



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

**Relaciones filogenéticas entre las especies
del género *Algansea* Girard, 1856
(Actinopterygii: Cyprinidae), utilizando
secuencias del gen mitocondrial citocromo *b*
y del primer intrón del gen *S7*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Sistemática)**

P R E S E N T A

Rodolfo Pérez Rodríguez

DIRECTOR DE TESIS: DR. Gerardo Pérez Ponce de León

MÉXICO, D.F.

Febrero, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primera instancia al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (no.195290) para realizar los estudios de maestría, y por el apoyo del proyecto 47233. Así mismo, agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) por el apoyo al proyecto IN220605 y la beca otorgada para la finalización de esta tesis.

Quiero agradecer al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León por su apoyo y conocimientos para la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial Dr. Luis Medrano Gonzáles y Dr. Luis Zambrano Gonzáles por el seguimiento del presente trabajo y sus valiosas observaciones para el desarrollo del mismo.

A los miembros del Jurado, Dr. Juan José Morrone Lupi y al Dr. Gerardo Salazar por sus comentarios y tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Al Dr. Ignacio Doadrio del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, España, por poner a disposición sus conocimientos y su laboratorio de biología molecular para la obtención de las secuencias empleadas en el presente trabajo.

A Omar Domínguez Domínguez por su apoyo total en la realización de este trabajo.

A Carlos Pedraza Lara y Patricia Ornelas García por instruirme en el laboratorio.

A Silvia Perea Aranda, por su apoyo en el laboratorio y análisis realizados.

Al Biol. Gerardo encargado de la granja piscícola de Tiacaque, Estado de México, por valioso apoyo en la obtención de un ejemplar de *Algansea barbata*.

A los pescadores de la reserva ecológica de pescado blanco y acumara, por su ayuda en la colecta de *A. lacustris* (acumara).

A mis compañeros de colecta, Rogelio Rosas, Elizabeth Martinez, y Jaquelina, quienes hicieron posible la obtención de muchos de los organismos analizados.

A mi familia y a todos mis amigos por su cariño y apoyo.

Para mi abuela Virginia Galicia Guerrero,
a su cariño y apoyo.

Contenido

	Página
Lista de figuras.....	1
Lista de tablas.....	3
1 Introducción.....	4
1.1. Sistemática y clasificación del género <i>Algansea</i>	6
1.2. Marcadores moleculares.....	9
1.2.1 citocromo <i>b</i>	10
1.2.2 primer intrón del S7.....	10
2 Objetivos.....	11
3 Área de estudio.....	12
4 Materiales y Métodos.....	14
4.1. Colecta de peces.....	14
4.2. Muestreo taxonómico.....	15
4.3. Obtención de secuencias.....	16
4.3.1. Extracción de DNA.....	16
4.3.2. Amplificación.....	16
4.3.3. Secuenciación.....	16
4.4. Análisis de secuencias.....	17
4.4.1. Alineamiento.....	17
4.4.2. Análisis filogenéticos.....	18
4.4.3. Reloj molecular.....	19
5 Resultados.....	24
5.1. Patrones de variación genética.....	24
5.2. Análisis filogenéticos.....	31
5.2.1. Citocromo <i>b</i>	31
5.2.1.1. Máxima Parsimonia.....	31
5.2.1.2. Inferencia Bayesiana.....	33
5.2.2. Intron S7.....	35
5.2.2.1. Máxima Parsimonia.....	35

5.2.2.2. Inferencia Bayesiana.....	35
5.2.3. Consenso de <i>cit-b</i> y <i>S7</i>	37
5.2.4. Análisis combinado.....	37
5.2.4.1. Homogeneidad de particiones.....	37
5.2.4.2. Máxima Parsimonia.....	39
5.2.4.3. Inferencia Bayesiana.....	39
5.3. Reloj molecular.....	42
6 Discusión.....	44
6.1. Incongruencia entre métodos de análisis (MP y BY).....	44
6.2. Incongruencias entre los marcadores moleculares (<i>cit-b</i> , <i>S7</i> y <i>cit-b+S7</i>).....	45
6.3. Implicaciones biogeográficas.....	47
6.4. Implicaciones en la clasificación y sistemática de <i>Algansea</i>	51
7 Conclusiones.....	54
8 Bibliografía.....	56
9 Anexos.....	64

