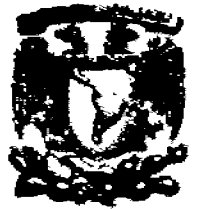




Universidad Nacional Autónoma de México
Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología



**DIVERSIFICACION DE *Procambarus (Villalobosus)*
HOBBS, 1972 (CRUSTACEA: DECAPODA:
CAMBARIDAE)**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Doctor en Ciencias del Mar y Limnología
(Limnología)

p r e s e n t a

M. en C. Marilú López Mejía

Director de Tesis: Dr. Fernando Álvarez Noguera

Comité Tutorial: Dra. Virginia León Règagnon
Dr. Ramiro Román Contreras
Dr. Javier Alcocer Durand
Dr. Daniel Piñero Dalmau

México, D. F.

Febrero, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

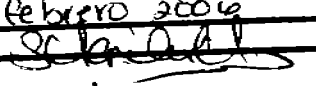
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Maribó López Mejía

DEDICATORIA

FECHA: 15 febrero 2006
FIRMA: 

A mi mami querida, Elsa Emma Mejía
Guadarrama, mujer de enorme fortaleza,
incondicional entrega y profundo amor. Por tu
sacrificio y ejemplo soy lo que soy. Te amo.

A mi amado esposo Luis Manuel, porque en nadie
he visto la pureza de tu mirada, porque eres mi
maestro de la vida, mi mejor amigo, el mejor
compañero y porque este logro en mi vida
simplemente no habría sucedido sin ti. Te amo.

A mi bebito lindo, por ser el bebé más paciente y
bien portado del mundo, por la maravillosa
espera y por el motor y motivación que significas
en mi vida.

A mis hermanos Elsa Emma, José Gabriel y
Guillermo, por los buenos momentos que son los
que cuentan.

“Cuando las puertas de la percepción se abran...
las cosas se verán como realmente son...
infinitas”

William Blake

“Cada flor es el resultado de la sonrisa de un hombre,
cada mosquito es la encarnación de sus pensamientos
mordaces”

Paramahansa Yogananda

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Álvarez Noguera, por la acertada dirección de esta tesis doctoral, por su confianza en mi capacidad, por todo lo aprendido a lo largo de mi formación, por su amistad, apoyo y calidez humana.

A los doctores Virginia León Règagnon, Ramiro Román Contreras, Javier Alcocer Durand y Daniel Piñero Dalmau por su acertada asesoría y amistad, enriqueciendo mi formación doctoral y por su invaluable apoyo hacia el final de este camino.

A la Dra. Virginia León Règagnon, por su excelente dirección al enseñarme las técnicas de biología molecular aplicadas en este proyecto y por su calidez humana.

A los doctores Gerardo Pérez Ponce de León y Michel Hendrickx Reners por los valiosos comentarios y sugerencias que sin duda enriquecieron esta tesis doctoral y su invaluable apoyo hacia el final de esta jornada.

Al Dr. Keith A. Crandall, de la Universidad de Brigham Young, Provo, Utah, por recibirme y permitirme ser parte de su equipo de investigación durante los 4 meses de mi estancia académica; por brindarme su laboratorio e incondicional asesoría y apoyo. A Jack Sifes, Jen Buhay (the teacher), Savel Daniels, Rebeca Sholl, Megan, Marcos, Pedro, Edgar, Jen, Monty, Cynthia... y todas las personas en BYU que indudablemente hicieron más placentera y fructífera mi estancia en Provo, Utah.

Al Dr. José Luis Villalobos Hiriar por sus atinados consejos, su sencillez y amistad y por compartir sus amplios conocimientos sobre carcinología. Pepe ya eras un doctor antes de serlo, mis respetos por eso.

Al Dr. Luis Manuel Mejía Ortíz, por su invaluable ayuda durante el trabajo de campo en la hermosa serranía mexicana, por sus consejos, impulso e incondicional apoyo.

A Berenit Mendoza Garfias, a cargo del microscopio electrónico del Instituto de Biología de la UNAM, por su colaboración en la toma de micrografías y las agradables charlas compartidas durante las sesiones.

A Laura Márquez, del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, por su colaboración en la secuenciación de muestras.

A Sara Good y César, del Instituto de Ecología de la UNAM, por su amable orientación y apoyo al inicio de este proyecto doctoral.

A David Posada, de la Universidad de Vigo, España, por su amable asistencia para el óptimo aprovechamiento de diversos programas de genética de poblaciones.

A Jesús A. Fernández por su valiosa e incondicional ayuda, pero sobre todo por su sincera amistad y los agradables momentos compartidos a lo largo de nuestro sendero académico.

Al Dr. Martín Merino Ibarra y al equipo de la Coordinación del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Norma, Lupita, Chantal, Diana, Gaby, por su invaluable apoyo, particularmente para la culminación de esta jornada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; número de registro 165911) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM, por las becas otorgadas durante todo mi doctorado.

A las fundaciones Telmex y Hombre Naturaleza por la beca otorgada durante la segunda mitad de mis estudios de posgrado y por permitirme compartir con ellos, además de agradables momentos, nuestro anhelo común por un México y un mundo mejor.

A los alumnos de la licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, que en diferentes momentos me brindaron su apoyo durante el trabajo de campo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, por el instrumental y espacio de laboratorio de los que pude disponer durante el trabajo de campo y análisis de algunas muestras.

Al Biól. Rolando Mendoza por la elaboración de los dibujos incluidos en las publicaciones y por las muy agradables charlas compartidas.

A los chavos de la Colección Nacional de Crustáceos del Instituto de Biología, Carmen, Lulú, Lupita, Paola, Olga, Toño, Alejandro... por los buenos momentos, las comidas compartidas y las palabras de aliento a lo largo del camino.

A todas aquellas personas que conocí durante mis viajes a campo y que me brindaron su hospitalidad, el acceso a sus terrenos y algunas pistas para encontrar más sitios donde habitan acociles.

Al personal de la Biblioteca del Instituto de Biología por su apoyo en particulares circunstancias.

A todas las personas, amigos, cuates, conocidos de pasillo, que de alguna manera contribuyeron al mejoramiento de mi formación y de esta tesis y a una placentera estancia en el Instituto de Biología, en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y la UNAM en general.

Al señor de la máquina de café que en algunas ocasiones me invitó el cafesito por ser paciente mientras esperaba a que reabasteciera la máquina...

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Planteamiento del problema	5
Hipótesis	6
Objetivos particulares	6
Area de estudio	7
- Hidrología	7
- Geología	10
- Vegetación y clima	11
Capítulo 1. Revisión taxonómica y descripción de especies	
Ubicación taxonómica	13
Diagnosís del género <i>Procambarus</i> subgénero <i>Villalobosus</i>	15
- Grupo Erichsoni	18
- Grupo Riojai	19
- Grupo Tlapacoyanensis	22
- Especies utilizadas como grupos externos	26
Descripción de especies	28
Capítulo 2. Análisis filogenético	
La biología molecular y su uso en filogenia	72
Filogenia molecular en crustáceos decápodos	76
Hipótesis	78
Método	78
Resultados	86
Discusión	97
Capítulo 3. Estructura jerárquica y diferenciación genética	115
Hipótesis	117
Método	117
Resultados	120
Discusión	124
Capítulo 4. Descripción de Historias de Vida	159
Hipótesis	160
Método	161
Resultados	162
Discusión	178

Capítulo 5. Biogeografía	185
Migración o dispersión del género <i>Procambarus</i>	187
Migración de las especies del subgénero <i>Villalobosus</i>	187
Hipótesis	190
Método	190
Resultados	191
Discusión	195
Capítulo 6. Discusión General	198
Conclusiones	207
Literatura citada	210

RESUMEN

El patrón de distribución de los subgéneros que conforman el género *Procambarus*, propuesto hace 20 años como la Ruta de *Procambarus*, sugiere que los acociles de Norteamérica emigraron desde el centro de origen del género hacia el sur hasta llegar a Cuba e Isla de Pinos, siendo la formación de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal las principales causas de diversificación y generación de nuevas especies y subgéneros. El subgénero *Villalobosus* es considerado como vestigio de un linaje inicial que se movió hacia el sur a lo largo de la costa del Golfo de México. La extraordinaria diversidad de formas de este subgénero en un área de distribución relativamente restringida despertó el interés de estudiar a fondo su distribución y relaciones filogenéticas, poniendo a prueba la hipótesis previa de dispersión, con el fin de elucidar su posible patrón de diversificación. Para el efecto, bajo un esquema de cinco capítulos, se efectuó una detallada revisión taxonómica y descripción de especies, un análisis filogenético de las especies del grupo con base en caracteres morfológicos y moleculares, un análisis de la estructura genética de las poblaciones, la determinación de tipos de hábitats y descripción de historias de vida y su vinculación con diversas variables ambientales y un análisis biogeográfico. La evidencia arrojada por los diversos análisis permitió construir una nueva hipótesis acerca de la diversificación del subgénero *Villalobosus*, con base en las siguientes conclusiones: a) El subgénero *Villalobosus* no es un grupo monofilético; b) La evidencia apoya un esquema que divide al subgénero en dos grupos, uno sobre la parte alta de la Sierra Madre Oriental y otro en la parte media baja de la vertiente, pero con un arreglo de especies diferente al propuesto por Villalobos y Hobbs; c) Los principales eventos geológicos que influyeron en la distribución y diversificación del subgénero *Villalobosus* fueron el levantamiento y conformación final de la porción sur de la Sierra Madre Oriental y la conformación del Eje Neovolcánico Transversal; d) Las subcuencas del río Pánuco representan el límite distribucional noroeste del subgénero *Villalobosus*, donde la disyunción del linaje ancestral pudo tomar lugar; el Eje Neovolcánico Transversal representa el límite distribucional sur-sureste del subgénero, propiciando una radiación adaptativa en dirección sureste-noroeste; e) La evidencia obtenida con este estudio apoya la hipótesis de especiación alopátrica del subgénero *Villalobosus* en esa región de la Sierra Madre Oriental.

Palabras clave: acociles, *Procambarus* (*Villalobosus*), gen 16S ADNm, morfología, filogenia, historias de vida, biogeografía.

INTRODUCCIÓN

La estimación de filogenias se considera una herramienta valiosa para determinar las relaciones taxonómicas y las clasificaciones (de Queiroz y Gauthier, 1990), para probar hipótesis de parentesco y explorar tendencias evolutivas (Harvey y Pagel, 1991), como un respaldo básico en la descripción de nuevos taxa y como indicador de hábitats importantes para la planeación de políticas de conservación (Crandall, 1998). La agudeza de las hipótesis filogenéticas es, por lo tanto, de gran importancia dada la difusión del enfoque filogenético en estudios sobre diversos aspectos de la biología evolutiva (Crandall y Fitzpatrick, 1996; Huelsenbeck y Crandall, 1997). Tradicionalmente el estudio de las relaciones filogenéticas se ha basado en el análisis de caracteres morfológicos. La facilidad para reconocer las especies y sus relaciones depende de marcadas diferencias rápidamente observables. Sin embargo, muchas especies son crípticas y son descubiertas a través del estudio de sistemas de caracteres cuyos estados no son sencillamente observados, éstos comprenden atributos fisiológicos, etológicos, ecológicos, citológicos, genéticos y bioquímicos. Los dos últimos son de gran valor para la sistemática de cualquier taxón y pueden ser analizados mediante diversos métodos (cladistas y fenetistas); no obstante, en diversos grupos o niveles jerárquicos, los caracteres morfológicos continúan siendo valiosos y superiores a otro tipo de caracteres. Ciertamente, debe reconocerse la importancia de los caracteres tanto moleculares como morfológicos para cada grupo y nivel taxonómico que permitan comparaciones más precisas de los patrones temporales y espaciales de las relaciones entre los organismos. El contraste y congruencia de cada conjunto de evidencia analizado brindará mayor resolución a los resultados acercándonos con más precisión a la filogenia (Cadle, 1988; Nieto y Llorente, 1994).

Templeton *et al.* (1992) sugirieron que una combinación de métodos tradicionales resulta útil para estudios sobre aspectos evolutivos. Estos autores desarrollaron un nuevo método para reconstruir las relaciones evolutivas con base en un modelo genético de población de evolución molecular, el cual, aplicado conjuntamente con otros métodos (por ejemplo parsimonia máxima), brindan mayor agudeza al inferir las relaciones evolutivas a partir de pocos caracteres (Crandall, 1994) y pueden ser una herramienta poderosa. El uso de secuencias de proteínas y de ácidos nucleicos en taxonomía como caracteres 'no morfológicos', ha tenido un nuevo impulso como medio para reconocer afinidades entre taxa (Wiley, 1981). Por ejemplo, asumiendo un reemplazamiento regular, las diferencias en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos entre dos especies puede servir como un reloj molecular, indicando el tiempo de divergencia desde un ancestro común (Hedrick, 2000). La diferenciación genética entre las especies, y por lo tanto sus probables relaciones filogenéticas, puede inferirse a partir del grado de diferenciación en la estructura primaria de sus proteínas (Dobzhansky *et al.*, 1977). Cadle (1988) señaló que los datos moleculares permiten proponer hipótesis de relaciones filogenéticas, que pueden desarrollarse independientemente de aquellas derivadas de la morfología, por lo que es factible una complementación de ambos en la filogenia y clasificación de los seres vivos.

Los acociles son organismos que han servido de modelo en infinidad de estudios zoológicos y, particularmente, juegan un papel central en investigaciones del ámbito de la fisiología neural, entre otros (Crandall y Cronin, 1997; Crandall y Hillis, 1997; Edwards *et al.*, 1999). En la actualidad, los acociles son de creciente importancia en estudios de evolución

molecular y ecología, no obstante, sus relaciones filogenéticas aún son cuestionadas (Crandall *et al.*, 2000). El subgénero *Villalobosus* es un grupo endémico de camarinos que habitan en la región sur de la Huasteca, en los límites de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz. La zona que habitan los organismos de este subgénero estuvo largo tiempo cubierta por el mar hasta su emersión en el Eoceno durante la orogénesis hidalguense, ocasionando principalmente el plegamiento y levantamiento de la Sierra Madre Oriental. Es muy posible que a esto se deba la distinción del subgénero *Villalobosus* del resto de los 16 subgéneros del género *Procambarus*, ya que las 10 especies conocidas que lo conforman son endémicas en nuestro país y habitan en un área aparentemente restringida de distribución, en la región montañosa de la Sierra Madre Oriental, justo al norte del Eje Neovolcánico Transversal (Villalobos, 1955; Hobbs, 1984), compartiendo territorio con algunos miembros de los subgéneros *Ortmannicus* y *Paracambarus*, remarcando su endemismo en la zona.

Un estudio previo (López-Mejía, 2001) proporcionó nuevos registros para tres especies conocidas y seis poblaciones de especies no descritas. Se presume que las condiciones ecológicas y geológicas a las que están vinculados estos organismos han propiciado la diferenciación genética y el incremento de la especiación considerando al grupo en una zona restringida, pero sobre todo en una zona de dispersión cuyo proceso de especiación potencialmente continúa. En ese mismo estudio se sugiere que estas especies pueden agruparse con base en la morfología del gonópodo de los machos de la forma I, en tres grupos distintos: 1) el grupo *Erichsoni*, considerando especies cuyo proceso caudal es en forma de placa ancha curvada o acampanada, localizado en tributarios de las cuencas de los ríos Tuxpan, principalmente, Pánuco y Cazonas, en la parte

norte de la zona; 2) el grupo Riojai, que incluye especies cuyo proceso mesial no rebasa en más de dos tercios los demás procesos y el proceso caudal es espiniforme o en forma de placa espatulada, localizado en la parte central de la zona, en tributarios de las cuencas de los ríos Cazonés y Tecolutla; y 3) el grupo Tlapacoyanensis, cuyas especies poseen un proceso mesial que sobrepasa en más de dos tercios al resto de los procesos y el proceso cefálico es espiniforme, localizado en la parte sur de la zona, en tributarios de las cuencas de los ríos Tecolutla y Nautla. La agrupación sugerida muestra la coincidencia que existe entre las especies relacionadas morfológicamente y su distribución geográfica, dado que los grupos ocupan áreas geográficas que se sobreponen poco o nada, definiendo un claro patrón de distribución.

Dadas las particularidades del subgénero *Villalobosus*, en este estudio se efectuará un análisis tanto de las relaciones filogenéticas entre las especies que lo integran, como aspectos de la estructura genética de las poblaciones, evolución de historias de vida y patrones biogeográficos, con objeto de inferir su diversificación.

PLANTEAMIENTOS

¿Cómo ocurrió la diversificación de las especies del subgénero *Villalobosus* en México?

¿Qué aspectos apoyan la diversificación de las especies del subgénero *Villalobosus* de noroeste a sureste sobre el talud de la Sierra Madre Oriental?

HIPOTESIS

1. La diversificación del subgénero *Villalobosus* se llevó a cabo del noroeste al sureste de México, invadiendo progresivamente el talud de la Sierra Madre Oriental desde Molango, Hidalgo, hasta Teziutlán, Puebla.
2. La filogenia, la estructura jerárquica de las poblaciones, la evolución de historias de vida y los patrones biogeográficos de las especies del subgénero *Villalobosus* apoyan su diversificación de noroeste a sureste, con la progresiva invasión del talud de la Sierra Madre Oriental.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si el subgénero *Villalobosus* es un grupo monofilético.
- Determinar si el arreglo filogenético basado en la morfología coincide con el basado en los caracteres moleculares, o bien, si combinados tienen mayor resolución.
- Establecer si el esquema que divide al subgénero en tres grupos es apoyado por la evidencia molecular.
- Determinar si las poblaciones consideradas como especies nuevas tienen el mismo grado de diferenciación entre ellas que con el resto de especies en el subgénero.
- Establecer si existe correlación entre el grado de diversificación genética y la distancia geográfica de las especies, de manera que esto refleje un proceso de invasión o dispersión dado.
- Inferir qué procesos pueden ser responsables para determinar la estructura genética de las poblaciones.

- Inferir qué característica de la historia de vida está fungiendo como mecanismo de especialización de las especies del subgénero.
- Establecer si existe un patrón biogeográfico apoyado por la filogenia que sugiera una invasión progresiva del subgénero *Villalobosus* desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de México y procesos de especiación sucesivos durante la dispersión del grupo hacia el sur.

Para este propósito, se adoptó una estructura de cinco capítulos subsecuentes que abordaron los diferentes aspectos que permiten inferir la diversificación del grupo. El primer capítulo abarca la revisión taxonómica y descripción de especies; el segundo capítulo comprende el análisis filogenético con base en caracteres morfológicos y moleculares; el tercer capítulo analiza la estructura jerárquica y diferenciación genética de las poblaciones; el cuarto capítulo aborda la evolución de historias de vida y el quinto capítulo comprende la búsqueda de patrones biogeográficos.

AREA DE ESTUDIO

El área de estudio abarca la región sur de la Huasteca, involucrando la colindancia entre los estados de Puebla, Hidalgo y Veracruz, entre los 19° y 21° N y los 97° y 98° W. Comprende la región sur-sureste de la Sierra Madre Oriental, donde ésta se une con el Eje Volcánico Transversal (Fig. 1).

a) Hidrología

El territorio está drenado por una densa red fluvial que vierte al Golfo de México, pudiendo dividirla en cuatro zonas, de acuerdo con la cuenca hidrológica presente:

Zona de la cuenca del río Pánuco

Incluye las localidades desde Tlanchinol hasta Xochicoatlán, Hidalgo, con un gradiente altitudinal del orden de los 1,375 m a los 1,495 msnm, destacando los cerros Teacal, Pinalco, Tecruz, Cuiffanolo, Sosuhuaco y Calvario. Los principales ríos tributarios de esta zona son el Atlapexco, el Calabozo, Contzintla, Calnali y el Arroyo Claro, así como la presa de Atezca.

Zona de la cuenca del río Tuxpan

Incluye las localidades desde Huayacocotla, Veracruz, hasta San Bartolo Tutotepec, Hidalgo, con un gradiente altitudinal del orden de los 1,000 m a los 2,000 msnm, destacando los cerros Alto, El Chato, Viejo Meta y La Bandera. Los principales ríos tributarios de esta zona son El Viñasco, Zacualpan, El Chiflón, Los Camarones y Pantepec.

Zona de la cuenca del río Cazonas

Comprende desde Pahuatlán hasta Xicotepec, en el estado de Puebla, en altitudes que van de 1,200 m a 2,110 msnm, involucrando los cerros Verde y La Cumbre. El principal río tributario en esta zona es el San Marcos, destacando además las presas Santa Ana Tzacuala, Omiltepec y Tejocotal.

Zona de la cuenca del río Tecolutla

Desde Nuevo Necaxa hasta Cuetzalan del Progreso, Puebla, con altitudes de los 500 m hasta los 1,300 msnm, sobresaliendo el cerro de Zihuateutla, el

San Marcos y el Cozoltotec. Los principales ríos tributarios son el Necaxa, el Lajajalpan, el Apulco y el San Pedro.

Zona de la cuenca del río Nautla

Comprende las localidades desde Mazatepec hasta Teziutlán, al sureste de Puebla y desde Tlapacoyan hasta Martínez de la Torre, al noreste de Veracruz. La altitud oscila entre los 2,550 m y 100 msnm, destacando los cerros Chignautla, La Ventanilla, Boludo, La Minilla y la Culebra, así como la loma La Bandera. Los ríos María de la Torre, San Pedro, Arroyo Negro, Filobobos y Alceseca se cuentan entre los principales tributarios de la zona.

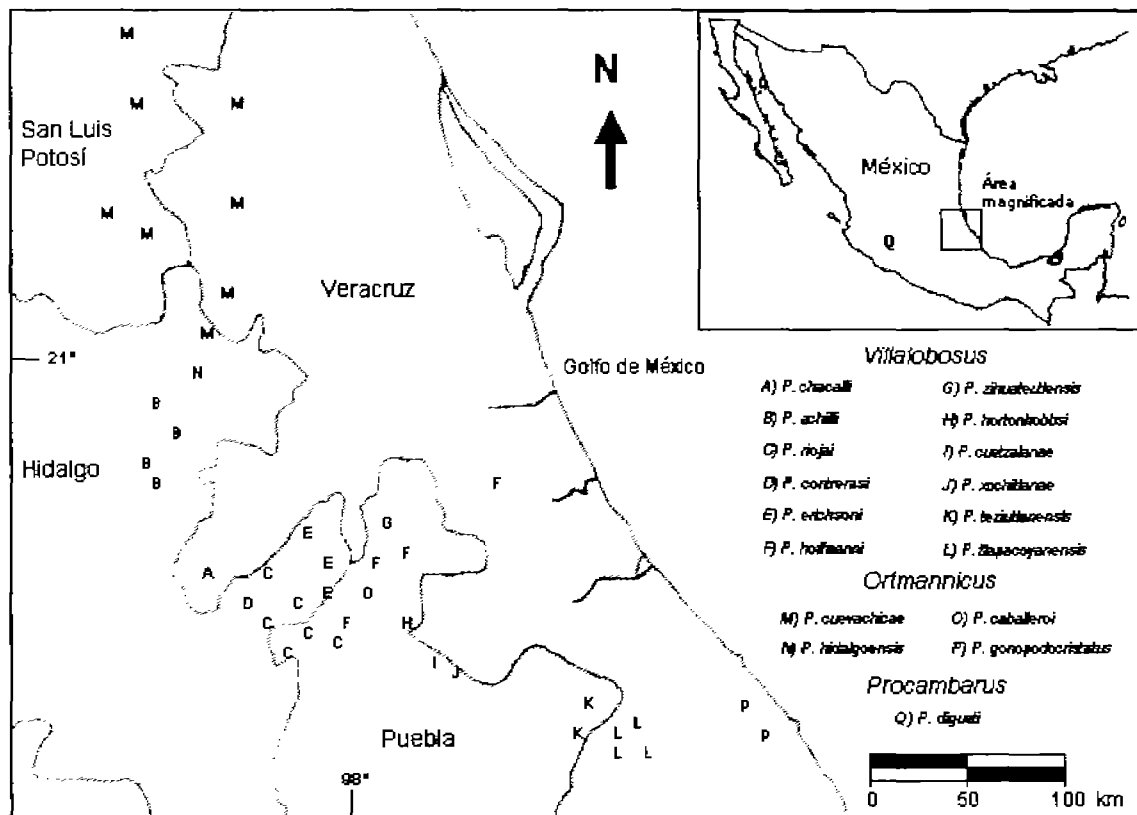


Fig. 1. Localización geográfica de las especies de los subgéneros *Villalobosus* (grupo en estudio), *Ortmannicus* y *Procambarus* (grupos externos).

b) Geología

De la revisión de la historia geológica se deriva que la formación de la zona de estudio, hasta su estructura actual, data de 280 millones de años aproximadamente, conformándose paulatinamente a lo largo de diferentes períodos de tres eras geológicas.

Zona de la cuenca del río Pánuco

Data del paleozoico, mesozoico y cenozoico: Atezca, Xochicoatlán y Chalma en Hidalgo del terciario superior; Calnali, Hgo. del pérmico y cretácico inferior; Atlapexco, Hgo. del cretácico inferior, jurásico superior y terciario superior y Tlanchinol, Hgo. del terciario superior (Anónimo, 1984a).

Zona de las cuencias de los ríos Tuxpan, Cazones y Tecolutla

Data del mesozoico y cenozoico: Nexapa, Pue. y Necaxa, Pue. del cretácico inferior; Tenango de las Flores y Huauchinango en Puebla y Santa Ana Tzacuala, Acaxochitlán y Tenango de Doria en Hidalgo, del terciario superior; Santa Ana Hueytlalpan, Hgo. del cuaternario; San Bartolo Tutotepec, Hgo. en el jurásico inferior; Metepec, Agua Blanca y Chichicaxtle en Hidalgo, del terciario superior; Los Cubes, Hgo. del terciario superior y Dejigui, Ver. del triásico (Anónimo, 1984a).

Zona de la cuenca del río Nautla

Data del mesozoico y cenozoico: Tlapacoyan, Ver. del terciario superior, cretácico inferior y jurásico superior; Teziutlán, Pue. del cuaternario; Xochitlán, Pue. del cretácico inferior, jurásico superior y jurásico medio;

Zacatlán, Pue. del terciario superior y cretácico inferior; Hueytamalco, Pue. del cretácico inferior y jurásico superior y Cuetzalan, Pue. del cretácico inferior (Anónimo, 1984a).

c) Vegetación y clima

Zona de la cuenca del río Pánuco

La vegetación está distribuida de la siguiente forma: Atezca, Hgo., pastizal cultivado rodeado de bosque mesófilo; Xochicoatlán, Hgo., agricultura de temporal; Chalma y Calnali en Hidalgo, agricultura de temporal y pastizal inducido; Atlapexco, Hgo., agricultura de temporal y pastizal cultivado y Tlanchinol, Hgo., pastizal cultivado rodeado de bosque mesófilo (Fig. 5) (Anónimo, 1984b; López-Mejía, 2001). En la zona el clima varía de templado húmedo (C(fm)b(e)g) y templado subhúmedo (C(w2)(w)b(i')g) a cálido húmedo ((A)C(fm)w''b(i')g) y semicálido húmedo ((A)C(fm)a(e)) (Anónimo, 1970).

Zona de las cuencas de los ríos Tuxpan, Cazones y Tecolutla

La vegetación está distribuida de la siguiente forma: Nexapa, Pue., pastizal inducido y agricultura de temporal y Necaxa, Pue., bosque de pino y pino-encino, agricultura de temporal y pastizal inducido; Tenango de las Flores, Pue., pastizal inducido y bosque de pino; Huauchinango Pue., pastizal cultivado rodeado de bosque de pino-encino y bosque mesófilo; Santa Ana Tzacuala, Hgo., agricultura de temporal rodeado de bosque de pino-encino y pino; Acaxochitlán, Hgo., agricultura de temporal y bosque de pino-encino; Tenango de Doria, Hgo., agricultura de temporal rodeado de bosque mesófilo; Santa Ana Hueytlalpan, Hgo., agricultura de temporal;

San Bartolo Tutotepec, Hgo., agricultura de temporal rodeado de bosque mesófilo y pastizal inducido; Metepec, Agua Blanca, Chichicaxtle y Los Cubes, en Hidalgo, agricultura de temporal y Dejiogui, Ver., bosque de pino-encino (Fig. 5) (Anónimo, 1984b; López-Mejía, 2001). Predomina un clima templado subhúmedo (C(w₂)(w)b(l')g), con algunas zonas de templado húmedo (C(fm)b(e)g) y semicálido húmedo ((A)C(fm)(w)) (Anónimo, 1970).

Zona de la cuenca del río Nautla

La vegetación está distribuida de la siguiente forma: Tlapacoyan, Ver., agricultura de temporal, rodeado de pastizal cultivado; Teziutlán, Pue., agricultura de temporal y bosque de pino-encino; Xochitlán, Pue., agricultura de temporal; Zacatlán, Pue., agricultura de temporal y partes de bosque de pino; Hueytamalco, Pue., pastizal cultivado e inducido y agricultura de temporal y Cuetzalan, Pue., agricultura de temporal y pastizal cultivado (Fig. 5) (Anónimo, 1984b; López-Mejía, 2001). Predomina un clima semicálido húmedo ((A) C(fm)(w'')a(c)g; (A)C(fm)a(e)) y en algunas zonas templado húmedo (C(m)w''b(l)g) y templado subhúmedo (C(w₂'')(w)b(l')) (Anónimo, 1970).

CAPÍTULO 1. REVISIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN DE ESPECIES

Ubicación taxonómica

La clasificación aceptada de los acociles se ubica en el infraorden Astacoidea, incluyendo tres superfamilias: Astacoidea, Nephropoidea y Parastacoidea. Los Astacoidea son divididos a su vez en dos familias: Cambaridae y Astacidae. Los miembros de la familia Cambaridae se distribuyen desde Norteamérica hacia el sur, pasando por México (Hobbs, 1984 y 1988); este grupo alberga a la subfamilia Cambarinae (Lám. I) conformada por los géneros *Barbicambarus*, *Cambarus*, *Fallicambarus*, *Faxonella*, *Hobbseus*, *Orconectes*, *Troglocambarus* y *Procambarus*; a este último pertenece el subgénero *Villalobosus* (Hobbs, 1974).

En virtud de la gran diversidad de especies asignadas al género *Procambarus*, divididas en secciones y grupos de acuerdo con las similitudes morfológicas existentes entre ellas, el subgénero *Villalobosus*, inicialmente referido por Villalobos (1955) como sección *Riojae*, fue elevado por Hobbs (1972) a un rango subgenérico, junto con las secciones *Blandingii*, *Tenuis*, *Digueti*, *Advena*, *Acherontis*, *Hinei*, *Barbatus*, *Gracilis* y *Mexicanus* (Tabla 1.1), ubicándolo taxonómicamente de la siguiente forma:

Phylum: Arthropoda
Clase: Crustacea
Orden: Decapoda
Superfamilia: Astacoidea
Familia: Cambaridae
Subfamilia: Cambarinae
Género: *Procambarus*
Subgénero: *Villalobosus*

Los rasgos morfológicos distintivos del subgénero *Villalobosus* consisten en ganchos en los isquiopoditos del cuarto par de pereiópodos; el primer par de pleópodos alcanza la coxa del segundo par de pereiópodos, terminando en cinco procesos (Fig. 1.1). La diagnosis correspondiente se presenta a continuación.

Tabla 1.1. Categorías infragenéricas del género *Procambarus* (Modificado de Hobbs, 1972).

Previamente reconocidas (Modificado de Hobbs, 1962)		Propuesta	
Secciones	Grupos	Subgéneros	Grupos
Blandingii (Ortmann, 1905:98)	Spiculifer (Ortmann, 1905a:100) Clarkii (Ortmann, 1905a:100) Blandingii (Ortmann, 1905a:100) Pictus (Hobbs, 1942b:129) Seminolae (Hobbs, 1942b:142) Lucifugus (Hobbs, 1942b:134) Planirostris (Penn, 1953b:75) miembros disyuntivos	<i>Pennides</i> (18)* <i>Scaputicambarus</i> (6) <i>Ortmannicus</i> (52) (Fowler, 1912:341)	Blandingii Pictus Seminolae Lucifugus Planirostris miembros disyuntivos
Tenuis (Hobbs, 1962:278)		<i>Tenuicambarus</i> (1)	
Riojae (Villalobos, 1955:94)	Riojae (Villalobos, 1955:96) Erichsoni (Villalobos, 1955:130)	<i>Villalobosus</i> (10)	Riojai Erichsoni
Digueti (Ortmann, 1905a:98)		<i>Procambarus</i> (1) (Ortmann, 1905c:437) <i>Mexicambarus</i> (1)	
Advena (Hobbs, 1942b:73)	Advena (Hobbs, 1942b:73) Rogersi (Hobbs, 1942b:88)	<i>Hagenides</i> (10)	Advena Rogersi
Acherontis (Hobbs, 1942b:91)		<i>Lonnbergius</i> (1)	
Hinei (Penn, 1953a:67)		<i>Capillcambarus</i> (3)	
Barbatus (Hobbs, 1942b:33)	Barbatus (Hobbs, 1942b:35) Alleni (Ortmann, 1905a:100) miembros disyuntivos	<i>Leonticambarus</i> (14)	Barbatus Alleni
Gracilis (Ortmann, 1905a:98)		<i>Girardiella</i> (14) (Lytle, 1938:76)	
Mexicanus (Villalobos, 1955:159)	Mexicanus (Villalobos, 1955:160) Pilosimanus (Villalobos, 1955:160) Cubensis (Hobbs, 1962:278)	<i>Austrocambarus</i> (19)	Mexicanus Pilosimanus Cubensis
Miembros no conocidos en 1962		<i>Acucauda</i> (1) <i>Remoticambarus</i> (1)	
Relegado para separar el género en 1962		<i>Paracambarus</i> (2) (Ortmann, 1906:1)	

* El número en paréntesis indica el número de especies y subespecies asignadas al subgénero (Hobbs, 1989).

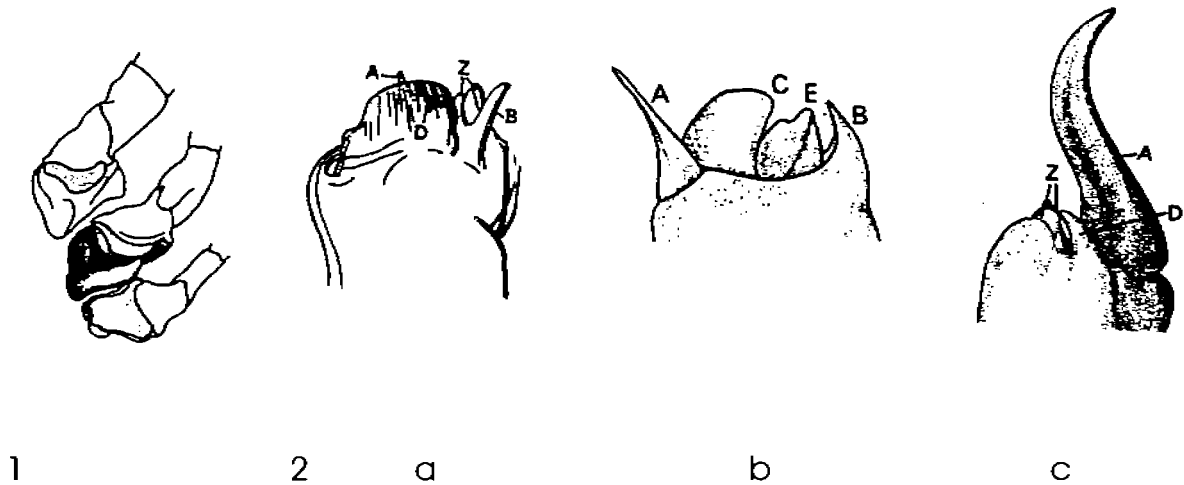


Fig. 1.1. Rasgos morfológicos distintivos del subgénero *Villalobosus*. 1. Gancho en el isquio del cuarto par de pereiópodos. 2. Primer pleópodo de *Procambarus erichsoni* (a), *Procambarus hoffmanni* (b) y *Procambarus tlapacoyanensis* (c). A, proceso mesial; B, proceso cefálico; C y D, proceso caudal; E, Z, proyección central (tomado de Villalobos, 1950 y 1955).

Diagnosis del género *Procambarus* subgénero *Villalobosus*

Cuerpo y ojos pigmentados, estos últimos bien desarrollados. Rostro sin espinas marginales o tubérculos; carina media presente o ausente. Caparazón sin espinas cervicales. Areola 3 a 37 veces más larga que ancha y constituyendo del 29% al 38% de la longitud total del caparazón. Primeros tres pares de pereiópodos sin mechones conspicuos de setas extendiéndose desde el basis hasta el merus. Gancho simple o bituberculado sobre el isquio de los cuartos pereiópodos; ocasionalmente ganchos rudimentarios sobre el isquio del tercer par. Coxa del cuarto pereiópodo con una protuberancia caudomesial subcilíndrica, subaguda, dirigida distalmente. Primer pleópodo de la forma I del macho asimétrico alcanzando la coxa del segundo pereiópodo, con un lóbulo próximo mediano (algunas veces dispuesto lateralmente); espolón próximo mesial y hombro sobre la superficie cefálica ausente; seta subapical usualmente

ausente, se ha observado sólo en *Procambarus teziutlanensis*, *P. tlapacoyanensis* y muy escasamente en *P. zihuateutlensis*. Elementos terminales del primer pleópodo consistiendo en un proceso mesial corto o largo, de subespiculiforme a masivo; proceso cefálico espiniforme o en forma de placa, situado cefalomesialmente o cefálicamente rudimentario; proceso caudal dentado a prominente, acampanado; proyección central de tuberculiforme a aguda, localizada centralmente (Fig. 1.1). Ramificación mesial del urópodo con espina media algunas veces casi obsoleta, nunca extendiéndose más allá del margen de ramificación (Hobbs, 1972).

Villalobos, en 1955, sugirió a *Procambarus (Villalobosus) riojai* Villalobos, 1944 como la especie tipo del subgénero *Villalobosus* y basándose en semejanzas morfológicas existentes entre los miembros del subgénero hasta entonces conocidos, decidió agruparlos en dos secciones, Riojai y Erichsoni, arreglo ratificado posteriormente por Hobbs (1972) denominándolos grupos (Tabla 1.1). Tales grupos, como se refirió en apartados anteriores, se sustentaron en las similitudes del proceso caudal, de manera que el grupo Riojai agrupa especies cuyo proceso caudal nunca es en forma de placa ancha, curvada o acampanada; el grupo Erichsoni por su parte, incluye aquellas cuyo proceso caudal se presenta en forma de placa ancha, curvada o acampanada:

Grupo Erichsoni.— Especies en las que el proceso caudal del primer pleópodo es en forma de placa ancha, curvada o acampanada. *Procambarus (Villalobosus) contrerasi* Creaser, 1931; *Procambarus (Villalobosus) erichsoni* Villalobos, 1950; *Procambarus (Villalobosus) zihuateutlensis* Villalobos, 1950.

Grupo Riojai.— Especies en las cuales el proceso caudal del primer pleópodo nunca es en forma de placa ancha curvada o acampanada. *Procambarus (Villalobosus) hoffmanni* Villalobos, 1944; *Procambarus (Villalobosus) hortonhobbsi* Villalobos, 1950; *Procambarus (Villalobosus) riojai* Villalobos, 1944; *Procambarus (Villalobosus) teziutlanensis* Villalobos, 1947a; *Procambarus (Villalobosus) tlapacoyanensis* Villalobos, 1947b; *Procambarus (Villalobosus) cuetzalanae* Hobbs, 1982; *Procambarus (Villalobosus) xochitlanae* Hobbs, 1975.

Como resultado de un estudio previo sobre la distribución de este grupo (López-Mejía, 2001), al considerar tanto similitudes morfológicas, principalmente, como aspectos ecológicos y de distribución, se sugirió un nuevo arreglo del subgénero en tres grupos. El grupo Erichsoni, considerando especies cuyo proceso caudal es en forma de placa ancha curvada o acampanada; habita principalmente la zona norte, en ríos y arroyos tributarios de la cuenca de los ríos Tuxpan, principalmente, Pánuco y Cazones. El grupo Riojai, incluyendo especies cuyo proceso mesial no rebasa en más de dos tercios los demás procesos y el proceso caudal es espiniforme o en forma de placa espatulada; estas especies habitan principalmente en la parte media de la distribución del subgénero, en tributarios de las cuencas de los ríos Cazones y Tecolutla. Finalmente, el grupo Tlapacoyanensis, cuyas especies poseen un proceso mesial que sobrepasa en más de dos tercios al resto de los procesos y el proceso cefálico es espiniforme; localizado en la parte sur de la zona, en tributarios de las cuencas de los ríos Tecolutla y Nautla (Fig. 1.2; Tabla 1.2). Con base en esta organización, se presenta a continuación la diagnosis de cada especie.

Tabla 1.2. Grupos de especies del subgénero *Villalobosus* propuestos por López-Mejía (2001).

Grupo	Similitudes morfológicas	Distribución	Hábitat	Especies
Erichsoni	Proceso caudal en forma de placa ancha curvada o acampanada.	Habitan en ríos y arroyos tributarios de la cuenca de los ríos Pánuco, Tuxpan, principalmente, y Cazones.	Ríos y arroyos de 10 a 25 cm de profundidad; temperaturas de 12° a 26.11°C; requerimiento de oxígeno desde 0.96 hasta 14.64 mg/l; altitud desde 855 hasta 1,700 msnm.	<i>Procambarus erichsoni</i> , <i>Procambarus contrerasi</i> , <i>Procambarus achilli</i> , <i>Procambarus chacalli</i>
Riojai	Proceso mesial que no rebasa en más de dos tercios los demás procesos; el proceso caudal espiniforme o en forma de placa espatulada.	Habitan principalmente en tributarios de las cuencas de los ríos Cazones y Tecolutla.	Ríos y arroyos de 20 a 100 cm de profundidad; temperaturas de 7.2° a 24.7°C; requerimiento de oxígeno desde 1.09 a 13.73 mg/l; altitud desde 600 hasta 2,240 msnm.	<i>Procambarus riojai</i> , <i>Procambarus hoffmanni</i> , <i>Procambarus hortonhobbsi</i> , <i>Procambarus zihuateutlensis</i>
Tlapacoyanensis	Proceso mesial que sobrepasa en más de dos tercios al resto de los procesos; proceso cefálico espiniforme.	Habitan en ríos y arroyos tributarios de las cuencas de los ríos Tecolutla y Nautla.	Ríos y arroyos de mediana profundidad, en altitudes desde 500 hasta +2000 msnm.	<i>Procambarus tlapacoyanensis</i> <i>Procambarus tezutlanensis</i> , <i>Procambarus cuetzalanae</i> , <i>Procambarus xochitlanae</i>

Grupo *Erichsoni*

Procambarus (Villalobosus) erichsoni Villalobos, 1951

Procambarus erichsoni Villalobos, 1951.

Diagnosis. Caparazón alargado. Rostro sin espinas laterales. Isquiopodios de los perelópodos del tercero y cuarto par con ganchos; los del tercer par muy reducidos. Pleópodos del primer par rectos, desiguales en longitud; proceso mesial presente; proceso caudal en forma de placa; proyección central y proceso cefálico presentes. *Annulus ventralis* con dos crestas en la región anterior (Villalobos, 1955; Lám. 1).

Procambarus (Villalobosus) contrerasi (Creaser, 1931)

Cambarus (Cambarus) contrerasi Creaser, 1931.

Procambarus contrerasi (Creaser) Hobbs, 1942.

Procambarus contrerasi (Creaser) Villalobos, 1951.

Diagnosis. Rostro sin espinas. Isquiopoditos de los pereiópodos del tercero y cuarto par con gancho, los del tercero muy reducidos. Pleópodos del primer par, rectos, desiguales; proceso mesial* presente, proceso cefálico reducido a una pequeña espina, proceso caudal en forma de una placa que asemeja a un casco de caballo. Annulus ventralis casi cubierto con dos láminas implantadas en las regiones anterolaterales (Lám. 2).

**Observaciones de la autora.* Descripción del proceso mesial: dispuesto mesialmente, espiniforme, ligeramente curvo en la punta, exhibiendo una pequeña protuberancia cercana a la punta que sugiere una espina vestigial.

Se han incorporado a este grupo *Procambarus (Villalobosus) achilli* y *Procambarus (Villalobosus) chacalli*, nuevas especies, cuya descripción se presenta en la segunda parte de este capítulo.

Grupo Riojai

***Procambarus (Villalobosus) riojai* (Villalobos, 1944)**

Paracambarus riojae Villalobos, 1944.

Procambarus riojae Villalobos, 1951.

Diagnosis. Rostro sin espinas laterales, con una quilla desvanecida en la parte anterior de la superficie dorsal. Areola ancha. Ganchos únicamente en los isquiopoditos del cuarto par de pereiópodos; coxopodios del mismo par con un fuerte tubérculo. Pleópodos del primer par del macho de la forma I, rectos, desiguales en tamaño; región apical con cinco procesos, de los cuales uno es adventicio; procesos mesial y cefálico espiniformes;

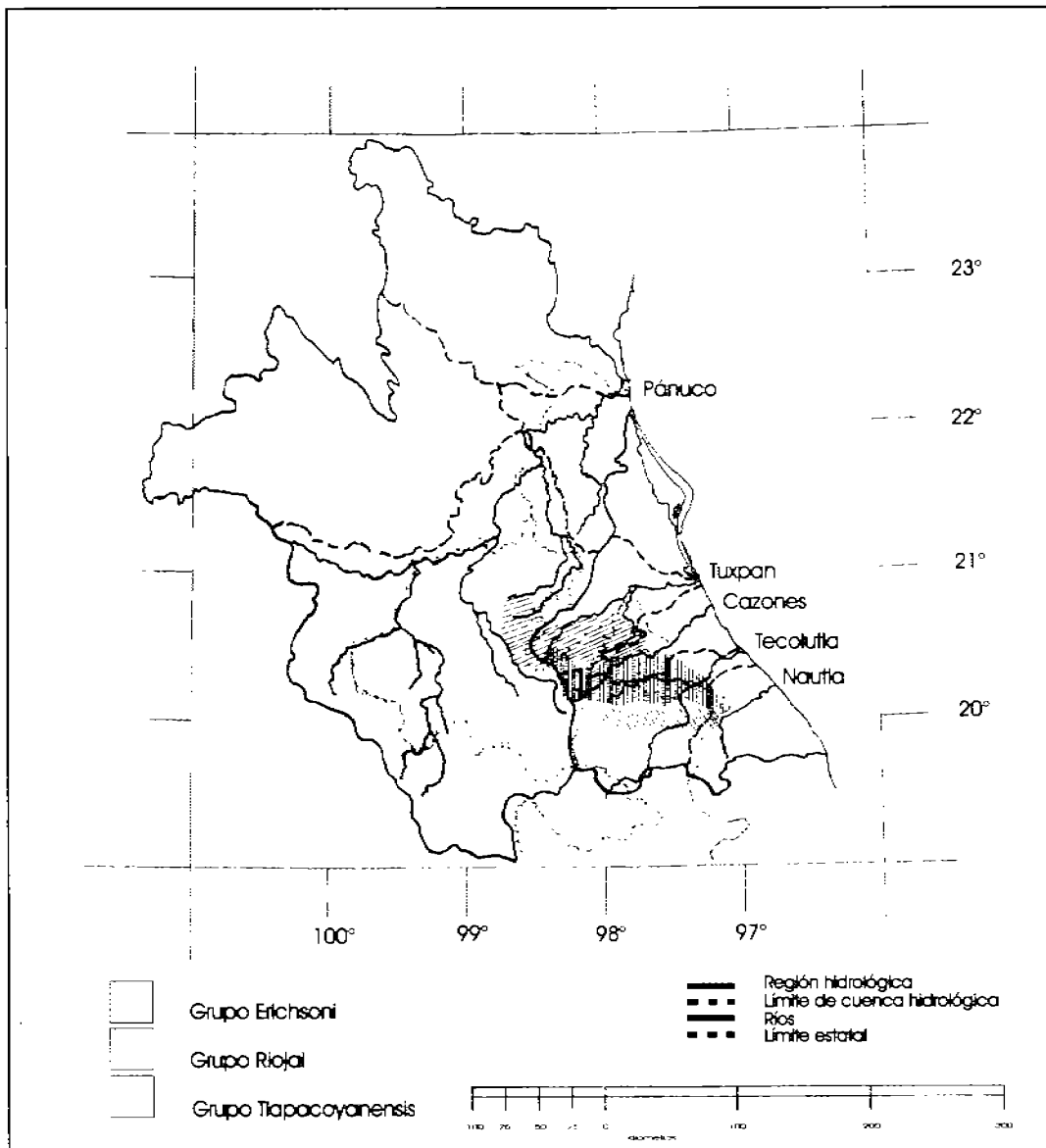


Fig. 1.2. Las áreas sombreadas hacen referencia a la localización geográfica de los tres grupos de especies del subgénero *Villalobosus* propuestos por López-Mejía (2001).

proyección central laminar; proceso caudal triangular; el proceso adventicio implantado en la región lateral distal. Annulus ventralis con una cresta apical en el lado derecho; surco dispuesto en forma semejante a *P. blandingii cuevachicae* (Villalobos, 1955; Lám. 3).

***Procambarus (Villalobosus) hoffmanni* (Villalobos, 1944)**

Paracambarus hoffmanni Villalobos, 1944.

Procambarus hoffmanni Villalobos, 1951.

Diagnosis. Rostro amplio en su base, sin espinas laterales. Macho de la forma I con los isquiopodios del tercer par de pereiópodos sin tubérculo, pero con una pequeña escotadura cerca de la articulación proximal del artejo. Isquiopodios de los pereiópodos del cuarto par con un proceso tuberculiforme esbelto. Pleópodos del primer par en el macho de la forma I, rectos, ligeramente desiguales en longitud; proceso mesial espiniforme, destacándose claramente de los otros procesos, los cuales son pequeños; el proceso cefálico es de contorno triangular y agudo; el proceso caudal está poco diferenciado; la proyección central claramente marcada en sus dos componentes. Annulus ventralis con dos prominencias mameliformes muy juntas, dispuestas en la cúspide del annulus; de entre ellas nace hacia atrás el surco. Proceso entre los quintos pereiópodos de la hembra, pequeño (Villalobos, 1955; Lám.4).

***Procambarus (Villalobosus) hortonhobbsi* Villalobos, 1951**

Procambarus hortonhobbsi Villalobos, 1951.

Diagnosis. Rostro sin espinas laterales, con una quilla pequeña en la región dorsal anterior. Ganchos únicamente en los isquiopodios de los pereiópodos del cuarto par en el macho. Pleópodos del primer par del macho de la forma I con cinco estructuras terminales; proceso cefálico en forma de una placa quitinosa; proyección central muy desarrollada; proceso mesial espiniforme. Annulus ventralis con una cresta en la región apical derecha, dispuesta perpendicularmente al eje mayor del cuerpo (Villalobos, 1955; Lám. 5).

***Procambarus (Villalobosus) zihuateutlensis* Villalobos, 1951**

Procambarus zihuateutlensis Villalobos, 1951

Diagnosis. Son cambarinos de tamaño mediano. Rostro sin espinas. Isquiopodios de los pereiópodos del tercer par con un pequeño tubérculo esbozado; los del cuarto par presentan un gancho bien desarrollado. Los pleópodos del primer par en el macho de la forma I, rectos; el proceso mesial corto, espiniforme; el proceso cefálico, pequeño, se encuentra rematando una cresta que rodea la porción cefálica del apéndice; proceso caudal en forma de espátula, acanalado; proyección central presente. Annulus ventralis con dos crestas situadas en la parte anterior (Lám. 6).

Grupo Tlapacoyanensis

***Procambarus (Villalobosus) tlapacoyanensis* (Villalobos, 1947)**

Paracambarus tlapacoyanensis Villalobos, 1947.

Procambarus tlapacoyanensis Villalobos, 1951.

Diagnosis. Rostro sin espinas. En el macho de la forma I, los isquiopodios de los pereiópodos del tercer par con un proceso triangular muy pequeño; los del cuarto par con un fuerte tubérculo. Pleópodos del primer par en el macho de la forma I, ligeramente desiguales en longitud; proceso mesial muy desarrollado, aplanado y ondulado; proceso cefálico muy pequeño; proyección central perfectamente destacada y con una clara relación con el proceso cefálico; proceso caudal poco desarrollado. Annulus ventralis muy semejante al de *Procambarus teziutlanensis*, pero aquí, una de las crestas, la del lado derecho, se desarrolla mucho más que la otra. La

hembra presenta entre los quintos pereiópodos un proceso tuberculiforme de punta roma (Villalobos, 1955; Lám. 7).

***Procambarus (Villalobosus) xochitlanae* Hobbs, 1975**

Procambarus xochitlanae Hobbs, 1975

Diagnosis. Pigmentado, ojos bien desarrollados. Rostro sin espinas marginales o tubérculos, carina media ausente. Caparazón sin espinas cervicales. Areola 4.3 a 7.0 veces más larga que ancha y constituyendo el 33.3 a 34.7% de la longitud total del caparazón (39.3 a 40.9% de la longitud postorbital). Ángulo suborbital obtuso. Pliegue postorbital sin espinas o tubérculos. Área hepática sin espinas. Escama antenal aproximadamente 1.8 veces más larga que ancha, amplitud distal hasta la longitud media. Isquio del cuarto pereiópodo del macho de la forma I con gancho prominente, no sobrepasando la articulación basioisquial, tercer pereiópodo con gancho reducido a pequeño tubérculo; coxa del cuarto pereiópodo con hombro lateralmente dirigido, redondeado, agudo distalmente. Primer pleópodo del macho de la forma I alcanzando el margen caudal de la coxa del segundo pereiópodo, asimétrico, carente de setas subapicales; extremo distal exhibiendo un proceso mesial fuerte, córneo, caudalmente inclinado, sobrepasando al resto de los elementos terminales; proceso cefálico consistente en una pequeña prominencia redondeada, comprimida, no córnea sobre el lado distal cefalomesial de la proyección central, ésta pequeña, córnea y en forma de pico, dirigida subcaudalmente; proceso caudal córneo, subespiniforme, situado lateralmente con respecto a la proyección central y dirigido caudodistalmente. Annulus ventralis convexo cefálicamente, cóncavo caudalmente, con un sinus submedio en forma de S situado en la

elevación convexa cefálicamente. Esternito cefálico con respecto al annulus (Lám. 8).

***Procambarus (Villalobosus) teziutlanensis* (Villalobos, 1947)**

Paracambarus teziutlanensis Villalobos, 1947.

Procambarus teziutlanensis Villalobos, 1951.

Diagnosis. Rostro sin espinas. En el macho de la forma I, los isquiopodios de los pereiópodos del tercer par sin ganchos, los del cuarto par provistos de un fuerte tubérculo. Coxopodios de los pereiópodos del cuarto par del macho, con un tubérculo posterior. Pleópodos del primer par en el macho de la forma I, desiguales en longitud; proceso mesial muy desarrollado, cónico, ligeramente vuelto hacia afuera; proceso cefálico poco desarrollado, formando un grupo con los demás procesos; proyección central presente; proceso caudal poco desarrollado. Annulus ventralis de contorno hexagonal, con dos pequeñas crestas dispuestas paralelamente en el centro y en la parte anterior del annulus. Entre los quintos pereiópodos de la hembra hay un tubérculo cónico (Villalobos, 1955; Lám. 9).

***Procambarus (Villalobosus) cuetzalanae* Hobbs, 1982**

Procambarus cuetzalanae Hobbs, 1982

Diagnosis. Cuerpo pigmentado, ojos bien desarrollados. Rostro carente de espinas marginales, carina media ausente. Espina cervical representada por pequeño tubérculo. Areola de especímenes con longitud del caparazón mayor a 19.9 mm, 5.5 a 8.6 (\bar{x} = 6.8) veces tan larga como ancha y constituyendo el 34.1 a 36.9% (\bar{x} = 34.5%) de la longitud del caparazón (39.8 a 42.8%, \bar{x} = 40.9% de la longitud postorbital del

caparazón). Ángulo suborbital subagudo a ampliamente obtuso. Ondulación postorbital terminando anteriormente con o sin tubérculo agudo a subagudo. Área hepática tuberculada; espina branquiostegal, si presente, espiniforme o tuberculiforme. Escama antenal aproximadamente dos veces tan larga como ancha, amplitud distal hasta la longitud media. Sólo el isquio del cuarto par de pereiópodos con gancho; gancho simple, tumescente y rebasando la articulación basioisquial, pero no opuesto al tubérculo sobre el basis; coxa del cuarto par de pereiópodos con protuberancia aguda prominente sobre el ángulo ventral caudomesial. Primer par de pleópodos del macho de la forma I, alcanzando el margen cefálico de la coxa del segundo par de pereiópodos, ligeramente asimétrico, escaso hombro sobre la superficie cefálica, setas subapicales limitadas a 1 ó 2 en la base cefalomesial del proceso cefálico; proceso mesial siendo el más prominente de los elementos terminales, córneo, ligeramente sinuoso y dirigido distalmente, su textura córnea contrastando sutilmente con la base calcificada; proceso cefálico también córneo, agudo y dirigido distalmente con la punta un poco dirigida caudalmente; proyección central originándose desde la región media del eje del apéndice, pareciendo aguda en sus aspectos lateral y mesial, dirigida distalmente, pero desde los procesos mesial y cefálico, su naturaleza compuesta claramente evidente en la vista cefalolateral; elemento caudal consistiendo en una reducida protuberancia situada caudolateralmente, sutil proceso caudal en forma de pala sobre el flanco lateral de la proyección central y proceso adventicio redondeado en la base caudomesial de la proyección central. Annulus ventralis aproximadamente 1.7 veces tan largo como ancho, asimétrico en la línea distal; superficie ventral fuertemente esculpida; mitad cefálica con seno oblicuo inclinándose lateralmente desde el margen cefalomedio y uniéndose a la depresión ocupando la parte media de la mitad caudal del

annulus; sinus originándose en el seno siguiendo una curva sigmoide en la depresión, terminando sobre la pared caudal del annulus; pared cefálica convexa, pared caudal cóncava; lengüeta ancha y redondeada. Esclerito postanular largo y muy elevado, ocupando la concavidad sobre la superficie caudal del annulus cuando es extendido hacia delante. Primer pleópodo presente en la hembra (Lám. 10).

Especies utilizadas como grupos externos

En este estudio se han incluido tres especies correspondientes a otros dos subgéneros del género *Procambarus*, con el fin de incorporarlos como grupos externos en el análisis filogenético del subgénero *Villalobosus*, a saber: *Procambarus (Procambarus) digueti*, debido a que esta especie se ha considerado la más evolutivamente distante en México, con base en la poca similitud que presentan los procesos apicales con respecto al resto de las especies de *Procambarus* en nuestro país y su aislamiento con respecto a los grupos genéricos afines de la zona oriental, dado que habita sólo en la zona occidental de la república, la cual corresponde a la región geográfica más antigua del país. *Procambarus (Ortmannicus) caballeroi* y *P. (O.) gonopodocristatus*, dado que este subgénero es considerado el grupo primitivo del cual pudo derivarse el subgénero *Villalobosus* (ver capítulo 5) y debido a que estas especies comparten territorio con el subgénero *Villalobosus* al norte de su zona de distribución. La diagnosis de estos grupos se presenta a continuación.

***Procambarus (Procambarus) digueti* (Bouvier, 1897)**

Cambarus digueti Bouvier, 1897

Cambarus carinatus Faxon, 1898

Cambarus (Cambarus) digueti Bouvier, 1905

Cambarus (Procambarus) digueti (Bouvier) Ortmann, 1905

Cambarus (Procambarus) digueti (Bouvier) Ortmann, 1906

Cambarus digueti (Bouvier) Faxon, 1914

Procambarus digueti (Bouvier) Hobbs, 1942

Procambarus digueti (Bouvier) Villalobos, 1946

Diagnosis. Cambarinos robustos; rostro con carena media en la superficie anterior; espinas laterales en el caparazón; quelas con la porción palmar subcilíndrica, la dactilar esbelta; ganchos en los isquiopodios del tercer par. Pleópodos del primer par robustos; hombro angular en la porción cefálica muy cerca del ápice; proceso mesial espiniforme; proceso caudal muy reducido; proceso cefálico y proyección central dentiformes. Annulus ventralis con una hendidura en forma de S que lo surca totalmente en sentido anteroposterior (Villalobos, 1955; Lám. 11).

***Procambarus (Ortmannicus) caballeroi* Villalobos, 1944**

Procambarus caballeroi Villalobos, 1944

Diagnosis. Rostro ancho, ligeramente cóncavo, sin espinas laterales. Areola ancha. Caparazón sin espinas laterales. Isquiopodios de los pereiópodos del segundo y tercer par, con ganchos. Tubérculo en el borde articular distal del basipodio del cuarto par; coxopodio de los mismos pereiópodos con un tubérculo en forma de rodilla más o menos prominente. Pleópodos del primer par del macho con tubérculos en la porción caudal interna de la base; un mechón de cerdas en la región subapical externa. Proceso mesial cónico, muy agudo y corto, naciendo de la región subapical mesial. Procesos cefálico, caudal y proyección central, dentiformes, aplanados en sentido lateral. Esternito del cuarto par de pereiópodos en la hembra, hendido en la línea media de la porción posterior. Annulus ventralis

pequeño y guarecido parcialmente por las prolongaciones posteriores del esternito del cuarto par de pereiópodos; sin tubérculo espiniforme entre los quintos pereiópodos (Villalobos, 1955; Lám. 12).

***Procambarus (Ortmannicus) gonopodocristatus* Villalobos, 1958**

Procambarus gonopodocristatus Villalobos, 1958

Diagnosis. Rostro sin espinas laterales. Areola obliterada. Caparazón sin espinas laterales. Bordes postorbitales sin espina en el extremo anterior. Macho con ganchos en los isquiopodios del tercero y cuarto par; pleópodos del primer par terminando en cinco partes distintas; proceso caudal crestiforme. Esternito de la cuarta somita del pereión en la hembra con dos prolongaciones en la parte posterior, provistas de tubérculos y separadas en la línea media (Lám. 13).

