13.6	0.42	0.43	0.42
	CLca	2.9	2.9	1.1	1.8	1	2.1	3.2	3.3	2.8	3.2	4.3	3.8	3.8	4.6	4.5	4.2	4.5	4	3.6	4.5	4.6	13.3	0.24	0.25	0.24
	YPal	3.2	3.4	1.7	2.7	1.1	2.4	3	3.5	2.9	3.5	4.5	3.8	3.6	4.6	4.3	4	4.8	4.2	3.8	5	4.7	13.3	0.33	0.34	0.33
	YPao	4	3.7	2.7	4	2.3	2.8	3.6	3.8	3.5	3.7	4.9	4.2	3.9	5.2	4.8	4.7	4.7	4.6	3.9	5.2	4.7	13.7	0.8	0.85	0.8
	PSsp	4.8	4.8	4.1	5.3	3.6	3.4	4.3	3.3	3.6	3.7	4.7	4.3	4.1	4.3	4.3	4.6	4.8	4.7	3.9	5.2	4.9	14.1	0.54	0.55	0.54
	AME+RAV	5.2	5.4	4.3	5.1	3.8	4.1	4.5	3.8	2.3	2.9	3.9	4.1	3.8	4.1	4.1	4.02	4.6	4	3.3	5.3	4.6	13.5	1.91	2.13	1.91
	MOR	4.8	5.1	3.7	4.4	3.1	3.3	4.1	4.1	2.5	2.4	4	3.7	3.6	3.9	4	3.9	3.9	3.9	3.2	4.4	4.6	13.9	0.12	0.12	0.12
MAR	5.3	5.4	4.2	5.1	3.6	4	4.3	4.3	3.2	2.7	3.7	3.9	3.9	4.2	4.4	4.1	4.5	4.3	3.7	4.7	4.7	14	0.67	0.7	0.67	
MOL	6.7	6.4	5.7	6.6	5.1	5.3	6.1	5.6	4.7	4.7	4.4	5.1	4.9	4.7	4.9	4.7	4.9	4.9	4.7	5.7	5.4	14.8	0	0	0	
Grupo II	NLae	6.5	6.5	5	6.2	4.6	4.6	5.2	5.1	4.9	4.3	4.7	6.3	1.4	3.5	3.4	3.2	3.5	4.5	3.9	4.7	4.8	13.7	0.85	0.89	0.85
	SJae	6.5	6.3	4.9	6	4.4	4.3	4.7	4.9	4.4	4.2	4.6	6.1	1.4	3.4	3.2	2.8	3	4.1	3.5	4.6	4.7	13.4	0.32	0.33	0.32
	Maee	7.9	7.6	6.2	7.8	5.5	5.5	6.7	5.1	4.7	4.5	4.9	5.6	4	3.8	3.3	3.1	4	4.3	4.6	6.1	5	13.9	0.17	0.17	0.17
	POae	7.1	6.9	5.7	7.1	5.6	5.4	6	5.3	4.9	4.8	5.3	5.9	3.9	3.7	3.7	3.2	3.9	4.6	4.2	5.1	4.8	13.4	0.49	0.5	0.49
	CHae	6.7	6.6	5.7	6.9	5	4.9	5.8	5.5	4.8	4.5	4.8	5.7	3.6	3.1	3.4	3.7	3.5	3.7	4	4.7	4.3	14	0.26	0.27	0.26
	PAae	8	7.8	5.8	7.2	5.6	6.1	6	5.9	5.7	4.7	5.4	6	4.1	3.5	4.7	4.6	4.1	4.3	4.3	5.2	5	15.5	0.39	0.4	0.39
	Grupo III	6.9	6.5	5.2	6.3	4.8	5.1	5.7	5.6	4.8	4.6	5	6.1	5.5	4.8	5.3	5.8	4.4	5.3	3.9	5.4	4.6	13.5	0.79	0.82	0.79
	Grupo IV	6.1	5.5	4.3	5.4	4.1	4.4	4.7	4.5	3.8	3.6	4.2	5.6	4.5	4.1	5.4	5	4.7	5.2	4.6	4.5	4.4	14	0	0	0
	Grupo V	6.7	7.4	5.8	6.5	5.4	6.3	6.5	6.4	6.7	5.3	5.7	7.2	5.9	5.6	7.7	6.4	5.7	6.6	6.8	5.5	5.6	14.8	0.23	0.23	0.23
	Grupo VI	7.8	7.2	5.9	7.2	5.7	6.1	5.9	6	5.6	5.5	5.7	6.8	5.9	5.7	6.2	5.9	5.1	6.3	5.6	5.3	7.1	12.2	0	0	0
<i>A. fasciatus</i>	35.3	32.5	30.4	29.3	30.3	30.8	30.3	31.8	30	30.6	30.9	33.8	29.4	28.4	28.9	28.8	32.1	40.7	29.2	30.1	32.7	22.6	0.82	0.85	0.82	

APÉNDICE 4. Diagrama de los principales grupos y linajes



North America and Central America *Aspityanax*

MEX= Mexico, BEL=Belice, GUA= Guatemala, S=Sabinos, A=Aguanaval, M=Mezquital, R= Rascon, T=Tamasopo, POL= Polochic, GRI= Grifalva, USU=Usumacinta, MAQ= Máquinas, MON=Montebello y MOT=Motagua.

4. CAPÍTULO II

Divergencia Adaptativa y Evolución en Paralelo en el género *Astyanax* Baird & Girard (1854) del Lago Catemaco (México)

“los genes mutan, los individuos son seleccionados y las especies evolucionan”

D. Hull 1975

Are the species Species Really Individuals?

“...Karl Marx señaló que todos los sucesos históricos ocurren dos veces, en primer lugar como una tragedia, la segunda vez como una farsa...”

Cita en el Pulgar del Panda

J. Gould 1980

4.1. INTRODUCCIÓN

Un objetivo importante en la biología evolutiva es entender cómo los diferentes taxones responden a presiones similares de selección. Es así que mientras algunos casos se pueden observar diferentes respuestas evolutivas bajo similares entornos selectivos [1, 2], en otros taxa se puede observar la evolución de un mismo fenotipo (como la forma del cuerpo) en poblaciones independientes como consecuencia de selección natural [3, 4].

Por otra parte, la divergencia observada en un rasgo está influenciada por dos tipos de selección, natural y sexual, lo que sugiere un posible papel de los dos tipos de selección en la especiación [2]. Estos ejemplos revelan el importante papel de la selección natural como moduladora de la evolución de caracteres, y sugieren que los patrones repetidos del cambio evolutivo en paralelo pueden contribuir a la diversificación en escalas más elevadas [1, 4].

Teniendo en cuenta esto, la plasticidad fenotípica, definida como los diferentes fenotipos producidos por un mismo genotipo en respuesta a diversas condiciones ambientales, podría amortiguar los efectos de la selección natural, lo que contribuye de dos maneras fundamentales en la evolución: el origen de nuevos caracteres complejos y el origen de nuevas especies [4]. Por otra parte, la plasticidad en un rasgo podría promover la selección de rasgos vinculados o correlacionados [5].

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

Evidencia teórica y empírica sugiere que individuos, poblaciones o especies ecológicamente idénticos no podrían cohabitar en una comunidad durante largos periodos de tiempo porque es probable que la competencia por recursos limitados conduzca a la extinción de uno o varios de los miembros de la comunidad. La coexistencia de especies en una comunidad es permitida por lo tanto, gracias a las diferencias en el uso de los recursos y el hábitat [6, 7]. Hay varios ejemplos en distintos grupos de peces en que se ha demostrado que la competencia puede promover cambios morfológicos (desplazamiento de caracteres), configurando la divergencia evolutiva de estos grupos [8-13]. La competencia también puede generar patrones de evolución en paralelo si las dos especies que compiten cohabitan en múltiples regiones geográficas [1, 14].

En términos generales los peces pueden presentar una morfología muy plástica, pero es importante resaltar que son ciertos caracteres los que suelen presentar una mayor plasticidad que otros, siendo los siguientes los más citados en la divergencia temprana entre especies: tamaño corporal, la forma del cuerpo, la forma de la cabeza, la posición de las aletas, caracteres tróficos y reproductivos [2, 3, 6, 9, 15-17]. En dichos cambios es esperable observar interrelaciones entre la morfología, el hábitat, la fisiología y comportamiento de forrajeo, en un contexto ecológico y evolutivo [18, 19]. Por lo tanto se puede esperar que la forma del cuerpo de los peces sea de especial importancia ecológica y evolutiva [19]. El ancho de la boca limita el tamaño máximo de las presas. El éxito en la captura en aguas abiertas también pueden ser promovido por la flexibilidad del cuerpo, en este sentido una forma corporal alargada y aletas relativamente extendidas suelen presentarse en formas limnéticas [20,

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

21]. Por ejemplo se ha reportado que la forma de la cabeza se correlaciona con el tipo de presas, así como con la técnica de captura en los pércidos [6]. Otro ejemplo son las diferencias en la morfología dental en los cíclidos, las cuales han sido relacionadas con diferencias en la dieta y el comportamiento [8]. Es así que la explotación de nuevos recursos, junto con las diferencias en la morfología pueden dar evidencia de la radiación adaptativa [22], y morfotipos ecológicos específicos en la utilización de ciertos recursos son indicadores de selección disruptiva la cual puede promover la especiación [23]. Por lo tanto, bajo ciertos escenarios, existe una relación positiva entre la coexistencia de parientes cercanos y la tasa de cambio en los caracteres morfológicos ecológicamente relevantes [6].

La radiación adaptativa suele ser acompañada por divergencias interespecíficas significativas en los tipos de recurso explotados y en los rasgos morfológicos y fisiológicos para aprovechar tales recursos, pudiendo entonces generar un gran número de nuevas especies y diversidad ecológica a través de múltiples episodios de especiación ecológica [4, 24].

La radiación adaptativa podría ser el resultado de tres procesos: 1) la selección natural divergente, por la que cada tipo de recurso condiciona a una especie a presiones de selección diferentes y favorece distintas combinaciones de rasgos para la alimentación, 2) la evolución de aislamiento reproductivo entre las poblaciones que explotan diferentes recursos, 3) el desplazamiento ecológico de caracteres, que se refiere a la competencia entre fenotipos

similares por recursos que conduce a la divergencia adaptativa, proceso impulsado en ambientes con limitación de recursos [22, 25, 26].

El desplazamiento de caracteres es la influencia de una especie en la evolución del uso de los recursos de otras especies como consecuencia de la competencia por los mismos [9], causando que especies simpátricas puedan divergir en los rasgos asociados con el uso de los recursos o la adquisición de pareja. Generalmente, este mecanismo es considerado como un mecanismo para explicar por qué las especies difieren (y por lo tanto coexisten), por lo que se ha postulado que juega un papel clave en la formación de nuevas especies [27]. Hay algunos criterios que se deben observar para determinar si existe desplazamiento de caracteres: que la variación existente tanto entre poblaciones como dentro de las mismas debe tener bases genéticas, que las diferencias deben reflejar cambios evolutivos, y que los morfotipos estén ligados al uso diferencial de los recursos [9].

Como ha sido observado, los efectos eco-fenotípicos o la evolución adaptativa llevan una forma corporal similar de poblaciones sintópicas en función de la existencia en un entorno similar [19]. En peces, el límite de velocidad y resistencia de nado están directamente relacionados con actividades como la captura de alimento, el escape de los depredadores y la reproducción. Por lo tanto, estos caracteres están sometidos a presiones de selección fuerte y pueden ser claves en la eficacia evolutiva de las especies [28]. Sin embargo, los efectos que pueden tener las diferencias en tamaño de

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

las aletas y/o las formas corporales sobre las capacidades de natación en las especies son poco conocidos [17].

La señal filogenética en algún aspecto del fenotipo puede definirse como el grado en que el parentesco filogenético entre taxa se asocia con su similitud fenotípica [25]. En otras palabras, una señal filogenética fuerte existe si taxa estrechamente relacionados fenotípicamente son más similares que los taxa que están filogenéticamente más remotos. Las señales filogenéticas se pueden buscar en todos los aspectos del fenotipo, incluyendo los rasgos con significado ecológico y fisiológico [29].

En el Lago Catemaco, centro-este de México, se había descrito una especie nueva carácido, *Bramocharax caballeroi* Contreras Balderas y Rivera-Teillery, 1985, que difiere de su especie simpátrica, *Astyanax aeneus* (Günther, 1860), en especializaciones tróficas. Más recientemente, a través de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas del género *Astyanax* [30], se observó que el género *Bramocharax* no se recuperó como monofilético, sino que corresponde a una evolución en paralelo de estos ecotipos en diferentes episodios en la historia evolutiva del género *Astyanax*, evidenciando la alta plasticidad fenotípica del género. Además, en este estudio se encontró evidencia de que este fenómeno podría haberse llevado a cabo más de una vez en el Lago de Catemaco, donde dos linajes independientes de *Bramocharax* fueron registrados. Como se mencionó anteriormente, los ecotipos, descritos como *Bramocharax sp.*, se basaron en las especializaciones tróficas como la forma de los dientes, la longitud del hocico y la forma y el

tamaño del cuerpo. En este sentido se puede argumentar la existencia de regímenes divergentes selectivos que se basaban en el uso de los recursos, lo que llevaba a una repartición de recursos y trajo consigo morfologías tróficas similares de forma independiente y en varias ocasiones en la historia evolutiva del grupo. Sin embargo, en este estudio previo [30] no se hace una comparación entre los dos ecotipos simpátricos en el lago. Por lo tanto, el presente estudio podría proporcionar una evidencia de diferenciación fenotípica asociada a un polimorfismo trófico que además puede tener consecuencias funcionales, como se ha registrado en otros grupos de peces modelo [11], y que de manera similar a otros grupos de teleósteos, podría definir su evolución [8, 12, 19].

En el presente estudio se evaluarán las diferentes hipótesis que pueden estar presentándose en el sistema de carácidos presente en el Lago de Catemaco, 1) Por un lado evaluaremos el papel de la divergencia adaptativa en el sistema *Astyanax* Vs *Bramocharax*, comparando la correspondencia entre la diferenciación morfológica y molecular, 2) adicionalmente esperaríamos observar la evolución en paralelo de morfotipos de linajes independientes, si estuvieran sometidos a fuertes presiones de selección, 3) así mismo evaluar estadísticamente si las diferencias morfológicas presentan bases genéticas, probando la existencia de señal filogenética en los datos morfométricos analizados, basado en el mapeo de datos morfométricos en una filogenia conocida (prueba descrita por Klingenberg y Gidaszewski [29]). Como se ha propuesto, señales filogenéticas claras son esperables cuando los rasgos se modifican bajo una evolución divergente, y las señales filogenéticas son

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

diluidas por procesos de homoplasia [29]; 4) y finalmente, es posible inferir la historia demográfica de los morfotipos de carácidos del lago Catemaco, utilizando métodos de genética de poblaciones y de coalescencia para sugerir un escenario evolutivo coherente con la variabilidad observada.

4.2. MÉTODOS

4.2.1 Muestreo y determinación taxonómica

Un total de 305 muestras fueron colectadas por medio del uso de atarraya en 12 localidades del Lago de Catemaco (Figura 1), en la región de Los Tuxtlas, una selva Reserva de la Biosfera (Sureste México). El muestreo incluyó a la localidad de Cuetzalapan, que corresponde a la desembocadura de un río que fluye hacia el lago. Además, se incluyó como "grupo externo" una población geográficamente aislada y perteneciente a un linaje genético profundamente divergente ($> 5\%$ *K81uf*, de divergencia mitocondrial [30]), que corresponde a la cuenca de Máquinas, dentro de la misma Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas.

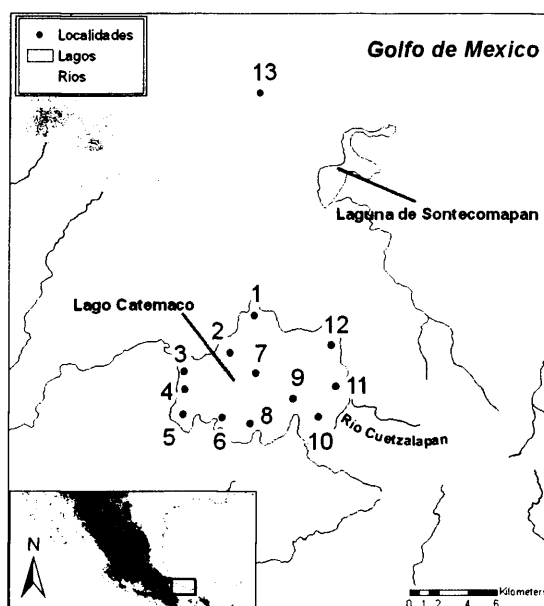


Figura 1. Mapa de las localidades muestreadas en el Lago Catemaco. 1) Isla Changos, 2) Isla Agatepec, 3) Finca, 4) Maxacapan, 5) Victoria, 6) Pozolapan, 7) Catemaco, 8) Ecuniapan, 9) Mimiagua, 10) Margarita, 11) Cuetzalapan y 12) Oxochapan, 13) Máquinas.

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

La determinación taxonómica de los carácidos del Lago de Catemaco se llevó a cabo con los siguientes caracteres diagnósticos de *Bramocharax caballeroi* y que le diferencian de los ecotipos *Astyanax aeneus*: a) fórmula dental, que en *Bramocharax* consistió en 3 o 4 dientes unicúspide, o al menos una proyección de la cúspide central de los dientes de la línea premaxilar externa, los cuales son tri o pentacuspidados, b) la línea interna con de 2 a 6 dientes multicuspidados; c) hueso dentario con de 3 a 6 dientes unicúspidados o bien, la cúspide central proyectada y el resto correspondiendo con dientes multicuspidados; d) maxilar con de 3 a 11 dientes multicuspidados.

4.2.2 Morfometría geométrica

Fueron capturadas imágenes de los individuos por una cámara de fotos digital, en las cuales se incluyó una escala en la misma orientación. Los individuos con deformaciones claras debido a la conservación fueron retirados de los análisis. Diecinueve *landmarks* homólogos y cinco *pseudo-landmarks* fueron digitalizados en coordenadas X e Y ("lms") con ayuda del programa TpsDig 1.4 [31]. Los *landmarks* y *pseudo-landmarks* fueron medidos en cada muestra como se ilustra en la Figura 2. Los datos de la forma corporal se obtuvieron mediante varios procedimientos: Análisis Procrustes Generalizado (GPA) [32], placas de cambio morfológico "*thin plate splines*" [33], y análisis de componentes principales (*principal component analysis* –PCA-) de los residuos Procrustes [34].

El GPA utiliza el método iterativo de traslación, rotación y escalamiento al tamaño de la unidad centroide ("centroid size") [32, 35] hasta que se reduce

al mínimo la “distancia Procrustes” (d) proveniente de los *landmarks* homólogos entre la media y cada ejemplar. La distancia de Procrustes se define como la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado entre dos o más configuraciones de *landmarks* registradas por Procrustes [33].

Después del procedimiento de escala, se obtiene un factor de escala, el tamaño del centroide (“centroid size”, CS), que es la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias entre el centroide (centro de gravedad del objeto) y cada landmark [33]. En ausencia de alometría, el CS es la única medida de talla que no se correlaciona con la forma [33, 36].

Los datos de la forma fueron obtenidos por medio de un ACP de las coordenadas de procrustes para formar un espacio de análisis [37-39] y usando “*thin-plate splines*” [33] para obtener deformaciones parciales (“*partial warps*”) y valores de componentes uniformes [40].

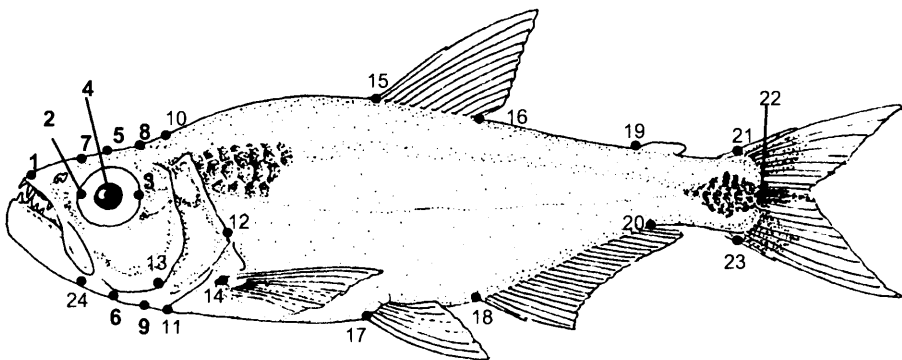


Figura 2. Posición de los 19 *landmarks* y de los cinco pseudo-*landmarks* utilizados en el presente estudio. Todos los *landmarks* fueron digitalizados desde la vista lateral izquierda de los ejemplares (descripción completa de cada landmark y pseudo-*landmarks* en la tabla 1).

Tabla 1. Descripción de *landmarks* (LMS) y pseudo-*landmarks*.

No. Landmark	Descripción	Elemento	Tipo
1	punta anterior de la maxila	Cráneo	L_2
2	medida anterior de la órbita	Cráneo	L_2
3	extensión posterior de la órbita	Cráneo	L_2
4	centro del orbital	Cráneo	L_1
5	proyección perpendicular de Landmark 4 en la vista dorsal	Cráneo	P
6	proyección perpendicular de Landmark 4 en la vista ventral	Cráneo	P
7	proyección perpendicular de Landmark 2 en la vista dorsal	Cráneo	P
8	proyección perpendicular de Landmark 3 en la vista dorsal	Cráneo	P
9	proyección perpendicular de Landmark 3 en la vista ventral	Cráneo	P
10	medida posterior de supra occipital	Cráneo	L_1
11	medida posteroventral del opérculo	Cráneo	L_1
12	medida del opérculo	Cráneo	L_2
13	margen inferior del preopérculo	Cráneo	L_2
14	inserción dorsal de la aleta pectoral	Cuerpo	L_1
15	inserción anterior de la aleta dorsal	Cuerpo	L_1
16	inserción posterior de la aleta dorsal	Cuerpo	L_1
17	inserción anterior de la aleta pélvica	Cuerpo	L_1
18	inserción anterior de la aleta anal	Cuerpo	L_1
19	inserción anteriodorsal de la aleta adiposa	Cuerpo	L_1
20	inserción posterior de la aleta anal	Cuerpo	L_1
21	unión dorsal de la aleta caudal y pedúnculo caudal	Cuerpo	L_1
22	medida posterior del pedúnculo caudal	Cuerpo	L_1
23	unión ventral de la aleta caudal y pedúnculo caudal	Cuerpo	L_1
24	proyección perpendicular de landmark 2 en la vista ventral	Cráneo	P

L= Landmarks, P= Pseudo-landmarks, los números corresponden a los tipos de landmarks propuestos por Bookstein (1981): 1) yuxtaposición de tejidos, 2) máximos de la curvatura.

4.2.3. Análisis estadísticos de Morfometría geométrica

Las diferencias por la variación de la forma y por grupo fueron evaluadas por varios métodos. La hipótesis de la existencia de diferencias en la forma media entre morfo-especies se abordó mediante una prueba de permutación MANOVA ($n = 999$) y se llevó a cabo utilizando el programa Morpheus [41]. Las pruebas de permutación son preferibles a la estadística paramétrica debido a que no se requiere una distribución normal, el tamaño de la muestra puede ser diferente, y porque pueden ser combinados *landmarks* con diferentes grados de libertad (de tipo 1 a tipo 3) [33, 36].

Las diferencias en el tamaño del centroide se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones post hoc. La variación alométrica se analizó por medio de un análisis de la forma en el espacio ("*form space analyses*") [38, 39], que utiliza registro de Procrustes, pero vuelve a introducir el logaritmo natural de CS ($\ln CS$) en la matriz de datos (que ahora comprende tanto la forma de coordenadas como el $\ln CS$) antes de implementar el PCA [38]. El logaritmo natural de CS por lo general tiene la mayor variación en cualquier columna de esta matriz, y el primer componente principal (PCA) de la distribución tamaño-forma (= forma) se encuentra a menudo estrechamente alineado con el tamaño. En esta situación, este método es muy adecuado para comparar trayectorias a escala [37-39] y un gráfico bidimensional de los PCA es útil para ilustrar la similitud o la disimilitud de las trayectorias alométricas. Este análisis se realizó con el programa MORPHOLOGIKA2, versión 2.5 [42].

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

Para evaluar el conjunto total de variación en la forma corporal entre grupos, se utilizó el análisis de variantes canónicas (CVA, al comparar varios grupos). Estos análisis de ordenación se usan comúnmente para capturar la variación multidimensional que es inherente a las formas corporales [35, 43]. Estos análisis multivariados reducen la cantidad de variación dentro de los grupos y expresan la variación entre los grupos en n dimensiones, donde n es el número de grupos menos uno. Se utilizaron gráficos multidimensionales para describir el morfo-espacio (es decir, el espacio abstracto en el que cada punto representa un individuo en particular) y para distinguir entre los grupos simultáneamente. Además, fue realizado un PCA de la forma del espacio de las configuraciones de la forma media y los resultados fueron proyectados en los tres primeros ejes de PCA. Por otra parte, en morfometría geométrica, el PCA, llamado análisis de la deformación relativa cuando se aplica a coordenadas Procrustes [33], se ha convertido en la herramienta estándar para el análisis de ontogenia y filogenia [39].

4.2.4 Extracción de ADN y secuenciación

El ADN genómico fue aislado utilizando métodos estándar de digestión con proteinasa K y extracción con fenol / cloroformo [44] y fue almacenado a 4 ° C. Fueron amplificadas muestras de ADN de 305 individuos que representan a todas las poblaciones (Figura 1) para dos fragmentos superpuestos del gen citocromo *b* (*Cytb*, en total 1 140 pb) a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados para el *Cytb* fueron Glu-F 5'GAAGAACCACCGTTGTTATTCAA y Thr-R 5'ACCTCCRATCTYC GGATTACA [45]. El perfil térmico de amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera:

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

95 ° C (5 min.), 35 ciclos de 94 ° C (45 sec.), 48 ° C (1 min.), 72 ° C (90 sec.), y 72 ° C (5 min.). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en reacciones de 10µL con 0,4 µM de cada cebador, 0,2 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1.5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 10ng del ADN molde. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% para confirmar la amplificación y purificados con el kit EXOSAPIT-PCR Product Clean-up (Usb). Ambos sentidos del *Cytb* fueron secuenciados y analizados en un secuenciador de ADN automático ABI 3730XL DNA Analyzer (servicio de secuenciación SECUGEN).

4.2.5 Análisis molecular y su correlación con la morfología

Secuenciación mitocondrial

Los estadísticos de genética de poblaciones, tales como el número de sitios polimórficos S , la diversidad de haplotipos Hd [46], la diversidad nucleotídica π [46] y el número medio de diferencias de nucleótidos por pares k [47] se calcularon utilizando el programa DnaSP 5.0 [48]. Se estimó una red de haplotipos con el algoritmo “Median-Joining Network”, generada usando el programa NETWORK v4.5.1.6 [49].

Flujo genético y estructura de la población

Se examinó el flujo de genes entre la combinación linajes + morfotipos por medio de la estimación de los valores de Φ_{ST} por pares y aplicando 1000x permutaciones para probar la significación tal como se aplica en el programa

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

Alerquin 3. 3.5.1.2 [50]. La estructura de la población se determinó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA), realizado según lo descrito por Excoffier [51]. Dos hipótesis fueron puestas a prueba, en la primera se evaluó la diferenciación jerárquica basada en morfotipos y en la segunda la diferenciación basada en linajes mitocondriales obtenida en la inferencia filogenética (figura 3). Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa ARLEQUIN 3. 3.5.1.2 [50].