Lista de figuras

	Página
Figura 1.- Hipótesis filogenética del género <i>Algansea</i> de acuerdo con Barbour y Miller (1978).....	7
Figura 2.- Hipótesis filogenética de las especies y subespecies con barbillas maxilares presentes del género <i>Algansea</i>	8
Figura 3.- Distribución de las especies de <i>Algansea</i> en la Mesa Central de México.....	13
Figura 4.- Curvas de saturación de cada una de las posiciones del codón del citocromo <i>b</i> y del S7 para todos los taxa analizados.....	26
Figura 5.- Hipótesis filogenéticas del género <i>Algansea</i> basadas en el gen mitocondrial citocromo <i>b</i> , obtenida mediante Máxima Parsimonia.....	32
Figura 6. Hipótesis filogenéticas del género <i>Algansea</i> basadas en el gen mitocondrial citocromo <i>b</i> , obtenida mediante inferencia bayesiana.....	34
Figura 7. Hipótesis filogenéticas del género <i>Algansea</i> basadas en el primer intrón S7, obtenida mediante Máxima Parsimonia e inferencia bayesiana.....	36
Figura 8. Consenso estricto de las hipótesis filogenéticas del género <i>Algansea</i> obtenidas con citocromo <i>b</i> y el intron S7, obtenida mediante Máxima Parsimonia.....	38
Figura 9.- Hipótesis filogenéticas del género <i>Algansea</i> basadas en el análisis combinado cit- <i>b</i> + S7, obtenida mediante Máxima Parsimonia.....	40

Figura 10.- Hipótesis filogenéticas del género *Algansea* basadas en el análisis combinado *cit-b* + *S7*, obtenida mediante Inferencia bayesiana.....41

Figura 11.- Árbol de reloj molecular. La escala superior muestra los periodos geológicos. La escala inferior muestra la duración de cada periodo.
Oli= Oligoceno; Mi= Mioceno inferior; Mioceno medio; Ms= Mioceno superior;
Pli= Plioceno inferior; Pls= Plioceno superior; Pt= Pleistoceno.....43

Lista de tablas

	Página
Tabla 1.- Localidades muestreadas.....	21
Tabla 2.- Parámetros del análisis de Máxima Parsimonia con cada matriz de datos.....	24
Tabla 3.- Distancias genéticas promedio entre los principales grupos.....	27
Tabla 4.- Resultados del análisis "Relative Rate Test".....	42

Resumen

El género *Algansea*, es uno de los grupos de peces dulceacuícolas endémicos, pertenecientes a la familia Cyprinidae con mayor representación dentro de la Mesa Central de México, debido a su amplia distribución dentro de la región. Estas características, amplia distribución y endemismo son de particular relevancia en el conocimiento de los procesos evolutivos que han originado la diversidad única de la ictiofauna de esta región. A pesar de contar con pocas especies, este grupo ha tenido una historia taxonómica compleja, particularmente debido a la gran variación morfológica encontrada en una de ellas, *A. tincella*, la especie con el mayor intervalo de distribución dentro de la Mesa Central; aunado a esto, el uso de caracteres morfológicos altamente homoplásicos, el empleo de métodos poco objetivos en la codificación y polarización de los mismos, y el muestreo parcial de organismos analizados debido al uso restringido de individuos a nivel de especie, ha generado que las hipótesis filogenéticas del género *Algansea* que se han propuesto hasta el momento se consideran parcialmente resueltas y poco robustas.

En el presente trabajo se llevo a cabo la reconstrucción de una hipótesis filogenética basada en dos marcadores moleculares, el gen mitocondrial citocromo *b* y el primer intrón del gen de la proteína ribosomal S7. Se corroboró la monofilia del género *Algansea* con ambos marcadores moleculares. La hipótesis mejor resuelta de la historia evolutiva del género *Algansea* se obtuvo al combinar la información de los dos marcadores (citocromo *b* + intrón S7); además de corroborar la validez de seis de las especies actualmente reconocidas, se sugiere la existencia de una nueva especie distribuida en el Río Ameca. De acuerdo con el tiempo de divergencia estimado y los eventos geológicos que ocurrieron en el Noroeste de México, se postula que el origen del género *Algansea* se remonta al Mioceno medio, hace 15 M.a. aproximadamente. El patrón biogeográfico del género *Algansea* en la Mesa Central de México es congruente con el de otros grupos de peces dulceacuícolas, que incluyen miembros de la familias Goodeidae, Poecilidae, así como otros ciprínidos.