***Procambarus (Ortmannicus) hidalgoensis*
López-Mejía, Alvarez y Mejía-Ortíz, 2005**

Procambarus hidalgoensis López-Mejía, Alvarez y Mejía-Ortíz, 2005

Esta especie se ha considerado también como grupo externo. Su diagnosis y descripción detallada se presenta en la siguiente sección de este capítulo.

DESCRIPCIÓN DE ESPECIES

Como resultado de la revisión taxonómica de los ejemplares recolectados, ha sido posible distinguir tres nuevas especies, dos pertenecientes al subgénero *Villalobosus* y una al subgénero *Ortmannicus*, cuya diagnosis se

expone a continuación. La descripción detalla puede consultarse al final de este capítulo.

Procambarus (Villalobosus) achilli

López, Mejía y Alvarez, 2003

Diagnosis. Cuerpo pigmentado. Ojos bien desarrollados. Rostro alcanzando el primer tercio del tercer segmento del pedúnculo antenular, representando el 15.2 a 20% (\bar{x} = 17.4%) de la longitud del caparazón, sin espinas marginales. Areola 4.9 a 6.9 (\bar{x} = 5.7) veces más larga que ancha, 32.2 a 42.2% (\bar{x} = 34.9%) de la longitud del caparazón, 16.8 a 20.1% (\bar{x} = 18.6%) de la longitud postorbital, con 1 a 3 puntuaciones en la parte más angosta. Sin espinas cervicales, una espina branquiostegal presente. Escama antenal 1.7 a 2.3 (\bar{x} = 1.9) veces más larga que ancha, con una profunda ranura longitudinal corriendo en toda su longitud. Quelípedos más cortos que la longitud total del cuerpo, superficie mesial de la palma de la quela con una línea irregular de tubérculos; superficie lateral de la quela cubierta con pequeñas y regularmente distribuidas brochas de setas cortas, dedos más largos que la palma; ambos dedos con tres ondulaciones longitudinales sobre las superficies ventral y dorsal. Isquio del tercer pereiópodo sin gancho, isquio del cuarto pereiópodo con fuerte gancho sobrepasando la articulación basioisquial, carente de tubérculo sobre el basis. Epistoma con márgenes regulares simétricos ligeramente rugosos, porción cefálica con extensión corta, con setas. Primer par de pleópodos del macho de la forma I asimétricos, alcanzando la coxa del segundo par de pereiópodos, con setas sobre las porciones central y proximal. Proceso mesial ligeramente aplanado, más corto que el resto de los elementos terminales, dirigido anteriormente; proyección central triangular, dividida en dos procesos, el primero córneo, más largo que el resto de los elementos terminales, dirigido caudocefálicamente, libre,

separado de los procesos caudal y cefálico; proceso cefálico espiniforme, dirigido distalmente, originándose sobre el proceso caudal; proceso caudal en forma de placa ligeramente curva. Annulus ventralis con la placa preanular dividida, cubierta con setas cortas a lo largo del margen posterior; annulus semicircular con márgenes anteriores convergentes, formando prominentes paredes; sinus originándose en la porción media del área convexa, con una profunda sección terminando en la región media posterior; placa postanular piramidal, superficie apical convexa, separada del annulus (Lám.). La descripción detallada de esta especie puede ser consultada en su versión original en el Anexo 1.1, al final de este capítulo.

Procambarus (Villalobosus) chacalli

López-Mejía, Alvarez y Mejía-Ortíz, 2004

Diagnosis. Cuerpo pigmentado, ojos normalmente desarrollados, facetas bien definidas. Rostro alcanzando el borde distal de la tercera articulación antenal, longitud 15.8 a 20.8% (\bar{x} = 17.9%, n= 26) la longitud del caparazón, sin espinas marginales. Areola 4.9 a 7.2 (\bar{x} = 5.9, n= 26) veces tan larga como ancha, longitud 32.3 a 38.6% (\bar{x} = 35.1%, n= 26) de la longitud del caparazón, 39.7 a 46.1% (\bar{x} = 42.8%, n= 26) de la longitud postorbital, con 2 ó 3 puntuaciones a través de la parte más angosta. Espinas cervicales e infraorbitales ausentes, espina branquiestegal presente. Escama antenal 1.8 a 2.3 (\bar{x} = 2.1, n= 26) veces más larga que ancha, con la ranura longitudinal a través de toda su longitud, ranura poco profunda anteriormente, volviéndose más profunda posteriormente. Quelípedos más cortos que la longitud total del cuerpo; superficie mesial de la palma de la quela con 7 tubérculos en hilera irregular, según el macho de la forma I; todos los tubérculos con pequeñas brochas de setas cortas anteriormente; dedos tan largos como la palma, ambos dedos con 3 surcos longitudinales

a lo largo de las superficies ventral y dorsal. Isquio del cuarto pereiópodo con gancho extendiéndose más allá de la articulación basioisquial, isquio del tercer pereiópodo con gancho vestigial. Lóbulo cefálico del epistoma aproximadamente hexagonal, con márgenes ligeramente ondulados, irregular y asimétrico anteriormente; ángulos laterales bien definidos, carentes de setas.

Primer par de pleópodos del macho de la forma I asimétricos, alcanzando la coxa del segundo par de pereiópodos, con 2 hileras de setas esparcidas a través de toda su longitud, setas más abundantes y más largas proximalmente. Proceso mesial corto, ligeramente truncado distalmente, dirigido distolateralmente; proyección central triangular, dividida en dos secciones, caudocefálicamente orientada; proceso cefálico espiniforme, dirigido distocefálicamente, más largo que el resto de los elementos terminales, originándose sobre el proceso la base del proceso caudal; proceso caudal en forma de placa en posición cefálica, córneo, envolviéndose alrededor de la proyección central, con un fuerte doblez en el margen caudolateral. Placa preanular de la hembra con 2 fuertes crestas laterales extendiéndose lateralmente y rodeando el annulus ventralis, con setas cortas dispersas sobre la porción posterior de la placa. Placa preanular y annulus con débil contacto. Annulus aproximadamente circular, con 2 fuertes crestas anteriormente, formando una depresión profunda en forma de V; mitad posterior de la cresta dextral lateralmente curva, volviéndose menos definida; cresta sinistral lateralmente curva formando una expansión en forma de lengua; proyección rectangular sobre la sección media posterior, formando el margen del sinus. En la vista ventral, placa postanular ovoide, en la vista caudal aproximadamente cónica; superficie apical exhibiendo pequeñas puntuaciones con setas cortas; placa no en contacto con el annulus. Primer par de pleópodos presentes en las hembras (Lám.). La descripción detallada de esta especie

puede ser consultada en su versión original en el Anexo 1.2, al final de este capítulo.

Procambarus (Ortmannicus) hidalgoensis

López-Mejía, Alvarez y Mejía-Ortíz, 2005

Diagnosis. Cuerpo pigmentado, ojos normalmente desarrollados, facetas bien definidas. Rostro alcanzando la porción media de la tercera articulación antenular, 18.2 a 22.7% ($\bar{x}=19.8\%$) de la longitud del cefalotórax, sin espinas marginales. Areola 5.1 a 9 ($\bar{x}=7.07$) veces tan larga como ancha, 29.7 a 35.4% ($\bar{x}=33.83\%$) de la longitud del caparazón, 36.4 a 44.7% ($\bar{x}=42.01\%$) de la longitud postorbital, con 2 a 3 puntuaciones a través de la parte más angosta. Espina cervical ausente, con una espina branquiostegal. Escama antenal 1.4 a 2.6 ($\bar{x}=1.8$) veces más larga que ancha, con una ranura longitudinal débilmente marcada a través de toda su longitud, poco profunda anteriormente, volviéndose más profunda posteriormente. Quelípedos más cortos que la longitud total del cuerpo, superficie mesial de la palma de la quela con 14 tubérculos en línea irregular; todos los tubérculos de la superficie de la quela con pequeños mechones de setas cortas anteriormente; dedos ligeramente más largos que la palma, ambos dedos con 3 ondulaciones longitudinales a lo largo de las superficies ventral y dorsal.

Isquio del tercero y cuarto pereiópodos con gancho, aquellos sobre el tercer par de pereiópodos extendiéndose más allá de la articulación basioisquial. Epistoma semitriangular, con la extensión cefalomedial terminando en cuatro espinas, tres de ellas compartiendo la base; porción anterior asimétrica, ángulos laterales bien definidos, márgenes ligeramente ondulados con escasas setas. Primer par de pleópodos del macho de la forma I asimétrico, alcanzando la cosa del tercer pereiópodo, con una hilera de setas esparcidas a lo largo de toda su longitud, setas más

abundantes y más largas sobre la porción media. Proceso mesial espiniforme, con la punta plana, dirigido caudodistalmente. Proyección central aplanada, dividida en dos elementos desiguales en tamaño, el externo evidentemente más largo y más robusto, el interno dirigido mesialmente. Proceso cefálico espiniforme, con la punta aplanada, dirigido centralmente. Proceso caudal espatulado, ligeramente quitinoso, cóncavo hacia el proceso mesial.

Annulus ventralis con la placa preanular tuberculada, exhibiendo dos fuertes crestas laterales extendiéndose lateralmente, rodeando el annulus, setas cortas dispersas sobre la parte posterior de la placa. Placa preanular y annulus con débil contacto, la primera sobrepasando la porción anterior del annulus. Annulus romboidal, con dos fuertes crestas laterales formando una profunda depresión en forma de V anteriormente, parcialmente cubierto por la placa preanular; mitad posterior de la cresta dorsal cubierta lateralmente, volviéndose menos definida; cresta sinistral lateralmente curva formando una expansión en forma de lengua; margen formado por ambas crestas enmarcando el sinus posteriormente. En la vista ventral, placa postanular con el margen anterior en forma oval, margen posterior recto; en la vista caudal, aproximadamente cónica, superficie apical exhibiendo pequeñas puntuaciones con setas cortas, no en contacto con el annulus (Lám.). La descripción detallada de esta especie puede ser consultada en su versión original en el Anexo 1.3, al final de este capítulo.

Discusión

Inicialmente, la posesión y disposición de ganchos en los isquiopoditos fue suficiente para determinar la posición taxonómica de ciertas especies del subgénero *Villalobosus* (*Procambarus riojai*, *P. hoffmanni*, *P. teziutlanensis* y

P. tlapacoyanensis) dentro del género entonces denominado *Paracambarus* (Villalobos, 1944, 1947). No obstante, fue necesaria su reubicación debido a las notables diferencias en los procesos apicales, particularmente la disposición del proceso mesial dirigido caudalmente en el género *Paracambarus* y distalmente en *Procambarus*, situándolas finalmente dentro del género *Procambarus* (Villalobos, 1951; 1955). La conformación de los dos grupos, Riojai y Erichsoni, dentro del subgénero se basó en la constitución de los pleópodos del primer par del macho de la forma I y la forma del annulus ventralis (Villalobos, 1955). No obstante, la posterior incorporación de nuevas especies a este subgénero (*P. cuetzalanae*, *P. xochitlanae*, *P. achilli* y *P. chacalli*) sugiere la necesidad de una reestructuración de los grupos.

Hasta ahora el grupo Erichsoni ha incorporado especies que poseen un proceso caudal en forma de placa ancha curvada o acampanada y un proceso cefálico espiniforme. Bajo esta descripción, *P. erichsoni* y *P. contrerasi* están debidamente consignados a este grupo y sugiero la incorporación de *P. achilli* y *P. chacalli*. En contraste, propongo la reubicación de *P. zihuateutlensis* ya que, a pesar de las similitudes en el annulus ventralis, su proceso caudal es en forma de placa espatulada, carente de un marcado doblez y sobresaliente en talla respecto al resto de los procesos apicales. El grupo Riojai ha incluido especies cuyo proceso mesial puede ser cónico o aplanado, igual en talla o ligeramente superando al resto de los procesos apicales. De acuerdo con estas características *P. riojai*, *P. hoffmanni* y *P. hortonhobbsi* están bien situados en este grupo y se incorporaría *P. zihuateutlensis*, adicionando a la diagnosis de este grupo un proceso caudal en forma de placa espatulada; pero es precisamente la talla reducida del proceso mesial y la forma del proceso caudal la que desde mi punto de vista excluye de este grupo a *P.*

teziutlanensis y *P. tlapacoyanensis*. Así, tal como he sugerido en párrafos anteriores, *P. tlapacoyanensis*, *P. teziutlanensis*, *P. xochitlanae* y *P. cuetzalanae* pueden agruparse en un tercer conjunto denominado Grupo Tlapacoyanensis, cuyas especies poseen un proceso mesial que sobrepasa en más de dos tercios al resto de los procesos y un proceso cefálico espiniforme.

Debe considerarse que la descripción puntual de los procesos no siempre estuvo disponible, como en el caso de *P. contrerasi*, cuya diagnosis carece de una descripción precisa del proceso mesial y del annulus ventralis, haciendo difícil su determinación final. La obtención de fotografías a través del microscopio electrónico de barrido permitió hacer una revisión más detallada de los procesos apicales del gonópodo revelando caracteres que podrían sugerir una reestructuración de los grupos, incluso diferente a la propuesta arriba. Las recientemente descritas *Procambarus achilli* y *P. chacalli*, colocadas en el grupo Erichsoni, comparten con *P. cuetzalanae* un proceso mesial plano distalmente, caracter que podría unirlos filogenéticamente. Considerando esa característica del proceso mesial y las diferencias en el annulus ventralis, *P. achilli* y *P. chacalli* podrían ser separados del grupo Erichsoni. Otro caracter, el más relevante derivado de esta revisión, es la presencia de una espina que nace en la mitad distal del proceso mesial y que está presente sólo en *P. hoffmanni*, separándola de cualquiera de los otros grupos, pero que sí comparte con algunas especies del subgénero *Ortmannicus*. La presencia de una espina sobre el proceso mesial y ganchos vestigiales sobre el isquio del tercer par de pereiópodos, son caracteres que habrán de considerarse al efectuar un análisis filogenético del grupo, pues podrían ser determinantes para establecer relaciones de ancestría y posibles hipótesis de diversificación.

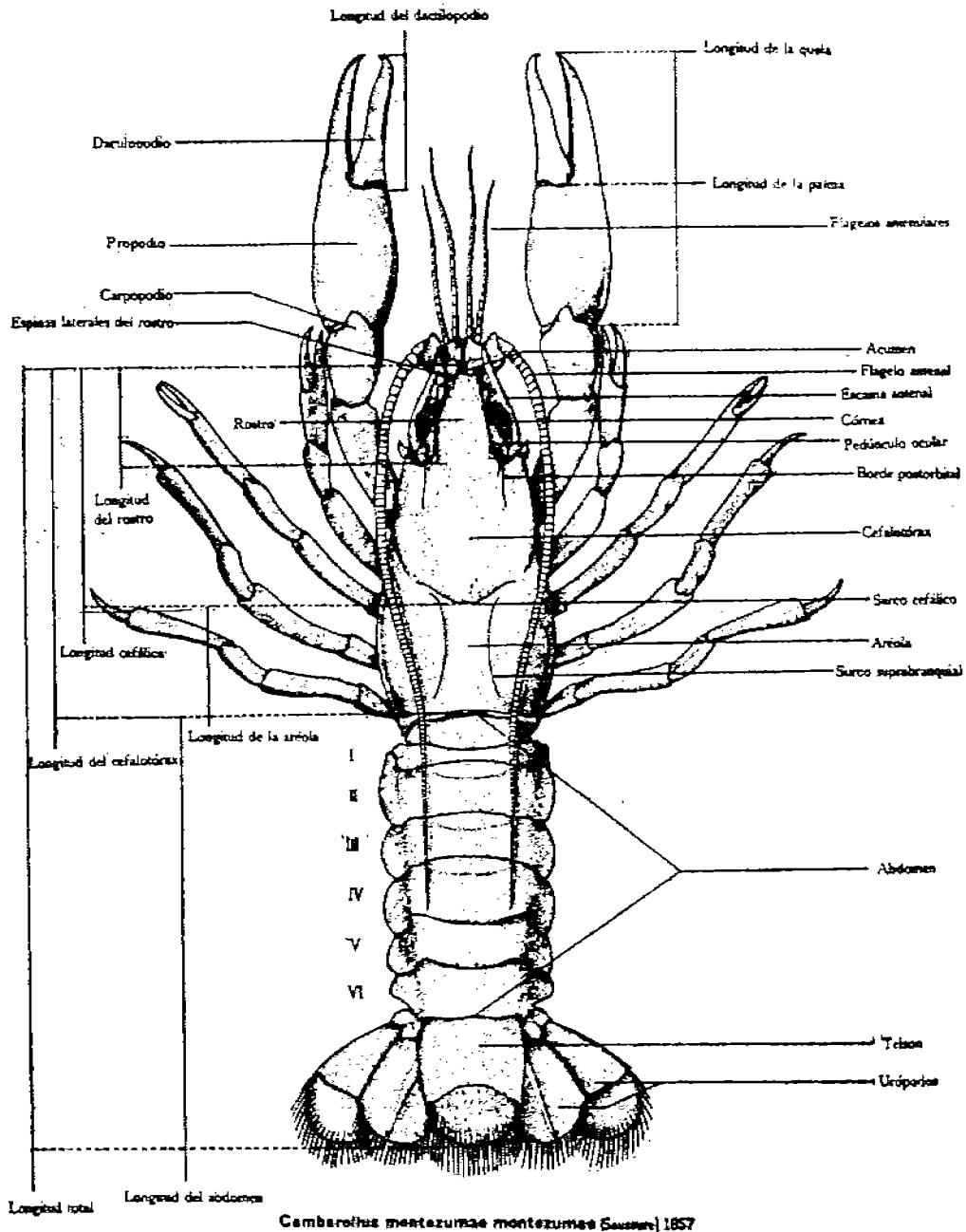
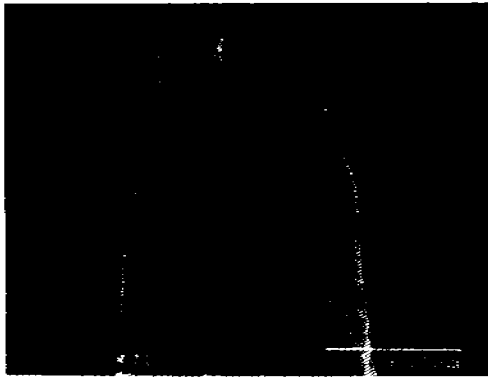
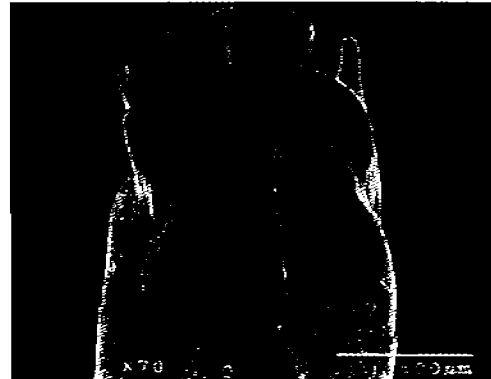


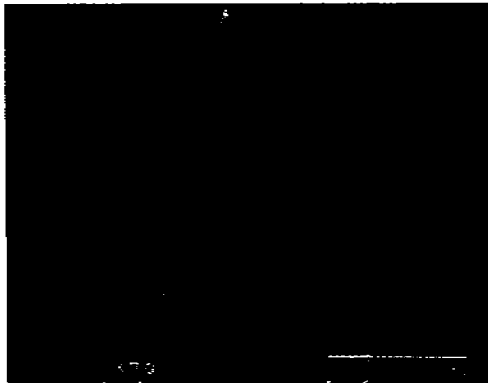
Lámina I. Esquema de un acocil (Villalobos, 1955).



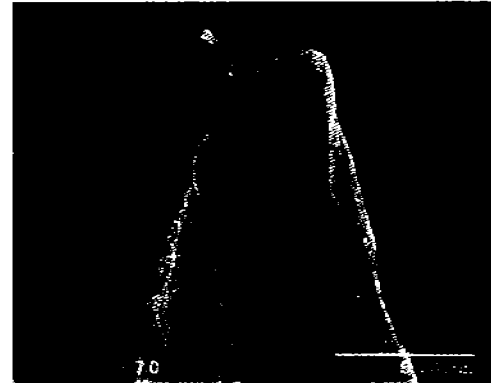
A



B



C



D



E



F

Lámina 1. *Procambarus (Villalobosus) erichsoni* (CNCR). A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal; F, annulus ventralis.



A



B



C



D



E



F

Lámina 2. *Procambarus (Villalobosus) contrerasi*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal; F, annulus ventralis.



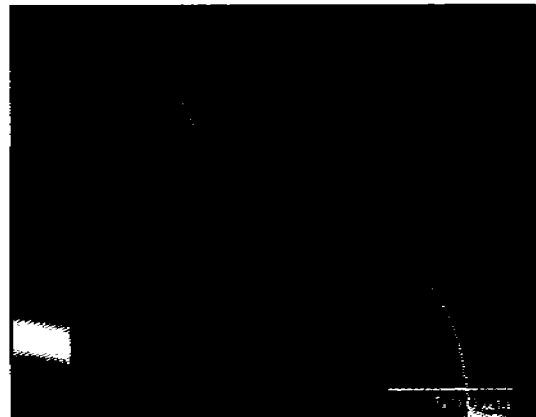
A



B



C

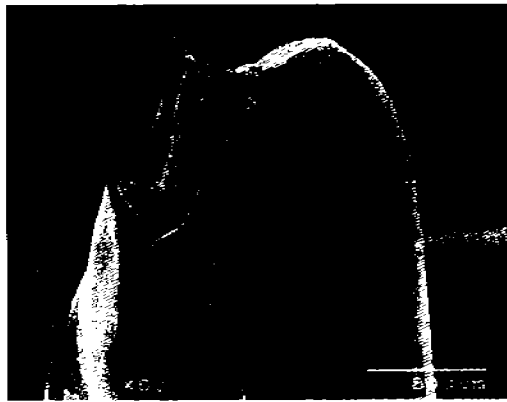


D



E

Lámina 3. *Procambarus (Villalobosus) riojai*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal.



A



B



C



D

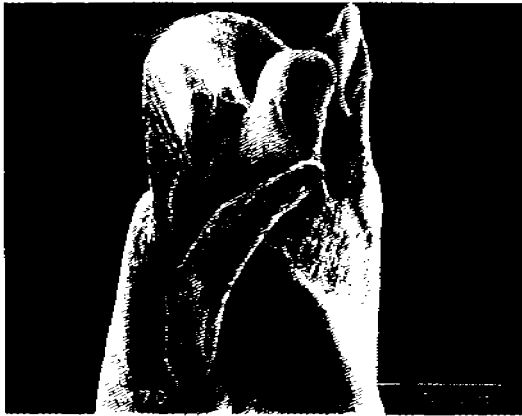


E

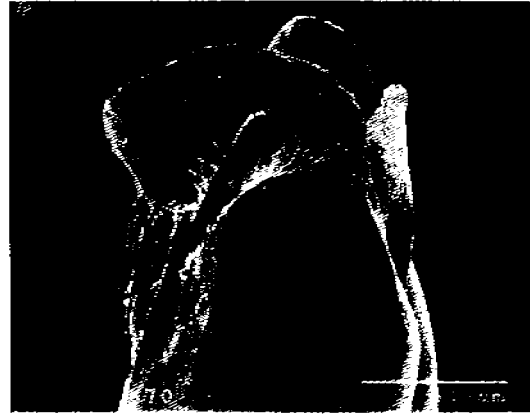


F

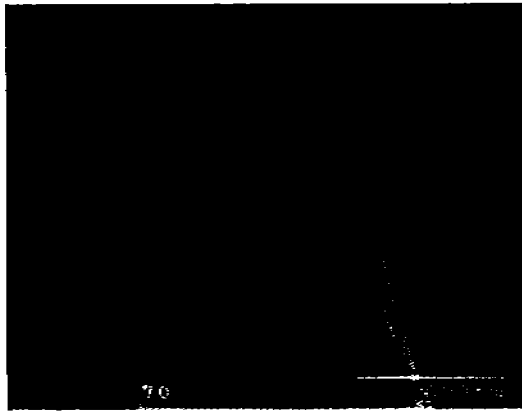
Lámina 4. *Procambarus (Villalobosus) hoffmanni*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal; F, annulus ventralis.



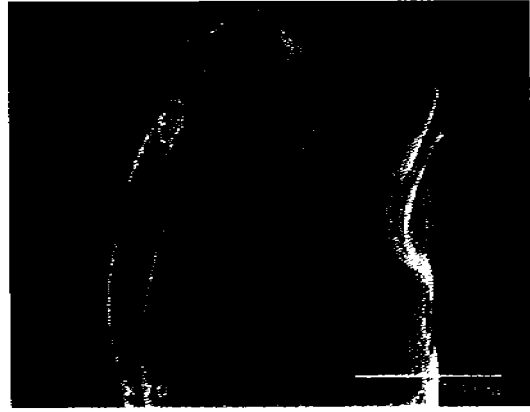
A



B



C



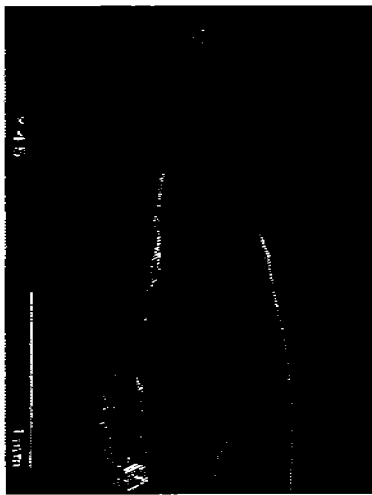
D



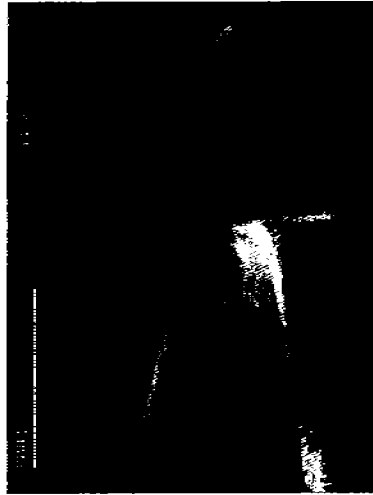
E

F

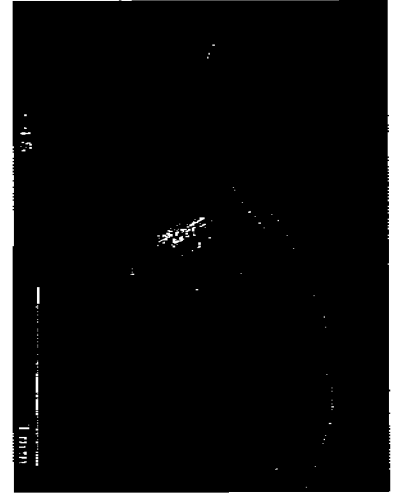
Lámina 6. *Procambarus (Villalobosus) zihuatlensis*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal.



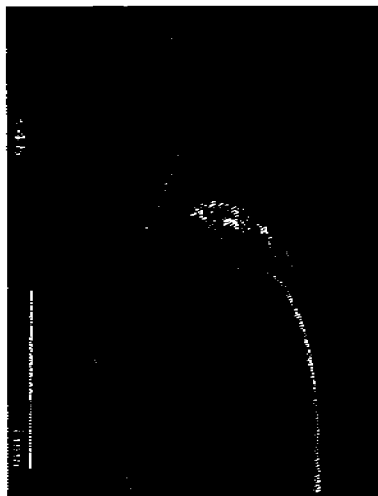
A



B



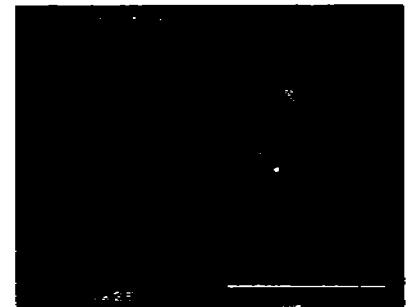
C



D

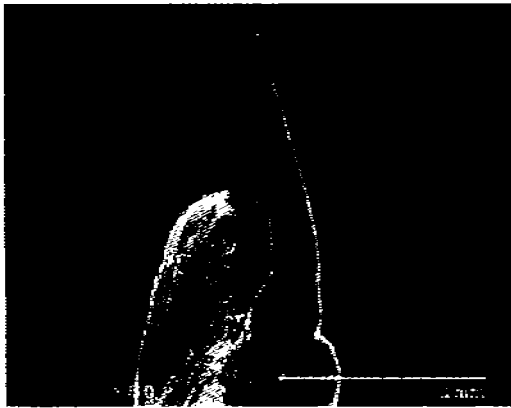


E



F

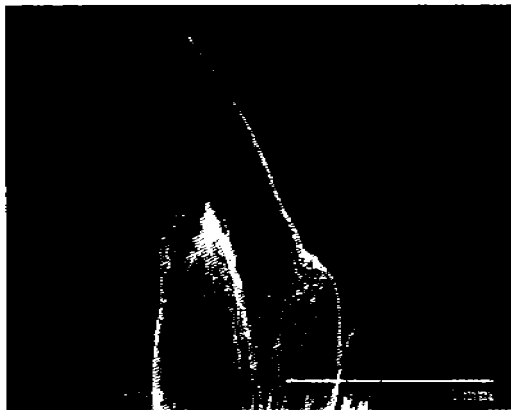
Lámina 7. *Procambarus (Villalobosus) tlapacoyanensis*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal; F, annulus ventralis.



A



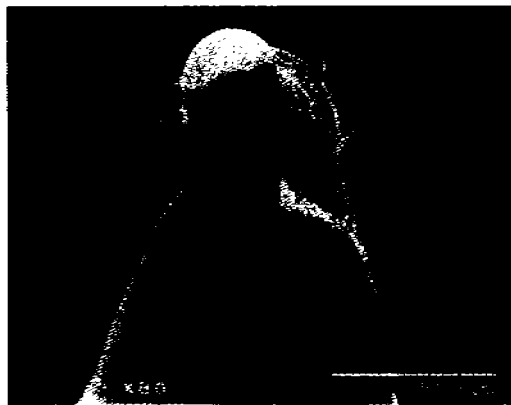
B



C



D

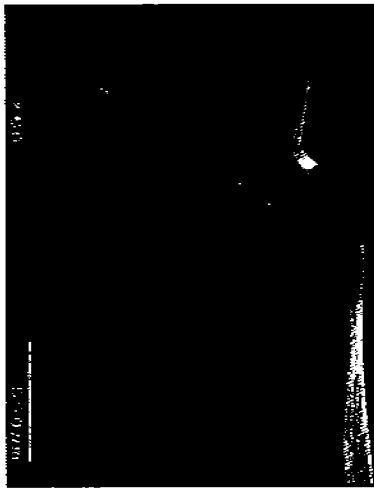


E



F

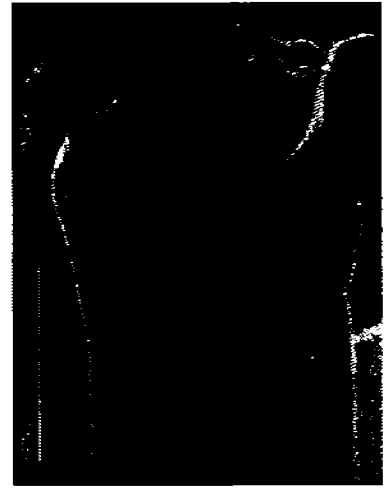
Lámina 9. *Procambarus (Villalobosus) teziutlanensis*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal; F, annulus ventralis.



A



B



C



D

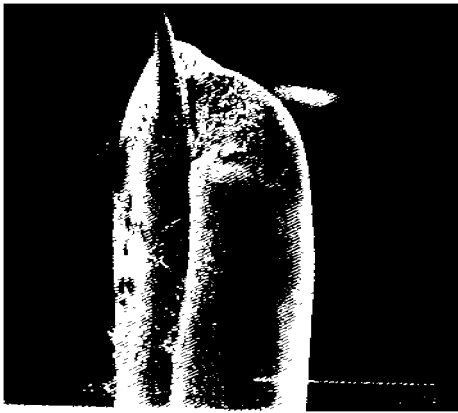


E

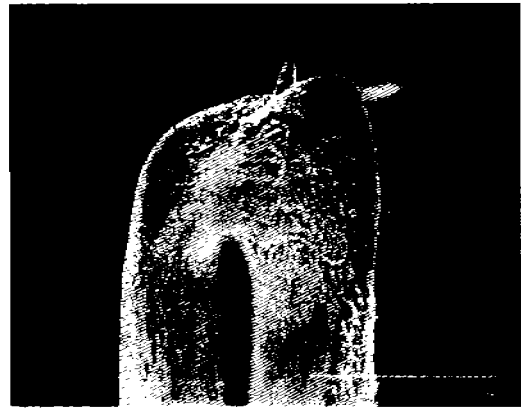


F

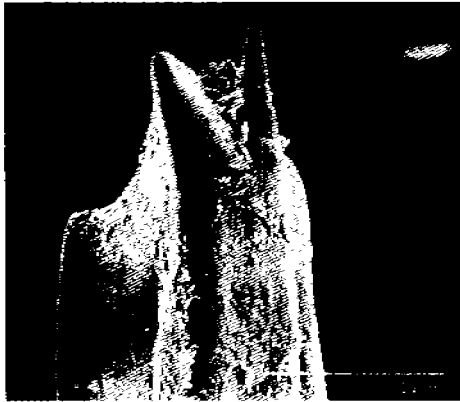
Lámina 10. *Procambarus (Villalobosus) cuetzalanae*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal; F, annulus ventralis.



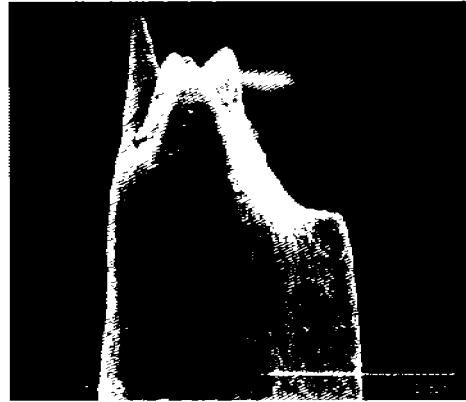
A



B



C



D



E

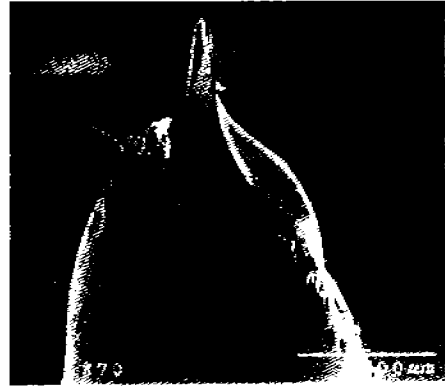


F

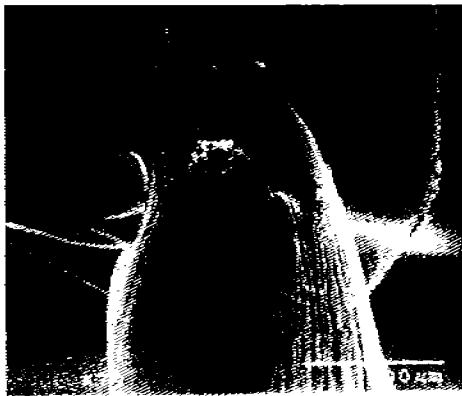
Lámina 11. *Procambarus (Procambarus) digueti*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal; F, annulus ventralis.



A



B

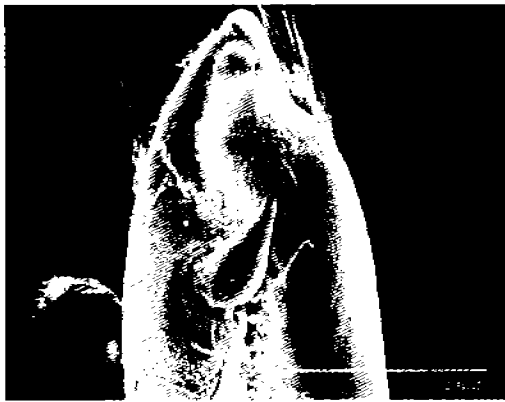


C

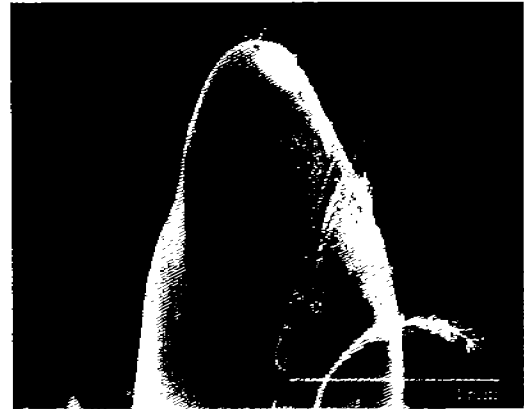


D

Lámina 12. *Procambarus (Ortmannicus) caballeroi*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista distal.



A



B



C



D



E

Lámina 13. *Procambarus (Ortmannicus) gonopodocristatus*. A, vista caudal; B, vista cefálica; C, vista mesial; D, vista lateral; E, vista distal.

**PROCAMBARUS (VILLALOBOSUS) ACHILLI (DECAPODA, CAMBARIDAE):
A NEW SPECIES OF CRAYFISH FROM MEXICO**

BY

MARILÚ LÓPEZ^{1,3}), LUIS M. MEJÍA¹) and FERNANDO ALVAREZ²)

¹) Laboratorio de Fisiología y Comportamiento Animal, Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco (UAM-X), Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México 04960, D.F., Mexico

²) Colección Nacional de Crustáceos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153, México 04510, D.F., Mexico

ABSTRACT

A new species of crayfish from Atezca, near Molango, Hidalgo, Mexico, is described. *Procambarus (Villalobosus) achilli* sp. nov., can be placed in the *erichsoni*-group, being morphologically similar to *Procambarus (V.) contrerasi* and *Procambarus (V.) erichsoni*, from which it can be distinguished by a gonopod with a mesial process shorter than the terminal elements, flattened, and directed anteriorly; a triangular central projection, divided into two processes of different size, independent from caudal and cephalic processes; a cephalic process directed distally, originating on the caudal process; and an annulus ventralis semicircular in shape, with convergent anterior margins, forming prominent walls.

RESUMEN

Se describe una nueva especie de la localidad de Atezca, cerca de Molango, Hidalgo, México. *Procambarus (Villalobosus) achilli* sp. nov. puede ser colocada en el grupo *erichsoni*, siendo morfológicamente similar a *Procambarus (V.) contrerasi* y *Procambarus (V.) erichsoni*, de las cuales se distingue por tener un gonópodo con un proceso mesial más corto que el resto de los elementos terminales, aplanado, dirigido anteriormente; una proyección central dividida en dos procesos de diferente talla, independiente de los procesos caudal y cefálico; un proceso cefálico dirigido distalmente, originándose sobre la base del proceso caudal, y un anulus ventralis semicircular con los márgenes convergentes anteriores divididos, formando prominentes paredes.

INTRODUCTION

The subgenus *Villalobosus* Hobbs, 1972, is of considerable systematic interest due to its particular geographic distribution, being one of four endemic Mexican

³) e-mail: lmejiam@cueyatl.sam.mx

groups belonging to the genus *Procambarus* Ortmann, 1905 (cf. Villalobos, 1955; Hobbs, 1972, 1974). To date, ten species belonging to this subgenus have been described from rivers, streams, and dam reservoirs in the Tuxpan, Cazonas, Tecolutla, and Nautla river basins, in the southern portion of the Huasteca region, in the boundaries of the states of Hidalgo, Puebla, and Veracruz.

The species described herein expands the distribution of the subgenus to the northwest of the previously defined geographical boundaries proposed by Villalobos (1955) and Hobbs (1984). The new distribution now includes tributaries in the Pánuco River basin, where the crayfishes occur in rivers, streams, ponds, and the Atezca dam reservoir. This find is the result of a previous study on the distribution of the subgenus *Villalobosus* (cf. López-Mejía, 2001).

The specimens were preserved in 70% alcohol and deposited in the Colección Nacional de Crustáceos (CNCR), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, and in the Colección de Crustáceos de Referencia of the Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (CCR-UAMX). The abbreviations used are: TL = total length, and CL = carapace length.

TAXONOMY

Procambarus (Villalobosus) achilli new species

Material examined. — Holotype: ♂ Form I, TL 57.1 mm, CL 28.4 mm; 4 September 2000; Cascada del Arroyo de Atezca, 5 km NW from Molango, Hidalgo, Mexico; this stream flows into the dam reservoir of the same name (20°48'5''N 98°44'6''W), at 1,285 m altitude; collectors M. López-Mejía and L. M. Mejía-Ortíz; CNCR 19870. Allotype ♀, TL 74.3 mm, CL 36.9 mm; 16 October 2000, same locality as holotype; CNCR 19871. Morphotype ♂ Form II, TL 60 mm, CL 30.1 mm; same locality and date as holotype; CNCR 19872.

Other paratypes: 2 ♀♀, 4 ♂♂ Form I, 2 ♂♂ Form II, TL 41.0-74.3 mm; CL 19.3-36.9 mm; 17 October 2000; Xochicoatlán, Hidalgo; CNCR 19873. One ♂ Form I and 1 ♀, 16 October 2000; locality as holotype; CNCR 19874. Two ♀♀, and 1 ♂ Form I, 18 October 2000; Calnali, Hidalgo; CNCR 19875. Three ♂♂ Form II, 14 February 2001; Calnali, Hidalgo; CNCR 19876. One ♂ Form I, 15 February 2001; Xochicoatlán, Hidalgo; CNCR 19877. Three ♀♀ and 1 ♂ Form I, 4 November 2002; Arroyo de Atezca, Hidalgo; CCR-UAMX 999. Two ♂♂ Form I and 1 ♀; 5 November 2002; Xochicoatlán, Hidalgo; CCR-UAMX 1000. Collectors of paratypes the same as those of holotype.

Diagnosis. — Body pigmented. Eyes well developed. Rostrum reaching first third of third antennular article, representing 15.2 to 20% (\bar{x} = 17.4%) of carapace length, without marginal spines. Areola 4.9 to 6.9 (\bar{x} = 5.7) times as long as wide, 32.2 to 42.2% (\bar{x} = 34.9%) of carapace length, 16.8% to 20.1% (\bar{x} = 18.6%) of postorbital length, with 1 to 3 punctuations across narrowest part. Without cervical spines, single branchiostegal spines present (fig. 1A, B). Antennal scale 1.7 to 2.3 (\bar{x} = 1.9) times longer than wide, with deep longitudinal groove

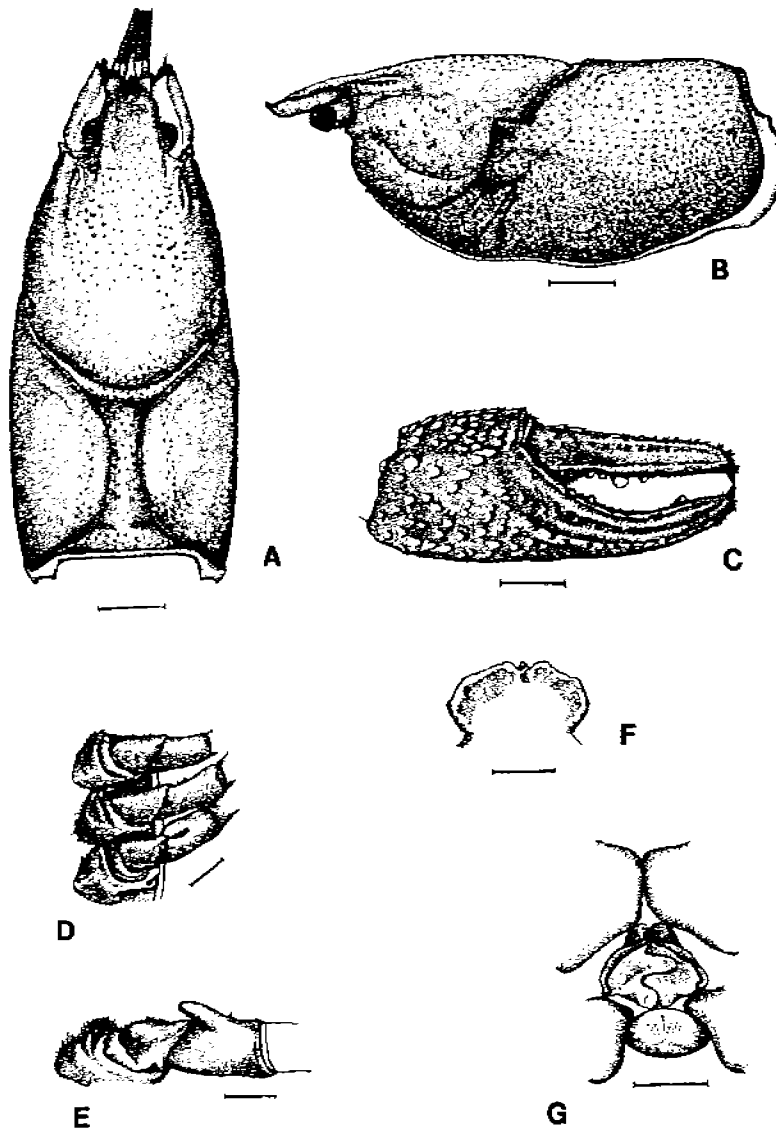


Fig. 1. *Procambarus (Villalobosus) achilli* new species A, dorsal view of carapace; B, dorsal view of carapace; C, dorsal view of cheliped; D, basal podomeres of second through fourth pereopods; E, hook of third pereopod; F, cephalic lobule of the epistome; G, annulus ventralis and adjacent sternites; (figures all from holotype, except F, which is taken from allotype). Scale bars, A-C = 4 mm, D, E, and G = 2 mm, F = 1 mm.

running throughout its whole length (fig. 2E). Chelipeds shorter than total body length, mesial surface of palm of chela with irregular row of tubercles; lateral surface of chela covered with small, regularly distributed tufts of short setae, fingers longer than palm; both fingers with three longitudinal ridges on ventral

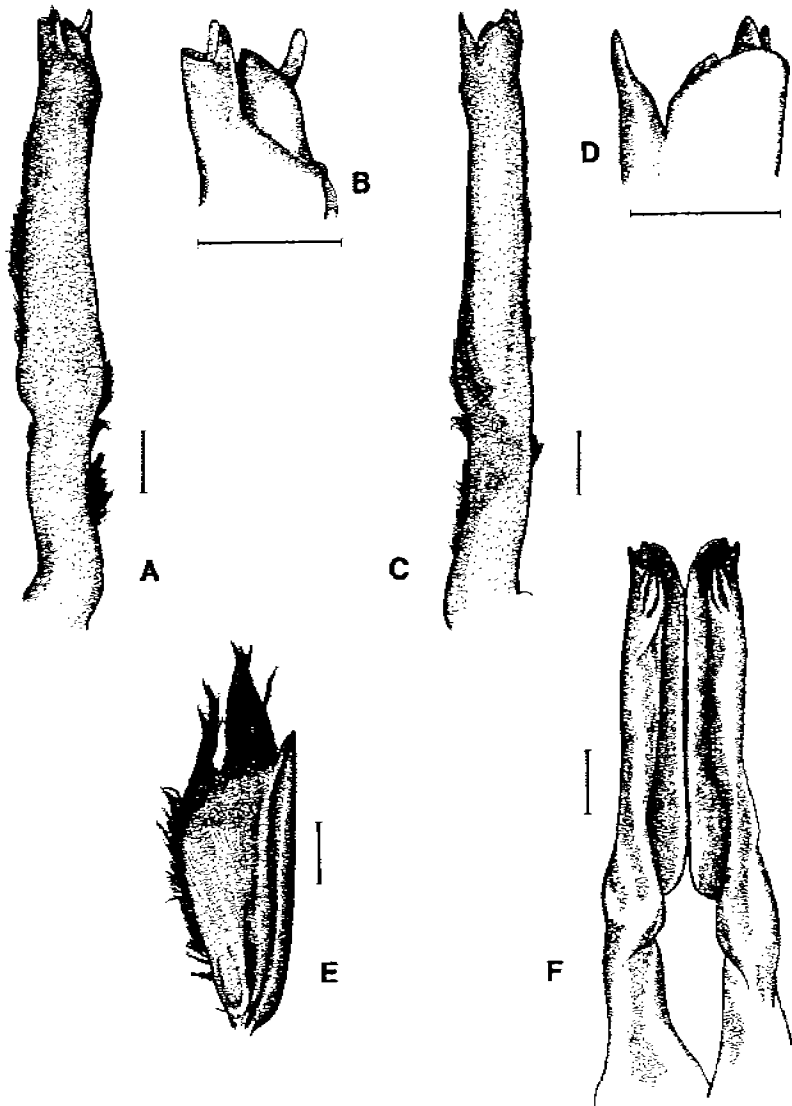


Fig. 2. *Procambarus (Vitalobosus) achilli* new species, holotype. A, lateral view of first pleopod of male; B, detail of apex; C, mesial view of first pleopod of male; D, detail of apex; E, antennal scale; F, caudal view of first pleopods. Scale bars: A-F = 1 mm.

and dorsal surfaces (fig. 1C). Ischium of third pereiopod without hook, ischium of fourth pereiopod with strong hook overreaching basi-ischial articulation, devoid of tubercle on basis (fig. 1D, E). Epistome roughly symmetrical with regular margins, cephalic portion with short extension, bearing setae (fig. 1F). First pleopods of male Form I asymmetrical, reaching coxa of second pereiopod, with setae on central and proximal portions. Mesial process slightly flattened, shorter

TABLE I
Measurements (in mm) of the type specimens of *Procambarus (Villalobosus) achilli* new species

	Holotype male, Form I	Morphotype male, Form II	Allotype female
Total length	57.1	60	74.3
Carapace			
Total length	28.4	30.1	36.9
Postorbital length	23.4	25.6	31.5
Areola			
Length	10.1	11.0	13.5
Width	3	2.4	2.5
Rostrum			
Length	5.2	4.7	6.2
Anterior width	3.1	2.8	3.5
Posterior width	4.9	4.1	5.7
Acumen length	1.2	1.4	1.6
Cheliped			
Length of mesial margin of palm	11.2	13.2	13.7
Width of palm	9.3	10	11.2
Length of dactyl	13.2	15.9	17.1
Abdomen			
Width	11.7	12.1	16.4
Length	21.4	21.1	27.1

than terminal elements, directed anteriorly; central projection triangular, divided into two processes, first one corneous, longer than terminal elements, directed caudocephalically, free, separated from caudal and cephalic processes; rostral process spiniform, directed distally, originating on caudal process; caudal process a slightly curved plate (fig. 2A-D, F). Annulus ventralis with divided preannular plate, covered with short setae along posterior margin; annulus semicircular with convergent anterior margins, forming prominent walls; groove originating in middle portion of convex area, with deep section ending in posterior middle region; postannular plate pyramidal, apical surface convex, not in contact with annulus (fig. 1G).

Measurements. — See table I.

Holotype male, Form I. — Body pigmented. Abdomen narrower than thorax (11.7 vs. 13.5 mm). Carapace width smaller than height at cervical groove.

Areola approximately 5.7 times longer than wide, with 3 punctuations across narrowest part. Cephalic section of carapace 1.8 times as long as areola, and 1.3 times longer than wide, constituting 65.1% of carapace length and 35.5% of postorbital length.

Rostrum slightly excavated dorsally with punctations and scattered setae, without marginal spines, convergent margins, acumen reaching first third of third antennular article, tip oriented upwards, shorter than antennal scale (fig. 1A).

Carapace with single branchiostegal spine directed anteriorly, without cervical spines (fig. 1B).

Epistome roughly symmetrical with regular margins, cephalic portion bearing short extension, covered with setae, overreaching distal margin of epistome (fig. 1F).

Antennule with prominent ventral spine on basal podomere; antenna shorter than total body length. Antennal scale 1.8 times longer than wide, lateral margin ending in acute spine, maximum width at second half of total length (fig. 2E).

Third maxilliped surpassing distal border of third article of antennular peduncle; internal margin of ischium with array of 21 irregular spines; all segments of third maxilliped with small tufts of short setae.

Chelae shorter than carapace. Both chelae robust, ovate, 2.4 times longer than wide, with blunt tubercles, each tubercle bearing tufts of setae anteriorly. Palm 1.2 times longer than wide, surface covered with tubercles, forming irregular row along mesial surface. Movable finger with subsquamate tubercles along dorsal margin. Opposable margins of fingers with scattered setae, margin of movable finger with 7 larger tubercles, fixed finger with 8 teeth and distal anterior spine (fig. 1C).

Carpus of cheliped short, approximately conical, longitudinal groove on dorsal surface dividing area with small and blunt tubercles from area with subsquamate tubercles; ventral surface with small subsquamate tubercles and single distal spine, distal margin with sharp spine on internal surface.

Merus of cheliped tuberculate; dorsal surface with row of small tubercles, bearing large, subdistal spine on dorsal surface; ventral surface with two longitudinal rows of sharp tubercles, distal margin with strong spine.

Ischium with dorsal and ventral surfaces not tuberculate, row of five small, blunt tubercles along ventromesial margin, slightly increasing in size distally.

Ischium of fourth pereopod with acute hook extending beyond articulation with basis, scattered setae surrounding its base; coxa with prominent acute protuberance on caudomesial ventral angle.

First pair of pleopods as described in Diagnosis, above.

First four somites of abdomen with two transverse lines of tufts of short setae.

Uropods with protopodite bearing short outer spines and large inner spine; endopodite with dorsal median ridge ending posteriorly in small spine and well developed distolateral spines.

Telson covered with tufts of short setae dorsally, forming longitudinal rows; cephalic portion with 3 spines of different length in right posterolateral angle, middle spine movable, lateral spines fixed; left side with four spines, second spine

movable, outer spine largest; tufts of short setae forming longitudinal rows on posterior plate.

Allotype female. — Similar to holotype, differing in the following characters. Areola approximately 5.8 times longer than wide. Antennal scale 2 times as long as wide. Thirteen teeth on opposable margin of movable finger and 13 teeth and one spine on fixed finger. Left side of anterior portion of telson with four spines, similar to holotype, but third spine movable; right side with three fixed spines. Annulus ventralis as described in Diagnosis.

Paratype male, Form II. — Differing from holotype in the following characters. First pleopod with central process poorly developed; mesial process conical and robust, not as elongated as in holotype; caudal process plate-like, slightly curved; cephalic process thick, apex blunt. Areola approximately 6 times longer than wide. Antennal scale 2 times longer than wide. Distinctive tubercles on surface of palm. Ischium of third pereopod with reduced border, coxa bearing small crest. Ischium of fourth pereopod armed with hook not surpassing basi-ischial articulation, with short setae on distoventral margin, and basal groove. Dorsal surface of rostrum more concave than in holotype, tip almost surpassing distal border of second article of antennular peduncle and shorter than antennal scale. Posterior plate of telson with acute spine just below distal border of anterior portion.

Distribution and ecological aspects. — *Procambarus (Villalobosus) achilli* was collected in Atezca, Municipio de Molango, where water temperature was 19.4°C; however, considering nearby sites within the same drainage basin where the new species was found, the range of temperatures was 17.6 to 26.1°C (\bar{x} = 19.3°). Water temperature at all sites where the new species was found showed considerable variation: Xochicoatlán 17 to 20°C (\bar{x} = 17.8°), Chalma 19.9 to 26.1°C (\bar{x} = 21.1°), and Calnali 20 to 22°C. Although all sites are located within a 20 km radius from the type locality, only Calnali is part of the Claro River sub-basin, while the rest are part of the Atlapexco River sub-basin, both tributaries of the Pánuco river (López-Mejía, 2001).

Etymology. — The specific epithet *achilli* is taken from the nahuatl “Achilli” (“*atl*” water, “*chilli*” hot pepper), “chile de agua” in Spanish, from which “achil” or “achiles” are derived, common names with which the crayfishes are known by the local people from northern Hidalgo, Mexico. The name thus is a noun in apposition to the generic name.

Remarks. — *Procambarus (Villalobosus) achilli*, new species, can be placed in the *erichsoni* group and is morphologically similar to *Procambarus (Villalobosus) contrerasi* Creaser, 1931, and *Procambarus (Villalobosus) erichsoni* Villalobos,

1950. It may be distinguished by a rostrum reaching the first third of the third antennular article, while in *P. contrerasi* and *P. erichsoni* the rostrum extends only to the second antennular article. In *P. achilli* the antennal scale reaches the distal border of the third antennular article, while in *P. erichsoni* it reaches the distal half of the third antennular article, and in *P. contrerasi* it possesses a strong spine. The epistome in the new species is heptagonal with setae on the anterior portion, in *P. contrerasi* and *P. erichsoni* the epistome is regular and irregular, respectively, without setae. *Procambarus contrerasi* and *P. erichsoni* also have a poorly developed tubercle on the ischium of the third pair of pereopods, the males of *P. achilli* have a strong hook only on the ischium of the fourth pair of pereopods. In the new species, the mesial process is flattened, shorter than the terminal elements, and anteriorly directed, such in contrast to *P. contrerasi* and *P. erichsoni*, in which the mesial processes are spiniform and conical, respectively. The central projection in *P. achilli* is triangular, divided into two processes, the first one corneous, larger than the terminal elements, directed caudocephalically, and independent from the caudal and cephalic processes. In *P. contrerasi* and *P. erichsoni* the cephalic process is partially fused to the caudal process; the cephalic process in *P. achilli* is spiniform, directed distally, emerging from the caudal process, while in *P. contrerasi* it is situated in the mesial region close to the caudal process and in *P. erichsoni* it is inserted at the base of the central projection. The females of *P. achilli* have an annulus ventralis with a divided preannular plate, covered with short setae along the posterior margin. Setae are absent in related species, and in *P. contrerasi* the plates cover the annulus almost completely. The annulus is semicircular with anterior margins convergent and divided, forming prominent walls, and with a deep, sinuous median groove running along the median section. In *P. contrerasi* it is asymmetrical and the groove is not evident, and in *P. erichsoni* it is a regular structure without prominent walls and a U-shaped groove.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the Ph.D. dissertation of the first author at the Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. She thanks the support received from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-165911). We wish to thank Biól. M. Nava-Bautista and the students of the undergraduate Biology Programme at UAM-X for their assistance in the field work. Thanks are given to R. Duarte for lending some measurement instruments, and to Rolando Mendoza for producing the drawings.

LITERATURE CITED

- CREASER, E. P., 1931. Three new crayfishes (*Cambarus*) from Puebla and Missouri. Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan, 224: 1-10.
- HOBBS, H. H., JR., 1972. The subgenera of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Astacidae). Smithsonian Contributions to Zoology, 117: 1-22.
- , 1974. A checklist of the North and Middle American crayfishes (Decapoda: Astacidae and Cambaridae). Smithsonian Contributions to Zoology, 166: 1-161.
- , 1984. On the distribution of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Cambaridae). Journal of Crustacean Biology, 4 (1): 12-24.
- LÓPEZ-MEJÍA, M., 2001. Nuevos registros de distribución de las especies del subgénero *Villalobosus* — Hobbs, 1972 (Cambaridae: *Procambarus*) en los límites de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz: 1-32. (Informe Final de Servicio Social (M.Sc. Thesis), Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico).
- ORTMANN, A. E., 1905. *Procambarus*, a new subgenus of the genus *Cambarus*. Annals Carnegie Museum, 3 (3): 435-442.
- VILLALOBOS, A., 1950. Contribución al estudio de los cambarinos mexicanos, IX: Estudio taxonómico de un grupo de especies del género *Procambarus*. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 21 (2): 367-413.
- , 1955. Cambarinos de la fauna mexicana (Crustacea: Decapoda): 1-290. (Ph.D. Thesis, Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico).

First received 15 July 2002.

Final version accepted 25 February 2003.

PROC. BIO. SOC. WASH.
Monday Mar 22 2004 08:29 PM
Allen Press

PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON
117(1):92–98, 2004.

**A new species of *Procambarus* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae)
from Veracruz, Mexico**

Marilú López-Mejía, Fernando Alvarez and Luis M. Mejía-Ortiz

(MLM & LMMO) Universidad Autónoma Metropolitana—Xochimilco (UAM-X),
Departamento El Hombre y su Ambiente, Laboratorio de Fisiología y Comportamiento Animal,
Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, C.P. 04960, México D.F., México,
e-mail: lmejiam@cueyaft.uam.mx

(FA) Colección Nacional de Crustáceos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma
de México, Apartado Postal 70-153, México 04510, D.F., México

Abstract.—*Procambarus (Villalobosus) chacalli* is a new species of crayfish from ponds at Manantial de Dejigui, Huayacocotla County, Veracruz, Mexico. It can be placed in the Erichsoni Group of the subgenus because the gonopod (first pleopod) of the first form male has a flared, broadly curved caudal process. Within the Group it is most similar to *P. (V.) erichsoni* Villalobos and *P. (V.) contrerasi* (Creaser). It can be distinguished from these and other members of the subgenus by a combination of gonopod characters that includes a short mesial process with a slightly flattened, caudodistally directed tip; a cephalic process that originates on the caudal process and is longer than the other terminal elements, and a platelike caudal process with a strong fold on the caudolateral surface. Another distinctive character is the subovate annulus ventralis, with two stronger ventral crests that form a deep submedian depression, and a sinus that extends to the caudomedian margin.

The subgenus *Villalobosus* Hobbs, 1972, of the genus *Procambarus* Ortmann, 1905, as defined by Hobbs (1972), includes 10 species with the following characters: presence of hooks on the fourth pereopods, and rarely vestigial hooks on the third pereopods, of males; and asymmetrical gonopods that reach the coxae of the second pereopods, with a tuberculiform or acute central projection. No new species has been described in this subgenus since Hobbs (1982) described *Procambarus (Villalobosus) cuetzalanae* Hobbs, 1982, from a series of springs, caves and deep holes in the environs of Cuetzalan, Puebla.

The species of *P. (Villalobosus)* inhabit the southern portion of the Huasteca region, within the states of Hidalgo, Puebla and Veracruz. This is a very mountainous region, with a number of narrow valleys and can-

yons that play an important role in isolating crayfish populations (López-Mejía 2001). The members of this subgenus have been found in rivers, small streams, impoundments, and springs, and in subterranean environments as stygophiles (Villalobos 1955; Hobbs 1975, 1982, 1984). The new species described herein has been found only in three ponds at the type locality, Manantial de Dejigui.