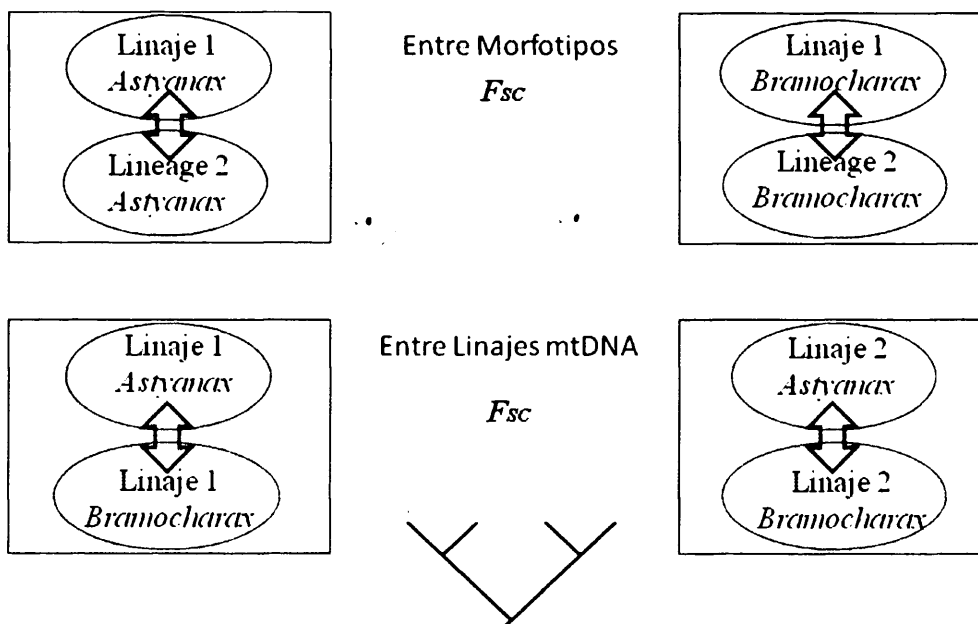


Figura 3. Esquema de las dos hipótesis probadas en el análisis molecular jerárquico (AMOVA jerárquica).

Correlación entre datos morfológicos y moleculares

La presencia de señal filogenética fue evaluada mediante la proyección de una topología obtenida previamente Ornelas-García *et al.* (2008) (figure 4),

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

en un morfo-espacio multivariado, utilizando MorphoJ v1.02b [52]. Se reconstruyeron las topologías de los morfotipos *Astyanax* y *Bramocharax* (figura 4), modificando la longitud de las ramas en Mesquite 2.72 [53], teniendo en cuenta las nuevas secuencias de *Cytb* obtenidas en el presente estudio. Las longitudes de las ramas se calcularon a partir de las divergencias de ML de las secuencias consenso para cada morfotipo y cada linaje. La idea básica de la proyección de filogenias en morfoespacios de dos dimensiones se remonta por lo menos a Bookstein *et al.* (1985). Rohlf demostró formalmente que las variables de morfometría geométrica pueden ser ajustados a una filogenia usando el cambio en parsimonia al cuadrado. Con la forma como un sólo carácter, las formas enteras son estados de carácter.

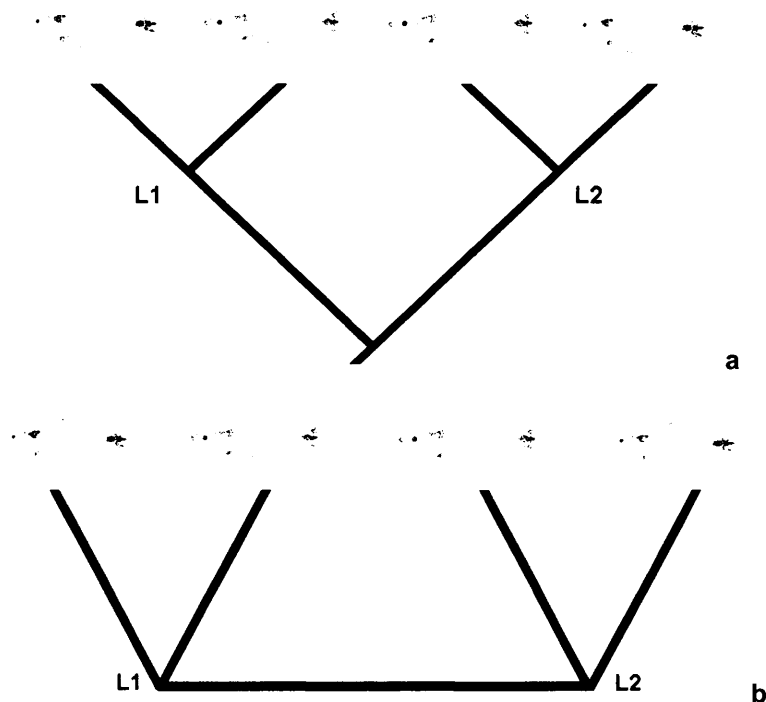


Figura 4. Hipótesis filogenética basada en Ornelas-García *et al.* (2008), topología enraizada (a) y topología sin enraizar (b).

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

La hipótesis nula es la ausencia total de señal filogenética, lo que corresponde a un intercambio al azar de los valores morfométricos entre las puntas de los árboles filogenéticos. Dado que las longitudes de los árboles sin enraizar pueden cambiar, tienden a ser más largas que las longitudes de los árboles enraizados obtenidos para los mismos datos, por lo que se utilizaron dos diferentes hipótesis filogenéticas (Figura 4). Los algoritmos para el cálculo de la longitud del árbol por medio del cambio en parsimonia al cuadrado normalmente utilizan árboles enraizados; dado que las longitudes de los árboles con y sin raíces pueden variar se han utilizado ambas topologías en la prueba (Figura 4).

Una señal filogenética fuerte significa que las formas de especies estrechamente relacionadas tienden a ser más similares entre sí que las formas de las especies más alejadas, o que especies estrechamente relacionadas ocupan la misma porción del espacio morfométrico, mientras que las especies más alejadas deberían localizarse en lugares diferentes y posiblemente distantes entre sí.

Adicionalmente, una correlación entre las distancias morfológicas y genéticas se calculó mediante una prueba de Mantel (1,000 permutaciones) [54]. Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa ARLEQUIN 3.5.1.2 [50].

4.2.6 Demografía Histórica

Las secuencias fueron agrupadas en nueve grupos diferentes (todas las secuencias, por morfotipos: *Astyanax*, *Bramocharax*, por linajes mitocondriales: Lineage 1, Lineage 2, y las combinaciones por linajes y morfotipos), de acuerdo con los diferentes escenarios propuestos anteriormente en el análisis jerárquico AMOVA (ver figura 3). Se utilizaron las dos pruebas más potentes para detectar desviaciones de la neutralidad debido a la expansión de la población: las pruebas de neutralidad F_S de F_u [55] y R_2 [56] (aplicando 1000 pseudo-réplicas en DnaSP). La F_S de F_u es especialmente sensible a un exceso de haplotipos raros [55, 56], para lo cual toma valores bajos o negativos con el exceso de mutaciones únicas causadas por la expansión de la población. R_2 utiliza la información de la segregación de los sitios y es más potente para un pequeño número de sitios en segregación [56]. La neutralidad también se evaluó mediante la probabilidad de obtener valores de irregularidad de r menor a la observada, calculada mediante el algoritmo coalescente en DnaSP 5.0 [48] con 1,000 pseudoréplicas, con una semilla aleatoria y sin asumir recombinación. Las pruebas de la neutralidad D de Tajima [57] y la de F_u y L_i [58] también se utilizaron para evaluar los cambios en la historia demográfica.

La demografía histórica de los grupos estudiados fue examinada usando análisis de “*mismatch*” en DnaSP 5.0 [48]. Estudios teóricos han demostrado que las poblaciones en el equilibrio demográfico prolongado

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

muestran una distribución de *mismatch* caótica (distribución multimodal), mientras que las poblaciones que han experimentado cuellos de botella o expansiones muestran un perfil unimodal (distribución de Poisson) [59, 60]. La distribución de *mismatch* se calculó para los seis grupos antes mencionados. El tiempo desde la expansión se estimó para las cuatro combinaciones de linaje + morfotipo. Los valores iniciales para el L1 del morfotipo *Astyanax* fueron $\theta_0 = 0.891$; $\theta_1 = 1000$, y $\tau = 1,584$ y para el L2 del morfotipo *Astyanax* fueron $\theta_0 = 0.719$; $\theta_1 = 1000$ y $\tau = 2,657$, para el L1 del morfotipo *Bramocharax* fueron: $\theta_0 = 0.872$, $\theta_1 = 1000$ y $\tau = 1,223$, por último para L2 del morfotipo *Bramocharax* fueron: $\theta_0 = 1.287$, $\theta_1 = 1000$ y $\tau = 2,572$. Para obtener el tiempo aproximado que corresponde con un posible evento de expansión se utilizó el criterio de expansión $\tau = 2ut$ obtenido en el análisis, donde u es la tasa de mutación por nucleótido y año, y t es el tiempo en generaciones desde la expansión. El parámetro τ es una estimación del tiempo después de la expansión (t) en unidades de mutación. Por lo tanto, es posible calcular la edad en que la expansión se produjo con la expresión $\tau = 2ut$, por lo que si despejamos $t = \tau/2u$ (modificado de Harpending et al. (1993)).

Los patrones de la demografía histórica también se pueden deducir de las estimaciones del tamaño efectivo de la población en el tiempo con el análisis de *Bayesian Skyline Plot* (BSP) [61] tal como se aplica en el programa BEAST 1.5.4 [62] para la estimación de las fluctuaciones en el tamaño efectivo de la población. Este método calcula una distribución posterior de tamaño efectivo de la población en el tiempo a través de los procedimientos MCMC, yendo hacia atrás hasta que el tiempo del ancestro común más reciente se alcanza. Se

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

aplicaron 10 intervalos agrupados coalescentes (m), y los valores estimados a priori para el modelo filogenético. Se utilizó el modelo de heterogeneidad de la tasa a través de las ramas HKY + Γ , particionando por las posiciones de los codones, separando las terceras posiciones de las primeras y segundas, asumiendo un reloj molecular estricto, con una distribución uniforme de la tasa de mutación con un valor inicial de del 0.7% por Ma y con un intervalo de 0.4% a 1.2% [30, 63, 64]. Se llevaron a cabo Cadenas de Markov durante 6×10^7 generaciones y se tomaron muestras cada 1000 generaciones, y el 10% de las muestras iniciales fueron descartadas como “*burn-in*”.

4.3 RESULTADOS

En términos generales, el morfotipo *Astyanax* fue el más abundante en el Lago de Catemaco, siendo capturados 207 individuos para este morfotipo y 97 para el morfotipo *Bramocharax*. Además, no fue posible probar una relación entre los morfotipos y sus localidades en el Lago de Catemaco, más aún no hubo diferencias en la distribución espacial a lo largo del lago de Catemaco entre los dos linajes mitocondriales.

4.3.1 Análisis de morfología geométrica

Los caracteres merísticos fueron utilizados para discriminar entre *Astyanax* y *Bramocharax*. Sin embargo, se detectaron algunos individuos con rasgos intermedios.

Diferencias de la forma entre los dos morfotipos

Las diferencias medias de la forma se compararon con MANOVAs: una comparación de forma simultánea para todos los grupos ($P < 0,001$), y el otro la realización de comparaciones por pares (Figura 5). Este análisis mostró diferencias significativas en la forma entre los dos morfotipos, y también en las comparaciones con la población Máquinas incluidos en el análisis. Las diferencias entre los morfotipos *Astyanax* y *Bramocharax* fueron principalmente en la altura vertical del cuerpo (fusiforme el morfotipo *Bramocharax*, la figura 5), en el contorno de la cabeza y la orientación del hocico. Por otra parte, existen

diferencias en la configuración espacial de los *landmarks* (LMS) 3, 12, 13 y 14 entre los grupos relacionados con el tamaño de los ojos y el tamaño de la cabeza, donde en el morfotipo de *Bramocharax* los *landmarks* se estiran con respecto a los morfotipos *Astyanax* y Máquinas. Además, la profundidad de pedúnculo (LMS 19-21) fue mayor en los morfotipos *Astyanax* (Lago de Catemaco y de las poblaciones Máquinas) que en los morfotipos *Bramocharax*, y la longitud de la aleta anal (LMS 18-20) fue mayor en estos últimos.

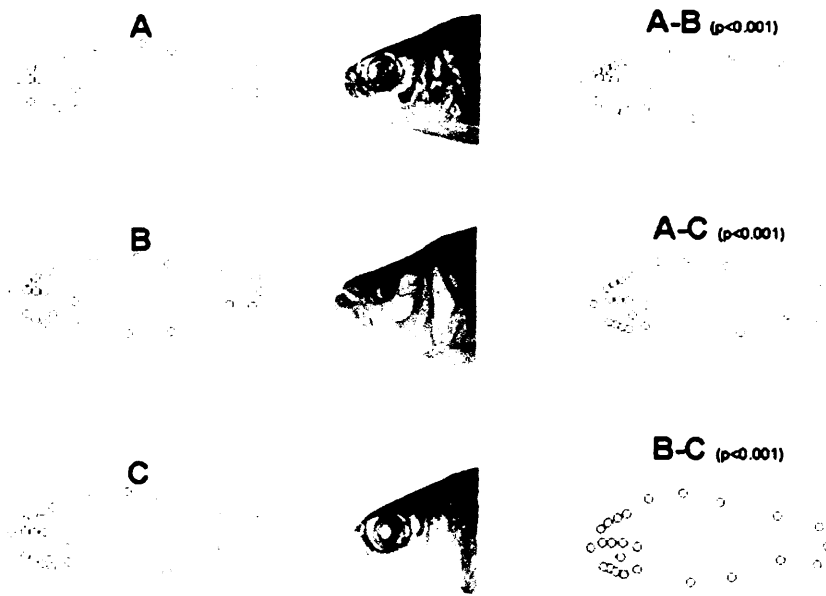


Figura 5. Comparaciones de la forma media representadas como cuadrículas de transformación. Todas las comparaciones entre los morfotipos fueron altamente significativas ($P < 0.001$).

Por otra parte, en el análisis canónico de los datos estandarizados, mostró que no hubo diferencias significativas entre los dos linajes mitocondriales del morfotipo *Astyanax* (véase más adelante) del Lago de Catemaco (Tabla 2), donde se puede observar la superposición entre los dos

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

linajes en el gráfico (figura 6). Por otra parte, hubo una ligera diferenciación entre los dos linajes de *Bramocharax*, sin embargo estas diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$). En el análisis de CVA también fue posible observar diferencias claras entre los dos morfotipos, con poco solapamiento entre ellos.

Tabla 2. Distancias Procrustes entre los grupos

	L1_Astyanax	L1_Bramocharax	L2_Astyanax
L1_Bramocharax	0.0163		
L2_Astyanax	0.0044	0.0161	
L2_Bramocharax	0.0181	0.0112	0.017

Valores significativos están en negritas y cursivas

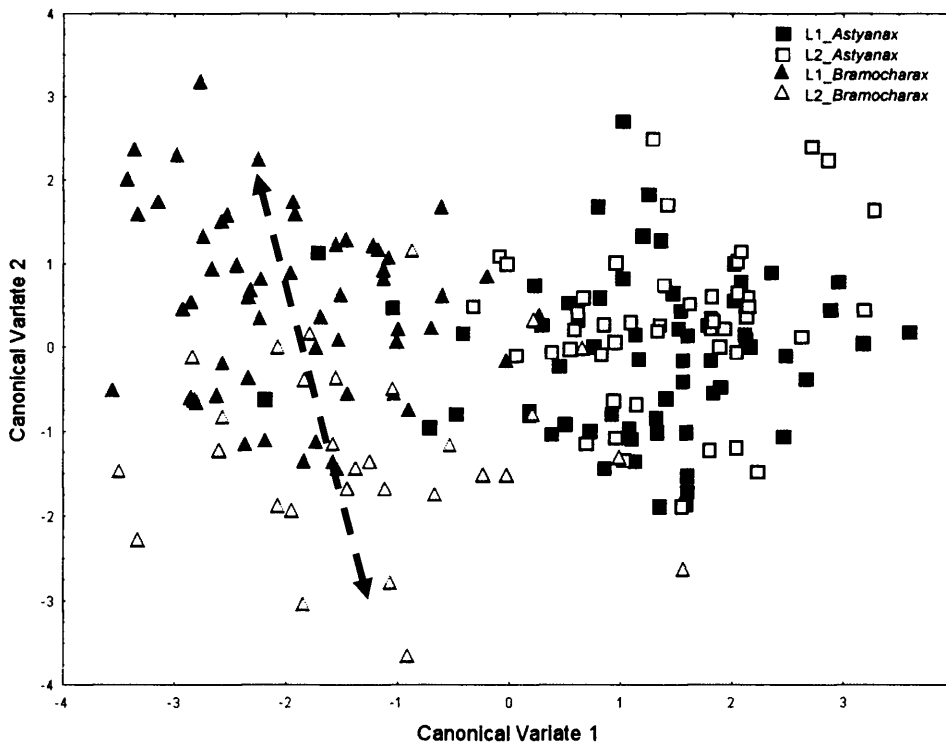


Figura 6. Gráfico con las dos primeras variables canónicas resultantes de las distancias Procrustes estandarizadas.

Diferencias de tamaño entre los morfotipos

La ANOVA de tamaño entre los grupos mostró diferencias significativas entre la combinación linajes + morfología ($F = 3,192$ 31.766 , $P < 0,00000$). En la figura 6 se muestran los resultados de los análisis de varianza, donde el Linaje 2 del morfotipo *Bramocharax* mostró los especímenes más grandes, que fueron significativamente diferentes del resto de *Astyanax* e incluso del Linaje 1 del *Bramocharax* ($MS = 7.85$, $gl = 192$, $P = 0.016$ después de la corrección de Bonferroni). En todos los casos los morfotipos de *Astyanax* fueron los más pequeños con una talla media (Tamaño del Centroide) de $9.71\text{cm} \pm 0.35$ para el linaje 1 y $9.72\text{cm} \pm 0.40$ (figura 7) para el Linaje 2, mientras que el morfotipo *Bramocharax* mostró mayor talla con una media de 12.7 ± 0.37 para el linaje 1 y $14.62\text{cm} \pm 0.51$ para el Linaje 2.

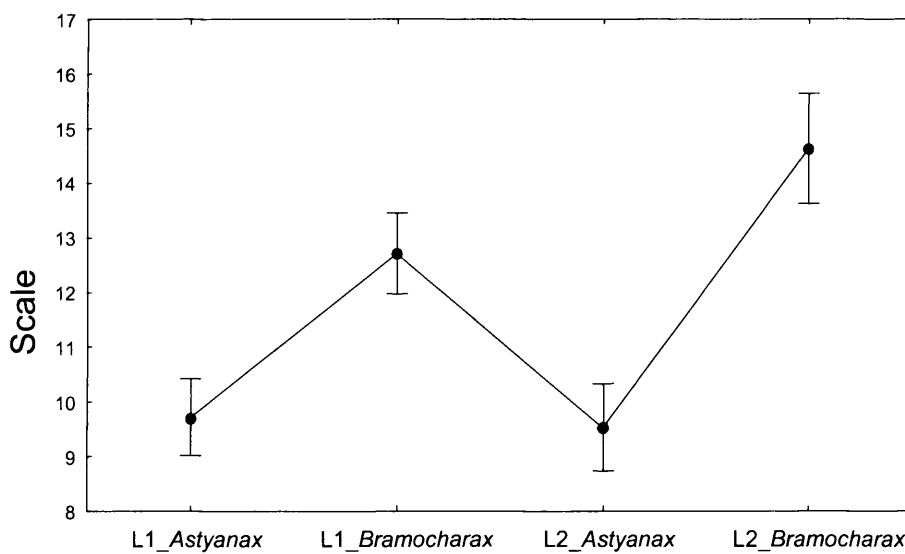


Figura 7. ANOVA del tamaño del Centroide (CS). Los círculos indican los valores medios y las barras verticales corresponden al 95% de los intervalos de confianza.

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

En la relación alométrica, relacionando la forma del cuerpo Vs. Tamaño del Centroide (CS), la regresión mostró que los individuos incluidos en el Linaje 2 (véase más arriba de los linajes mitocondriales) del morfotipo *Bramocharax*, fueron los que alcanzaron el mayor tamaño en comparación con los demás grupos analizados, de forma similar a la ANOVA del CS. Además, hubo un desplazamiento entre las trayectorias de crecimiento de los dos morfotipos, siendo la del morfotipo *Bramocharax* la que comenzó su crecimiento en tallas más grandes y se proyectó más allá de los dos linajes de morfotipos *Astyanax*. La prueba estadística corroboró estas diferencias entre las dos trayectorias de los dos morfotipos (véase Tabla 3, MANCOVA).

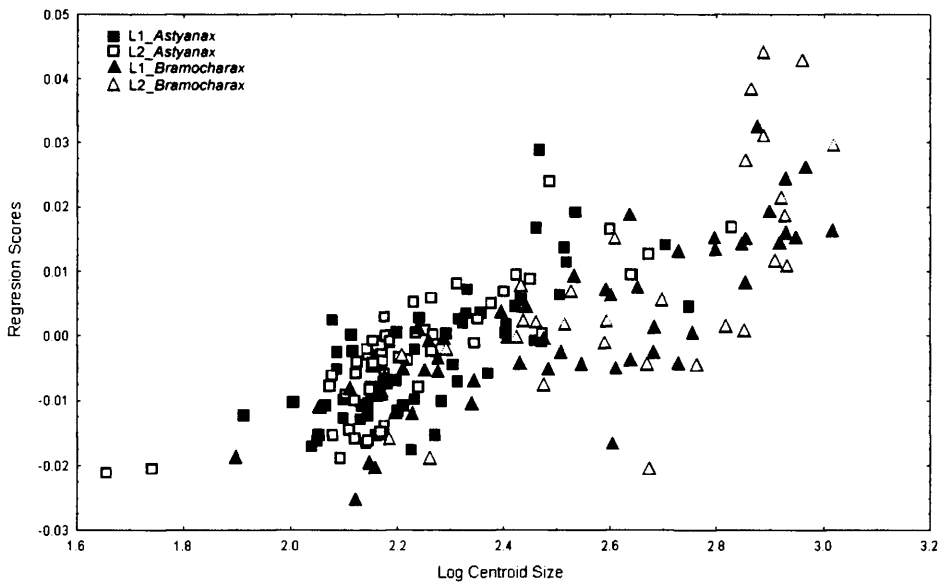


Figura 8. Regresión entre la forma del cuerpo (coordenadas de los valores Procrustes) Vs el logaritmo del tamaño del Centroide en cuatro grupos.

Tabla 3. La MANCOVA llevada a cabo para la comparación entre morfotipos y tamaño del Centroide en el sistema de *Astyanax*.

	Test	Value	F	Effect	Error	P
Intercept	Wilks	0.27266	9.33643	46	161	0.000000
Morphotypes	Wilks	0.64518	1.92482	46	161	0.001527
CS	Wilks	0.30161	8.10415	46	161	0.000000
Morphotypes*CS	Wilks	0.61568	2.18477	46	161	0.000186

4.3.2 Análisis moleculares y su correspondencia con la morfología

Se obtuvieron un total de 304 secuencias del *Cytb* (1140 pb), de los cuales 136 haplotipos fueron únicos (GenBank número XXXX-XXXX). Se observó una diversidad mitocondrial relativamente alta (π y HD, Tabla 4), con un total de 149 sitios variables (66 sitios parsimoniosamente informativos) y con una media alta de diversidad nucleotídica ($\pi = 0.933 \pm 0.010$) para el conjunto de datos completo. Sin embargo, hubo una falta de correlación entre la divergencia genética y la diferenciación morfológica. En la red de haplotipos no fueron recuperados por separados los morfotipos, compartiendo haplotipos entre los dos morfotipos *Astyanax* y *Bramocharax*, sin embargo, dos linajes distintos fueron recuperados (Figura 9).

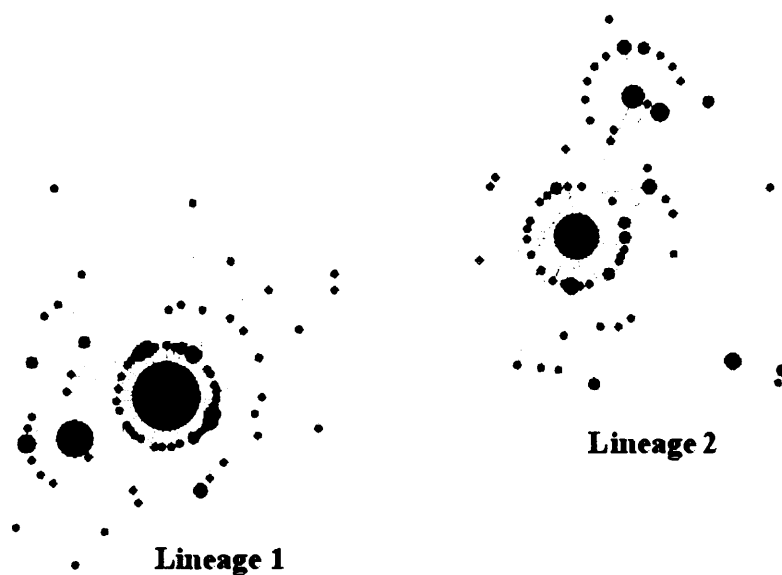


Figura 9. Red de haplotipos del gen *Cytb* entre los morfotipos, *Bramocharax* (azul) y *Astyanax* (verde).

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

El primer linaje (Linaje 1, figura 5) incluyó 186 individuos, con 75 haplotipos diferentes y de los cuales 121 correspondían con ejemplares de *Astyanax* (60 haplotipos diferentes) y 65 con *Bramocharax* (24 haplotipos diferentes), mientras que en el segundo linaje, se incluyeron 118 individuos con 61 diferentes haplotipos, de los cuales 86 ejemplares eran de *Astyanax* y 32 *Bramocharax*. En términos generales el linaje 2 mostró una mayor diversidad nucleotídica que el linaje 1 (L2 $\pi = 0.003 \pm 0.0002$, y L1 $\pi = 0.002 \pm 0.0001$). Así mismo presentó un mayor número promedio de sitios polimórficos (L2 $k = 3.49$ y L1 $k = 2.34$) y una mayor diversidad genética (L2 $Hd = 0.93 \pm 0.018$).

Tabla 4. Variación genética del citocromo b en el sistema de carácidos del Lago Catemaco; n = número de individuos analizados, h = número de haplotipos, S = número de sitios polimórficos, Hd = diversidad genética, k = media de las diferencias por pares de nucleótidos, π = la diversidad de nucleótidos.

Población		<i>Cytb</i> (ADNmt)
L1 $n = 186$	n / h	186/75
	S	97
	$H_d (SD)$	0.849 (0.025)
	k	2.34426
	$\pi(SD)$	0.00206 (0.00015)
L2 $n = 118$	n / h	118/61
	S	70
	$H_d (SD)$	0.932 (0.018)
	k	3.49153
	$\pi(SD)$	0.00306 (0.00020)
L1_ <i>Astyanax</i> $n = 121$	n / h	121/60
	S	75
	$H_d (SD)$	0.879 (0.028)
	k	2.47534
	$\pi(SD)$	0.00217 (0.00019)
L1_ <i>Bramocharax</i> $n = 65$	n / h	65/24
	S	41
	$H_d (SD)$	0.785 (0.047)
	k	2.09519
	$\pi(SD)$	0.00184 (0.00023)

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

L2_ <i>Astyanax</i> n = 86	n / h	86/48
	S	57
	H_d (SD)	0.937 (0.020)
	k	3.37592
	π (SD)	0.00296 (0.00022)
L2_ <i>Bramocharax</i> n = 32	n / h	32/21
	S	34
	H_d (SD)	0.921 (0.040)
	k	3.85887
	π (SD)	0.00338 (0.00042)
<i>Astyanax</i> n = 207	n / h	207/108
	S	118
	H_d (SD)	0.948 (0.011)
	k	7.05839
	π (SD)	0.00619 (0.00018)
<i>Bramocharax</i> n = 97	n / h	97/45
	S	76
	H_d (SD)	0.896 (0.024)
	k	6.62779
	π (SD)	0.00581 (0.00039)
Todos n = 304	n / h	304/136
	S	149
	H_d (SD)	0.933 (0.010)
	k	6.93751
	π (SD)	0.00609 (0.00017)

Al comparar dentro de linajes entre los morfotipos, el linaje 2 del morfotipo *Bramocharax* fue el que presentó los valores más altos en el número promedio de sitios polimórficos ($k = 6,178$), más del doble en comparación con los dos morfotipos de Linaje 1. Del mismo modo la diversidad nucleotídica y la diversidad genética fueron mayores que para los otros grupos ($\pi = 0.005 \pm 0.0004$ y $H_d = 0.921 \pm 0.04$).