Abstract

Members of the genus *Algansea* are one of the most representative groups of freshwater fishes in the Mesa Central of México due to their wide geographic distribution and unusual level of endemism. Such traits, are very important in the description of the evolutionary process that produced unique diversity of the ichthyofauna in this region. Even through the small number of species included, this genus has had an unstable taxonomic history, particularly due to the high morphological variation found in the most widely distributed species within the genus, *A. tincella*; in addition, previous phylogenetic hypothesis presented the following shortcomings: the use of morphological characters with a high degree of homoplasy, the use of codification and polarization methods of characters lacking objectivity, and the incomplete sampling since just a few specimens were included; therefore, previous phylogenetic hypothesis are not fully resolved and they are not robust.

In this study, a phylogenetic hypothesis based on two molecular markers, mitochondrial gene cytochrome *b*, and the first intron of the ribosomal protein *S7* gene, was obtained. Monophyly of the genus *Algansea* was corroborated with both markers. Combined analysis (cytochrome *b* + intron *S7*) showed the best performance of the evolutionary history of the genus. In addition of confirming the validity of six species, our results suggest the possibility of the existence of a new species from the Ameca river. In accordance with the estimated divergence time and geological events occurred in the north-west part of Mexico, the origin of genus *A. tincella* is dated approximately 15 million years ago, in the middle Miocene. The genus *Algansea* shares the same biogeographic pattern with other freshwater fishes in the Mesa Central of Mexico, such as members of the Goodeidae, Poeciliidae, as well other cyprinids.

1 Introducción

La familia Cyprinidae es uno de los taxa de peces dulceacuícolas más diversos del planeta, cuenta con alrededor de 2000 especies que se encuentran en casi todos los ecosistemas dulceacuícolas de casi todos los continentes, excepto en Australia y Sudamérica (Howes, 1991). Estos peces presentan una considerable variabilidad morfológica asociada con la diversidad de hábitats que ocupan (Briolay *et al.*, 1997). Dichos atributos destacan la relevancia de este grupo de peces como modelo en estudios de evolución y diversidad biológica (Howes, 1991; Simmons *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2002). Actualmente la diversidad de dicho taxón está comprendida en dos grandes grupos reconocidos como las subfamilias Cyprininae y Leuciscinae (Cavender y Coburn, 1992; Cunha *et al.*, 2002).

Dentro de la subfamilia Leuciscinae las tribus Leuciscini y Phoxinini (Cavender y Coburn, 1992; Simons *et al.*, 2003), además de incluir especies en su mayoría euroasiáticas, destacan por ser los únicos con representación en Norteamérica. A excepción de la especie *Notemigonus crysoleucas*, el resto de la diversidad de ciprínidos americanos forma parte de la tribu Phoxinini (Cavender y Coburn, 1992; Simons *et al.*, 2003), considerado el taxón con mayor número especies de peces dulceacuícolas de Norteamérica (alrededor de 300 spp.) (Mayden, 1991; Burr y Mayden, 1992).

Phoxinini presenta un intervalo de distribución cuya extensión latitudinal abarca desde Alaska hasta el centro de México (Mayden, 1991). La mayor parte de la diversidad de este grupo de peces en Norte América se concentra en la parte central de su distribución, el sistema fluvial del Mississippi, disminuyendo de manera gradual el número de especies hacia los extremos norte y sur (Schönhuth, 2002). Sin embargo, en el extremo sur de la distribución, el centro de México (Schönhuth, 2001), a pesar de su extensión territorial relativamente pequeña, presenta altos índices de diversidad y endemismo, por lo que es considerada una de las provincias biogeográficas con mayor relevancia para la familia cyprinidae en Norte América (Mayden, 1991).