The specimens studied are deposited in the Colección Nacional de Crustáceos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (CNCR), and in the Colección de Crustáceos de Referencia, Universidad Autónoma Metropolitana—Unidad Xochimilco (CCR-UAMX). Other abbreviation used is: TCL, total carapace length.

PROC. BIO. SOC. WASH.
Monday Mar 22 2004 08:29 PM
Allen Press

VOLUME 117, NUMBER 1

93

Procambarus (Villalobosus) chacalli,
new species
Figs. 1, 2

Diagnosis.—Body pigmented, eyes normally developed, facets well defined. Rostrum reaching distal border of third antennular article, length 15.8 to 20.8% ($x = 17.9\%$, $n = 26$) of TCL, without marginal spines (Fig. 1A). Areola 4.9 to 7.2 ($x = 5.9$, $n = 26$) times as long as wide, length 32.3 to 38.6% ($x = 35.1\%$, $n = 26$) of TCL, 39.7 to 46.1% ($x = 42.8\%$, $n = 26$) of postorbital carapace length, with 2 or 3 punctations across the narrowest part. Cervical and infraorbital spines absent, branchiostegal spine present. Antennal scale 1.8 to 2.3 ($x = 2.1$, $n = 26$) times longer than wide, with longitudinal groove throughout whole length, groove shallow anteriorly, becoming deeper posteriorly. Chelipeds shorter than total body length; mesial surface of palm of chela with 7 tubercles in irregular row, based on holotypic male form I; all tubercles with small tufts of short setae anteriorly; fingers as long as palm, both fingers with 3 longitudinal ridges along ventral and dorsal surfaces (Fig. 1C). Ischium of fourth pereopod with hook extending beyond basiischial articulation (Figs. 1D–E), ischium of third pereopod with vestigial hook. Cephalic lobe of epistome approximately hexagonal, with margins undulating slightly, irregular and asymmetrical anteriorly; lateral angles well defined, devoid of setae (Fig. 1F).

First pleopods of form I male asymmetrical, reaching coxae of second pereopods, with 2 rows of scattered setae running throughout whole length, setae more abundant and longer proximally. Mesial process short, slightly truncated distally, directed distolaterally; central projection triangular, divided into 2 sections, caudocephalically oriented; cephalic process spiniform, directed distocephalically, longer than rest of terminal elements, originating on caudal process; caudal process in cephalic position plate-like, corneous, wrapping around cen-

tral projection, with strong fold on caudolateral margin (Figs. 2A–D, F–G). Preannular plate of female with 2 strong lateral crests extending laterally and surrounding annulus ventralis, with scattered short setae on posterior portion of plate (Fig. 1G). Preannular plate and annulus in loose contact. Annulus approximately circular, with 2 strong crests anteriorly, forming deep, V-shaped depression; posterior half of dextral crest curved laterally, becoming less defined; sinistral crest curving laterally to form tongue-like expansion; rectangular projection on medial posterior section, forming margin of sinus. In ventral view, postannular plate ovoid, in caudal view approximately conical; apical surface bearing small punctations with short setae; plate not in contact with annulus. First pleopods present in females.

Measurements of types.—Provided in Table 1.

Holotypic male, form I.—Body and eyes pigmented. Cephalothorax becoming thicker posterior to cervical groove, maximum width at posterior margin, 0.97 times length of abdomen. Areola 6.2 times as long as wide, 32.3% of TCL, with 3 punctations across narrowest part, with slight median crest; branchiocardiac grooves well defined. Surface of carapace densely punctate, punctations increasing in density laterally. Rostrum excavated dorsally, margins convergent, without spines; anterior width 2.9 mm, posterior width 3.8 mm. Acumen reaching distal border of third article of antennular peduncle, slightly shorter than antennal scale, tip oriented dorsally, length of acumen 28.2% of rostrum length, ventral keel without spines. Postorbital ridge straight, moderately strong, with very small cephalic tubercle. Suborbital angle acute, branchiostegal spine present on both sides of carapace, directed anteriorly. Cervical groove describing acute angle over hepatic region, cervical spine absent (Fig. 1B).

Abdomen slightly longer than carapace. Surface of somites covered with regularly distributed punctations. Uropods with pro-

PROC. BIO. SOC. WASH.
Monday Mar 22 2004 08:29 PM
Allen Press

94

PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON

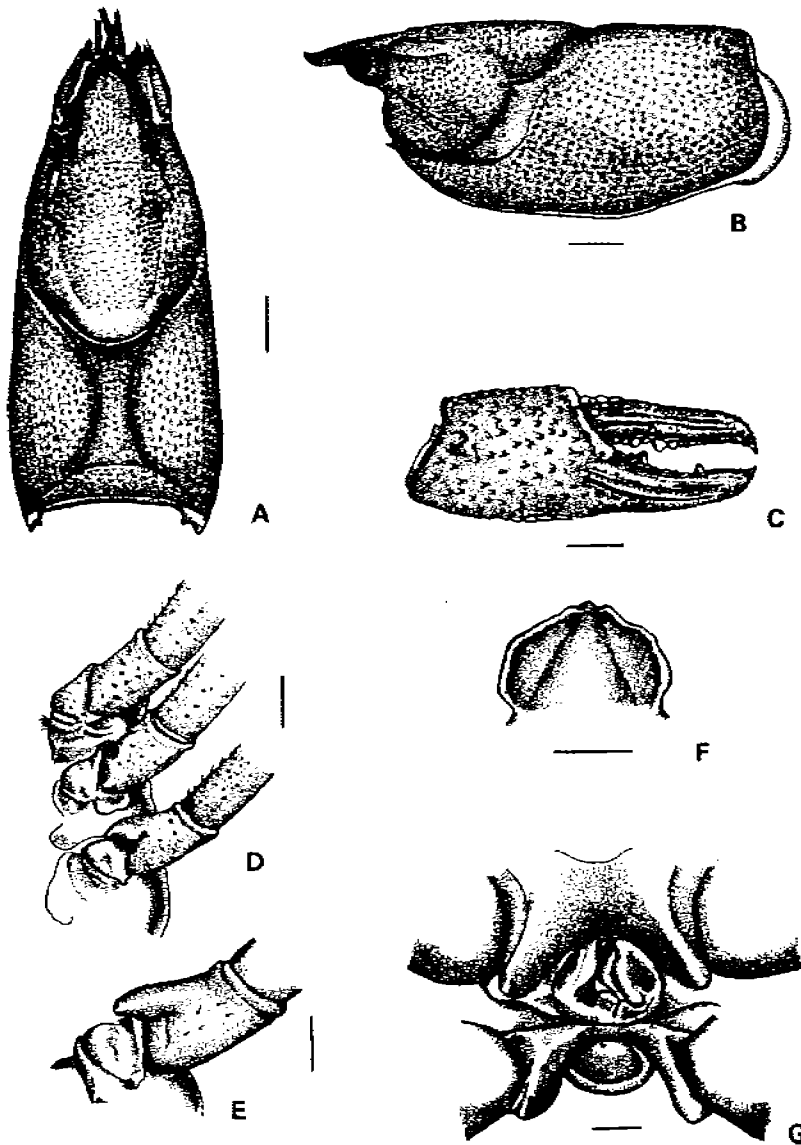


Fig. 1. *Procambarus (Villalobosus) chacali*, new species, all from holotypic male, form I, except G from allotypic female. A, carapace, dorsal view; B, carapace, lateral view; C, distal podomeres of right cheliped; D, basal podomeres of left second, third and fourth pereopods; E, detail of basis and ischium of left fourth pereopod; F, epistome, cephalic lobe; G, annulus ventralis. Scale bars represent 3 mm (A, B, C), 2 mm (D, E), and 1 mm (F, G).

PROC. BIO. SOC. WASH.
Monday Mar 22 2004 08:29 PM
Allen Press

VOLUME 117, NUMBER 1

95

Table 1.—Measurements (mm) of type specimens of *Procambarus chacalli*, new species.

	Holotypic male, form I	Allotypic female	Morphotypic male, form II
Total length	51.2	55.5	48.7
Carapace			
Total length	24.1	26.9	23.6
Postorbital length	19.6	22.6	19.3
Width	11	12	10.2
Height	10	12.1	9.3
Areola			
Length	7.8	10.4	8.6
Width	1.2	1.7	1.7
Rostrum			
Length	4.5	4.25	4.2
Width	3.8	4.2	4.8
Antennal scale			
Length	3.9	4.1	3.5
Width	2.1	2.4	2.2
Cheliped			
Length of mesial margin of palm	10.5	9.5	10.5
Width of palm	7.5	7.1	7.1
Length of lateral margin of propodus	18.9	18.2	19
Length of dactyle	10.2	9.5	10.1
Length of carpus	6.8	6.6	7.3
Length of merus	10.7	10.7	10.3
Abdomen			
Length	27.1	28.6	25.1
Width	10.4	11.3	9.8

topodite bearing short spines; endopodite with dorsal median ridge ending posteriorly in small spine, and well developed distolateral spine. Telson covered with tufts of short setae, loosely forming 4 longitudinal rows; cephalic portion with 4 spines on posterolateral angle, two lateral ones larger, second one articulated.

Cephalic lobe of epistome irregular, without cephalomedian extension; distal half asymmetrical, with central depression. Antennule with prominent ventral spine on basal podomere, with setae on its base; antenna shorter than total body length. Antennal scale 1.8 times longer than wide, lateral margin ending in acute spine, maximum width at distal half (Fig. 2E). Third maxilliped reaching distal border of third article of antennal peduncle; internal margin of ischium with array of 26 irregular spines; all

segments of third maxilliped with small tufts of short setae.

Chelae 1.2 times shorter than TCL, robust, ovate, 2.5 times longer than wide. Palm 1.4 times longer than wide, surface covered with small, blunt tubercles each with small tuft of setae; irregular row of tubercles along mesial surface. Movable finger with subsquamate tubercles anteriorly. Opposable margins of fingers with small tufts of setae; opposable surface of movable finger with 10 tubercles, that of fixed finger with 7 tubercles, third from base largest; both fingers ending in corneous tip.

Carpus of cheliped short, approximately conical, dorsal surface with scattered tubercles; lateral and ventral surfaces with small subsquamate tubercles, with tufts of short setae, distal margin with blunt spine on in-

PROC. BIO. SOC. WASH.
Monday Mar 22 2004 08:29 PM
Allen Pres

96

PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON

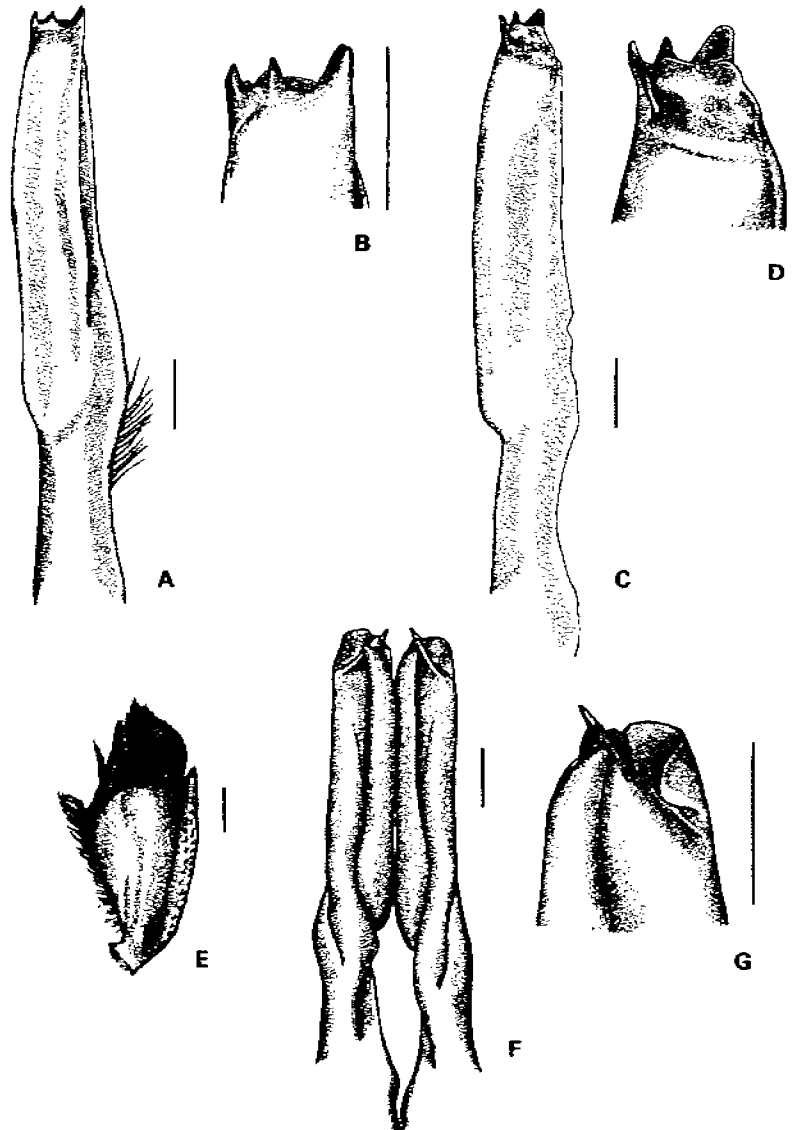


Fig. 2. *Procambarus (Vilatobosus) chacali*, new species, all from holotypic male, form I, except H from morphotypic male, form II. A, left gonopod, mesal view; B, detail of apex of left gonopod, mesal view; C, left gonopod, lateral view; D, detail of apex of left gonopod, lateral view; E, anal scale; F, caudal view of gonopods; G, detail of apex of left gonopod, caudal view; H, caudal view of gonopods. Scale bars represent 1 mm.

PROC. BIO. SOC. WASH.
Monday Mar 22 2004 08:29 PM
Allen Press

VOLUME 117, NUMBER 1

97

teral surface. Merus slightly tuberculate; dorsal surface with large, strong, subdistal tubercle, and other smaller tubercles; ventral surface with 2 longitudinal rows of blunt tubercles, distal margin with strong tubercle. Ischium with dorsal and ventral surfaces punctate, and row of 6 blunt tubercles along ventromesial margin, increasing in size distally.

Ischium of third pereopod with vestigial hook, left and right sides different in size. Ischium of fourth pereopod with strong, thick, cylindrical hook, extending beyond basioischial articulation, reaching mid-length of basis. Coxa of fourth pereopod with prominent acute boss on caudomesial ventral angle.

Gonopods as described in Diagnosis.

Allotypic female.—Similar to holotype, differing in following characters: telson bearing 2 movable spines on left caudolateral angle of cephalic portion and 1 on right side. Areola 6.2 times as long as wide. Antennal scale 1.8 times longer than wide. Eight tubercles on opposable margin of movable finger. Rostrum reaching first third of third article of antennular peduncle. Cephalic lobe of epistome asymmetrical as in holotype, distal border with small variations with respect to holotype. Annulus ventralis as described in Diagnosis.

Morphotypic male, form II.—Differing from holotype in following characters: first pleopod with apical elements poorly developed, cephalic process conical and reduced, central projection small, caudal process surrounding central projection, mesial process undefined. Areola 4.9 times as long as wide. Antennal scale 1.6 times longer than wide. Chelae with irregular row of four tubercles on surface of palm. Protuberance on ischium of third pereopod extremely reduced. Ischium of fourth pereopod with small hook, not surpassing basioischial articulation. Rostrum shorter, acumen reaching middle part of third podomere of antennular peduncle.

Type locality.—Nacimiento de Dejigui (altitude 1675 m), 4 km east of Huayaco-

cotla, Municipio de Huayacocotla, Veracruz, Mexico (20°32'6"N, 98°26'15"W).

Disposition of types.—Holotypic ♂ form I, CNCR 20529; allotypic ♀, CNCR 20530; and morphotypic ♂ form II, CNCR 20531. Paratypes: 2 ♂ I, 2 ♂ II, 8 ♀, CNCR 20532; 5 ♂ II, 6 ♀ CCR-UAMX 1001.

Material examined.—All from type locality: 1 ♂ form I (CNCR 20529), 14 Nov 1999, coll. M. López-Mejía, L. M. Mejía-Ortiz; 1 ♀ (CNCR 20530), same date and coll. as holotype; 1 ♂ form II (CNCR 20531), 2 ♂ form I, 2 ♂ form II, 8 ♀ (CNCR 20532), 5 ♂ form II, 6 ♀ (CCR-UAMX 1001), 2 Nov 2001, coll. M. López-Mejía, L. M. Mejía-Ortiz, M. Signoret, J. A. Viccon-Pale, J. Cruz-Hernández, H. Solís.

Etymology.—The specific epithet "*chacalli*" is taken from the nahuatl word "*chacalli*", common name used for the crayfishes in northern Hidalgo, Mexico.

Remarks.—*Procambarus (Villalobosus) chacalli*, new species, can be placed in the Erichsoni Group due to the presence of a platelike caudal process on the male gonopod (Villalobos 1955). The new species is morphologically similar to *Procambarus (Villalobosus) contrerasi* (Creaser, 1931), and *Procambarus (Villalobosus) erichsoni* Villalobos, 1950, from which it may be distinguished by the following characters: a longer rostrum, with tip reaching the distal border of the third antennular article; a wider areola with a slight median crest; and an epistome bearing a cephalic lobe with an undulated surface. Regarding the gonopod morphology of the form I male, *P. chacalli* exhibits the following unique characters: a short and slightly truncated mesial process, directed distolaterally; a cephalic process which is the largest of the terminal elements, originating on the caudal process; and a platelike caudal process with a strong fold on the margin. In *P. erichsoni* and *P. contrerasi* the rostrum reaches the distal part of the second antennular article, the areola is narrower, and the surface of the epistome is smooth; their gonopods bear

PROC. BIO. SOC. WASH.
Monday Mar 22 2004 08:29 PM
Allen Press

98

PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON

shorter cephalic processes, that originate between the central projection and the mesial process, and the caudal process is slightly folded. The amulus ventralis of *P. chacalli* differs from those of *P. erichsoni* and *P. contrerasi* in the extension of the lateral projections of the preannular plate, the shape of the crests and sinus in the annulus, and the size and shape of the postannular plate.

Procambarus (Villalobosus) chacalli has been collected only at the type locality, where specimens were captured in three small, shallow ponds next to the spring. The largest pond was 8 m², and the deepest one was 0.4 m. The recorded water temperatures ranged from 18.9 to 20.4°C.

Acknowledgments

Our thanks to J. Cruz-Hernández, M. Signoret, H. Solís and J. A. Viccon-Pale for their help during field work, and to Rolando Mendoza for producing the drawings. We are also grateful to Drs. J. E. Cooper, R. Lemaitre and two anonymous reviewers, for their suggestions.

Literature Cited

- Creaser, E. P. 1931. Three new crayfishes (*Cambarus*) from Puebla and Missouri.—Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan, 224:1–10, plates I–V.
- Hobbs, H. H., Jr. 1972. The subgenera of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Astacidae).—Smithsonian Contributions to Zoology 117:1–22.
- . 1975. New crayfishes (Decapoda: Cambaridae) from the southern United States and Mexico.—Smithsonian Contributions to Zoology 201:1–34.
- . 1982. A new crayfish (Decapoda: Cambaridae) from the state of Puebla, Mexico, with new locality records for *Procambarus (Villalobosus) xochitlanae* and encyberid ostracod symbionts.—Association for Mexican Cave Studies Bulletin (8):39–44.
- . 1984. On the distribution of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Cambaridae).—Journal of Crustacean Biology 4(1):12–24.
- López-Mejía, M. 2001. Nuevos registros de distribución de las especies del subgénero *Villalobosus*—Hobbs, 1972 (Cambaridae: *Procambarus*) en los límites de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz. Informe Final de Servicio Social (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México, D.F. 32 p. [Unpublished thesis].
- Ostruman, A. E. 1905. *Procambarus*, a new subgenus of the genus *Cambarus*.—Annals of the Carnegie Museum 3(3):435–442.
- Villalobos, A. 1950. Contribución al estudio de los camarinos mexicanos, IX: estudio taxonómico de un grupo de especies del género *Procambarus*.—Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 21(2): 367–413.
- . 1955. Camarinos de la fauna mexicana (Crustacea: Decapoda). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F., 290 p.

PROC. BIO. SOC. WASH
Wednesday Jul 06 2005 08:18 AM
Allen Press

PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON
118(3):558–565, 2005.

Procambarus (Ortmannicus) hidalgoensis (Crustacea: Decapoda:
Cambaridae), a new species of crayfish from Mexico

Marilú López-Mejía, Fernando Alvarez and Luis M. Mejía-Ortíz

(MLM, FA) Colección Nacional de Crustáceos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153, México 04510, D.F., México, e-mail: mlm@ibiologia.unam.mx; falvarez@servidor.unam.mx;
(LMMO) Universidad de Quintana Roo, División de Desarrollo Sustentable, Unidad Cozumel, Av. Andrés Quintana Roo s/n, frente a la Col. San Gervasio, Cozumel 77640, Quintana Roo, México, e-mail: luismejia@correo.uqroo.mx

Abstract.—A new species of crayfish from Camino a Olotla, Tlanchinol County, Hidalgo, Mexico, is described. *Procambarus (Ortmannicus) hidalgoensis* is most closely related to *P. (O.) cuevachicae* (Hobbs, 1941) and *P. (O.) tolteca* Hobbs, 1943, from which it can be distinguished by having a gonopod with a mesial process slightly flattened distally and directed caudo-distally; a cephalic process slightly larger than the rest of the terminal elements, originating on the caudal surface; and a plate-like caudal process, exhibiting a strongly folded external part of the pleopod. The annulus ventralis in the new species is rhomboidal, with two strong crests, forming a deep V-shaped depression anteriorly, ending in a sinus in the middle region.

The species of the procambarid crayfish subgenus *Ortmannicus* Fowler, 1912, are distributed in the southern United States and central Mexico. In Mexico, six species of the subgenus have been recorded: *Procambarus cuevachicae* (Hobbs, 1941), *P. tolteca* Hobbs, 1943, *P. gonopodocristatus* Villalobos, 1958, *P. caballeroi* Villalobos, 1944a, *P. villalobosi* Hobbs, 1969, and *P. xilitlax* Hobbs and Grubbs, 1982. These species inhabit rivers, streams, and caves, with very diverse abiotic conditions. Their distribution in the central portion of the Sierra Madre Oriental comprises localities in a wide range of altitudes (155–1600 m) (Fig. 1). In this paper, we describe a new species, *Procambarus (Ortmannicus) hidalgoensis*, which has been found only in the type locality in Camino a Olotla, Tlanchinol County, Hidalgo, whose streams are tributaries of the Pánuco River. The specimens described herein come from a previous study on the distribution of the subgenus *Villalobosus* Hobbs, 1972 (López-Mejía 2001).

Fifteen crayfish specimens were captured by hand using traps baited with chicken, from clear water stream ponds with an average depth of 40 cm. All specimens were preserved in 70% alcohol and deposited in the Colección Nacional de Crustáceos (CNCR), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. The abbreviations used are: TL, total length; TCL, total carapace length; and POCL, postorbital carapace length.

Procambarus (Ortmannicus)
hidalgoensis, new species
Figs. 2, 3

Disposition of types.—Holotypic male form I: TL 57.3 mm, TCL 27.9 mm; 14 October 2000; Camino a Olotla stream 2 km east from Tlanchinol, Tlanchinol County, Hidalgo; colls. L. M. Mejía-Ortíz and M. López-Mejía; CNCR 22509. Allotypic female: TL 65.0 mm, TCL 32.9 mm; same date, locality, and collectors as holotype; CNCR 22510. Morphotypic male form II:

PROC. BIO. SOC. WASH.
 Wednesday Jul 06 2005 08:18 AM
 Allen Press

VOLUME 118, NUMBER 3

559

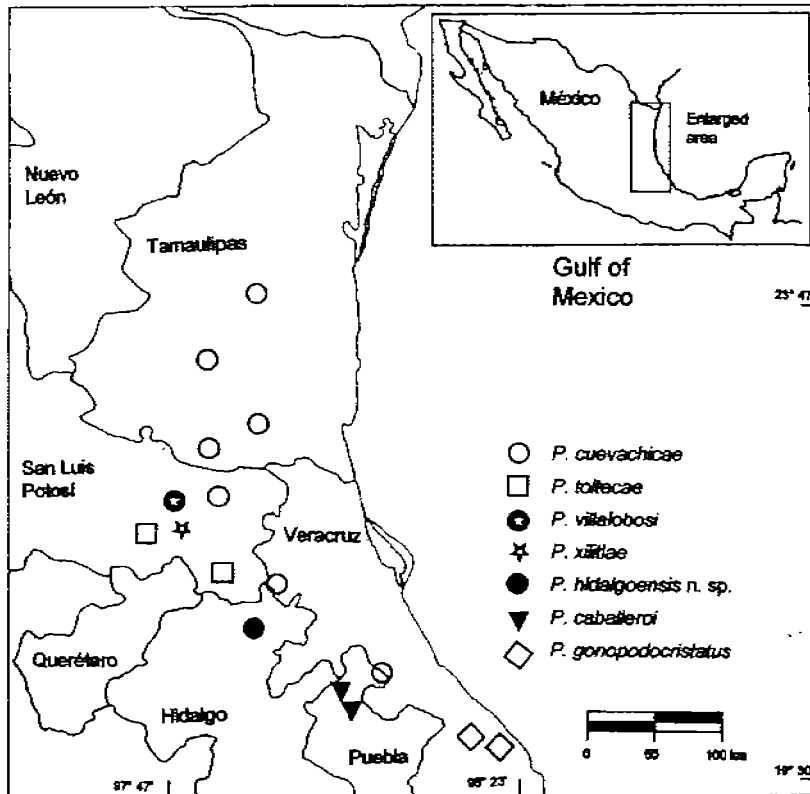


Fig. 1. Map showing the distribution of the species of the subgenus *Orizomatius* in Mexico.

TL 45.5 mm, TCL 20.8 mm; 14 November 1999; same locality as holotype; coll. M. López-Mejía; CNCR 22511.

Paratypes.—Eight females, 2 males form I, 2 males form II; 2 November 2001; same locality as holotype; colls. M. López-Mejía, L. M. Mejía-Ortiz & M. Nava; CNCR 22512.

Type locality.—The new species was collected in a stream at Carrino a Ootla, at 1375 m of altitude (20°38'15"N, 98°38'3"W), 2 km east of Tlanchinol, Hidalgo; the stream is a tributary of the Pánuco River.

Diagnosis.—Body pigmented, dark brown to dark green. Eyes normally developed, facets well defined. Rostrum reaching middle portion of third antennular article, 18.2 to 22.7% (\bar{x} = 19.8%) of TCL, without marginal spines (Fig. 2A). Areola 5.1 to 9 times (\bar{x} = 7.07) as long as wide, 29.7 to 35.4% (\bar{x} = 33.83%) of TCL, 36.4% to 44.7% (\bar{x} = 42.01%) of postorbital length, with 2 or 3 punctations across narrowest part. Cervical spine absent, with single branchiostegal spine (Fig. 2B). Antennal scale 1.4 to 2.6 (\bar{x} = 1.8) times longer than wide, with weakly marked longitudinal

PROC. BIO. SOC. WASH.
 Wednesday Jul 06 2005 08:18 AM
 Allen Press

560

PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON

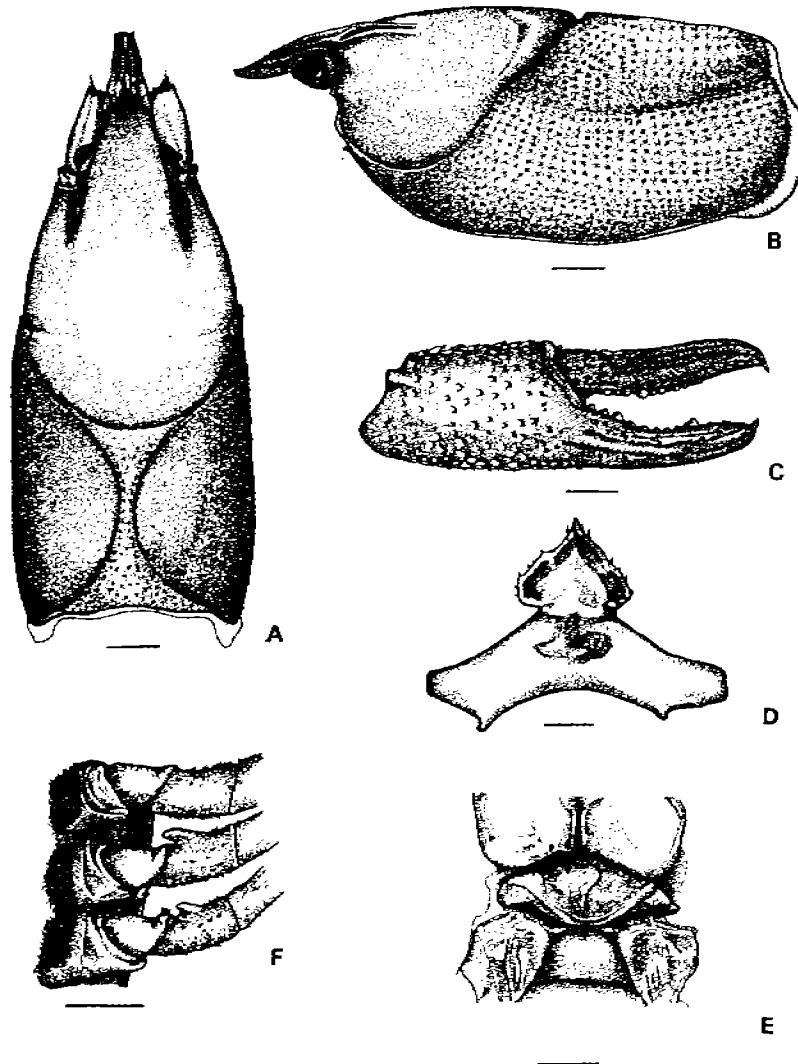


Fig. 2. *Procambarus kidaigoensis* (all from holotype, except E, which is taken from allotype). A, dorsal view of carapace; B, lateral view of carapace; C, lateral view of cheliped; D, epistome; E, armalus ventralis and adjacent sternites; F, basal podomeres of second through fourth pereopods. Scale bars, A-C = 4 mm, D, E = 2 mm, F = 1 mm.

groove throughout its whole length, shallow anteriorly, becoming deeper posteriorly (Fig. 3G). Chelipeds shorter than total body length, mesial surface of palm of chela with 14 tubercles in irregular row, all tubercles of surface of chela with small tufts of short setae anteriorly; fingers slightly longer than palm, both fingers with 3 longitudinal ridges along ventral and dorsal surfaces (Fig. 2C).

Ischium of third and fourth pereopods with hook, those on third pereopods extending beyond basioischial articulation (Fig. 2F). Epistome semitriangular, with cephalomedian extension ending in four spines, three of them with shared base; anterior portion asymmetrical, lateral angles well defined, margins slightly undulating, with scattered setae (Fig. 2D). First pleopods of male form I asymmetrical, reaching coxa of third pereopod, with single row of scattered setae running throughout their whole length, setae more abundant and larger on middle portion. Mesial process spiniform with flattened tip, directed caudodistally. Central projection flattened, divided into two subequal elements, external one evidently larger, more robust, internal one directed mesially (Fig. 3A). Cephalic process spiniform, with flattened tip, directed centrally (Fig. 3E, F). Caudal process spatulate, slightly chitinous, concave towards mesial process (Fig. 3B, C).

Annulus ventralis with tuberculate preannular plate bearing two strong lateral crests extending laterally, surrounding annulus, scattered short setae on posterior portion of plate (Fig. 2E). Preannular plate and annulus in loose contact, former one overlapping anterior portion of latter one. Annulus rhomboidal, with two strong lateral crests, forming deep, V-shaped depression anteriorly, partially covered by preannular plate; posterior half of dextral crest curved laterally, becoming less defined; sinistral crest curving laterally to form tongue-like expansion; margin formed by both crests enclosing sinus posteriorly. In ventral view, postannular plate with anterior margin oval-

shaped, posterior margin straight; in caudal view, approximately conical, apical surface bearing small punctuations with short setae, not in contact with annulus.

Measurements of types.—Provided in Table 1.

Holotypic male, form I.—Body pigmented, eyes well developed. Width of abdomen narrower than that of thorax. Carapace slightly higher than its width at cervical groove. Areola approximately 5.2 times longer than wide, with 3 punctuations across narrowest part, middle portion slightly elevated. Cephalic section of carapace 2.3 times as long as areola, 1.6 times longer than wide, constituting 70.2% of carapace length and 85.9% of postorbital carapace length. Rostrum excavated dorsally, without marginal spines, with convergent margins, acumen reaching third article of antennular peduncle, slightly shorter than antennal scale. Cervical spine absent, single branchiostegal spine present on each side of carapace, directed anteriorly (Fig. 2B).

Epistome semitriangular, with cephalomedian extension ending in four spines, three of them with common base; asymmetrical anteriorly, lateral angles well defined, margins slightly undulating, with setae (Fig. 2D). Antennule with prominent ventral spine on basal article; antenna shorter than total body length. Antennal scale 1.8 times longer than wide, lateral margin ending in spine, maximum width at second half of total length (Fig. 3G). Third maxilliped reaching middle portion of third article of antennal peduncle; internal margin of ischium with array of 20–25 irregular spines on left and right sides, respectively; all segments of third maxilliped with small tufts of short setae.

Chelipeds 1.7 times length of carapace. Chelae long, thin, slightly ovate laterally, 3 times longer than wide, covered with scattered small blunt tubercles, each tubercle bearing tuft of setae anteriorly. Palm 1.6 times longer than wide, surface covered with tubercles, forming irregular row along mesial surface. Movable finger with sub-

PROC. BIO. SOC. WASH.
Wednesday Jul 06 2005 08:18 AM
Allen Press

562

PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON

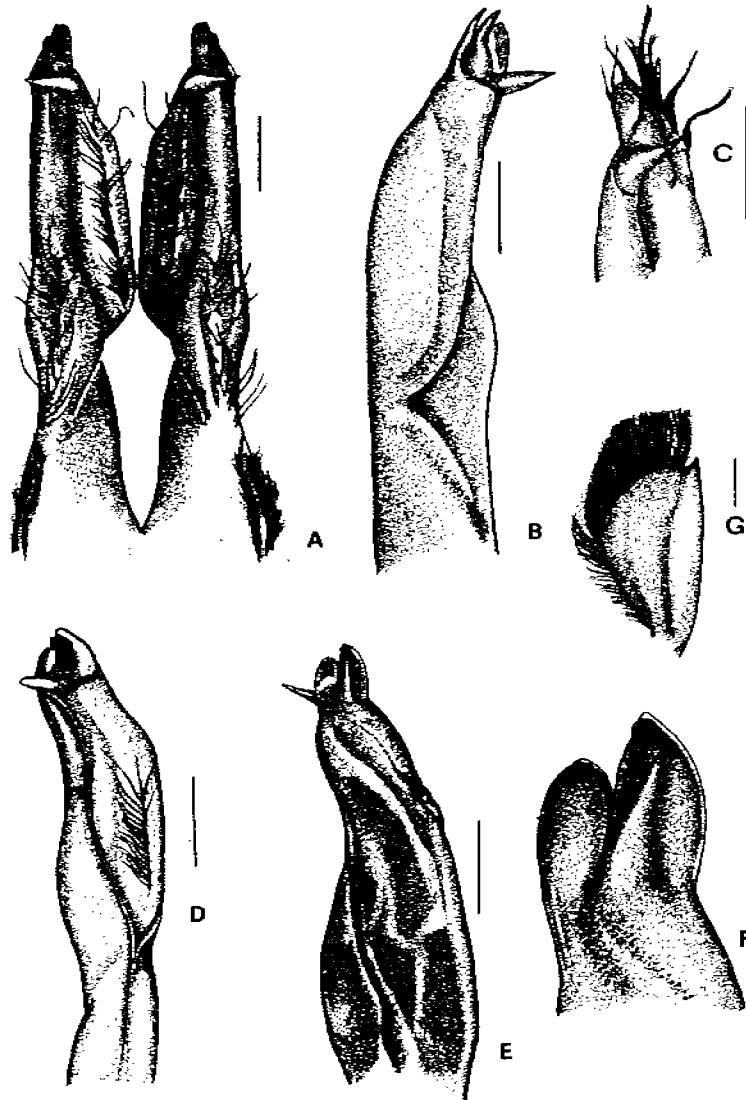


Fig. 3. *Procambarus hidalgoensis* (all from holotype, except D, which is taken from morphotype). A, first pleopods of male, caudal view; B, left gonopod, lateral view; C, left gonopod, detail of apex; D, right gonopod, caudal view; E, left gonopod, cephalic view; F, left gonopod, cephalic view, detail of apex; G, antennal scale. Scale bars = 1 mm.

PROC. BIO. SOC. WASH.
 Wednesday Jul 08 2005 08:18 AM
 Allen Press

VOLUME 118, NUMBER 3

563

Table 1.—Measurements (mm) of type specimens of *Procambarus* (*O.*) *hidalgensis*. TCL, total carapace length, POCL, postorbital carapace length.

	Holotypic male, form I	Allotypic female	Morphotypic male, form II
TCL	27.9	32.9	20.8
Height	14.1	15.9	11
Width	12.7	14.9	8.8
POCL	22.8	26.7	16.3
Arcola			
Width	1.6	1.5	1
Length	8.3	11.3	7.1
Rostrum			
Width	4.7	5.5	3.9
Length	5.1	6.3	4.3
Antennal scale			
Length	5	5.2	3.5
Width	2.7	2	1.9
Right chela			
Length of mesial margin of palm	13	10.2	6.2
Width of palm	7.9	6.7	3.6
Length of lateral margin of propodus	24	21.5	11.2
Length of dactyl	13.1	12	6.8
Length of carpus	8.1	6.9	4.2
Length of merus	11.1	11.2	7.1
Abdomen			
Width	12.2	14.6	8.6
Length	29.1	34	23.1

squamate tubercles anteriorly. Opposable margins of fingers with small tufts of setae next to articulation, that of movable finger with 11 (left pereopod) and 13 (right pereopod) teeth; that of fixed finger with 11 (left pereopod) and 12 (right pereopod) short teeth, third one largest; tip of fingers ending in corneous spine.

Ischium of third and fourth pereopods with hook, that of third pereopod larger, reaching beyond basioischial articulation; hook of fourth pereopod shorter, reaching articulation with basis. Coxa of fifth pereopod with subangular caudomesial boss. Each hook with setae on internal margin, scattered setae surrounding its base.

Surface of merus of cheliped tuberculate, large subdistal tubercle on dorsal surface, ventral surface with two longitudinal rows of blunt tubercles, distal margin with strong spine. Carpus short, approximately conical, dorsal surface with scattered tubercles; lateral and ventral surfaces with small sub-

squamate tubercles bearing tufts of short setae, distal margin with blunt spine on internal surface. Ischium with punctuations on dorsal surface and scattered tubercles on ventral surface; row of two to four blunt tubercles along ventromesial margin.

First pleopods of male form I as described in Diagnosis.

Uropods with protopodite bearing two distolateral spines, inner pair shorter, endopodite with dorsal median ridge ending posteriorly in small spine and well developed distolateral spines.

Telson with scattered short setae anteriorly; cephalic portion with three spines on right side and two spines on left side; distolateral spine larger, fixed, second and third spines small, articulated.

Allotypic female.—Similar to holotype, differing in the following characters. Two spines on left side of cephalic portion of telson, one movable, one fixed; fixed spine larger; one movable spine on right side.

PROC. BIO. SOC. WASH.
Wednesday Jul 06 2005 08:18 AM
Allen Press

564

PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON

Areola 7.5 times longer than wide. Antennal scale 2.6 times longer than wide. Opposable margin of movable finger with 10 teeth. Epistome with cephalomedian extension ending in 2 spines, undulating borders forming a slight groove with 3 and 1 spines on right and left sides, respectively; asymmetrical as in holotype. Annulus ventralis as described in Diagnosis.

Morphotypic male, form II.—Differing from holotype in the following characters. Cephalic process of first pleopod conical, reduced, slightly flattened; central projection conical, reduced; caudal process reduced to protuberance; mesial process conical, wider, ending in rounded tip (Fig. 3D). Areola 7.1 times longer than wide. Antennal scale 1.8 times longer than wide. Irregular row of 5 tubercles on surface of palm. Hook on ischium of fourth pereopod reduced to small protuberance. Ischium of third pereopod with small protuberance not reaching basioischial articulation. Rostrum slightly shorter, acumen reaching beyond middle part of third podomere of antennal peduncle.

Etymology.—The specific name is derived from the name of the state where the type locality is located.

Remarks.—*Procambarus (Ortmannicus) hidalgoensis* is a typical species of this subgenus, having hooks on the ischium of the third and fourth pairs of pereopods, and an annulus ventralis with a tuberculate preannular plate partially covering the anterior portion of the annulus. The new species is morphologically similar to *P. cuevachicae* in the size of the mesial process. However, all Mexican species of the subgenus share the presence of apical setae on the first pleopods, mainly on the caudal process and the central projection.

The new species differs from other species in the subgenus in the shape of the cephalic process, which is spiniform, with a flattened tip, directed centrally, and a spatulate caudal process, with the concavity oriented mesially. In particular, it differs from *P. villalobosi* and *P. caballeroi* in the size

and shape of the mesial process, which is folded against the main body of the gonopod in the new species, and free in the latter two species; from *P. toltecaae* in the origin of the cephalic process, which derives from the cephalolateral region in the latter species, and from *P. gonopodocristatus* in the shape of the areola, which in that species is obliterated.

The preannular plate also can be used to distinguish the new species, while in *P. caballeroi* it covers almost all of the annulus, in *P. gonopodocristatus* and *P. xilitlae*, it does not cover any of the annulus. In the rest of the species, including the new species, the plate covers it partially; however, *P. hidalgoensis* n. sp. is the only species exhibiting a deep depression in the anterior portion of the annulus. Because of its adaptations to cave life, *P. xilitlae* stands apart from the rest of the species in the subgenus.

The Mexican species of *Procambarus (Ortmannicus)* are distributed along a 310 km stretch in the central portion of the Sierra Madre Oriental on the Gulf of Mexico slope; this region is traversed by a number of canyons and narrow valleys, including extensive karst areas (López-Mejía 2001). The new species has been found only in the type locality, which is in the central section of the distribution range of the subgenus, even when most of the rivers and streams in the environs of the town of Tlanchinol have been surveyed. The species that are spatially closest are *P. cuevachicae*, occurring 21 km to the northeast near the town of Pujal, and *P. toltecaae* inhabiting small streams north of the town of Tamazunchale at a distance of 39 km (Fig. 1). However, the new species seems to be closer ecologically to *P. caballeroi*, *P. toltecaae*, and *P. villalobosi*, as they all inhabit cloud-forest streams with temperatures that seldom rise above 15°C. In this respect, they resemble some species of the subgenus *Villalobosus* (*P. (V.) riojai* Villalobos, 1944b; *P. (V.) achilli* López, Mejía & Alvarez, 2003; *P. (V.) erichsoni* Villalobos, 1950) whose distribution range is adjacent to the south. In

PROC. BIO. SOC. WASH.
Wednesday Jul 06 2005 09:18 AM
Allen Press

VOLUME 118, NUMBER 3

565

contrast, *P. gonopodocristatus* and *P. cuevachicae* inhabit streams at low altitudes with temperatures ranging between 20 and 30°C.

The collections of *P. hidalgoensis* have all been made at the end of the fall (October and November) and early winter (December), when the chances of capturing them increase. Although no systematic sampling program has been conducted, no organisms have been captured in collecting trips during the dry season (April, May) and early summer (June). Locally, crayfish are only seen at the end of the rainy season (November through January).

Acknowledgments

This work is part of the Ph.D. dissertation of the first author at the Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. She thanks the support received from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-165911). Our thanks to Biól. M. Nava-Bautista and the students of the undergraduate Biology Program at UAM-Xochimilco for their assistance in the field work. Thanks to Rolando Mendoza for producing the drawings.

Literature Cited

- Fowler, H. W. 1912. The Crustacea of New Jersey.—Annual Report of the New Jersey State Museum for 1911:29–650.
- Hobbs, H. H., Jr. 1941. A new crayfish from San Luis Potosí, México (Decapoda, Astacidae).—Zootologica 26:1–4.
- . 1943. Two new crayfishes of the genus *Procambarus* from México (Decapoda, Astacidae).—Lloydia 6:198–206.
- . 1969. *Procambarus villalobosi*, un nuevo camarino de San Luis Potosí, México (Decapoda, Astacidae).—Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie Ciencias del Mar y Limnología 38: 41–46.
- , and A. G. Grubbs. 1982. Description of a new troglolithic crayfish from Mexico and a list of Mexican crayfishes reported since the publication of the Villalobos monograph (1955) (Decapoda, Cambaridae).—Association for Mexican Cave Studies Bulletin 8:45–50.
- López-Mejía, M. 2001. Nuevos registros de distribución de las especies del subgénero *Villalobosus*—Hobbs, 1972 (Cambaridae: *Procambarus*) en los límites de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz. Informe Final de Servicio Social (Tesis de Licenciatura).—Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México, D.F. 32 p. (Unpublished thesis).
- , L. M. Mejía & P. Alvarez. 2003. *Procambarus (Villalobosus) achilli* (Decapoda: Cambaridae) a new species of crayfish from México.—Crustaceana 76(5):523–531.
- Villalobos, A. 1944a. Estudios de los camarinos mexicanos III. Una especie nueva de *Procambarus*, *Procambarus caballeroi* n. sp.—Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México 15(2):175–184.
- . 1944b. Estudios de los camarinos mexicanos II. Dos especies nuevas del género *Paracambarus* (Crustacea: Decapoda).—Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México 15(1):161–174.
- . 1950. Estudios de los camarinos mexicanos IX. Estudio taxonómico de un grupo de especies del género *Procambarus*.—Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México 21(2):367–412.
- . 1957. Estudios de los camarinos mexicanos. XIII. Descripción de una nueva especie de camarinos del estado de Veracruz.—Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México 28(1–2):279–288.

Associate Editor: Christopher B. Boyko

CAPÍTULO 2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La biología molecular y su uso en filogenia

Por centurias los humanos han estado concientes de que las variaciones individuales existen entre sí mismos y que tales variaciones tendían a concentrarse en las familias. Las diferencias entre las variedades o entrecruzamientos entre animales y plantas, por ejemplo, fueron asumidas también como producto de la herencia. No obstante, hasta la fusión en los años treinta de la genética Mendeliana y la teoría de Darwin de la selección natural en una sola teoría neodarwiniana de evolución, fueron vislumbrados los primeros esfuerzos para documentar la cantidad de variación genética dentro y entre las poblaciones naturales. Los primeros estudios de variación genética sobre poblaciones naturales se concentraron sobre variación cuantificable o fácilmente detectable, como el color o variantes morfológicas (Ford, 1940) e inversiones cromosomales o grupos sanguíneos (Dobzhansky, 1941). Aunque estos estudios no carecen de valor, no permitieron una estimación de la cantidad total de variación genética en el genoma de las poblaciones estudiadas. De alguna manera, las variantes mencionadas son atípicas de la mayoría de los loci en el genoma —en muchos de ellos sólo diversos loci polimórficos de tipo morfológico o de color existen en una población, las inversiones contienen un gran número de genes y las variantes de grupo sanguíneo inicialmente encontradas fueron resultado de problemas de transfusión sanguínea—. La carencia de conocimiento definitivo sobre la existencia de la variación genética produjo muy diferentes visiones en los años sesenta (Hedrick, 2000). El auge de los estudios a nivel molecular y el avance tecnológico han permitido en la actualidad obtener valiosa información.

Un primer enfoque para obtener una estimación imparcial de la variación genética fue el propuesto por Lewontin y Hubby (1966) y Harris (1966), quienes estudiaron la variación en una serie de loci de enzimas codificantes, generalmente llamadas alozimas, mediante la movilidad de sus productos. Muchos estudios de genética de

poblaciones se han enfocado sobre la variación en proteínas como una estimación de la variación en la secuencia de ADN que determina la secuencia de aminoácidos de estas proteínas. La genética evolutiva encontró un gran marco de desarrollo en la aplicación de la electroforesis de proteínas para resolver problemas de genética de poblaciones (Lewontin y Hubby, 1966; Harris, 1966; Avise, 1994). En general, esta técnica hace posible la separación de diferentes proteínas extraídas de la sangre, tejidos u organismos completos, mediante el corrimiento de una carga eléctrica a través de un medio determinado, propiciando la migración de las proteínas. Su relativa movilidad está en función de la talla, la carga y la forma específica de la molécula (por ejemplo, proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes).

El uso de técnicas electroforéticas adquirió gran auge para investigar problemas de genética de poblaciones, dado que permite estudiar la variación genética de prácticamente cualquier especie con relativamente poco equipo y experiencia. Algunos resultados permiten inferir que algunas variantes alélicas son ampliamente distribuidas en una especie y en especies estrechamente relacionadas; o bien, las especies o poblaciones pueden diferir en la presencia o frecuencia de diversas variantes. Asimismo, algunas poblaciones pueden diferir en la cantidad de heterocigosidad promedio en diversos loci, o bien, ser muy similares (Hedrick, 2000). Un ejemplo de variación espacial es el estudio de Selander y Kaufman (1975), quienes encontraron tanto heterocigosidades similares como gran variación en las frecuencias de algunos alelos, en áreas realmente pequeñas. Una aportación relevante de la técnica de electroforesis es el descubrimiento de una extensa variación en diversos genes determinantes de la variación alozímica sobre todo en invertebrados y plantas.

Las similitudes y diferencias en la estructura molecular entre diferentes organismos es útil para entender sus relaciones evolutivas. Presumiblemente, los organismos que poseen muchas moléculas semejantes están estrechamente relacionados, mientras

que aquellos que son diferentes molecularmente están distantemente relacionados. Quizá las predicciones serían más agudas si las diferencias en la estructura molecular entre las especies estuvieran en función del tiempo de divergencia de las especies; es decir, si la evolución de estas secuencias fuese gobernada por la neutralidad. La generación de datos de secuencias de ADN en muchos organismos proporciona una base de datos para determinar las relaciones filogenéticas entre las especies u otros taxa, que no son fácilmente inferidas a partir de otras características. En la actualidad se asume que este tipo de información refleja mejor las verdaderas relaciones filogenéticas que a partir de datos, por ejemplo, morfológicos, ya que los datos de secuencias son menos influidos por los efectos selectivos y las diferencias entre árboles filogenéticos generados desde datos moleculares y otras características, permiten evaluar los efectos selectivos sobre otros caracteres (Hedrick, 2000). Debe considerarse la importancia de contrastar la información derivada tanto de datos moleculares como de datos morfológicos, dado que la información obtenida de uno o varios fragmentos no necesariamente puede reflejar aquella proporcionada por un carácter morfológico, cuya expresión puede implicar una mayor cantidad de genes. El contraste y congruencia de cada conjunto de evidencia analizado, permitirá una mayor resolución de los resultados acercándonos con más precisión a la filogenia (Cadle, 1988; Nieto y Llorente, 1994).

Uno de los usos más importantes de las diferencias genéticas entre los genes, poblaciones o especies, es su organización de una manera significativa biológicamente. El arreglo de tales grupos, que generalmente tiene una raíz o tipo ancestral en un lado y las ramas o tipos derivados evolutivamente en el otro, puede ilustrar ancestría putativa o tipos derivados recientemente. Una de las metas puede ser encontrar la topología correcta de los arreglos de las ramas para una línea dada de grupos, especialmente a partir de un determinado número de grupos. Al incrementarse éste, el número de diferentes topologías enraizadas se aumenta muy rápidamente (para 3 grupos hay 3 diferentes topologías, para 4 grupos hay 15, para

5 grupos hay 105 y para 10 grupos hay más de 34 millones de diferentes posibles topologías enraizadas (Felsenstein, 1978).

La variación molecular tanto alélica como de secuencia de nucleótidos proporciona la descripción fundamental de la variación genética en un organismo. Las fuerzas que influyen la cantidad y patrones de variación molecular, es decir, la selección, la endogamia, la deriva génica, el flujo génico, la mutación y la recombinación, son las mismas que influyen otras variaciones genéticas aunque su eficiencia relativa puede ser diferente. Debido a los avances tecnológicos en genética molecular de la última década, particularmente para determinar las secuencias de nucleótidos, una gran cantidad de información está ahora disponible. El análisis de estos datos de secuencias desde una perspectiva evolutiva ha resultado en el rápido crecimiento del campo de la filogenética molecular, el cual tiene como principal enfoque la reconstrucción de las relaciones evolutivas tanto para genes como para especies (Hedrick, 2000).

En la época de los sesenta, los datos obtenidos a partir de secuencias de aminoácidos de proteínas pareció indicar que las mutaciones en la evolución de las proteínas se acumula en una tasa constante. Asumiendo un reemplazamiento regular, las diferencias en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos entre dos especies puede servir como un reloj molecular, indicando el tiempo de divergencia de dos especies desde un ancestro común (Hedrick, 2000). Kimura (1968) sugirió que la idea de un reloj molecular es consistente con la hipótesis de que las variantes moleculares pueden ser neutrales con respecto a otras, es decir, si el reemplazamiento de variantes moleculares en el tiempo es una función de la deriva génica y la mutación, el resultado deberá ser un reemplazamiento relativamente regular de las variantes moleculares en el tiempo. El reloj molecular es un concepto valioso y ha sido de gran utilidad para entender las relaciones entre genes y especies.

Filogenia molecular en crustáceos decápodos

En la actualidad, el estudio de la filogenia de decápodos difícilmente escapa de la consideración de temas moleculares. Sin embargo, aunque aumenta el número de grupos de investigación que generan y utilizan datos de secuencias, su uso es aún relativamente restringido en este campo (Schram, 2001). Kim y Abele (1990) y Abele (1991), por ejemplo, examinaron las relaciones filogenéticas de diversos taxa utilizando un conjunto limitado de datos de secuencias de los genes de ARNr 18S y ADNr 18S, apoyados en su mayor parte por resultados derivados de la morfología. No obstante, aunque inicialmente las técnicas moleculares fueron usadas para el análisis de genes específicos, para entender la acción del gen, para estructurar mapas genéticos y desarrollar tecnologías de transferencia, desde años recientes las técnicas han sido aplicadas a problemas de relevancia directa para entender la distribución y existencia de variación genética dentro y entre las especies (Hodgkin, 1997). Los estudios de filogenia molecular y evolución de las especies se efectúan en mayor cantidad, produciendo una considerable cantidad de información más detallada en diferentes niveles taxonómicos. Los datos de secuencias moleculares han sido de gran utilidad para elucidar relaciones filogenéticas aún cuestionadas (Felsenstein, 1985b; Huelsenbeck y Crandall, 1997) en diferentes grupos de decápodos. Por ejemplo, el gen de ADN mitocondrial 16S ha sido utilizado para estudios de poblaciones de cangrejos marinos (Cuesta y Schubart, 1998; Schubart *et al.*, 2000). En otros estudios, la filogenia molecular basada en ese gen ha resuelto el estatus monofilético a nivel de familias, dando pie a la subdivisión de grupos específicos y sugiriendo una reciente separación o continuo flujo génico para determinadas especies (Schubart *et al.*, 2001).

La consideración de los acociles en estudios de evolución molecular y ecología se ha incrementado y dado que sus relaciones filogenéticas aún son cuestionadas (Crandall *et al.*, 2000), su definición ha motivado el desarrollo de diversos estudios relacionados en diferentes niveles taxonómicos y el surgimiento de nuevos enfoques

para su análisis. El uso de métodos comparativos para probar hipótesis evolutivas es cada vez más común a niveles tanto macro como microevolutivos y la combinación de métodos ha mejorado la estimación de relaciones filogenéticas en acociles (Felsenstein, 1985a, Templeton *et al.*, 1992; Crandall y Fitzpatrick, 1996). Crandall *et al.* (2000a) examinaron la monofilia de los acociles y su posición dentro de los crustáceos decápodos, a partir de datos de secuencias de nucleótidos de las regiones 18S y 28S de ADN ribosomal y la región 16S de ADN mitocondrial; y obtuvieron evidencia de monofilia para los acociles y para la relación de grupo hermano entre éstos y las langostas. La secuenciación particularmente de la región 16S del ADN mitocondrial ha apoyado también la monofilia de los géneros de acociles de Australia y Nueva Zelanda (Crandall *et al.*, 1999) y la monofilia de un género sudamericano estrechamente relacionado a un subgrupo de acociles australianos (Crandall *et al.*, 2000b). La filogenia molecular ha sido útil también para explorar la historia evolutiva y centros de origen en acociles del subgénero *Procericambarus* (Crandall, 1993; Crandall y Templeton, 1999) y el género *Orconectes* (Crandall y Fitzpatrick, 1996) a partir de secuencias de ADN del gen 16S mitocondrial.

Ha sido referido en párrafos anteriores el caso del subgénero *Villalobosus*, objeto de este estudio. Si bien la hipótesis de distribución del grupo involucrando un centro de origen y una ruta de dispersión sobre la planicie costera del Golfo de México en dirección sureste (Villalobos, 1955; Hobbs, 1984) ha sido ampliamente aceptada, a la fecha no se han efectuado análisis formales de índole filogenética o de otro tipo, incluso a nivel molecular, que sustenten esa aseveración. En virtud de las muchas diferencias en su morfología y el creciente número de especies del subgénero *Villalobosus*, se consideró necesario efectuar un análisis cladístico de las relaciones filogenéticas entre las especies que lo integran a partir de caracteres morfológicos, basados principalmente en los procesos apicales del gonópodo del macho de la forma I, así como caracteres moleculares con base en la obtención de secuencias de un fragmento del gen 16S de ADN mitocondrial, dada la eficacia que la

combinación de ambas fuentes de caracteres ha demostrado. Con este análisis se pretende obtener argumentos que, en un momento dado, apoyen lo propuesto por Villalobos (1955), Hobbs (1984) y López-Mejía (2001), permitan comprender mejor su distribución e inferir su diversificación, conllevando incluso, de ser el caso, a una reestructuración del género *Procambarus*.

Hipótesis

El subgénero *Villalobosus* es un grupo monofilético dividido en tres grupos y su arreglo filogenético, basado en su morfología, coincide con el basado en los caracteres moleculares.

Método

a) Muestras

Se examinaron los siguientes ejemplares de acociles del subgénero *Villalobosus*: *Procambarus riojai*, *P. hoffmanni*, *P. erichsoni*, *P. hortonhobbsi*, *P. tlapacoyanensis*, *P. zihuateutlensis*, *P. teziutlanensis*, *P. xochitlanae*, *P. cuetzalanae*, *P. contrerasi* y *Procambarus* spp.; así como de los subgéneros *Ortmannicus* y *Procambarus*: *Procambarus* (*Ortmannicus*) *caballeroi*, *Procambarus* (*Ortmannicus*) *gonopodocristatus*, *Procambarus* (*Ortmannicus*) *hidalgoensis* y *Procambarus* (*Procambarus*) *digueti*. Los acociles fueron recolectados a mano, con cebo o con red. Los organismos se conservaron en alcohol 96° al 100% para facilitar la deshidratación del tejido, conservación y posterior extracción de ADN. En el laboratorio, los ejemplares fueron identificados de acuerdo con las claves sugeridas por Villalobos (1955), Hobbs (1972) y Hobbs (1989) y se disectó una muestra de tejido abdominal y branquial de un mínimo de 10 organismos por población, considerado el número mínimo adecuado para que los datos a nivel poblacional sean informativos, particularmente cuando se pretende observar la

variación entre ellos (Holsinger y Mason-Gamer, 1996). El resto de los organismos se preservó en alcohol al 70% y se depositó en la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR) del Instituto de Biología, UNAM.

b) Extracción-secuenciación de ADN.

El trabajo de laboratorio dirigido a la obtención de ADN y el proceso hasta su secuenciación se realizó en dos etapas. La *primera* fue efectuada en el laboratorio de Biología Molecular 3 del Instituto de Biología de la UNAM, a cargo de la Dra. Virginia León Regagnon. Se extrajo el ADN de la totalidad de las muestras y se amplificó y secuenció de acuerdo a los métodos descritos a continuación. Durante esta etapa se obtuvo el 70% de las secuencias de ADN:

El ADN genómico total fue extraído del tejido mediante una extracción estándar de proteinasa K, seguido por la adición de fenol/cloroformo y la precipitación con etanol (Hillis *et al.*, 1996). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron amplificados utilizando los siguientes 'primers' —16S ADNm, 520 bp: 1471 (5'-CCTGTTANCAAAAACAT-3') y 1472 (5'-AGATAGAAACCAACCTGG-3') (Crandall y Fitzpatrick, 1996). Las reacciones de PCR estándar se efectuaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Posteriormente, el ADN fue desnaturalizado inicialmente a 95°C por 3 min, después se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 95°C por 1 min para desnaturalización, 45°C por 1 min para alineación y 72°C de extensión por 1.5 min (Crandall y Fitzpatrick, 1996). Algunas variaciones en la temperatura de alineación fueron efectuadas con base en la siguiente fórmula, optando usualmente por el valor más bajo resultante o bien uno intermedio:

$$((A+T)2 + (G+C)4) - 4^{\circ}\text{C} = t_m$$

Los resultados de la PCR fueron evaluados mediante el método electroforético corriendo la totalidad de la muestra en un gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio, sumergido durante 20 min en líquido amortiguador TAE 10x (Tris-Acetato-EDTA) en la cámara de electroforesis, a 97 Volts. Los productos se purificaron posteriormente cortando las bandas del gel y colocándolas en tubos de 2 ml para su procesamiento. En los casos en que se utilizó el método de purificación directa (a partir de la reacción de PCR), sólo se colocó una muestra 2 μ l de la reacción de PCR en el gel, el cual fue desechado en su totalidad después de observarse en el transiluminador de rayos UV y fotografiarse. Con este último método la pérdida de ADN durante el proceso de purificación fue mayor. Las secuencias fueron generadas mediante el secuenciador automático ABI PRISM Modelo 310, del Posgrado en Ciencias Biológicas, localizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. La reacción de secuenciación a base de Big Dye para casi todas las muestras fue efectuada en ese mismo laboratorio.