Flujo genético y estructura poblacional

En el análisis de diferenciación entre los morfotipos (Φ_{ST}), *Astyanax* Vs *Bramocharax*, no se obtuvieron valores significativos entre los pares de comparaciones (tabla 5) y se presentaron los menores valores de diferenciación en las comparaciones entre morfotipos dentro de su Linaje, esto es, que presentaron una menor diferenciación los *Bramocharax* del Linaje 1 con respecto a los *Astyanax* del mismo linaje, que con los *Bramocharax* del Linaje 2. Por el contrario, los valores más altos y significativos de las Φ_{ST} fueron cuando se comparó entre los linajes mitocondriales.

Tabla 5. Valores de Φ_{ST} del sistema de carácidos en el Lago Catemaco

	L1_ <i>Astyanax</i>	L2_ <i>Astyanax</i>	L1_ <i>Bramocharax</i>
L1_ <i>Astyanax</i>	-		
L2_ <i>Astyanax</i>	0.75172	-	
L1_ <i>Bramocharax</i>	0.00107	0.75682	-
L2_ <i>Bramocharax</i>	0.75896	-0.00973	0.76834

Los valores significativos ($P < 0.001$) después de la corrección secuencial de Bonferroni están en negritas

En el análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) no se detectaron valores significativos entre las varianzas considerando los morfotipos (*Astyanax* Vs *Bramocharax*), sin embargo fue significativo cuando comparamos por linajes mitocondriales (Tabla 6). En el AMOVA considerando los morfotipos encontramos una diferenciación significativa entre linajes dentro de morfotipos (por ejemplo, entre Lineage 1 y 2 de *Astyanax* y Lineage 1 y 2 de *Bramocharax*) y también dentro de morfotipos (40.51%, $\Phi_{ST} = 0.5949$).

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

En el AMOVA entre los linajes mitocondriales obtenidos la mayor parte de la variación detectada se debió a las diferencias entre los grupos (75.78%, $\Phi_{CT} = 0.7578$, $P < 0,0000$), sin embargo y de manera similar con la AMOVA por morfotipos, no hubo diferencias significativas entre los morfotipos dentro de los linajes (por ejemplo, las diferencias no fueron significativas entre el Linaje 1 de *Astyanax* y Linaje 1 de *Bramocharax*) (tabla 6).

Tabla 6. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) jerárquico, basado en las secuencias de de *Cytb* evaluando dos hipótesis, 1) diferencias entre morfotipos y 2) entre linajes mitocondriales.

Grupos	Entre grupos		Entre Poblaciones		Dentro poblaciones	
	%	Φ_{CT}	%	Φ_{SC}	%	Φ_{ST}
Morfotipos						
<i>Astyanax</i> (L1 X L2)						
<i>Bramocharax</i> (L1 X L2)	-66.62	-0.6662	126.12	0.7559	40.51	0.5949
Linajes mitocondriales						
L1 (A X B)	75.78	0.7578	-0.07	-0.00301	24.29	0.7570
L2 (A X B)						

L1= Linaje 1, L2= Linaje 2, A = *Astyanax*, B = *Bramocharax*. En negritas los valores significativos ($P < 0.001$).

Correlación entre la morfología y los datos moleculares

La reconstrucción del cambio evolutivo de la forma en la filogenia (Figura 10), mostró una clara evidencia de que nuestros datos presentan altos niveles de homoplasia, donde se pudo observar de forma gráfica, la evolución paralela de *Bramocharax* en los dos linajes mitocondriales de forma independiente, mientras que en el caso del morfotipo *Astyanax* ambos linajes presentes en el Lago Catemaco se han mantenido casi indiferenciados. La prueba utilizando permutaciones mostró la ausencia de señal filogenética entre

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

los dos linajes independientes que se han separado del morfotipo *Bramocharax*, el cual presenta una mayor especialización para el Lago (forma limnética), y por tanto ambas topologías, enraizada y sin enraizar, presentaron valores no significativos lo que rechaza la hipótesis nula de señal filogenética en los datos morfológicos para estimar la historia evolutiva ($P > 0.05$).

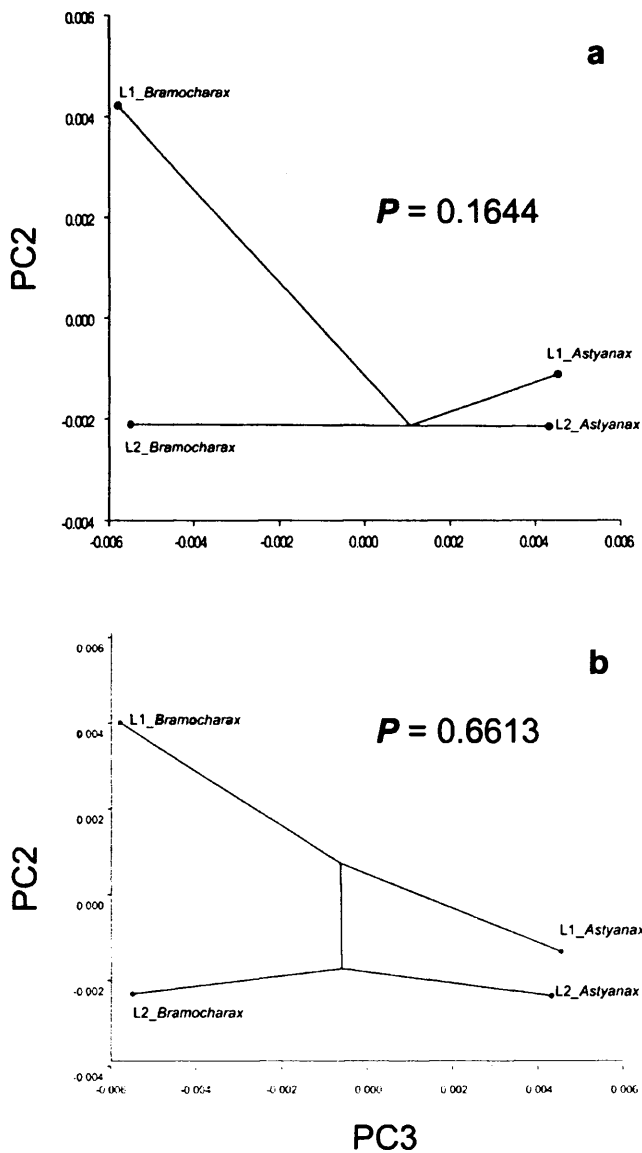


Figura 10. Árbol filogenético (enraizado) superpuesto en el gráfico del segundo y tercer componente del análisis de ordenamiento de las medias morfológicas.

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

A pesar de que se observan diferencias entre los dos linajes del morfotipo de *Bramocharax*, estas diferencias pueden ser atribuidas a las divergencias en tamaño anteriormente mencionadas, donde los individuos del morfotipo *Bramocharax* del linaje 2 presentaron mayores tamaños de cuerpo, aún así no se descarta que pueda haber también diferencias en la forma por lo que se podrían incluir un mayor número de ejemplares en estudios posteriores.

Cabe resaltar que aunque son un poco divergentes entre sí, los dos linajes de *Bramocharax* divergieron hacia la misma región del morfo espacio, lo cual puede corresponder a un patrón de evolución en paralelo entre dos linajes independientes. A diferencia del patrón observado en la forma de *Astyanax*, la cual pareciera mantenerse entre los dos linajes mitocondriales, lo que da evidencia de una diversificación morfológica no simétrica entre los carácidos en el lago.

En la prueba de Mantel hubo una correlación negativa ($r = -0.020737$, $p > 0.05$ gl 196) pero no significativa entre las divergencias genéticas (usando el modelo HKY+ Γ) y morfológicas (distancias Procrustes).

4.3.3 Demografía histórica

Todos los conjuntos de datos mostraron desviaciones de la neutralidad (tabla 7), sin embargo fueron observadas, tanto distribuciones unimodales como bimodales. En una distribución unimodal corresponde a un proceso de expansión repentina o crecimiento en la población estudiada [60 1603],

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

mientras que una distribución bimodal implica una divergencia espacial con una baja frecuencia de migración entre las poblaciones derivadas [65 1927].

Tabla 7. Prueba estadística de la neutralidad, y estimas de los parámetros demográficos del sistema de carácidos del Lago Catemaco

	<i>D</i>	<i>F_s</i>	<i>R₂</i>
	-	-	
L1	2.680	121.641	0.011
	-		
L2	2.366	-77.260	0.022
	-		
L1_ <i>Astyanax</i>	2.636	-90.375	0.014
	-		
L1_ <i>Bramocharax</i>	2.495	-19.145	0.027
	-		
L2_ <i>Astyanax</i>	2.306	-55.671	0.025
	-		
L2_ <i>Bramocharax</i>	2.008	-13.393	0.045
	-		
<i>Astyanax</i>	2.039	125.465	0.028
	-		
<i>Bramocharax</i>	1.819	-24.741	0.039
	-		
Todos	2.179	-34.516	0.022

D= *D* de Tajima, *F_s*= Prueba estadística de Fu *F_s* (1997), *R₂* = Prueba de Ramos-Onsins y Rozas (2002). En negrita valores de *P* < 0.001, y cursiva para valores de *P* < 0.05.

Se obtuvo una distribución bimodal para el conjunto completo de datos (figura 11A), así como para los subconjuntos agrupando por morfotipos *Astyanax* y *Bramocharax* (figura 11C y E). Mientras que las distribuciones fueron unimodales cuando se consideró la distribución independiente por linaje mitocondrial (figura 11B y D). Los gráficos bimodales podrían ser un artefacto de la agrupación de los ejemplares correspondientes a diferentes grupos

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

“naturales”, es decir, incluir artificialmente en un grupo a dos poblaciones divergentes.

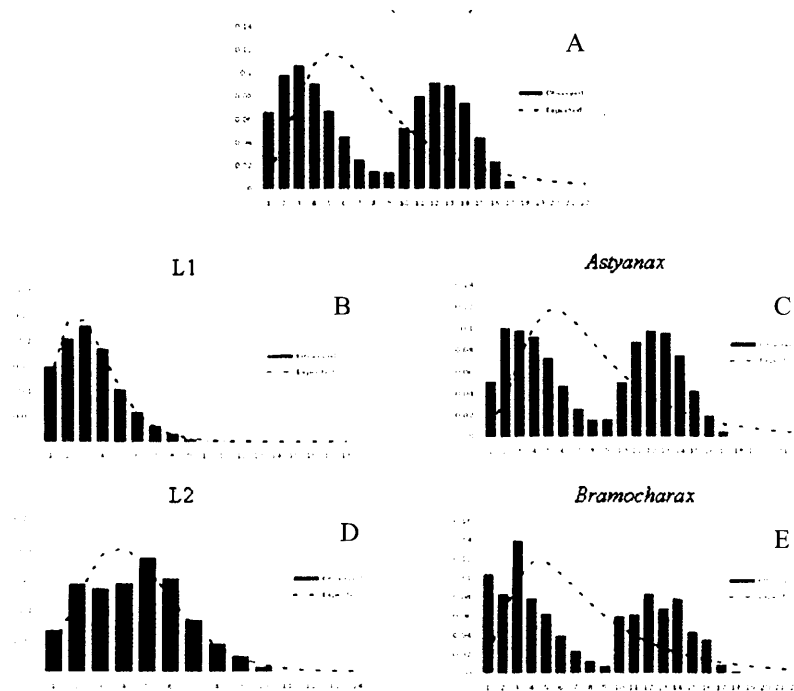


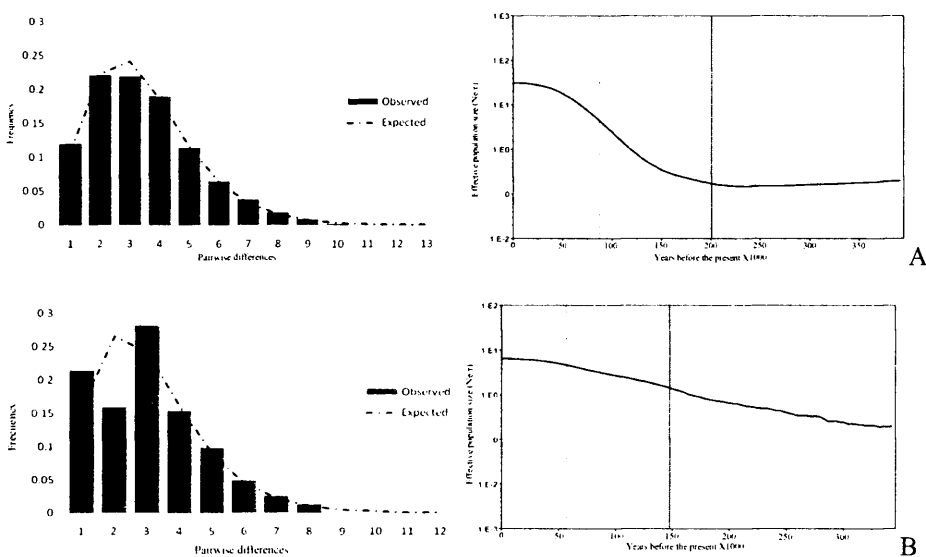
Figura 11. Distribución de *mismatch* basada en las secuencias obtenidas para el *Cytb*. A) Todos los ejemplares analizados en un sólo grupo (n=305), B) Linaje 1 (incluyendo los morfotipos *Astyanax* y *Bramocharax*, n=186), C) Datos agrupados por el morfotipo *Astyanax* (incluyendo los dos linajes mitocondriales de este morfotipo, n=207), D) Linaje 2 (incluyendo los morfotipos *Astyanax* and *Bramocharax*, n= 118), E) Datos agrupados por el morfotipo *Bramocharax* (incluyendo los dos linajes mitocondriales de este morfotipo, n=97).

Se observaron distribuciones unimodales cuando se analizó de manera independiente los linajes en combinación con el morfotipo (L1_*Astyanax*, L2_*Astyanax*, L1_*Bramocharax* y L2_*Bramocharax*) (figura 12), obteniendo incluso patrones similares para las estimas en los tiempos de expansión con el método de BSP. Se observaron dos diferentes expansiones, correspondientes a dos diferentes episodios temporales tanto para la estima con base en la tasa de mutación para el *Cytb* propuesta por Harpending (1994) y Rogers y

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

Harpending (1992) [59, 60], así como con la aproximación de bayes BSP [61], donde para los dos linajes mitocondriales estudiados los más recientes correspondieron al morfotipo *Bramocharax*.

En este sentido la expansión más reciente correspondiente al Linaje 1 en el morfotipo *Astyanax* ocurrió hace 99,248 años, mientras la estima con BSP para el mismo linaje mostró una media de hace 242,900 años (95% intervalos de confianza (IC) 93,000 a 457,000 años) (figura 12A). Mientras que para el mismo linaje del morfotipo *Bramocharax* ocurrió hace 76,629, mientras que la estima con el BSP fue aproximadamente 169,000 años atrás (IC 56,587 a 345,800 años). Como se puede observar en los datos antes presentados, la expansión del linaje 1 de la forma *Bramocharax* es ligeramente más reciente que su grupo hermano de la forma *Astyanax*.



Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

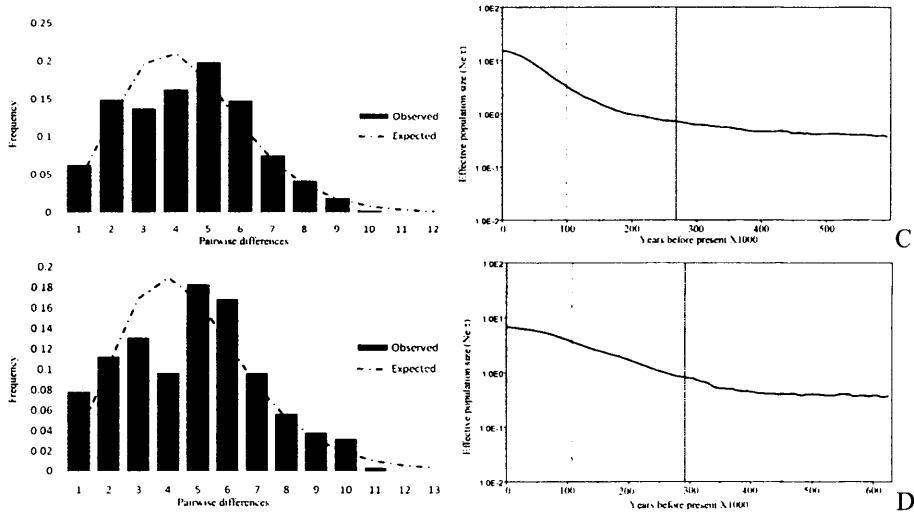


Figura 12. Distribución Mismatch basada en secuencias del *Cytb* para cada uno de los morfotipos y linajes y su correspondiente al análisis de *Bayesian Skyline Plots* (BSP). A) Linaje 1_*Astyanax*, B) Linaje 1_*Bramocharax*, C) Linaje 2_*Astyanax* y D) Linaje 2 *Bramocharax*.

La expansión más antigua mostró un patrón similar que la primera, donde el linaje 2 del morfotipo *Bramocharax* fue contemporáneo al linaje 2 de *Astyanax*. El Linaje 2 de *Astyanax* presentó una expansión hace 166,478 años y para la estima con BSP la media fue de 301,700 años atrás (IC 98,000 a 599,000). Mientras que la expansión del Linaje 2 de *Bramocharax* ocurrió hace 161,152 años y para el BSP, con una media de hace 326,000 años (IC 107 400 a 630 000 años).

4.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.4.1 Análisis de morfometría geométrica

La existencia de especies con morfologías extremas en carácidos se puede explicar con base en adaptaciones ecológicas, en la que los morfotipos limnéticos y la modificación en rasgos tróficos ha precedido cambios importantes en la evolución morfológica del grupo [66]. En este estudio se postula que el sistema de carácidos presente en el Lago Catemaco es coherente con este patrón, sobre todo porque se ha observado diferencias morfológicas significativas entre los morfotipos presentes, y donde el morfotipo limnético (*Bramocharax*) ha evolucionado más de una vez en linajes mitocondriales independientes y las adaptaciones tróficas podrían estar asociadas a su divergencia morfológica.

La competencia por alimento entre los individuos fenotípicamente similares podría implicar el desplazamiento entre los caracteres asociados entre formas limnéticas y bentónicas [9], donde la evolución morfológica puede ser promovida por interacciones interespecíficas [1], y la selección natural divergente podría explicar las diferencias morfológicas como consecuencia de adaptaciones a los entornos ecológicos distintos [1, 26]. Este patrón de divergencia adaptativa también ha sido reportado por otra fauna lacustre en peces de agua dulce, donde se pueden encontrar las formas limnética y bentónica [4, 12, 15, 19, 20, 67-70]. Teniendo en cuenta esto, es importante destacar que las características tróficas se han caracterizado por ser muy

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

plásticas [8], y algunos autores han mostrado que la consideración de estas características tróficas en la taxonomía clásica puede dar lugar a interpretaciones erróneas, como en este caso [11], hasta el punto de considerar distintos ecotipos como diferentes géneros [71].

El morfotipo limnético corresponde al morfotipo *Bramocharax*, con un cuerpo fusiforme, posiblemente adaptado a aguas abiertas consistente con las expectativas teóricas para los peces adaptados a una la alta velocidad de natación mantenida [14, 18], y muestra además los siguientes caracteres diagnósticos: dientes unicúspides, un hocico hacia arriba y proyectado y una joroba fuerte en la vista dorsal, que es muy abrupta justo después del fin de la cabeza, si bien se han reportado branquispinas más largas con respecto a otras especies de *Bramocharax* [71]. Mientras que *Astyanax* corresponde a un morfotipo más generalista, que presenta un cuerpo más profundo, hocico romo y dientes multicúspides en la maxila y el dentario. Por otra parte, se observó en un análisis preliminar del contenido estomacal, que el morfotipo *Astyanax* podría estar asociado al bentos debido a la mayor presencia de moluscos en su dieta, mientras que los ejemplares de *Bramocharax* mostraron una mayor frecuencia de arañas, lo que podría dar prueba de ser cazadores de superficie (los datos no se muestran). Por lo tanto, se ha asumido que todas estas diferencias en la morfología podrían estar relacionadas con diferencias en la ecología trófica [12, 20, 72-74].

Se ha propuesto en otros modelos que los morfotipos limnéticos y bentónicos se correlacionan con el tamaño del cuerpo [26]. En este estudio se

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

han observado diferencias significativas en el tamaño corporal, donde los morfotipos *Bramocharax* eran significativamente más grandes que morfotipos *Astyanax* (figura 6). En consecuencia, se propone que la competencia interespecífica podría explicar también las diferencias observadas en el tamaño, ya que las formas corporales altas y de tamaño pequeño podrían estar relacionadas con una mayor maniobrabilidad, el perfil del cuerpo recto y un mayor tamaño pueden incrementar la eficacia natatoria en ambientes pelágicos [18, 73]. Por otra parte, estas diferencias en el uso del hábitat podrían estar relacionadas con la alimentación [4, 14, 68], así como con la selección sexual [4, 26].

Independientemente de las diferencias de tamaño entre los morfotipos, un proceso heterocrónico se podría sugerir para el morfotipo *Bramocharax*, definido como un cambio en el tiempo de aparición y en la tasa de desarrollo de los caracteres presentes en relación a su ancestro [75]. Este estudio soporta lo anterior, principalmente porque la trayectoria de crecimiento del morfotipo *Bramocharax* está ligeramente desplazada en comparación con el morfotipo *Astyanax* (figura 8). Por otra parte, al comparar las pendientes entre ellos (ver el análisis MANCOVA), se observaron diferencias significativas. Por lo tanto, y además de que podría haber un fuerte componente de adaptación ecológica en el sistema de carácidos del Lago de Catemaco, en este estudio se observa evidencia que sugiere un mecanismo heterocrónico que estaría íntimamente vinculado con los procesos evolutivos en este caso de estudio, de manera similar a lo que se ha sugerido en otros carácidos [66]. Posteriores estudios que describan las posibles diferencias entre series ontogenéticas de los dos

morfotipos proporcionarían una mejor comprensión del mecanismo de diversificación del grupo.

4.4.2 Estructura genética mitocondrial y su correspondencia con la morfología

La evidencia mitocondrial, muestra dos linajes diferentes, sin embargo, en contradicción con lo que se ha reportado para otros peces de agua dulce [16, 76, 77], no se observa correspondencia entre la forma del cuerpo y los haplotipos del gen *Cytb*.

Contrario a la diferenciación morfológica observada, no se encontraron diferencias genéticas significativas entre los morfotipos, ni en las comparaciones de Φ_{ST} ni en la AMOVA jerárquica. Sin embargo, diferencias significativas fueron observadas entre los dos linajes mitocondriales presentes en el lago y curiosamente hay diferencias también entre los ecotipos del mismo linaje, tanto *Astyanax* Linaje 1 Vs Linaje 2 como para *Bramocharax* Linaje 1 Vs Linaje 2. Por lo tanto, la falta de coincidencia entre la diferenciación morfológica y su correspondencia con los datos mitocondriales, podría ser el resultado de un proceso de divergencia morfológica rápida [78, 79], o de un proceso de introgresión reciente de los morfotipos *Bramocharax* en el Lago Catemaco. Esta última hipótesis es poco probable debido a que la población más cercana del morfotipo *Bramocharax* se ha descrito para Guatemala (a más de 600 km en distancia lineal), y además no conforman un grupo monofilético [30], por lo que se puede apoyar la hipótesis de que *Bramocharax caballeroi* se haya

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

originado en el lago como resultado de una adaptación recurrente de dos episodios independientes de colonización en el lago (véase más abajo demografía histórica).

En cuanto se refiere a la morfología funcional, se ha supuesto que las estructuras similares o grupos de caracteres son funcionalmente similares [80]. El morfotipo limnético (*Bramocharax*), ha evolucionado de forma independiente dos veces, sin embargo, además de las similitudes morfológicas generales entre los dos linajes limnéticos, se encontraron diferencias significativas en el tamaño y, posiblemente, incluso en la forma (figura 6-8), donde el linaje 2 del morfotipo *Bramocharax* mostró el mayor tamaño, no sólo en comparación con *Astyanax*, sino también con el Linaje 1 del mismo morfotipo. Este patrón coordinado de tamaño y forma, en el que *Bramocharax*, independientemente de linaje, fue más grande que *Astyanax* y evolucionó repetidamente en un morfotipo limnético, este proceso puede ser el resultado tanto de una vía común del desarrollo, experimentando una inercia filogenética [66, 77, 81, 82] así como de la influencia de factores externos actuando de forma independiente [83]. Entre los factores externos se pueden sugerir la selección natural, donde los morfotipos se asocian fuertemente con condiciones ecológicas locales en los entornos del lago [4, 72].

Por último, se obtuvo una correlación negativa entre las distancias morfológicas y las distancias de ML ($r = -0.02$, $P > 0.05$). Incluso, el mapeo de la filogenia en la morfología no rechazó la hipótesis nula de la prueba ($P > 0.05$), que establece la ausencia de señal filogenética [29]. Por lo tanto nuestros datos

apoyan altos niveles de homoplasia, donde la forma del cuerpo no se relaciona con la estimación de la filogenia de este grupo correctamente [29]. Además, si bien se observan linajes del morfotipo *Astyanax* que han permanecido casi sin cambios, se puede observar gráficamente la presencia de una evolución paralela morfológica en linajes diferentes, que se puede suponer son resultado de adaptación a nichos ecológicos similares [29, 84].

4.4.3 Historia demográfica

En este estudio se han observado curvas unimodales de distribución para la combinación de linaje y morfotipo, siendo para todos los casos rechazada la hipótesis nula de equilibrio [60]. Sin embargo, si consideramos el conjunto de datos por morfotipos, se obtuvieron distribuciones bimodales, lo que sugiere una expansión espacial con baja migración [65], este patrón de flujo genético bajo dentro del morfotipo puede ser sugerida también a partir de las comparaciones por pares de Φ_{ST} y los análisis AMOVA, sugiriendo un flujo genético limitado entre los linajes, pero no dentro de ellos. En este sentido, se necesitan más estudios para comprobar si existe flujo genético entre los morfotipos divergentes o si los morfotipos presentes en el lago corresponden a una respuesta plástica.

Por otro lado, la expansión de ambos linajes es relativamente reciente, tanto para las estimaciones de la distribución de Mismatch como para las de BSP, con un intervalo que va de hace 93 000 a 630 000 años, y para ambos casos, en el linaje 1 o 2, los dos morfotipos fueron casi contemporáneos, con

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

intervalos de tiempo que en su mayoría se superponen, sin embargo, en el caso de las estimaciones de mismatch del morfotipo *Bramocharax*, éste fue relativamente más reciente con respecto a los morfotipos *Astyanax*, y fue similar en las estimaciones de BSP para el Linaje 1, pero no para el segundo, lo que sin embargo puede ser afectado por el menor número de secuencias, que tienen un efecto en la observación de intervalos más amplios. Estos resultados no son coherentes con lo que se ha propuesto previamente para otros carácidos, en los que se ha relacionado la edad del linaje con el grado de diferenciación morfológica [82]. Dado que la mayoría de la actividad geológica en el Lago fue durante el Mioceno tardío y el Plioceno temprano (7-3 millones de años) [85], ninguno de los procesos de expansión podrían estar asociados a la actividad volcánica, sin embargo una hipótesis factible sería la consideración de dos invasiones recurrentes al lago y una posterior divergencia ecológica.

Conclusiones

El sistema de carácidos del Lago de Catemaco mostró fuertes divergencias morfológicas, en que la mayoría de las divergencias pudieron ser explicadas en términos de las modificaciones en la forma de la cabeza y del cuerpo. Estas diferencias morfológicas se asociaron a ecotipos diferentes, comúnmente asociados en otros peces de agua dulce como formas pelágicas (*Bramocharax*) y generalistas (*Astyanax*), en ambos morfotipos, se observó una fuerte diferenciación en los rasgos tróficos, como la forma de los dientes, la posición de la boca y la longitud del hocico, que se ha mostrado en otros grupos, son

Divergencia Adaptativa y evolución en paralelo

caracteres fuertemente seleccionados y asociados con adaptaciones tróficas. Por lo anterior se sugiere, que como se ha descrito en otros grupos, la divergencia morfológica actual puede estar asociada a la adaptación a ambientes diferentes entre los dos ecotipos presentes en el lago [12, 86, 87].