Esta región del territorio mexicano mejor conocida como Mesa Central alberga una considerable diversidad única de ictiofauna dulceacuícola de diferentes taxa (Miller y Smith, 1986) representada principalmente por la subfamilia completa Goodeinae con 41

especies (Doadrio y Domínguez, 2004), los géneros de atherinopsidos, *Chirostoma* con 19 especies (Barbour, 1973a-b; Espinosa *et al.*, 1993) y *Poblana* con cuatro especies (Espinosa *et al.*, 1993), y desde luego los géneros de ciprínidos incluidos en esta parte del territorio mexicano, *Algansea* con siete especies (Mayden *et al.*, 1992b; Espinosa *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2005), *Evarra* con tres especies (Miller *et al.*, 2005), *Yuriria* con tres especies (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2007) y al menos cinco especies endémicas del género *Notropis* (Schönhuth y Doadrio, 2003).

Dentro de la composición singular de estos ciprínidos, el género *Algansea* es uno de los grupos con mayor representación dentro de la Mesa Central. A pesar de ser un grupo pequeño, presenta una amplia distribución dentro de la región, con especies únicas en diferentes sistemas hidrológicos y cuencas interiores que indican una estrecha asociación con la historia geológica de la Mesa Central (Barbour y Miller, 1978). Dicha característica es de particular relevancia en el conocimiento acerca de los procesos evolutivos que han originado la diversidad única de la ictiofauna de esta región.

Actualmente, la obtención de hipótesis filogenéticas en algunos grupos de peces también representativos de la Mesa Central, como es el caso de la subfamilia Goodeinae (Doadrio y Domínguez-Domínguez; 2004) y el complejo de especies de *Notropis* del centro de México (Schönhuth y Doadrio, 2003), han establecido algunos patrones evolutivos comunes entre ambos taxa vinculados a procesos de vicariancia por efecto de la actividad geológica dentro de la región (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2006). Ambas hipótesis fueron basadas en el gen mitocondrial citocromo *b*, cuyo desempeño permitió además de la obtención de relaciones filogenéticas considerablemente resueltas y robustas, estimar la datación de los diferentes eventos cladogenéticos que dieron lugar a sus respectivos linajes.

Con base en lo anterior, se considera que la obtención de una hipótesis de relaciones filogenéticas de las especies del género *Algansea*, además de las implicaciones en la sistemática y clasificación del taxon, contribuiría al conocimiento de los patrones evolutivos que dieron lugar a la diversidad única de peces de la Mesa Central. La determinación de dichos patrones contribuiría al entendimiento del origen y de la diversidad no solo biológica sino también de los procesos evolutivos que dieron lugar a la ictiofauna de esta región.

Más allá de la trascendencia evolutiva de este conocimiento, la ubicación físico-geográfica de dichos procesos evolutivos, es de particular relevancia como base para priorizar las áreas naturales que deben de ser protegidas en función de la ictiofauna dulceacuícola dentro de la región de la Mesa Central.

1.1. Sistemática y clasificación del Género *Algansea*

Actualmente se reconocen siete especies: *A. aphaea* Barbour y Miller, 1978; *A. avia* Barbour y Miller, 1978; *A. barbata* Álvarez del Villar y Cortés, 1964; *A. lacustris* Steindachner, 1895; *A. monticola* Barbour y Contreras, 1968; *A. popoche* Jordan y Snyder, 1900; y *A. tincella* Valenciennes, 1844 (Mayden *et al.*, 1992b; Espinosa *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2005). A pesar de sus pocas especies, este grupo ha tenido una historia taxonómica compleja, particularmente debido a la gran variación morfológica encontrada en *A. tincella*, la especie con el mayor intervalo de distribución dentro de la Mesa Central (Barbour y Miller, 1978).

El primer trabajo donde se analizó la composición del género *Algansea* y se discuten algunos aspectos sobre su taxonomía fue el realizado por Barbour y Miller (1978), quienes hicieron uso de caracteres morfológicos y ecológicos para proponer en un contexto fenético y cladista, una clasificación del género donde reconocieron seis especies y dos subespecies (*A. monticola monticola* y *A. monticola avia*), y donde establecieron por primera vez las relaciones filogenéticas del género *Algansea* (fig. 1). El análisis filogenético arrojó dos grupos, uno compuesto por ((*A. barbata*, *A. monticola*) *A. aphaea*), cuya monofilia se sustenta en la presencia de barbillas maxilares, y otro, carente de estas mismas ((*A. lacustris*, *A. popoche*) *A. tincella*), apoyado por cuatro caracteres (fig. 1). La relación *A. barbata*–*A. monticola* fue apoyada por un estado de carácter presente en la primera especie y observado únicamente en algunos individuos de *A. m. monticola*.