Los protocolos de extracción, amplificación, purificación y secuenciación, así como las recetas para la preparación de geles y otras sustancias aplicados en esta primera etapa de trabajo de laboratorio, pueden consultarse en detalle en el Anexo 2.1 al final de este capítulo.

La *segunda etapa* fue efectuada en el laboratorio de Biología Integrativa, Microbiología y Biología Molecular, del Departamento de Biología Integrativa de la Universidad Brigham Young, en Provo, Utah, E.U., a cargo del Dr. Keith A. Crandall. Las acciones realizadas durante esta estancia académica se centraron principalmente en la obtención de aquellas secuencias que mostraron dificultad para secuenciarse debido a una ocasionalmente deficiente amplificación de ADN durante la PCR, o bien, la pérdida de ADN durante el proceso de purificación previo a la secuenciación. Tal dificultad se atribuyó a defectos en el kit de purificación utilizado al inicio del trabajo de laboratorio en México, por un lado y a que los extractos de ADN fueron obtenidos a partir de tejido abdominal, siendo el tejido

branquial una mejor fuente de células mitocondriales. Algunos cambios en la temperatura de los programas de amplificación y modificaciones a la fórmula utilizando HotmasterTaq polimerasa, aunado a la implementación de diferentes técnicas, permitieron la obtención del restante 30% de secuencias óptimas:

El ADN genómico total fue extraído del tejido utilizando el protocolo de digestión/extracción Qiagen Dneasy Kit. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron amplificados utilizando los mismos 'primers' diseñados por Crandall y Fitzpatrick (1996) referidos arriba. Las reacciones de PCR estándar se efectuaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Posteriormente, el ADN fue desnaturalizado inicialmente a 94°C por 3 min, después se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 94°C por 1 min para desnaturalización, 47°C por 1 min más 70°C por 1 min para alineación y 70°C de extensión por 5 min. Los resultados de la PCR fueron evaluados mediante el método electroforético corriendo 2 µl de la muestra en un gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio, sumergido durante 15 min en líquido amortiguador TAE 10x (Tris-Acetato-EDTA) en la cámara de electroforesis, a 103 Volts. Los productos se purificaron posteriormente mediante el método de Placas Millipore para Limpieza de PCR. Las reacciones de secuenciación fueron a base de Big Dye v3.0 y se purificaron utilizando Placas Millipore a base de Sephadex. Las secuencias fueron generadas en el Centro de Secuenciación de ADN, Departamento de Biología Integrativa, de la Universidad Brigham Young.

Los protocolos de extracción, amplificación, purificación y secuenciación, así como las recetas para la preparación de geles y otras sustancias aplicados en esta segunda etapa de trabajo de laboratorio, pueden consultarse a detalle en el Anexo 2.2 al final de este capítulo.

c) *Reconstrucción filogenética*

Caracteres morfológicos. Se examinaron los rasgos morfológicos de 350 especímenes de los 16 taxa referidos en el inciso 'a'. Como grupos externos se utilizaron *Procambarus* (*Procambarus*) *digueti*, debido a que es considerada la especie mexicana más evolutivamente distante y las tres especies del subgénero *Ortmannicus* por su colindancia geográfica con las especies de *Villalobosus* y porque derivan del linaje que se cree dio origen a las especies del subgénero *Villalobosus*. Los caracteres a considerar fueron los procesos terminales del gonópodo de los machos de la forma I, el annulus ventralis de la hembra y los ganchos en el isquio de los pereiópodos (ver listado de caracteres adelante), generando una matriz de datos de 19 caracteres, 3 binarios y 15 multiestado, utilizando la codificación numérica estándar para análisis cladísticos, considerando "0" como el estado plesiomórfico; la excepción es el carácter número 3 dado que en todos los ejemplares se observó el estado sugerido como plesiomórfico (Tabla 2.1). El análisis de parsimonia (MP) fue efectuado usando los programas NONA ver. 2.0 (para Windows) y WinClada ver. 0.9.99m24 (BETA), utilizando la búsqueda heurística con adición al azar de taxa y la Tree-Bisection-Reconnection (TBR) como algoritmo de permutación de ramas. Todos los caracteres fueron tratados como desordenados e igualmente pesados (Crandall y Fitzpatrick, 1996; Pohle y Marques, 2000). El soporte en los clados resultantes fue valorado utilizando el procedimiento de bootstrap, basado en 1000 réplicas (Felsenstein, 1985a; Felsenstein, 1985b; Hillis y Bull, 1993; Crandall y Fitzpatrick, 1996).

Caracteres moleculares. Las secuencias generadas fueron alineadas usando CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997; Anexo 2.3). El alineamiento derivado fue ajustado manualmente e importado al PAUP* (Swofford, 2000) para el análisis filogenético, usando MacClade (Maddison y Maddison, 1992) como programa externo. El análisis de parsimonia (MP) fue interpretado utilizando la búsqueda heurística con adición al azar de taxa y la Tree-Bisection-Reconnection (TBR) como algoritmo de permutación

de ramas. Todos los caracteres fueron tratados como desordenados e igualmente pesados (Crandall y Fitzpatrick, 1996; Pohle y Marques, 2000). Para la estimación de las relaciones filogenéticas entre secuencias debe asumirse un modelo de evolución independientemente del criterio de optimización empleado. Para determinar este modelo se aplicó el enfoque de Huelsenbeck y Crandall (1997) con objeto de probar los modelos alternativos de evolución, empleando PAUP* y Modeltest 3.06 (Posada y Crandall, 1998). El modelo seleccionado fue utilizado para estimar un árbol con el criterio de optimización de máxima probabilidad (ML). Se valoró el soporte en las ramas resultantes utilizando el procedimiento de bootstrap, con base en 1000 réplicas (Felsenstein, 1985a; Felsenstein, 1985b; Hillis y Bull, 1993; Crandall y Fitzpatrick, 1996).

Tabla 2.1. Matriz de caracteres morfológicos. Listado de caracteres: *primer análisis; **segundo análisis.

Taxa	Caracteres	*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	18	19	20	26
		**	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 <i>P. digueti</i>		4	0	0	0	1	0	0	0	0	4	4	4	0	5	3	0	1	1	2	
2 <i>P. riojai</i>		3	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	2	0	1	5	4	
3 <i>P. erichsoni</i>		3	0	0	1	0	0	0	1	3	1	1	0	1	0	1	4	1	2	4	
4 <i>P. hoffmanni</i>		3	0	0	0	0	0	2	6	0	1	1	0	0	0	2	1	4	4	0	
5 <i>P. hortonhobbsi</i>		0	0	0	1	0	2	0	1	0	4	2	1	0	2	2	1	1	0	2	
6 <i>P. contrerasi</i>		3	0	0	1	0	0	2	1	1	1	3	0	0	2	1	1	1	4	4	
7 <i>P. xochitlanae</i>		0	?	0	1	2	2	1	1	0	0	4	0	1	1	1	?	?	?	0	
8 <i>P. tlapacoyanensis</i>		0	0	0	0	2	3	1	0	0	4	2	0	1	2	1	1	1	3	0	
9 <i>P. zihuatlensis</i>		3	0	0	1	0	2	0	5	0	1	1	3	0	5	1	0	1	3	3	
10 <i>P. cuetzalanae</i>		3	1	0	1	2	3	2	1	0	5	3	0	1	4	1	0	1	1	4	
11 <i>P. teziutlanensis</i>		0	0	0	1	2	2	0	6	0	2	5	0	1	0	2	2	1	0	0	
12 <i>P. achilli</i>		3	0	0	1	0	3	2	4	2	1	0	2	1	4	2	4	1	1	4	
13 <i>P. chacalli</i>		6	1	0	1	0	2	2	6	2	1	0	0	1	4	1	4	1	1	4	
14 <i>P. hidalgoensis</i>		1	0	0	0	1	0	0	1	2	1	0	4	0	2	0	3	1	2	4	
15 <i>P. caballeroi</i>		5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0	2	1	1	7	
16 <i>P. gonopodocristatus</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	0	3	0	0	2	1	0	

Listado de caracteres morfológicos utilizados en el *primer* análisis filogenético del subgénero *Villalobosus*.

1. **Posición proceso cefálico:** 0-central; 1-caudal; 3-distal; 4-mesial; 5-caudocentral; 6-cefálica (alejado de los otros procesos)
2. **Esternito entre los quintos pereiópodos de la hembra separado o no del *annulus*:** 0-cerca *annulus*; 1-separado del *annulus*
3. **Simetría del gonópodo del macho:** 0-asimétrico; 1-simétrico
4. **Longitud gonópodo del macho:** 0-alcanzando coxa del tercer pereiópodo; 1-alcanzando coxa del segundo pereiópodo
5. **Longitud del proceso mesial:** 0-no sobrepasando los otros procesos; 1-sobrepasado $<2/3$; 2-sobrepasando $>2/3$
6. **Forma proceso mesial:** 0-espiniforme; 2-cónico, plano/robusto; 3-espiniforme (punta plana)
7. **Proceso mesial:** 0-recto; 1-sinuoso; 2-ligeramente curvo
8. **Posición proceso mesial:** 0- distal; 1-caudal; 4-mesial; 5-caudocentral; 6-caudodistal
9. **Origen proceso cefálico:** 0-cefálico; 1-base de los procesos caudal y central; 2-base del proceso caudal; 3-base de la proyección central
10. **Forma proceso caudal:** 0-espiniforme; 1-placa; 2-tubercular; 3-hombro; 4-espatulado; 5-triangular/piramidal
11. **Posición proceso caudal:** 0-caudal; 1-distal; 2-central; 3-cefálica; 4-mesial; 5-céfalocentral
12. **Forma proyección central:** 0-espatulada (triangular, curva o terminando en espina); 1-tubercular; 2-triangular; 3-cónica; 4-placa
13. **Proyección central dividida o no:** 0-no dividida; 1-dividida en dos procesos
14. **Posición proyección central:** 0-cefálica; 1-central; 2-caudal; 3-caudocentral; 4-caudocefálica; 5-mesial
17. **Ganchos sobre isquio de pereiópodos:** 0-sobre 3° y 4° pereiópodos; 1-sobre 4° y 3° vestigial; 2-sólo sobre el cuarto; 3-sólo sobre el tercero
18. ***Annulus ventralis* - origen del sinus:** 0-centroapical; 1-central; 2-subapical; 3-céfaloapical; 4-céfalomedio
19. ***Annulus ventralis* - forma del sinus:** 0-recto; 1-sinuoso; 2-variable entre 0 y 1
20. **Esternito entre quintos pereiópodos de la hembra - forma:** 0-trapezoidal; 1-oval; 2-monticular; 3-triangular; 4-trapezoidal y oval; 5-triangular y oval
26. **Forma proceso cefálico:** 0-espatulado; 1-tubercular; 2-placa; 3-cónico; 4-espiniforme; 5-triangular; 6-hombro (ligeramente tubercular); 7-espina incurvada lateralmente plana

Listado de caracteres morfológicos utilizados en el *segundo* análisis filogenético del subgénero *Villalobosus*.

0. **Posición proceso cefálico:** 0-central; 1-caudal; 3-cefálica; 4-distal; 5-mesial; 6- cefálica (alejado de los otros procesos)
1. **Estemito entre los quintos pereiópodos de la hembra separado o no del annulus:** 0-cerca annulus; 1-separado del annulus
2. **Simetría del gonópodo del macho:** 0-asimétrico; 1-simétrico
3. **Longitud gonópodo del macho:** 0-alcanzando coxa del tercer pereiópodo; 1-alcanzando coxa del segundo pereiópodo
4. **Longitud del proceso mesial:** 0-no sobrepasando los otros procesos; 1-sobrepasado <2/3; 2-sobrepasando >2/3
5. **Forma proceso mesial:** 0-espiniforme; 2-cónico, plano/robusto; 3-espiniforme (punta plana)
6. **Proceso mesial:** 0-recto; 1-sinuoso; 2-ligeramente curvo
7. **Posición proceso mesial:** 0- distal; 1-caudal; 4-mesial; 5-caudocentral; 6-caudodistal
8. **Origen proceso cefálico:** 0-cefálico; 1-base de los procesos caudal y central; 2-base del proceso caudal; 3-base de la proyección central
9. **Forma proceso caudal:** 0-espiniforme; 1-placa; 2-tubercular; 3-hombro; 4-espatulado; 5-triangular/piramidal
10. **Posición proceso caudal:** 0-caudal; 1-distal; 2-central; 3-cefálica; 4-mesial; 5-céfalo central
11. **Forma proyección central:** 0-espatulada (triangular, curva o terminando en espina); 1-tubercular; 2-triangular; 3-cónica; 4-placa
12. **Proyección central dividida o no:** 0-no dividida; 1-dividida en dos procesos
13. **Posición proyección central:** 0-cefálica; 1-central; 2-caudal; 3-caudocentral; 4-caudocefálica; 5-mesial
14. **Ganchos sobre isquio de pereiópodos:** 0-sobre 3° y 4° pereiópodos; 1-sobre 4° y 3° vestigial; 2-sólo sobre el cuarto; 3-sólo sobre el tercero
15. **Annulus ventralis - origen del sinus:** 0-centroapical; 1-central; 2-subapical; 3-céfaloapical; 4-céfalo medio
16. **Annulus ventralis - forma del sinus:** 0-recto; 1-sinuoso; 2-variable entre 0 y 1
17. **Estemito entre quintos pereiópodos de la hembra - forma:** 0-trapezoidal; 1-oval; 2-monticular; 3-triangular; 4-trapezoidal y oval; 5-triangular y oval
18. **Forma proceso cefálico:** 0-espatulado; 2-placa; 3-cónico; 4-espiniforme; 7-espina incurvada lateralmente plana

Resultados

Filogenia con base en caracteres morfológicos

En el primer análisis efectuado, no incluyendo las tres especies recientemente descritas, la búsqueda de parsimonia resultó en 24 árboles más parsimoniosos (L=79, CI=68, RI=54). Las especies del subgénero *Villalobosus* aparecen claramente separadas de los grupos externos, sugiriendo su monofilia. El árbol de consenso de mayoría (Fig. 2.1) resalta la ocurrencia de dos clados bien apoyados; todos los análisis colocaron a *P. xochitlanae*, *P. tlapacoyanensis* y *P. teziutlanensis* juntos en un clado, con *P. hortonhobbsi* como grupo hermano. Este grupo es definido por la forma cónica del proceso mesial y la posición del sinus sobre el annulus ventralis. Estas especies se distribuyen en la porción sur de la distribución del subgénero, con excepción de *P. hortonhobbsi*, la cual ocurre sobre la porción central del rango. El segundo grupo incluye *P. contrerasi* y *P. hoffmanni* en un clado y *P. cuetzalanae*, *P. zihuateutlensis*, *P. erichsoni* y *P. riojai* en otro, como grupos hermanos. Este segundo grupo es definido por un proceso cefálico espiniforme, distalmente orientado. Estas especies habitan en las zonas norte y central del rango de distribución geográfica del subgénero, con excepción de *P. cuetzalanae* y *P. hoffmanni* que habitan al sur.

En el segundo análisis, al incorporar las tres especies nuevas, se obtuvo un total de 5 árboles igualmente parsimoniosos (L=94, CI=60, RI=54). La topología de consenso resultante también agrupa a las especies del subgénero *Villalobosus* en dos clados (Fig. 2.2). El primero, presente en todos los árboles, está nuevamente conformado por *P. xochitlanae*, *P. tlapacoyanensis* y *P. teziutlanensis* juntos en un clado, con *P. hortonhobbsi* como grupo hermano, siguiendo el mismo patrón de agrupación del análisis anterior.

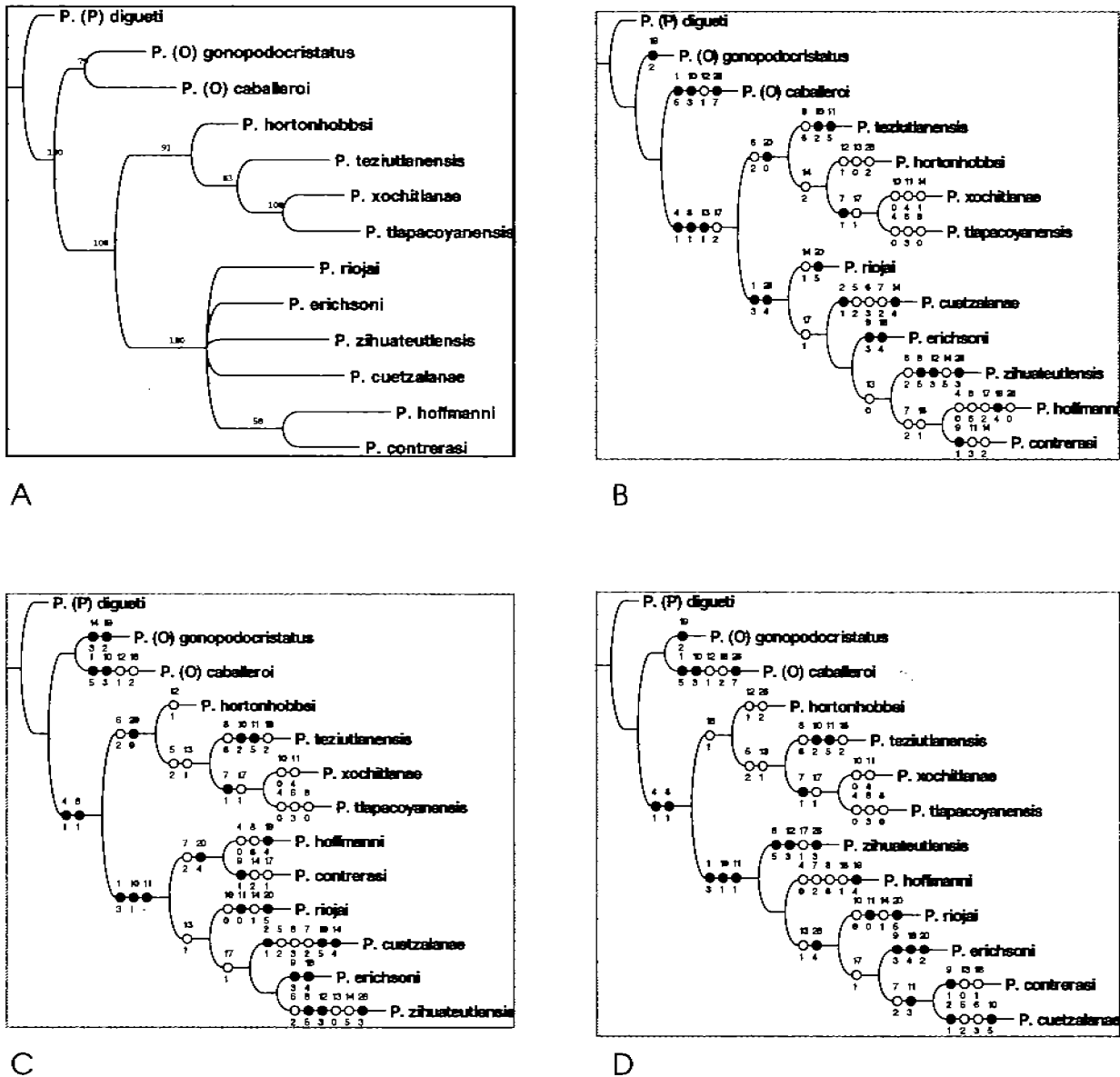


Fig. 2.1. Topologías morfológicas alternativas representando las posibles relaciones entre las especies del subgénero *Villalobosus* y su potencial estatus monofilético. A, árbol de consenso (L=79, CI=68, RI=54); B, C Y D, hipótesis alternativas reflejando las dos posibles vías de diversificación del subgénero. Los valores en las ramas corresponden en A, a los porcentajes del nivel de confianza (bootstrap) y B-D, los caracteres y estados de carácter definiendo los clados. No se incluyeron las especies recientemente descritas.

El segundo grupo incluye al resto de las especies del subgénero; agrupa nuevamente a *P. hoffmanni* y *P. contrerasi* en un clado, pero ahora con *P. erichsoni* y *P. zihuateutlensis* como grupos hermanos. Las dos especies recientemente descritas, *P. achilli* y *P. chacalli*, aparecen en un clado con *P. cuetzalanae* como grupo hermano; este grupo es definido por poseer un proceso cefálico dirigido distalmente, un proceso mesial espiniforme, plano en la punta y ligeramente curvo. Estas especies habitan en las zonas norte, con excepción de *P. cuetzalanae* que habita al sur. Las especies incluídas como grupos externos aparecen claramente separadas del subgénero *Villalobosus*, con excepción de *P. (O.) hidalgoensis*, la cual se incorpora como grupo hermano de *P. cuetzalanae*, *P. achilli* y *P. chacalli* en dos de los 5 árboles resultantes (Fig. 2.3A, C).

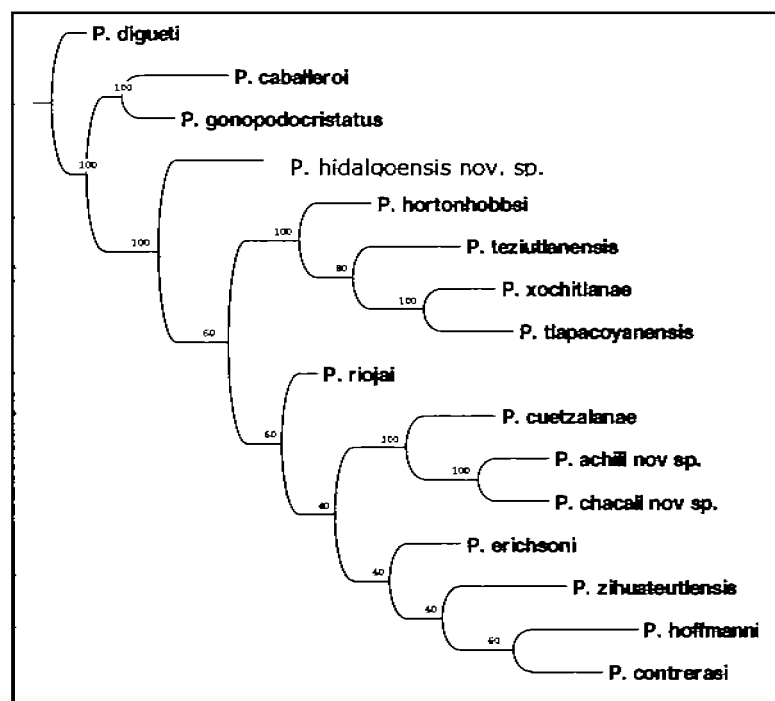


Fig. 2.2. Árbol de consenso de mayoría de las especies del subgénero *Villalobosus* L=94, CI=60, RI=54. Los valores en las ramas corresponden a los porcentajes del nivel de confianza (bootstrap). Se han incluido las especies recientemente descritas.

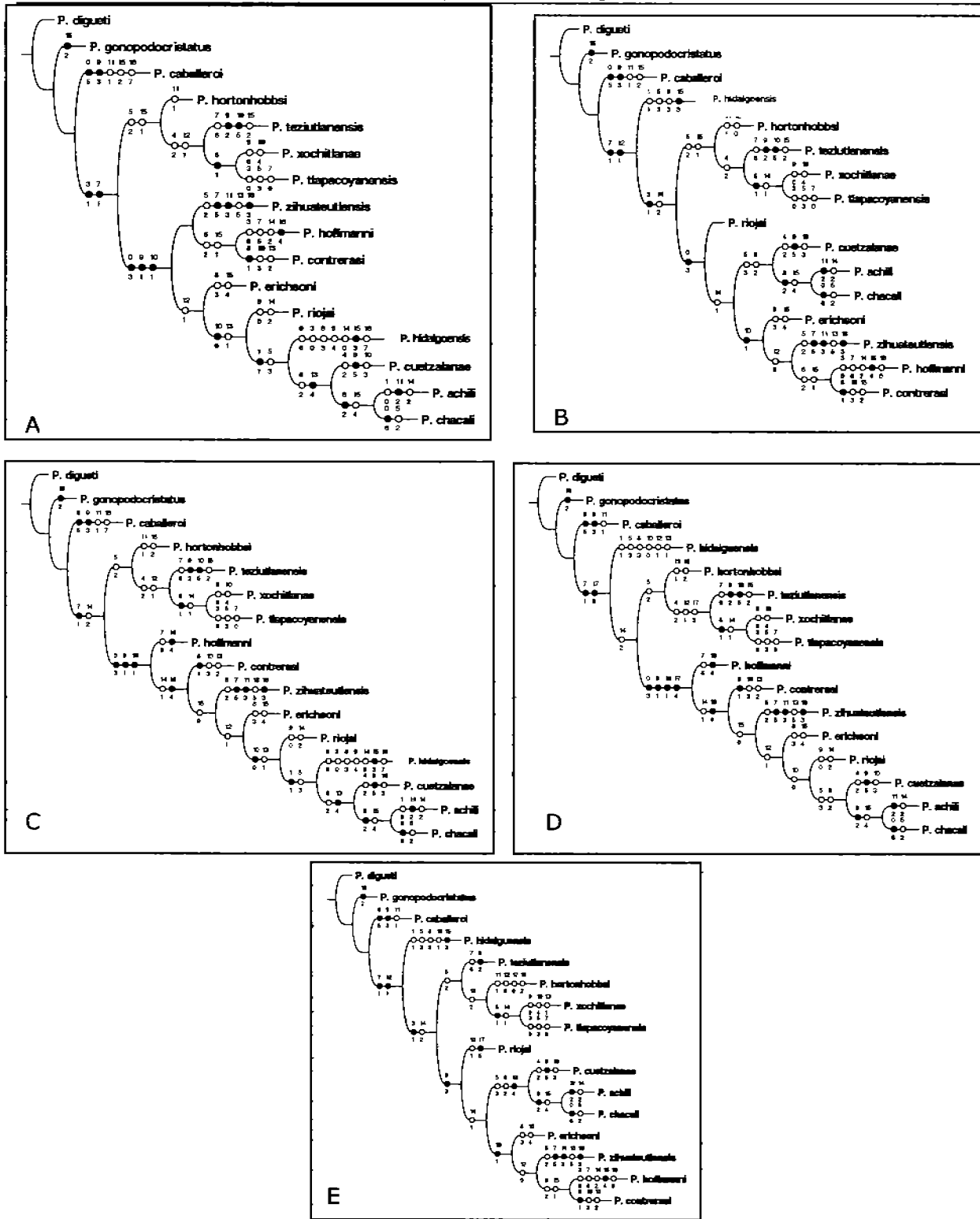


Fig. 2.3. Topologías morfológicas alternativas donde la presencia de *Procambarus* (*Ortmannicus*) *hidalgoensis* dentro del clado de las especies del subgénero *Villalobosus* (A y C) rechaza la monofilia de éste. Los números en las ramas corresponden a los caracteres y estados de carácter definiendo los clados.

La incorporación de *P. (O.) hidalgoensis* dentro de ese clado está definida por poseer el esternito entre los quintos pereiópodos de la hembra separado del annulus y un proceso mesial espiniforme con punta plana. Particularmente este último caracter distingue a *P. hidalgoensis* del resto de los miembros del subgénero *Ortmannicus* y lo vincula con *Villalobosus*, permitiéndonos cuestionar su monofilia. Efectuar un análisis que considere la totalidad de las especies de *Ortmannicus*, no sólo las mexicanas, seguramente esclarecerá si ese subgénero es o no monofilético. El árbol que se muestra en la Fig. 2.2 es por lo tanto un árbol de consenso de mayoría.

Filogenia con base en caracteres moleculares

Se obtuvieron 92 nuevas secuencias del gen 16S de ADN mitocondrial de 520 pares de bases de 23 poblaciones correspondientes a 16 especies de acociles (Tabla 2.3). Se corrieron los análisis considerando dos tipos de conjuntos de datos: secuencias a nivel poblacional y secuencias a nivel específico. Los árboles fueron enraizados usando *Procambarus (Procambarus) digueti*. Utilizando Modeltest concluí que el modelo más apropiado a utilizar era el modelo general de tiempo reversible (GTR) (Tavaré, 1986) con un modelo de heterogeneidad de tasa de distribución gamma y proporción estimada de sitios invariables (Tabla 2.4). Una búsqueda heurística con (10) réplicas usando adición de secuencias al azar con ese modelo produjo un árbol de ML de score $-\ln 959.55$ a nivel específico (Fig. 2.4), un árbol de ML a nivel poblacional (Fig. 2.7) y un árbol de MP (Fig. 2.5). Implementando un análisis de máxima parsimonia se produjeron dos árboles basados en una combinación de ambas matrices, morfológica y molecular, uno enraizado usando *P. (P.) digueti* y otro utilizando *P. (O.) hidalgoensis* (Fig. 2.6).

Tabla 2.3. Ejemplares y secuencias de ADNm asociadas.

Especies	Localidad	Secuencia	Referencia
<i>Procambarus (Procambarus) digueti</i>	Michoacán	Pd1	Este estudio
	Chichicaxtle, Hgo.	Pr	Este estudio
<i>Procambarus (Vitalobosus) riojai</i>	El Salta, Agua Blanca, Hgo.		
	Tenango de Doria, Hgo.	Pe	Este estudio
<i>Procambarus (Vitalobosus) erichsoni</i>	San cornelio, Hgo.		
	Necaxa, Pue.	Ph	Este estudio
	Tenango de las Flores, Pue.		
	Contenedor		
<i>Procambarus (Vitalobosus) hoffmanni</i>	Arroyo		
<i>Procambarus (Vitalobosus) hortonhobbsi</i>	CNCR	Phh	Este estudio
<i>Procambarus (Vitalobosus) contrerasi</i>	La Unión, Pue.	Pct	Este estudio
<i>Procambarus (Vitalobosus) xochitlanae</i>	Xochitlán, Pue.	Px	Este estudio
<i>Procambarus (Vitalobosus) tlapacoyanensis</i>	Portezuelo, Tlapacoyan, Ver.	Pt	Este estudio
<i>Procambarus (Vitalobosus) zihuateutlensis</i>	CNCR	Pz	Este estudio
<i>Procambarus (Vitalobosus) cuezatlanae</i>	Cuetzalan, Pue.	Pc	Este estudio
<i>Procambarus (Vitalobosus) teziutlanensis</i>	Chignautla, Pue.	Ptz	Este estudio
	Atezca, Hgo.	Pac	Este estudio
	Chalma, Hgo.		
	Calndii, Hgo.		
<i>Procambarus (Vitalobosus) achiñi</i>	Xochicoatlán, Hgo.		
<i>Procambarus (Vitalobosus) chacaltli</i>	Dejigui, Huayacocotla, Ver.	Pch	Este estudio
<i>Procambarus (Ortmannicus) hidatgoensis</i>	Tlanchinol, Hgo.	Phg	Este estudio
	Tenango de las Flores	Pcb	Este estudio
<i>Procambarus (Ortmannicus) cabañeroi</i>	Arroyo Jardín de Flores		
<i>Procambarus (Ortmannicus) gonopodocristatus</i>	Paso Largo 1, Ver.	Pg	Este estudio

Tabla 2.4. Pruebas de tasas de probabilidad de modelos de evolución molecular (Huelsenbeck y Crandall, 1997; Posada y Crandall, 1998).

Abreviaturas: Ti=transición, Tv=transversión. Modelos: GTR=general time reversible model, TrN=tasas de sustitución variables y proporción de sitios no variables, TIM=selección en ambientes al azar sin componentes balanceantes, HKY=variación de frecuencia en sitios finitos y sitios infinitos, F81=sustitución en tasas proporcionales de frecuencias de nucleótidos, JC=frecuencias pesadas generalizadas, +G=con distribución gamma.

Hipótesis nula	Modelos			df	P
	comparados	-lnL ₀	-lnL ₁		
Arbol ML poblacional					
Misma frecuencia de bases	JC, F81	5263.9	5255.5	3	0.000791
Ti = Tv	F81, HKY	5255.5	5218.2	1	<0.000001
Mismas tasas de Ti	HKY, TrN	5218.2	5213.8	1	0.002882
Mismas tasas de Tv	TrN, TIM	5213.8	5213.7	1	0.833955
Mismas tasas entre sitios	TrN, TrN+G	5213.8	5052.4	1	<0.000001
Proporción de sitios no variables	TrN+G, TrN+G	5052.4	5052.3	1	0.367131
Modelo seleccionado	GTR+G	5047.7			
Arbol ML específico	GTR+G				

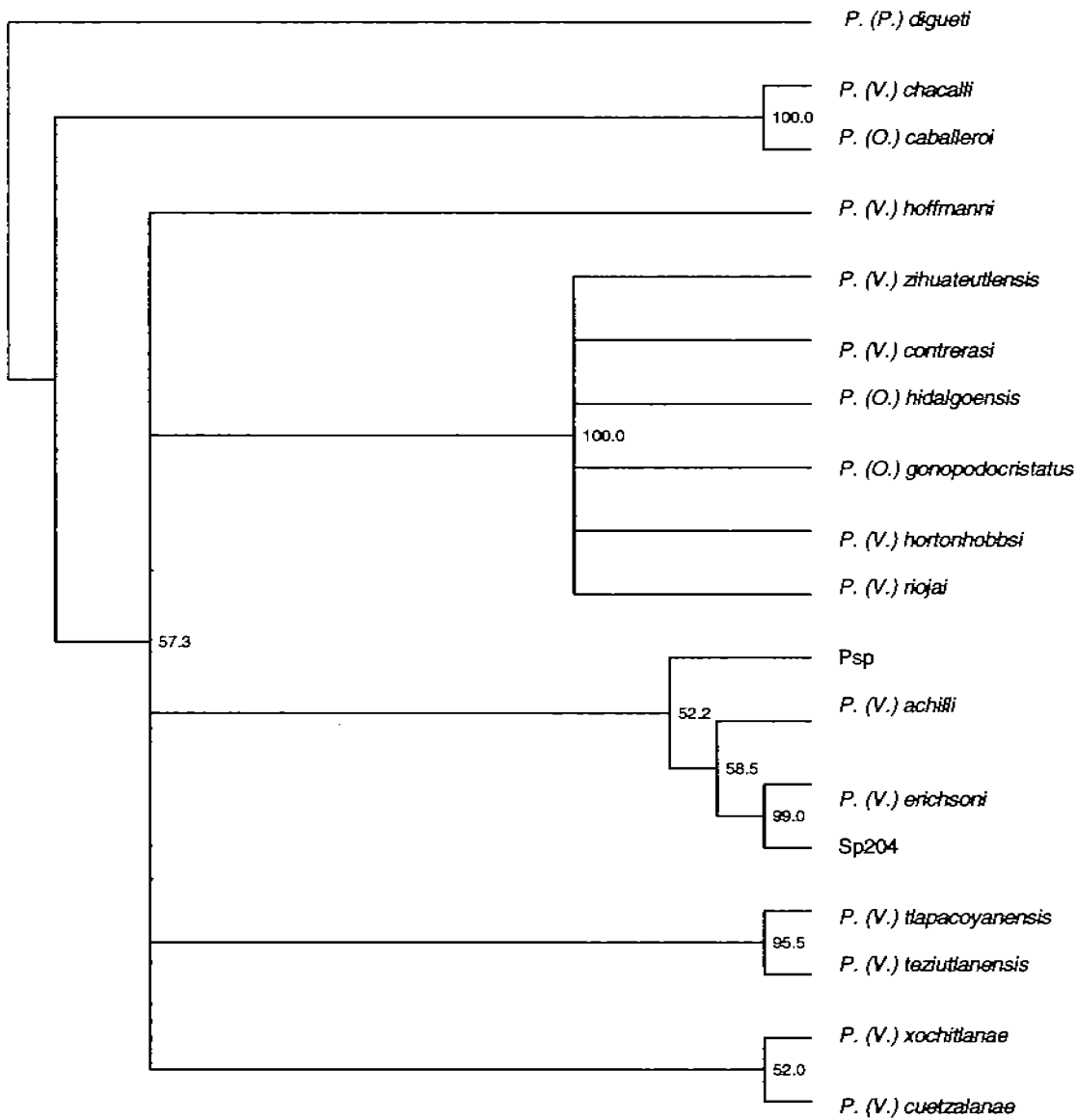


Fig. 2.4. Árbol de máxima verosimilitud (ML) basado en secuencias del gen 16S ADNm mostrando las relaciones filogenéticas de las especies del subgénero *Villalobosus*. Los números mostrados en los nodos corresponden a los porcentajes de confianza (bootstrap basado en 1000 réplicas).

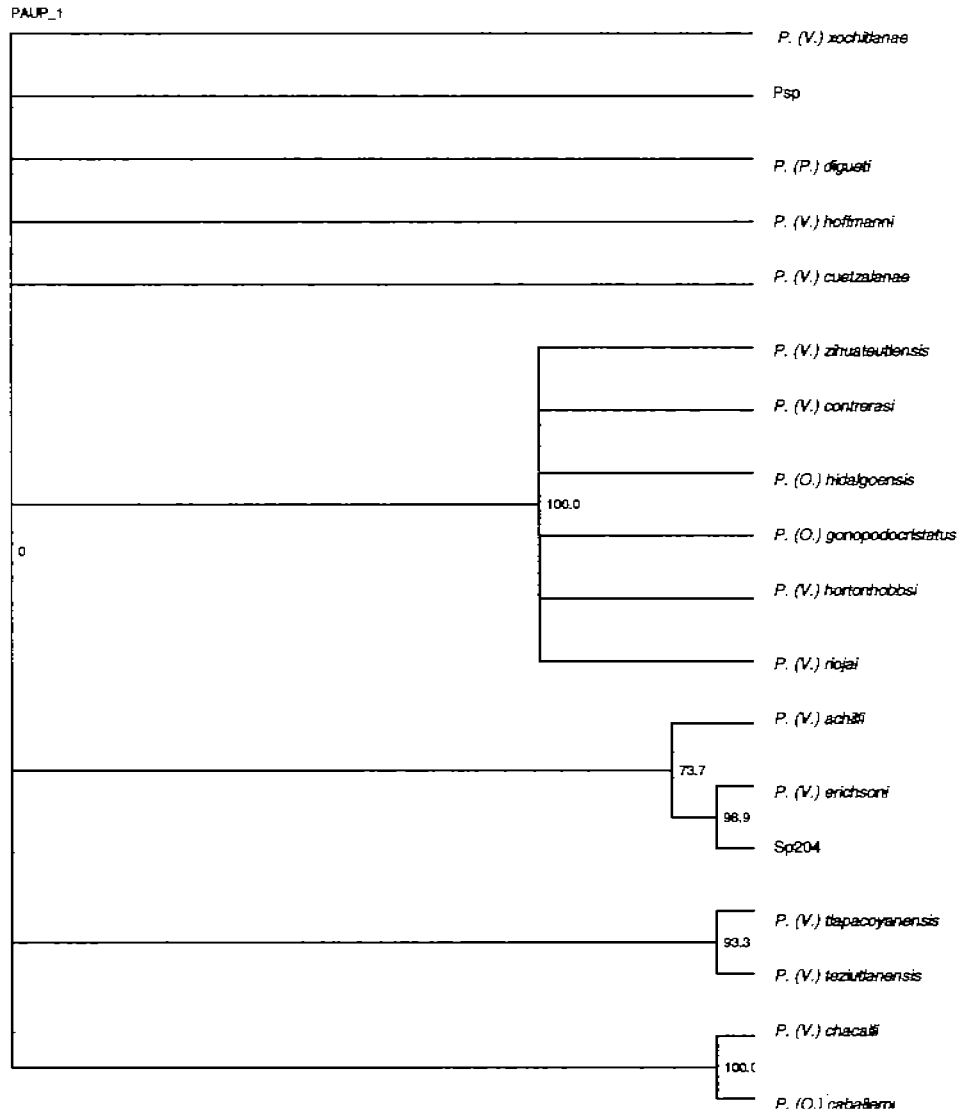


Fig. 2.5. Árbol de máxima parsimonia (MP) basado en secuencias del gen 16S ADNm mostrando las relaciones filogenéticas de las especies del subgénero *Villalobosus*. Los números mostrados en los nodos corresponden a los porcentajes de confianza (bootstrap basado en 1000 réplicas).

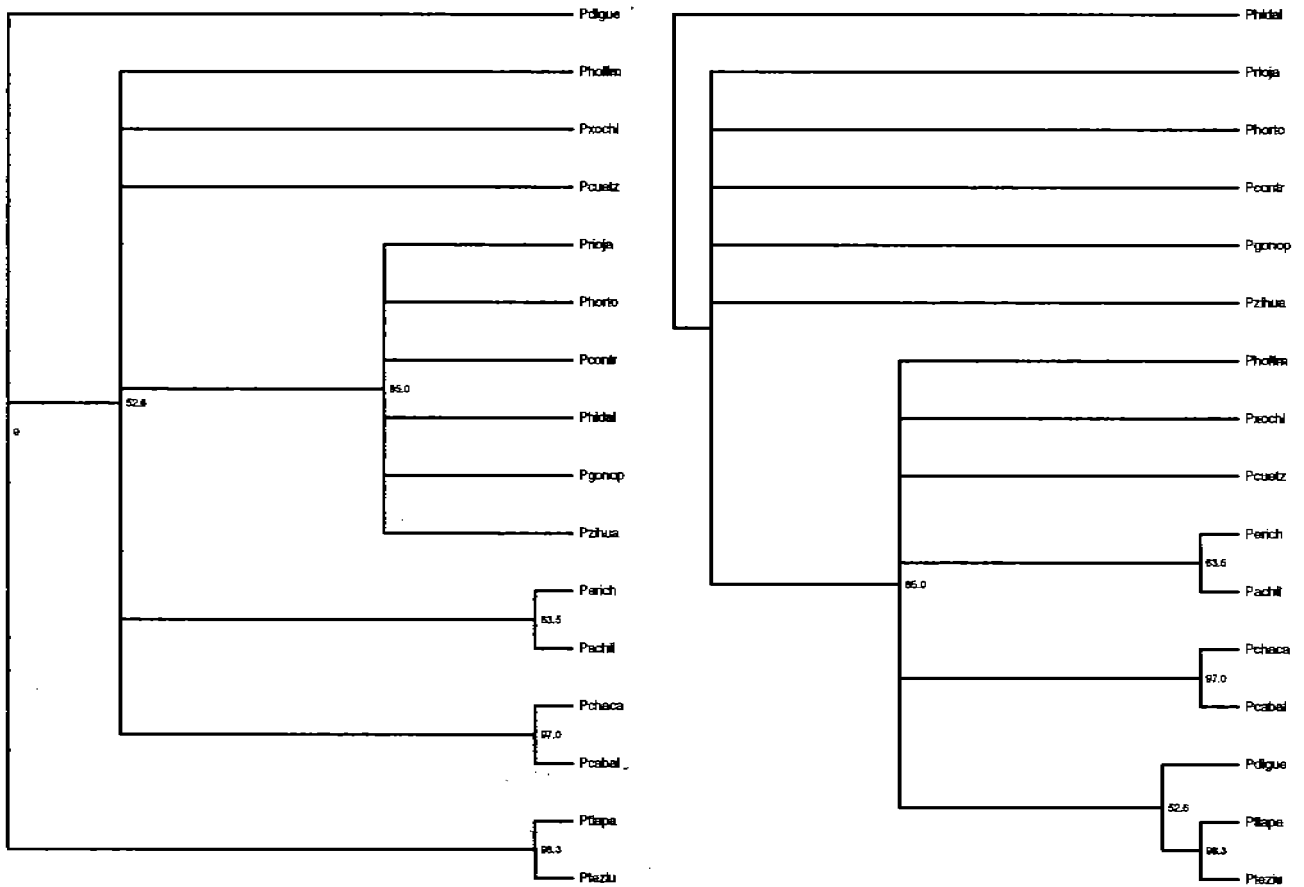


Fig. 2.6. Árboles de máxima parsimonia (MP) mostrando las relaciones filogenéticas de las especies del subgénero *Villalobosus*, basados en una matriz que conjuga caracteres moleculares (secuencias del gen 16S ADNm) y caracteres morfológicos y enraizados por *P. (P.) digueti* (A) y *P. (O.) hidalgoensis* (B). Los números mostrados en los nodos corresponden a los porcentajes de confianza (bootstrap basado en 1000 réplicas).

Se efectuó un análisis de máxima parsimonia utilizando una matriz que combinó caracteres morfológicos y moleculares esperando observar un arreglo filogenético más resuelto. Los árboles en la figura 2.6 muestran las posibles relaciones filogenéticas de las especies del subgénero *Villalobosus* y su comportamiento si el árbol es enraizado con *P. (P.) digueti* o *P. (O.) hidalgoensis*.

Ambos árboles reflejan relaciones consistentes entre *P. erichsoni* y *P. achilli*, *P. chacalli* y *P. (O.) caballeroi*, *P. tlapacoyanensis* y *P. teziutlanensis*, en concordancia con el arreglo filogenético molecular. Por otro lado, aunque la agrupación de *P. riojai*, *P. hortonhobbsi*, *P. contrerasi*, *P. (O.) gonopodocristatus* y *P. zihuateutlensis* parece mantenerse, sus relaciones filogenéticas permanecen inciertas con el enfoque de matrices combinadas. La principal diferencia entre estos dos árboles es la posición de *P. hoffmanni*, *P. xochitlanae* y *P. cuetzalanae*, las cuales se incorporan en un clado junto con las especies de los clados más consistentes. Los árboles resultantes del análisis de matrices combinadas muestran mayor similitud con aquellos obtenidos a partir de sólo caracteres moleculares (Figs. 2.4 y 2.5). De hecho, las agrupaciones que parecen consistentes en éste último son mantenidas en los árboles de la figura 2.6.

En general no se observan grandes diferencias con respecto a los árboles obtenidos a partir de sólo caracteres moleculares, sin embargo el arreglo filogenético discrepa de aquel obtenido con base en la morfología de las especies (Figs. 2.2 y 2.3).

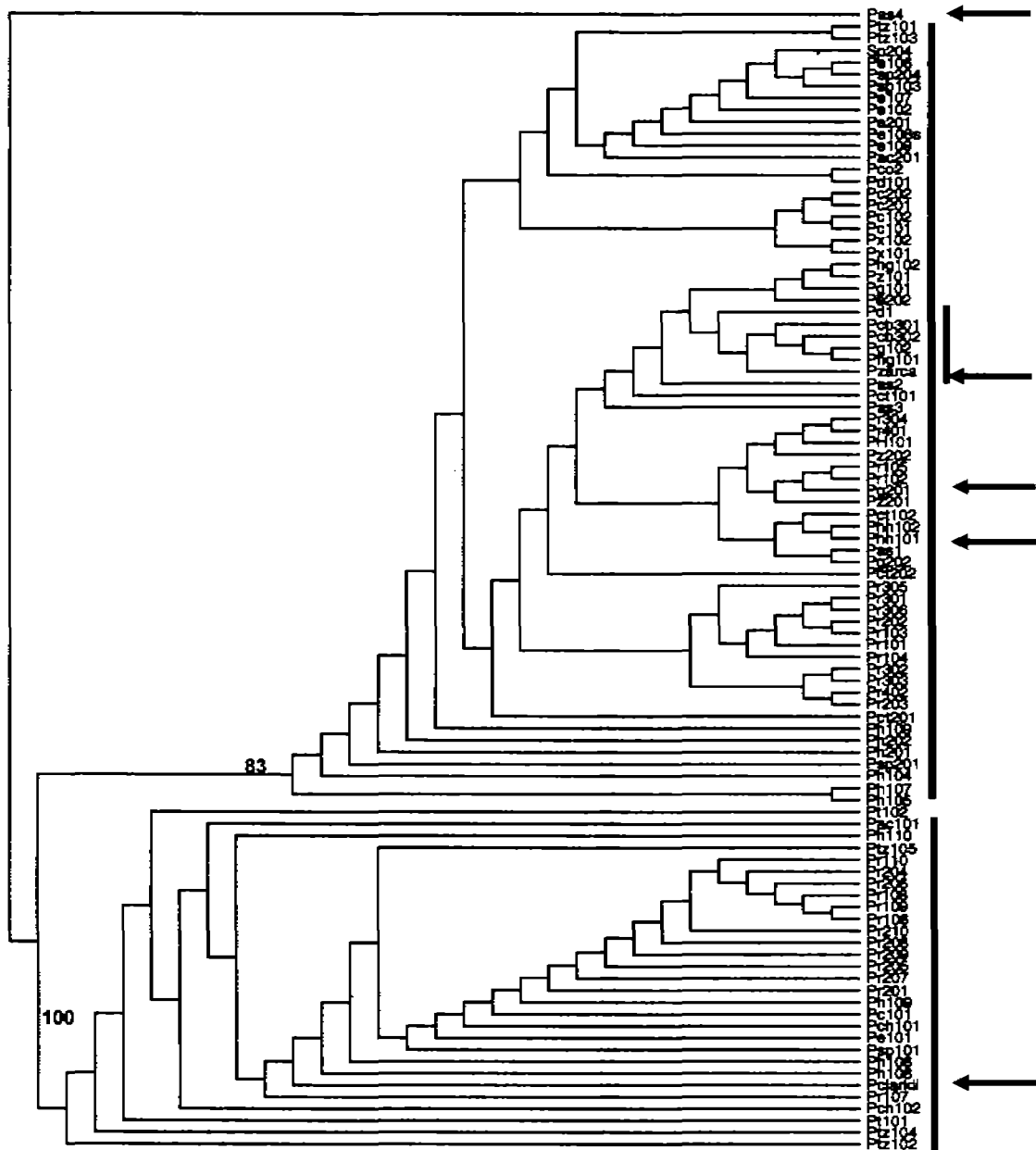


Fig. 2.7. Árbol más parsimonioso basado en secuencias del gen 16S ADNm mostrando las relaciones filogenéticas de las especies del subgénero *Villalobosus*. Los valores mostrados en las ramas corresponden a los valores de bootstrap (basado en 1000 réplicas). El patrón de colores corresponde a los tipos de hábitat sugeridos en el capítulo 4.

Discusión

Filogenia morfológica

El subgénero *Villalobosus* ha sido considerado originalmente como un grupo natural caracterizado básicamente por la ausencia de ganchos en los isquiopoditos de los pereiópodos del tercer par, los pleópodos del primer par del macho rectos y desiguales en longitud y por poseer los procesos apicales dirigidos distalmente (Villalobos, 1955). El análisis filogenético arrojó resultados distintos a los sugeridos en estudios previos (Villalobos, 1955; Hobbs, 1984; López-Mejía, 2001). Se identificaron como estados plesiomórficos el proceso mesial espiniforme, ocasionalmente terminado en punta y su disposición caudal, la forma ligeramente sinuosa del sinus del annulus ventralis, la disposición caudocentral del proceso cefálico, la forma de hombro del proceso caudal, la separación del esternito entre los quintos pereiópodos y el annulus ventralis, el estado no dividido de la proyección central, el origen subapical o cefaloapical del sinus del annulus ventralis y el origen del proceso cefálico en la proyección central. Los estados apomórficos relevantes son la longitud del proceso mesial rebasando en más de dos tercios al resto de las estructuras apicales; la proyección central dividida en dos procesos y la forma cónica, robusta, sinuosa y ocasionalmente plana en la punta del proceso mesial.

Las hipótesis de relaciones del grupo Riojai se basaron principalmente sobre la forma cónica o aplanada del proceso mesial, de igual longitud que el proceso cefálico o rebasando en más de dos tercios el resto de las estructuras apicales (Villalobos, 1955); sin embargo, en nuestro análisis es este último carácter el que separa claramente de este grupo a *P. tlapacoyanensis*, *P. xochitlanae* y *P. teziutlanensis*, tal como lo sugirió López-Mejía (2001). En cambio, el carácter aplanado del proceso mesial y la disposición distal del proceso cefálico incorporan a las especies del grupo Riojai y el grupo Erichsoni en un sólo clado, no obstante el proceso caudal en forma

de placa curvada que caracterizaba este último. Esto fue corroborado en el presente estudio por la adición de nuevos taxa, estados y caracteres, sugiriendo la existencia de un patrón diferente donde hay sólo dos principales grupos: Riojai y Hortonhobbsi.

El grupo Riojai es el que presenta mayores diferencias. Esto puede deberse a que las características que definen a las especies contemplan más variación, es decir, las especies poseen un proceso mesial no mayor a dos tercios respecto a los demás procesos, pero el proceso caudal puede ser espiniforme en algunas especies, o bien en forma de placa espatulada, lo que tal vez propicia la separación de los grupos, especialmente en el caso de *P. hoffmanni* y *P. hortonhobbsi*. *Procambarus cuetzalanae* comparte con *P. achilli* y *P. chacalli* el proceso espiniforme con punta plana y ligeramente curvo. El resto de las especies del grupo Riojai evidencia mayor relación, aunque podrían estar en un proceso joven de especiación; comparten el estado del proceso cefálico dirigido distalmente, la posesión del gancho sobre el cuarto par de pereiópodos y ocasionalmente uno vestigial sobre el tercer par, la disposición distal del proceso caudal y exhiben una proyección central no dividida asumida como un estado plesiomórfico. Algunos de estos caracteres sugieren la monofilia del subgénero, sin embargo las relaciones de grupo hermano dentro del grupo Riojai permanecen inciertas. El grupo Hortonhobbsi, presente en todos los árboles, está conformado por *P. xochitlanae*, *P. tlapacoyanensis* y *P. teziutlanensis* juntos en un clado, con *P. hortonhobbsi* como grupo hermano. A diferencia del grupo Riojai, este clado está muy bien apoyado en todas las topologías obtenidas por la forma cónica del proceso mesial y la posición del sinus sobre el annulus ventralis. Es posible que este grupo de especies, particularmente *P. hortonhobbsi*, encabezaran el proceso de diversificación resultado de la división poblacional de un linaje ancestral, dada su posición geográfica y filogenética.

El análisis revela una clara división del subgénero *Villalobosus* en dos grupos, Hortonhobbsi y Riojai, que parece reflejar eventos históricos de diversificación. Las

relaciones filogenéticas entre las especies reflejan un patrón de distribución y diversificación inicialmente desde el noroeste hacia el sureste encabezados por un linaje que dio origen *P. hortonhobbsi* sobre la planicie costera del Golfo de México, con el avance hacia el sureste conformando las poblaciones que actualmente habitan en el extremo sur de su rango distribucional, como consecuencia principalmente de la barrera geográfica que impuso la conformación final del Eje Neovolcánico Transversal. Sin embargo, presumo que las condiciones ecológicas y geológicas a las que están vinculados estos organismos, han propiciado la diferenciación genética en dirección sur a norte, con el consecuente incremento de la especiación. Tal puede ser el caso del segundo clado, encabezado por *P. riojai*, que conforma un grupo de especies establecidas sobre la vertiente de la Sierra Madre Oriental, cuyas poblaciones pudieron asimismo iniciar procesos de especiación como consecuencia de los cambios ecológicos tomando lugar en la región, propiciando la segregación espacial que puede ser evidencia de procesos de especiación alopátrica.

La inclusión de taxa adicionales y caracteres en la matriz usada en el análisis sugirió que la concordancia fenética discutida antes y que parcialmente apoya las hipótesis previas, no se mantiene cuando los datos son sometidos a análisis cladístico.

Filogenia molecular

Las topologías basadas en secuencias del gen 16S ADNm rechazan firmemente al subgénero *Villalobosus* como un grupo monofilético, tal como sucede con los datos morfológicos. El agrupamiento de las especies del subgénero en tres grupos (López-Mejía, 2001; Tabla 1.2), es apoyado por ambos análisis, máxima verosimilitud (Fig. 2.4) y máxima parsimonia (Fig. 2.5), pero su arreglo es parcialmente diferente. La propuesta de dos grupos (Villalobos, 1955; Hobbs, 1972), no se sostiene en este caso.

El análisis a nivel de especie apoya fuertemente (bootstrap 100% en ML y MP) el clado conformado por *P. zihuatlensis*, *P. contrerasi*, *P. hortonhobbsi*, *P. riojai*, *P. hidalgoensis* y *P. gonopodocristatus*, los dos últimos originalmente grupos externos, apareciendo como grupos hermanos de *P. hoffmanni*. Estas especies habitan en la porción centro-este de la zona de distribución del subgénero *Villalobosus*, con excepción de *P. hidalgoensis*, que habita en el extremo norte. Un segundo clado bien soportado (bootstrap 100% en ML y MP) es aquel sugiriendo a *P. chacalli* y *P. caballeroi*, este último también un grupo externo, como especies hermanas. El tercer clado claramente definido está conformado por *P. erichsoni* (Sp y Psp), como grupos hermanos de *P. achilli* en el análisis de ML, pero excluyendo ésta última especie en el análisis de MP. Estas relaciones de grupo hermano son de particular interés dado que involucran especies habitando al norte (*P. chacalli* y *P. achilli*) y en la región central (*P. erichsoni* (Psp, Sp) y *P. caballeroi*) de la zona de distribución del subgénero *Villalobosus*, lo que involucra una serie de barrancas pronunciadas que prácticamente han impedido el flujo génico entre estas poblaciones. El árbol de ML apoya dos clados conformados por las especies hermanas *P. tlapacoyanensis* y *P. teziutlanensis*, así como *P. xochittanae* y *P. cuetzalanae*. La posición de estas especies, no obstante, parece incierta en el árbol de MP. La corta longitud de las ramas para estos linajes sugiere la necesidad de más información de secuencias, que permita valorar su estatus filogenético con mayor agudeza.

El análisis a nivel poblacional (Fig. 2.7) muestra la existencia de dos principales clados bien apoyados, que reflejan relativa correspondencia con respecto a las topologías presentadas anteriormente. Primero, a pesar de la agrupación de poblaciones representantes de los grupos externos, su posición en la topología rechaza nuevamente el estatus monofilético del subgénero *Villalobosus*. Segundo, la división del subgénero en dos grupos es apoyada por los dos principales clados en la topología, cuyo arreglo sigue un patrón semejante al de las topologías discutidas anteriormente. El primer clado está conformado por poblaciones de especies habitando principalmente sobre la vertiente de la Sierra Madre Oriental. El segundo

clado agrupa aquellas poblaciones de especies que se localizan sobre la planicie del Golfo de México. Esto permite sugerir eventos de especiación en dirección noroeste-sureste sobre la planicie del Golfo de México, encabezados probablemente por un linaje que eventualmente dio origen a *P. riojai*. Eventos subsecuentes de diferenciación pueden estar tomando lugar sobre la vertiente de la Sierra Madre Oriental, encabezados por poblaciones de *P. erichsoni* o *P. riojai* localizadas al centro del rango de distribución del subgénero *Villalobosus*.

ANEXO 2.1

PROTOSCOLOS UTILIZADOS DURANTE LA PRIMERA ETAPA DE TRABAJO DE LABORATORIO, EFECTUADA EN EL LAB. DE BIOLOGÍA MOLECULAR 3, DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA DE LA UNAM, A CARGO DE LA DRA. VIRGINIA LEÓN RÈGAGNON

Método básico de extracción de DNA (Fenol-Cloroformo) (Tomado de Hillis, *et al.*, 1996, pag. 342)

- Limpiar mesa con alcohol 96° y papel.
- Tener a la mano papel secante, pinzas delgadas y cajas petri con alcohol para esterilizar las pinzas entre cada muestra.
- Preparar un tubo eppendorf de 2.0 ml por cada muestra y etiquetar.

En la mesa de laboratorio:

1. Fragmentar el tejido y colocarlo en un tubo eppendorf de 2.0 ml.
2. Adicionar al tubo:

500 µl de Buffer STE

25 µl de 10 mg/ml de Proteinasa K (mantenida en el refrigerador a 4°C)

75 µl de SDS 10%

3. Agitar bien e incubar por 24 hr a 50°C (incubadora). Agitar ocasionalmente durante el tiempo de incubación.
- * Marcar tres tubos eppendorf nuevos para cada muestra (para los cambios a continuación).

CONTINUA EN LA CAMPANA DE EXTRACCIÓN

En la campana de extracción:

4. Agregar 600µl de Fenol (almacenado en el refrigerador a 4°C). Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Mezclar cada vez que las fases se separen.
5. Centrifugar a velocidad alta por 5 min.
6. Cuidadosamente, remover la capa superior (acuosa) con una micropipeta y transferir un tubo limpio. Cuidar de no alterar la interfase.
7. Repetir los pasos 4-6.
8. Agregar 600µl de cloroformo (Cl) (almacenado en el refrigerador a 4°C), mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente por 2 min. Mezclar cada minuto para evitar que las fases se separen.

9. Centrifugar a velocidad alta por 3 min.
10. Cuidadosamente, remover la capa superior (acuosa) con una micropipeta y transferir a un tubo limpio. Tener cuidado de no alterar la interfase.

CONTINUA EN LA MESA DE LABORATORIO

De regreso en la mesa de laboratorio:

11. Agregar 1/10 de la muestra (aproximadamente 45µl) de 2M NaCl y 2.5 veces el volumen de la muestra de alcohol 96% helado - al tope del tubo sin derramar (almacenado en el congelador a -20°C).
12. Precipitar el DNA a -20°C por dos horas como mínimo; de preferencia por 24 horas (cuando es poco DNA).
13. Centrifugar el precipitado por 10 min a velocidad alta. Lavar el botón de ADN una vez con alcohol al 70% (refrigerador; 100 µl) y secar en una centrífuga de vacío o en su defecto, dejar secando por 24 hr con la tapa del tubo abierta y cubierto con una toalla de papel.
14. Suspender en 100µl de ddH₂O (bombeando cuidadosamente con una micropipeta, o bien suavemente con el vórtex).
15. Almacenar el extracto (templado) a -20°C (dura años).

PROTOCOLO PARA PCRs (vol. Rx. 25 µl)

1. Preparar una "mezcla maestra" con las siguientes proporciones:

Primer 1	1.0 µl	x (# muestras + control)
Primer 2	1.0 µl	x (# muestras + control)
Buffer	2.5 µl	x (# muestras + control)
dNTPs	2.5 µl	x (# muestras + control)
MgCl ₂	0.8 µl	x (# muestras + control)
Taq Polimerasa*	0.4 µl	x (# muestras + control)

* Sacar del congelador (-20°C) el tiempo mínimo necesario.