Por otra parte, una prueba adicional de que la divergencia adaptativa puede corresponder al proceso evolutivo presente en el sistema de carácidos del Lago, es que en nuestro sistema se ha dado de manera independiente en dos diferentes episodios temporales, mostrando un patrón de evolución en paralelo del morfotipo pelágico. Esto además, de la divergencia adaptativa, podría explicarse por constricciones filogenéticas (inercia filogenética), o la presencia de fuertes presiones de selección. Estudios posteriores involucrando series de desarrollo podrían dar pruebas adicionales para describir mejor el proceso evolutivo del sistema.

No hay evidencia de que los elevados niveles de diferenciación morfológica detectados tengan una base genética, ya que no se observa una congruencia entre los datos morfológicos y moleculares, lo que sugiere altos niveles de homoplasia, en los que la forma del cuerpo no se corresponde con la filogenia del grupo [29].

4.5 REFERENCIAS

1. Adams D: **Parallel evolution of character displacement driven by competitive selection in terrestrial salamanders.** *BMC Evol Biol* 2010, **10**(1):72.
2. McKinnon JS, Rundle HD: **Speciation in nature: the threespine stickleback model systems.** *Trends Ecol Evol* 2002, **17**(10):480-488.
3. McGuigan K, Franklin CE, Moritz C, Blows MW: **Adaptation of rainbow fish to lake and stream habitats.** *Evolution* 2003, **57**(1):104-118.
4. Schluter D: **Ecological Causes of Adaptive Radiation.** *Am Nat* 1996, **148**:S40-S64.
5. Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, Cruickshank T, Schlichting CD, Moczek AP: **Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation.** *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* 2010, **25**(8):459-467.
6. Carlson R, Wainwright P, Near T: **Relationship between species co-occurrence and rate of morphological change in Percina darters (Percidae: Etheostomatinae).** *Evolution* 2009, **63**(3):767-778.
7. Losos JB, Glor RE: **Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation.** *Trends Ecol Evol* 2003, **18**(5):220-227.
8. Rüber L, Verheyen E, Meyer A: **Replicated evolution of trophic specializations in an endemic cichlid fish lineage from Lake Tanganyika.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**(18):10230-10235.
9. Schluter D, McPhail J: **Ecological character displacement and speciation in sticklebacks.** *Am Nat* 1992, **140**:85.
10. Meyer A: **Ecological and evolutionary consequences of the trophic polymorphism in Cichlasoma citrinellum (Pisces: Cichlidae).** *Biol J Linn Soc* 1990, **39**:279 - 299.
11. Meyer A: **Phenotypic Plasticity and Heterochrony in Cichlasoma managuense (Pisces, Cichlidae) and their Implications for Speciation in Cichlid Fishes.** *Evolution* 1987, **41**(6):1357-1369.
12. Barluenga M, Stolting K, Salzburger W, Muschick M, Meyer A: **Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish.** *Nature* 2006, **439**:719 - 723.

13. Elmer K, Kusche H, Lehtonen T, Meyer A: **Local variation and parallel evolution: morphological and genetic diversity across a species complex of Neotropical crater lake cichlid fishes.** *Phil Trans R Soc B* 2010, **365**:1769 - 1782.
14. Walker JA: **Ecological morphology of lacustrine threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. (*Gasterosteidae*) body shape.** *Biol J Linn Soc* 1997, **61**(1):3-50.
15. Cavalcanti M, Monteiro L, Lopes P: **Landmark-based morphometric analysis in selected species of serranid fishes (Perciformes: Teleostei).** *Zool Stud* 1999, **38**(3):287-294.
16. Linde M, Palmer M, Gómez-Zurita J: **Differential correlates of diet and phylogeny on the shape of the premaxilla and anterior tooth in sparid fishes (Perciformes: Sparidae).** *J Evol Biol* 2004, **17**(5):941-952.
17. Plaut I: **Effects of fin size on swimming performance, swimming behaviour and routine activity of zebrafish *Danio rerio*.** *J Exp Biol* 2000, **203**(4):813-820.
18. Webb PW: **Body Form, Locomotion and Foraging in Aquatic Vertebrates.** *Amer Zool* 1984, **24**(1):107-120.
19. Klingenberg C, Barluenga M, Meyer A: **Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry.** *Evolution* 2002, **56**:1909 - 1920.
20. Schluter D: **Adaptive radiation in sticklebacks: size, shape, and habitat use efficiency.** *Ecology* 1993, **74**(3):699-709.
21. Albertson RC, Kocher TD: **Assessing morphological differences in an adaptive trait: A landmark‐based morphometric approach.** *J Exp Zool* 2001, **289**(6):385-403.
22. Schluter D, Price T: **Honesty, perception and population divergence in sexually selected traits.** *Proc Biol Sci* 1993, **253**(1336):117-122.
23. Barluenga M, Stölting KN, Salzburger W, Muschick M, Meyer A: **Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish.** *Nature* 2006, **439**(7077):719-723.
24. Terai Y, Seehausen O, Sasaki T, Takahashi K, Mizoiri S, Sugawara T, Sato T, Watanabe M, Konijnendijk N, Mrosso H *et al*: **Divergent selection on opsins**

- drives incipient speciation in Lake Victoria cichlids.** *PLoS Biol* 2006, 4(12):e433.
25. Allendorf F, Luikart G: **Conservation and the genetics of populations.** Singapore: Blackwell; 2007.
26. Nagel L, Schluter D: **Body size, natural selection, and speciation in sticklebacks.** *Evolution* 1998, 52(1):209-218.
27. Rice AM, Pfennig DW: **Does character displacement initiate speciation? Evidence of reduced gene flow between populations experiencing divergent selection.** *J Evol Biol* 2010, 23(4):854-865.
28. Videler J, Wardle C: **Fish swimming stride by stride: speed limits and endurance.** *Rev Fish Biol Fish* 1991, 1(1):23-40.
29. Klingenberg CP, Gidaszewski NA: **Testing and Quantifying Phylogenetic Signals and Homoplasy in Morphometric Data.** *Syst Biol* 2010:syp106.
30. Ornelas-Garcia CP, Dominguez-Dominguez O, Doadrio I: **Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies.** *BMC Evol Biol* 2008, 8:340.
31. Rohlf F: **TpsDig, digitize landmarks and outlines, version 1.39.** *Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY* 2003.
32. Rohlf FJ, Slice D: **Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks.** *Syst Biol* 1990, 39(1):40-59.
33. Bookstein F: **Morphometric tools for landmark data: geometry and biology.** Cambridge Univ. Press; 1991.
34. O'Higgins P: **The study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry.** *J Anat* 2000, 197(01):103-120
M103 - 110.1046/j.1469-7580.2000.19710103.x.
35. Mardia K, Dryden I: **Statistical shape analysis.** John Wiley & Sons; 2002.
36. Bookstein F: **Combining the tools of geometric morphometrics.** In: *Advances in Morphometrics.* Edited by Marcus LF. New York: Plenum Press; 1996: pp. 131-151.
37. Bastir M, O'Higgins P, Rosas A: **Facial ontogeny in Neanderthals and modern humans.** *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 2007, 274(1614):1125-1132.

38. Mitteroecker P, Gunz P, Bernhard M, Schaefer K, Bookstein FL: **Comparison of cranial ontogenetic trajectories among great apes and humans.** *J Hum Evol* 2004, **46**(6):679-698.
39. Mitteroecker P, Gunz P, Bookstein FL: **Heterochrony and geometric morphometrics: a comparison of cranial growth in *Pan paniscus* versus *Pan troglodytes*.** *Evol Dev* 2005, **7**(3):244-258.
40. Rohlf FJ, Loy A, Corti M: **Morphometric Analysis of Old World Talpidae (Mammalia, Insectivora) Using Partial-Warp Scores.** *Syst Biol* 1996, **45**(3):344-362.
41. Slice D: **Morpheus et al.: software for morphometric research.** *Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York* 1998.
42. O' Higgins P: **The study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry.** *J Anat* 2000, **197**(01):103-120.
43. Zelditch M, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL: **Geometric morphometrics for biologists: a primer.** London: Elsevier Academic Press; 2004.
44. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: **Molecular cloning: A laboratory manual.** New York: Cold Spring Laboratory; 1989.
45. Zardoya R, Doadrio I: **Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications.** *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 1998, **265**(1403):1365-1372.
46. Nei M: **Molecular evolutionary genetics.** New York, USA: Columbia University Press; 1987.
47. Tajima F: **Evolutionary Relationship of DNA-Sequences in Finite Populations.** *Genetics* 1983, **105**(2):437-460.
48. Librado P, Rozas J: **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* 2009, **25**(11):1451-1452.
49. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A: **Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.** *Mol Biol Evol* 1999, **16**(1):37-48.
50. Schneider S, Roessli D, Excoffier L: **Arlequin ver 2.000: a software for population genetics data analysis.** In. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva; 2000.

51. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM: **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data.** *Genetics* 1992, **131**(2):479-491.
52. Klingenberg C: **MorphoJ.** *Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK* 2008.
53. Maddison WP, Maddison DR: **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.72** In.: <http://mesquiteproject.org>; 2009.
54. Mantel NA: **The detection of disease clustering and a generalized regression approach.** *Cancer Res* 1967, **27**:209-220.
55. Fu YX: **Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection.** *Genetics* 1997, **147**(2):915-925.
56. Ramos-Onsins SE, Rozas J: **Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth.** *Mol Biol Evol* 2002, **19**(12):2092-2100.
57. Tajima F: **Statistical-Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism.** *Genetics* 1989, **123**(3):585-595.
58. Fu YX, Li WH: **Statistical tests of neutrality of mutations.** *Genetics* 1993, **133**:693-709.
59. Harpending HC: **Signature of Ancient Population-Growth in a Low-Resolution Mitochondrial-DNA Mismatch Distribution.** *Hum Biol* 1994, **66**(4):591-600.
60. Rogers A, Harpending H: **Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences.** *Mol Biol Evol* 1992, **9**(3):552-569.
61. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG: **Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences.** *Mol Biol Evol* 2005, **22**:1185-1192.
62. Drummond A, Rambaut A: **BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.** *BMC Evol Biol* 2007, **7**(1):214.
63. Concheiro Perez GA, Rican O, Orti G, Bermingham E, Doadrio I, Zardoya R: **Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene.** *Mol Phylogen Evol* 2007, **43**(1):91-110.

64. Doadrio I, Perdices A: **Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (Cobitis, cobitidae) based on cytochrome b sequence data.** *Mol Phylogen Evol* 2005, **37**(2):484-493.
65. Ray N, Currat M, Excoffier L: **Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations.** *Mol Biol Evol* 2003, **20**(1):76-86.
66. Sidlauskas B: **Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of Characiform fishes: a phylomorphospace approach.** *Evolution* 2008, **62**(12):3135-3156.
67. Hatfield T, Schluter D: **Ecological speciation in sticklebacks: environment-dependent hybrid fitness.** *Evolution* 1999, **53**(3):866-873.
68. Schluter D, McPhail JD: **Ecological Character Displacement and Speciation in Sticklebacks.** *Am Nat* 1992, **140**(1):85.
69. Elmer K, Lehtonen T, Kautt A, Harrod C, Meyer A: **Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historic times.** *BMC Biol* 2010, **8**(1):60.
70. Bernatchez L, Chouinard A, Lu GQ: **Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study.** *Biol J Linn Soc* 1999, **68**(1-2):173-194.
71. Contreras-Balderas S, Rivera-Teillery R: **Bramocharax (Catemaco) caballeroi Subgén. et. sp. nv., del Lago de Catemaco, Veracruz, México** *Inst Inv, Cient, UANL* 1985, **2**(1):7-29.
72. Krabbenhoft T, Collyer M, Quattro J: **Differing evolutionary patterns underlie convergence on elongate morphology in endemic fishes of Lake Waccamaw, North Carolina.** *Biol J Linn Soc* 2009, **98**(3):636-645.
73. Guill JM, Hood CS, Heins DC: **Body shape variation within and among three species of darters (Perciformes: Percidae).** *Ecol Freshwat Fish* 2003, **12**(2):134-140.
74. Schluter D: **Ecological speciation in postglacial fishes.** *Phil Trans R Soc B* 1996, **351**:807 - 814.
75. Gould S: **Ontogeny and phylogeny:** Belknap press; 1977.
76. Crow KD, Munehara H, Bernardi G: **Sympatric speciation in a genus of marine reef fishes.** *Mol Ecol* 2010, **19**(10):2089-2105.
77. Valentin A, Sévigny J-M, Chanut J-P: **Geometric morphometrics reveals body shape differences between sympatric redfish *Sebastes mentella*, *Sebastes***

- fasdatus* and their hybrids in the Gulf of St Lawrence. *J Fish Biol* 2002, **60**(4):857-875.
78. Sturmbauer C, Meyer A: **Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes.** *Nature* 1992, **358**(6387):578-581.
79. Verheyen E, Salzburger W, Snoeks J, Meyer A: **Origin of the Superflock of Cichlid Fishes from Lake Victoria, East Africa.** *Science* 2003, **300**(5617):325-329.
80. Webb PW: **Locomotor Patterns in the Evolution of Actinopterygian Fishes.** *Amer Zool* 1982, **22**(2):329-342.
81. Gould SJ, Lewontin RC: **The Spandrels of San Marco and the Panglossian Paradigm: A Critique of the Adaptationist Programme.** *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 1979, **205**(1161):581-598.
82. Sidlauskas B: **Testing for unequal rates of morphological diversification in the absence of a detailed phylogeny: a case study from Characiform fishes.** *Evolution* 2007, **61**(2):299-316.
83. Klingenberg CP: **Morphological Integration and Developmental Modularity.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 2008, **39**(1):115-132.
84. Boughman JW, Rundle HD, Schluter D: **Parallel evolution of sexual isolation in sticklebacks.** *Evolution* 2005, **59**(2):361-373.
85. Ferrari L, Tagami T, Eguchi M, Orozco-Esquivel MT, Petrone CM, Jacobo-Albarran J, Lopez-Martinez M: **Geology, geochronology and tectonic setting of late Cenozoic volcanism along the southwestern Gulf of Mexico: The Eastern Alkaline Province revisited.** *J Volcanol Geoth Res* 2005, **146**(4):284-306.
86. Schluter D: **Ecology and the origin of species.** *Trends Ecol Evol* 2001, **16**(7):372-380.
87. Elmer KR, Kusche H, Lehtonen TK, Meyer A: **Local variation and parallel evolution: morphological and genetic diversity across a species complex of neotropical crater lake cichlid fishes.** *Philos Trans R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 2010, **365**(1547):1763-1782.

5. CAPÍTULO III

¿Puede ser Rastreada la Especiación Ecológica a través de Marcadores Neutrales?

“Por supuesto, si nos encontramos por casualidad con una especie en el microsegundo geológico de su origen, no seremos capaces de encontrar distinciones claras. Pero nuestras posibilidades de encontrar una especie en este estado son realmente muy escasas”

J. Gould 1980

5.1 INTRODUCCIÓN

Las especies morfológicamente más diferenciadas dentro de los Characiformes, suelen relacionarse con adaptaciones ecológicas, siendo las diferencias tróficas las más determinantes en la evolución del grupo [1]. Como se ha descrito en el capítulo anterior, esta asociación entre morfologías diferenciadas y distintas preferencias ecológicas se puede identificar en nuestro sistema de carácidos presentes en los del Lago Catemaco (Veracruz, México). En éste sistema las principales diferencias morfológicas observadas entre los dos morfotipos están asociadas a caracteres relacionados con especializaciones tróficas (como la fórmula dentaria y la forma del hocico, entre otras). Estos morfotipos fueron descritos originalmente como especies pertenecientes a diferentes géneros, *Astyanax aeneus* (Günther, 1860) y *Bramocharax caballeroi* Contreras-Balderas y Rivera-Teillery, 1985, pero como se ha visto en los capítulos previos de esta Tesis Doctoral, no presentan una correspondencia entre la diferenciación molecular y la diferenciación morfológica.

Por el contrario, se observó que había dos diferentes linajes mitocondriales compartiendo haplotipos entre ambos morfotipos *Astyanax* Vs *Bramocharax*, más aún, este último morfotipo (*Bramocharax*) ha divergido de forma independiente en los dos linajes presentes en el lago, como una adaptación a ambientes limnéticos. Las principales características que definen a *Bramocharax caballeroi* son: una menor altura del cuerpo, un hocico más

largo y orientado hacia arriba, así como un mayor tamaño del cuerpo con respecto a *Astyanax aeneus*.

Al igual que en otros modelos, la radiación adaptativa puede ser considerada como el primer paso de una diversificación intralacustre, donde hay una influencia importante de la especialización ecológica y la selección sexual [2, 3 1654, 4]. Presentándose incluso, un aislamiento reproductivo entre poblaciones que habitan diferentes ambientes (por ejemplo, limnéticos Vs béticos), mientras que el aislamiento reproductivo es menor entre poblaciones de ambientes similares, incluso en poblaciones alopátricas [5, 6].

En este sentido la selección natural está involucrada en a las fases iniciales de la especiación, siendo en el caso de la especiación ecológica, o poblaciones que explotan diferentes recursos, las que experimentan diferentes presiones de selección en rasgos que, directa o indirectamente, dirigen el aislamiento reproductivo [5, 7-10].

La competencia por recursos entre poblaciones simpátricas puede dar lugar a la divergencia fenotípica y promover el aislamiento reproductivo [7]. Por lo tanto, cuando poblaciones naturales han divergido fenotípicamente, y el proceso de la deriva genética puede ser descartado, la selección divergente ("*divergent selection*") es considerada como el agente causal más probable de dicha diferenciación. Ésta selección divergente puede favorecer unos rasgos bajo ciertas condiciones en una población, mientras que otros son favorecidos en otra. Dicha variación en la dirección de la selección en cada población

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

interactúa con la bases genéticas de estos rasgos de manera compleja en la generación de la divergencia fenotípica [11].

Así mismo, en la especiación ecológica se produce una selección negativa de los híbridos, los cuales presentan fenotipos intermedios mostrando una menor adaptación que los extremos más especializados, habiendo un apareamiento preferencial entre los individuos de cada tipo [8, 12, 13].

Considerando lo anterior se puede evaluar la especiación ecológica con base en las siguientes premisas:

- 1) El flujo genético debe ser menor que la dispersión
- 2) Mayores diferencias ambientales deben dar lugar a un menor flujo genético.
- 3) Mientras mayores sean las diferencias adaptativas, menor flujo genético.

Las poblaciones que muestran mayores diferencias fenotípicas en presuntos rasgos adaptativos son las que muestran mayor divergencia genética, por consiguiente menor flujo genético [12].

Por otra parte, la plasticidad fenotípica entendida como la capacidad de un sólo genotipo para producir diferentes fenotipos en respuesta a diversas condiciones ambientales, es un proceso fundamental en el origen de las especies [14, 15]. Así, diferencias entre las poblaciones que originalmente surgen a través de la plasticidad fenotípica, eventualmente pueden llegar a ser fijadas genéticamente, acumulando diferencias genéticas entre poblaciones que, a su vez, pueden promover el aislamiento reproductivo [14]. Dando como

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

resultado una radiación adaptativa donde la diferenciación fenotípica es el resultado de una fuerte selección natural [4].

Por lo tanto si los individuos son capaces de adaptarse fenotípicamente, por plasticidad, mediante una respuesta inducida por el ambiente, es posible que no se limite el flujo genético entre los fenotipos generados limitando así la divergencia adaptativa, dando lugar a poca o ninguna divergencia genética [12, 15].

Los intentos por distinguir entre los componentes genéticos y ambientales de la divergencia de los caracteres en las poblaciones naturales muestran que la divergencia en la mayoría de los caracteres tiene tanto un componente genético como ambiental, donde la selección divergente promueve la interrupción del flujo genético entre los ambientes seleccionados [15].

Estudios recientes han documentado que la divergencia adaptativa puede ocurrir en presencia de flujo genético. Por lo tanto, la plasticidad fenotípica y la variación genética pueden considerarse como dos formas de adaptarse a las condiciones locales del ambiente [15]. Es así como la diferenciación ecológica puede ocurrir mucho más rápido de lo que puede ser detectada a través de la evolución de marcadores moleculares neutrales, es por esto que la ausencia de diferenciación genética con estos marcadores entre ecotipos no refuta la especiación ecológica [10].

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

Más aún, como se describió previamente, la presencia de patrones fenotípicos similares que han evolucionado de forma paralela, como ocurre en nuestro sistema de estudio en el Lago Catemaco, sugiere que dichos patrones de diferenciación pueden ser explicados por causas ecológicas [6, 14, 16].

En el presente estudio hemos considerado el uso de 12 microsatélites para evaluar el flujo genético entre los diferentes morfotipos descritos previamente en el Lago Catemaco. En este sentido evaluaremos si nuestro sistema corresponde con un proceso de divergencia adaptativa, con la interrupción del flujo genético entre los grupos morfológicamente divergentes, como ha sido observado para otros modelos de peces intralacustres [2], mientras en caso contrario, el proceso puede ser atribuible tanto a la plasticidad fenotípica intrapoblacional, como a un fenómeno incipiente de diferenciación donde las presiones de selección no son lo suficientemente fuertes [14], lo cual para ambos casos mencionados anteriormente no sería posible detectar la interrupción del flujo genético entre los morfotipos, con los marcadores neutrales [17].

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Colecta de material y su determinación taxonómica

Un total de 305 ejemplares fueron colectados con redes tipo atarraya, en 12 localidades del Lago Catemaco (Figura 1) y en la parte alta del río Cuetzalapan, afluente del lago. El lago de Catemaco se localiza en la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas (Veracruz, México) y forma parte del extremo meridional del Eje Neovolcánico Transversal, una zona de alta actividad volcánica desde finales del Mioceno hasta la actualidad [18].

Además, se incluyó como grupo externo una población del género *Astyanax* situada fuera del sistema lacustre de Catemaco. Esta población se encuentra en la cuenca del río Máquinas, también localizado dentro de la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas y que vierte sus aguas directamente al Atlántico. Se utilizó este grupo como grupo de referencia, ya que en el primer capítulo de esta tesis se observó que esta población presentaba una alta divergencia para el citocromo *b* (*Cytb*), con respecto a las poblaciones del Lago Catemaco (> 5% *K81uf*, [19]).

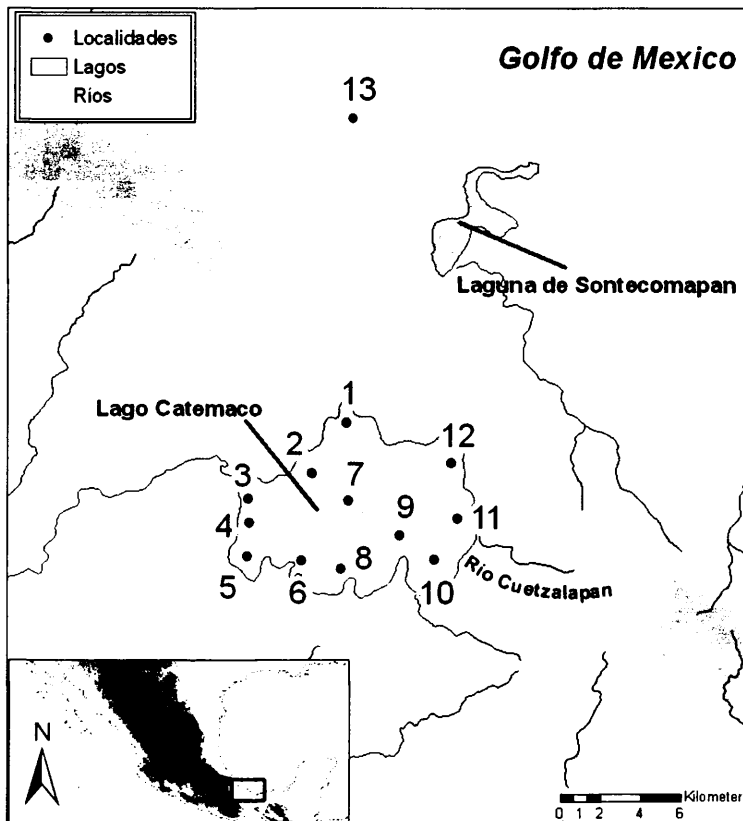


Figura 1. Mapa de localidades en el Lago Catemaco. 1) Isla Changos, 2) Isla Agatepec, 3) Finca, 4) Maxacapan, 5) Victoria, 6) Pozolapan, 7) Catemaco, 8) Escuniapan, 9) Mimiagua, 10) Margarita, 11) Cuetzalapan, 12) Oxochapan, y 13) Maquinas.

La determinación taxonómica de los carácidos del Lago de Catemaco se llevó a cabo atendiendo a diferentes caracteres morfológicos. La especie *Bramocharax caballeroi* se diferencia de *Astyanax aeneus* por presentar: de 3 a 4 dientes unicúspides en la fila externa de la premaxila, o al menos con una clara proyección de la apófisis central en dientes tri o penta cuspidados, b) de 2 a 6 dientes multicuspidados en la fila interna de la premaxila; c) dentario con 3 a 6 dientes unicúspides o con la apófisis central proyectada d) de 3 a 11 dientes multicúspides maxilares.

5.2.2 Extracción de ADN y Secuenciación

El ADN genómico fue obtenido mediante el protocolo estándar de proteinasa K fenol/cloroformo [20] y fue almacenado a 4 °C. En total fueron analizados 305 individuos, representando a todas las poblaciones colectadas (Figura 1, Tabla 1). Se amplificaron doce microsatélites aislados previamente para *Astyanax mexicanus* [21, 22]. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo como sigue: 95 °C (15 min.), 35 ciclos a 94 °C (30 sec.), 60 °C (30 sec.), 72°C (30 sec.), y 72 °C (7 min.). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs por sus siglas en inglés *Polymerase chain reactions*) se llevaron a cabo en un volumen final de 5 µL utilizando el kit Type-it Microsatellite PCR (Qiagen) y usando 10ng de ADN. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.0% para confirmar la amplificación. Los fragmentos marcados con fluorescencia fueron analizados en un secuenciador automático ABI 3730XL DNA Analyzer, utilizando Rox 500 como estándar de tamaño, los genotipos fueron revisados en GENEMAPPER 3.7 (Applied Biosystems).

Tabla 1. Descripción de los 12 microsatélites utilizados.

Microsatélites	Tamaño	Repetición	Secuencia	Marcaje
215D	102	16(TG)	ATTACGTGCTCCTTTGTGGG TCTTATCAGCATTACTGCGCC	HEX
235D	128	6(GT)	AGTGTTGGCAAACGTGGG GTTGTCACAGCAACCACCC	FAM
211B	233	14(CA)	TACAAGGGGCAATTAGAGCC ACCTGGGTACAAACATGCG	HEX
6A	256	30(TG)	GCATCTGTAAACTCCAGAAGCG CACCCAAACCTAATGATGCC	FAM
30C	321	11(TG)	TCTCTCGCACACTGAACCC GGATTCTTAACGACTTTCCGC	HEX

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

NYU13.F	386	14(CT)	GGAGAGTCAGCTGGAATTTGA AGATGCGCGCAGAGAGATAC	FAM
16C.F	148	15(TG)	CTGATGATTGTAAGATGCTGCC GGCTCCATCTAAACTACGGC	FAM
NYU14.F	155	11(CA)	AACCTGTCTCACAAGAGCCC CTGTCAGACCAGACACTGGG	HEX
NYU29.F	249	10(GT)	GTGGGGAAGTGAGAGAGTGC CGGTTTGTCACAGACATGGT	FAM
207F.F	253	14(TG)	AATGTGGAGAAAAGAGAGGGC GTCTTTCATTCAATGGCCG	HEX
229B.F	368	16(CA)	AGCCTCTCACCTCACAATCC CCGCTCCAAACTTACAAAC	HEX
142C.F	393	13(CA)	AATTGAGGGTATGTCCCCG ATCTCGGATGGTTGAGGG	FAM

5.2.3 Variación genética, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Todos los análisis se llevaron a cabo agrupando a los individuos en cuatro categorías, siendo asignados a una combinación entre los linajes mitocondriales descritos anteriormente (Figura 2) y los morfotipos (L1_*Astyanax*, L1_*Bramocharax*, L2_*Astyanax* y L2_*Bramocharax*). La calidad del genotipado para cada loci fue verificado en MCRO-CHECKER v2.23 [23], con 5 000 asignaciones al azar con un intervalo de confianza del 95%. El locus 142C mostró señales de presentar alelos nulos para todas las pruebas llevadas a cabo, mientras que para el resto de los loci no hubo señales de alelos nulos para todas las poblaciones.