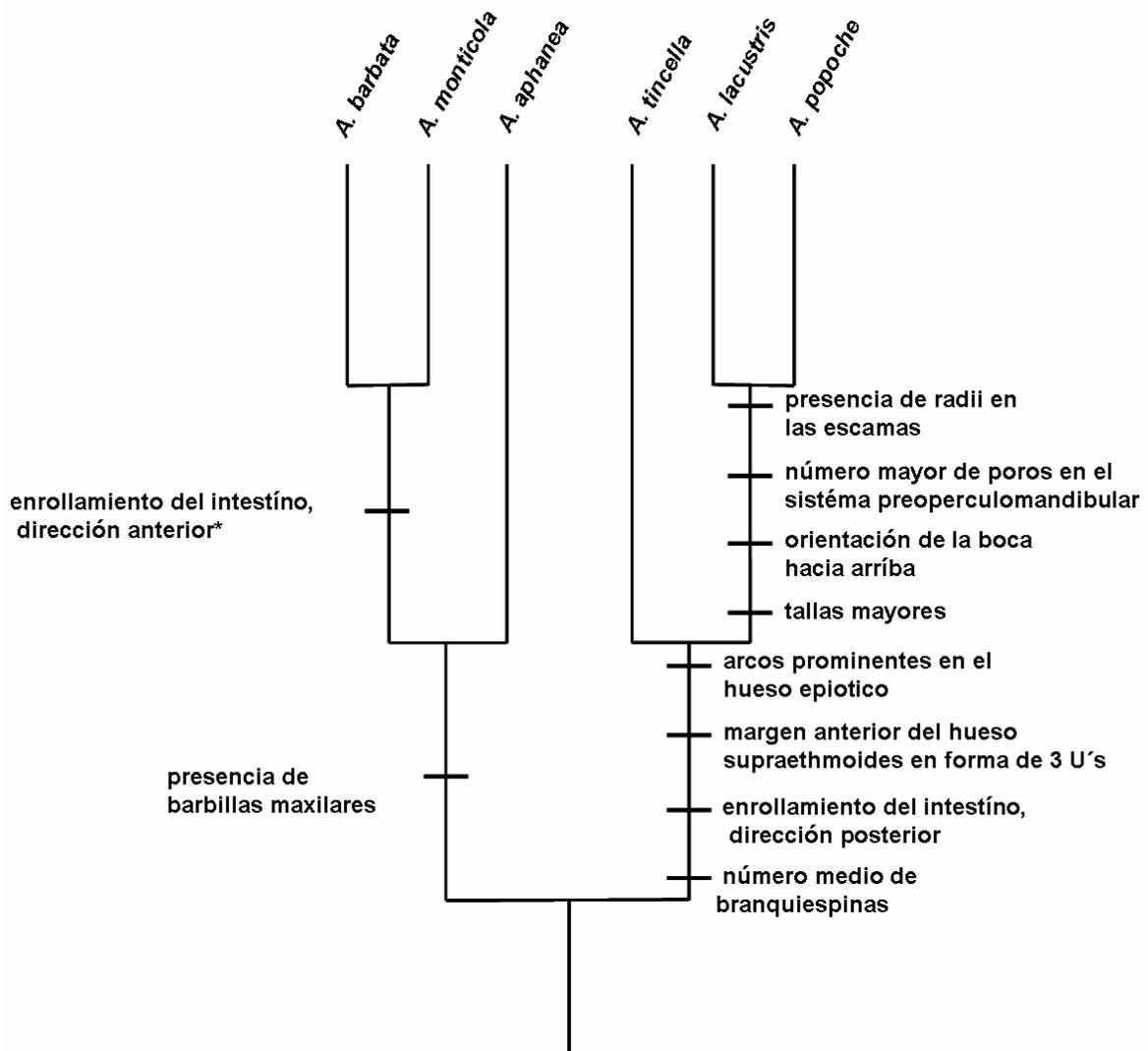


Figura 1. Hipótesis filogenética del género *Algansea*, de acuerdo a Barbour y Miller (1978). Las pequeñas líneas horizontales, corresponden a los caracteres apomórficos. *estado de caracter que comparte *A. barbata* únicamente con una de las dos subespecie, *A. m. monticola*.