2. Dividir el volumen resultante entre el número de muestras + 1 control y repartir en tubos de 0.2 ml previamente marcados.

3. Agregar a cada tubo (excepto al control):

1.0 µl de templado de ADN

4. Agregar a cada tubo (incluyendo control):

Agua destilada y esterilizada para completar un volumen total de 25 μ l.

5. Cerrar perfectamente los tubos para evitar evaporación de la muestra y colocar en el termociclador.

El programa de amplificación utilizado para la desnaturalización (separación de hebras), alineación (de primer y ADN) y replicación de ADN, corresponde al descrito en el apartado de métodos.

Ejemplo del cálculo para preparación de la mezcla maestra (μ l):

Muestras	ADN	Primer 1	Primer 2	dNTPs	Buffer	MgCl ₂	TaqPolimerasa	H ₂ O
1	2.0	2.0	2.0	2.5	2.5	0.8	0.4	12.8
2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
3								
control	no	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
		8.0	8.0	10	10	3.2	1.6	

Total=40.8ml / 4 muestras = 10.2 μ l de mezcla maestra por cada tubo de muestra. El ADN se agrega al final a cada tubo. Lo último en agregarse es el agua hasta completar 25 μ l.

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PCR

1. Correr el total de la muestra de reacción en un gel de agarosa.
2. Identificar las bandas en el transiluminador.
3. Fotografiar.
4. Cortar las bandas y transferirlas a tubos de 2.0 ml para purificación. En
5. caso de utilizar el método de purificación directo de PCR, correr solamente 2 μ l de muestra en el gel y reservar el resto.

Electroforesis:

- a) Cortar un gel con el número de pozos necesarios (según cantidad de muestras).
- b) colocar en la cámara de electroforesis conteniendo líquido amortiguador TAE (el gel debe sumergirse casi completamente).
- c) Marcar las muestras de PCR (2 μ l) mezclándolas con colorante azul (bromofenol) (1 gota de colorante por muestra, previamente colocada en parafilm).
- d) Agregar marcador azul en uno de los pozos del gel para calcular el peso molecular de la muestra (número de pares de bases).
- e) Tapar la cámara electroforética y correr a 97 volts, durante 20 min máximo.

Preparación de geles de agarosa:

Agarosa	0.75 g
Buffer TAE 1x	75 ml
Bromuro de etidio	6 µl

Preparación de geles de agarosa (para pozos más profundos):

Agarosa	1.0 g
Buffer TAE 1x	100 ml
Bromuro de etidio	6 µl

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DIRECTO DE PCR QIAquick

- 1) Agregar 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen del producto de PCR y mezclar.
- 2) Colocar una columna en un tubo de 2 ml.
- 3) Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar por 30-60 s a 13 rpm.
- 4) Desechar líquido filtrado. Colocar la columna en el mismo tubo.
- 5) Para lavar, adicione 0.75 ml (750 µl) de buffer PE a la columna y centrifugue por 30-60 s a 13 rpm.
- 6) Eliminar el sobrenadante y colocar la columna en el mismo tubo. Centrifugar la columna durante un minuto más a velocidad alta (14 rpm).

IMPORTANTE: El residuo de etanol del buffer PE no se removerá completamente a menos que el sobrenadante sea desechado antes de la centrifugación adicional.

- 7) Colocar la columna en un tubo limpio de 2.0 ml.
- 8) Agregar 50 µl de agua destilada y esterilizada (para evitar perder DNA) al centro de la membrana y centrifugar la columna durante 1 min. Para incrementar la concentración de DNA agregar 30 µl de buffer de elusión al centro de la membrana, dejar reposar 1 min y centrifugar.

Nota: El volumen promedio de recuperación de DNA es de 48 µl a partir de 40 µl de volumen de buffer y de 28µl a partir de 30 µl de buffer de recuperación.

La eficiencia de la elusión depende del pH. La máxima se alcanza entre pH de 7 y 8.5. Cuando se use agua bidestilada, asegurarse de que el valor de pH está entre este rango y almacenar el DNA a -20°C, dado que el DNA puede degradarse en ausencia de un agente amortiguador (buffer). La concentración de DNA purificado también puede elevarse con TE (10 mM Tris Cl 1mM EDTA pH8), pero el Edta puede inhibir las reacciones enzimáticas subsecuentes.

PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN

Limpieza (Cleaning DNA)

1) Después de PCR: agregar cada tubo 25 μ l de H₂O_{dd}, pasar la muestra a la placa y filtrar en bomba de vacío por 15 a 20 min

Nota: No tapar al filtrar porque hace vacío; colocar en columna (no filas) las muestras y registrar en una planilla.

- 2) Resuspender el DNA c/25 μ l H₂O_{dd} y poner 20 min en un removedor.
- 3) Trasladar las muestras a una placa para reacción de secuenciación.
- 4) La placa de filtrado se sella en lo usado y el resto queda disponible para usar otra vez (hasta que dejamos todo, asegurar c/sello de scotch (dimexacal) en la superficie.
- 5) Para hacer la columna de sephadex se usa placa negra pesada y placas receptoras de sephadex de tipo MAHVS4S (no confundir con las de retención en el filtrado; puede reusarse).
- 6) Agregar 300 μ l de H₂O de sephadex a cada sitio (hueco). Esperar de 20 a 25 min a que seque.
- 7) Sacar exceso de agua con centrífuga especial por 4 min.
- 8) Agregar 25 ml de H₂O_{dd} a la reacción de seq (PCR con muestras), se mezclan y trasladan a las placas c/sephadex
- 9) Centrifugar por 4 min para filtrar ADN
- 10) Deshidratar (secar muestras en centrifuga de vacío p/placas por 35 minutos, ya secas se sellan con diurex y está listo para secuenciación.

ANEXO 2.2

Estancia académica

Integrative Biology, Microbiology & Molecular Biology,
Keith A. Crandall Lab, Integrative Biology Department
Brigham Young University
3 de enero – 30 abril 2005

Plan de trabajo realizado durante la estancia

a) Instrucción formal sobre el análisis de datos en materia de Genética de poblaciones, cursando la materia:

Nombre del curso: InBio 560 – Population Genetics
Instructor: Dr. Keith A. Crandall
Nivel del curso: Posgrado

b) Aprendizaje de nuevas técnicas en biología molecular y especialización de las técnicas previamente aprendidas.

c) Análisis de datos moleculares de la tesis doctoral, para la conformación del capítulo correspondiente y estructuración final de la tesis doctoral.

PROTOSCOLOS UTILIZADOS DURANTE LA SEGUNDA ETAPA DE TRABAJO DE LABORATORIO, EFECTUADA EN EL LAB. DE BIOLOGÍA INTEGRATIVA, MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA INTEGRATIVA DE LA UNIVERSIDAD BRIGHAM YOUNG, A CARGO DEL DR. KEITH A. CRANDALL

Mezcla maestra para PCR utilizando Hotmaster Taq polimerasa (Vol. Rx. 25µl).

2.5 µl	10x Hot Buffer
4.0 µl	dNTPs
2.5 µl	Primer 1
2.5 µl	Primer 2
0.15 µl	Hotmaster Taq
3.0 µl	ADN (para muestras con baja concentración de ADN).
–	H ₂ O (la diferencia hasta alcanzar un volumen total de 25 µl)

El programa de amplificación utilizado para la desnaturalización (separación de hebras), alineación (de primer y ADN) y replicación de ADN, corresponde al descrito en el apartado de métodos correspondiente a la segunda etapa.

Muestras	ADN	Primer 1	Primer 2	dNTPs	Hot Buffer 10x	Hotmaster TaqPolimerasa	H ₂ O
1	2.0	2.0	2.0	4	2.5	0.15	12.35
2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
3	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
control	no	↓	↓	↓	↓	↓	
		8.0	8.0	16.0	10.0	0.6	

Total=42.6µl / 4 muestras = 10.65 µl de mezcla maestra por cada tubo de muestra. El ADN se agrega al final a cada tubo. Lo último en agregarse es el agua hasta completar 25 µl.

Preparación de geles de agarosa 1.5%:

Agarosa	0.9 g
Buffer TAE 1x	60 ml
Bromuro de Etidio	2 µl

Preparación de geles de agarosa (para pozos más profundos):

Agarosa	1.4 g
Buffer TAE 1x	100 ml
Bromuro de etidio	2 µl

TISSUE DIGESTION/EXTRACTION: CELL LYSIS PROTOCOL

1. Cut up tissue (25mg) into small pieces.
2. Blot tissue to remove excess ethanol. Place in labelled 2.0 ml tubes.
3. Add 800 µl Cell Lysis buffer.
4. Add 9µl Proteinase K (20mg/ml).
5. Vortex samples 15 seconds to mix.
6. Incubate at 55° until tissue is completely lysed (over night if needed) vortexing samples occasionally.
7. Vortex samples then spin tubes at 13,000 rpm for 1 minute. Undigested debris will be pelleted.
8. Transfer supernatant to new 2.0 ml tube without disturbing pellet.
9. Add 180 µl of 5M NaCl and vortex well. Solution will become frothy.
10. Spin tubes at 13,000 rpm for 5 minutes. Salted out debris will pellet.
11. Transfer supernatant to cryotubes (screw-cap).
12. Add 420 µl ice-cold isopropanol (2-propanol) to supernatant. Mix slowly by inversion 5-10 times DO NOT VORTEX. DNA fibers may be seen at this time.
13. Spin tube at 13,000 rpm for 10 minutes. DNA pellet should be visible.
14. Pour out supernatant.
15. Add 400µl 70% ethanol to wash DNA pellet. Wash 20 minutes on cell rotator at room temp.

16. Spin tubes at 13,000 rpm for 5 minutes and pour out ethanol carefully! Pellet may be loose. If pellet is loose pipette ethanol out being careful to not disturb the pellet.
17. Dry DNA pellet in speed vac on High for 10 minutes.
18. Resuspend pellet in TLE, TE or purified H₂O. If small pellet add 50 µl; if large pellet add 100 µl.
19. Let tubes stand at room temp overnight then place in -20° freezer.

DNA DIGESTION/EXTRACTION: QIAGEN DNeasy kit protocol

1. Cut up tissue (25mg) into small pieces.
2. Blot tissue to remove excess ethanol. Place in labeled 2.0 ml tubes.
3. Add 180 µl buffer ATL.
4. Add 20 µl Proteinase K.
5. Mix by vortexing.
6. Incubate at 55° on cell rotator until tissue is completely lysed (over night if needed) vortexing samples occasionally.
7. Vortex samples 15 seconds.
8. Add 200 µl buffer AL, mixing thoroughly by vortex.
9. Incubate at 70°C for 10 minutes.
10. Add 200 µl ethanol (96-100%), mixing thoroughly by vortex.
11. Pipette the mixture into DNeasy spin columns placed in 2 ml collection tube.
12. Centrifuge at 8,000 rpm for 1 min.
13. Discard flow-through from collection tube.
14. Place spin column in new collection tube (old collection tubes can be reused if needed).
15. Add 500 µl buffer AW1.
16. Centrifuge at 8,000 rpm for 1 minute.
17. Discard flow-through from collection tube.
18. Place spin column in new collection tube.
19. Add 500 µl buffer AW2.
20. Centrifuge at full speed for 3 minutes.
21. Discard flow-through and collection tube (make sure not to have the spin column touch the flow-through, the membrane needs to be dry for the next step).
22. Place spin column in clean 2.0 ml tube.
23. Pipette 200 µl buffer AE onto membrane.
24. Incubate at room temp for 1 minute.
25. Centrifuge at 8,000 rpm for 1 minute.

PCR CLEANUP MILLIPORE PLATES

1. Bring total PCR volume up to 100 µl (50 µl H₂O_{dd} cuando hay poco DNA).
2. Transfer all 100 µl of diluted PCR reaction to a Millipore 96 well clean up plate.
3. Tape up wells no being used.

4. Put plate on vacuum manifold for 10 minutes until wells are empty, making sure pressure gauge is at -24 inHg. Wells will appear shiny, so they will look slightly wet all the time.
5. Blot bottom of plate on paper towel to remove excess water.
6. Resuspend DNA with 30 μl water ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$).
7. Place plate on shaker/mixer for 10 minutes.
8. Pipette product out of wells and transfer to labeled tube or plate.

Reacción de secuenciación Big Dye v3.0

	1/4 rxn	1/8 rxn	1/16 rxn
Big Dye	2.0 μl	1.0 μl	0.50 μl
5x buffer	0.0 μl	1.5 μl	1.75 μl
Primer	1.0 μl	1.0 μl	1.0 μl
DNA	2.0 μl	2.0 μl	2.0 μl
H_2O	0.0 μl	4.5 μl	4.75 μl
Vol. Total	5.0 μl	10.0 μl	10.0 μl

Usar tanto 1/8 ó 1/16 tallas de reacción
 Usar 7-10 pmoles de primer por reacción
 Usar 30-50 ng de productos de PCR

SEPHADEX CLEANUP OF SEQUENCING REACTION

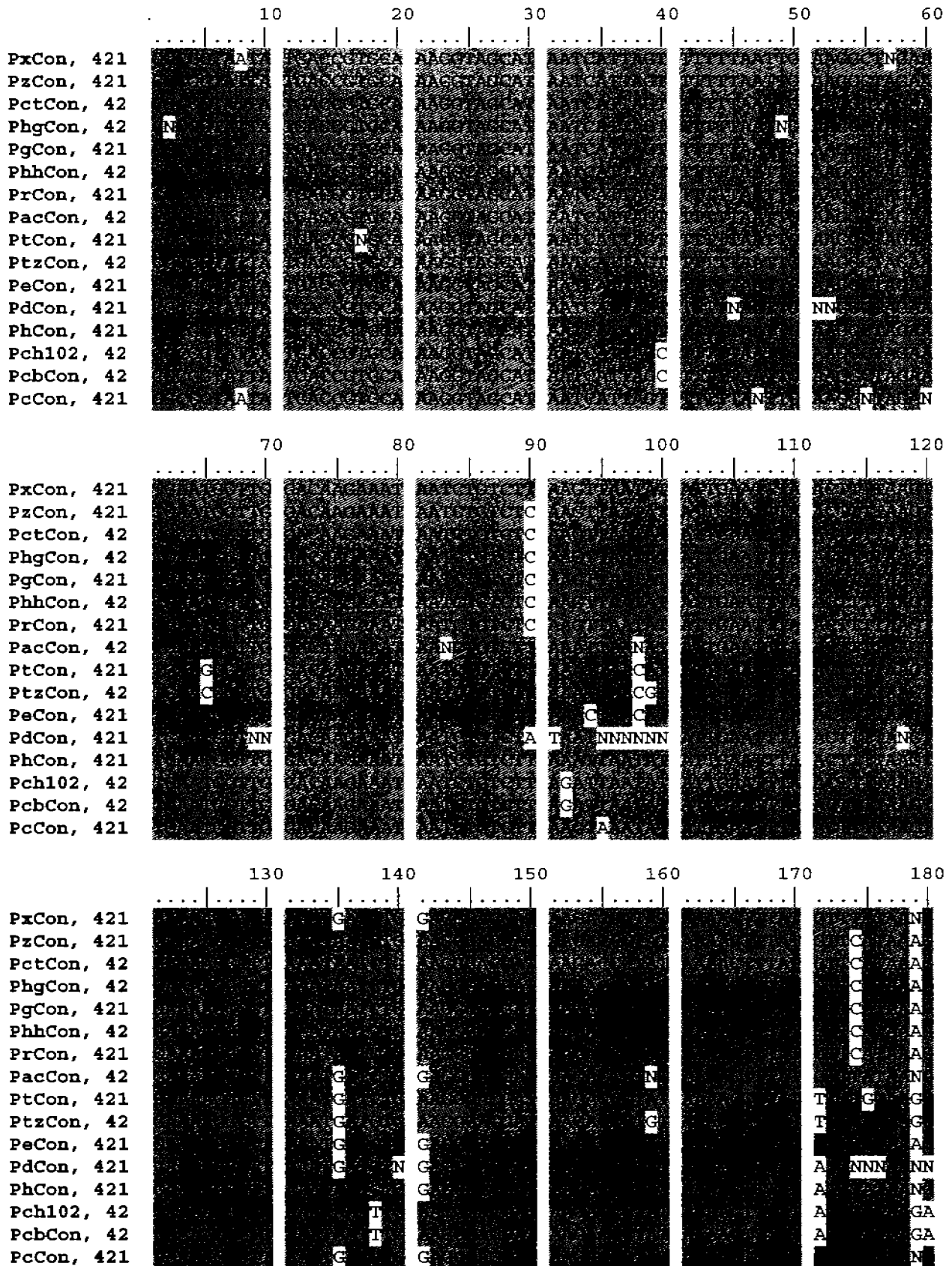
1. Obtain Millipore multiscreen filter plates (96 well). Add a used v-bottom 96 well plate to the bottom of filter plate making sure rows A-H are aligned on both plates.
2. Obtain Sephadex plate loader from DNASC.
3. Pour Sephadex on plate loader and fill all holes. Place left over sephadex back into bottle.
4. Turn filter plate upside down and slide onto plate loader. Tap plate loader to get the sephadex to fall into the wells.
5. Add 300 μl d H_2O to each well (make sure the wells are full).
6. Let plate stand for 10-15 minutes.
7. Spin plate in centrifuge (using balance plate with water) for 2 minutes at 2,500 rpm. Rotate plate 180° and spin for another 4 minutes.
8. Empty 96 well plate and place back in cupboard.
9. Add a new (labeled) v-bottom 96 well plate to filter plate making sure rows A-H are aligned on both plates.
10. Add 10-20 μl d H_2O to sequencing reaction.
11. Transfer all sequencing samples to filter plate.

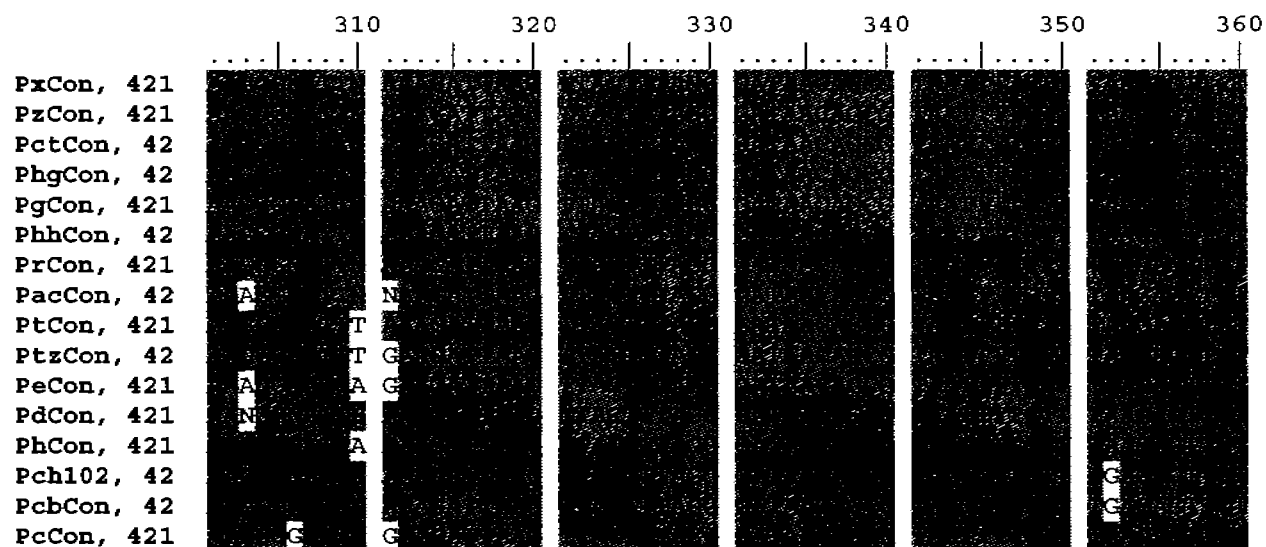
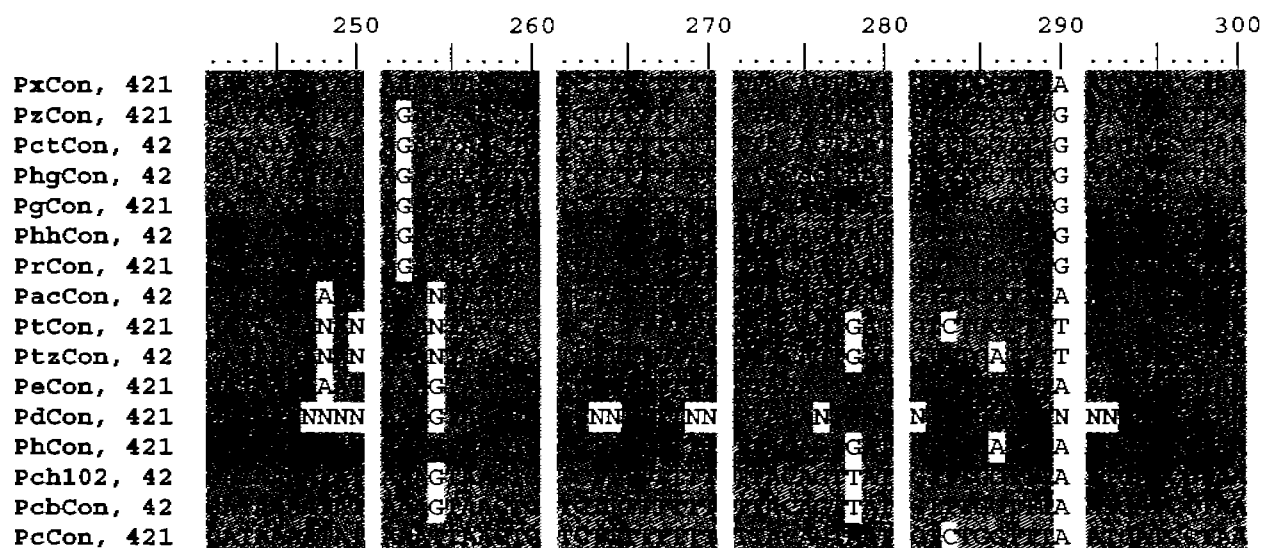
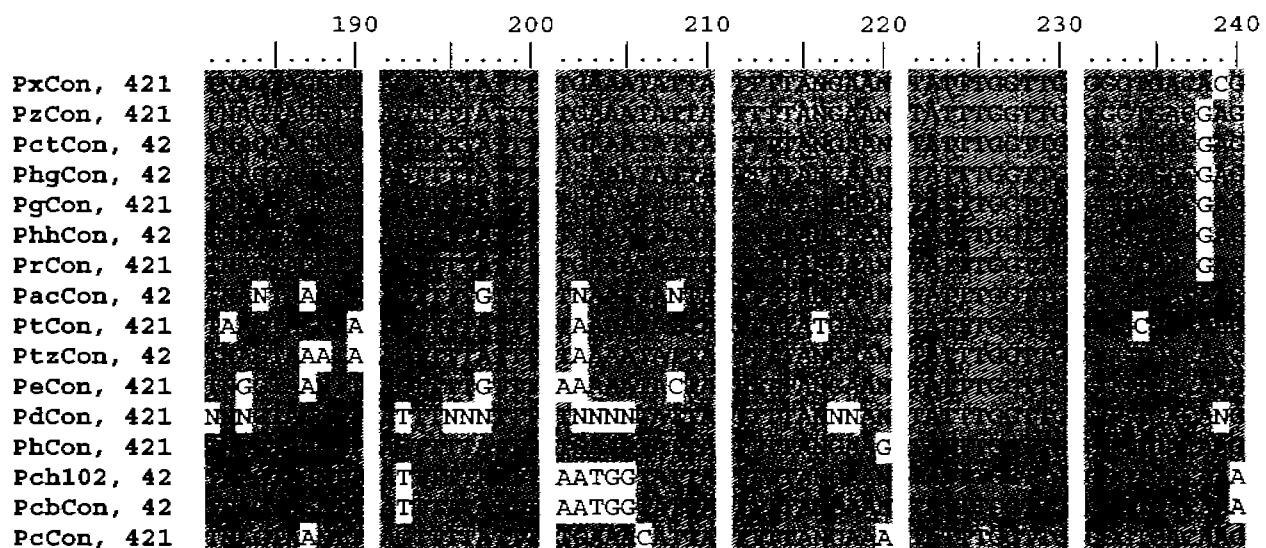
12. Spin plate for 2 minutes at 2,500 rpm. Rotate plate 180° and spin for another 2 minutes.
13. Dry samples in Vacufuge at 60° for 30 minutes (15 min). Make sure to use balance plate.
14. Cover plate and mark off all unused wells.
15. Write DNA sequence submission number on plate and cover.
16. Place plate in DNASC fridge.

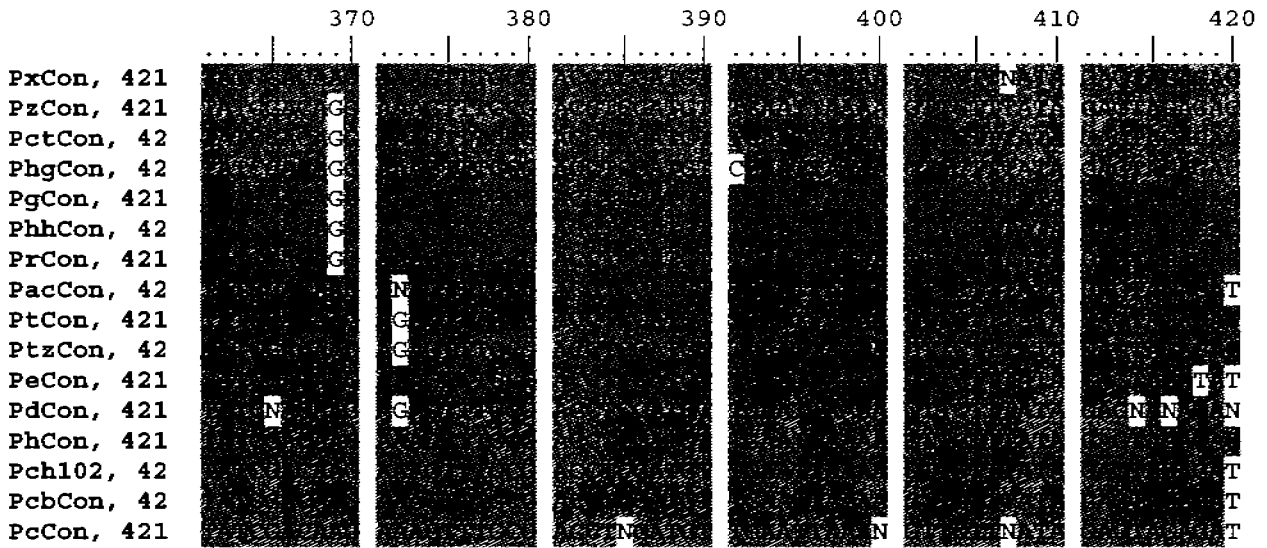
*En caso de hacer uso de estas técnicas, favor de citar esta tesis como fuente.

ANEXO 2.3

Alineamiento de secuencias del gen 16S ADN mitocondrial







PxCon, 421
PzCon, 421
PctCon, 42
PhgCon, 42
PgCon, 421
PhhCon, 42
PrCon, 421
PacCon, 42
PtCon, 421
PtzCon, 42
PeCon, 421
PdCon, 421
PhCon, 421
Pch102, 42
PcbCon, 42
PcCon, 421

CAPÍTULO 3. ESTRUCTURA JERÁRQUICA Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

La capacidad de reconstruir los eventos históricos que han dado lugar a la estructura actual de las poblaciones naturales, es una de las principales metas de los biólogos de poblaciones. La situación geográfica actual de una población puede atribuirse a una colonización o expansión de rango a partir de otra población, después de lo cual su estructura genética puede ser afectada por diversos factores, tales como una subsecuente disminución de rango, subdivisión, dispersión, migración, selección y el sistema de apareamiento. Aunque es posible predecir el patrón de diferenciación genética consecuencia de cada uno de estos procesos, no siempre es posible identificar aquellos procesos que han contribuido a la estructura genética actual, dado que es más de un proceso el que puede estar involucrado (Good *et al.*, 1997). Durante largo tiempo se ha reconocido que la diversidad genética presente en una especie está estructurada jerárquicamente. Así, además de las diferencias entre los individuos de una población, pueden existir también diferencias entre poblaciones dentro de una región geográfica dada, entre poblaciones de diferentes regiones geográficas y entre regiones geográficas enteras (Holsinger y Mason-Gamer, 1996). La *F* estadística de Wright (o sus derivaciones), fue introducida como una manera de valorar la diferenciación genética en cada uno de estos niveles, al igual que el método descrito por Excoffier *et al.* (1992). Sin embargo, aunque valiosos, estos y otros métodos pueden tener ciertas limitantes. Muchos modelos que examinan diferentes aspectos de la estructura de población asumen que las poblaciones están en equilibrio con respecto a la deriva génica, la migración y la mutación, pero esta condición puede no mantenerse si las poblaciones se han subdividido recientemente o si la tasa de mutación es alta (Good *et al.*, 1997). Asimismo, como con cualquier análisis de varianza,

el investigador debe especificar la estructura jerárquica de los datos antes de comenzar el análisis, es decir, se requiere imponer una estructura jerárquica predeterminada sobre los datos, en lugar de inferirla. Esto hace que estos métodos sean poco adecuados para identificar la estructura jerárquica que mejor refleje el patrón de diferenciación genética entre las poblaciones (Holsinger y Mason-Gamer, 1996).

Una alternativa es la estimación de un árbol de haplotipos a partir de la variación en el conjunto de datos de secuencias y su transformación en una serie de clados (ramas) anidados (Templeton *et al.*, 1987; 1992; Templeton y Sing, 1993) que constituyan un arreglo estadístico evolutivo. Este diseño anidado puede ser utilizado para buscar asociaciones geográficas y el procedimiento simple para hacerlo es mediante el análisis de contingencia anidada, en el cual, cada localización geográfica es considerada una variable categórica. Mientras la F_{st} estadística puede no detectar ninguna asociación geográfica, ésta es revelable cuando el árbol de haplotipos es usado para generar un diseño estadístico anidado (Templeton, 1998), permitiendo separar la estructura poblacional de la historia poblacional. Este método ha sido ampliamente implementado (Abbott y Double, 2003; Contreras-Dias *et al.*, 2003; Cuenca *et al.*, 2003; de Brito *et al.*, 2002; Mun *et al.*, 2003) y ha permitido esclarecer patrones y procesos históricos concernientes a diversas especies de acociles (Fetzner y Crandall, 2003; Buhay y Crandall, en prensa).

Como se ha mencionado previamente, el subgénero de acociles *Villalobosus* se distingue por reflejar un patrón geográfico particular que limita la distribución de sus especies a una región relativamente pequeña en comparación con otros subgéneros de acociles mexicanos. En este estudio, se efectuó el análisis de clados anidados con objeto de establecer

si existe correlación entre el grado de diversificación genética y la distancia geográfica de las especies, de manera que esto refleje un proceso de invasión o dispersión dado.

Hipótesis

La estructura jerárquica refleja un patrón de variabilidad genética que agrupa a las especies del subgénero *Villalobosus* en tres grupos dentro de tres regiones geográficas distintas.

Método

a) Muestras

Se recolectaron muestras de tejido abdominal y branquial de 95 ejemplares de acociles de los subgéneros *Villalobosus*, *Ortmannicus* y *Procambarus*, provenientes de 27 localidades (Tabla 3.1). Todos los ejemplares fueron recolectados en campo, utilizando trampas con cebo o bien manualmente (ver detalles en la sección de método del Capítulo 4), con excepción de las especies *Procambarus* (*Procambarus*) *diguetti*, *Procambarus* (*Villalobosus*) *hortonhobbsi* y *Procambarus* (*Villalobosus*) *zihuatlensis*, cuyas muestras de tejido fueron tomadas de ejemplares inventariados en la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR). El ADN genómico total fue extraído y un fragmento de 540 pares de bases del gen 16S ADN_m fue amplificado y secuenciado usando los iniciadores (primers) y protocolos previamente descritos en el Capítulo 2. Como ahí se ha referido, el trabajo de laboratorio se llevó a cabo en dos etapas, la primera en el Laboratorio de Biología Molecular 3, del Instituto de Biología de la UNAM, a cargo de la Dra. Virginia León Rêgagnon y la segunda etapa en el laboratorio de Biología Integrativa, Microbiología y Biología Molecular, del

Departamento de Biología Integrativa de la Universidad Brigham Young, en Provo, Utah, E.U., a cargo del Dr. Keith A. Crandall.

b) *Análisis filogeográfico*

Se implementó un Análisis de Clados Anidados para probar la hipótesis nula de no diferenciación genética entre los sitios muestreados y proporcionar una luz sobre los procesos históricos. El programa TCS (Clement *et al.*, 2000) fue utilizado para construir las redes de haplotipos de secuencias (parsimonia estadística) y el programa GeoDIS (Posada *et al.*, 2000) se empleó para probar las asociaciones significativas entre los sitios de localización geográfica de las especies (secuencias) y las distancias genéticas entre ellas, con base en 5000 permutaciones al azar (un mínimo de 1000 permutaciones es recomendado para un análisis con un 95% de nivel de confianza). Para el análisis geográfico se utilizaron las coordenadas geográficas (latitud y longitud) de las localidades donde habitan las especies de los tres subgéneros involucrados en el estudio (*Villalobosus*, *Ortmannicus* y *Procambarus*). Los haplotipos con la mayoría de conexiones y las más altas frecuencias son considerados los más antiguos, mientras que los haplotipos en las puntas de los clados son los más recientes. Las distancias de los clados (D_c) representan los rangos geográficos de los clados en cada paso-nivel. Las distancias de clados anidados (D_n) representan las distancias promedio de las muestras con un haplotipo particular, con respecto al centro geográfico del clado. La inferencia sobre procesos históricos que han dado origen al patrón genético actual se obtuvo utilizando la Clave de Inferencia 2005 (Templeton *et al.*, 1995; Anexo 3.1).

Tabla 3.1. Lista de taxa de los subgéneros *Villalobosus*, *Ortmannicus* y *Procambarus*, localidades muestreadas, haplotipo del gen 16S de ADNm con el número de individuos en paréntesis, clados anidados de 3-pasos en que se agrupa y cuenca a la que pertenece. (*) representa la localidad tipo.

Especies	Localidad	Haplotipo (# indiv/sec)	Clado de 3 pasos	Cuenca
<i>P. achilli</i>	Xochicoatlán, Hgo.	54 (1)	3-16	Río Pánuco
<i>P. achilli</i>	Chalma, Hgo.	65(1)	ind	Río Pánuco
<i>P. caballeroi</i>	Arroyo Tenango de las Flores, Hgo.	64(1), 73(1)	ind	Río Tecolutla
<i>P. contrerasi</i>	La Unión, Pue.	6(1), 8(1), 52(1)	3-6, 3-5, 3-18	Río Cazonces
<i>P. contrerasi</i>	La Unión, Pue. (pocitas)	25 (1), 27 (1)	3-6	Río Cazonces
<i>P. cuetzalanoe</i>	Cuetzalan, Pue. (tanque)	22(1), 36(1), 42(1)	3-4, 3-9, 3-10	Río Tecolutla
<i>P. cuetzalanoe</i>	Cuetzalan, Pue. (poza)	37(1), 38(1)	3-9	Río Tecolutla
<i>P. chacalli</i>	Dejigui, Ver.*	42(1), 67(1)	3-10, ind	Río Tuxpan
<i>P. digueti</i>	Hidalgo (CNCR)	53(1)	3-18	Río Cazonces
<i>P. digueti</i>	El Platanal, Mich. (CNCR)	66(1)	ind	Río Lerma
<i>P. erichsoni</i>	Tenango de Doria, Hgo.*	42(1), 48(1), 49(1), 50(1), 51(1), 69(1)	3-10, 3-14, 3-16, ind	Río Tuxpan
<i>P. erichsoni</i>	San Cornelio, Hgo.	4(1), 71(1)	3-6, ind	Río Tuxpan
<i>P. gonopodocristatus</i>	Paso Largo 1, Ver.*	5(1), 9(1)	3-6	Río Nautla
<i>P. gonopodocristatus</i>	Paso Largo 1, Ver. (CNCR)	29(1), 63(1)	3-1, ind	Río Nautla
<i>P. hidalgoensis</i>	Tlanchinol, Hgo.*	59(1), 72(1)	ind	Río Pánuco
<i>P. hoffmanni</i>	Necaxa, Pue.*	11(1), 13(1), 14(1), 15(1), 18(1), 22(1), 33(1), 42(1), 56(1), 57(1)	3-2, 3-3, 3-4, 3-7, 3-10, 3-15	Río Tecolutla
<i>P. hoffmanni</i>	Presa Tenango de las Flores, Hgo.	12(1), 17(1)	3-2, 3-3	Río Tecolutla
<i>P. hortonhobbsi</i>	El Coyular, Pue.* (CNCR)	39(2)		Río Cazonces
<i>P. riojai</i>	Chichicaxtle, Hgo.	2(1), 21(1), 23(1), 34(1), 41(1), 42(4)	3-7, 3-4, 3-6, 3-10	Río Tuxpan
<i>P. riojai</i>	El Salto, Agua Blanca, Hgo.	3(1), 30(1), 42(8)	3-1, 3-7, 3-10	Río Tuxpan
<i>P. riojai</i>	Sta. Ana Tzacuala, Hgo.	7(1), 19(1), 20(1), 22(1), 26(1), 31(1)	3-1, 3-6, 3-4, 3-5	Río Cazonces
<i>P. riojai</i>	La Bóveda, Ver.	26(1), 28(1)	3-5	
<i>P. tezuttkanensis</i>	Chignautla, Pue.	42(1), 43(1), 44(1), 45(1), 62(1)	3-10, ind	Río Nautla
<i>P. tlapacoyanensis</i>	Portezuela, Ver.	46(1), 47(1)	3-11, 3-12	Río Nautla
<i>P. xochitlanae</i>	Xochitlán, Pue.	35(2)	3-8	Río Nautla
<i>P. zihuatlensis</i>	La Magdalena, Pue.	1(2)	3-6	Río Cazonces
<i>P. zihuatlensis</i>	La Unión, Pue. (CNCR)	32(1)	3-1	Río Cazonces

ind= haplotipo independiente. CNCR = Colección Nacional de Crustáceos (muestra proveniente de ejemplares inventariados).

Resultados

La red de haplotipos de parsimonia estadística resultó en 73 haplotipos únicos geográficamente divididos a lo largo del rango de distribución del subgénero *Villalobosus* (Fig. 3.1, Tabla 3.1). El conjunto de datos fue subdividido en 4 redes. La primera subred conecta los haplotipos 42 al 47, involucrando 8 de las 23 localidades muestreadas (Chignautla, Necaxa y Cuetzalan (tanque) en Puebla, Chichicaxtle, El Salto y Tenango de Doria en Hidalgo, Dejigui y Portezuelo en Veracruz). El haplotipo 42 es el más grande en el árbol de redes, involucrando 18 secuencias de 6 especies de 7 diferentes localidades. La segunda subred conecta los haplotipos 48 al 55, correspondientes a 4 localidades (Tenango de Doria, Hgo., Xochicoatlán, Hgo., La Unión, Pue. y una localidad referida en la etiqueta únicamente como "estado de Hidalgo" para el caso de los ejemplares inventariados de *Procambarus* (*Procambarus*) *digueti*). La tercera subred está conformada por los haplotipos 56 y 57, situados geográficamente en Necaxa, Pue. La cuarta subred, la más grande, conecta los haplotipos 1 al 41 distribuidos a lo largo de 16 localidades dentro del rango de distribución del subgénero *Villalobosus*. El análisis de clados anidados generó un diseño estadístico de 4 clados de 5 pasos, sugiriendo como inferencia significativa el "flujo génico restringido con aislamiento por distancia" (clado 5-4; Figs. 3.3, 3.4). No obstante, ciertos valores muy bajos pero diferentes de $P \geq 0.0000$ (Anexo 3.2), podrían sugerir fragmentación alopatrica dados los clados restringidos por distribuciones parcialmente sin sobreposicionamiento conectados por un mayor número de pasos. En el resto de los casos, los resultados no son concluyentes.

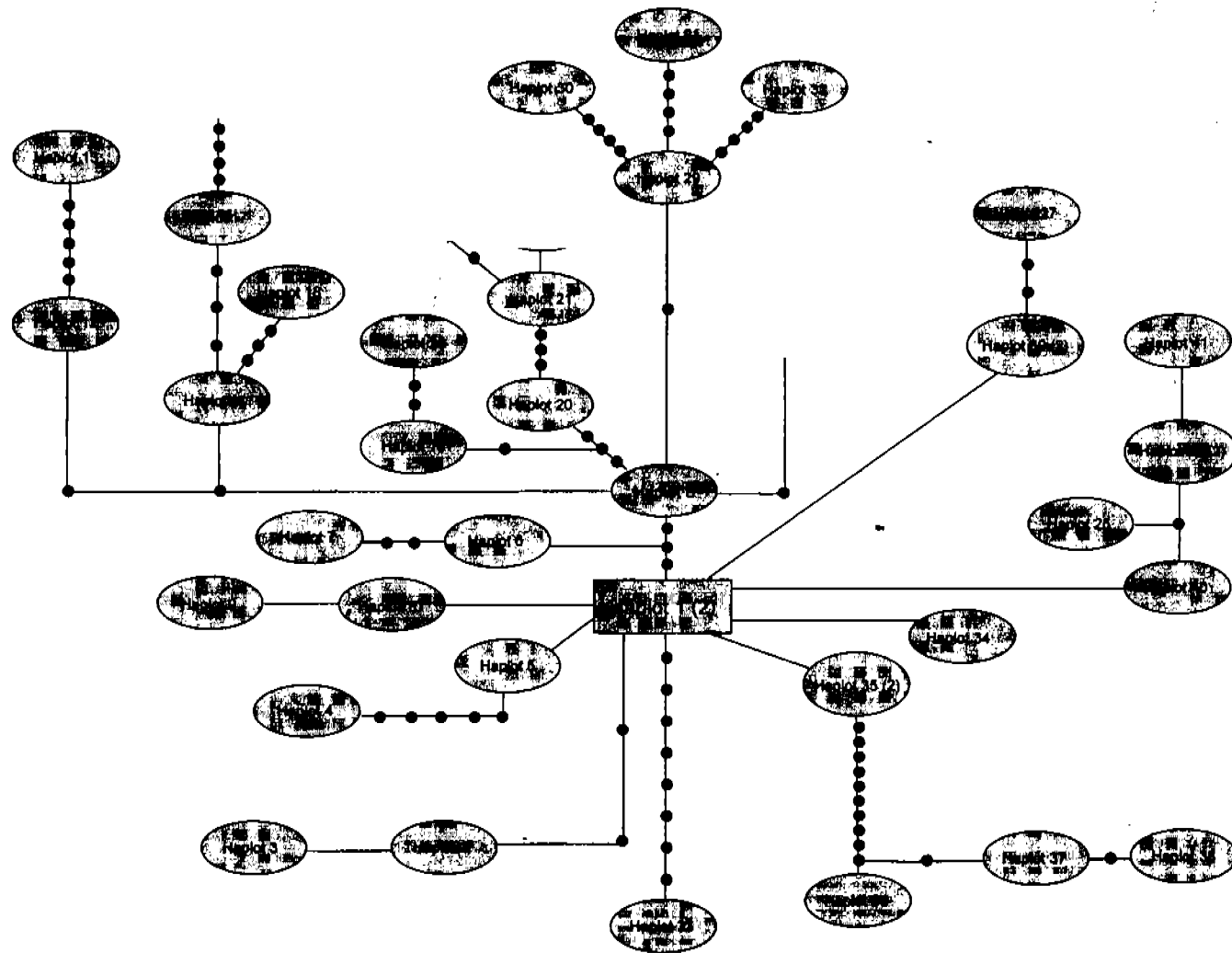


Fig. 3.1. Red de haplotipos de parsimonia estadística.

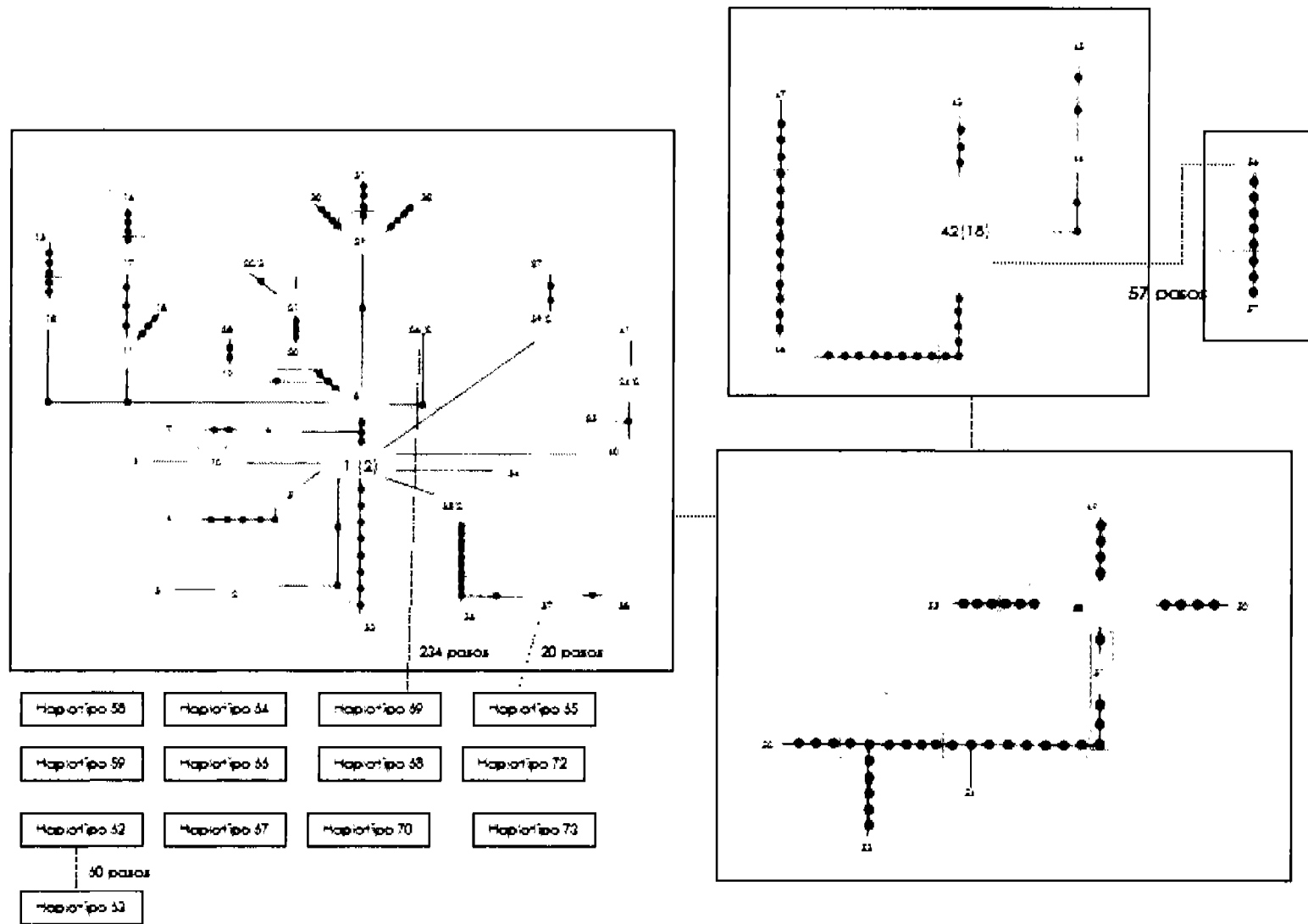


Fig. 3.2. Red de haplotipos del gen 16S de ADNm mostrando los niveles de anidación utilizados para inferir procesos históricos.

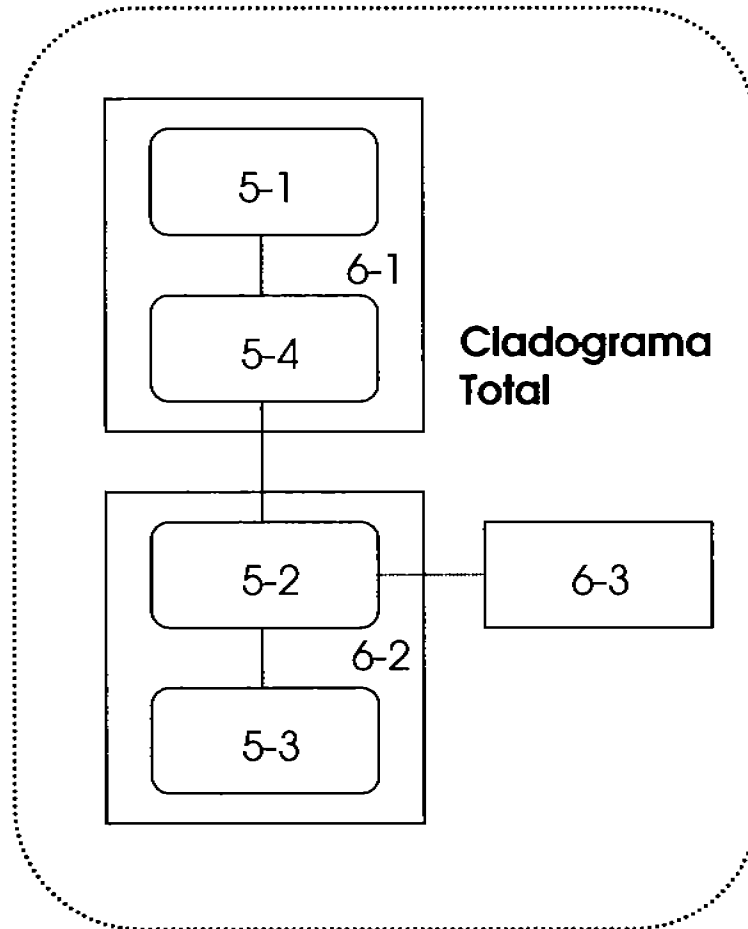


Fig. 3.3. Cladograma total mostrando los clados anidados de 5 y 6 pasos.

y/o una insuficiente divergencia de caracteres que permitan delinear los eventos de separación.

No obstante, la restricción del flujo génico con aislamiento por distancia parece ser el principal mecanismo para la variación dentro de las especies de acociles del subgénero *Villalobosus*. De manera análoga a un modelo de islas, es presumible que grandes poblaciones fueron separadas en muchas subpoblaciones dispersadas geográficamente como consecuencia de la conformación final de la región sur de la Sierra Madre Oriental, previo a lo cual las conexiones hidrológicas fueron mayores. Cada subpoblación, todavía asumida grande, pudo ignorar inicialmente la deriva génica al azar. Sin embargo, la migración en las poblaciones actuales es más compleja de lo que supone el modelo de islas. En la naturaleza se esperaría que los migrantes provengan inicialmente de poblaciones cercanas. Debido a los efectos de la migración sobre la diferenciación genética de poblaciones, altas densidades de población propiciarían una tasa de migración baja y una substancial diferenciación genética entre las poblaciones (Hartl y Clark, 1997). La relativamente reciente orogenia Hidalguense, es el evento geológico que debió propiciar una nueva subdivisión de las poblaciones y propiciar la separación de las especies conformando el subgénero *Villalobosus*.

Resalta cómo poca migración ha sido requerida para prevenir una divergencia genética importante entre algunas poblaciones de alta densidad, particularmente *Procambarus (Villalobosus) riojai*. Sin embargo, las diferencias genéticas reflejadas entre las poblaciones representan los primeros pasos hacia la especiación y son importantes para la evolución de las especies dado que proveen una posible base para la selección intergrupala de sistemas genéticos, proporcionando un mecanismo más

efectivo para el avance adaptativo de las especies bajo entrecruzamiento al azar. El análisis pone en evidencia que los procesos de especiación continúan sucediendo como consecuencia de eventos que propiciaron la subdivisión de las poblaciones y la restricción del flujo génico, propiciando entrecruzamiento al azar. El hecho de que las poblaciones de las diferentes especies en estudio comparten uno o más haplotipos ancestrales, es evidencia de posible endogamia sucediendo al interior de las subpoblaciones, disminuyendo la heterozigosidad.

ANEXO 3.1

Inference Key for the Nested Haplotype Tree Analysis of Geographical Distances, 11 November 2005.

Start with haplotypes nested within a 1-step clade and work up to clades nested within the total tree. If the tree is not rooted through an outgroup or if none of the clades nested at the total tree level have the sum of the outgroup probabilities of their haplotypes greater than or equal to 0.95, regard all clades nested at the total tree level as tips. When rooting is deemed reliable, interiors should also refer to the older clades in a nesting category, and tips to their evolutionary descendants.

This key is applied only if there are some significant values for Dc, Dn, or I-T within the nesting clade. If there are no statistically significant distances within the clade, the null hypothesis of no geographical association of haplotypes cannot be rejected (either panmixia in sexual populations, extensive dispersal in non-sexual populations, small sample size, or inadequate geographical sampling). In that case, move on to another clade at the same or higher level.

1. Are all clades within the nesting clade found in separate areas with no overlap?

- NO - Go to step 2.
- YES - Go to step 19.

2. Is at least one of the following conditions satisfied?

a. The Dc's for one or more tips are significantly small and the Dc's for one or more

of the interiors are significantly large or non-significant.

b. The Dc's for one or more tips are significantly small or non-significant and the

Dc's for some but *not* all of the interiors are significantly small.

c. The Dc's for one or more interiors are significantly large and the Dc's for the tips

are either significantly small or non-significant

d. The I-T Dc is significantly large.

- NO - Go to step 11.
- YES - Go to step 3.
- Tip/Interior Status Cannot be Determined - **Inconclusive Outcome.**

3. Is at least one of the following conditions satisfied?

- a. Some Dn and/or I-T Dn values are significantly reversed from the Dc values.
- b. One or more tip clades show significantly large Dn's.
- c. One or more interior clades show significantly small Dn's.
- d. I-T has a significantly small Dn with the corresponding Dc value non-significant.
 - NO - Go to step 4.
 - YES - Go to step 5.

4. Are both of the following conditions satisfied?

a. The clades (or 2 or more subsets of them) with significantly small Dc or Dn values have ranges that are completely or mostly non-overlapping with the other clades

in the nested group (particularly interiors).

b. The pattern of completely or mostly non-overlapping ranges in the above condition represents a break or reversal from lower level trends within the nested

clade series (applicable to higher-level clades only).

- NO - **Restricted Gene Flow with Isolation by Distance (Restricted Dispersal by Distance in Non-sexual species)**. This inference is strengthened if the clades with restricted distributions are found in diverse locations, if the union of their ranges roughly corresponds to the range of one or more clades (usually interiors) within the same nested group (applicable only to nesting clades with many clade members or to the highest level clades regardless of number), and if the Dc values increase and become more geographically widespread with increasing clade level within a nested series (applicable to lower level clades only).
- YES - Go to step 9.

5. Are both of the following conditions satisfied?

a. The clades (or 2 or more subsets of them) with significantly small Dc values have ranges that are completely or mostly non-overlapping with the other clades in the nested group (particularly interiors).

b. The pattern of completely or mostly non-overlapping ranges in the above condition represents a break or reversal from lower level trends within the nested clade series (applicable to higher-level clades only).

- NO - Go to step 6.
- YES - Go to step 15.

6. Do clades (or haplotypes within them) with significant reversals or significant Dn

values without significant Dc values define two or more geographically concordant subsets.

- No - Go to step 7.
- YES - Go to step 13.
- TOO FEW CLADES (< 2) TO DETERMINE CONCORDANCE - **Insufficient Genetic Resolution to Discriminate between Range Expansion/Colonization and Restricted Dispersal/Gene Flow** - Proceed to step 7 to determine if the geographical sampling is sufficient to discriminate between short versus long distance movement.

7. Are the clades with significantly large Dn's (or tip clades in general when Dn for I-T is significantly small) separated from the other clades by intermediate geographical areas that were sampled?

- NO - Go to step 8.
- YES - **Restricted Gene Flow/Dispersal but with some Long Distance Dispersal.**

8. Is the species absent in the non-sampled areas?

- NO - **Sampling Design Inadequate to Discriminate between Isolation by Distance (Short Distance Movements) versus Long Distance Dispersal**
- YES - **Restricted Gene Flow/Dispersal but with some Long Distance Dispersal over Intermediate Areas not Occupied by the Species; or Past Gene Flow Followed by Extinction of Intermediate Populations.**

9. Are the different geographical clade ranges identified in step 4 separated by areas that have not been sampled?

- NO - **Allopatric Fragmentation.** (If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.)
- YES - Go to step 10.

10. Is the species absent in the non-sampled areas?

- NO - **Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation and Isolation By Distance.**
- YES - **Allopatric Fragmentation.** (If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.)

11. Is at least one of the following conditions satisfied?

- a. The Dc value(s) for some tip clade(s) is/are significantly large.
- b. The Dc value(s) for all interior(s) is/are significantly small.
- c. The I-T Dc is significantly small.
 - NO - Go to step 17
 - YES - **Range Expansion**, go to step 12.

12. Are the Dn and/or I-T Dn values significantly reversed from the Dc values?

- NO - **Contiguous Range Expansion**.
- YES - Go to step 13.

13. Are the clades with significantly large Dn's (or tip clades in general when Dn for I-T is significantly small) separated from the geographical center of the other clades by intermediate geographical areas that were sampled?

- NO - Go to step 14.
- YES - **Long Distance Colonization Possibly Coupled with Subsequent Fragmentation** (subsequent fragmentation is indicated if the clades displaying restricted but at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps) **or Past Fragmentation Followed by Range Expansion**. To see if secondary contact is involved, perform the supplementary tests given in Templeton, *Molecular Ecology* 10: 779-791, 2001. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.

14. Is the species present in the intermediate geographical areas that were not sampled?

- YES - **Sampling Design Inadequate to Discriminate between Contiguous Range Expansion, Long Distance Colonization, and Past Fragmentation**.
- NO - **Long Distance Colonization and/or Past Fragmentation** (not necessarily mutually exclusive). If inferred at a high clade level, fragmentation rather than colonization is inferred if the clades displaying restricted but at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps. If the branch lengths are short, a colonization event is inferred, perhaps associated with recent fragmentation. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.

15. Are the different geographical clade ranges identified in step 5 separated by areas that have not been sampled?

- NO - **Past Fragmentation and/or Long Distance Colonization** (not necessarily mutually exclusive). If inferred at a high clade level, fragmentation rather than colonization is inferred if the clades displaying restricted but at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps. If the branch lengths are short, a colonization event is inferred, perhaps associated with recent fragmentation. To discriminate the type of movement leading to this pattern, go to step 21.
- YES - Go to step 16.

16. Is the species present in the intermediate geographical areas that were not sampled?

- YES - Go to step 18.
- NO - **Allopatric Fragmentation**. If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.

17. Are either of the following conditions satisfied?

- a. The Dn values for tip or some (but not all) interior clades are significantly small.
 - b. The Dn for one or more interior clades is/are significantly large.
 - c. The I-T Dn value is significantly large.
- NO - **Inconclusive Outcome**.
 - YES - Go to step 4.

18. Are the clades found in the different geographical locations separated by a branch length with a larger than average number of mutational steps.

- NO - **Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation, Range Expansion, and Isolation By Distance**.
- YES - **Geographical Sampling Scheme Inadequate to Discriminate Between Fragmentation and Isolation By Distance**.

19. Is the species present in the areas between the separated clades?

- NO - **Allopatric Fragmentation**. If inferred at a high clade level, additional confirmation occurs if the clades displaying restricted by at least partially non-overlapping distributions are mutationally connected to one another by a larger than average number of steps.
- YES - Go to step 20.

20. Was the species sampled in the areas between the separated clades?

- NO – **Inadequate Geographical Sampling.**
- YES – Go to step 2.

21. Are all of the following true?

a. Is it biologically realistic that the organism could have undergone long-distance movement?

b. Are the nested haplotypes that mark a potential long-distance colonization event within a clade that shows evidence of population growth by other methods (such as mismatch distributions)?

c. At the level of the entire cladogram, does the clade *not* inferred to have produced long-distance colonization *not* show evidence of past population growth with other methods?