La caracterización de la diversidad genética para cada locus en los cuatro grupos antes mencionados se llevó a cabo con FSTAT 2.9.3 [24]. La prueba exacta para detectar desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) [25], así como la de desequilibrio de ligamiento fueron llevadas a cabo con el programa GENEPOP 4.0.1 [26], tanto por locus para cada población

como para todos los loci por población. La corrección secuencial de Bonferroni se utilizó para las pruebas antes descritas [27].

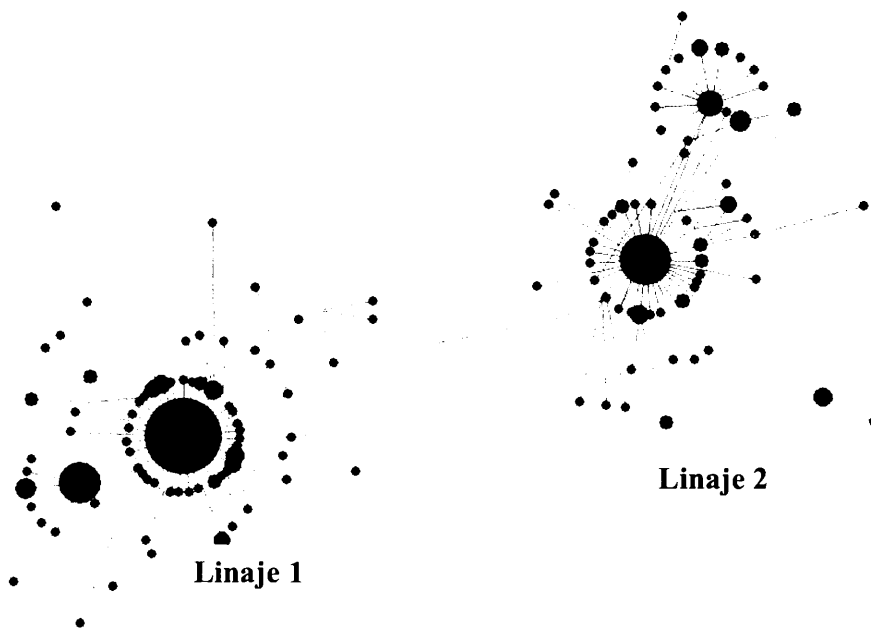


Figura 2. Red de haplotipos para el gen *Cytb* entre los morfotipos de carácidos en el Lago Catemaco. *Bramocharax* (azul) y *Astyanax* (verde).

5.2.4 Probando la reducción del flujo genético entre morfotipos

Para probar la posibilidad de la importancia de la contribución de mutaciones paso a paso (SMM) a la diferenciación en los loci utilizados, se llevó a cabo el procedimiento de asignación al azar del tamaño de los alelos [28]. La prueba fue llevada a cabo entre poblaciones para determinar el estadístico adecuado para caracterizar la diferenciación entre muestras, ya que un resultado global significativo sustentaría la utilización de R_{ST} en lugar de las medidas tradicionales de F_{ST} . La significación fue evaluada con 10 000 pasos de asignación al azar. Con base en estos resultados, se determinó que las F_{ST} eran más adecuadas que las R_{ST} , ya que la mutación no mostraba un efecto

significativo sobre el cambio en el tamaño de los alelos, sustentando que la variación estaba más relacionada con eventos de deriva hacia cada población [28, 29].

Dado que las medidas tradicionales de diferenciación y evaluación del flujo genético entre poblaciones como F_{ST} y G_{ST} han sido consideradas como no adecuadas en casos de bajos niveles de diferenciación [30-34], las estimas de diferenciación fueron hechas considerando las D_{EST} [34], usando el programa SMOGD 1.2.5 [35]. La significación en estas medidas no debe ser tomada como tal, y más bien las tendencias en los resultados a través de las poblaciones son consideradas para evaluar la diferenciación de forma no desviada por los valores mínimos en el total de las muestras, lo cual es generalmente más informativo. Los valores de F_{ST} fueron también estimados con fines de comparación, mediante las estimas basadas en la identidad de los alelos por pares [36], usando el programa Arlequin versión 3.1 [37].

Agrupación genética y estructura jerárquica de la población

La significación de la variación molecular fue agrupada en diferentes niveles usando un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) [38], donde se probaron dos hipótesis de estructuración genética (figura 3), en la primera hipótesis se probó la diferenciación entre morfotipos (*Astyanax* Vs *Bramocharax*) y en la segunda hipótesis se probó la diferenciación entre los dos linajes mitocondriales obtenidos para el lago (Linaje 1 Vs Linaje 2; figura 2 y 3). Todos los análisis fueron llevados a cabo con el programa ARLEQUIN 3.5.1.2 [39].

Además, se llevó a cabo una correlación entre las distancias derivadas del ADN mitocondrial, determinado por Φ_{ST} y las distancias genéticas obtenidas para los 12 microsatélites analizados, determinadas por la D_{EST} , utilizando una prueba de Mantel (1 000 permutaciones) [40 456] la cual se llevó a cabo con ARLEQUIN 3.5. 1.2 [39 667].

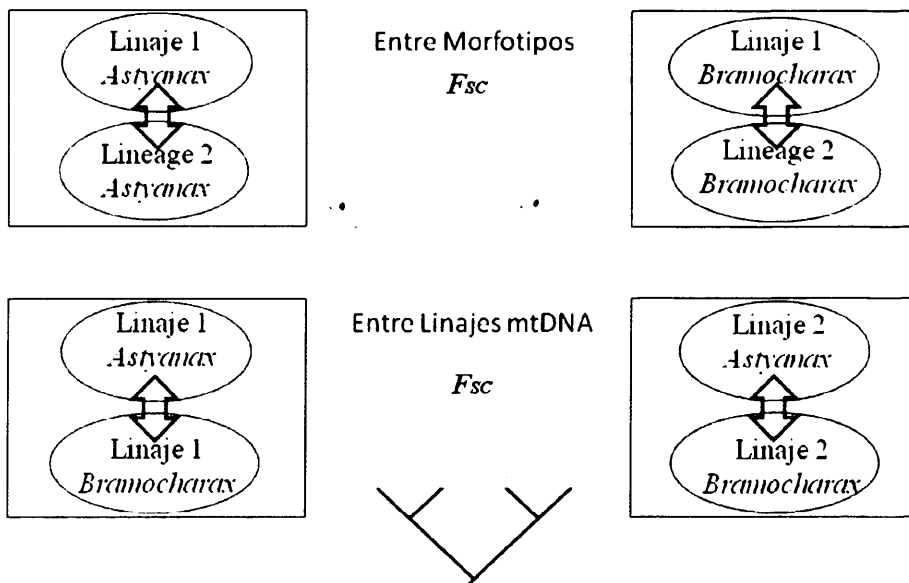


Figura 3. Esquema de las dos hipótesis evaluadas en el análisis molecular de la varianza jerárquico.

Posteriormente, se llevo a cabo un análisis de ordenamiento (PCA) de la variabilidad entre muestras fue analizada por medio de un análisis de correspondencia [41] implementado en el programa Genetix v.4.05.2 [42].

El flujo genético entre las muestras fue inferido por medio de la probabilidad de pertenencia de los individuos a grupos genéticos discretos, con

el programa STRUCTURE 2.0 [43], el cual usa un método de aproximación bayesiana para inferir el número de poblaciones (K) con mejores valores de probabilidad posterior y estimar así el grado de mezcla genética en los individuos que conforman una muestra. Las simulaciones fueron llevadas a cabo bajo un modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas, dado el cercano parentesco de las poblaciones. El procedimiento de cadenas de Markov consistió en de 1×10^6 seguido de un periodo de dememorización de 1×10^5 . La inferencia del valor de K más probable fue llevada a cabo con el cambio en el valor modal de K [44]. Se probaron diferentes escenarios: en el primero se consideró el número de poblaciones donde los diferentes valores posibles de K correspondieron a dichas poblaciones yendo de K= 1 a 16, además de considerar cuatro grupos combinando la morfología con los linajes mitocondriales (L1_*Astyanax*, L2_*Astyanax*, L1_*Bramocharax*, L2_*Bramocharax*). Adicionalmente se llevaron a cabo dos pruebas en las que se consideró como agrupación inicial a los morfotipos y para la segunda prueba a los linajes mitocondriales con un valor de K de 1 a 2.

El flujo genético puede estimarse como resultado del flujo reciente y asimétrico entre poblaciones, así mismo, puede evaluarse de acuerdo al número de individuos que físicamente se trasladan entre poblaciones. Para ambas estimas se utilizaron métodos de coalescencia con el programa BayesAss+ v1.3 [28]. Este método estima la proporción de migrantes de una población a otra, para lo cual se diseña una búsqueda por medio de cadenas de Markov e inspección de los valores de Likelihood alcanzados. Se llevaron a cabo cinco búsquedas independientes para asegurar la convergencia de los parámetros, y posteriormente se aplicó una prueba de máxima verosimilitud

para probar la significación de los valores de probabilidad posterior en las tasas de migración [28]. La comparación de las tasas de flujo genético obtenidos por BayesAss y el número de migrantes entre poblaciones permitió distinguir entre flujo y dispersión.

Una prueba de asignación bayesiana fue implementada también en el programa GENECLASS 2.0 [45], el cual estima la probabilidad que cada individuo posee de pertenecer a la población de referencia. En este caso, con la finalidad de estimar el porcentaje de auto-asignación (una medida relativa que puede relacionarse con el grado de aislamiento de una población), las poblaciones de referencias fueron las mismas que las de prueba. En un segundo paso, se probó la asignación a poblaciones de acuerdo a los morfotipos, así como por linajes mitocondriales y su combinación. El procedimiento siguió el método de exclusión parcial [46], y la simulación consistió de 10,000 individuos. Posibles diferencias entre los porcentajes de asignación fueron evaluadas mediante un ANOVA de medidas repetidas, utilizando las frecuencias de asignación individuales obtenidas, donde se evaluaron los siguientes escenarios: *Astyanax* Vs *Bramocharax*, L1 Vs L2 y su combinación, en el programa STATISTICA 6 [47].

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Variación genética, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

Los parámetros de variabilidad genética para los doce loci se enumeran en la tabla 2. La mayoría de las combinaciones de loci por población no mostraron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). Sólo dos loci (142C y NYU13) mostraron desviaciones del HWE (tabla 2), donde el locus 142C presentó señales de alelos nulos, por esta razón los análisis de AMOVA, así como los análisis de agrupamiento fueron llevados a cabo sin considerar este locus. Ningún loci presentó desequilibrio de ligamiento después de la corrección secuencial de Bonferroni [27].

En términos generales la población del río Máquinas (alopátrica), mostró los valores de diversidad más bajos para todos los loci analizados, presentando un promedio de alelos por locus de 3.6 ± 0.35 , mientras que los valores obtenidos para los grupos analizados dentro del Lago Catemaco fueron más altos con una media de 14 alelos por locus (Tabla 2). La heterocigosidad observada (H_o) también fue menor en la población del río Máquinas que para el resto de los grupos, mostrando estas últimas un intervalo de 0.78 a 0.80, mientras que para la población de Máquinas la media fue de 0.52 ± 0.045 . Además, esta última población mostró valores negativos del coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) para cinco de los doce loci analizados (Figura 4).

speciati n eco gica y os marca ores neu ra es

Tabla 2. Variabilidad genética del sistema de carácidos para los doce microsátelites analizados. *n*: número de individuos analizados; *A_R*: riqueza alélica, *N_a*: número de alelos, *H_o*: heterocigosidad observada, *H_e*: heterocigosidad esperada, *F_{is}*: índice de consanguinidad. Desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg se encuentran resaltadas en cursivas y negritas después de la corrección secuencial de Bonferroni.

Población	Locus												Mean	SD	
	211B	215D	235D	30C	6A	NYU13	142C	16C	207F	229B	NYU14	NYU29			
L1_Astyanax n=113	AR	11.631	11.481	17.436	14.145	13.525	17.936	14.520	13.257	13.702	11.005	6.198	16.736	13.035	3.086
	Na	17	15	21	20	18	24	19	17	19	13	12	23	18.167	1.058
	Ho	0.850	0.858	0.876	0.894	0.616	0.793	0.658	0.946	0.796	0.902	0.688	0.786	0.805	0.030
	He	0.871	0.870	0.912	0.895	0.859	0.909	0.905	0.897	0.881	0.870	0.651	0.911	0.869	0.021
F _{is}	0.024	0.013	0.039	0.002	0.283	0.128	0.273	-0.055	0.096	-0.036	-0.055	0.138	0.071	0.034	
L1_Bramocharax n=59	AR	10.834	11.132	18.131	12.975	9.901	19.684	14.112	13.684	13.022	10.623	5.443	15.254	12.323	3.631
	Na	13	14	20	16	12	25	17	16	16	12	7	19	15.583	1.323
	Ho	0.797	0.847	0.949	0.881	0.596	0.786	0.576	0.898	0.780	0.898	0.661	0.797	0.789	0.035
	He	0.845	0.854	0.921	0.881	0.796	0.911	0.893	0.900	0.868	0.869	0.645	0.897	0.857	0.022
F _{is}	0.057	0.008	-0.030	0.000	0.250	0.138	0.355	0.002	0.102	-0.034	-0.025	0.112	0.078	0.035	
L2_Astyanax n=83	AR	11.518	12.470	16.207	13.051	11.619	17.847	15.612	14.067	12.130	11.352	6.184	17.203	12.850	3.066
	Na	13	17	21	17	14	23	19	19	16	14	9	24	17.167	1.254
	Ho	0.771	0.867	0.880	0.783	0.556	0.769	0.593	0.855	0.855	0.904	0.610	0.747	0.766	0.035
	He	0.876	0.867	0.896	0.871	0.838	0.912	0.913	0.896	0.865	0.874	0.640	0.902	0.863	0.021
F _{is}	0.120	0.000	0.019	0.101	0.337	0.157	0.351	0.045	0.011	-0.034	0.048	0.172	0.111	0.036	
L2_Bramocharax n=32	AR	12.603	11.610	18.399	13.703	14.765	17.599	14.696	13.702	13.422	9.906	6.742	18.126	13.326	3.258
	Na	13	12	19	14	15	18	15	14	14	10	7	19	14.167	1.021
	Ho	0.906	0.750	0.906	0.906	0.700	0.563	0.688	0.969	0.844	0.875	0.677	0.656	0.787	0.037
	He	0.860	0.847	0.885	0.892	0.783	0.894	0.905	0.882	0.864	0.871	0.644	0.874	0.850	0.021

	F_{is}	-0.053	0.115	-0.024	-0.016	0.106	0.370	0.240	-0.098	0.023	-0.004	-0.052	0.249	0.071	0.042
Astyanax	AR	14.74	14.997	20.795	17.715	16.972	23.086	18.74	17.147	17.455	13.832	9.368	22.628	16.852	3.689
n=196	Na	18	17	22	21	20	25	20	19	20	16	12	25	19.583	1.055
	Ho	0.816	0.862	0.878	0.847	0.591	0.783	0.630	0.908	0.821	0.903	0.655	0.769	0.789	0.031
	He	0.875	0.870	0.908	0.887	0.856	0.913	0.912	0.900	0.876	0.873	0.649	0.910	0.869	0.021
	F_{is}	0.067	0.009	0.033	0.045	0.310	0.142	0.309	-0.009	0.062	-0.034	-0.009	0.155	0.090	0.034
Bramocharax	AR	14.865	13.909	19.998	17.777	16	24.954	17.949	15.954	17.903	11.912	9.8	20.863	16.356	3.906
n=91	Na	15	14	20	18	16	25	18	16	18	12	10	21	16.917	1.171
	Ho	0.835	0.813	0.934	0.890	0.632	0.705	0.615	0.923	0.802	0.890	0.667	0.747	0.788	0.033
	He	0.855	0.854	0.912	0.890	0.793	0.907	0.905	0.902	0.870	0.872	0.645	0.893	0.858	0.022
	F_{is}	0.023	0.048	-0.024	0.000	0.202	0.224	0.320	-0.023	0.078	-0.021	-0.033	0.163	0.080	0.034
Máquinas	AR	4	4.999	2	2.967	4	3.967	3.967	2	3	5.967	2	3.999	3.369	1.181
n=30	Na	4	5	2	3	4	4	4	2	3	6	2	4	3.583	0.358
	Ho	0.700	0.700	0.567	0.500	0.633	0.367	0.267	0.400	0.276	0.567	0.586	0.667	0.519	0.045
	He	0.677	0.704	0.495	0.466	0.663	0.442	0.550	0.420	0.454	0.709	0.479	0.596	0.554	0.032
	F_{is}	-0.034	0.006	-0.145	-0.073	0.044	0.170	0.515	0.048	0.392	0.201	-0.225	-0.119	0.065	0.064

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

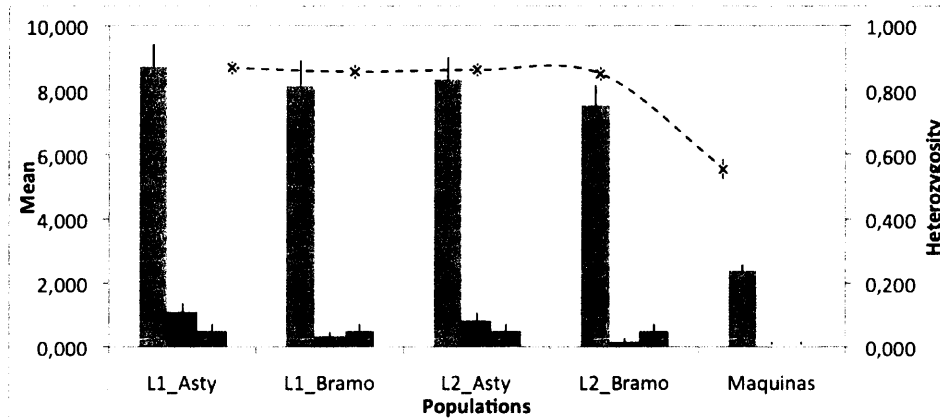


Figure 4. Gráfico de diversidad genética entre los cuatro grupos de carácidos en el Lago Catemaco y la población de Máquinas para los 12 microsatélites analizados. En verde el número efectivo de alelos, en azul el número de alelos exclusivos y en marrón el número de alelos comunes <50%. La línea discontinua corresponde a la heterocigosidad esperada (H_e).

La hipótesis nula de ausencia de la contribución a la diferenciación genética de la mutación paso a paso (SMM; Michalakis and Excoffier 1996) no fue rechazada ($P > 0.05$), por lo que no se encontraron diferencias significativas entre las R_{ST} y las simuladas por el modelo pR_{ST} para el conjunto de los 12 loci (Tabla 3). Por lo anterior, se determinó que podían ser utilizados los valores de F_{ST} para la caracterización genética entre las poblaciones [48].

Tabla 3. Valores globales de la prueba de R_{ST} , F_{ST} y D_{ST}' por locus

Locus	F_{ST}	D_{ST}'	R_{ST}	$\square R_{ST}$	95% IC
211B	0.032	0.065	0.006	0.028	-0.005 0.131
215D	0.040	0.095	0.013	0.035	-0.006 0.224
235D	0.057	0.104	0.083	0.051	-0.005 0.270
30C	0.065	0.090	0.347	0.057	-0.006 0.341
6A	0.059	0.100	0.018	0.059	-0.007 0.252
NYU13	0.063	0.091	0.015	0.051	-0.008 0.269
142C	0.058	0.126	-0.003	0.047	-0.007 0.271
16C	0.078	0.069	0.047	0.078	-0.005 0.443
207F	0.043	0.028	0.007	0.030	-0.006 0.133
229B	0.016	0.151	0.015	0.014	-0.007 0.070
NYU14	0.118	0.090	0.082	0.120	-0.005 0.524
NYU29	0.055	0.088	0.039	0.047	-0.006 0.314

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

Todos los loci 0.056 0.048 0.033 0.046 0.013 0.103

En negritas están marcados los valores que presentaron diferencias significativas entre R_{ST} y ρR_{ST} después de la corrección de Bonferroni. IC = intervalo de confianza.

Los valores de diferenciación genética (F_{ST}) dentro del sistema de carácidos del Lago Catemaco no fueron significativos (Tabla 4) entre los grupos analizados después de la corrección secuencial de Bonferroni, más aún los valores de diferenciación fueron muy bajos (< 0.001) entre los pares de grupos analizados siendo el valor más alto reportado entre los morfotipos del Linaje 1 (*Astyanax* Vs *Bramocharax*). De forma similar, los niveles de diferenciación obtenidos con las distancias D_{EST} , fueron bajos pero a diferencia de los valores de F_{ST} , los grupos que presentaron una mayor diferenciación fueron los morfotipos del linaje 2. Debido que para esta última prueba no es posible llevar a cabo permutaciones no fue posible calcular el grado de significación de los mismos.

Tabla 4. Valores de F_{ST} por debajo de la diagonal y valores D_{EST} por encima de la diagonal

	L1_ <i>Astyanax</i>	L2_ <i>Astyanax</i>	L1_ <i>Bramocharax</i>	L2_ <i>Bramocharax</i>
L1_ <i>Astyanax</i>	-	0.000132	0.00019	0.000063
L2_ <i>Astyanax</i>	0.00035	-	-0.00128	0.000476
L1_ <i>Bramocharax</i>	0.00068	-0.00108	-	-0.001090
L2_ <i>Bramocharax</i>	0.00014	0.0005	-0.00255	-

5.3.2 Análisis de la estructura jerárquica y agrupamiento genético de las poblaciones

En la AMOVA jerárquica se observó que de forma global no hubo una correspondencia entre la diferenciación morfológica o mitocondrial ($P < 0.05$), con respecto a los marcadores nucleares analizados en el presente estudio (Tabla 5). Así cuando se considero una agrupación por morfotipos, *Astyanax*

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

Vs *Bramocharax*, no se encontraron diferencias significativas entre grupos, ni entre poblaciones mostrando diferencias significativas dentro de éstas últimas, las cuales explicaban la mayor proporción de la varianza analizada (8.54%). De forma similar cuando se compararon los dos grupos correspondientes a los linajes mitocondriales, no se encontraron diferencias significativas entre grupos, ni entre poblaciones siendo la agrupación dentro de las poblaciones las que explicaban un mayor porcentaje de la varianza (8.54%) y de manera similar a la comparación entre morfotipos, donde los valores significativos fueron dentro de las poblaciones.

Tabla 5. AMOVA jerárquica entre los grupos de diferentes niveles entre los morfotipos y linajes mitocondriales analizados.

Grupos	Entre grupos		Entre poblaciones		Dentro poblaciones	
	%	F_{CT}	%	F_{SC}	%	F_{IS}
Morfotipos						
<i>Astyanax</i> (L1 X L2)	0.08	0.00083	-0.12	-0.00116	8.54	0.08533
<i>Bramocharax</i> (L1 X L2)						
Linajes Mitocondriales						
L1 (<i>Astyanax</i> X <i>Bramocharax</i>)	-0.08	-0.00083	-0.01	-0.00009	8.54	0.08533
L2 (<i>Astyanax</i> X <i>Bramocharax</i>)						

Valores significativos en negritas ($P < 0.05$).

Con respecto a la prueba de Mantel donde se correlacionó las distancias genéticas mitocondriales determinadas por Φ_{ST} y las distancias nucleares calculadas para los 12 loci a partir de las D_{EST} encontramos una correlación negativa y no significativa ($r = -0.61$, $P = 0.052$), donde previamente se habían observado diferencias significativas entre los linajes mitocondriales y no entre morfotipos.

Tabla 6. Valores de diferenciación mitocondrial (Φ_{ST}) por debajo de la diagonal y valores de diferenciación nuclear (D_{ST}) por encima de la diagonal del sistema de carácidos del Lago Catemaco

	L1_Astyanax	L2_Astyanax	L1_Bramocharax	L2_Bramocharax
L1_Astyanax	-	0.00013	0.00020	0.00006
L2_Astyanax	0.75172	-	-0.00128	0.00048
L1_Bramocharax	0.00107	0.75682	-	-0.00109
L2_Bramocharax	0.75896	-0.00973	0.76834	-

En negritas se muestran los valores significativos después de la corrección de Bonferroni.

El análisis de ordenamiento entre los individuos (PCA) mostró, de forma similar a los resultados previos, que no hay una diferenciación entre los cuatro grupos analizados con los 12 microsatélites, siendo la población del río Máquinas la única que se agrupó por separado. En los dos primeros componentes se acumuló un 47.9% de la varianza.

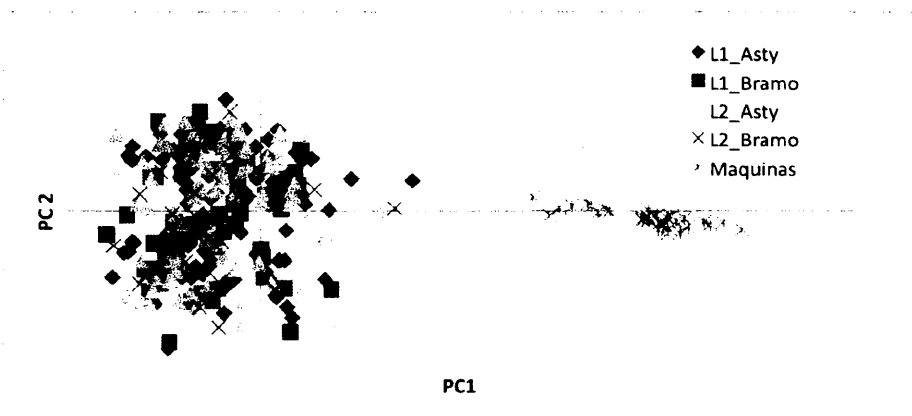
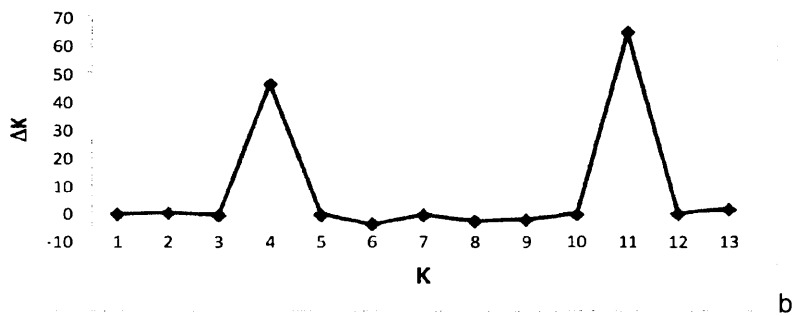
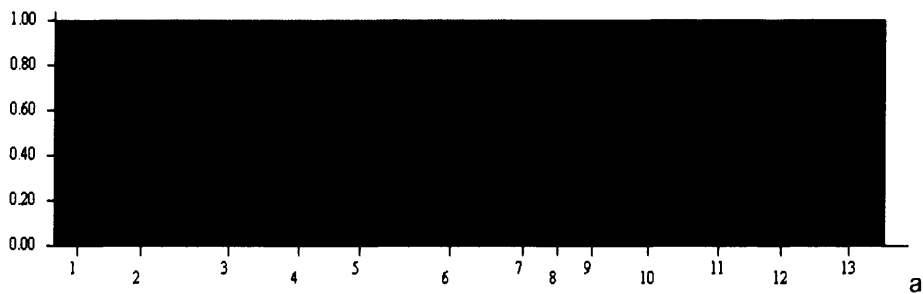


Figura 5. Análisis de ordenamiento de componentes principales (PCA). Con los dos primeros componentes se acumuló un 47.9% de la varianza.