Posteriormente, Jensen y Barbour (1981) analizaron nuevamente la matriz de caracteres obtenida por Barbour y Miller (1978) y realizaron algunos cambios en la codificación de caracteres, para proponer una hipótesis de las relaciones entre especies de *Algansea*. Las relaciones filogenéticas resultantes fueron sustancialmente similares, con algunas diferencias, particularmente dentro del grupo con barbillas presentes, donde se

estableció la relación ((*A. aphaea*, *A. barbata*) *A. monticola*), apoyada por dos sinapomorfías, orientación de la boca hacia abajo y supraetmoides inclinado anteroventralmente. Sin embargo, en este mismo trabajo, fue implementado un análisis filogenético únicamente con las especies con barbillas presentes, donde fueron incluidas *A. m. monticola* y *A. m. avia*. Los resultados de dicho análisis contradicen en cierta forma las relaciones previamente establecidas entre las especies con barbillas presentes, y la postulan los autores como una mejor hipótesis filogenética (fig. 2). Dadas estas relaciones, donde no se recupera la monofilia de cada una de las subespecies de *A. monticola*, Jensen y Barbour (1981) sugieren que la interpretación más apegada a los principios de monofilia que considera unidades lo suficientemente diferenciadas y diagnosticables, es la elevación de *A. m. avia* y *A. m. monticola* a nivel de especie.