- YES – **Long-distance movement.**
- NO – Insufficient evidence to discriminate between long-distance movements of the organism and the combined effects of gradual movement during a past range expansion and fragmentation. If the case against long-distance movement is compelling, then the inference is **past gradual range expansion followed by fragmentation.**

ANEXO 3.2

Differentiating population structure from history - Geodis 2.4
 (c) Copyright, 1999-2005 David Posada and Alan Templeton
 Contact: David Posada, University of Vigo, Spain (dposada@uvigo.es)

Input file: C:\Documents and
 Settings\Marilu\Escritorio\Marilú\Doctorado\Biología Molecular\Análisis
 TCS y Geodis\VillalgeodisUx.doc

Villalgeodis

Wed Jan 04 22:09:53 GMT 2006

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 1-20
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 3.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 1-20	18 00'48"	-92 04'16"
41	20 21'04"	-98 18'11"
24	17 52'60"	-91 43'30"

CLADE 41 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	703.4579	1.0000	0.3318

CLADE 24 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	132.7692	0.6580	0.6738
NESTED CLADE	136.9860	0.3318	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	132.7692	0.6580	0.6738
NESTED CLADE	-566.4719	0.3318	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 1-24
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 2.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 1-24	17 57'33"	-93 29'04"
9	20 08'12"	-96 56'15"
10	17 14'00"	-92 19'60"

CLADE 9 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	435.8544	1.0000	0.5058

CLADE 10 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	146.1419	0.5058	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	-289.7125	0.5058	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 1-26
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 2.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
----------------------	----------	-----------

Clade 1-26	20 20'35"	-98 20'04"
3	20 20'02"	-98 22'09"
2	20 21'04"	-98 18'11"

CLADE 3 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	3.7617	1.0000	0.5058

CLADE 2 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	3.3853	0.5058	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	-0.3763	0.5058	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 1-32
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 15.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0988

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 1-32	19 25'16"	-94 14'55"
5	20 08'12"	-96 56'15"
1	20 29'01"	-98 22'01"
34	20 21'04"	-98 18'11"
40	18 00'60"	-88 46'60"

CLADE 5 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	292.1114	0.2034	1.0000

CLADE 1 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.0988	1.0000
NESTED CLADE	445.9357	0.5896	0.5092

CLADE 34 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
------------------	----------	---------	---------

WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	435.9584	0.4118	0.7976

CLADE 40 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	595.7631	1.0000	0.1976

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.0988	1.0000
NESTED CLADE	8.9781	0.4172	0.6140

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 2-1
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 4.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 2-1	18 29'11"	-93 08'57"
1-20	18 00'48"	-92 04'16"
1-21	20 29'01"	-97 42'01"

CLADE 1-20 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	166.8003	0.2438	1.0000
NESTED CLADE	224.7259	0.2438	1.0000

CLADE 1-21 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	525.7037	0.7532	0.4906

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-166.8003	1.0000	0.2438
NESTED CLADE	300.9778	0.7532	0.4906

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 2-2
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 3.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.3318

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 2-2	20 29'02"	-98 08'42"
1-18	20 29'01"	-97 42'01"
1-19	20 29'02"	-98 22'02"

CLADE 1-18 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	46.2706	1.0000	0.3318

CLADE 1-19 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.3318	1.0000
NESTED CLADE	23.1353	0.3318	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.3318	1.0000
NESTED CLADE	-23.1353	0.3318	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 2-3
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 4.5500

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.8052

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 2-3	18 54'18"	-93 58'44"
1-32	19 25'16"	-94 14'55"
1-24	17 57'33"	-93 29'04"

CLADE 1-32 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	485.7992	1.0000	0.1000

NESTED CLADE	496.5443	1.0000	0.1000
CLADE 1-24 (Tip)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	218.5700	0.7118	0.3882
NESTED CLADE	275.4140	0.1000	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	267.2292	0.4798	0.6202
NESTED CLADE	221.1303	1.0000	0.1000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 2-4
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 3.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 2-4	18 24'49"	-98 10'11"
1-16	20 29'00"	-97 42'00"
1-17	17 38'15"	-98 20'45"

CLADE 1-16 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	235.1263	0.6738	0.6580

CLADE 1-17 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	413.1577	0.6580	0.6738
NESTED CLADE	371.0017	0.6580	0.6738

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-413.1577	0.6738	0.6580
NESTED CLADE	-135.8754	0.6738	0.6580

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 2-5
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 2.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 2-5	16 22'12"	-97 54'48"
1-22	20 29'00"	-97 42'00"
1-23	10 11'60"	-98 14'00"

CLADE 1-22 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	457.5009	0.5058	1.0000

CLADE 1-23 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	686.2942	1.0000	0.5058

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	-228.7933	0.5058	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 2-7
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 2.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 2-7	17 38'15"	-98 20'45"
1-13	20 07'00"	-98 23'00"
1-14	10 11'60"	-98 14'00"

CLADE 1-13 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	275.4377	0.5058	1.0000

CLADE 1-14 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	826.3175	1.0000	0.5058

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	550.8798	1.0000	0.5058

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 2-15
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 2.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 2-15	20 17'07"	-97 15'51"
1-2	20 08'12"	-96 56'15"
1-3	20 29'00"	-97 42'00"

CLADE 1-2 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	37.8547	0.5058	1.0000

CLADE 1-3 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	50.4273	1.0000	0.5058

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	-12.5725	0.5058	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 2-39
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 3.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.3318

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 2-39	16 00'02"	-98 16'23"
1-11	10 11'60"	-98 14'00"
1-12	20 21'04"	-98 18'11"

CLADE 1-11 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	644.4044	1.0000	0.3318

CLADE 1-12 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.3318	1.0000
NESTED CLADE	483.3028	0.3318	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.3318	1.0000
NESTED CLADE	-161.1016	0.3318	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-1
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 0.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-1	17 24'34"	-97 32'10"

2-13	10 11'60"	-98 14'00"
2-14	20 20'02"	-98 22'09"
2-15	20 08'12"	-96 56'15"

CLADE 2-13 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	804.4031	1.0000	0.3318

CLADE 2-14 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	336.4782	0.6582	0.6722

CLADE 2-15 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	309.4465	0.3302	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	-260.9941	0.3302	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-2
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 8.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.1602

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-2	20 14'58"	-97 50'02"
2-12	20 17'03"	-97 44'00"
2-11	20 11'60"	-97 58'00"
2-8	20 12'15"	-97 59'15"

CLADE 2-12 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	11.1661	0.2500	1.0000

CLADE 2-11 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000

NESTED CLADE	14.8911	0.5048	0.7462
CLADE 2-8 (Interior)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.1602	1.0000
NESTED CLADE	16.7843	1.0000	0.1602

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.1602	1.0000
NESTED CLADE	4.9871	1.0000	0.0822

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-3
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 2.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-3	20 12'03"	-97 58'14"
2-10	20 12'15"	-97 59'15"
2-9	20 11'60"	-97 58'00"

CLADE 2-10 (Tip)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	1.8170	1.0000	0.5058

CLADE 2-9 (Interior)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	0.4038	0.5058	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	-1.4132	0.5058	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-4
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 2.4000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-4	16 50'07"	-97 58'58"
2-39	18 09'45"	-97 55'58"
2-6	10 11'60"	-98 14'00"

CLADE 2-39 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	356.6053	0.3286	1.0000
NESTED CLADE	444.1179	0.3286	1.0000

CLADE 2-6 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	737.6128	1.0000	0.3286

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-356.6053	1.0000	0.3286
NESTED CLADE	293.4950	1.0000	0.3286

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-5
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 0.8333

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-5	18 05'13"	-98 14'38"
2-7	17 38'15"	-98 20'45"
2-4	18 24'49"	-98 10'11"

CLADE 2-7 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	413.1577	0.8094	0.5888
NESTED CLADE	388.5119	0.7068	0.6914

CLADE 2-4 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	333.9448	0.6914	0.7068
NESTED CLADE	356.8077	0.6914	0.7068

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-79.2129	0.5888	0.8094
NESTED CLADE	-31.7042	0.6914	0.7068

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-6
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 59.7024

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0158

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-6	19 05'15"	-95 03'30"
2-16	20 23'05"	-98 18'11"
2-3	18 54'18"	-93 58'44"
2-5	16 22'12"	-97 54'48"
2-2	20 29'02"	-98 08'42"
2-1	18 29'11"	-93 08'57"

CLADE 2-16 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	368.5916	0.5852	0.4734

CLADE 2-3 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	418.4983	0.7774	0.2226
NESTED CLADE	422.8467	0.6768	0.3232

CLADE 2-5 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	549.0182	1.0000	0.0064
NESTED CLADE	607.7987	0.9628	0.0436

CLADE 2-2 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	30.8471	0.1334	0.8716
NESTED CLADE	358.2702	0.4188	0.5826

CLADE 2-1 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	282.3599	0.3438	0.6572
NESTED CLADE	377.0949	0.4620	0.5390

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	186.4966	0.6368	0.3632
NESTED CLADE	6.1088	0.5380	0.4620

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-7
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 3.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-7	20 17'42"	-98 12'53"
2-17	20 20'35"	-98 20'04"
2-18	20 12'15"	-97 59'15"

CLADE 2-17 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	3.5636	0.3302	1.0000
NESTED CLADE	13.7333	0.3302	1.0000

CLADE 2-18 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	25.7499	1.0000	0.3302

NO INTERIOR/TIP CLADES EXIST IN THIS GROUP

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-9
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 3.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.3318

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-9	20 00'11"	-97 31'04"
2-22	20 00'14"	-97 31'02"
2-23	20 00'10"	-97 31'05"

CLADE 2-22 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	0.1133	1.0000	0.3318

CLADE 2-23 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.3318	1.0000
NESTED CLADE	0.0378	0.3318	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	0.3318
NESTED CLADE	0.0755	1.0000	0.3318

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-10
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 14.8750

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.4364

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-10	20 17'42"	-98 06'55"
2-27	19 49'02"	-97 23'04"
2-28	19 49'02"	-97 23'04"
2-26	20 22'54"	-98 14'51"

CLADE 2-27 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
------------------	----------	---------	---------

WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	92.9113	1.0000	0.1974
CLADE 2-28 (Tip)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.1880	1.0000
NESTED CLADE	92.9113	1.0000	0.0300
CLADE 2-26 (Interior)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	30.8837	0.0082	0.9946
NESTED CLADE	40.9275	0.0028	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	30.8837	0.3832	0.6196
NESTED CLADE	-51.9837	0.0028	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-14
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 4.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-14	20 32'23"	-98 23'16"
2-32	20 32'01"	-98 24'01"
2-33	20 33'00"	-98 21'60"
2-34	20 33'00"	-98 21'60"
2-31	20 33'00"	-98 21'60"

CLADE 2-32 (Tip)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	1.4783	0.2500	1.0000

CLADE 2-33 (Interior)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	2.4637	1.0000	0.7462

CLADE 2-34 (Tip)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000

NESTED CLADE	2.4637	1.0000	0.7506
CLADE 2-31 (Tip)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	2.4637	1.0000	0.7532

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	0.3285	1.0000	0.7462

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 3-18
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 2.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 3-18	20 11'24"	-98 14'48"
2-37	20 07'00"	-98 23'00"
2-38	20 29'00"	-97 42'00"

CLADE 2-37 (Tip)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	16.4166	0.5058	1.0000

CLADE 2-38 (Tip)			
TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	65.6081	1.0000	0.5058

NO INTERIOR/TIP CLADES EXIST IN THIS GROUP

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 4-1
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 17.0250

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.2466

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 4-1	17 46'42"	-98 00'16"
3-1	18 18'48"	-97 35'03"
3-4	16 50'07"	-97 58'58"
3-5	18 05'13"	-98 14'38"

CLADE 3-1 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	360.1334	0.5068	0.4998
NESTED CLADE	399.4685	0.4906	0.5160

CLADE 3-4 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	493.0337	0.7174	0.2844
NESTED CLADE	458.7400	0.7034	0.2984

CLADE 3-5 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	370.1569	0.4358	0.5720
NESTED CLADE	390.9967	0.4154	0.5924

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-69.7167	0.3672	0.6330
NESTED CLADE	-44.0347	0.4110	0.5892

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 4-2
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 0.7500

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 4-2	20 14'12"	-97 52'11"
3-2	20 14'58"	-97 50'02"
3-3	20 12'03"	-97 58'14"

CLADE 3-2 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	12.9725	0.8014	0.6014
NESTED CLADE	13.6170	0.9358	0.4670

CLADE 3-3 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.6607	0.6656	0.7372
NESTED CLADE	11.2494	0.4670	0.9358

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-12.3118	0.6014	0.8014
NESTED CLADE	-2.3676	0.4670	0.9358

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 4-3
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 14.7712

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.4970

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 4-3	19 07'41"	-95 09'51"
3-6	19 05'15"	-95 03'30"
3-7	20 17'42"	-98 12'53"

CLADE 3-6 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	402.0506	0.4636	0.5406
NESTED CLADE	400.4477	0.3928	0.6114

CLADE 3-7 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	17.8769	0.1260	0.8782
NESTED CLADE	344.3711	0.3486	0.6556

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	384.1737	0.8626	0.1416
NESTED CLADE	56.0766	0.5620	0.4422

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 4-6
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 0.3125

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 4-6	20 32'27"	-98 23'07"
3-14	20 32'23"	-98 23'16"
3-16	20 33'00"	-98 21'60"

CLADE 3-14 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	1.8478	1.0000	0.8008
NESTED CLADE	1.9163	0.8008	1.0000

CLADE 3-16 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	2.1900	1.0000	0.8008

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-1.8478	0.8008	1.0000
NESTED CLADE	0.2737	1.0000	0.8008

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 4-7
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 3.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 1.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 4-7	20 26'48"	-98 25'38"

3-17	20 46'03"	-98 39'11"
3-18	20 11'24"	-98 14'48"

CLADE 3-17 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	1.0000	1.0000
NESTED CLADE	42.6781	0.6580	0.6738

CLADE 3-18 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	26.2549	0.3318	1.0000
NESTED CLADE	44.7164	0.6738	0.6580

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-26.2549	1.0000	0.3318
NESTED CLADE	-2.0383	0.6580	0.6738

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 4-8
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 5.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.1922

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 4-8	19 59'18"	-97 33'41"
3-8	19 58'08"	-97 37'09"
3-9	20 00'11"	-97 31'04"

CLADE 3-8 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.1922	1.0000
NESTED CLADE	6.4220	1.0000	0.0986

CLADE 3-9 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0566	0.0986	1.0000
NESTED CLADE	4.8162	0.0986	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-0.0566	0.3918	0.7068

NESTED CLADE 1.6058 1.0000 0.0986

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 5-1
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 16.4286

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0132

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 5-1	18 41'44"	-97 57'41"
4-2	20 14'12"	-97 52'11"
4-1	17 33'58"	-98 01'42"

CLADE 4-2 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	12.9969	0.0008	0.9992
NESTED CLADE	171.8899	0.0516	0.9484

CLADE 4-1 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	432.4464	0.9780	0.0220
NESTED CLADE	375.3834	0.9776	0.0224

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	419.4495	0.9886	0.0114
NESTED CLADE	203.4935	0.9776	0.0224

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 5-2
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 0.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0000

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 5-2	20 13'22"	-97 57'45"
4-4	19 52'09"	-97 13'01"
4-5	20 17'42"	-98 06'55"

CLADE 4-4 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	0.0000	0.1652	1.0000
NESTED CLADE	87.1715	1.0000	0.0034

CLADE 4-5 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	48.9023	0.0034	1.0000
NESTED CLADE	56.0682	0.0034	1.0000

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	48.9023	0.5494	0.4540
NESTED CLADE	-31.1033	0.0034	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 5-3
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 8.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0750

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 5-3	20 29'19"	-98 24'31"
4-6	20 32'27"	-98 23'07"
4-7	20 26'48"	-98 25'38"

CLADE 4-6 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	1.9467	0.0210	1.0000
NESTED CLADE	6.4249	0.0210	1.0000

CLADE 4-7 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	43.8105	1.0000	0.0210
NESTED CLADE	44.4035	1.0000	0.0210

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	-41.8638	0.0210	1.0000
NESTED CLADE	-37.9786	0.0210	1.0000

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 5-4
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 25.0000

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0244

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 5-4	19 17'45"	-95 37'54"
4-3	19 07'41"	-95 09'51"
4-8	19 59'18"	-97 33'41"

CLADE 4-3 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	398.5709	0.9992	0.0008
NESTED CLADE	390.2239	0.9994	0.0006

CLADE 4-8 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	5.5044	0.0012	0.9988
NESTED CLADE	216.0739	0.0106	0.9894

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB.<=	PROB.>=
WITHIN CLADE	393.0665	1.0000	0.0000
NESTED CLADE	174.1500	0.9962	0.0038

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 6-1
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 25.8975

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0578

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 6-1	19 07'05"	-96 22'25"
5-1	18 44'32"	-97 56'35"
5-4	19 17'45"	-95 37'54"

CLADE 5-1 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	283.8258	0.3000	0.7000
NESTED CLADE	321.6040	0.4136	0.5864

CLADE 5-4 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	356.2513	0.6094	0.3906
NESTED CLADE	342.0576	0.5402	0.4598

NO INTERIOR/TIP CLADES EXIST IN THIS GROUP

PERMUTATION ANALYSIS OF Clade 6-2
BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 23.1632

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.0022

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Clade 6-2	20 19'51"	-98 08'06"
5-2	20 12'53"	-97 55'59"
5-3	20 29'19"	-98 24'31"

CLADE 5-2 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	63.0464	0.9598	0.0402
NESTED CLADE	60.3698	0.9274	0.0726

CLADE 5-3 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	27.5241	0.0792	0.9208
NESTED CLADE	45.1366	0.1964	0.8036

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	-35.5223	0.0718	0.9282
NESTED CLADE	-15.2332	0.1558	0.8442

PERMUTATION ANALYSIS OF Total Cladogram
 BASED ON 5000 RESAMPLES

PART I. PERMUTATIONAL CONTINGENCY TEST:

OBSERVED CHI-SQUARE STATISTIC = 70.9521

THE PROBABILITY OF A RANDOM CHI-SQUARE BEING GREATER THAN
 OR EQUAL TO THE OBSERVED CHI-SQUARE = 0.1800

PART II. GEOGRAPHIC DISTANCE ANALYSIS:

GEOGRAPHICAL CENTERS	LATITUDE	LONGITUDE
Total Cladogram	19 33'50"	-97 01'31"
6-1	19 07'33"	-96 23'09"
6-2	20 19'52"	-98 08'40"
6-3	20 12'15"	-97 59'15"

CLADE 6-1 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	334.1911	0.9816	0.0184
NESTED CLADE	295.8945	0.9734	0.0266

CLADE 6-2 (Interior)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	52.3723	0.0028	0.9972
NESTED CLADE	145.5842	0.0128	0.9872

CLADE 6-3 (Tip)

TYPE OF DISTANCE	DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	0.0000	0.0490	1.0000
NESTED CLADE	123.1383	0.3082	0.7010

PART III. TEST OF INTERIOR VS. TIP CLADES:

TYPE OF DISTANCE	I-T DISTANCE	PROB. <=	PROB. >=
WITHIN CLADE	-267.8942	0.0066	0.9934
NESTED CLADE	-143.1122	0.0190	0.9810

** ANALYSIS FINISHED **
 It took 6.2190 seconds.

CAPÍTULO 4. DESCRIPCIÓN DE HISTORIAS DE VIDA

La teoría de historia de vida está directamente vinculada con la selección natural, la adecuación, la adaptación y la coacción. Contribuye al pensamiento evolutivo con el análisis de las causas fenotípicas de variación en la adecuación y expone la marcada tensión entre la adaptación y la coacción. Esta teoría se considera necesaria para entender la acción de la selección natural, un elemento central de la evolución y comprender cómo otros elementos centrales, como la variación genética, serán expresados. La evolución de las características de historia de vida y sus plasticidades, determina la dinámica de la población de especies interactuantes; su análisis se centra en la variación fenotípica que produce la selección, la expresión de la variación genética que capacita una respuesta a la selección y la coacción de linajes específicos con los cuales interactúa la selección para producir la diversidad observada de historias de vida (Stearns, 1992).

Para que ocurra la selección natural se requieren dos condiciones: una genotípica y una fenotípica. La primera implica que la variabilidad heredable para la característica en cuestión determina si habrá una respuesta a la selección. La segunda, que los individuos deben variar en la adecuación, dado que esa variación entre los individuos es la selección natural. Estas condiciones se complementan entre sí. La teoría de historia de vida analiza qué causa las diferencias en la adecuación entre diferentes historias de vida, mientras que la genética de poblaciones analiza las consecuencias que esas diferencias en adecuación tienen sobre las frecuencias de genes (Stearns, 1992).

Debido a que los acociles son poiquilotérmicos, es probable que la temperatura sea el factor primario de influencia sobre algunos eventos de

su historia de vida (Richards *et al.*, 1996; Whitmore y Huryn, 1999). Se ha observado, por ejemplo, que la temperatura del agua puede explicar bajas tasas de crecimiento (Belchier *et al.*, 1998) o las diferencias estacionales en el tiempo de la primera muda del macho, tiempo que varía también geográficamente y de acuerdo al hábitat (Richards *et al.*, 1996). Momot (1984) observó que los acociles de altas latitudes o altitudes en regiones templadas generalmente viven más tiempo y maduran más tarde que aquellos en climas cálidos, debido a los largos períodos en que la temperatura es baja incluso para el crecimiento y desarrollo. Se ha documentado que la plasticidad de las historias de vida existe básicamente por las características ambientales de los sitios en donde viven los diferentes animales, lo cual no excluye a los acociles y como éste es un rasgo que permite conocer el papel de la selección natural sobre las historias de vida, en el presente capítulo se muestra cómo las condiciones ambientales de cada arroyo y río, además de ser específicas para el subgénero e influir en la dinámica poblacional de las diferentes especies, también determina la variación de algunas características de historia de vida como la talla y el número de los huevos de las diferentes especies.

Hipótesis

- El patrón de la variación de la historia de vida en el subgénero *Villalobosus* puede ser interpretado en términos de diferencias en la talla y número de huevos, así como la talla en la madurez.
- La talla y el número de huevos así como la talla en la madurez son características que actúan como mecanismo de especialización y adaptación de las especies a un cierto régimen de temperatura, determinando su diversificación.

Método

Se realizaron recolectas de las diferentes especies de acociles del subgénero *Villalobosus* en 23 localidades (Ver tabla 4.1), durante los meses de noviembre-diciembre de 2002; y febrero-marzo, mayo-junio y agosto-septiembre de 2003, con la finalidad de obtener registros de la presencia de hembras ovígeras. Los organismos fueron capturados utilizando redes de acuario, pequeñas trampas con pollo o pescado como cebo, o bien, manualmente. Algunos ejemplares se mantuvieron vivos en condiciones de laboratorio y otros fueron conservados en alcohol al 70% y sexados. La identificación se basó en las claves sugeridas por Villalobos (1955), Hobbs (1972) y Hobbs (1989). Durante cada recolecta se consideraron las siguientes características de historia de vida:

- Talla total y talla del caparazón de los machos
- Talla total y talla del caparazón de las hembras
- Número y tamaño de los huevos
- Temporalidad de eventos reproductivos

Con el objeto de relacionarlo con las características referidas, durante cada período se cuantificaron los valores de oxígeno disuelto, salinidad y temperatura del agua al momento de la recolecta con un oxímetro YSI modelo 5100 (± 0.01 mg/l; $\pm 0.01\%$; $\pm 0.01^\circ\text{C}$); el pH se midió con papel indicador marca Whatman; la profundidad con una sondaleza y la velocidad de la corriente con un correntímetro General Oceanics Modelo 2035-MK III (± 0.2 m/s). La altitud se midió con un altímetro de pulso marca Casio con precisión de ± 5 m y se utilizaron dos geoposicionadores, Garmin GPS 45XL y Magellan GPS 315 ($\pm 0.001'$), para ubicar la latitud y longitud de los sitios de colecta. La búsqueda de relaciones entre las variables se efectuó aplicando el análisis estadístico de regresión lineal simple con los datos como lo sugieren Sokal y Rohlf (1981). Mediante un análisis de

regresión múltiple utilizando el método de paso a paso de acuerdo con Sokal y Rohlf (1981), se estimaron las relaciones entre las características de historia de vida y las propiedades de los adultos y la relación de éstos con respecto a las variables ambientales. Adicionalmente se midieron los valores de alcalinidad a través de la concentración de CaCO_3 y se estimó la cantidad de materia orgánica en sedimento para cada sitio de muestreo, con la finalidad de realizar un análisis de la estructura del hábitat de estas especies y su relación con las historias de vida. Un análisis de cluster (k-means clustering) se efectuó con objeto de visualizar los sitios conformando los diferentes tipos de hábitat posibles para las especies del subgénero *Villalobosus* y aquéllos para las especies del subgénero *Ortmannicus* como grupo externo. Ambos análisis se implementaron mediante el programa Statistica (StatSoft, Inc., 1998)

Resultados

a) Se efectuaron recolectas durante los meses de noviembre y diciembre de 2002; y en febrero, marzo, mayo, junio, agosto y septiembre de 2003 en los diversos sitios en que habitan las especies involucradas en este estudio, obteniendo datos de las variables abióticas y morfométricas (Ver detalles en Tabla 4.1). Los valores de estas últimas son ilustrados mediante histogramas de frecuencia (Fig. 4.1 – 4.5), sólo con el objeto de mostrar en qué etapa de crecimiento se encuentran los organismos capturados y suponer la temporada del año en que se esperaba encontrar hembras ovadas. Esto es, en el período de noviembre-diciembre se observó el mayor número de cópulas *in situ*; en febrero-marzo se encontraron hembras ovadas para la mayoría de las especies y se observaron cópulas y obtuvieron hembras ovadas en condiciones de laboratorio; durante agosto-septiembre la incidencia de hembras con juveniles adheridos a los pleópodos o en vida libre aumentó (Tabla 4.2).

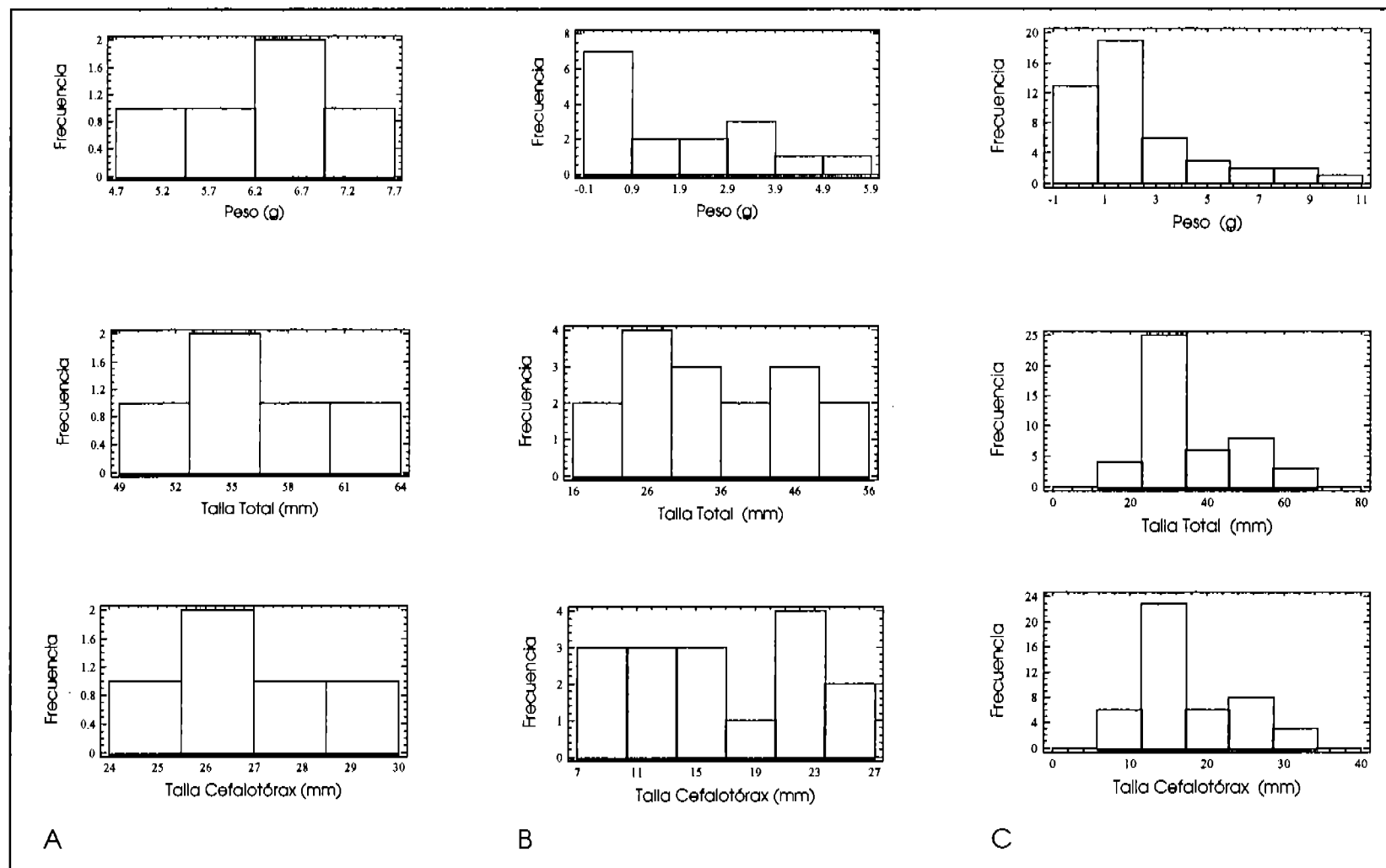


Fig. 4.1. Histogramas de frecuencia de peso, talla total y talla del cefalotórax de acociles de las localidades de A, Chichicaxtle, Hgo.; B, Chignautla, Pue. y C, Cuetzalan, Pue.

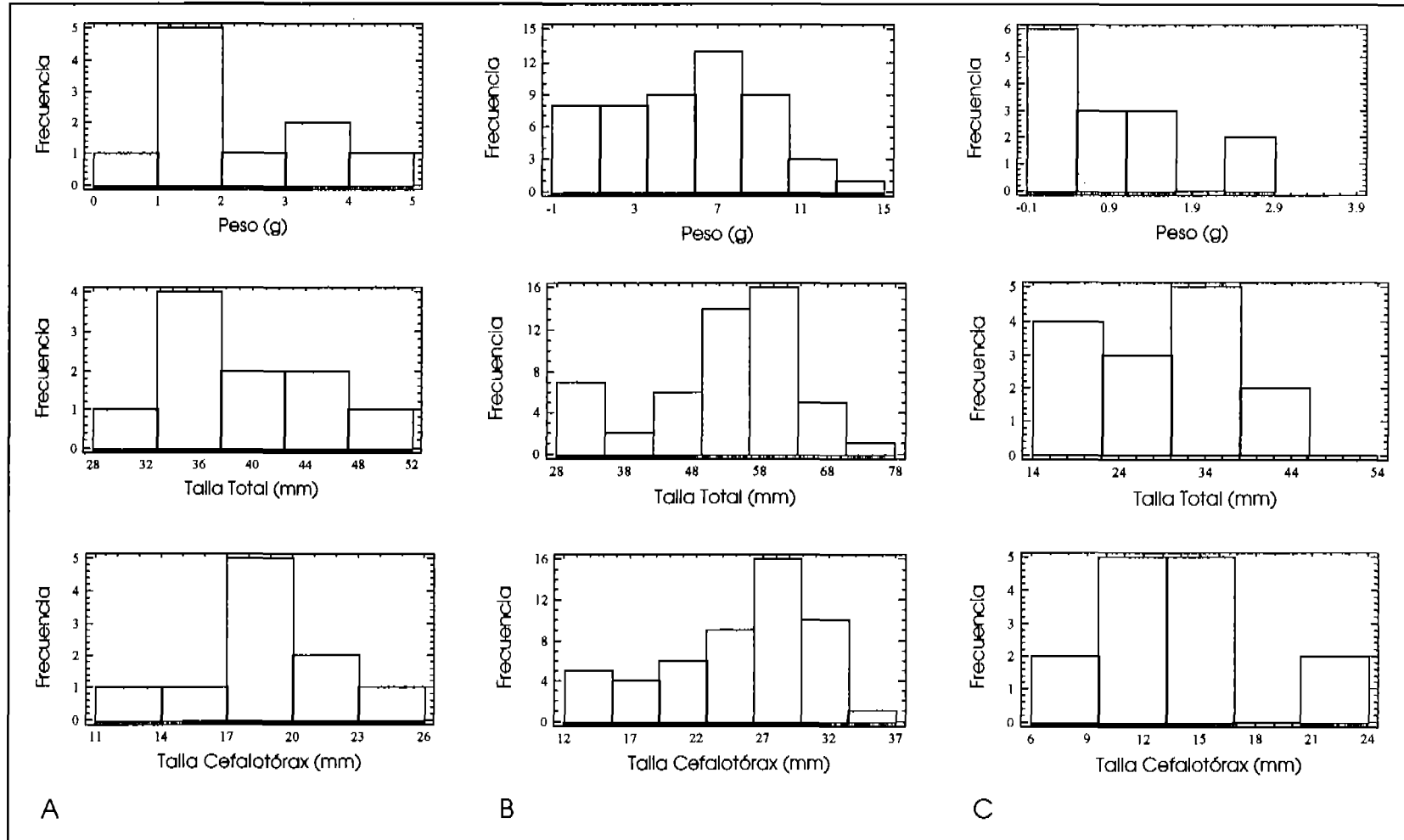


Fig. 4.2. Histogramas de frecuencia de peso, talla total y talla del cefalotórax de acociles de las localidades de A, Dejgúl, Huayacocotla, Ver.; B, El Salto, Agua Blanca, Hgo. y C, La Unlón, Pue.

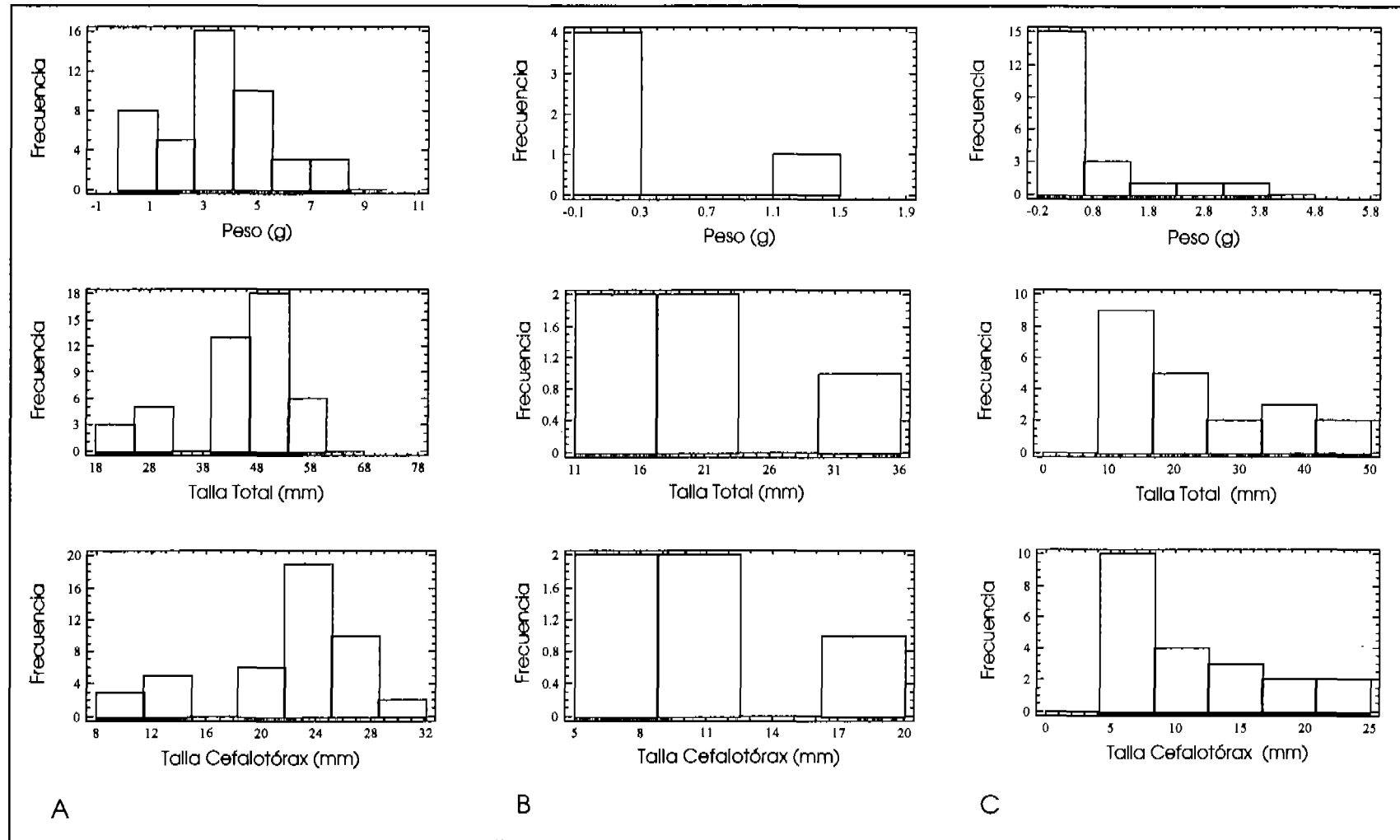


Fig. 4.3. Histogramas de frecuencia de peso, talla total y talla del cefalotórax de acociles de las localidades de A, Necaxa, Pue.; B, Paso Largo 1, Ver. y C, Portezuelo, Tlapacoyan, Ver.

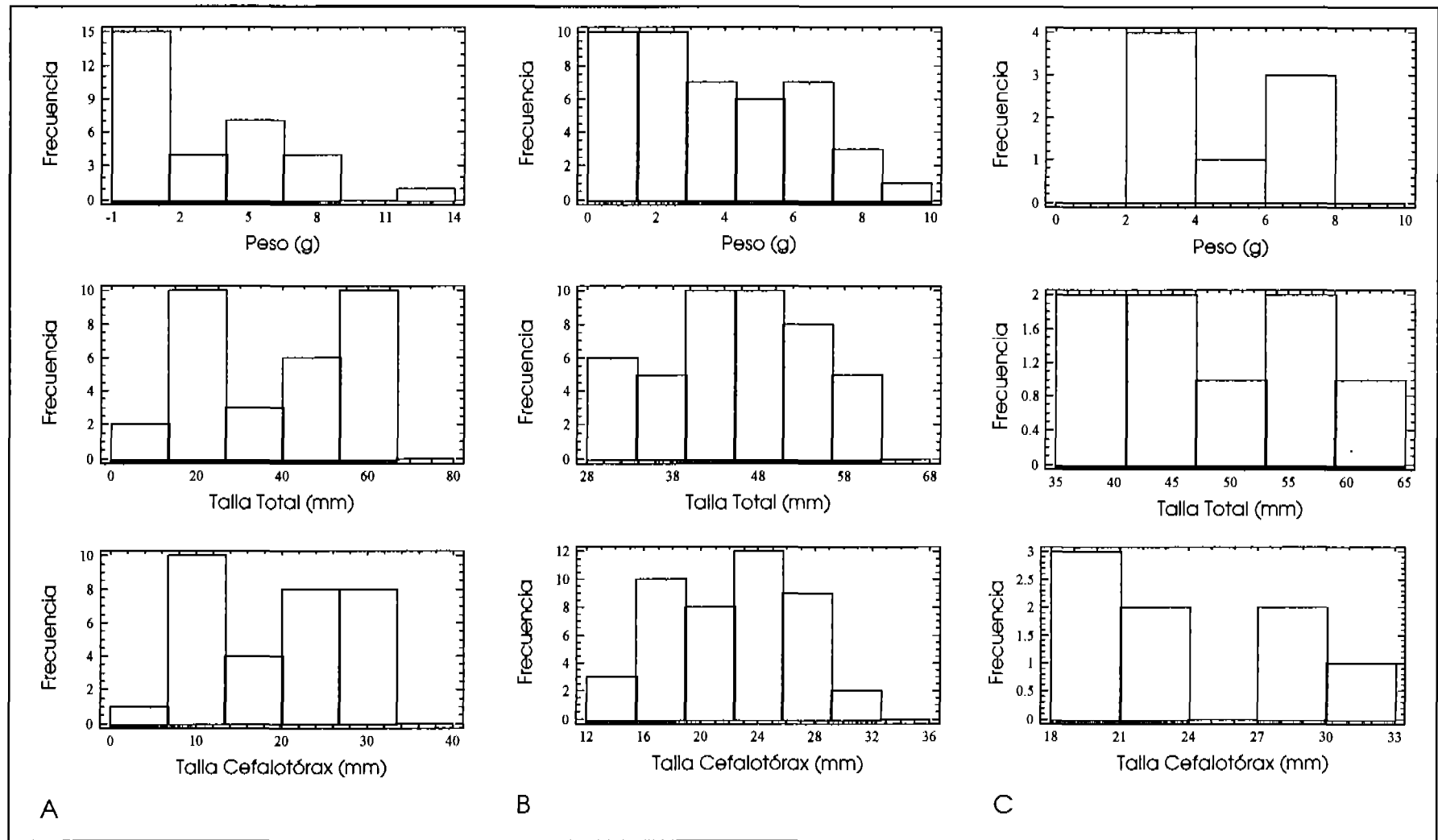


Fig. 4.4. Histogramas de frecuencia de peso, talla total y talla del cefalotórax de acociles de las localidades de A, Tenango de las Flores, Pue. (Presa); B, San Cornello, Hgo. y C, Tenango de Dorla, Hgo.

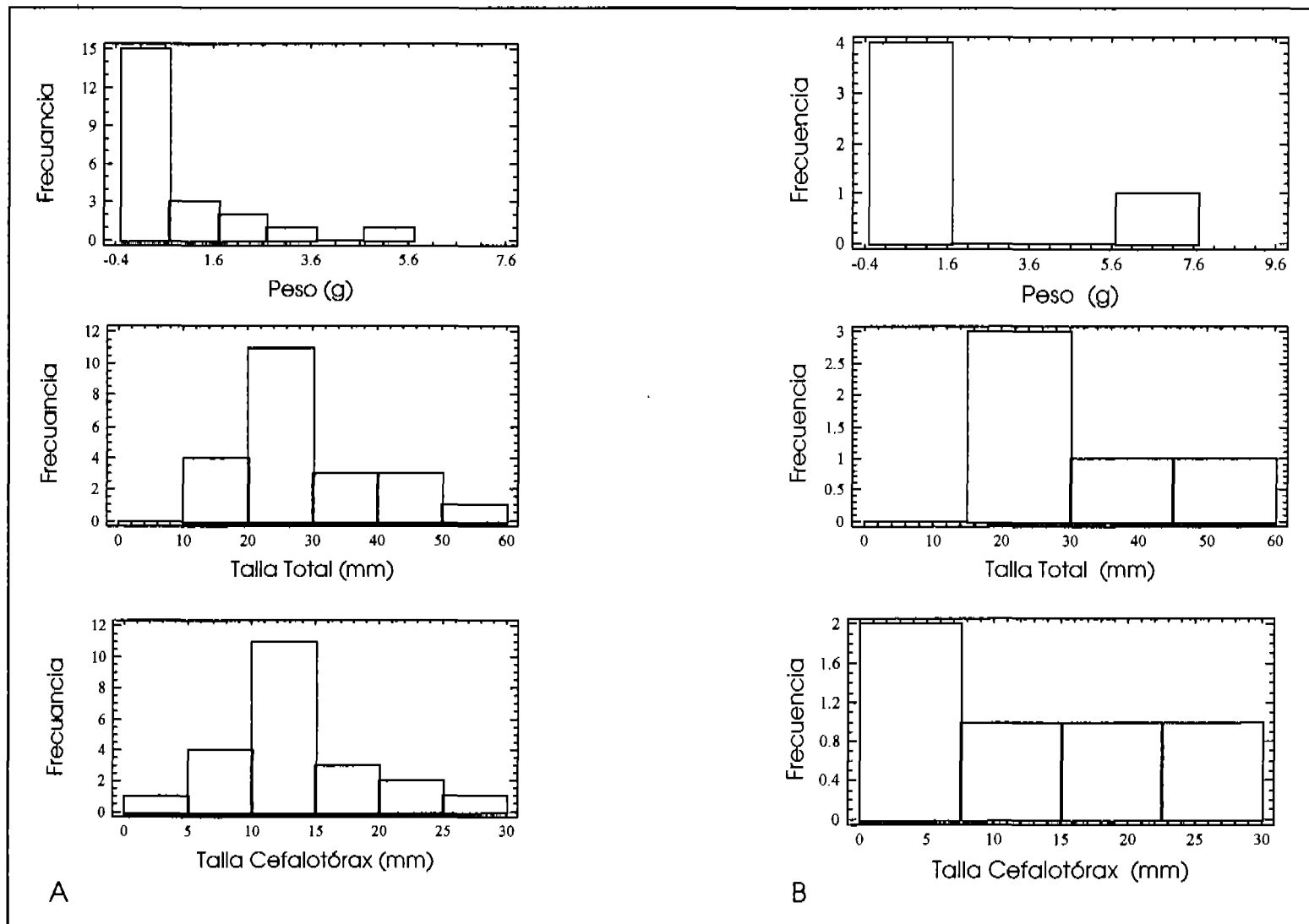


Fig. 4.5. Histogramas de frecuencia de peso, talla total y talla del cefalotórax de acociles de las localidades de A, Tenango de las Flores, Pue. (Bosque) y B, Xochitlán, Pue.

Tabla 4.2. Eventos reproductivos e incidencia de hembras ovadas de las especies en estudio.

Especie	Nov-Dic 2002	Feb-Mar 2003	Ago-Sep 2003
	No se encontraron hembras ovadas	Primeros indicios de ovoposición en condiciones de laboratorio	Se encontraron las primeras hembras ovadas y hembras con críos recién eclosionados.
<i>P. (O.) hidalgoensis</i>	Cópulas observadas In situ: 4 en cautiverio 1	Cópulas observadas en laboratorio	
<i>P. (V.) riojai</i>	Cópulas observadas en cautiverio 2	Total: 128 huevos Diámetro del huevo: Promedio: 2.37 mm Máximo: 2.60 mm Mínimo: 2.20 mm	
<i>P. erichsoni</i>		Total: 86 huevos Diámetro del huevo: Promedio: 2.58 mm Máximo: 2.80 mm Mínimo: 2.40 mm	
<i>P. hoffmanni</i>			Longitud total del juvenil: Promedio: 9.12 mm Máximo: 9.50 mm Mínimo: 9.00 mm Longitud cefalotórax del juvenil: Promedio: 4.08 mm Máximo: 4.50 mm Mínimo: 3.90 mm

Asimismo, en el análisis de los huevos registrados para estas especies se encontró que existen diferencias significativas entre las tallas y el número de huevos entre las diferentes especies y que los huevos son más grandes y en menor número en las especies que habitan los ríos y arroyos con mayor altitud en comparación con las que habitan sitios más bajos. Lo anterior, de acuerdo con el análisis de varianza en la comparación de medias (ANOVA $F= 197.66$ $P<0.05$), como se puede ver al cotejar el diámetro de los huevos para las especies graficadas en las figs. 4.6 y 4.7.

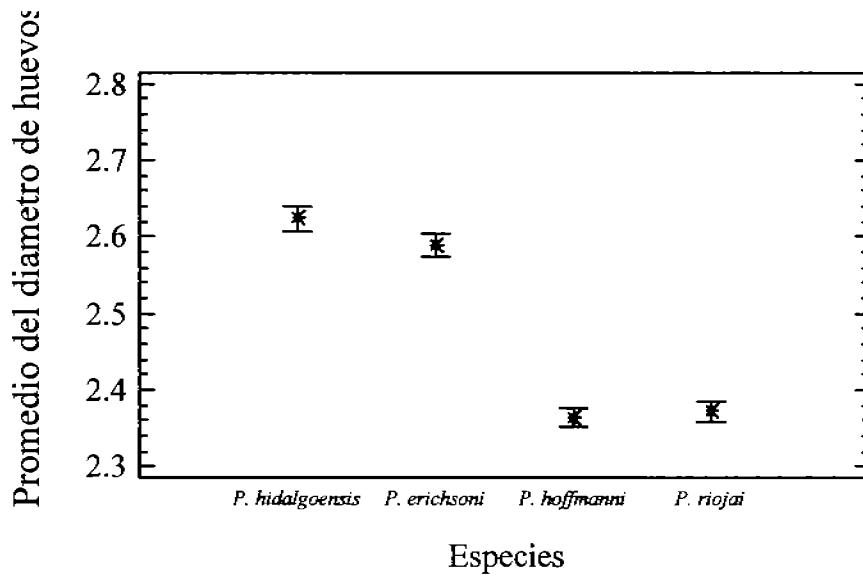


Fig. 4.6 Comparación de promedio del diámetro de los huevos de las especies mencionadas.

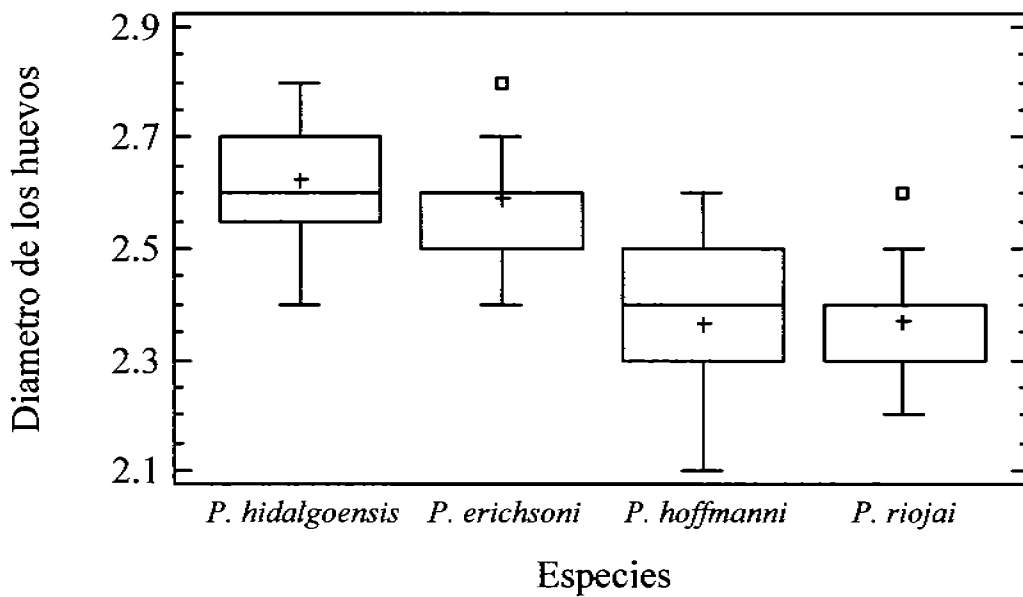


Fig. 4.7 Gráfica de comparación de los valores del diámetro de los huevos de los acociles.

De acuerdo con el análisis de Fisher y el procedimiento de la diferencia significativa mínima, las especies que habitan en altitudes similares no son estadísticamente diferentes como ocurre con especies de subgéneros distintos, es decir *P. (O.) hidalgoensis* ($n= 76$ $\bar{x}= 2.62\text{mm}$) y *P. (V.) erichsoni*

($n= 86$ $\bar{x}= 2.58$ mm), pero cabe señalar que *P. hidalgoensis* habita arroyos muy similares en características ambientales a los registrados para las especies del subgénero *Villalobosus*. Sin embargo, conforme los acociles habitan en sitios con altitudes menores el tamaño de los huevos disminuye y aumenta su número, como sucede con *P. riojai* ($n= 123$ $\bar{x}= 2.37$ mm) y *P. hoffmanni* ($n= 137$ $\bar{x}= 2.36$ mm).

b) Con base en los datos ambientales y biométricos de los cuatro períodos, se realizó un análisis de regresión múltiple para encontrar las variables ambientales que están determinando el incremento del peso, la talla total o talla del caparazón. En los tres casos, talla del cefalotórax, peso y talla total, los resultados sugieren a la temperatura del agua como la función común que predice las variaciones morfométricas.

Para la variable peso de los acociles analizados en este trabajo, las principales variables ambientales son: oxígeno disuelto, salinidad (por sus valores bajos), temperatura y profundidad, existiendo una influencia aunque no significativa del resto de las variables ($\text{Peso} = -3.0252 + 0.666 \cdot \text{OD} + 0.560 \cdot \text{Salinidad} + 0.145 \cdot \text{Temperatura} + 0.042 \cdot \text{Profundidad} + 0.38 \cdot \text{Vel. Corriente} - 0.01 \cdot \text{CaCO}_3 - 0.01\% \cdot \text{OD} - 0.16 \cdot \text{pH} - 0.31 \cdot \text{MO}$, $r^2= 0.9927$), fig. 4.8.

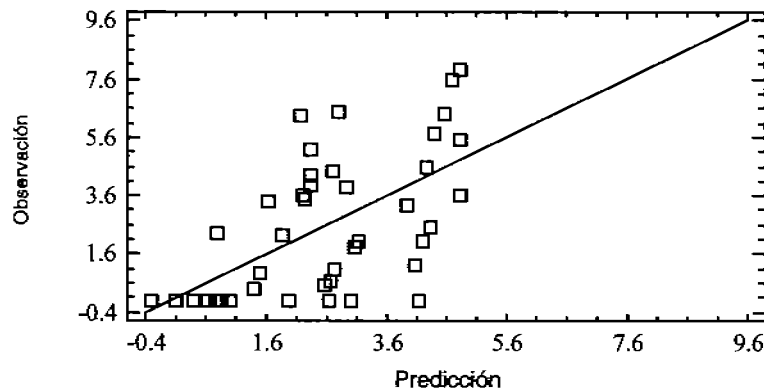


Fig. 4.8. Regresión múltiple entre el peso y las variables ambientales.

Asimismo, para la variable talla total, el análisis demostró que las variables ambientales con mayor relación son: oxígeno disuelto, profundidad y temperatura; en este análisis la variable menos significativa fue la velocidad de la corriente (Talla total = $9.7822 + 2.87 \cdot \text{OD} + 0.330 \cdot \text{Profundidad} + 0.311 \cdot \text{Temperatura} + 0.138 \cdot \% \text{OD} - 0.14 \cdot \text{CaCO}_3 - 0.21 \cdot \text{MO} - 0.24 \cdot \text{pH} - 5.20 \cdot \text{Salinidad} - 5.5 \cdot \text{Vel. Corriente}$, $r^2 = 0.82299\%$), fig. 4.9.

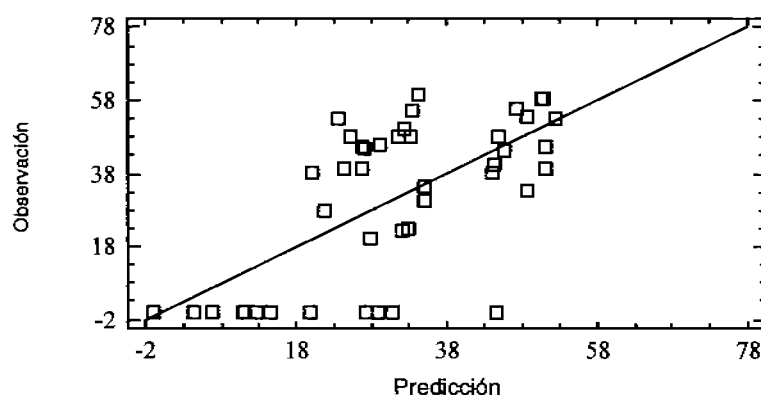


Fig. 4.9. Regresión múltiple entre la talla total y las variables ambientales.

En el análisis de la talla del caparazón, se encontró que las principales variables ambientales son el oxígeno disuelto, la temperatura y la profundidad; sin embargo, en este análisis el coeficiente de correlación fue menor al encontrado en los anteriores resultados (Talla del caparazón = $16.5457 + 6.52 \cdot \text{OD} + 0.635 \cdot \text{Temperatura} + 0.191 \cdot \text{Profundidad} + 1.63 \cdot \text{salinidad} + 0.113 \cdot \text{CaCO}_3 - 0.16 \cdot \text{MO} - 0.39 \cdot \text{pH} - 4.0 \cdot \text{Vel. Corriente} - 4.2\% \cdot \text{OD}$, $r^2 = 0.5818\%$), fig. 4.10.

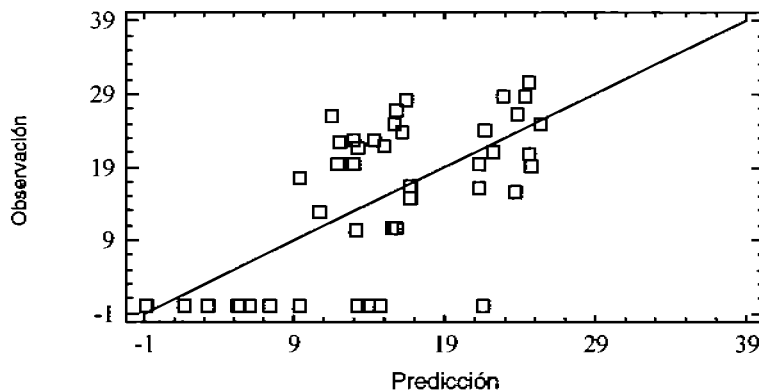


Fig. 4.10. Regresión múltiple entre la talla del caparazón y las variables ambientales.

c) La figura 4.11A ilustra resultados del primer período de recolecta, donde se observan tres grupos: el primero conformado por las localidades donde habitan las especies del subgénero *Villalobosus* (Atezca, Calnali, Xochicoatlán, Chalma, Atlapexco, San Cornelio, Tenango de Doria, El Salto y Chichicaxtle, en Hidalgo; Necaxa, Tenango de las Flores, Cuetzalan, Chignautla y Xochitlán, en Puebla; La Unión, Paso Largo 1, Tlapacoyan y Dejigui, en Veracruz) y dos más incluyendo aquellos sitios donde habitan dos especies del subgénero *Ortmannicus* (Atlapexco y Tlanchinol). La figura 4.11B muestra los resultados del segundo período de recolecta, donde se observan tres grupos: el primero conformado por las localidades donde habitan las especies del subgénero *Villalobosus* (Atezca, Calnali, Xochicoatlán, Chalma, Atlapexco, San Cornelio, Tenango de Doria, El Salto y Chichicaxtle, en Hidalgo; Necaxa, Tenango de las Flores, Cuetzalan, Chignautla y Xochitlán, en Puebla; La Unión, Paso Largo 1, Tlapacoyan y Dejigui, en Veracruz) y dos más incluyendo aquellos sitios donde habitan dos especies del subgénero *Ortmannicus* (Atlapexco y Paso Largo 1) y una localidad para el subgénero *Villalobosus* (Chignautla). En este caso, el grupo conformado por los sitios de *Villalobosus* incluye una localidad del grupo externo, Tlanchinol, Hgo. En la figura 4.11C se aprecia la agrupación

de localidades para el tercer período de recolecta, donde se observan tres grupos conformados por las localidades donde habitan las especies del subgénero *Villalobosus* y asociados a ellas aquellos sitios donde habitan especies del subgénero *Ortmannicus* (Atlapexco, Tlanchinol y Paso Largo 1). La figura 4.11D muestra la agrupación de localidades para el cuarto período de recolecta, donde se observan cuatro grupos: dos grupos conformados por las localidades donde habitan las especies del subgénero *Villalobosus* (Chignautla, Pue., Atezca, Calnali, Xochicoatlán y Chalma en Hidalgo; Atlapexco, San Cornelio, Tenango de Doria, El Salto y Chichicaxtle, Hgo., Necaxa, Tenango de las Flores, Cuetzalan, y Xochitlán, Pue., La Unión, Tlapacoyan y Dejjgui, en Veracruz. Aquellos sitios donde habitan especies del subgénero *Ortmannicus* (Atlapexco, Tlanchinol y Paso Largo 1) nuevamente aparecen en distintas asociaciones dentro de uno de los grupos del subgénero *Villalobosus*.

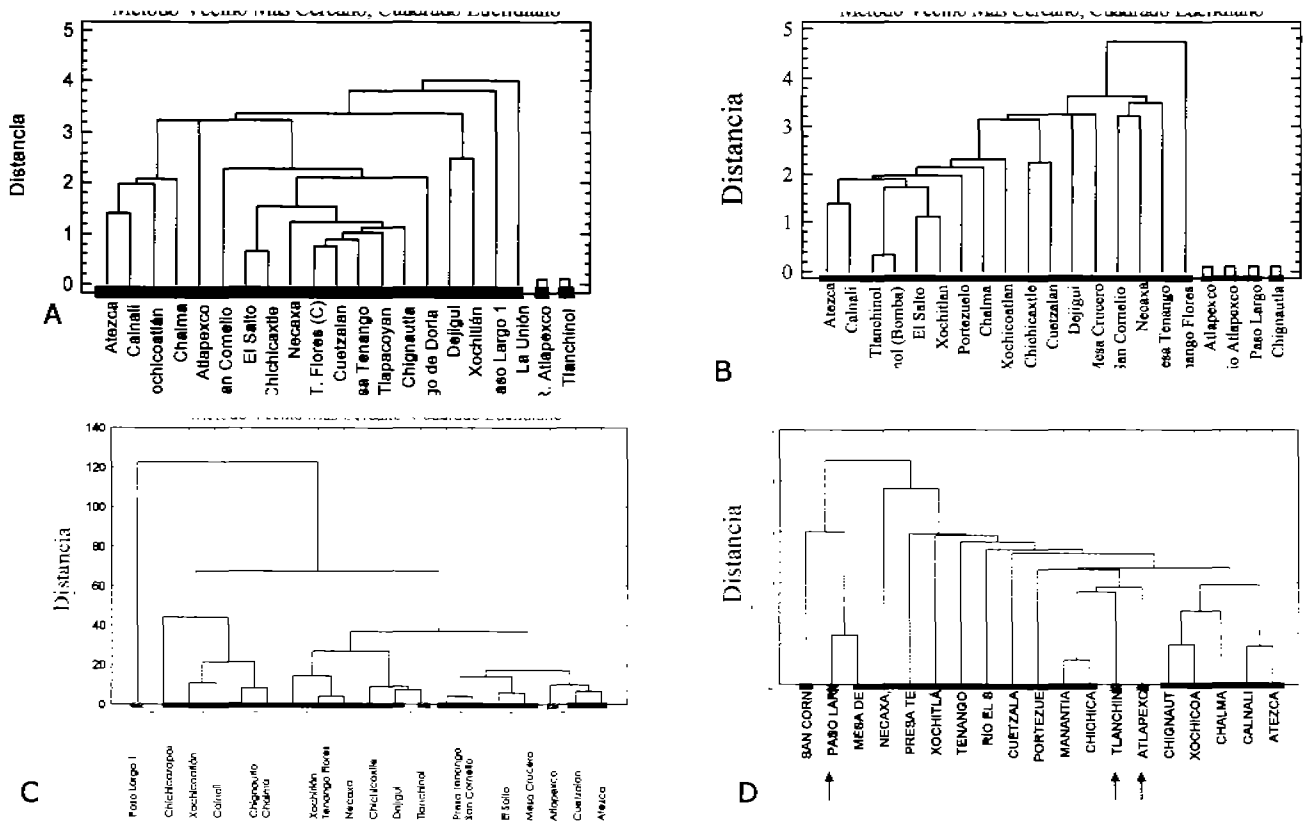


Fig. 4.11. Análisis de cluster de localidades con base en datos de variables ambientales, de los cuatro períodos de muestreo. A, noviembre-diciembre de 2002; B, febrero-marzo; C, mayo-junio; D; agosto septiembre (B-D, 2003). Localidades para *Villalobosus* —; localidades para *Ortmannicus* - - -.