Los resultados de la aproximación Bayesiana de agrupamiento STRUCTURE 2.3.1. [43], para determinar la estructura entre los individuos presentaron, sin considerar a priori ninguna agrupación (“*admixture*”), una

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

ausencia de correspondencia entre la estructura genética ni con los morfotipos, ni con los linajes mitocondriales. Por el contrario observamos que el número más probable de grupos genéticos de nuestros datos en relación a los valores del incremento en el número de agrupaciones (ΔK), fue de $K=4$ y $K=11$ (figura 6b), presentando para el primer caso un valor medio de verosimilitud $L(K=4) = -18\ 473.47$ (-18 470.2 a -18 475.8) y para el segundo caso $L(K=11) = -19\ 568.625$ (-19 256.9 a -20 052.8). Sin embargo para ambos casos dichas agrupaciones no correspondían a individuos (por ejemplo véase la figura 7a), por lo que hasta la agrupación de $K=2$, con un valor medio de verosimilitud de $-18\ 675.32$ (-18 674.9 a -1 8676.1), se recuperaron individuos asignados a una sola agrupación para el Lago y la segunda agrupación se correspondía con la población de Máquinas (Figura 6a).



Especiación ecológica y los marcadores neutrales

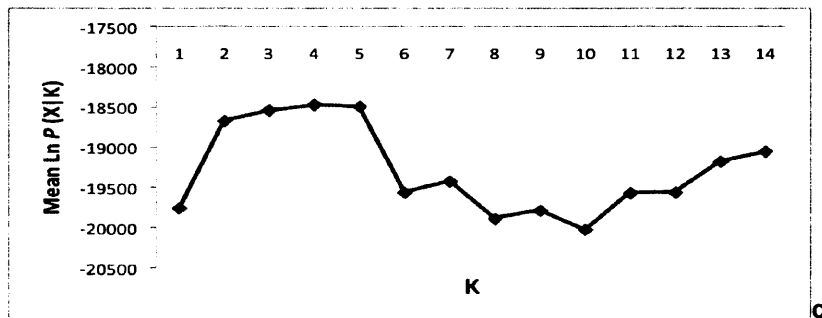


Figura 6. Agrupamiento de las poblaciones geográficas de los carácidos del Lago Catemaco y la población de Máquinas, sin considerar a priori ninguna agrupación (“*admixture*”) con STRUCTURE 2.3.1. [43]. a) Asignación en dos grupos genéticos (Lago Catemaco Vs Máquinas) $K=2$, b) Número de poblaciones con los valores más altos de probabilidad posterior expresado como ΔK , para las 16 poblaciones de carácidos. ΔK fue calculada como la media de los valores absolutos de la segunda derivación de $L(K)$ [44], c) Probabilidad posterior de los datos asumiendo diferentes valores de K .

Cuando se consideró a priori los cuatro grupos combinando la morfología y los linajes mitocondriales (L1_*Astyanax*, L1_*Bramocharax*, L2_*Astyanax* y L2_*Bramocharax*), sin incluir la población de Máquinas, se observó que de manera similar a lo obtenido previamente, el número más probable de grupos genéticos de nuestros datos en relación a valores del incremento en el número de agrupaciones (ΔK) fue de $K=7$ (figura 7b), presentando un valor medio de verosimilitud $L(K=7) = -18\,510.9$ (-17 642.6 a -19 302.3). Sin embargo dicha agrupación no corresponde a individuos, por lo que hasta la agrupación de $K=1$ con un valor medio de verosimilitud de -16 257.87 (-16 257.8 a -16 258.4), se recuperaban los individuos en una sola población dentro del Lago.

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

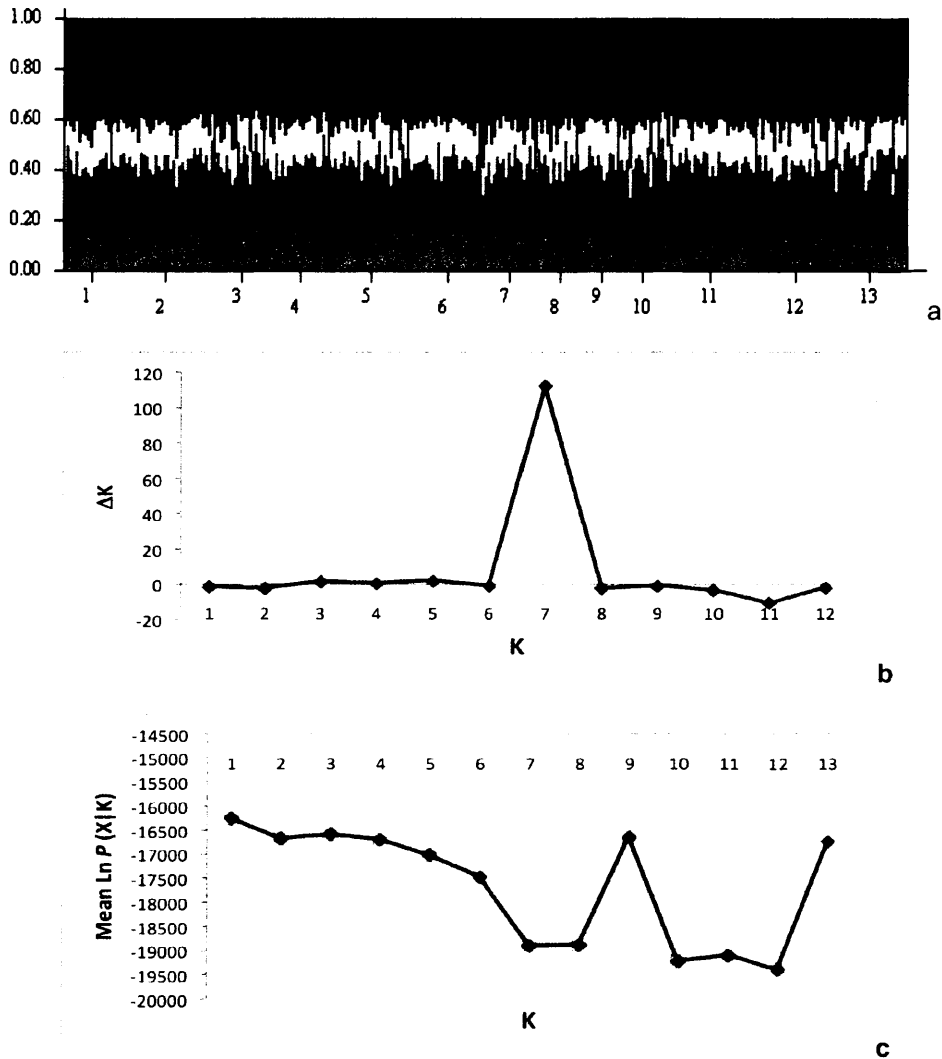


Figura 7. Agrupamiento de los carácidos del Lago Catemaco sin la población de Máquinas, considerando a priori los cuatro grupos combinando la morfología y los linajes mitocondriales (L1_*Astyanax*, L1_*Bramocharax*, L2_*Astyanax* y L2_*Bramocharax*) con STRUCTURE 2.3.1. [43]. a) Asignación en siete grupos genéticos $K=7$. b) Número de poblaciones con los valores más altos de probabilidad posterior expresado como ΔK , para las 16 poblaciones de carácidos. ΔK fue calculada como la media de los valores absolutos de la segunda derivación de $L(K)$ [44], c) Probabilidad posterior de los datos asumiendo diferentes valores de K .

Cuando se consideraron a priori los dos morfotipos (*Astyanax* Vs *Bramocharax*), sin incluir la población de Máquinas, no se recuperó una agrupación que correspondiera a éstos, siendo similar a lo obtenido

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

previamente, siendo en este caso $K=3$ la que obtuvo el valor más alto de probabilidad posterior, (figura 8b), presentando un valor medio de verosimilitud $L(K=3) = -16\ 585.37$ (-16 534.6 a -16 632.8). Sin embargo dicha agrupación no corresponde a individuos, por lo que hasta la agrupación de $K=1$ con un valor medio de verosimilitud de -16 258.3 (-16 258.1 a -16 258.9), se recuperaron los individuos los cuales se correspondían a una sola población dentro del Lago.

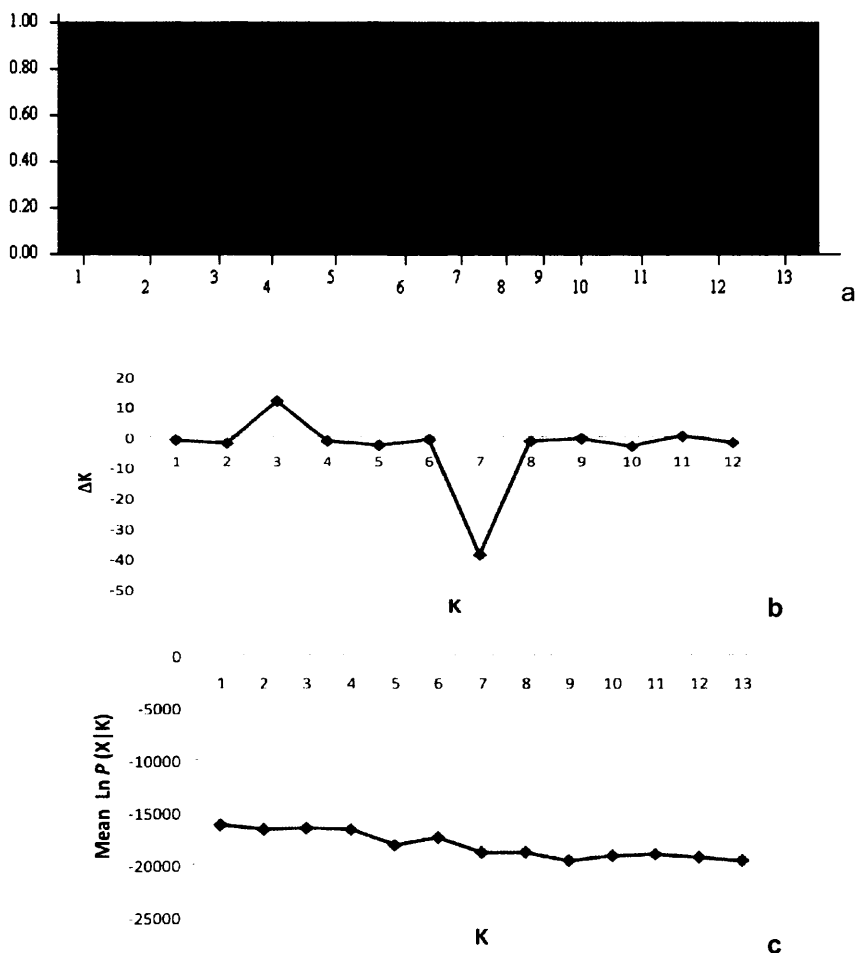


Figura 7. Agrupamiento de los carácidos del Lago Catemaco sin la población de Máquinas, considerando a priori los morfotipos (*Astyanax* Vs *Bramocharax*) con STRUCTURE 2.3.1. [43]. a) Asignación en siete grupos genéticos $K=3$. b) Número de poblaciones con los valores más altos de probabilidad posterior expresado como ΔK , para las 13 poblaciones de carácidos. ΔK fue calculada como la media de los valores absolutos de la segunda derivación de $L(K)$ [44]. c) Probabilidad posterior de los datos asumiendo diferentes valores de K .

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

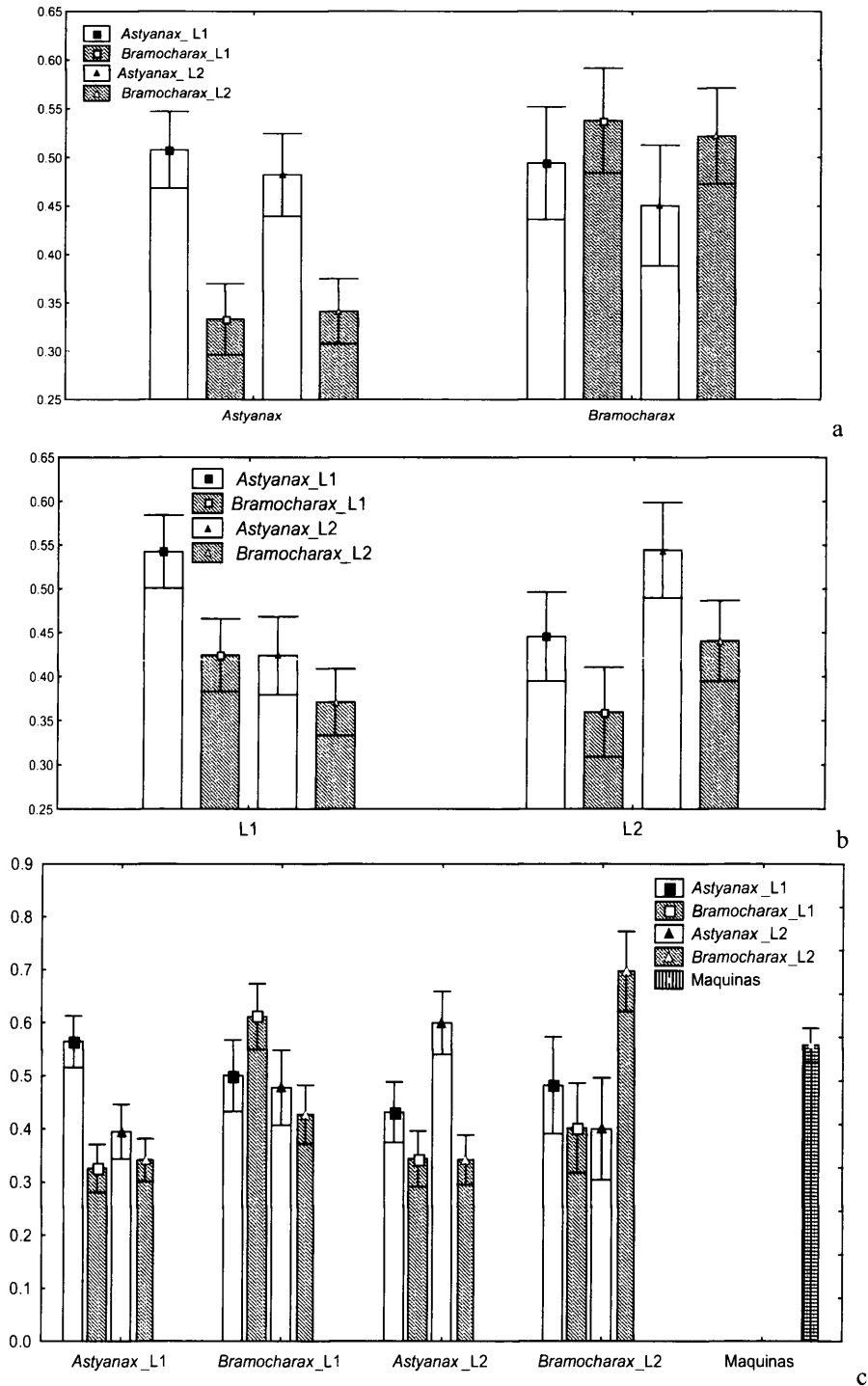


Figura 8. Frecuencias de asignación de los individuos considerando la morfología (a), los linajes mitocondriales (b) y su combinación (c). Las barras verticales denotan los intervalos de confianza al 95%.

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

Con respecto a las frecuencias de asignación calculadas en GENECLASS 2.0 [45], se observó que para la mayoría de los casos las poblaciones se auto asignaron en mayor frecuencia a su población original que a otra, esto es que presentaron una mayor auto asignación de acuerdo a los morfotipos, linajes mitocondriales y su combinación (Figura 8). En particular cabe destacar como se había observado antes que la población de Maquinas ha diferido significativamente del resto de grupos analizados ($P < 0.0001$), siendo su auto asignación mayor que ningún otro grupo y viceversa, ningún individuo fue asignado a la población de Maquinas (Figura 8c).

Por otro lado cuando comparamos por morfotipos, *Astyanax* Vs *Bramocharax* (figura 8a), encontramos que los dos linajes de *Bramocharax* se asignaron significativamente menos a *Astyanax* (post Hoc Tukey, *Bramocharax* L1 MS=0.06769 $P=0.000009$ y *Bramocharax* L2 MS=0.09088 $P=0.000009$, $gl=284$), patrón que no se observó para los *Astyanax* siendo no significativas las diferencias de asignación entre *Astyanax* y *Bramocharax* al morfotipo *Bramocharax*.

En la comparación por linajes mitocondriales también se encontraron diferencias significativas entre grupos (figura 8b), siendo el Linaje 1 del fenotipo *Astyanax* el que presentó una auto asignación significativa con respecto al resto (post Hoc Tukey MS=0.0769, $P=0.0036$), así como para el Linaje 2 tanto para *Bramocharax* y *Astyanax* (post Hoc Tukey, $P < 0.05$). Finalmente en la ANOVA de las frecuencias de asignación combinando los linajes mitocondriales y morfotipos, fue significativa ($P=0.0000$, $F(12, 738.46)=45.644$) mostrando

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

cada grupo una mayor frecuencia de auto asignación que al resto de los grupos (figura 8 c), los valores de significancia post Hoc se presentan en la tabla 7, sin embargo en términos generales las poblaciones que más difirieron significativamente del resto corresponden a Maquinas y *Bramocharax* Linaje 2.

Tabla 7. Comparaciones post Hoc Tukey de las frecuencias de asignación individuales para los cuatro grupos combinando la morfología y los linajes mitocondriales.

<i>Astyanax</i> _L1 MS = 0.07605, gl = 282		<i>Astyanax</i> _L1	<i>Bramocharax</i> _L1	<i>Astyanax</i> _L2
	<i>Bramocharax</i> _L1	0.470661		
	<i>Astyanax</i> _L2	0.004735	0.455179	
	<i>Bramocharax</i> _L2	0.445034	0.990742	0.810820
<i>Bramocharax</i> _L1 MS = 0.06488, gl = 282		<i>Astyanax</i> _L1	<i>Bramocharax</i> _L1	<i>Astyanax</i> _L2
	<i>Bramocharax</i> _L1	0.000008		
	<i>Astyanax</i> _L2	0.963456	0.000008	
	<i>Bramocharax</i> _L2	0.446685	0.001016	0.692033
<i>Astyanax</i> _L2 MS = 0.08400, gl = 282		<i>Astyanax</i> _L1	<i>Bramocharax</i> _L1	<i>Astyanax</i> _L2
	<i>Bramocharax</i> _L1	0.284541		
	<i>Astyanax</i> _L2	0.000014	0.065172	
	<i>Bramocharax</i> _L2	0.999804	0.609484	0.005104
<i>Bramocharax</i> _L2 MS = 0.05170, gl = 282		<i>Astyanax</i> _L1	<i>Bramocharax</i> _L1	<i>Astyanax</i> _L2
	<i>Bramocharax</i> _L1	0.087456		
	<i>Astyanax</i> _L2	0.999998	0.122045	
	<i>Bramocharax</i> _L2	0.000008	0.000008	0.000008

Cuando se calculó la migración entre los grupos definidos previamente combinando la morfología y los linajes mitocondriales, se observó que los únicos valores significativos fueron los que correspondían a la migración de Linaje 1 del morfotipo de *Astyanax* hacia el resto de grupos definidos (de 0.27 a 0.29), siendo este linaje también el que presentó los valores más altos de auto asignación (0.93) (Tabla 8).

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

Tabla 8. Valores de Migración entre los cuatro grupos combinando la morfología y los linajes mitocondriales.

	<i>L1_Astyanax</i>	<i>L1_Bramocharax</i>	<i>L2_Astyanax</i>	<i>L2_Bramocharax</i>
<i>L1_Astyanax</i>	0.934462	0.0511066	0.0121966	0.00223509
<i>L1_Bramocharax</i>	0.294123	0.688366	0.0127785	0.0047324
<i>L2_Astyanax</i>	0.271972	0.0509488	0.673657	0.00342268
<i>L2_Bramocharax</i>	0.285609	0.0261617	0.0117023	0.676527

En negrita están los valores de los no migrantes (auto-asignación), mientras que en cursiva los valores significativos de migración.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente estudio probamos la hipótesis de especiación ecológica mediante la evaluación de la interrupción (o reducción) del flujo genético [49] entre dos morfotipos presentes en el Lago Catemaco, la cual puede promover diversificación intralacustre [2, 4]. La alternativa se representa por la plasticidad fenotípica, en la que se espera flujo genético entre los individuos que la componen, permitiendo que éstos respondan a las condiciones ambientales en pocas generaciones y sin estar sujetos a fuertes presiones de selección [14, 15].

Como hemos descrito en el capítulo anterior, nuestro sistema de estudio en el Lago Catemaco consiste de al menos dos morfotipos bien diferenciados (*Bramocharax caballeroi* Vs *Astyanax aeneus*), los cuales han divergido de forma independiente en dos linajes evolutivos distintos. En otros modelos de diversificación ecológica intralacustre, se han reportado procesos de especialización es similar al nuestro, donde uno de los ecotipos ha divergido como resultado de la divergencia adaptiva presentando una especialización trófica, asociada a modificaciones en el patrón corporal relacionadas con el uso del hábitat [2, 4, 7, 50-55]. Siendo en nuestro caso *Bramocharax caballeroi* la forma especializada para el Lago Catemaco, y se caracteriza por presentar modificaciones en caracteres tróficos (número y forma de los dientes), así como modificaciones en otras estructuras como la cabeza, el tamaño del ojo, y la forma del cuerpo (por ejemplo, la altura del cuerpo y del pedúnculo caudal).

Todas estas características han sido previamente asociadas a la divergencia ecológica en otros modelos de especialización intralacustre [2, 4].

Por lo anterior consideramos que el presente sistema (*Bramocharax* Vs *Astyanax*) puede ser un buen modelo para la evaluación de la especiación ecológica, en un grupo de peces como los carácidos, donde a pesar de presentar en términos generales una morfología conservada, muestran adaptaciones tróficas como fuente importante de diversificación (Weitzman y Fink, 1983; Lucena, 1993).

En nuestro sistema de estudio encontramos que la población del río Máquinas fue la única que se diferenció del resto de las poblaciones analizadas, tanto en el análisis de ordenamiento, como en el agrupamiento genético (figuras 5 y 6). Así mismo, también fue ésta la que presentó los valores más bajos diversidad genética con una media de $H_o = 0.52$, mientras que para el resto de los grupos analizados la heterocigosidad observada fue mayor (>0.8). Por lo anterior, y como se había expuesto previamente, la población del río Máquinas, corresponde a una población aislada geográficamente, con base en tanto marcadores mitocondriales ($>5\%$ divergencia para el gen *cytb*) como con los marcadores nucleares utilizados en el presente capítulo, presenta una clara diferenciación genética con otras poblaciones de la especie *Astyanax aeneus* [19] siendo tentativamente la deriva génica la responsable de dicha diferenciación. Es por esto que sería necesario llevar a cabo una revisión en la cual se pueda establecer si puede ser considerada como una especie distinta, ya que debido a su baja diversidad

genética, y restringida área de distribución, sería necesario llevar programas de conservación que permitan el mantenimiento de este linaje evolutivo y por lo tanto de la diversidad dentro del género en la región descrita.

Por otra parte, en el Lago Catemaco, y en contraste con lo que se esperaría, los cuatro grupos analizados en el presente estudio relacionados con los fenotipos y los linajes mitocondriales (L1_*Astyanax*, L2_*Astyanax*, L1_*Bramocharax* y L2_*Bramocharax*) no presentaron señales de interrupción del flujo genético entre los grupos. Por tanto en nuestro sistema no podemos proponer a la especiación ecológica como el proceso que explica la divergencia morfológica encontrada, la cual se caracteriza por presentar una selección divergente que está sujeta a la selección sexual (asociada a un carácter), dando como resultado el aislamiento reproductivo [9]. Los valores de F_{ST} para los cuatro grupos no fueron significativos ($P > 0.05$, tabla 4), así mismo los valores de D_{EST} fueron considerablemente bajos. Por otro lado en la AMOVA jerárquica las comparaciones entre grupos no fueron significativas, tanto para las comparaciones entre linajes mitocondriales (L1 Vs L2), como para el agrupamiento por morfotipos (*Astyanax* Vs *Bramocharax*) siendo explicada la mayor proporción de la varianza, en ambos casos, por las diferencias dentro de las poblaciones (8.54%, $F_{IS} = 0.08533$). Más aún en el test de Mantel entre las diferencias calculadas con el mitocondrial (Φ_{ST}) Vs nuclear (D_{EST}), hubo una correlación negativa, aunque no fue significativa.

El análisis de agrupamiento, STRUCTURE discriminó entre los grupos alopátricos (Máquinas Vs Lago Catemaco), sin embargo bajo ningún escenario

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

fueron recuperadas agrupaciones correspondientes a los fenotipos, linajes mitocondriales o su combinación. Para el Lago Catemaco se obtuvo una $K=1$, y aunque en algunos casos el número de grupos más probable fue superior a 1 en todos los casos dichas agrupaciones no correspondían con asignaciones individuales, por lo tanto ningún individuo podía ser asociado con grupos discretos y mucho menos a fenotipos o linajes mitocondriales (por ej. *Astyanax* Vs *Bramocharax*).

En contraparte con los resultados obtenidos con STRUCTURE, las asignaciones individuales obtenidas con GENECLASS al parecer sí que mostraron una congruencia con la morfología. De estos resultados cabe resaltar la alta auto asignación del morfotipo *Bramocharax*, en contraste con *Astyanax* cuando se comparó entre morfotipos. Así como cuando se comparó por la combinación entre morfotipos y linajes fueron significativas la mayoría de las diferencias entre *Bramocharax* del Linaje 2 y el resto de grupos, siendo este último, junto con ambos linajes de *Astyanax*, los que presentaron los valores más altos de auto asignación (frecuencia <0.6 , figura 8).

Por otro lado las tasas de migración obtenidas fueron significativas en dirección del linaje 1 fenotipo *Astyanax* hacia el resto de grupos (de 0.27 a 0.29), mientras que fue éste grupo el que también presentó los valores más altos de auto-asignación. En este sentido, y en ausencia de barreras geográficas que impidan el flujo genético, nuestros datos con microsatélites no muestran una divergencia genética asociada a la divergencia morfológica. Más aún, las diferencias en tamaño entre morfotipos se han propuesto como un

carácter responsable del aislamiento pre-cigótico entre especies simpátricas cercanas (por ej. el salmón rojo o los espinosos [9, 56], sin embargo en nuestro sistema no parecen ser determinantes en el flujo genético entre los morfotipos, siendo *Bramocharax* significativamente más grande que *Astyanax*. Por último, con base en nuestros resultados no parece haber una presión negativa desfavorable para los híbridos con fenotipo intermedio, en contraste con lo que se ha propuesto previamente [57].

Por lo tanto y a pesar de que con los 12 loci nucleares no se encontró una diferenciación molecular correspondiente a la diferenciación morfológica, ni a la diferenciación mitocondrial descrita previamente, debemos considerar también las limitaciones de los marcadores utilizados, así como que otros procesos pueden estar involucrados en el sistema de estudio que no impliquen especiación ecológica.

Por lo anterior, y con base en nuestros resultados, no ha sido posible probar la especiación ecológica, para la cual sería necesario un aislamiento reproductivo entre los fenotipos asociados a un ambiente [7], sin embargo es posible que en nuestro sistema otros procesos puedan explicar el patrón observado. Por ejemplo puede estar siendo favorecida una elevada plasticidad fenotípica, lo cual promueve un escenario con un elevado flujo genético entre fenotipos y los individuos con mayor plasticidad presentan una mayor probabilidad para sobrevivir bajo una mayor variedad de ambientes [15].

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

Aún así es necesario considerar las limitaciones de los marcadores empleados en el presente estudio ya que en recientes estudios se ha observado que ciertas regiones del genoma no muestran señales de selección divergente (con marcadores genéticos neutrales como los microsatélites). Por tanto si se encuentra evidencia de un flujo reducido entre poblaciones divergentes ecológicamente con dichos marcadores (neutrales) puede ser un buen indicador de especiación ecológica, pero la ausencia de dicha diferenciación no necesariamente implica que la especiación ecológica no esté ocurriendo [10, 58]. Basados en lo anterior, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que puede ser arriesgado evaluar la especiación ecológica con marcadores genéticos neutrales, ya que la coherencia y la fuerza que la selección divergente ejerce sobre algunas regiones del genoma pueden ser inciertas, y donde se espera que primero se presente la divergencia adaptativa seguida por el aislamiento reproductivo [10].