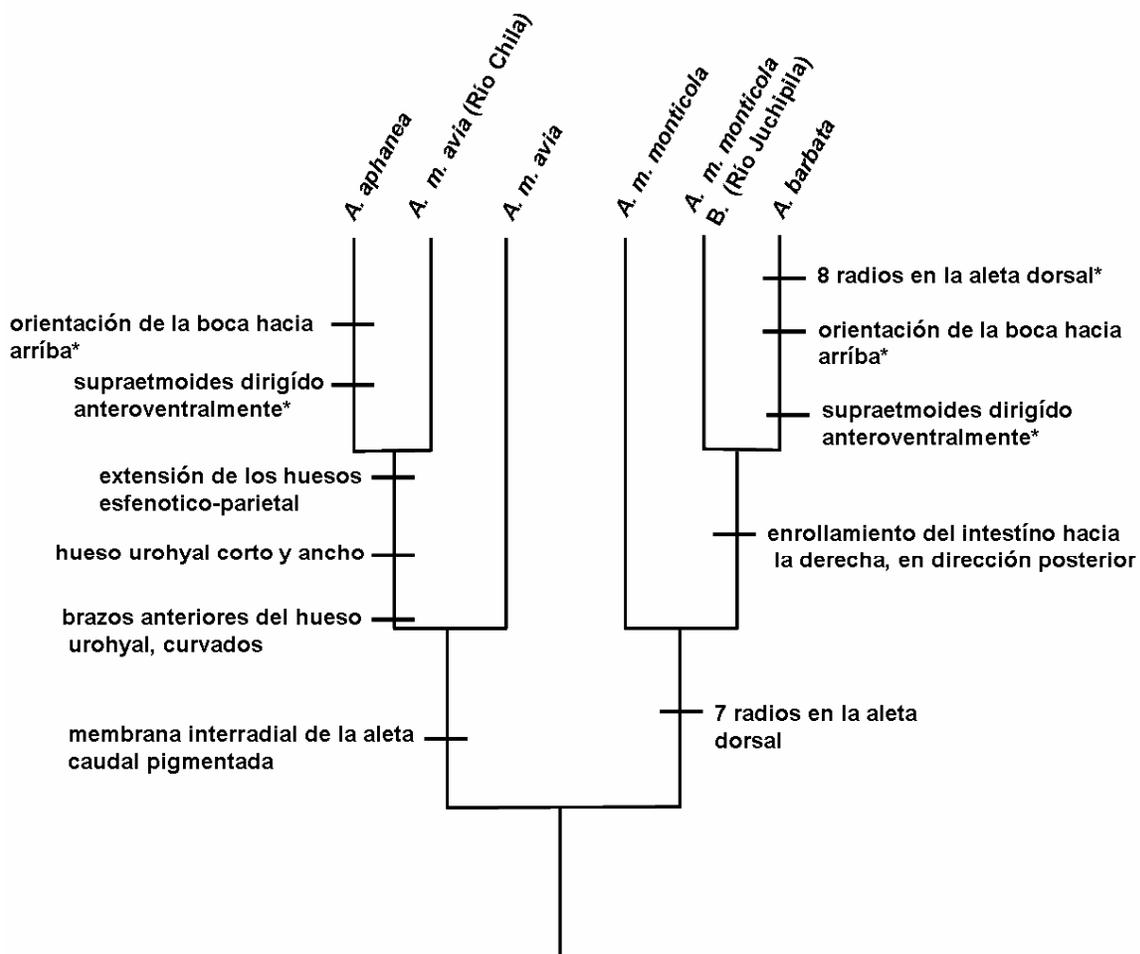


Figura 2. Hipótesis filogenética de las especies y subespecies con barbillas maxilares presentes del género *Algansea*, de acuerdo con Jensen y Barbour (1981). Las pequeñas líneas horizontales, corresponden a los caracteres apomórficos. Los caracteres con asterisco representan homoplasias.

Los análisis filogenéticos anteriormente referidos utilizaron caracteres tales como la presencia/ausencia de barbillas maxilares o el enrollamiento del intestino, sin embargo, se ha discutido ampliamente que estos caracteres son altamente homoplásicos dentro de los ciprínidos (Gilbert, 1978; Howes, 1991), e incluso son considerados una de las principales causas de la confusión en la clasificación de los ciprínidos norteamericanos (Simmons *et al.*, 2003). Así mismo, las hipótesis filogenéticas del género *Algansea*, además de presentar estos caracteres considerados altamente homoplásicos que determinan los dos linajes principales del género, presentan otros considerables inconvenientes, como el uso de otros caracteres que representan adaptaciones derivadas independientes en medios lacustres, tales como los que apoyan la relación de *A. lacustris* y *A. popoche* (fig. 1), así como métodos de codificación de caracteres cuestionables, señalados incluso por los mismos autores (Barbour y Miller, 1978; Jensen y Barbour, 1981), y además cabe resaltar la carencia de un “grupo externo” en dichos análisis para establecer la polarización de caracteres, indispensable para poner a prueba la monofilia de un grupo (Sanderson y Shaffer, 2002).

1.2. Marcadores moleculares

La clasificación y sistemática de peces basadas en caracteres morfológicos han tenido considerable éxito, especialmente en la definición de especies y en la organización de éstas dentro de géneros, frecuentemente confirmados incluso por aproximaciones moleculares (Stepien y Kocher, 1997). Sin embargo, el empleo de marcadores moleculares ha revelado situaciones donde la variación morfológica es limitada, y la homología de los caracteres morfológicos es cuestionable (Moritz y Hillis, 1997). Éste es el caso de la filogenia de la familia Cyprinidae, donde el empleo del gen mitocondrial citocromo *b* reveló de la presencia/ausencia de barbillas, carácter que determinaba los dos principales linajes, Leuciscini y Barbini *sensu* Chen *et al.* (1984) era un carácter homoplásico (Briolay *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2002).

Para el caso particular de los ciprínidos norteamericanos, el empleo de marcadores moleculares ha permitido dilucidar algunos de los inconvenientes de los caracteres

morfológicos en la inferencia filogenética, tales como los altos niveles de homoplasia en caracteres que determinan linajes (v. gr. la abertura en el miodomo posterior), y la diferente condición de homología que puede adquirir un carácter en función de la codificación de caracteres (Simons y Mayden, 1999).

1.2.1. Citocromo *b*

Este gen mitocondrial codificante ha sido ampliamente utilizado para diferentes estudios filogenéticos dentro de los vertebrados. Particularmente en peces ha sido empleado para resolver preguntas a diferentes niveles taxonómicos, que incluyen relaciones entre especies muy cercanas, y relaciones más profundas. Esta característica tan versátil del *cit-b*, es atribuida principalmente a las dos regiones o dominios que presenta, uno conservado y el otro altamente variable, y a la variación en la tasa evolutiva en las posiciones del codón (Stepien y Kocher, 1997; Lydeard y Roe, 1997; Farías *et al.*, 2001).