Partiendo de los resultados del análisis anterior, se efectuó un análisis de cluster usando la técnica de agrupamiento con base en valores promedio (K-means clustering), con objeto de producir un número de clusters diferentes con la mayor distinción posible, permitiendo inferir los posibles tipos de hábitat para las especies del subgénero *Villalobosus*. De acuerdo con la figura 4.12, podemos definir que existen 2 tipos de hábitat específicos para el subgénero *Villalobosus*: uno que comprende los sitios Atezca, Chalma, Calnali, Xochicoatlán y San Cornelio, en Hidalgo (Figs. 4.12A y 4.13) y otro agregando a El Salto, Chichicaxtle y Tenango de Doria, en Hidalgo; a Necaxa, la Presa de Tenango de las Flores, La Unión, Xochitlán, Cuetzalan y Chichicazapan, en Puebla y finalmente al

Manantial de Dejjigui y Portezuelo, en Veracruz (Figs. 4.12B y 4.13). El tercer hábitat incluye al arroyo de Tenango de las Flores, Pue., Atlapexco, Hgo. y Paso Largo 1, Ver., donde habitan especies del subgénero *Ortmannicus* (Figs. 4.12C y 4.13). Los dos puntos no agrupados en la gráfica y en el mapa corresponden a las localidades de Tlanchinol, Hgo. y Chignautla, Pue.

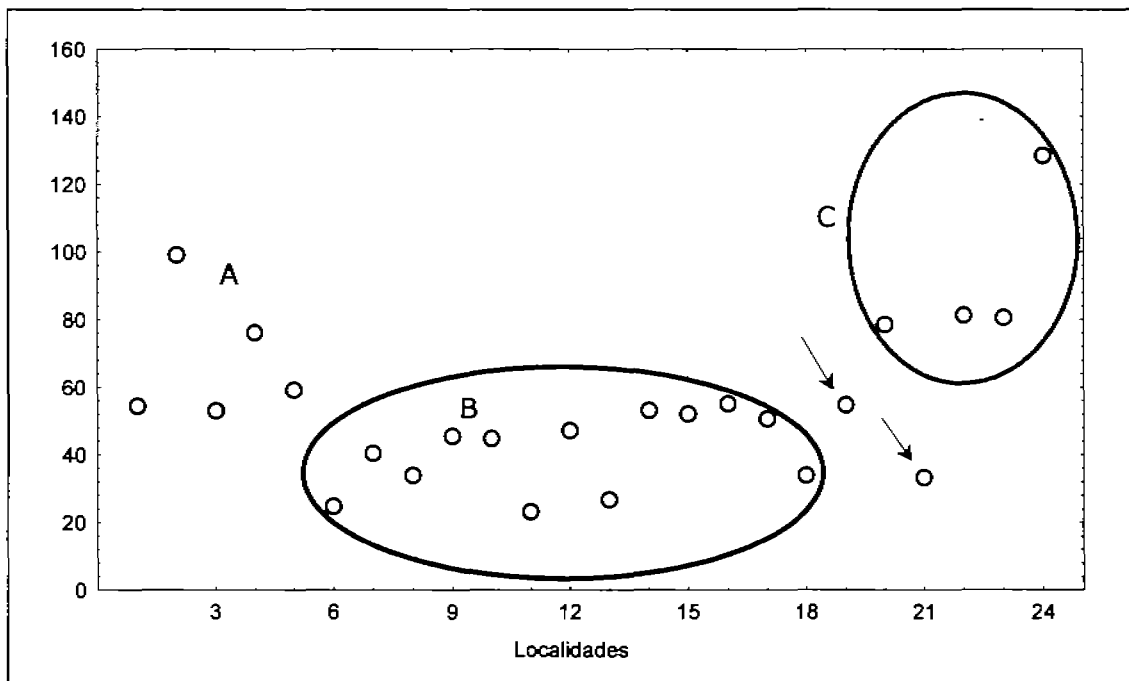


Fig. 4.12. Resultados del análisis "k-means clustering" mostrando los dos tipos de hábitat estimados para el subgénero *Villalobosus* (A y B) y uno para el subgénero *Ortmannicus* (C).

La posición de Tlanchinol, Hgo. y Chignautla, Pue. en algún tipo de hábitat es aún estadísticamente incierta. Aunque para el primero se esperaría su agrupación en el hábitat C, sus características tienden a incorporarlo en el hábitat A, dado que se trata de un arroyo en medio de bosque de niebla, muy similar al del resto de localidades de ese tipo de hábitat del subgénero *Villalobosus* y diferente a las características del tipo de hábitat C, temperaturas cálidas y ríos de mayor caudal, donde habitan las

especies del subgénero *Ortmannicus*. Chignautla, Pue. sería colocado en el hábitat B, pero su posición es aún incierta.

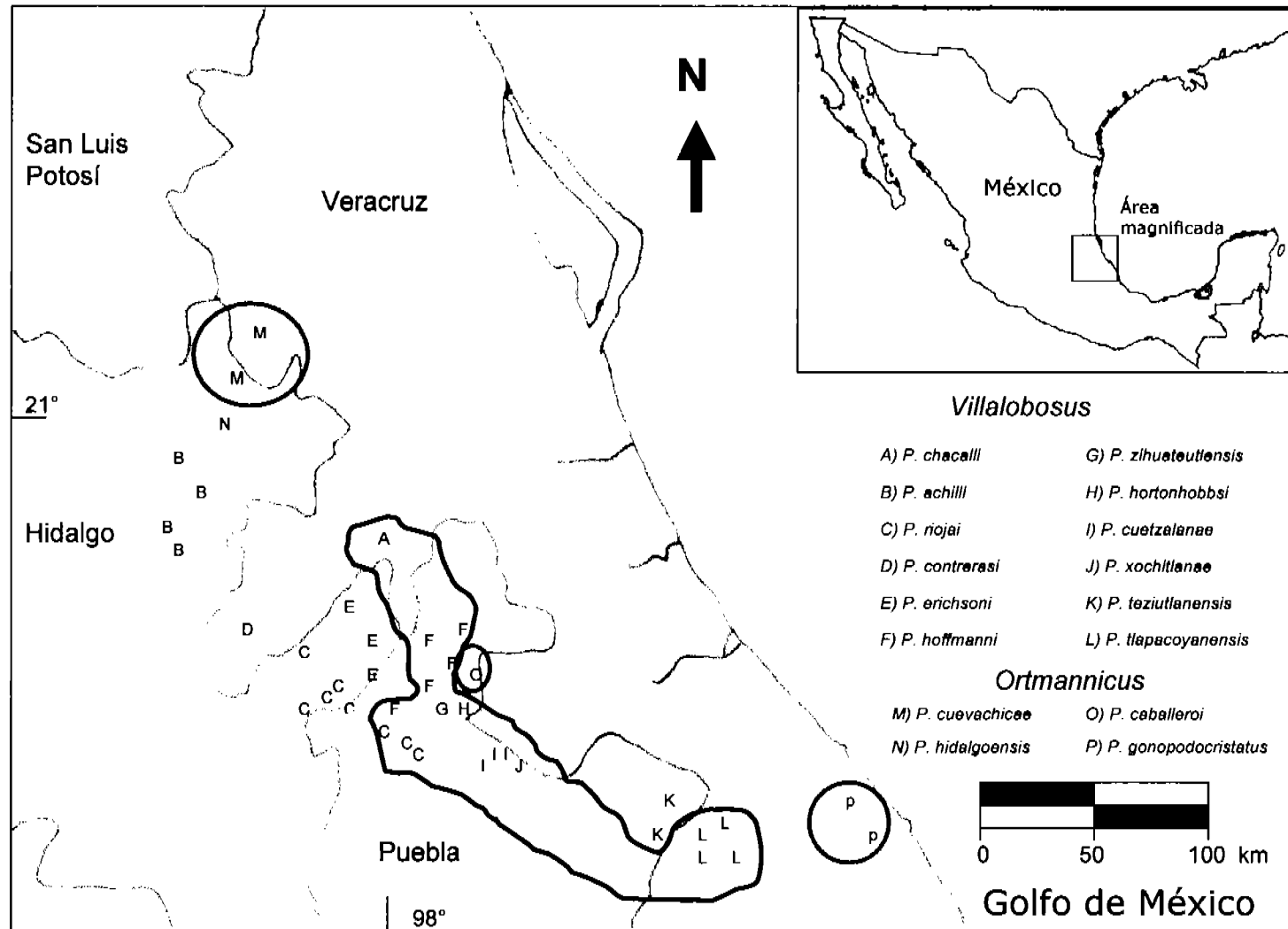


Fig. 4.13. Mapa mostrando los dos tipos de hábitat para el subgénero *Villalobosus* y el hábitat representativo del subgénero *Ortmannicus*.

Discusión

El territorio donde habitan los acociles del subgénero *Villalobosus* está drenado por una densa red fluvial que vierte al Golfo de México y puede dividirse en cinco zonas de acuerdo con la cuenca hidrológica de que se trate. Se identifican dos épocas al año, la temporada de lluvias y la de secas. La dinámica ambiental que presentan los ríos está en función del régimen hidrológico que ocurre en las respectivas cuencas. Las discrepancias en las agrupaciones de las localidades observadas en los análisis se atribuyen a los cambios en la dinámica de estos cuerpos de agua provocados por el mayor afluente en la temporada de lluvias y la desecación en temporada de secas. Esto fue evidente en el período de mayo-junio, durante el cual algunos arroyos y pozas se encontraban totalmente secos, razón por la que fueron excluidos del análisis (Fig. 4.11C). La figura 4.14 muestra ejemplos de los sitios donde habitan las especies del subgénero *Villalobosus*, que son más contrastantes durante la época de lluvias y secas. Sin embargo, ha sido evidente que existen dos tipos de hábitat para las especies del subgénero *Villalobosus* y que las diferencias entre ellos están marcadas por la altitud, la temperatura y la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, pero aun estas variables presentan diferencias realmente pequeñas en comparación con las características de los hábitats de las especies del subgénero *Ortmannicus* que habitan en ríos con mayor corriente y temperatura y menor cantidad de oxígeno; o bien hasta del subgénero *Austrocambarus* que habitan en sitios más cálidos con temperaturas mayores, por arriba de los 20°C (Mejía-Ortiz *et al.*, 2003).

Considero que las particulares condiciones ambientales han influido fundamentalmente en la especialización de los taxa del subgénero *Villalobosus*. De acuerdo con las relaciones existentes entre las variaciones

de los valores morfométricos y las variables ambientales estudiadas aquí, este subgénero tiene preferencia por un cierto tipo de hábitat; las variables que determinan ese tipo de hábitat son el oxígeno disuelto, la temperatura y la profundidad del cuerpo de agua. En general, estos organismos habitan en los nacimientos y las zonas de los ríos en donde las corrientes son de poca intensidad, la temperatura es baja y las aguas son ricas en oxígeno disuelto; asimismo, prefieren las zonas profundas más que someras, pues en su constante búsqueda de alimento, se desplazan caminando por el lecho del río. Ha sido documentado para otros grupos y lo he observado para las especies de este subgénero, que en sitios en donde la profundidad de los cuerpos de agua se incrementa (más de 1.5 metros), estos animales prefieren habitar la zona más profunda, refugiándose debajo de las piedras, entre la vegetación o cavando refugios en el sedimento para evitar la depredación principalmente por peces (Stein y Magnuson, 1976; Englund, 1999; Englund y Krupa, 2000; Nyström, 2002). Debido a las diferentes pendientes y geomorfología de la cuenca, el flujo del agua es básicamente turbulento, pero se torna laminar en las orillas de los ríos y pequeños remansos, lo que permite una menor inversión de energía por parte de los acociles y otros organismos acuáticos relacionada con la permanencia o desplazamiento alrededor de su ámbito hogareño. Esto explicaría la importancia, aunque en menor grado, de la velocidad de la corriente mostrada por el análisis. Sin embargo, como se ha mencionado, el régimen hidrológico (época de sequía y lluvias) es el principal regulador de las diferentes actividades y procesos que estos organismos presentan en la región. Debido a que en su mayoría los acociles estudiados habitan en las regiones más altas, básicamente en los nacimientos de los ríos, el efecto de las corrientes que se incrementan durante la época de lluvias afecta primordialmente a los acociles juveniles, debido a su menor talla y peso y a la ausencia en muchos casos de refugios, propiciando su dispersión a lo

largo del río (Foster, 1993; Foster, 1995; Kutka et al., 1996; McMahon, 2002). Razón por la cual no me ha sorprendido encontrar la mayor incidencia de juveniles hacia el final de la época de lluvias, tiempo en que la disponibilidad de alimento consecuencia de la remoción del sedimento por el agua también asegura la sobrevivencia de la prole.

Los acociles se han adaptado en diversas formas de acuerdo a las condiciones ambientales que ocurren en los lugares que han logrado colonizar. Una primera adaptación es su capacidad de pasar mucho tiempo, incluso meses ante escasez de agua y respirar oxígeno atmosférico (Huner y Lindqvist, 1995); en algunos ambientes cavernícolas se ha registrado que estos organismos presentan una disminución en su tasa respiratoria efectiva como una respuesta a la disminución en la concentración de oxígeno y la escasez de alimento, característica de estos ambientes (Mejía-Ortiz, 2003; Mejía-Ortiz y López-Mejía, 2005). Otra adaptación es su capacidad de soportar una amplia gama de temperaturas (McMahon, 2002; Nyström, 2002). Los hábitos omnívoros de los acociles les permiten sobrevivir en lugares donde el alimento llega a escasear por tiempos prolongados, donde el detritus se convierte en su principal fuente de energía. Por otro lado, su fuerte exoesqueleto y los mecanismos internos de regulación iónica que éstos y otros decápodos han desarrollado, les permite sobrevivir a cambios bruscos en la concentración de sales; aunque se ha documentado que algunas especies de acociles pueden habitar temporalmente ambientes estuarinos con fines alimenticios (Nyström, 2002), aún no hay evidencia de su capacidad para reproducirse en tales condiciones. Los acociles que habitan en altitudes menores, no en zonas estuarinas pero cercanas a la costa están expuestos probablemente a mayores cambios en la composición química del agua, variación en la intensidad de la corriente y

mayor depredación. Una respuesta de estas poblaciones a tales condiciones es la ovoposición de un número mayor de huevos de menor tamaño que garantice su sobrevivencia.

He visto en este estudio que los acociles habitando en zonas más altas donde las condiciones ecológicas son distintas, el número de huevos disminuye aumentando su densidad. Esto es interesante si consideramos que la clave para el éxito adaptativo en cambáridos, particularmente en linajes ancestrales durante la transición desde ambientes salinos y cálidos hacia ambientes de agua dulce más frescos, pudo muy probablemente haber sucedido con la naturaleza del huevo y los primeros estadios larvales más que con cambios en la morfología adulta. Esta idea ha sido reforzada al notar que los huevos, los estadios larvales y los primeros instars son generalmente más susceptibles a variaciones dentro del ambiente tales como fluctuaciones en el pH, la temperatura y la salinidad. Por lo tanto, el amplio rango en adaptaciones para la producción de huevos en cambáridos provee una base para el éxito adaptativo (Payne, 1997).

En el caso del subgénero *Villalobosus*, pude determinar dos tipos de hábitat para sus especies, uno que involucra localidades en la parte más alta sobre la vertiente de la Sierra Madre Oriental y otro de sitios de altitudes menores, algunas cercanas a la costa. Aquellas especies que habitan en las cabeceras de los ríos, en climas fríos, tienden a producir un menor número de huevos de mayor densidad, en comparación con las que habitan en sitios más cálidos de altitudes menores. Lo que coincide con la idea de que ante condiciones tales como la variación en los valores ambientales o nutrimentales entre hábitats, densidad, depredación o estrés por contaminación, algunas especies pueden compensar las fluctuaciones poblacionales ajustando su fecundidad (Momot, et al, 1978).

Observé también variación en la talla y número de huevos entre especies habitando un mismo tipo de hábitat (entre altitudes altas), influenciada por diferencias en la talla individual de los huevos producidos por cada especie. Sin embargo, esta variación es mínima entre hembras de la misma especie, como ha sido reportado para otros grupos de cambáridos (Corey, 1987). Asimismo, datos limitados sugieren que la talla de cada huevo varía poco entre ejemplares de hábitats de 'buena calidad', principalmente libres de contaminación (Payne, 1997), como es el caso de los ríos en altitudes mayores donde habita la mayor parte de las especies del subgénero *Villalobosus*.

Otra idea que apoya la variación en talla y número de huevos como respuesta adaptativa es que aparentemente los ambientes de agua dulce propician la selección en contra de los estados larvales, es decir, que los invertebrados de agua dulce muestran cierta pausa en los estados larvales. Conforme a este diseño, los acociles dirigen mayor inversión parental hacia la talla individual de los huevos, traducida en un mayor tamaño e incrementada incorporación de material nutrimental (Pennak, 1985). Los huevos de mayor talla poseen un porcentaje mayor de lípidos, lo que proporciona un almacén de energía adicional, que a su vez adapta a las especies a vivir en climas más fríos, como en el caso de las especies del subgénero *Villalobosus*; los huevos más grandes, asimismo, producen primeros instars más grandes, lo que significa una ventaja competitiva sobre estadios más pequeños que los preparan para sobrevivir condiciones ambientales específicas (Payne, 1997). La talla más pequeña de huevos conocida para cambáridos (1 mm) es considerada de hecho dos veces la talla necesaria para el desarrollo directo (Wray and Raff, 1991; Payne, 1997), lo que se traduce en especies más adaptadas.

La determinación de dos tipos de hábitat para las especies del subgénero *Villalobosus* claramente diferenciados, el hábitat de la parte alta y el hábitat de la parte media baja y las adaptaciones que estas especies muestran, es una evidencia de la especialización de estos organismos a tan particulares condiciones, propiciadas por las múltiples barrancas existentes y los consecuentes microclimas, en esa región de la Sierra Madre Oriental.

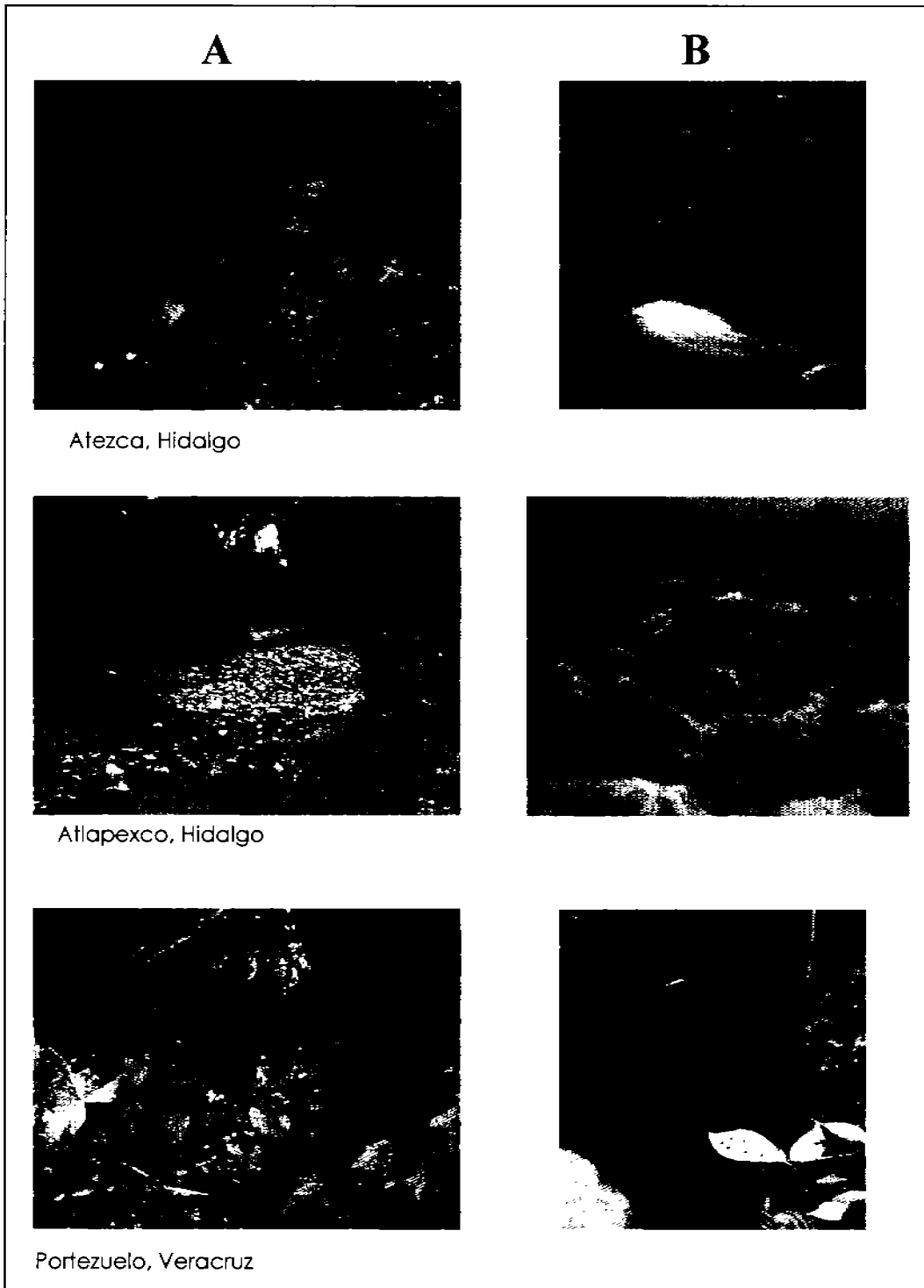


Fig. 4.14. Ejemplos del contraste en sitios donde habitan las especies de los subgéneros *Villalobosus* (Atezca, Hgo. y Portezuelo, Ver.) y *Ortmannicus*, (Atlapexco, Hgo.) durante A, la época de secas (may-jun) y B, la época de lluvias (ago-sep).

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)* Hobbs, 1972

Nov/Dic 2002

1/3

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		Temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.
				mg/l	%								
04-Nov-02	16:56	Atezca	Poza 1	8.16	83.4	19.1	7.08	0	0.14		52.50		
	17:35	20°48'10" 98°44' 4"	Poza 2	8.16	73.8	19.1	7.06	0	0.35		71.50		<i>P. achilli</i>
	18:00	1,495 msnm	Cascada	8.21	91.1	19	7.18	0	0.42		65.50		
			<i>promedio</i>	8.18	82.77	19.07	7.11	0	0.30		63.17	0.84184	
05-Nov-02	11:51	Chalma	Poza 1*	6.63	80.7	20.6	7.51	0.1	0.40	110,54,50,30 .24,20 (48x)	143.00		
	13:48	20°52' 0" 98°41' 11"	Poza 2 Cascada grande	7.63	88	21.1	7.77	0.1	0.36	70,38,14,10 (33x)	280.00		<i>P. achilli</i>
		1,480* y 1,525 msnm	<i>promedio</i>	7.13	84.35	20.85	7.64	0.1	0.38	42	211.50		
05-Nov-02	17:35	Calnali	Poza 1	7.85	86.3	20.3	7.9	0	0.20		60.00		
	17:43	20°53'7" 98°36'0"	Poza 2	8.01	106.3	20.3	7.66	0.1	0.35		58.00		<i>P. achilli</i>
	17:50	855 msnm	Poza 3	7.99	81.6	20.2	7.69	0.1	0.20		37.00		
	17:57		Poza 4*	7.32	96.2	20.1	6.68	0	0.30	63	35.50		
			<i>promedio</i>	7.79	92.60	20.23	7.48	0.05	0.26	63	47.63	1.04883	
06-Nov-02	9:00	Xochicoatlán Camino a Tianguistengo	Poza 1	8.1	82.1	16.4	7.37	0.1	0.33	30	208.50		
		20°46' 3" 98°39'11"	Poza 2	8.36	86.9	16.6	8	0	0.2	45	34.05		<i>P. achilli</i>
		1,535 msnm	<i>promedio</i>	8.23	84.5	16.5	7.685	0.05	0.265	37.5	121.28		
06-Nov-02	14:30	Atlapexco, Hgo.	Poza 1	6.32	72	24.1	7.31	0.3	0.2	45	2.97		
	16:42	21°00'15" 98°20'10"	Desagüe	4.52	58.9	24.4	7.25	0	0.425	20	0.00		<i>P. cuevachicae</i>
	17:00	235 msnm	Poza 2	6.15	95.9	24	7.3	0.3	0.24	45	295.50		
	17:19		Poza 3	5.83	63.1	23.9	7.68	0.3	0.13	72	285.50		
			<i>promedio</i>	5.71	72.48	24.1	7.39	0.23	0.25	45.5	145.99	0.38128	
07-Nov-02	10:30	Río Atlapexco	Remanso 1	10.37	150.4	26.8	7.32	0.2		15	267.20		
		21°00'2" 98°20'11"	Remanso 2	10.29	164	28	7.11	0.1		15	271.00		<i>P. cuevachicae</i>
		155 msnm	Remanso 3	5.3	186.1	27.1	7.36	0.2		20, 150 (x85)	276.50		
			<i>promedio</i>	8.65	166.83	27.3	7.26	0.17		50	271.57	0.58362	

MLM

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)* Hobbs, 1972

Nov/Dic 2002

2/3

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		Temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	app.
				mg/l	%								
07-Nov-02	17:55	Tlanchinol, Hgo.	Poza 1	6.29	65.3	17.3	8.33	0			30.00		<i>P. (O.) sp.</i>
	18:04	20°58'14" 98°38'5"	Poza 2	7.19	74.5	17	8.12	0			25.00		<i>P. (O.) sp.</i>
	18:17	1,555 msnm	Poza 3	2.42	24.5	16.1	7.48	0			35.50		no
			<i>promedio</i>	5.30	54.77	16.80	7.98	0.00			30.17	2.48569	
07-Dic-02	13:15	San Cornelio, Hgo.	Poza 1	5.83	61.8	15.8	7		0.03				
		20°23'5" 98°18'11"	Poza 2	7.25	72.6	15.4	7			53			<i>P. erichsoni</i>
		1,600 msnm (1,385 ?)	<i>promedio</i>	6.54	67.2	15.6	7		0.03	53			
08-Dic-02	9:35	Río El Salto, Agua Blanca, Hgo.	Poza 1 claro	6.77	63.3	12.6	6		0.02	29,34,32 (x31.6)			
	9:53	20°20'2" 98°22'9"	Poza 2	6.92	65.1	12.6	6		0.125	27,25,27 (x27.75)			<i>P. riojal</i>
	10:24	2095 msnm	Poza 3 cascada	6.3	74.3	12.8	6		0.125	30			
			<i>promedio</i>	6.66	67.57	12.67	6		0.09	29.1			
08-Dic-02	12:30	Chichicxtle, Hgo.	remansos 1-2	6	59.2	13.8	6			42,50,37 (x43)			
		20°21'4" 98°18'8"	remanso 3	7.58	73.70	13.60	6		0.14	32,40 (x36)			<i>P. riojal</i>
		2,110 msnm	<i>promedio</i>	6.79	66.45	13.7	6		0.14	40.2			
08-Dic-02	15:53	Tenango de Doria, Hgo.	Camino al Gosco; contenedor del arroyo	7.17	66.1	13.9			0.16	10, 66			
		14Q580472 2248229	<i>promedio</i>	7.17	66.1	13.9			0.16	38			
		1,880 msnm											
09-Dic-02	13:54	Necaxa, Pue.	Vertedor Salto Chico	6.47	68.5	18.5	6		0.03	58			
		20°12'15" 97°59'15"	<i>promedio</i>	6.47	68.5	18.5	6		0.03	58			<i>P. hoffmanni</i>
		1,390 msnm											
09-Dic-02	16:26	Tenango de las Flores, Pue.	Arroyo del Jardín de Flores	5.20	56.80	19.5	6.00		0.00	49.5			<i>P. caballeroi</i>
			<i>promedio</i>	5.20	56.80	19.50	6.00		0.00	49.5			
		1,465 msnm											
10-Dic-02	7:30	Presa Tenango de las Flores	Contenedor	3.83	42.9	18.5	6			53			
			Arroyo	4.27	45.1	17.9	6			53			<i>P. hoffmanni</i>
			<i>promedio</i>	4.05	44	18.2	6			53			

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)* Hobbs, 1972
 Nov/Dic 2002

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		Temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.
				mg/l	%								
11-Dic-02		La Unión, Pue.	Poetas carretera	7.82	72.8	16.9			0.00	10			
		850 msnm											
16-Dic-02	12:44	Manantial de Dejgüi, Ver.	Poza 1 bebedero	2.49	27.90	19.3	6	0	0.00	8.5,9.5,9.5 (x0.1)			<i>P. chacalli</i>
	12:55	20°32'6" 98°26'15"	Poza 2	4.44	48.4	19.9	6	0	0.00	11.11.5,12.1 6 (x12.6)			
	13:01	1,915 msnm	Poza 3	4.31	45.8	18.1	6		0.00	38			
			promedio	3.75	40.7	19.1	6		0.00	14.5			
27-Dic-02	8:21	Paso Largo 1, Ver.											
		20°08'12" 96°56'15"	Poza carretera	2	21.4	19	7		0.04	16		1.82023	<i>P. gonopodocristatus</i>
		250 msnm											
27-Dic-02	11:43	Portezuelo, Tlapacoyan, Ver.											
		19°52'9" 97°13'1"	Nacimiento	6.17	63.60	17.20	6		0.04	36,33,30 (x33)		0.92414	
		1,070 msnm	promedio	6.17	63.60	17.20	6.00		0.04	33		0.92414	
27-Dic-02	14:49	Chignautla, Pue.											
		19°49'2" 97°23'4"	Manantiales	6.46	65.7	16.3	6		0.14	23,26,22 (x23.6)		14.34481	
		2,050 msnm											
28-Dic-02	10:00	Cuetzalan, Pue.	Camino "La Conchita"										
		20°0'10" 97°31'5"	Poza nacimiento	4.88	51.4	16.4	6		0.00	22			
	10:54	20°0'14" 97°31'2"	Tanque	5.31	55.1	17.7	6		0.00	63			
		1,045 msnm	promedio	5.10	53.25	17.05	6		0.00	42.5		1.46310	
28-Dic-02	14:23	Xochitlán, Pue.	Arroyo Cueva Sta. Elena										
	15:00	19°58'8" 97°37'9"	Nacimiento 1	3.12	33.7	17.3	6.5		0.00	4.7,3.6 (x4.5)			
	15:57		Nacimiento 2	6.96	74	18.5	6.5		0.00	4			
			promedio	5.04	53.85	17.90	6.50		0.00	4.4		0.82214	

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)* Hobbs, 1972

Feb/Mar 2003

1/3

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	cm profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.
				mg/l	%								
10-Feb-03		Atezca	Poza 1	7.67	76.7	14.4	6.0	0.1			13.00		
		20°48'10" 98°44' 4"	Poza 2	7.76	76.0	14.7	6.0	0.1			12.00		<i>P. achilli</i>
		1,495 msnm	Cascada	8.72	60.0	14.5	6.0	0.1			10.00		
			<i>promedio</i>	8.05	70.90	14.53	6.0	0.1			11.67	0.58872	
11-Feb-03		Chalma	Poza 1*	8.18	82.1	15.1	7.0	0.2			34.00		
			Cascada chlca	8.17	81.1	15.1	6.0	0.2			33.00		
		20°52' 0" 98°41' 11"	Poza 2 Cascada grande	8.21	82.4	15.1	6.0	0.1			21.00		<i>P. achilli</i>
		1,480* y 1,525 msnm	<i>promedio</i>	8.19	81.9	15.1	6.3	0.2			29.33	0.76809	
11-Feb-03		Calnail	Poza 1	7.44	77.2	17.2	6.0	0.1			10.00		
		20°53'7" 98°36'0"	Poza 2	7.01	70.9	16.9	6.0	0.1			11.00		<i>P. achilli</i>
		855 msnm	Poza 3	7.86	81.0	16.6	6.0	0.1			11.00		
			Poza 4*	7.98	70.5	16.7	6.0	0.1			12.00		
			<i>promedio</i>	7.57	74.90	16.85	6.00	0.10			11.00		
12-Feb-03		Xochicoatlán Camino a Tianguistenco	Poza 1	8.05	75.4	13.2	7.0	0.2			28.00		
		20°46' 3" 98°39'11"	Poza 2	8.17	77.7	13.2	7.0	0.2			55.00		<i>P. achilli</i>
			Poza 3	7.95	75.0	13.1	7.0	0.2			30.00		
		1,535 msnm	<i>promedio</i>	8.06	76.03	13.17	7.0	0.2			37.67	0.36562	
11-Feb-03		Atlapexco, Hgo.	Poza 1	5.39	65.6	25.0	7.0	0.3			48.00		
		21°00'15" 98°20'10"	Desagüe										<i>P. cuevachicae</i>
		235 msnm	Poza 2	5.72	65.9	25.1	7.0	0.3			50.00		
			Poza 3	4.78	60.6	24.9	7.0	0.3			49.00		
			<i>promedio</i>	5.30	64.0	25.0	7.0	0.3			49.00		
11-Feb-03		Río Atlapexco	Remanso 1	8.92	102.9	22.8	7.0	0.2			28.00		
		21°00'2" 98°20'11"	Remanso 2	9.02	104.9	22.8	7.0	0.2			30.00		<i>P. cuevachicae</i>
		155 msnm	<i>promedio</i>	8.97	103.9	22.8	7	0.2			29		

MLM

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)* Hobbs, 1972

Feb/Mar 2003

2/3

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.
				mg/l	%								
13-Feb-03		Tlanchinol, Hgo. 20°58'14" 98°38'5" 1,555 msnm	Poza 1	6.81	68.6	16.1	6.0	0			70.00		<i>P. (O.) sp.</i>
			Poza 2	6.63	67.0	16.1	6.0	0			100.00		<i>P. (O.) sp.</i>
			<i>promedio</i>	6.72	67.8	16.1	6	0			85.00		no
13-Feb-03		Tlanchinol, Hgo. (Bomba)	Remanso 1	7.42	77.7	15.4	6.0	0.00			60.00		
			Remanso 2	7.61	73.3	15.3	6.0	0.00			100.00		
			Bomba	6.78	71.3	15.3	6.0	0.00			80.00		
			Remanso 3	7.70	76.2	15.2	6.0	0.00			90.00		
			<i>promedio</i>	7.38	74.6	15.30	6.0	0.00			82.50		
02-Mar-03	15:53	San Cornelio, Hgo. 20°23'5" 98°18'11" 1,600 msnm	Poza 1	5.81	68.1	20.2	7.0	0.2	0.07	36, 34.5	66.00		
			Poza 2	6.31	69.2	19.3	7.0	0.2	0.07	22.5, 43, 28.	64.00		<i>P. erichsoni</i>
			<i>promedio</i>	6.06	68.65	19.75	7	0.2	0.07	34.6	65.00	0.82149	
01-Mar-03	17:58	Rio El Santo, Agua Blanca, Hgo. 20°20'2" 98°22'9" 2095 msnm	Poza 1 claro	6.96	75.6	17.1	6.0	0	0.05	12.2	8.00		
	18:26		Poza 2	6.6	71.8	16.8	6.0	0	0.11	10.5	12.00		<i>P. riojai</i>
	18:42		Poza 3 cascada	6.82	77.0	17.4	6.0	0	0.04	30	9.00		
			<i>promedio</i>	6.79	74.80	17.10	6.00	0.00	0.07	17.57	9.67		
02-Mar-03	18:18	Cholhicaxtle, Hgo. 20°21'4" 98°18'8" 2,110 msnm	remanso	5.50	64.1	18.3	6.0	0.00	0.05	16, 13.5	5.00	1.06133	<i>P. riojai</i>
04-Mar-03	14:31	Necaxa, Pue. 20°12'15" 97°59'15" 1,390 msnm	Vertedor Salto Chico	6.42	68.6	18.9	7.0	0.1	0.11	23, 23, 24	34.00		
	15:00		Poza (eclosión)	5.82	68.4	20.2	7.0	0.1	0.00	20.8, 18, 19	33.00		<i>P. hoffmanni</i>
			<i>promedio</i>	6.12	68.5	19.55	7	0.1	0.055	21.3	33.50	1.54015	
04-Mar-03	12:35	Tenango de las Flores, Pue. 1,465 msnm	Arroyo del Jardín de Flores	5.79	71.8	19.3	6.0	0.00	0.04	39.5, 44	6.00	2.43336	<i>P. caballeroi</i>
04-Mar-03	10:36	Presa Tenango de las Flores	Contenedor	4.66	54.4	18.3	7.0	0.1	0.00	65, 83	0.00	0.97364	<i>P. hoffmanni</i>

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)* Hobbs, 1972
 Feb/Mar 2003

3/3

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	cm profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.
				mg/l	%								
		La Unión, Pue.	Pocitas carretera										
		850 msnm											
01-Mar-03	12:42	Manantial de Dejigui, Ver.	Poza 1 Bebedero	2.69	34.8	26.5	6.0	0	0.00	4.00	10.00		<i>P. chacalli</i>
		20°32'6" 98°26'15"	Poza 2	5.95	62.8	18.8	6.0	0	0.00	35.5	13.00		
		1,915 msnm	<i>promedio</i>	4.32	48.80	22.65	6.00	0.00	0.00	19.75	11.50	0.80020	
29-Mar-03	8:20	Paso Largo 1, Ver.											
		20°08'12" 96°56'15"	Poza carretera	0.83	8.2	23.0	8.0	0.2	0.00	19	136.00	1.24197	<i>P. gonopodocris-tatus</i>
		250 msnm											
29-Mar-03	10:30	Portezuelo, Tlapacoyan, Ver.											
		19°52'9" 97°13'1"	Nacimiento	5.50	57.0	16.9	6.0	0.00	0.01	15, 27, 18	6.00		
		1,070 msnm											
29-Mar-03	14:35	Chignautla, Pue.											
		19°49'2" 97°23'4"	Manantiales	7.64	77.1	16.2	6.0	0.1	0.60	32, 40, 15	24.00	0.57110	
		2,050 msnm											
30-Mar-03	11:35	Cuetzalan, Pue.	Camino "La Conchita"										
		20°0'10" 97°31'5"	Poza nacimiento	4.96	48.9	14.0	6.0	0.1	0.00	16, 15, 11			
	12:09	20°0'14" 97°31'2"	Tanque	5.92	61.2	17.8	6.0	0.1	0.00	47.5, 48, 46			
		1,045 msnm	<i>promedio</i>	5.44	55.05	15.90	6.00	0.10	0.00	30.50		0.89307	
30-Mar-03	14:45	Xochitlán, Pue.	Arroyo Cueva Sta. Elena										
		19°58'8" 97°37'9"	Nacimiento 2	7.46	76.1	16.5	6.0	0	0.04	5.5, 3, 2.5, 0.5	41.00		
	15:40		Arroyo Santa Elena								28.00		
			<i>promedio</i>	7.46	76.10	16.50	6.00	0.00	0.04	2.8	34.50	0.36562	
04-Mar-03	15:39	Mesa del Crucero, Pue. (La Unión)	Poza 1	5.93	62.8	23.1	6.0	0.00	0.05	16, 12, 13	7.00		
			Poza 2 (túnel)	5.82	73.9	27.3	6.0	0.00	0.05	11.5, 7.7, 9.8	12.00		
	15:45	715 msnm	<i>promedio</i>	5.88	68.35	25.20	6.00	0.00	0.05	11.60	9.50	1.22638	

MLM

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)*

May/Jun 2003

1/4

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		Temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad cm	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	app.
				mg/l	%								
2-Jun-2003	17:37	Atezca	Poza 1 (alslada)	4.15	51.5	22.3	6.0	0.1	0.01	50			
		20°48'10" 98°44' 4"	Poza 2 (seca)										<i>P. achilli</i>
	18:10	1,495 msnm	Cascada (estancado)	1.01	8.1	23.7	6.0	0.1	0.00	26			
	19:07		Poza azul (arriba cascada)	1.29	136.5	20.6	7.0	0.1		57			
	19:15		Pocitas gemelas	0.63	12.1	20.7	7.0	0.1	0.007	25			
			<i>promedio</i>	0.98	52.23	21.67	6.67	0.10	0.00	36.00			
3-Jun-2003	12:29	Chalma	Poza 1	5.92	66.8	20.6	7.0	0.1	0.002	23			
	12:44		Poza 2 Cascada chica	6.46	72.8	20.7	7.0	0.2	0.04	54			
	14:17	20°52' 0" 98°41' 11"	Poza 3 Cascada grande	7.06	81.3	20.7	7.0	0.2	0.00	60.23			<i>P. achilli</i>
		1,480* y 1,525 msnm	<i>promedio</i>	6.48	73.633	20.667	7	0.1667	0.014	40			
3-Jun-2003	18:07	Calnali	Poza 1	5.26	62.1	22.9	6.0	0.1		36			
	18:16	20°53'7" 98°36'0"	Poza 2	5.45	62.4	22.7	6.0	0.1					<i>P. achilli</i>
	18:23	855 msnm	Poza 3	5.40	61.3	22.6	6.0	0.1					
	18:30		Poza 4	5.38	59.6	22.4	6.0	0.0					
			<i>promedio</i>	5.37	61.4	22.7	6.0	0.08					
4-Jun-2003	8:45	Xochicoatlán Camino a Tianguistengo	Poza 1	5.49	58.0	17.8	7.0	0.2					
	8:50	20°46' 3" 98°39'11"	Poza 2	4.04	43.3	17.6	7.0	0.2					<i>P. achilli</i>
	8:55	1,535 msnm	Poza 3	4.29	47.5	17.6	7.0	0.2					
	9:06		Poza 4	4.88	59.8	17.5	7.0	0.2					
	9:13		Poza 5	5.35	66.8	17.5	7.0	0.2					
			<i>promedio</i>	4.81	55.1	17.6	7	0.2					
4-Jun-2003		Atlapexco, Hgo.	Poza 1 junto desagüe										
		21°00'15" 98°20'10"	Poza 2										<i>P. cuevachicae</i>
		235 msnm	<i>promedio</i>										
4-Jun-2003	18:37	Río Atlapexco	Remanso 1	6.56	85.4	30.4	7.0	0.2					
	18:53	21°00'2" 98°20'11"	Remanso 2 Cola de Zorra	3.04	43.4	30.7	7.0	0.1					<i>P. cuevachicae</i>
	19:07	155 msnm	Pocitas	1.88	25.2	29.3	7.0	0.1					

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)*

May/Jun 2003

2/4

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.
				mg/l	%								
4-Jun-2003	19:10	Río Atlapexco	Remanso 3	4.91	67.5	31.3	7.0	0.1					
	19:15		Remanso 4 rápidos, oca de zorra	1.86	26.3	29.4	7.0	0.2					
			<i>promedio</i>	3.65	49.6	30.22	7.0	0.1					
5-Jun-2003	19:15	Tlanchinol, Hgo. 20°58'14" 98°38'5" 1,555 msnm	Poza 1	1.41	9.3	20.5	6.0	0.0		13			<i>P. (O.) sp.</i>
	19:24		Poza 2	4.76	52.7	18.7	6.0	0.0					<i>P. (O.) sp.</i>
			<i>promedio</i>	3.09	31.0	19.6	6.0	0		13			no
20-Jun-2003	17:40	San Cornelio, Hgo. 20°23'5" 98°18'11" 1,600 msnm (1,385 ?)	Poza 1			22	7.0		0.025	33,29,31			
	17:45		Poza 2			22	7.0		0.01	25,43,5,45			<i>P. erichsoni</i>
			<i>promedio</i>			22	7.0		0.0175	34.4			
22-Jun-2003	14:30	Río El Salto, Agua Blanca, Hgo. 20°20'2" 98°22'9" 2095 msnm	Poza 1 claro			20	6.0		0.04	8,15,22,5,25			
			Poza 2			21	6.0		0.01	11,12,10			<i>P. riojai</i>
			Poza 3 cascada			19	6.0		0.06	38,51,5,5,8			
		<i>promedio</i>							25.6				
22-Jun-2003	17:00	Chichicaxtle, Hgo. 20°21'4" 98°18'8" 2,110 msnm	Remanso			20.0	6.0		0.02	17,18,19			<i>P. riojai</i>
											18		
			<i>promedio</i>										
		Tenango de Dorla, Hgo. 14Q580472 2248229 1,880 msnm	Camino al Gosco; contenedor del arroyo										
		<i>promedio</i>											
21-Jun-2003	19:00	Necaxa, Pue. 20°12'15" 97°59'15" 1,390 msnm	Vertedor Salto Chlco			23	7.0		0.05	8,9,10			
											9		<i>P. hoffmanni</i>
			<i>promedio</i>										
22-Jun-2003	8:30	Presa Tenango de las Flores, Pue. 1,465 msnm	Contenedor			18	6.0		0	27,30,57			<i>P. caballeroi</i>
			<i>promedio</i>								38		

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)*
 May/Jun 2003

3/4

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.
				mg/l	%								
22-Jun-2003	10:30	Tenango de las Flores	Poza 1 manantial			19	6.0		0	33,35,31			
	10:35	Arroyo del Jardín de Flores	Poza 2			21	6.0		0	23,37,5,32			
	10:45		Poza 3 arroyo puente				20	6.0		0.04	9,9,9,5,9,5		
			<i>promedio</i>							9.25			
20-Jun-2003		Manantial de Dejgüil, Ver.											<i>P. chacalli</i>
		20°32'6" 98°26'15"	Poza 1	4.34	46.1	18.0	6.0	0.0	0.00	12,11,11			
		1,915 msnm	Poza 2 bebedero	2.53	28.4	19.0	6.0	0.0	0.00	7,5,10,10,1			
			<i>promedio</i>	3.44	37.25	18.50	6.00	0.00	0.00	10			
15-May-2003	19:17	Paso Largo 1, Ver.											
		20°08'12" 96°56'15"	Poza carretera	0.23	3.5	28.6	7.0	0.5	0.00	100	164		<i>P. gonopodocris-tatus</i>
		250 msnm											
15-May-2003	17:00	Portezuelo, Tlapacoyan, Ver.											
		19°52'9" 97°13'1"	Nacimiento			31°C (aire)							Poza seca
		1,070 msnm											
16-May-2003	9:16	Chignautla, Pue.											
		19°49'2" 97°23'4"	Manantiales	6.96	70	16.8	6.0	0.1	0.50	32, 36, 30	36		
		2,050 msnm											
16-May-2003	13:36	Cuetzalan, Pue.	Camino "La Conchita"										<i>P. cuetzalananae</i>
		20°0'10" 97°31'5"	Poza nacimiento	3.11	29.9	22.6	6.0	0.1	0.00	16, 14, 12	43		
	10:54	20°0'14" 97°31'2"	Tanque	5.6	63.6	21.4	6.0	0.1	0.00	59, 59, 57	65		
		1,045 msnm	<i>promedio</i>	4.36	46.75	22.00	6.0	0.1	0.00	36.1	54		
16-May-2003	18:16	Xochitlán, Pue.	Arroyo Cueva Sta. Elena										<i>P. xochitlananae</i>
	15:00	19°58'8" 97°37'9"	Nacimiento 1										
	15:57		Nacimiento 2	5.12	56.9	21.4	6.0	0.1	0.00	5, 5, 2.5	49		
			<i>promedio</i>										

MLM

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)*

Ago / Sep 2003

1/3

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	app.
				mg/l	%								
22-Ago-2003	7:55	Atezca	Poza 1	7.53	80.6	18.3	6	0.0	0.2	38,38,15			
	8:07	20°48'10" 98°44' 4"	Poza 2	7.38	78.9	18.3	6	0.0	0.19	18,28,45			<i>P. achilli</i>
	8:23	1,495 msnm	Cascada	7.43	79.7	18.3	6	0.0	0.175	40, 70			
			<i>promedio</i>	7.45	79.73	18.30	6	0.0	0.19	36.5			
22-Ago-2003	11:46	Chalma	Poza 1	6.94	64.8	19.5	7	0.1	0.2	30,34,34			
		20°52' 0" 98°41' 11"	Poza 2	7.00	77	19.6	7 al	0.1	0.1	30,36			<i>P. achilli</i>
		1,480* y 1,525 msnm	<i>promedio</i>	6.97	70.90	19.55	7	0.1	0.17	32.8			
22-Ago-2003	14:20	Calnali, Hgo.	Poza 1	7.07	75.1	20	6	0.0	0.22	30,81,65			
		20°53'7" 98°36'0"	Poza 2	6.87	77.5	20	6	0.0	0.16	28,30,34			<i>P. achilli</i>
		855 msnm	Poza 4*	7.33	81.4	9.9	6	0.0	0.15	32,30,44			
			<i>promedio</i>	7.09	78.00	16.63	6	0.0	0.18	39.3			
24-Ago-2003	8:03	Xochicoatlán, Hgo. Camino a Tianguistengo	Poza 1	6.92	73.8	18.1	7	0.2	0.1	21,26			
	8:24	20°46' 3" 98°39'11"	Poza 2	7.07	77.3	18.2	7	0.2	0.18	23.5,31,24			<i>P. achilli</i>
		1,535 msnm	<i>promedio</i>	7.00	75.55	18.15	7	0.2	0.14	25.1			
23-Ago-2003	14:49	Atlapexco, Hgo.	Poza 1	5.63	68	26.6	7	0.3		25			
	14:55	21°00'15" 98°20'10"	Poza 2	3.38	48.8	26.4	7	0.3		25,20			<i>P. cuevachicae</i>
		235 msnm	<i>promedio</i>	4.51	58.40	26.50	7	0.3		23.3			
23-Ago-2003		Río Atlapexco	Remanso 1										
		21°00'2" 98°20'11"	Remanso 2		creciente								<i>P. cuevachicae</i>
		155 msnm	Remanso 3										
			<i>promedio</i>										
23-Ago-2003	8:02	Tlanchinol, Hgo.	Poza 1	5.43	60	17.5	6	0.0	0.05	29,13,35			<i>P. (O.) sp.</i>
	8:21	20°58'14" 98°38'5"	Poza 2	5.71	48.1	17.5	6	0.0	0.04	51,57.5,44			<i>P. (O.) sp.</i>
		1,565 msnm	Poza 3	5.57	54.05	17.50	6.0	0.0	0.05	38.25			

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus (Villalobosus)*
 Ago / Sep 2003

2/3

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.	
				mg/l	%									
20-Ago-2003	15:15	Mesa de Crucero, Pue.	poza arroyo	0.85	10.9	23.9	6	0.0	0.00	23,27				
			río	1.37	12.7	25.4	6	0.0	0.05	30,29,25				
			<i>promedio</i>	1.11	11.80	24.65	6.00	0.00	0.03	26.8				
21-Ago-2003		San Cornelio, Hgo.												
			20°23'5" 98°18'11"	Poza 1	2.06	24.3	19	7	0.2	0.06	29,34,35			<i>P. erichsoni</i>
			1,600 msnm (1,385 ?)	<i>promedio</i>							32.6			
		Río El Salto, Agua Blanca, Hgo.	Poza 1 claro											
			20°20'2" 98°22'9"	Poza 2										<i>P. riojai</i>
			2095 msnm	Poza 3 cascada										
			<i>promedio</i>											
21-Ago-2003	14:35	Chichicaxtle, Hgo.												
			20°21'4" 98°18'8"	Remanso	5.24	58.3	18.1	6	0.0	0.06	38,38,15			<i>P. riojai</i>
			2,110 msnm	<i>promedio</i>							30.3			
		Tenango de Dorla, Hgo.	Camino al Gosco; contenedor del arroyo											
			14Q580472 2248229	<i>promedio</i>										
			1,880 msnm											
20-Ago-2003	13:00	Necaxa, Pue.												
			20°12'15" 97°59'15"	Vertedor Salto Chlco	6.20	31.5	22.2	7	0.1	0.80	10,13,14			<i>P. hoffmanni</i>
										12.3				
20-Ago-2003	15:00	Tenango de las Flores, Pue.	poza 1	4.84	54.7	20.3	6	0.0	0.04	68,68,62			<i>P. caballeroi</i>	
			Arroyo del Jardín de Flores	poza 2	4.51	51.6	20.50	6	0.0	0.00	50			
	15:20		1,465 msnm	<i>promedio</i>	4.68	53.15	20.40	6	0.00	0.02	62			
20-Ago-2003	16:45	Presas Tenango de las Flores												
			Contenedor	3.40	41.2	19.4	6	0.1	0	77,30			<i>P. hoffmanni</i>	
			<i>promedio</i>							53.5				

Variables físico-químicas
Diversificación de *Procambarus* (Villalobosus)
 Ago / Sep 2003

3/3

Fecha	Hora	Localidad	sitio de muestreo	Oxígeno disuelto		temperatura °C	pH	salinidad	velocidad corriente m/s	profundidad	CaCO ₃ mg/l	materia orgánica g	spp.
				mg/l	%								
		La Unión, Pue.	Pocltas carretera										
		850 msnm											
		Manantial de Dejgüi, Ver.	Poza 1										<i>P. chacalli</i>
		20°32'6" 98°26'15"	Poza 2										
		1,915 msnm	Poza 3										
			<i>promedio</i>										
17-Ago-2003	3:55	Paso Largo 1, Ver.											
		20°08'12" 96°56'15"	Poza carretera	0.71	11.6	26.7	8	0.5		17,30,22			<i>P. gonopodocristatus</i>
		250 msnm								23			
17-Ago-2003	13:56	Portezuelo, Tlapacoyan, Ver.											
		19°52'9" 97°13'1"	Nacimiento	5.54	65.40	19.40	6	0.0	0.03	12, 20,23			
		1,070 msnm								18.3			
18-Ago-2003	8:45	Chignautla, Pue.											
		19°49'2" 97°23'4"	Manantiales	6.88	72.6	16.5	6	0.1	0.05	20,27,33			
		2,060 msnm								26.6			
18-Ago-2003		Cuetzalan, Pue.	Camino "La Conchita"										
	13:06	20°0'10" 97°31'5"	Poza nacimiento	3.82	43.3	20.2	7	0.1	0.01	9.5,11,12			
	13:30	20°0'14" 97°31'2"	Tanque	4.15	46.8	19.9	7	0.1	0.00	70			
		1,045 msnm	<i>promedio</i>	3.99	45.05	20.05	7.00	0.1	0.01	25.6			
18-Ago-2003		Xochitlán, Pue.	Tributario al Arroyo Cueva Sta. Elena										
	16:05	19°58'8" 97°37'9"	Nacimiento 1	5.75	67	20.5	7	0.1	0.02	4,5,6,6			
	17:05		Santa Elena	6.77	75.6	21.2		0.1					
			<i>promedio</i>	6.26	71.30	20.85	7.00	0.1	0.02	5.1			

CAPÍTULO 5. BIOGEOGRAFÍA

Los camarinos (Cambaridae: Cambarinae) constituyen un grupo altamente especializado de la superfamilia Astacoidea y al parecer provienen de un tipo inferior muy parecido al género *Astacus*, cuya relación morfológica es la supresión de la única pleurobranquia y la especialización del primer par de pleópodos en el macho (Villalobos, 1955). Los rasgos morfológicos distintivos de Cambarinae consisten en la posesión de ganchos sobre el isquiopodito del tercero o cuarto par de pereiópodos, o bien sobre ambos pares, el primer pleópodo con la porción distal compleja y estrechamente recogida y el conducto espermático abierto sobre uno de dos ó más elementos terminales, en los machos; en las hembras el *annulus ventralis* es fijo o movable, si es movable, pocas veces en un arco mayor a 40 grados. Los géneros incluidos en esta subfamilia son *Barbicambarus*, *Cambarus*, *Fallicambarus*, *Faxonella*, *Hobbseus*, *Orconectes*, *Troglocambarus* y *Procambarus*; a este último pertenece el subgénero *Villalobosus* (Hobbs, 1974).

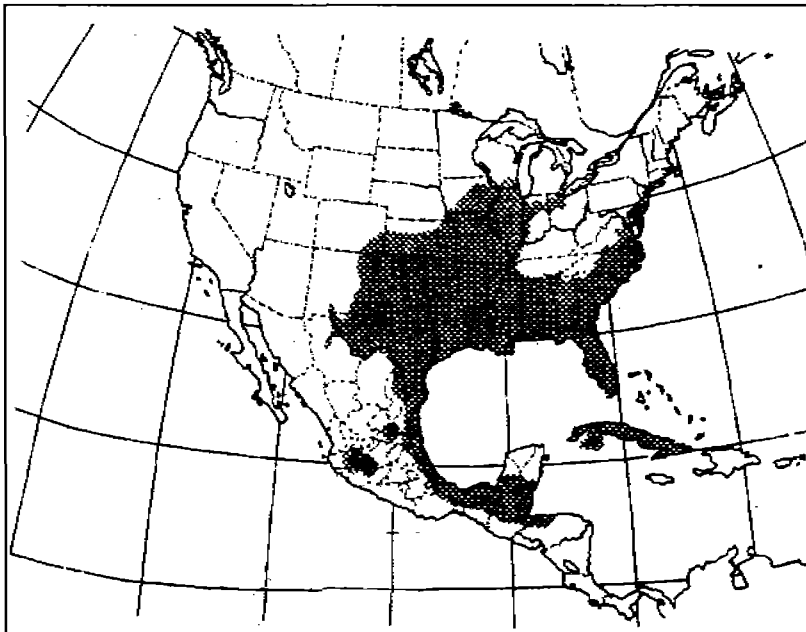


Fig. 5.1. Distribución de los acociles del género *Procambarus* en América (Hobbs, 1984).

El género *Procambarus* es particularmente importante por contener aproximadamente la mitad de las especies y subespecies de acociles descritas en América, distribuyéndose desde el sureste de los Estados Unidos, pasando por México sobre la vertiente del Atlántico y del Golfo de México, con dos especies aisladas sobre la vertiente del Pacífico, hasta el sur de Belice y Guatemala (Fig. 5.1). No obstante, se ha sugerido un rango de distribución más amplio durante el Mesozoico tardío y el Cenozoico temprano, debido a la evidencia fósil del Eoceno encontrada en la formación de Río Verde de Wyoming (Packard, 1880; Feldmann *et al.*, 1981; Hobbs, 1984). La diversidad demostrada por los variados y dispares vestigios de subgéneros monotípicos apoyan la creencia de que los ahora casi extintos linajes estuvieron más ampliamente distribuidos de lo que muestran las poblaciones existentes (Hobbs, 1984).

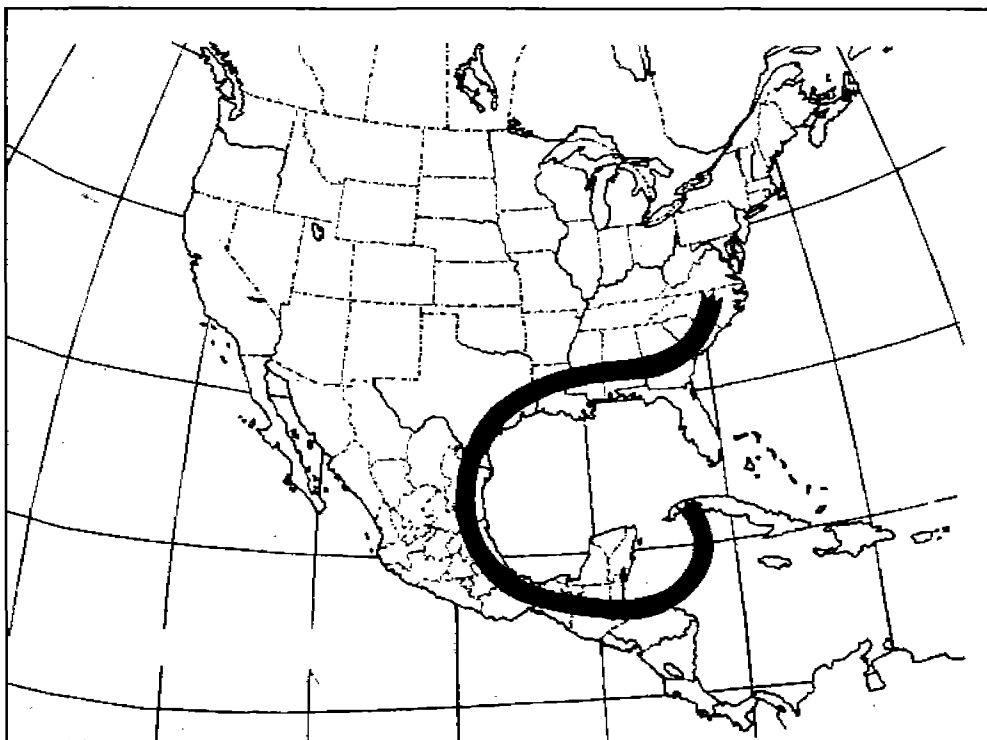


Fig. 5.2. Patrón básico de distribución de *Procambarus* (Hobbs, 1984).

Migración o dispersión del género *Procambarus*

Hobbs (1984) consideró que el patrón de distribución de los subgéneros de *Procambarus* podría ser llamado el patrón general de la ruta de dispersión de *Procambarus* (Fig. 5.2). Asimismo, sugirió que los acociles de Norteamérica emigraron desde el centro de origen del género hacia el sur, hasta llegar a la Isla de Cuba y la Isla de Pinos. Este autor consideraba que los acociles habían tenido un centro de origen, concepto que es totalmente dispersionista. La diversificación y la generación de nuevas especies y subgéneros en México pudieron deberse principalmente a la formación de la Sierra Madre Oriental y del Eje Neovolcánico Transversal. No obstante debe considerarse que, si bien esta hipótesis de distribución ha sido ampliamente aceptada, no se han efectuado análisis de índole filogenética o de otro tipo, incluso a nivel molecular, que sustenten esa aseveración.

Migración de las especies del subgénero *Villalobosus*

El subgénero *Villalobosus*, establecido en la región nororiental de la República Mexicana, pudo derivarse del mismo linaje ancestral del cual proviene el subgénero *Ortmannicus*, con el que mantiene ciertos rasgos de correspondencia y comparte el territorio geográfico. Esta diversificación pudo ser consecuencia de la posible emigración de ese linaje desde el noreste de Norteamérica a través de la planicie costera del Golfo de México, a finales del Plioceno, la cual por su reciente emersión, pudo brindar condiciones ecológicas más favorables que propiciaron la gran variedad de formas de camarinos en la zona. Estos eventos concuerdan con el principio del periodo glacial del Cuaternario, en que quizá el cambio de temperatura y otros cambios climáticos influyeron en el desplazamiento y ayudaron a los procesos de dispersión de los camarinos

del subgénero *Ortmannicus* hacia el sur de la República Mexicana (Villalobos, 1955). De acuerdo con Hobbs (1971), las especies del subgénero *Villalobosus* conforman uno de los tres linajes adicionales que siguieron al 'stock' inicial que se movió hacia el sur a lo largo de la costa del Golfo de México (Fig. 5.3), propiciando muchas de las especies que actualmente habitan en la pendiente del Golfo, el área más densamente poblada en México en términos de número de especies.