Por ejemplo, se ha reportado que sólo el 10% del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), se habían separado entre las poblaciones de insectos adaptados a diferentes ambientes [59]. Es por esto que señales de divergencia con marcadores neutrales son esperados, siempre y cuando, la selección divergente y la selección sexual sean lo suficientemente fuertes y los niveles de flujo genético sea restringido, y por lo tanto marcadores neutrales elegidos al azar, como regularmente son utilizados, pueden fallar en detectar una señal de especiación ecológica. Es así que poblaciones adaptadas a ambientes divergentes con un cierto nivel de flujo genético persistente pueden mostrar señales de divergencia genética sólo si los loci

estudiados se encuentren bajo presiones de selección y que estos marcadores se encuentren ligados a ellos [58].

Así mismo, en otros modelos intralacustres en cíclidos de sur América, que presentan en términos generales un patrón de radiación adaptativa, no ha sido posible detectar una correlación entre la diferenciación genética y la diferenciación morfológica utilizando microsatélites o secuencias de ADN mitocondrial [17]. De forma similar en el complejo de especies *Coregonus spp.* de los Grandes Lagos de Norte América, no presentaron señales de divergencia genética congruente con la diferenciación morfológica utilizando seis loci nucleares altamente polimórficos (microsatélites), a excepción que en este modelo sí se observó una correlación entre la diferenciación molecular mitocondrial y nuclear, sugiriendo que uno de los morfotipos presentes correspondían con una invasión reciente [60].

Por último, también en otros grupos se ha reportado la ausencia de estructura genética entre diferentes morfotipos, tal es el caso de un grupo de anfípodos en donde fueron evaluados seis loci y no fue posible obtener una divergencia genética correspondiente con dos ecotipos presentando, de forma similar al presente estudio, una mayor variación genética entre las poblaciones que dentro o entre ecotipos [16].

En este sentido nuestro sistema puede coincidir con lo que se ha propuesto previamente, donde a pesar de no tener señales de una interrupción del flujo genético, lo cual es considerado como una de las características de la de especiación ecológica, la ausencia de dicha señal no implica que no haya

Especiación ecológica y los marcadores neutrales

un proceso de divergencia adaptativa, o incluso que no haya especiación ecológica la cual no ha sido posible detectar con los marcadores nucleares utilizados. Por otro lado la presencia de flujo genético entre poblaciones adaptadas a diferentes ambientes puede favorecer la plasticidad fenotípica, la cual puede maximizar la eficacia biológica, en contradicción con fenotipos altamente especializados a un sólo ambiente [61]. Más aún hemos observado que el flujo genético es unidireccional, desde el linaje 1 del fenotipo de *Astyanax* hacia el resto de grupos, esto puede incrementar la plasticidad en la poblaciones receptoras debido a que el flujo genético no se da desde las poblaciones divergentes hacia la población donadora [15].

Conclusiones

La plasticidad fenotípica puede ser un factor determinante en la evolución del sistema de carácidos dentro del Lago Catemaco, cuyo efecto puede representar una ventaja adaptativa [61], permitiendo que los individuos puedan adaptarse más rápidamente a condiciones ambientales variables y por lo tanto se relaje la fuerza de la selección. Además, dicha plasticidad puede promover la diversidad dentro de los grupos promoviendo que las poblaciones adaptadas diverjan adaptativamente, así como incrementar el potencial evolutivo en diferentes ambientes, favoreciendo la divergencia adaptativa con respecto a adaptaciones locales [15].

Por otro lado, a pesar de que no fue posible probar la especiación ecológica en nuestro modelo, es necesario llevar a cabo en un futuro

experimentos controlando las condiciones ambientales así como la dieta, para poder evaluar la divergencia adaptativa entre los fenotipos estudiados [7, 15].

Es importante mencionar que en futuros estudios se puede incluir un mayor número de loci o llevar a cabo otro tipo de estudios, tipo QTLs [22], con el fin de caracterizar de forma más potente la asociación entre el genotipo y el fenotipo, ya que en los últimos años se ha cuestionado el uso de marcadores genéticos neutrales (microsatélites), ya que sólo un pequeño porcentaje de éstos pueden estar sujetos a selección divergente [59]. Como se ha propuesto, éstos pueden dar definición solamente bajo ciertos escenarios, esto es, cuando las diferencias ambientales deben ser muy contrastantes y donde muy poco migrantes puedan exitosamente adaptarse, así como una fuerte presión de selección sexual. Este escenario puede a su vez resultar mucho más frecuente en poblaciones pequeñas (<250 individuos) [10], condiciones que tendrán que ser abordadas en un futuro.

5.5 REFERENCIAS

1. Sidlauskas B: **Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of Characiform fishes: a phylomorphospace approach.** *Evolution* 2008, **62**(12):3135-3156.
2. Barluenga M, Stolting K, Salzburger W, Muschick M, Meyer A: **Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish.** *Nature* 2006, **439**:719 - 723.
3. Elmer K, Fan S, Gunter H, Jones J, Boekhoff S, Kuraku S, Meyer A: **Rapid evolution and selection inferred from the transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes.** *Mol Ecol* 2010, **19**(Suppl 1):197 - 211.
4. Schluter D: **Ecological Causes of Adaptive Radiation.** *Am Nat* 1996, **148**:S40-S64.
5. McKinnon JS, Rundle HD: **Speciation in nature: the threespine stickleback model systems.** *Trends Ecol Evol* 2002, **17**(10):480-488.
6. LANGERHANS RB, LAYMAN CA, LANGERHANS AK, DEWITT TJ: **Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species.** *Biol J Linn Soc* 2003, **80**(4):689-698.
7. Schluter D: **Ecology and the origin of species.** *Trends Ecol Evol* 2001, **16**(7):372-380.
8. Hatfield T, Schluter D: **Ecological speciation in sticklebacks: environment-dependent hybrid fitness.** *Evolution* 1999, **53**(3):866-873.
9. Nagel L, Schluter D: **Body size, natural selection, and speciation in sticklebacks.** *Evolution* 1998, **52**(1):209-218.
10. Thibert-Plante X, Hendry A: **Five questions on ecological speciation addressed with individual-based simulations.** *J Evol Biol* 2009, **88**:109 - 123.
11. Chenoweth S, Rundle H, Blows M: **The contribution of selection and genetic constraints to phenotypic divergence.** *Am Nat* 2010, **175**:186-196.
12. Hendry A: **Ecological speciation! Or the lack thereof?** *Can J Fish Aquat Sci* 2009, **66**(8):1383-1398.
13. Mank JE: **Sexual Selection and Darwin's Mystery of Mysteries.** *Science* 2009, **326**(5960):1639-1640.

14. Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, Cruickshank T, Schlichting CD, Moczek AP: **Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation.** *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* 2010, **25**(8):459-467.
15. Crispo E: **Modifying effects of phenotypic plasticity on interactions among natural selection, adaptation and gene flow.** *J Evol Biol* 2008, **21**(6):1460-1469.
16. McPeck MA, Wellborn GA: **Genetic Variation and Reproductive Isolation Among Phenotypically Divergent Amphipod Populations.** *Limnol Oceanogr* 1998, **43**(6):1162-1169.
17. Elmer K, Lehtonen T, Kautt A, Harrod C, Meyer A: **Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historic times.** *BMC Biol* 2010, **8**(1):60.
18. Ferrari L, Tagami T, Eguchi M, Orozco-Esquivel MT, Petrone CM, Jacobo-Albarran J, Lopez-Martinez M: **Geology, geochronology and tectonic setting of late Cenozoic volcanism along the southwestern Gulf of Mexico: The Eastern Alkaline Province revisited.** *J Volcanol Geoth Res* 2005, **146**(4):284-306.
19. Ornelas-Garcia CP, Dominguez-Dominguez O, Doadrio I: **Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies.** *BMC Evol Biol* 2008, **8**:340.
20. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: **Molecular cloning: A laboratory manual.** New York: Cold Spring Laboratory; 1989.
21. Protas M, Conrad M, Gross JB, Tabin C, Borowsky R: **Regressive Evolution in the Mexican Cave Tetra, *Astyanax mexicanus*.** *Curr Biol* 2007, **17**(5):452-454.
22. Protas ME, Hersey C, Kochanek D, Zhou Y, Wilkens H, Jeffery WR, Zon LI, Borowsky R, Tabin CJ: **Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism.** *Nat Genet* 2006, **38**(1):107-111.
23. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P: **micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data.** *Mol Ecol Notes* 2004, **4**(3):535-538.

24. Goudet J: **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3)**. In.; 2001.
25. Guo SW, Thompson EA: **Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles**. *Biometrics* 1992, **48**(2):361-372.
26. Raymond M, Rousset F: **Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism**. *J Hered* 1995, **86**(3):248-249.
27. Rice W: **Analyzing tables of statistical tests**. *Evolution* 1989, **43**(1):223-225.
28. Wilson GA, Rannala B: **Bayesian Inference of Recent Migration Rates Using Multilocus Genotypes**. *Genetics* 2003, **163**(3):1177-1191.
29. Lugon-Moulin N, Brunner H, Balloux F, Hausser J, Goudet J: **Do riverine barriers, history or introgression shape the genetic structuring of a common shrew (*Sorex araneus*) population?** *Heredity* 1999, **83**:155-161.
30. Hedrick P: **Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation**. *Evolution* 1999, **53**(2):313-318.
31. Hedrick PW: **A standardized genetic differentiation measure**. *Evolution* 2005, **59**(8):1633-1638.
32. Heller R, Okello JBA, Siegismund H: **Can small wildlife conservancies maintain genetically stable populations of large mammals? Evidence for increased genetic drift in geographically restricted populations of Cape buffalo in East Africa**. *Mol Ecol* 2010, **19**(7):1324-1334.
33. Heller R, Siegismund HR: **Relationship between three measures of genetic differentiation GST, DEST and G'ST: how wrong have we been?** *Mol Ecol* 2009, **18**(10):2080-2083.
34. Jost L: **GST and its relatives do not measure differentiation**. *Mol Ecol* 2008, **17**(18):4015-4026.
35. Crawford NG: **smogd: software for the measurement of genetic diversity**. *Molecular Ecology Resources* 2010, **10**(3):556-557.
36. Weir BS, Cockerham CC: **Estimating F-statistics for the analysis of population structure**. *Evolution* 1984, **38**(6):1358-1370.
37. Excoffier L, Laval G, Schneider S: **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis**. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005, **1**:47-50.

38. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM: **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data.** *Genetics* 1992, **131**(2):479-491.
39. Schneider S, Roessli D, Excoffier L: **Arlequin ver 2.000: a software for population genetics data analysis.** In. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva; 2000.
40. Mantel NA: **The detection of disease clustering and a generalized regression approach.** *Cancer Res* 1967, **27**:209-220.
41. Guinand B: **Use of a multivariate model using allele frequency distributions to analyse patterns of genetic differentiation among populations.** *Biol J Linn Soc* 1996, **58**(2):173-195.
42. Belkir K, Borsa P, Chickhi L, Raufaste N, Bonhomme F: **Genetix 4.04 logici el sous windows tm, pour la génétique des poblacions.** Montpellier, France: Université de Montpellier II, Laboratoire Génome, Poblacions, Interactions, CNRS UMR 5000; 2000.
43. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P: **Inference of population structure using multilocus genotype data.** *Genetics* 2000, **155**(2):945-959.
44. Evanno G, Regnaut S, Goudet J: **Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study.** *Mol Ecol* 2005, **14**(8):2611-2620.
45. Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A: **GeneClass2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection.** *J Hered* 2004, **95**:536-539.
46. Rannala B, Mountain JL: **Detecting immigration by using multilocus genotypes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**(17):9197-9201.
47. Statistica S-I: **STATISTICA (data analysis software system) version 6.** In.: www.statsoft.com; 2001.
48. Hardy OJ, Charbonnel N, Freville H, Heuertz M: **Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation.** *Genetics* 2003, **163**(4):1467-1482.
49. Mayr E: **Animal species and evolution:** Harvard Univesity Press; 1963.
50. Barluenga M, Meyer A: **The Midas cichlid species complex: incipient sympatric speciation in Nicaraguan cichlid fishes?** *Mol Ecol* 2004, **13**:2061 - 2076.

51. Klingenberg C, Barluenga M, Meyer A: **Body shape variation in cichlid fishes of the *Amphilophus citrinellus* species complex.** *Biol J Linn Soc* 2003, **80**:397 - 408.
52. Rüber L, Verheyen E, Meyer A: **Replicated evolution of trophic specializations in an endemic cichlid fish lineage from Lake Tanganyika.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**(18):10230-10235.
53. Schluter D: **Ecological speciation in postglacial fishes.** *Phil Trans R Soc B* 1996, **351**:807 - 814.
54. Schluter D: **The Ecology of Adaptive Radiations.** 2000.
55. Schluter D, McPhail J: **Ecological character displacement and speciation in sticklebacks.** *Am Nat* 1992, **140**:85.
56. Schluter D: **Adaptive radiation in sticklebacks: size, shape, and habitat use efficiency.** *Ecology* 1993, **74**(3):699-709.
57. Crow KD, Munehara H, Bernardi G: **Sympatric speciation in a genus of marine reef fishes.** *Mol Ecol* 2010, **19**(10):2089-2105.
58. Rice AM, Pfennig DW: **Does character displacement initiate speciation? Evidence of reduced gene flow between populations experiencing divergent selection.** *J Evol Biol* 2010, **23**(4):854-865.
59. Nosil P, Egan SP, Funk DJ: **Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: “isolation by adaptation” and multiple roles for divergent selection.** *Evolution* 2008, **62**(2):316-336.
60. Turgeon J, Estoup A, Bernatchez L: **Species Flock in the North American Great Lakes: Molecular Ecology of Lake Nipigon Ciscoes (Teleostei: Coregonidae: *Coregonus*).** *Evolution* 1999, **53**(6):1857-1871.
61. Richards CL, Bosssdorf O, Muth NZ, Gurevitch J, Pigliucci M: **Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions.** *Ecol Lett* 2006, **9**(8):981-993.

6. DISCUSIÓN

6.1 Relaciones filogenéticas

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue conocer las relaciones filogenéticas del género *Astyanax* Baird & Girard (1854) en Mesoamérica. Para abordar estas relaciones filogenéticas analizamos el material más completo, en cuanto a número y extensión de las muestras, así como el mayor número de marcadores moleculares hasta la fecha. En contraste con los estudios filogenéticos previos [1, 2], encontramos una estructura geográfica correspondiente a las relaciones filogenéticas dentro del género. El modelo biogeográfico propuesto en esta tesis doctoral es coincidente con otros modelos llevados a cabo para peces de agua dulce de la región [3-5], lo cual en su conjunto permite entender mejor la historia biogeográfica y la paleohidrografía de Mesoamérica.

Por otro lado en el presente estudio nos permitió ahondar más en los patrones interespecíficos de *Astyanax* presentes en Mesoamérica. En este sentido no se observaron linajes mitocondriales cercanos en simpatria, y cuando ocurrió las divergencias eran en su mayoría superiores al 3% de divergencias absolutas con genes del ADN mitocondrial, lo cual coincide con estudios previos para otros carácidos de la región [6]. Este hecho ha sido interpretado en esta tesis doctoral como el resultado tanto de la historia evolutiva del grupo, posiblemente asociado con un proceso de recambio de los linajes (*lineage turnover*), como a las posibles interacciones ecológicas entre dichos linajes. Estas interacciones ecológicas dan lugar a un solapamiento de nicho entre especies cercanas que puede llevar a la exclusión competitiva, siendo desplazado un linaje por otro.

Por otro lado y a diferencia de la región norte de Centroamérica y México, en la parte meridional de Centroamérica no fue posible resolver las relaciones filogenéticas basales entre los grupos analizados (incluso para el subconjunto de datos de 3.8 Kpb). Lo anterior puede ser explicado por una radiación rápida de estos linajes alrededor de 6.9 Ma durante el Mioceno superior. Este mismo patrón se ha observado en otros peces de agua dulce en Mesoamérica [3-7].

6.2 Historia biogeográfica de los carácidos Mesoamericanos

Con nuestros datos fue posible apoyar la hipótesis generalizada de un origen sudamericano para el género *Astyanax* [6, 8, 9], basados principalmente en la congruencia geográfica con las relaciones obtenidas, siendo filogenéticamente más cercanos los grupos más meridionales de Centroamérica a nuestros grupos externos de América del Sur, en particular *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) de Brasil y *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) de Argentina. Por otro lado y mediante el cálculo de un reloj molecular obtuvimos una tasa media de divergencia entre dos linajes para el gen mitocondrial *cytb* de 0.8% por millón de años (Ma), esta divergencia correspondió a las distancias corregidas utilizando el modelo de sustitución *K81uf*. Nuestra estima de divergencia resultó coincidente con otras descritas previamente para el citocromo b y para otros grupos de peces de agua dulce, calculada en trabajos recientes tanto con fósiles, como con divergencias

Discusión general

geográficas, la cual varía alrededor del 1%/Ma utilizando diferentes modelos de substitución [3, 10, 11].

En el presente estudio se ha propuesto un escenario biogeográfico para el género *Astyanax* en Mesoamérica, basado tanto en sus relaciones filogenéticas, así como en el reloj molecular. En este sentido fue calculada la primera expansión para el género hacia Centroamérica desde el hemisferio Sur en aproximadamente 8 Ma (7.8 - 8.1 Ma). Esta estima no coincide con la información geológica de la zona, para la cual se ha propuesto que el cierre del Istmo de Panamá se completó hace ~ 3,3 Ma [12-14]. Por lo tanto nuestra hipótesis biogeográfica parece incongruente con los datos geológicos y contradice estudios previos realizados para algunos carácidos de los géneros *Brycon*, *Bryconamericus*, *Eretmobrycon* y *Cyphocharax* [6], incluso para lo propuesto anteriormente para el propio género *Astyanax* [2], cuya expansión desde sur América se estimó alrededor ~3.3 Ma, coincidiendo con el cierre final del Istmo de Panamá.

Sin embargo, algunos autores ya habían propuesto una conexión entre Sur América y Centroamérica en una época anterior al Plioceno situada probablemente en el Cretácico como resultado de la formación de las protoantillas [15, 16]. Según estos autores los géneros ampliamente distribuidos en la parte norte del continente, como es el caso de cíclidos, poecílidos y del género *Astyanax*, habrían colonizado Mesoamérica antes del cierre del Istmo de Panamá (~3.3 Ma).

Discusión general

Durante las últimas décadas estos patrones se han ido confirmando para varios grupos de peces en Mesoamérica, sin embargo en muy contadas excepciones coinciden en el Cretácico, la cual pareciera ser una época muy temprana, y en particular nuestro modelo tampoco coincide. Sin embargo son múltiples los ejemplos donde se señala una colonización previa al Plioceno, y en particular anteriores al cierre del Istmo [3-5, 17], mostrando diferentes fechas, rutas y número de eventos de acuerdo a las capacidades de dispersión de cada grupo.

Una vía de conexión entre faunas de norte y sur América ha sido propuesta por las antillas a través del corredor de GAARlandia [14] (figura 6.1), el cual debió de servir de conexión de ictiofaunas y vía de dispersión de faunas sudamericanas durante gran parte del Cenozoico. Es así como las primeras colonizaciones de la ictiofauna se remontan al Cretácico para la familia Poeciliidae [18], seguido de múltiples eventos de colonización posteriores.

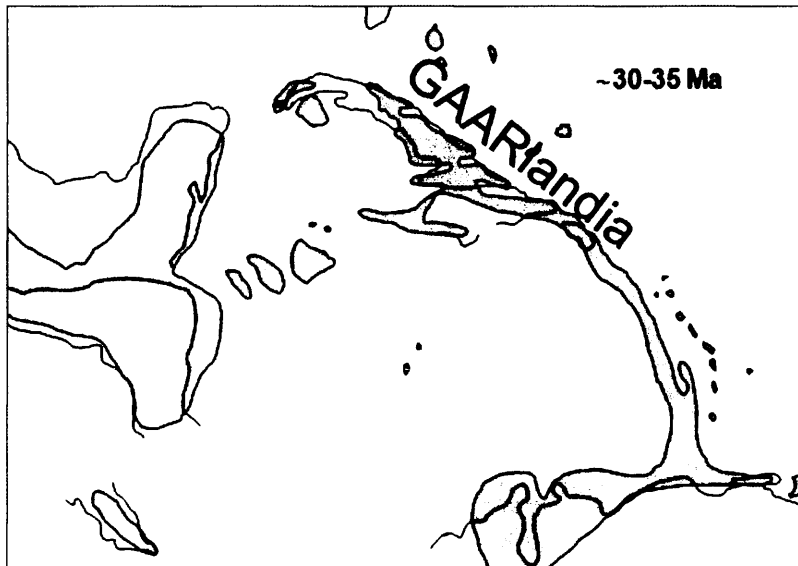


Figura 6.1. Hipótesis biogeográfica de GAARlandia, de la colonización de las Antillas y Centroamérica propuesta por Iturralde-Vinent y MacPhee (1999) [14], durante el Eoceno/Oligoceno (~30-35 Ma).

Sin embargo este modelo biogeográfico (GAARlandia), no puede ser aplicado a nuestro caso de estudio, ya que el género *Astyanax*, así como ningún otro carácido americano, cuenta con representantes en las islas del Caribe. La ausencia de carácidos en las Antillas puede ser explicada por sus características fisiológicas, lo cuales al ser peces primarios [15], y en contraparte con los poeciífididos, no toleran la salinidad lo que limita en gran medida su dispersión.

Los tiempos de divergencia y dispersión del género *Astyanax* parece coincidir con algunos grupos dentro de las familias Cichlidae [3] o Synbranchidae [5], cuya presencia en la parte sur de Centroamérica puede remontarse al Mioceno (entre 23 y 5 Ma). Más aún nuestro género parece

Discusión general

coincidir con el modelo propuesto previamente por Bermingham y Martin [17], basado en la filogeografía comparada para tres géneros de peces de agua dulce y que consistió en múltiples eventos expansión y extinción los cuales explican la distribución actual de algunos carácidos y otros grupos de peces primarios. En el modelo de Bermingham y Martin (1998), el evento de expansión más antiguo se presentó entre 4 y 7 Ma (figura 6.2), y es explicado por una formación incipiente del istmo de Panamá, seguido de una extinción, debido a cambios en los niveles del océano y por último una reciente colonización una vez que el Istmo de Panamá se cerró por completo (~3 Ma).

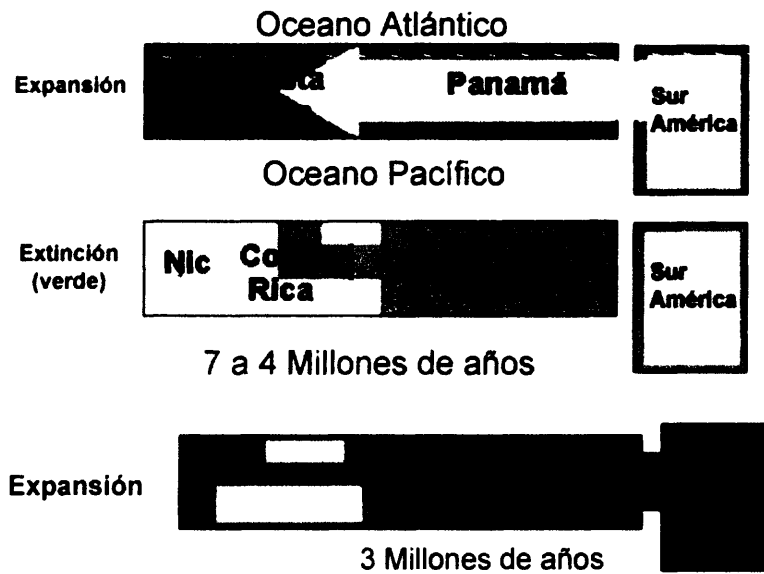


Figura 6.2. Hipótesis biogeográfica propuesta por Bermingham y Martin (1998), para la colonización de Centroamérica por la fauna dulce acuícola suramericana, basada en la biogeografía comparada de tres géneros Neotropicales: *Roeboides* (Characidae), *Pimelodella* (Pimelodidae) e *Hypopomus* (Hypopomidae).

6.3 Principales eventos de vicarianza en el género *Astyanax*

Los principales eventos de vicarianza para el género *Astyanax* en Mesoamérica debieron ocurrir a finales del Mioceno y principios del Plioceno (4-8 millones de años). Estos grandes eventos vicariantes se produjeron principalmente en la región más meridional de Centroamérica (Panamá y Costa Rica principalmente). Este periodo coincide con una fragmentación geográfica del sur de Centroamérica, como consecuencia de movimientos tectónicos [13, 14] (figura 6.3), que finalmente dieron lugar al cierre del Istmo de Panamá hace ~ 3.3 Ma. Del mismo modo a la vez que ocurre esta fragmentación de la parte sur de Centroamérica, donde los clados encontrados presentaron distribuciones limitadas, debieron ocurrir extinciones locales relacionadas con cambios en los niveles eustáticos del mar (5-8 Ma) [19].

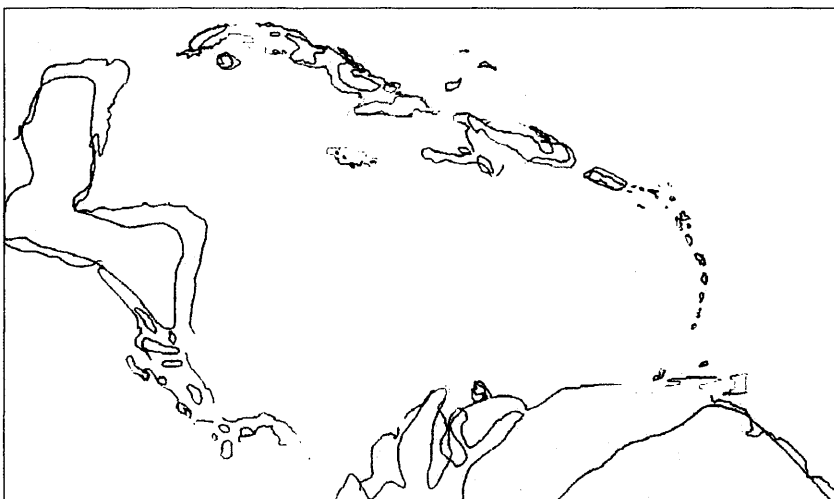


Figura 6.3. Hipótesis geológica de Centroamérica propuesta por Iturralde-Vinent y MacPhee [14], Mioceno-Plioceno (15 – 4 Ma).

Discusión general

El otro gran evento vicariante ocurre en la región septentrional de América Central (México-EEUU) y corresponde a la formación del Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (ENTM). El ENTM cruza México de este a oeste, desde el océano Pacífico al Atlántico, y su formación geológica se sitúa entre 3 y 12 Ma, aunque la actividad volcánica continua hasta la actualidad [20-22].

En particular el ENTM parece constituir una barrera importante para *Astyanax*, con la cual coincide con la separación entre *Astyanax mexicanus*, situada al norte del ENTM y *Astyanax aeneus*, situada al sur del ENTM. Nuestra datación del reloj molecular para la separación de ambos taxones (4-6 Ma) es coherente con el periodo de formación del ENTM.

6.4 Otros patrones biogeográficos

Además de los grandes eventos vicariantes descritos, ha sido posible contrastar algunos modelos biogeográficos propuestos previamente en Mesoamérica, tal es el caso de las regiones ictio-faunísticas propuestas por Bussing (1985) [23]. En primer lugar y de acuerdo con Bussing (1985) se observó una congruencia con la Región del Istmo, la cual presentó un patrón de fragmentación similar al reportado para otros peces de agua dulce [4, 6, 24]. Con respecto a las regiones Usumacinta, Chiapas-Nicaragua y San Juan las diferencias correspondieron a sus límites por lo que en la figura 6.4 se esquematiza los límites obtenidos para cada una de las regiones anteriormente propuestas por Bussing (1985) [23].