El subgénero *Villalobosus*, junto con algunos miembros de *Ortmannicus* y *Paracambarus*, habita en la Sierra Madre Oriental, al norte de la región montañosa del Eje Volcánico Transversal --región especialmente diversa faunísticamente debido a su amplio gradiente altitudinal—. El endemismo del subgénero *Villalobosus* en el sur de la Sierra Madre Oriental es muy marcado. Geográficamente comparte el territorio con algunos miembros de los subgéneros *Ortmannicus* y *Paracambarus*. *Procambarus* (*Villalobosus*) *hoffmanni* comparte territorio con *Procambarus* (*Ortmannicus*) *caballeroi* en Villa Juárez, Puebla —este último subgénero se extiende ampliamente desde Florida, E.U.A., hasta el norte de Puebla (Hobbs, 1984)— y aunque los sitios que habitan ambas especies pueden estar separados por tan sólo algunos metros, no se han encontrado reunidas. *Procambarus* (*Villalobosus*) *hoffmanni* y *Procambarus* (*Villalobosus*) *zihuateutlensis* comparten territorio con *Procambarus* (*Paracambarus*) *ortmanni* en Zihuateutla, Puebla --aparentemente el único caso en que se han colectado tres especies en el mismo sitio—, mientras que *Procambarus* (*Paracambarus*) *paradoxus* se localiza en Tetela de Ocampo, Puebla, marcando el límite de lo que Villalobos (1955) consideró la zona geográfica de *Villalobosus* y coincidiendo con *Procambarus* (*Villalobosus*) *teziutlanensis*. El primer registro de extensión de *Villalobosus* sobre el considerado territorio de *Ortmannicus* y *Paracambarus*

fue hasta la descripción de *Procambarus (Villalobosus) xochitlanae* (Hobbs, 1975) y *Procambarus (Villalobosus) cuetzalanae* (Hobbs, 1982).

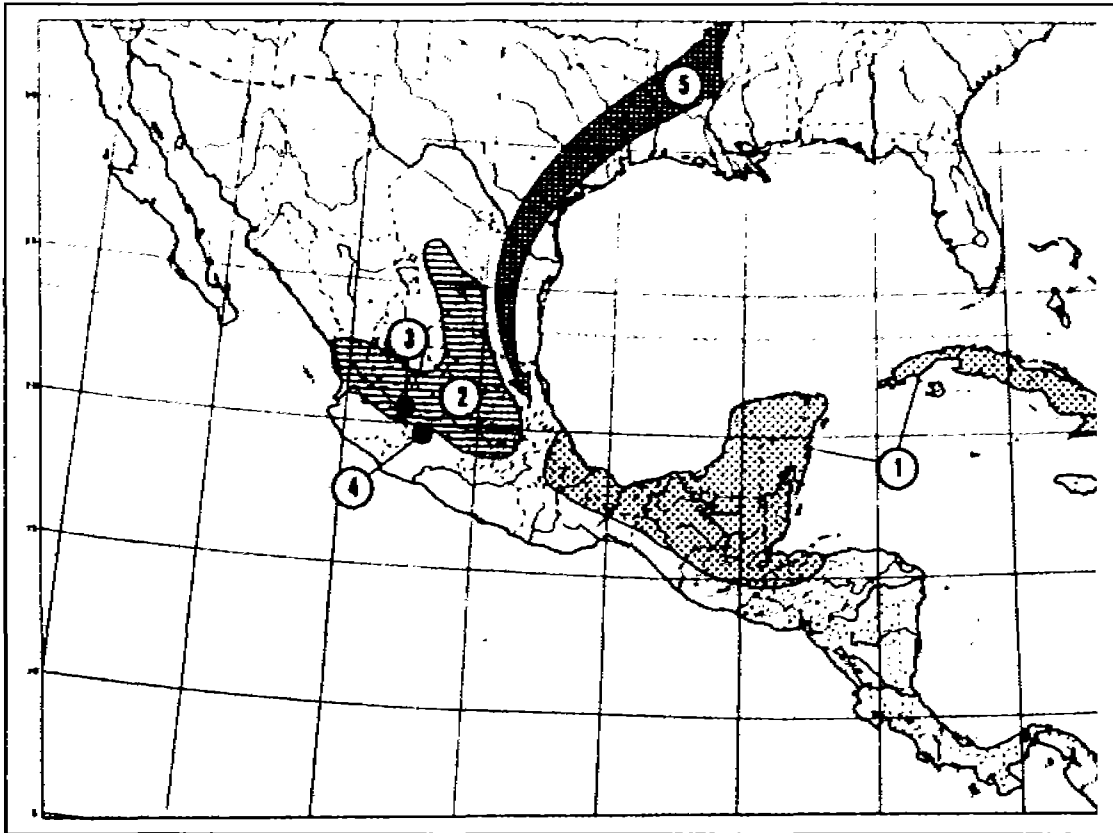


Fig. 5.3. Migración de acociles durante el Plioceno. Número 5, stock primitivo del cual se postula que se derivaron las especies del subgénero *Villalobosus* (Hobbs, 1971).

Este subgénero es uno de los considerados como vestigio de un linaje que tuvo una trayectoria de dispersión desde el norte de Florida hasta el este del Eje Neovolcánico Transversal (Hobbs, 1984). Desde un punto de vista ecológico y geográfico, es posible que el Eje Neovolcánico Transversal, como barrera natural, detuviera la migración de los camarinos hacia el sur, siendo éstos objeto de procesos de especiación que pudieron propiciar la diversificación del subgénero *Villalobosus*, manteniéndolo en esa región de la Sierra Madre Oriental, considerada por Villalobos (1955) como zona de dispersión. Estas teorías sobre la dispersión de los acociles

del subgénero *Villalobosus* propuestas por Hobbs y Villalobos son altamente dispersionistas; sin embargo, no se debe olvidar que otros procesos, como los vicariantes, pudieron de manera regional y local haber provocado la distribución actual de estas especies. La falta de análisis cladísticos o biogeográficos formales que respalden la hipótesis dispersionista es lo que nos motiva a ponerla a prueba en este estudio.

Hipótesis

Existe un patrón biogeográfico apoyado por la filogenia que sugiere una invasión progresiva del subgénero *Villalobosus* desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de México y procesos de especiación sucesivos durante la dispersión del grupo hacia el sur.

Método

A partir de las topologías obtenidas con base en caracteres morfológicos y moleculares representando las posibles las relaciones filogenéticas entre las especies del subgénero *Villalobosus* y la información sobre su distribución geográfica, se construyeron cladogramas taxonómicos de áreas, cladogramas resueltos de áreas y cladogramas generales de áreas, lo que permitió inferir las relaciones entre áreas de endemismo. Los cladogramas de áreas se obtuvieron aplicando el método de análisis de componentes (Nelson, 1984; Page, 1988; Morrone y Crisci, 1995), mediante el programa Component 2.0 (Page, 1993). Este método consiste en maximizar la codivergencia, es decir, la historia compartida entre los taxa y de minimizar las pérdidas (debidas a extinciones o taxones no coleccionados) y duplicaciones (resultado de eventos de especiación simpátrida o de especiación antes del surgimiento de las barreras), reconciliando los

cladogramas taxonómicos de áreas entre sí.

Resultados

El análisis de componentes dio por resultado dos cladogramas generales de áreas. En orden de elegir el mejor de ellos, los cladogramas alternativos fueron evaluados mediante el cálculo manual de sus ítems de error (Nelson y Platnick, 1981; Morrone y Carpenter, 1994; Morrone, 2001), que consistió en determinar el número de nodos interiores y áreas terminales que era necesario agregar a los cladogramas taxonómicos de áreas para lograr su concordancia con uno general de áreas. El árbol mostrado en la figura (Fig. 5.4) fue el más congruente debido al mínimo número de nodos y terminales requeridos para adicionar. De acuerdo con el cladograma, las localidades analizadas se agruparon de la forma siguiente:

- Paso Largo 1, Ver.
- Tlanchinol, Hgo.
- El Salto, Agua Blanca, Hgo., Chichicaxtle, Hgo., Cuetzalan, Pue., Dejjigui, Huayacocotla, Ver., Calnali, Hgo., Atezca, Hgo, Xochicoatlán, Hgo y Chalma, Hgo. Asimismo, Tenango de Doria, Hgo., San Cornelio, Hgo, Tenango de las Flores y Necaxa, Pue., La Unión, Pue. y Zihuateutla, Pue.
- La Unión, Pue., Teziutlán, Pue., Portezuelo, Tapacoyan, Ver. y Xochitlán, Pue.

Tenango de las Flores, Hgo. y Zamora, Mich. aparecen en la parte basal del árbol pero sin agruparse.

La tabla 5.1 describe estos clados desde el punto de vista de la cuenca a la que pertenece cada localidad.

Tabla 5.1. Arreglo de localidades visto desde un nivel de cuencas.

Cuenca	Localidades	Especies
Río Pánuco	Calnali Xochicoatlán Atezca Chalma Tlanchinol	P. achilli P. hidalgoensis
Río Tuxpan	El Salto Chichicaxtle Dejigui Tenango de Doria San Comello	P. riojai P. chacalli P. erichsoni
Río Cazones	La Unión Zihuateutla	P. hortonhobbsi P. zihuateutlensis P. contrerasi
Río Tecolutla	Tenango de las Flores (contenedor) Cuetzalan Necaxa Tenango de las Flores (arroyo) Xochitlán	P. caballeroi P. cuetzalanae P. hoffmanni P. xochitlanae
Río Nautla	Paso Largo 1 Teziutlán Portezuelo	P. gonopodocristatus P. teziutlanensis P. tlapacoyanensis

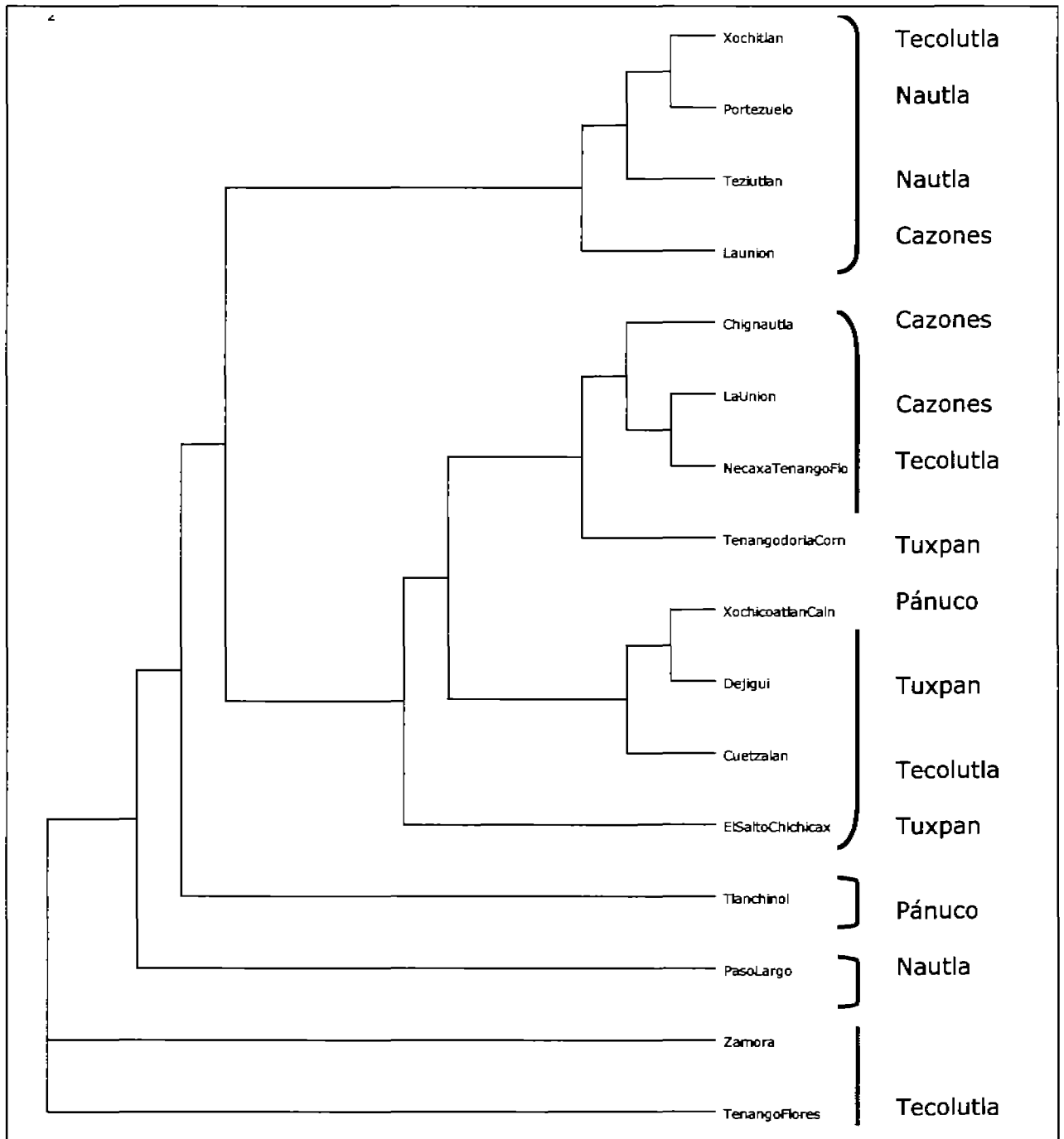


Fig. 5.4. Cladograma general de áreas resultante del análisis de componentes que muestra las relaciones de las localidades donde habitan acociles. Las líneas indican el tipo de hábitat reportado en el capítulo 4. Las líneas rojas y amarillas corresponden a especies del subgénero *Villalobosus* y las verdes a las especies del subgénero *Ortmannicus*.

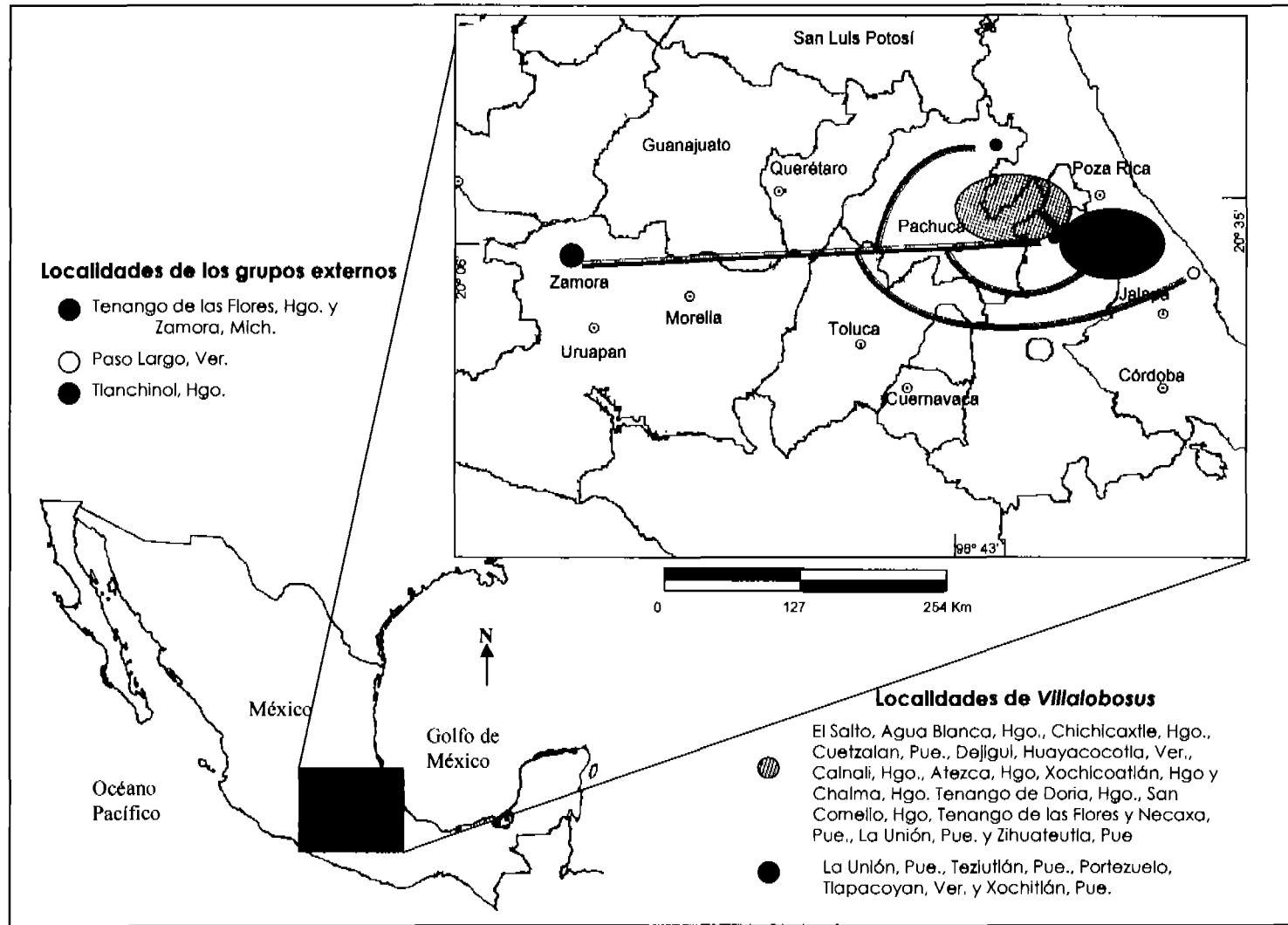


Fig. 5.5. Mapa ilustrando las agrupaciones del cladograma general de áreas resultante del análisis de componentes, de las localidades donde habitan los acociles en estudio. Los colores representan los diferentes clados resultantes con sus respectivas localidades.

Discusión

De acuerdo con los resultados, algunas de las regiones habitadas por acociles del subgénero *Villalobosus* no parecen representar unidades naturales cuando se consideran los taxones que los habitan, tal es el caso de la cuenca del Tecolutla que se divide en 3 clados diferentes, mostrando que sus distintos componentes están más estrechamente relacionados con aquellos al sur de los ríos Tuxpan y Cazones.

La cuenca del Pánuco se divide en dos clados (3 y 4), cuyas localidades son relativamente cercanas geográficamente, pero ciertamente involucran especies distintas, una del subgénero *Villalobosus* y otra de *Ortmannicus*. Ha sido documentada la posible existencia de una antigua fragmentación de las zonas montañosas de México que separó una biota tropical de una extratropical, ésta última fragmentándose posteriormente en dos áreas, la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, incluyendo parte del altiplano (Liebherr, 1991). Debe recordarse la posición en el clado 1 de Zamora, Mich. La Sierra Madre Oriental puede asimismo dividirse en dos partes, una sur y otra norte (Smith, 1941; Luna et al., 1994). De acuerdo con Liebherr, existe gran número de especies endémicas compartidas entre las partes norte de las Sierras Madre Oriental y Occidental y también entre las partes sureñas, por lo que no pueden considerarse como unidades biogeográficas naturales. Los cañones de la cuenca del río Pánuco son la barrera que separa en dos a la Sierra Madre Oriental, lo que concordaría con la estrecha relación observada entre Tlanchinol, localidad para una especie del subgénero *Ortmannicus* ubicada al norte del área de estudio y aquellas de *Villalobosus*, así como la afinidad entre sus especies.

Resulta interesante resaltar que el arreglo dicotómico de los clados parece reflejar una separación en tres grandes regiones, que se sobreponen en sus límites, a través de las diferentes cuencas donde habitan los acociles del subgénero *Villalobosus*. Esto, por un lado, coincide parcialmente con la agrupación en tres conjuntos de las especies en estudio, por el otro muestra también cercana coincidencia con los resultados derivados del análisis de distribución ecológica, reflejando tres regiones que se sobreponen conformando los tres tipos de hábitat determinados: uno para las especies del subgénero *Ortmannicus* y dos más para las especies de *Villalobosus*.

Considerando que la dispersión del linaje ancestral pudo suceder hacia el sureste, el sitio geográfico de la disyunción que daría origen a las especies del subgénero *Villalobosus* se situaría en el límite distribucional noreste de éste último, dando lugar a subpoblaciones que pudieron establecerse, por un lado, en sitios sobre la parte baja de la vertiente de la Sierra Madre Oriental y por otro en la parte alta. A partir de esto podríamos inferir que la diversificación del subgénero *Villalobosus* pudo suceder inicialmente en dirección noreste-sureste, pero con dos eventos claros de divergencia que pudieron partir, uno de la región centro-sur y otro en dirección sur a norte, lo que explicaría la afinidad de especies habitando en las zonas de sobreposición. No obstante, la relación observada entre localidades ubicadas al extremo sur (Cuetzalan) y al extremo norte (Dejigui, Calnali, Xochicoatlán, Atezca, Chalma) de la zona de estudio es aún incierta. La dispersión inicial debió verse favorecida por las conexiones entre cuerpos de agua propiciadas por los continuos cambios físicos en la región. La subsecuente fragmentación de esas poblaciones tomaría lugar debido a la conformación orográfica final de esa región de la Sierra Madre y marcaría al sureste los límites distribucionales de esas poblaciones como

resultado de la emergencia del Eje Neovolcánico Transversal. Por lo tanto, si bien la dispersión de los linajes ancestrales pudo verse favorecida por las nuevas condiciones ecológicas, la orografía de esa región culminando en la conformación final de las cuencas y múltiples barrancas, sugiere que eventos de vicarianza debieron propiciar la subdivisión de las poblaciones, su adaptación a los diferentes microclimas en conformación y por lo tanto procesos de especiación alopátrica.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL

En 1984, Hobbs propuso que el patrón de distribución de los subgéneros de *Procambarus* podría ser llamado el Patrón General de la Ruta de *Procambarus*. Sugirió que los acociles de Norteamérica emigraron desde el centro de origen del género, en el sureste de los Estados Unidos, hacia el sur pasando por México sobre la vertiente del Atlántico y del Golfo de México, hasta llegar a la Isla de Cuba y la Isla de Pinos (dispersión de las formas ancestrales, desde un posible centro de origen). La diversificación y la generación de nuevas especies y subgéneros pudieron deberse principalmente a la formación de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico Transversal (por procesos de vicarianza). Villalobos (1955) sugirió que el subgénero *Villalobosus*, en aquel momento referido como sección Riojae, establecido en la región nororiental de la República Mexicana, pudo derivarse del subgénero *Ortmannicus*, con el que mantiene ciertos rasgos de correspondencia y comparte el territorio geográfico. Esta diversificación pudo ser consecuencia de la posible emigración de *Ortmannicus* desde el noreste de Norteamérica a través de la planicie costera del Golfo de México a finales del Plioceno, la cual, por su reciente emergencia y por los procesos orogénicos que ocurrieron durante esa época geológica, brindaron las condiciones ecológicas y de aislamiento geográfico que propiciaron la gran diversificación de formas que se observa en la actualidad en los camarinos en la zona. Después de estos eventos geológicos, con el principio del período glacial durante el Cuaternario, el cambio de temperatura y otros cambios climáticos influyeron en la fragmentación y desaparición de varias poblaciones de camarinos relacionados con el subgénero *Ortmannicus*, que ya se habían establecido en territorio de México. Las poblaciones que sobrevivieron a estos sucesos, quedaron de esta forma aisladas del grupo ancestral

norteamericano. De acuerdo con Hobbs (1971), las especies del subgénero *Villalobosus* conforman uno de los tres linajes adicionales que siguieron al 'stock' inicial que se movió hacia el sur desde el norte de Florida a lo largo de la costa del Golfo de México, hasta el este del Eje Neovolcánico Transversal, propiciando la formación de muchas de las especies que habitan en la pendiente del golfo, el área más densamente poblada en México en términos de números de especies. Desde un punto de vista ecológico, es posible que el Eje Neovolcánico Transversal, como barrera natural, detuviera la migración de los camarinos hacia el sur, siendo éstos objeto de un proceso de especiación que pudo propiciar la diversificación de las especies del subgénero *Villalobosus*, manteniéndolas en esa región de la Sierra Madre Oriental, considerada por Villalobos (1955) como zona (quizá centro) de dispersión.

Considero que a diferencia de otros grupos de acociles que habitan en la parte baja de la vertiente del Golfo de México y sobre la planicie costera, como por ejemplo el subgénero *Austrocambarus* al sureste del país, la adaptación y subsiguiente especiación de las formas que integran el subgénero *Villalobosus*, no está sucediendo en un continuo con dirección al sureste, como inicialmente pudo suceder con los grupos ancestrales (Villalobos, 1955 y Hobbs, 1989), sino que está ocurriendo en un sentido opuesto, motivado inicialmente por la barrera geográfica que significó el Eje Neovolcánico Transversal. Debe considerarse que la distribución del subgénero *Villalobosus* ocurre sobre la subprovincia fisiográfica del Carso Huasteco, cuyos límites son las cuencas de los ríos Pánuco y Nautla; por lo tanto, si bien la dispersión pudo ocurrir de norte a sur, son las subcuencas del Pánuco las que podrían significar el límite geográfico para la disyunción del linaje ancestral en dos vías, sobre la vertiente media baja de la sierra y sobre altitudes mayores y el Eje Neovolcánico, a su vez, el límite geográfico

que propició la radiación adaptativa en dirección sureste-noroeste del subgénero (Fig. 6.1).

En estudios previos sobre el subgénero *Villalobosus*, la morfología de las especies y su distribución geográfica fueron usadas como un argumento para apoyar la erección de tres grupos morfológicos (López-Mejía, 2001), que concordaban con la progresión noroeste-sureste propuesta por Hobbs. Los resultados derivados del análisis filogenético de las especies del subgénero, con base en caracteres morfológicos, sugieren la existencia de un patrón diferente donde hay sólo dos principales grupos: Hortonhobbsi y Riojai. El primero agrupa tres especies distribuidas en la porción sureste de la distribución del subgénero. El segundo grupo incluye seis especies, de las cuales cuatro se distribuyen en la parte norte y la parte central del rango de distribución geográfica del subgénero y dos de ellas ocurren en el sureste. Desde el punto de vista de la biogeografía de la vicarianza, cuyo eje central es la búsqueda de relaciones históricas de biotas endémicas con las áreas en que habitan (Espinosa y Llorente, 1993), con base en las posibles relaciones de origen o de parentesco y su expresión en cladogramas, el primer grupo apoya la diversificación de las especies en una progresión de noroeste a sureste, mientras que el segundo grupo, sugiere inicialmente una progresión de norte a sur y una posterior radiación de sureste a noroeste, con el Eje Neovolcánico Transversal fungiendo como la principal barrera geográfica que propicia todo este movimiento. Lo anterior apoyaría preliminarmente la hipótesis de radiación sureste-noroeste ya mencionada.

Esta interpretación difiere de aquellas basadas en la panbiogeografía y la dispersionista. Si bien la panbiogeografía comparte con la biogeografía de la vicarianza el principio de que la biota muestra áreas de distribución

recurrentes no explicables por dispersión aleatoria, una diferencia fundamental entre ellas es que el método panbiogeográfico no exige como requisito previo el análisis cladista de los taxa. Esto puede ser una limitante, porque si bien la inferencia de las relaciones filogenéticas puede ayudar a comprender la distribución actual de los taxa, el análisis de sólo la distribución geográfica no es necesariamente un reflejo de las relaciones filogenéticas.

Por su parte, la biogeografía dispersionista se basa en la idea de que la distribución de la biota es el resultado de eventos de dispersión azarosos y a grandes distancias, a partir de un centro de origen particular para cada taxón y a través de barreras geográficas infranqueables. Esto parcialmente apoya la propuesta de Hobbs (1984) acerca de la existencia de un centro de origen para los acociles de Norteamérica; sin embargo, él sí considera los eventos geológicos ocurridos y a las barreras geográficas que limitaron la dispersión, para explicar los posibles patrones de diversificación y distribución de los grupos. Por otra parte, la existencia de un único centro de origen como lo sugiere Hobbs es aún incierta para el caso de los camarinos mexicanos, dado que hasta ahora se carecía de evidencia basada en análisis filogenéticos morfológicos y moleculares, que sustentaran esa aseveración. De hecho la cuenca del río Pánuco y el Eje Neovolcánico Transversal, límites de la subprovincia fisiográfica del Carso Huasteco, podrían significar no sólo una zona de radiación adaptativa como lo muestra la evidencia generada en este estudio para el caso de las especies del subgénero *Villalobosus*, sino un posible centro de origen de los camarinos mexicanos.

Presumiblemente, los organismos que poseen muchas moléculas semejantes están estrechamente relacionados, mientras que aquellos que

son diferentes molecularmente, están sólo distantemente relacionados. Quizá las predicciones serían más agudas si las diferencias en la estructura molecular entre las especies estuvieran en función del tiempo de divergencia de las especies; es decir, si la evolución de estas secuencias fuese gobernada por la neutralidad. La generación de datos de secuencias de ADN en muchos organismos proporciona una base de datos para determinar las relaciones filogenéticas entre las especies u otros taxa, que no son fácilmente inferidas a partir de otras características. En la actualidad este tipo de información ha reflejado mejor las relaciones filogenéticas en ciertos casos que a partir de datos, por ejemplo, morfológicos, ya que los datos de secuencias son menos influidos por los efectos selectivos y dado que las diferencias entre árboles filogenéticos generados desde datos moleculares y otras características, permiten evaluar los efectos selectivos sobre otros caracteres.

A diferencia del análisis morfológico, el análisis filogenético con base en caracteres moleculares efectuado en este estudio, apoya la agrupación de las especies del subgénero *Villalobosus* en tres grupos. Los datos de secuencias del gen 16S colocan a cinco especies del subgénero *Villalobosus* (*P. chacalli*, *P. hoffmanni*, *P. zihuateutlensis*, *P. contrerasi*, *P. hortonhobbsi* y *P. riojai*) como grupos hermanos de tres especies del subgénero *Ortmannicus* (*P. caballeroi*, *P. hidalgoensis*, *P. gonopodocristatus*) y proporcionan una evidencia más fuerte de las relaciones a nivel específico. Esto apoya parcialmente la hipótesis de que el subgénero *Villalobosus* pudo derivarse del stock inicial que se dispersó hacia el sur (un evento reciente de transferencia horizontal podría explicar el que las especies del grupo externo pertenezcan de hecho al grupo interno), pero rechaza firmemente su estatus monofilético.

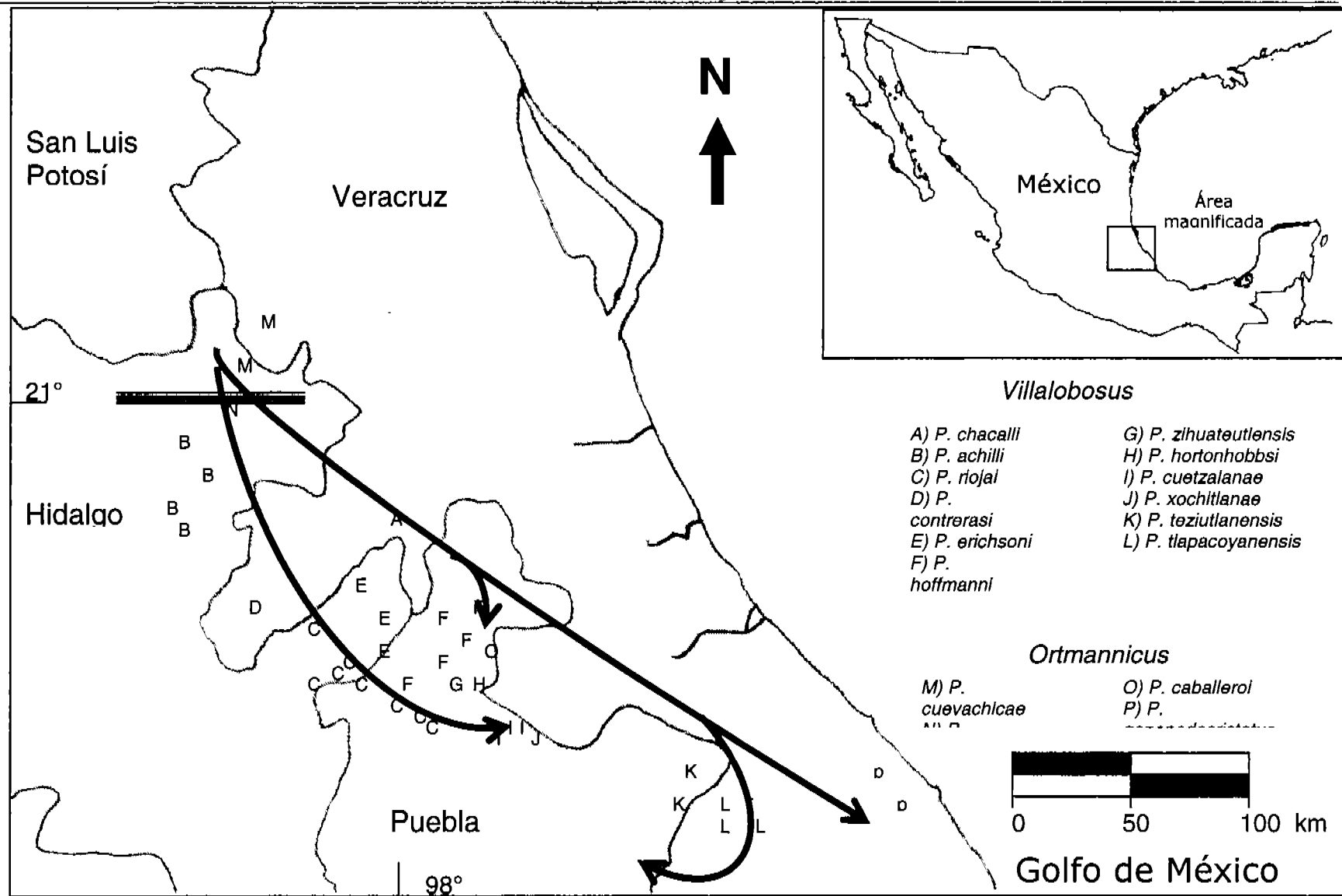


Fig. 6.1. Mapa reflejando el patrón de diversificación sugerido por este estudio para el subgénero *Villalobosus*. La línea Indica el sitio geográfico de disyunción de las poblaciones ancestrales (**█**).

La variación en talla y número de huevos entre las especies es evidencia de su respuesta adaptativa al ambiente que habitan. Los huevos de mayor talla poseen un porcentaje mayor de lípidos, lo que proporciona un almacén de energía adicional, que a su vez adapta a las especies a vivir en climas más fríos, como en el caso de las especies del subgénero *Villalobosus*; los huevos más grandes, asimismo, producen primeros instars más grandes, lo que significa una ventaja competitiva sobre estadios más pequeños que los preparan para sobrevivir condiciones ambientales específicas (Payne, 1997). Asimismo, la determinación de dos tipos de hábitat para las especies del subgénero *Villalobosus* claramente diferenciados, el hábitat de la parte alta y el hábitat de la parte media baja y las adaptaciones que estas especies muestran, es una evidencia de la especialización de estos organismos a tan particulares condiciones, propiciadas por las múltiples barrancas existentes y los consecuentes microclimas, en esa región de la Sierra Madre Oriental.

Pero las condiciones ambientales no son, directamente, el único factor regulador de la distribución de los organismos; el conocimiento de la historia geológica —o parte de ella— permite visualizar los posibles cambios ocurridos en diferentes aspectos de los organismos, incluyendo la distribución, estrechamente vinculada con las barreras geográficas producto de diversos eventos geológicos.

En términos de alopatría, una especie polifípica se dispersa a través de un área de distribución continua, donde las poblaciones intercambian sus genes libremente, hasta que una barrera geográfica emerge separando dos conjuntos de poblaciones (Salomon, 2001). Así, las áreas de distribución de taxa vicariantes pueden ser inconexas, o ser adyacentes con una

mínima coincidencia o sin ella a lo largo de un frente, o bien, coincidir ampliamente. Cada uno de estos casos se vincula con un grado particular de diferenciación taxonómica (Bernardi, 1980; Salomon, 2001), los cuales, de acuerdo con Salomon (2001), pueden ser interpretados como estados de especiación. *Procambarus hoffmanni*, por ejemplo, habita en localidades cuyo registro geológico data del cretácico inferior (Necaxa) y del terciario superior (Tenango de las Flores). Posiblemente, estos organismos encontraron las condiciones óptimas que les permitieron colonizar esa región, propiciar su diferenciación y mantener un libre flujo genético, el cual pudo no verse afectado por los eventos del cenozoico, o bien, ser afectado pero brindando condiciones que permitieran una recolonización de la misma especie. Quizá, como refiere Salomon (2001), en algunos casos los aislamientos fueron pocos para permitir una derrama genética y/o endogamia, que generara una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones separadas.

Procambarus riojai y *Procambarus erichsoni*, en cambio, habitan en lugares no adyacentes cuya formación data del terciario superior y, aunque no son los únicos sitios de la zona originados en ese período, pudieron emerger en diferentes momentos durante el curso de éste, brindando condiciones ambientales que influyeron su patrón de dispersión. Caso similar se presenta para otras especies del grupo, con excepción de *Procambarus chacalli*, cuya localidad data del triásico y *Procambarus achilli* que habita en sitios que datan del pérmico y el terciario superior. *Procambarus tlapacoyanensis*, *Procambarus cuetzalanae* y *Procambarus xochitlanae*, habitan zonas originadas en tres distintos momentos geológicos.

Lo anterior apoya la idea de una emigración continua de norte a sur, que tuvo lugar a medida que las condiciones del medio ambiente favorecían

la distribución (Villalobos, 1955), siguiendo, por un lado, la planicie costera del Golfo de México (Hobbs, 1984) y por el otro el límite oeste de la vertiente de la sierra, en altitudes mayores. Debido a que la elevación del eje neovolcánico transversal debió suceder antes de que terminara el mioceno (Hobbs, 1984) —aunque sus elevaciones más importantes datan del plioceno y del pleistoceno (Rzedowski, 1981)—, los ancestros del subgénero *Villalobosus* debieron situarse en esta zona de la Sierra Madre sin que el evento geológico les permitiera dispersarse, sobreviniendo la diferenciación, la cual pudo ser reforzada por eventos fallidos posteriores, sobre todo en el caso de las poblaciones aisladas más pequeñas (Mayr, 1942).

En virtud de la presencia de regiones montañosas y de zonas áridas durante todo el cenozoico (Rzedowski, 1962), es probable que, a grandes rasgos, las condiciones climáticas no difirieran mucho de las actuales. Aunque la distribución de las zonas calientes, templadas, frías, húmedas y secas debió variar a lo largo del tiempo, las glaciaciones del pleistoceno pudieron ser suficientes para desplazar hacia el sur y a altitudes inferiores algunas zonas térmicas (Rzedowski, 1981), propiciando la diferenciación de los organismos. Ciertamente, la diferenciación genética puede ser inducida cuando el ambiente del habitat invadido difiere, incluso en un menor grado, del habitat original de la especie o especies introduciéndose; esta diferencia ecológica es probablemente frecuente en muchas poblaciones naturales y conduce correlativamente a la modificación de caracteres fenotípicos mediante la adaptación, capacitando a los portadores de éstos a sobrevivir (Salomon, 2001 y Lodé, 2001). Los ejemplos quizá más evidentes de esto son *Procambarus cuetzalanae* y *Procambarus xochitlanae*, especies estigófilas del subgénero, o bien, una de las poblaciones de *Procambarus hoffmanni* en

la que se observan ciertas diferencias morfológicas con respecto a la población de la localidad tipo, que habita hasta el momento sólo dentro de la compuerta de distribución del vertedor de la presa de Tenango de las Flores; un ejemplo más es *Procambarus chacalli* encontrada solamente en tres pozas cuyo suministro de agua es aparentemente sólo por filtración en época de seca. Pero no debe perderse de vista que tales diferencias ecológicas se debieron a los diversos eventos geológicos ocurriendo en la región, produciendo cambios físicos importantes que propiciaron el aislamiento por distancia de las subpoblaciones y la consecuente restricción del flujo génico.

Este estudio pone en evidencia la posibilidad de que la diversificación del subgénero sucediera como una radiación en dirección sureste-noroeste e incluso que sostenga estrechas relaciones con el linaje que dio origen a las especies que actualmente habitan en el altiplano central y sureste de la Sierra Madre Oriental. Considero que una combinación de genes, por ejemplo 16S y COI, aunado a un número mayor de secuencias, puede proveer un espectro más amplio de inferencia y proporcionar mayor luz en la historia evolutiva de los acociles de éste y el resto de los subgéneros y géneros mexicanos.

CONCLUSIONES

- El subgénero *Villalobosus* no es un grupo monofilético
- La evidencia apoya un esquema que divide al subgénero en dos grupos, uno sobre la parte alta de la Sierra Madre Oriental y otro en la parte media baja de la vertiente, pero con un arreglo de especies diferente al propuesto por Villalobos y Hobbs.

- Los principales eventos geológicos que influyeron en la distribución y diversificación del subgénero *Villalobosus* fueron el levantamiento y conformación final de la porción sur de la Sierra Madre Oriental, particularmente la subprovincia fisiográfica del Carso Huasteco y la conformación del Eje Neovolcánico Transversal, que propiciaron las múltiples barrancas existentes y los consecuentes microclimas.
- Los cañones del río Pánuco representan el límite distribucional noroeste del subgénero *Villalobosus*, donde la disyunción del linaje ancestral pudo tomar lugar; el Eje Neovolcánico Transversal representa el límite distribucional sur-sureste del subgénero, propiciando una radiación adaptativa en dirección sureste-noroeste.
- La determinación de dos tipos de hábitat, el hábitat de la parte alta y el de la parte media baja, la variación interespecífica en términos de fecundidad como evidencia de adaptación a estos ambientes, la evidente restricción del flujo génico entre las poblaciones, el hallazgo de nuevas formas y la concordancia de todo esto con el arreglo filogenético de las especies, apoyan la hipótesis de especiación alopátrica y permiten determinar un patrón de diversificación del subgénero *Villalobosus* en esa región de la Sierra Madre Oriental.
- Se sugiere continuar con una revisión detallada de los caracteres morfológicos que permita reconsiderar su uso o adición en análisis filogenéticos y/o claves de identificación de especies de cambáridos.

- Una combinación de genes, aunado a un número mayor de secuencias, puede proveer un espectro más amplio de inferencia y proporcionar mayor luz en la historia evolutiva de los acociles de éste y el resto de los subgéneros y géneros mexicanos.

LITERATURA CITADA

- Abele, L. G. 1991. Comparison of morphological and molecular phylogeny of the Decapoda. **Memoirs Queensland Museum** 31:101-108.
- Abbott, C. L. y M. C. Double. 2003. Phylogeography of shy and white-capped albatrosses inferred from mitochondrial DNA sequences: implications for population history and taxonomy. **Molecular Ecology** 12:2747-2758.
- Anónimo, 1970. Cartas Climáticas de las localidades de Veracruz, Poza Rica y Pachuca. INEGI (Ed.), México.
- Anónimo, 1984a. Cartas Geológicas de las localidades de Veracruz (E14-3), Poza Rica (F14-12) y Pachuca (F14-11). INEGI (Ed.), México.
- Anónimo, 1984b. Cartas de Vegetación y Uso de Suelo de las localidades de Veracruz (E14-3), Poza Rica (F14-12) y Pachuca (F14-11). INEGI (Ed.), México.
- Avise, J. C. 1994. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall: Nueva York. 389 p.
- Belchier, M., L. Desmán, M. R. J. Sheehy y P. M. J. Shelton. 1998. Estimating age and growth in long-lived temperate crayfish using lipofuscin. **Freshwater Biology** 39:439-446.

- Bernardi, G., 1980. Les catégories taxinomiques de la systématique évolutive. **Les Problèmes de l'espèce dans le Règne animal, Vol. 3** (eds. C. Bosquet, J. Générmont y M. Lamotte) **40**, 373-425. Mémoire de la Société Zoologique de France, Paris.
- Buhay, J. E. y K. A. Crandall. Extreme genetic diversity in subterranean crayfishes. En prensa.
- Cadle, J. E. 1988. Phylogenetic relationships among advanced snakes: a molecular perspective. **University California Publications (Zoology)** **119**:1-77.
- Clement, M., Posada, D. y Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology** **9**(10):1657-1660.
- Contreras-Dias, H. G., O. Moya, P. Oromi y C. Juan. 2003. Phylogeography of the endangered darkling beetle species of *Pimelia* endemic to Gran Canaria (Canary Islands). **Molecular Ecology** **12**:2131-2143.
- Corey, S. 1987. Comparative fecundity of four species of crayfish in southwestern Ontario, Canada (Decapoda, Astacidea). **Crustaceana** **52**:276-286.
- Crandall, K. A. 1993. **Molecular systematics and evolutionary biology of the crayfish subgenus *Procericambarus* (Decapoda: Cambaridae)**. Ph.D. Dissertation. Washington University, St. Louis, MO.
- Crandall, K. A. 1994. Intraspecific cladogram estimation: accuracy at higher levels of divergence. **Systematic Biology** **43**:222-235.

- Crandall, K. A. 1998. Conservation phylogenetics of Ozark crayfishes: assigning priorities for aquatic habitat protection. **Biological Conservation** **84**:107-117.
- Crandall, K. A. y T. W. Cronin. 1997. The molecular evolution of visual pigments of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae). **Journal of Molecular Evolution** **45**:524-534.
- Crandall, K. A. y J. F. Fitzpatrick, Jr. 1996. Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. **Systematic Biology** **45**(1):1-26.
- Crandall, K. A. y D. M. Hillis. 1997. Rhodopsin evolution in the dark. **Nature** **387**:667-668.
- Crandall, K. A. y A. R. Templeton. 1999. The zoogeography and centers of origin of the crayfish subgenus *Procericambarus* (Decapoda: Cambaridae). **Evolution** **53**(1):123-134.
- Crandall, K. A., J. W. Fetzner, Jr., S. H. Lawler, M. Kinnersley y C. M. Austin. 1999. Phylogenetic relationships among the Australian and New Zealand genera of freshwater crayfishes (Decapoda: Parastacidae). **Australian Journal of Zoology** **47**:199-214.
- Crandall, K. A., D. J. Harris y J. W. Fetzner, Jr. 2000a. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Proceedings of Royal Society of London B.** **267**:1679-1686.

- Crandall, K. A., J. W. Fetzner, Jr., C. G. Jara y L. Buckup. 2000b. On the phylogenetic positioning of the south american freshwater crayfish genera (Decapoda: Parastacidae). **Journal of Crustacean Biology** **20**(3):530-540.
- Cuenca, A., A. E. Escalante y D. Piñero. 2003. Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). **Molecular Ecology** **12**:2087-2097.
- Cuesta, J. A. y C. D. Schuart. 1998. Morphological and molecular differentiation between three allopatric populations of the littoral crab *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850) (Brachyura: Grapsidae). **Journal of Natural History** **32**:1499-1508.
- de Brito, R. A., M. H. Manfrin y F. M. Sene. 2002. Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. **Molecular Phylogenetic Evolution** **22**:131-143.
- de Queiroz, K. y J. Gauthier. 1990. Phylogeny as a central principle in taxonomy: phylogenetic definitions of taxon names. **Systematic Zoology** **39**:307-322.
- Dobzhansky, T. 1941. **Genetics and the origin of species**. Columbia University Press: Nueva York. p. 147.
- Edwards, D. H., W. J. Heitler y F. B. Krasne. 1999. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. **Trends Neuroscience** **22**:153-161.

- Englund, G. 1999. Effects of fish on the local abundance of crayfish in stream pools. **Oikos** **87**: 48-56.
- Englund G. y J. J. Krupa, 2000. Habitat use by crayfish in stream pools: influence of predators, depth and body size. **Freshwater Biology** **43**: 75-83.
- Espinosa, D. y J. Llorente, 1993. **Fundamentos de Biogeografías Filogenéticas**. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 133 p.
- Espinosa, D., C. Aguilar y S. Ocegueda. 2004. Identidad biogeográfica de la Sierra Madre Oriental y posibles subdivisiones bióticas. Págs. 487-500. En: Luna, I., J. J. Morrone y D. Espinosa. **Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental**. México, D.F.: CONABIO-UNAM. 527 p.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** **131**:479-491.
- Faxon, W., 1914. notes on the crayfishes in the United States National Museum and the Museum of Comparative Zoology, with descriptions of new species and subspecies to which is appended a Catalogue of known species and subspecies. **Mem. Mus. Comp. Zool. at Harvard Coll.** **40**(23):356-361.
- Felsenstein, J. 1978. The number of evolutionary trees. **Systematic Zoology** **27**:27-33.

- Felsenstein, J. 1985a. Phylogenies and the comparative method. **American Naturalist** **125**:1-15.
- Felsenstein, J. 1985b. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** **39**:783-791.
- Fetzner, J. W., Jr. y K. A. Crandall. 2003. Linear habitats and the nested cllade analysis: an empirical evaluation of geographic versus river distances using an Ozark crayfish (Decapoda: Cambaridae). *Evolution Int J Org* **Evolution** **57**:2101-2118.
- Ford, E. B. 1940. Polymorphism and taxonomy, En: Huxley, L., (Ed.). **The New Systematics**. Clarendon Press: Oxford. p. 493-513.
- Foster, J. 1993. The relationship between refuge size and body size in the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). **Freshwater Crayfish** **9**: 354-349.
- Foster, J. 1995; Factores influencing the distribution and abundance of the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) in Wales and Marches, UK. **Freshwater Crayfish** **8**: 78-98.
- Good, S. V., D. F. Williams, K. Ralls y R.C. Fleischer. 1997. Population structure of *Dipodomys ingens* (Heteromyidae): the role of spatial heterogeneity in maintaining genetic diversity. **Evolution** **5(4)**:1296-1310.

- Harris, H. 1966. Enzyme polymorphism in man. **Proceedings of Royal Society of London B.** **164**:298-310.
- Harris, D. J. y K. A. Crandall. 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. **Molecular Biology and Evolution** **17**(2):284-291.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark. 1997. **Principles of population genetics**. 3ª Edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 542 p.
- Harvey, P. H. y M. D. Pagel. 1991. **The comparative method in evolutionary biology**. Oxford University Press: Oxford.
- Hedrick, P. W. 2000. **Genetics of populations**. 2ª edición. Jones y Bartlett Pub.: Sudbury. 553 p.
- Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable. 1996. **Molecular systematics**. 2a. Edición. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 655 p.
- Hillis, D. M. y J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology** **42**:182-192.
- Hobbs, H. H. Jr. 1942. A generic revision of the crayfishes of the subfamily Cambarinae (Decapoda, Astacidae) with the description of a new genus and species. **The American Midland Naturalist** **28**(2):334-357.

- Hobbs, H. H. Jr. 1971. The entocytherid ostracods of Mexico and Cuba. **Smithsonian Contributions to Zoology 81**:1-55.
- Hobbs, H. H. Jr., 1972. The subgenera of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Astacidae). **Smithsonian Contributions to Zoology 117**:1-22.
- Hobbs, H. H. Jr., 1974. Synopsis of the Families and Genera of Crayfishes (Crustacea: Decapoda). **Smithsonian Contributions to Zoology 164**:1-32.
- Hobbs, H. H. Jr., 1975. New Crayfishes (Decapoda: Cambaridae) from the Southern United States and Mexico. **Smithsonian Contributions to Zoology 201**:1-34.
- Hobbs, H. H. Jr., 1982. A new crayfish (Decapoda: Cambaridae) from the state of Puebla, Mexico, with new locality records for *Procambarus (Villalobosus) xochitlanae* and entocytherid ostracod symbionts. **Association for Mexican Cave Studies Bulletin (8)**:39-44.
- Hobbs, H. H. Jr. 1984. On the distribution of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Cambaridae). **Journal of Crustacean Biology 4(1)**:12-24.
- Hobbs, H. H., Jr. 1988. Crayfish distribución, adaptative radiation and evolution. Págs. 52-82. En: D. M. Holdich y R. S. Lowery (Eds.). **Freshwater crayfish: Biology, Management and Exploitation**. Croom Helm, Londres.

- Hobbs, H. H. Jr., 1989. An Illustrated Checklist of the American Crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 480:1-236.
- Hodgkin, T. 1997. Some current issues in the conservation and use of plant genetic resources. En: Ayad, W. G., T. Hodgkin, A. Jaradat y V. R. Rao (Ed.). **Molecular genetics techniques for plant genetic resources**. Report of an IPGRI Workshop, 9-11 octubre 1995, Roma, Italia. p. 3-10.
- Holsinger, K. E. y R. J. Mason-Gamer. 1996. Hierarchical analysis of nucleotide diversity in geographically structured populations. **Genetics** **142**:629-639.
- Huelsenbeck, J. P. y Crandall, K. A. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. **Annual Review of Ecological Systematic** **28**:437-466.
- Huner, J.W. y O.V. Lindqvist. 1995. Physiological adaptations of freshwater crayfishes that permit successful aquacultural enterprises. **American Zoologist** **35**, 12-19.
- Kim, W. Y L. G. Abele. 1990. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18S rRNA nucleotide sequences. **Journal of Crustacean Biology** **10**:1-13.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature** **217**:624-626.

- Kutka F. J., C. Richards y G. W. Merrick. 1996. Habitat relationships and distribution of the crayfish, *Orconectes propinquus*, in the Saint Louis River Basin Minnesota, USA. **Freshwater Crayfish 11**: 73-82.
- Lewontin, R. C. y J. L. Hubby. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics 54**:595-609.
- Liebherr, J. K. 1991. A general area cladogram for montane Mexico based on distributions in the Platynine genera *Elliptoleus* and *Calathus* (Coleoptera: Carabidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington 93**:390-406.
- Lodé, T., 2001. Genetic divergence without spatial isolation in polecat *Mustela putorius* populations. **Journal of Evolutionary Biology, 14**(2):228-236.
- López-Mejía, M. 2001. **Nuevos registros de distribución de las especies del subgénero *Villalobosus* - Hobbs, 1972 (Cambaridae: *Procambarus*) en los límites de los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz**. Informe Final de Servicio Social (Tesis Profesional). Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México, D.F. 32 p.
- López, M., L. M. Mejía O. y F. Alvarez. 2003. *Procambarus (Villalobosus) achilli* (Decapoda: Cambaridae): a new species of crayfish from Mexico. **Crustaceana 76**(5):523-531.

- López-Mejía, M., F. Alvarez y L. M. Mejía-Ortíz. 2004. A new species of *Procambarus* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) from Veracruz, Mexico. **Proceedings of the Biological Society of Washington** **117**(2):169-175.
- López-Mejía, M., F. Alvarez y L. M. Mejía-Ortíz. 2005. *Procambarus (Ortmannicus) hidalgoensis* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae), a new species of crayfish from Mexico. **Proceedings of the Biological Society of Washington** **118**(3):558-565.
- Luna, I., S. Ocegüera y O. Alcántara. 1994. Florística y notas biogeográficas del bosque mesófilo de montaña del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica** **65**(1):31-62.
- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 1992. **MacClade 3.01: Analysis of phylogeny and character evolution**. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Mayr, E., 1942. **Systematics and the origin of species**. 1ª Ed. Columbia University Press (Ed.), Nueva York.
- McMahon, B.R. 2002. Physiological adaptation to environment. En: **Biology of freshwater crayfish**. D. M. Holdich (Ed.), pp. 327-376. Blackwell Science.

- Mejía-Ortíz, L. M. 2003. **Comparative study of adaptations to cave life in stygobite decapod crustaceans (Decapoda: Palaemonidae and Cambaridae)**. Tesis Doctoral, Laboratorio de Biología Marina de Port Erin, Facultad de Ciencias, Universidad de Liverpool, Inglaterra. 274 p.
- Mejía-Ortíz, L. M. R. G. Hartnoll & J. A. Viccon-Pale A new species of stygobitic crayfish from Mexico, *Procambarus cavernicola* (Decapoda: Cambaridae), with a review of cave dwelling crayfishes in Mexico. **Journal Crustacean Biology** 23(2): 391-401.
- Mejía-Ortíz, L. M. y M. López-Mejía. 2005. Are there adaptation levels to cave life in crayfish? **Journal of Crustacean Biology** 25(4):593-597.
- Momot, W. T., H. Gowing y P. D. Jones. 1978. The dynamics of crayfish and their role in ecosystem. **American Midland Naturalist** 99:10-35.
- Momot, W. 1984. Crayfish production: a reflection of community energetic. **Journal of Crustacean Biology** 4:35-54.
- Morrone, J. J. 2001. **El lenguaje de la cladística**. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM. 109 p.
- Morrone, J. J. y J. M. Carpenter. 1994. In search of a method for cladistic biogeography: an empirical comparison of component analysis, Brooks parsimony analysis, and three-area statements. **Cladistics** 10:99-153.

- Morrone, J. J. y J. V. Crisci. 1995. Historical biogeography: introduction to methods. **Annual Review of Ecology and Systematics** 26:373-401.
- Nelson, G. 1984. Cladistics and biogeography. En: Duncan, T. Y F. F. Stuessy. **Cladistics: perspectives on the reconstruction of evolutionary history**. Nueva York. Columbia University Press. p. 273-293.
- Nyström, P. 2002. Ecology. En: **Biology of freshwater crayfish**. D. M. Holdich (Ed.), pp. 192-235. Blackwell Science.
- Page, R. D. M. 1988. Quantitative cladistic biogeography: constructing and comparing area cladograms. **Systematic Zoology** 37:254-270.
- Page, R. D. M. 1993. **COMPONENT user's manual**. Release 2.0. Londres. Publicado por el autor.
- Payne, J. F. 1997. Adaptative success within the cambarid life cycle. **Freshwater Crayfish** 11:1-12.
- Pennak, R. W. 1985. The freshwater invertebrate fauna: problems and solution for evolutionary success. **American Zoologist** 25:671-687.
- Pohle, G. y F. Marques. 2000. Larval stages of *Paradasygyius depressus* (Bell, 1835) (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Majidae) and a phylogenetic analysis for 21 genera of Majidae. **Proceedings of the Biological Society of Washington** 113(3):739-760.
- Posada, D. y K. A. Crandall, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** 14:817-818.

- Posada, D., K. A. Crandall, A. R. Templeton. 2000. GeoDIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Molecular Ecology** 9(4):487-488.
- Richards, C., F. J. Kutka, M. E. McDonald, G. W. Merrick y P. W. Devore. 1996. Life history and temperature effects on catch of northern orconectid crayfish. **Hidrobiologia** 319:111-118.
- Rzedowski, J., 1962. Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México. I. Algunas consideraciones acerca del elemento endémico en la flora mexicana. **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, 27:52-65.
- Rzedowski, J., 1981. **Vegetación de México**. Limusa (Ed.): México, D.F. 432 p.
- Salomon, M., 2001. Evolutionary biogeography and speciation: essay on a synthesis. **Journal of Biogeography**, 28:13-27.
- Schram, F. R. 2001. Phylogeny of decapods: moving towards a consensus. **Hydrobiologia** 449:1-20.
- Schubart, C. D., J. E. Neigel y D. L. Felder. 2000. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. **Crustacean Issues** 12:817-830.

- Schubart, C. D., J. A. Cuesta y A. Rodríguez. 2001. Molecular phylogeny of the crab genus *Brachynotus* (Brachyura: Varunidae) based on the 16S rRNA gene. **Hydrobiologia** **449**:41-46.
- Smith, H. M. 1941. Las provincias bióticas de México, según la distribución geográfica de las lagartijas del género *Sceloporus*. **Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas** **2**:103-110.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1981. **Biometry**, 2ª. Edición. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Swofford, D.L. 2000. **PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- StatSoft, Inc. (1998). **STATISTICA for Windows** (Computer program manual). Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>
- Stearns, S. C. 1992. **The evolution of life histories**. Oxford University Press, Nueva York. 249 p.
- Stein R. A. y J. J. Magnuson. 1976. Behavioural response of crayfish to a fish predator. **Ecology** **57**:751-761.
- Tamayo, J.L. 1949. **Geografía general de México. Geografía Física**. Tomo I. México D. F. Talleres Gráficos de la Nación 628 p.

- Tamayo, J. L. 1999. **Geografía moderna de México**. 11ava. Edición. Ed. Trillas, México D. F. 512 pp.
- Tavaré, L. 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. **Lectures on Mathematics in the Life Sciences** 17:57-86.
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology** 7:381-397.
- Templeton, A. R., 2005. **Population genetics and microevolutionary theory**. Wiley & Sons.
- Templeton, A. R., E. Boerwinkle y C. F. Sing. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics** 117:343-351.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall y C. F. Sing. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics** 132:619-633.
- Templeton, A. R., E. Routman y C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics** 140:767-782. *Clave de*

Referencia Noviembre 11, 2005 y posteriores actualizaciones, disponibles en: <http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>

Templeton, A. R. y C. F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. **Genetics** **134**:659-669.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G.Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** **25**:4876-4882.

Villalobos, A. 1944. Estudios de los cambarinos mexicanos; II: Dos especies nuevas del género *Paracambarus*. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México** **15**(1):161-174.

Villalobos, A. 1947a. Estudios de los cambarinos mexicanos; V: Redescrición de *Paracambarus paradoxus* (Ort.) y descripción de una especie nueva del mismo género. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México** **18**(1):233-247.

Villalobos, A. 1947b. Estudios de los cambarinos mexicanos; VI: Descripción de una nueva especie del género *Paracambarus*. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México** **18**(2):537-546.

Villalobos, A. 1950. Contribución al estudio de los cambarinos mexicanos, IX: Estudio taxonómico de un grupo de especies del género

Procambarus. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México** 21(2):367-413.

Villalobos, A. 1951. Estudios de los camarinos mexicanos X. Una nueva especie del género *Cambarellus* del estado de Nuevo León. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México** 22(2):525-532.

Villalobos, A. 1955. **Cambarinos de la fauna mexicana (Crustacea: Decapoda)**. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 290 p.

Whitmore, N. y A. D. Huryn. 1999. Life history and production of *Paranephrops zealandicus* in a forest stream, with comments about the sustainable harvest of a freshwater crayfish. **Freshwater Biology** 42:467-478.

Wray, G. A. y R. A. Raff. 1991. The evolution of developmental strategy in marine invertebrates. **Tree** 6:45-50.