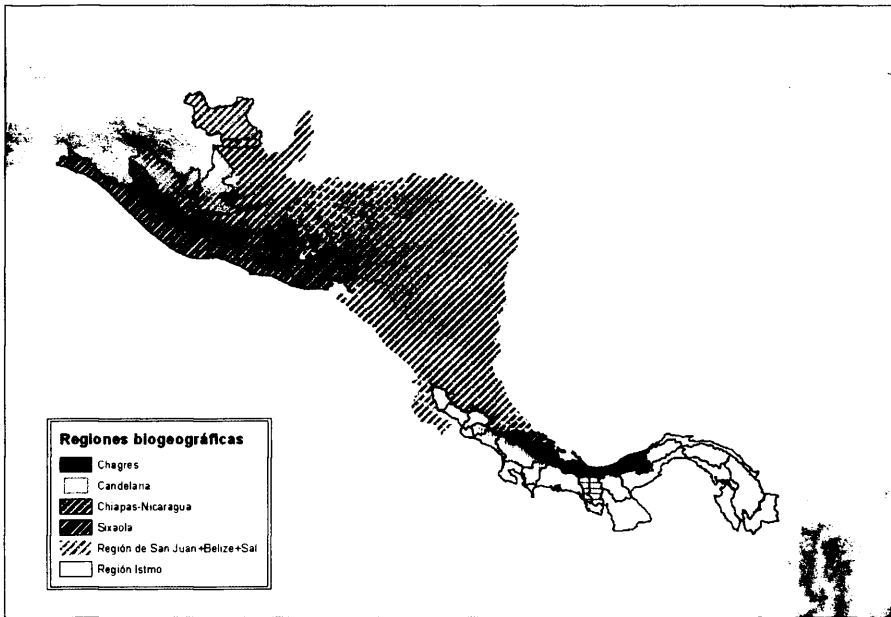


Figura 6.4. Regiones biogeográficas obtenidas para el género *Astyanax* en Centroamérica, con relación a las regiones previamente descritas por Bussing (1985), para la misma región.

De manera singular, se observó un proceso de recambio de linajes en toda la distribución norte del género *Astyanax*, donde solo se observó simpatria de linajes mitocondriales altamente divergentes (>5% de divergencia con las distancias corregidas, *K81uf*), lo cual había sido previamente descrito para otros carácidos en Centroamérica [6].

6.5 Procesos de diversificación del género *Astyanax* en Mesoamérica

En particular el género *Astyanax* resulta un sistema altamente complejo en cuanto a sus modelos de diversificación, y a su vez, da la oportunidad de abordar desde diferentes perspectivas la evolución morfológica. El género

Discusión general

Astyanax presenta generalmente una morfología conservada, sin embargo las modificaciones más conspicuas puede explicarse con base en sus adaptaciones ecológicas y en particular son las adaptaciones tróficas las que parecen sin lugar a dudas ser las más extremas dentro del este género, lo cual es similar a lo que ha sido propuesto como mecanismo de evolución dentro de los Characiformes [25]. Aunado a estas adaptaciones tróficas, podemos encontrar un gran número de estudios, enfocados al estudio de la evolución de los caracteres troglóbicos, para los cuales se ha utilizado al género *Astyanax* como modelo [26-29]. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado al estudio de otros sistemas de adaptación ambiental, y en particular a la diversificación intralacustres dentro del género *Astyanax*.

En esta tesis se registro por primera vez, la presencia de múltiples e independientes eventos de especialización trófica dentro del género *Astyanax*, los cuales resultaron en la convergencia de un fenotipo descrito originalmente como un género diferente, *Bramocharax*, y cuyas especies suelen estar asociadas con ambientes lacustres como el Lagos Nicaragua o Catemaco (México). Sin embargo, en nuestra filogenia molecular pudimos observar que el género *Bramocharax* no se recuperaba como monofilético, y que en todos los casos se agrupaba con las especies de *Astyanax* más cercanas geográficamente, haciendo al género *Astyanax* parafilético. Más aún, en algunas de las localidades analizadas donde se hallaban en simpatria especies de *Bramocharax* y *Astyanax* no presentaron casi divergencias genéticas, llegando incluso a compartir haplotipos entre los diferentes morfotipos.

Discusión general

El interés por los procesos de diferenciación que han dado lugar a los patrones de divergencia observados en nuestra filogenia y especialmente por aquellos procesos menos estudiados como son los de diferenciación en simpatria asociados a posibles divergencias adaptativas nos llevó al estudio del modelo *Bramocharax- Astyanax*.

Tomando la localidad del Lago Catemaco como sistema de estudio, el cual destaca dentro de la sierra de los Tuxtlas por su gran tamaño y su origen por derrames lávicos Plio-Pleistocénicos, cuenta con un área de 72 km² y una profundidad máxima de 7.6 metros, lo que lo hace el más extenso de la región, donde se encuentran en simpatria los dos morfotipos que corresponden con las especies descritas como *Astyanax aeneus* (Günther, 1860) y *Bramocharax caballeroi* Contreras-Balderas y Rivera-Teillery 1985. Debido a lo antes descrito, en este lago estudiamos la divergencia morfológica y su correspondencia con marcadores nucleares y mitocondriales.

En este sentido pudimos utilizar nuestro modelo al estudio de la morfología funcional, la cual resulta de gran importancia en la biología evolutiva, entre otras cosas, debido a que la generación de nuevas formas contempla la interacción de múltiples factores que pueden modelar la evolución de los grupos, abriendo una ventana al estudio de la relación entre la función y la forma que subyace a los rasgos fenotípicos [30].

De nuestros resultados se pudieron derivar algunas hipótesis, entre ellas se determinó que la forma más especializada corresponde con

Discusión general

Bramocharax caballeroi (figura 6.5), presentando características asociadas con ambientes pelágicos, como la forma fusiforme del cuerpo, con una menor altura del cuerpo, posición supra y proyectada del hocico, así como presentar diferencias significativas con *Astyanax* en el tamaño del cuerpo.

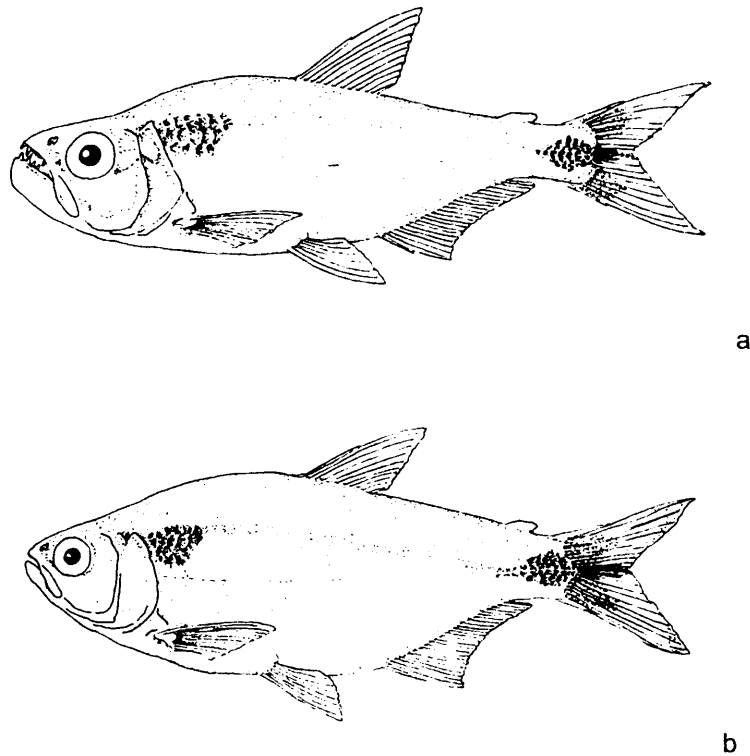


Figura 6.5. Dibujos de los dos morfotipos presentes en el Lago Catemaco. a) *Bramocharax*. b) *Astyanax*.

Todas estas diferencias corroboran una divergencia morfológica, la cual puede ser asociada, como en otros modelos con adaptaciones a diferentes ambientes dando soporte a un patrón de divergencia adaptativa el cual ha sido reportado previamente para otros modelos de fauna acuática intralacustre [31-39].

Discusión general

Por otro lado y de manera singular, se observó un desplazamiento entre las regresiones alométricas (trayectorias de crecimiento) entre los dos morfotipos (*Astyanax* Vs *Bramocharax*), y a la espera de llevar a cabo comparaciones con series ontogenéticas, podemos explicar las diferencias en las trayectorias de crecimiento obtenidas entre *Astyanax* y *Bramocharax* como con un proceso de hetercronía, mecanismo que ha sido postulado también para otros carácidos [25].

6.6 La estructura mitocondrial revela la evolución en paralelo del fenotipo *Bramocharax* en el Lago Catemaco

Como se había descrito en el estudio filogenético previo llevado a cabo, se observaron dos linajes mitocondriales independientes en el lago Catemaco. Los cuales se esperaba que correspondieran con los diferentes morfotipos presentes en el lago. Sin embargo, y contrario de lo esperado, los dos linajes se encontraban en proporciones similares en los dos morfotipos *Bramocharax* y *Astyanax*. Con base en lo anterior, hemos propuesto que el morfotipo más especializado (*Bramocharax*) ha divergido de forma independiente desde dos diferentes linajes de *Astyanax aeneus*, posiblemente como resultado de presiones de selección similares [40-43].

Sin embargo, se observó que mientras en la forma generalista casi no hubo modificaciones entre los dos linajes presentes, la forma especializada

Discusión general

(*Bramocharax*), presentó diferencias significativas en el tamaño entre los linajes (L1 Vs L2). Así el linaje 2 presentó el mayor tamaño, no sólo en comparación con *Astyanax*, sino también con el linaje 1 de la misma forma (figura 5.5).

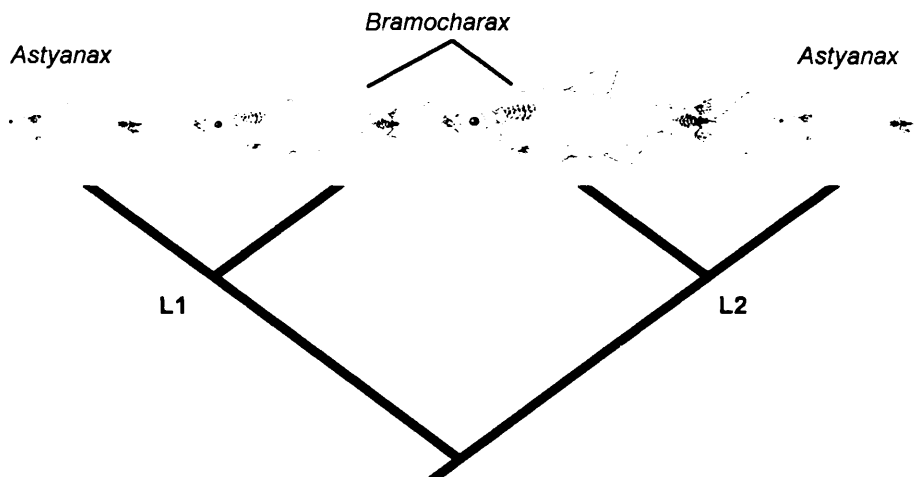


Figura 6.5. Hipotesis filogenética entre los morfotipos presentes en el Lago Catemaco.

El patrón morfológico común en los dos linajes mitocondriales que convergen en una forma limnética (*Bramocharax*) podría ser el resultado de una vía común del desarrollo, debido a la inercia filogenética dentro del grupos [25, 44-46]. Pero también puede ser el resultado de presiones asociadas a factores externos que se han dado de manera paralela [47]. Entre estos factores externos se encuentra la selección natural la cual puede estar fuertemente asociada a las condiciones locales presentes en el lago [37, 48].

Discusión general

Por tanto dentro del Lago Catemaco se pudo observar que nuestros datos morfológicos no presentaban señal filogenética ($P > 0.05$), lo cual establece que el sistema, o estructuras analizadas (forma del cuerpo) presentan un alto grado de homoplásia, no siendo posible estimar las relaciones filogenéticas mediante la forma del cuerpo [49]. En contraparte, el morfotipo *Astyanax* permaneció prácticamente sin cambios entre los dos linajes mitocondriales presentes en lago.

6.7 Especiación Ecológica Vs Radiación Adaptativa

La divergencia adaptativa puede ser el motor de la diversificación intralacustre, promoviendo la divergencia genética entre los ecotipos adaptados [31, 37]. Mientras que la plasticidad fenotípica intra poblacional permite el flujo génico entre los individuos que la componen, relajando los efectos de la selección y promoviendo que estas poblaciones respondan a las condiciones ambientales en pocas generaciones [50, 51].

En el Lago Catemaco, y en contraparte con lo que se esperaría en la especiación ecológica, no existen señales de aislamiento reproductivo entre los diferentes morfotipos [31, 37, 52, 53]. Así, los cuatro grupos estudiados (L1_*Astyanax*, L2_*Astyanax*, L1_*Bramocharax* y L2_*Bramocharax*) no mostraron señales de interrupción del flujo génico entre ellos para cualquiera de las comparaciones que se realizaron y presentaron valores muy bajos de diferenciación genética.

Discusión general

Así mismo en nuestros análisis de agrupamiento únicamente fue posible diferenciar entre poblaciones alopátricas (Maquinas Vs Lago Catemaco), pero bajo ningún escenario fueron recuperadas agrupaciones dentro del Lago Catemaco correspondientes a los fenotipos, linajes mitocondriales o su combinación. Además se observó una tasa de migración asimétrica en dirección del linaje 1 fenotipo *Astyanax* hacia el resto de grupos, dicho flujo podría incrementar la plasticidad en la poblaciones receptoras [50].

Sin embargo, a pesar de no tener señales de una interrupción del flujo genético, esto no implica que no haya un proceso de divergencia adaptativa, o incluso que no haya especiación ecológica. Esta especiación ecológica podría no haber sido detectada con los marcadores nucleares utilizados. Por otro lado la presencia de flujo genético entre poblaciones adaptadas a diferentes ambientes puede favorecer la plasticidad fenotípica, la cual puede maximizar la eficacia biológica, en contradicción con fenotipos altamente especializados a un sólo ambiente [54].

6.8 REFERENCIAS

1. Paulo-Maya J: **Análisis morfométrico del género Astyanax (Pisces: Characidae) en México.** México, D. F. : Instituto Politécnico Nacional; 1994.
2. Strecker U, Faundez VH, Wilkens H: **Phylogeography of surface and cave Astyanax (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2004, **33**(2):469-481.
3. Concheiro Perez GA, Rican O, Orti G, Bermingham E, Doadrio I, Zardoya R: **Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2007, **43**(1):91-110.
4. Perdices A, Bermingham E, A. M, Doadrio I: **Evolutionary history of the genus Rhamdia (Teleostei: Pimelodidae) in Central America.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2002, **25**:172-189.
5. Perdices A, Doadrio I, Bermingham E: **Evolutionary history of the synbranchid eels (Teleostei: Synbranchidae) in Central America and the Caribbean islands inferred from their molecular phylogeny.** *Mol Phylogenet Evol* 2005, **37**(2):460-473.
6. Reeves RG, Bermingham E: **Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish.** *Biological Journal of the Linnean Society* 2006, **88**(2):235-255.
7. Murphy WJ, Collier GE: **Phylogenetic relationships within the aplocheiloid fish genus Rivulus (Cyprinodontiformes, Rivulidae): Implications for Caribbean and Central American biogeography.** *Molecular Biology and Evolution* 1996, **13**(5):642-649.
8. Calcagnotto D, Schaefer SA, DeSalle R: **Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2005, **36**(1):135-153.
9. Gayet M, Marshall LG, Sempere T, Meunier FJ, Cappetta H, Rage JC: **Middle Maastrichtian vertebrates (fishes, amphibians, dinosaurs and other reptiles, mammals) from Pajcha Pata (Bolivia). Biostratigraphic, palaeoecologic and**

- palaeobiogeographic implications.** *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 2001, **169**(1-2):39-68.
10. Dowling TE, Martasian DP, Jeffery WR: **Evidence for Multiple Genetic Forms with Similar Eyeless Phenotypes in the Blind Cavefish, *Astyanax mexicanus*.** *Mol Biol Evol* 2002, **19**(4):446-455.
 11. Doadrio I, Perdices A: **Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (*Cobitis*, cobitidae) based on cytochrome b sequence data.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2005, **37**(2):484-493.
 12. Bartoli G, Sarnthein M, Weinelt M, Erlenkeuser H, Garbe-Schonberg D, Lea DW: **Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation.** *Earth and Planetary Science Letters* 2005, **237**(1-2):33-44.
 13. Coates A, Oblando JA: **The geologic evolution of the Central America Isthmus.** In: *Evolution and Environmental in Tropical America*. Edited by Jackson JBC, Budd AF, Coates AG. Chicago: Chicago University Press, Chicago; 1996: 21-56.
 14. Iturralde-Vinent MA, MacPhee RDE: **Paleogeography of the Caribbean region: Implications for cenozoic biogeography.** *Bulletin of the American Museum of Natural History* 1999(238):1-95.
 15. Myers GS: **Derivation of Freshwater Fish Fauna of Central America.** *Copeia* 1966(4):766-&.
 16. Rosen DE: **Vicariance Model of Caribbean Biogeography.** *Systematic Zoology* 1975, **24**(4):431-464.
 17. Bermingham E, Martin AP: **Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America.** *Molecular Ecology* 1998, **7**(4):499-517.
 18. Hrbek T, Seckinger J, Meyer A: **A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2007, **43**(3):986-998.
 19. Haq BU, Hardenbol J, Vail PR: **Chronology of fluctuating sea levels since the triassic.** *Science* 1987, **235**(4793):1156-1167.
 20. Ferrari L: **Avances en el conocimiento de la Faja Volcánica Transmexicana durante la última década.** *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 2000, **53**:84-92.

Discusión general

21. Ferrari L, Rosas-Elguera J: **Alkalic (ocean-island basalt type) and calc-alkalic volcanism in the Mexican volcanic belt: A case for plume-related magmatism and propagating rifting at an active margin?: Comment.** *Geology* 1999, **27**(11):1055-1056.
22. Ferrari L, Tagami T, Eguchi M, Orozco-Esquivel MT, Petrone CM, Jacobo-Albarran J, Lopez-Martinez M: **Geology, geochronology and tectonic setting of late Cenozoic volcanism along the southwestern Gulf of Mexico: The Eastern Alkaline Province revisited.** *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 2005, **146**(4):284-306.
23. Bussing WA: **Patterns of distribution of the Central American ichthyofauna.** In: *The Great American Biotic Interchange*. Edited by Stehli FG, Webb SD. New York: Plenum Press, New York; 1985: 453-473.
24. Birmingham E, Martin AP: **Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing sharded history to infer the evolutionary landscape of lower Central America.** *Molecular Ecology* 1998, **7**:499-518.
25. Sidlauskas B: **Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of characiform fishes: a phylomorphospace approach.** *Evolution* 2008, **62**(12):3135-3156.
26. Jeffery WR: **Cave fish as a model system in evolutionary developmental biology.** *Developmental Biology* 2001, **231**:1-12.
27. Jeffery WR: **Regressive Evolution in Astyanax Cavefish.** *Annu Rev Genet* 2009, **43**(1):25-47.
28. Protas M, Conrad M, Gross JB, Tabin C, Borowsky R: **Regressive Evolution in the Mexican Cave Tetra, Astyanax mexicanus.** *Curr Biol* 2007, **17**(5):452-454.
29. Protas ME, Hersey C, Kochanek D, Zhou Y, Wilkens H, Jeffery WR, Zon LI, Borowsky R, Tabin CJ: **Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism.** *Nat Genet* 2006, **38**(1):107-111.
30. Kingsolver JG, Huey RB: **Introduction: The Evolution of Morphology, Performance, and Fitness.** *Integr Comp Biol* 2003, **43**(3):361-366.
31. Barluenga M, Stolting K, Salzburger W, Muschick M, Meyer A: **Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish.** *Nature* 2006, **439**:719 - 723.

Discusión general

32. Klingenberg C, Barluenga M, Meyer A: **Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry.** *Evolution* 2002, **56**:1909 - 1920.
33. Cavalcanti M, Monteiro L, Lopes P: **Landmark-based morphometric analysis in selected species of serranid fishes (Perciformes: Teleostei).** *Zool Stud* 1999, **38**(3):287-294.
34. Hatfield T, Schluter D: **Ecological speciation in sticklebacks: environment-dependent hybrid fitness.** *Evolution* 1999, **53**(3):866-873.
35. Schluter D: **Adaptive radiation in sticklebacks: size, shape, and habitat use efficiency.** *Ecology* 1993, **74**(3):699-709.
36. Schluter D, McPhail JD: **Ecological Character Displacement and Speciation in Sticklebacks.** *The American Naturalist* 1992, **140**(1):85.
37. Schluter D: **Ecological Causes of Adaptive Radiation.** *The American Naturalist* 1996, **148**:S40-S64.
38. Elmer K, Lehtonen T, Kautt A, Harrod C, Meyer A: **Rapid sympatric ecological differentiation of crater lake cichlid fishes within historic times.** *BMC Biol* 2010, **8**(1):60.
39. Bernatchez L, Chouinard A, Lu GQ: **Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study.** *Biological Journal of the Linnean Society* 1999, **68**(1-2):173-194.
40. Adams D: **Parallel evolution of character displacement driven by competitive selection in terrestrial salamanders.** *BMC Evolutionary Biology* 2010, **10**(1):72.
41. Boughman JW, Rundle HD, Schluter D: **Parallel evolution of sexual isolation in sticklebacks.** *Evolution* 2005, **59**(2):361-373.
42. Elmer K, Kusche H, Lehtonen T, Meyer A: **Local variation and parallel evolution: morphological and genetic diversity across a species complex of Neotropical crater lake cichlid fishes.** *Phil Trans R Soc B* 2010, **365**:1769 - 1782.
43. Hendry AP, Kelly ML, Kinnison MT, Reznick DN: **Parallel evolution of the sexes? Effects of predation and habitat features on the size and shape of wild guppies.** *J Evol Biol* 2006, **19**(3):741-754.
44. Gould SJ, Lewontin RC: **The Spandrels of San Marco and the Panglossian Paradigm: A Critique of the Adaptationist Programme.** *Proceedings of the*

Discusión general

Royal Society of London Series B, Biological Sciences 1979, **205**(1161):581-598.

45. Valentin A, Sévigny J-M, Chanut J-P: **Geometric morphometrics reveals body shape differences between sympatric redfish *Sebastes mentella*, *Sebastes fasdatus* and their hybrids in the Gulf of St Lawrence.** *J Fish Biol* 2002, **60**(4):857-875.
46. Sidlauskas B: **Testing for unequal rates of morphological diversification in the absence of a detailed phylogeny: a case study from characiform fishes.** *Evolution* 2007, **61**(2):299-316.
47. Klingenberg CP: **Morphological Integration and Developmental Modularity.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 2008, **39**(1):115-132.
48. Krabbenhoft T, Collyer M, Quattro J: **Differing evolutionary patterns underlie convergence on elongate morphology in endemic fishes of Lake Waccamaw, North Carolina.** *Biol J Linn Soc* 2009, **98**(3):636-645.
49. Klingenberg CP, Gidaszewski NA: **Testing and Quantifying Phylogenetic Signals and Homoplasy in Morphometric Data.** *Syst Biol* 2010:syp106.
50. Crispo E: **Modifying effects of phenotypic plasticity on interactions among natural selection, adaptation and gene flow.** *J Evol Biol* 2008, **21**(6):1460-1469.
51. Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, Cruickshank T, Schlichting CD, Moczek AP: **Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation.** *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* 2010, **25**(8):459-467.
52. Nagel L, Schluter D: **Body size, natural selection, and speciation in sticklebacks.** *Evolution* 1998, **52**(1):209-218.
53. Schluter D: **Ecological speciation in postglacial fishes.** *Phil Trans R Soc B* 1996, **351**:807 - 814.
54. Richards CL, Bossdorf O, Muth NZ, Gurevitch J, Pigliucci M: **Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions.** *Ecol Lett* 2006, **9**(8):981-993.

7. CONCLUSIONES

Del trabajo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. El análisis filogenético del género *Astyanax* mostró la presencia de convergencias morfológicas durante diferentes episodios evolutivos, siendo las adaptaciones tróficas y troglobíticas las más conspicuas dentro de la variación morfológica del grupo.
2. El género *Astyanax* resultó parafilético para Mesoamérica, y mostró una falta de congruencia entre la variación morfológica y molecular a lo largo de su distribución. Por tanto hemos sugerido modificaciones considerables en su taxonomía del género.
3. No hubo evidencia molecular para discriminar entre especies originalmente descritas como un género distinto (*Bramocharax*), y las especies simpátricas del género *Astyanax*. Por lo anterior se pone de manifiesto la naturaleza homoplásica de los caracteres tróficos en nuestro sistema, ya que los caracteres diagnósticos del género *Bramocharax* se asociaron con especializaciones tróficas en hábitats lacustres de Mesoamérica.
4. Aunque el género *Astyanax* mostró una congruencia entre el análisis filogenético y su distribución geográfica en Mesoamérica, en la parte norte de su distribución (México), se observó un proceso de recambio de linajes, la cual puede ser consecuencia tanto de factores históricos, como de relaciones interespecíficas.

5. Se obtuvo una tasa de divergencia para el *Cytb* similar a la de otros modelos de peces de agua dulce, siendo para el caso de *Astyanax* la tasa media de 0.8%/Ma. Utilizando un reloj molecular de tasa relajada de mutación propusimos que el primer episodio de colonización de Mesoamérica desde América del Sur hace 7.8-8.1 Ma, ocurrió antes cierre final del Istmo de Panamá ~ 3.3 Ma, lo cual coincide con el modelo de Bermingham y Martin (1998).
6. Diferencias morfológicas significativas fueron encontradas en el sistema de carácidos del Lago de Catemaco, las cuales se localizaron principalmente en la forma de la cabeza y la altura del cuerpo. Estas diferencias morfológicas se asociaron a ecotipos diferentes, siendo el morfotipo *Bramocharax* la forma especializada y *Astyanax* la más generalista. Estas modificaciones en la forma pueden ser asociadas con adaptaciones a diferentes ambientes presentes en el Lago Catemaco.
7. No se encontró una correspondencia entre la diferenciación morfológica y mitocondrial en el sistema de carácidos del Lago Catemaco, lo que sugiere altos niveles de homoplasia en los que la forma del cuerpo no se corresponde con la filogenia del grupo.
8. La presencia de flujo genético entre morfotipos divergentes apoya que la plasticidad fenotípica puede ser el proceso evolutivo del sistema de carácidos dentro del Lago Catemaco, permitiendo que los individuos puedan adaptarse más rápidamente a condiciones ambientales variables.

7. CONCLUSIONS

From our studies performed in this Ph.D. thesis, the following conclusions can be drawn:

1. Phylogenetic analysis of the genus *Astyanax* showed the presence of parallel morphological convergence during different evolutionary episodes, where the trophic and troglotic adaptations corresponded to the most conspicuous morphological variation within the group.
2. The genus *Astyanax* was paraphyletic in Mesoamerica, and showed a lack of congruence between morphological and molecular variation across its distribution. Therefore we suggest considerable changes to the taxonomy of the group
3. There was no molecular evidence to discriminate between species, originally described as a different genus (*Bramocharax*), and sympatric species of the genus *Astyanax*. Therefore gives additional evidence of the homoplastic nature of trophic characters in our system, because the diagnostic characters of the genus *Bramocharax* are associated with trophic specializations in lacustrine habitats of Mesoamerica.
4. Although the genus *Astyanax* showed congruence between phylogenetic analysis and geographical distribution in Mesoamerica, in the northern part of its distribution (Mexico) showed a lineage turn-over process, which may result from both historical factors as interspecific relationships.

5. The estimated *Cytb* divergence rate was similar to others previously obtained for freshwater fish fauna, being in average 0.8% /Mya. Using a relaxed molecular clock we proposed that the first episode of colonization of Mesoamerica from South America occurred 7.8-8.1 Ma ago, before the final closure of the Isthmus of Panama ~ 3.3 Ma, and coinciding with Bermingham and Martin model (1998).
6. Significant morphological differences were found in the characids system in Lake Catemaco, mainly located in the shape of the head and body height. These morphological differences were associated with different ecotypes, where the morphotype *Bramocharax* corresponded to the specialized form and the *Astyanax* to the generalist. These morphological modifications may be associated with adaptation to different environments present in Lake Catemaco.
7. We found no correlation between morphological and mitochondrial differentiation in the characids system of Lake Catemaco, suggesting high levels of homoplasy in which the body shape does not correspond to the phylogeny of the group.
8. The presence of gene flow between divergent morphotypes supports that the phenotypic plasticity may be the ongoing evolutionary process of the characins system within Lake Catemaco, allowing individuals to adapt more quickly to changing environmental conditions.