Dentro de la familia Cyprinidae el *cit-b* se ha empleado para resolver hipótesis filogenéticas en diferentes niveles taxonómicos. A nivel de género ha tenido un buen desempeño, delimitando especies y estableciendo sus relaciones filogenéticas (Brito *et al.*, 1997; Schönhuth y Doadrio, 2003).

1.2.2. Primer intrón del gen de la proteína ribosomal S7

El análisis de secuencias con intrones provee una resolución en filogenias comparable a la del DNA mitocondrial (Palumbi, 1996). Su amplia aplicabilidad (primers universales), las altas tasas de variabilidad y su contexto genético bien entendido, lo convierten en un marcador atractivo para estudios de estructura de poblaciones y diversidad genética (Palumbi, 1996).

A partir de la caracterización de los primers de los primeros dos intrones del S7, mediante RFLP's, se demostró el considerable polimorfismo intraespecífico y la herencia mendeliana de estos marcadores dentro de diferentes poblaciones (Chow y Hazama, 1998) de atunes de aleta amarilla (*Thunnus albacares*), e inclusive dentro de un par de progenitores y las crías de la misma especie de atún (Chow *et al.*, 2001).

El primer intrón ha tenido un considerable desempeño a nivel interespecífico, resolviendo relaciones filogenéticas a nivel de género, como es el caso de la filogenia de un

género de peces de arrecifes de coral, *Thalassoma* (Bernardi *et al.*, 2004), corroborada por otros genes.

2 Objetivos

General

- Proponer una hipótesis de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Algansea* basada en marcadores moleculares nucleares y mitocondriales.

Particulares

- Determinar las relaciones filogenéticas de las especies del género *Algansea*, utilizando el primer intrón del gen nuclear *S7*.
- Determinar las relaciones filogenéticas de las especies del género *Algansea*, utilizando el gen mitocondrial citocromo *b*.
- Realizar un análisis con una matriz combinada con base en el principio de “evidencia de total”, utilizando ambos marcadores, para proponer una hipótesis de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Algansea*.
- Comparar la filogenia obtenida con previas hipótesis filogenéticas basadas en caracteres morfológicos.

3 Área de estudio

La Mesa Central es uno de los principales componentes fisiográficos del centro de México. Es una planicie elevada en la parte central de México que incluye el Cinturón Volcánico Transversal Mexicano (CVTM) y se encuentra limitada al norte y oriente por la Sierra Madre Oriental, hacia el occidente por la Sierra Madre Occidental y al sur por la depresión conocida como El Bajío (Nieto-Samaniego *et al.*, 2005).

Su principal sistema hidrológico es el Lerma-Chapala-Santiago. También cuenta con varias cuencas interiores en los altos valles del CVTM, que incluyen los Valles de México y los Llanos de Puebla en el Este; los valles de Tocuambo, Sayula y Zacoalco cerca del lago de Chapala; así como los lagos de Zirahuén, Patzcuaro, Zacapu y Cuitzeo las cuencas circundantes tanto las de la vertiente pacífico como la atlántico, son parte también de esta región. Además incluye varios de los tributarios en las cabeceras de algunos de los principales ríos que drenan hacia ambas vertientes, Pacífica y Atlántica, tales como el Río Pánuco en el Este, el Río Balsas en el Sur, y los ríos Coahuayana, Armería y Ameca, Lago de Chapala y el Río Grande de Santiago (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2006) (fig. 3).

Esta región fisiográfica presenta una historia tecto-volcánica compleja. Su origen data del Mioceno superior y está asociado con la formación del Proto Golfo de California y la intensificación de la actividad tectónica y volcánica en la parte Oeste del CVTM (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2006). Aunado a dicha actividad geológica, el cambio de clima en el Plioceno donde predominó un ambiente seco, propició el aislamiento de sistemas hidrográficos (Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004) y con ello la ocurrencia de eventos vicariantes que se consideran los responsables de los procesos de especiación que en gran parte dieron lugar a este patrón de diversidad única, observado y representado no solo por ciprínidos, sino por otras familias de peces dulceacuícolas (Miller y Smith, 1986) como Goodeidae, con 41 especies, todos miembros de la subfamilia Goodeinae (Doadrio y Domínguez, 2004), y Atherinopsidae, con 19 especies del género *Chirostoma* (Barbour, 1973a-b; Espinosa *et al.*, 1993), y 4 especies de *Poblana* (Espinosa *et al.*, 1993).

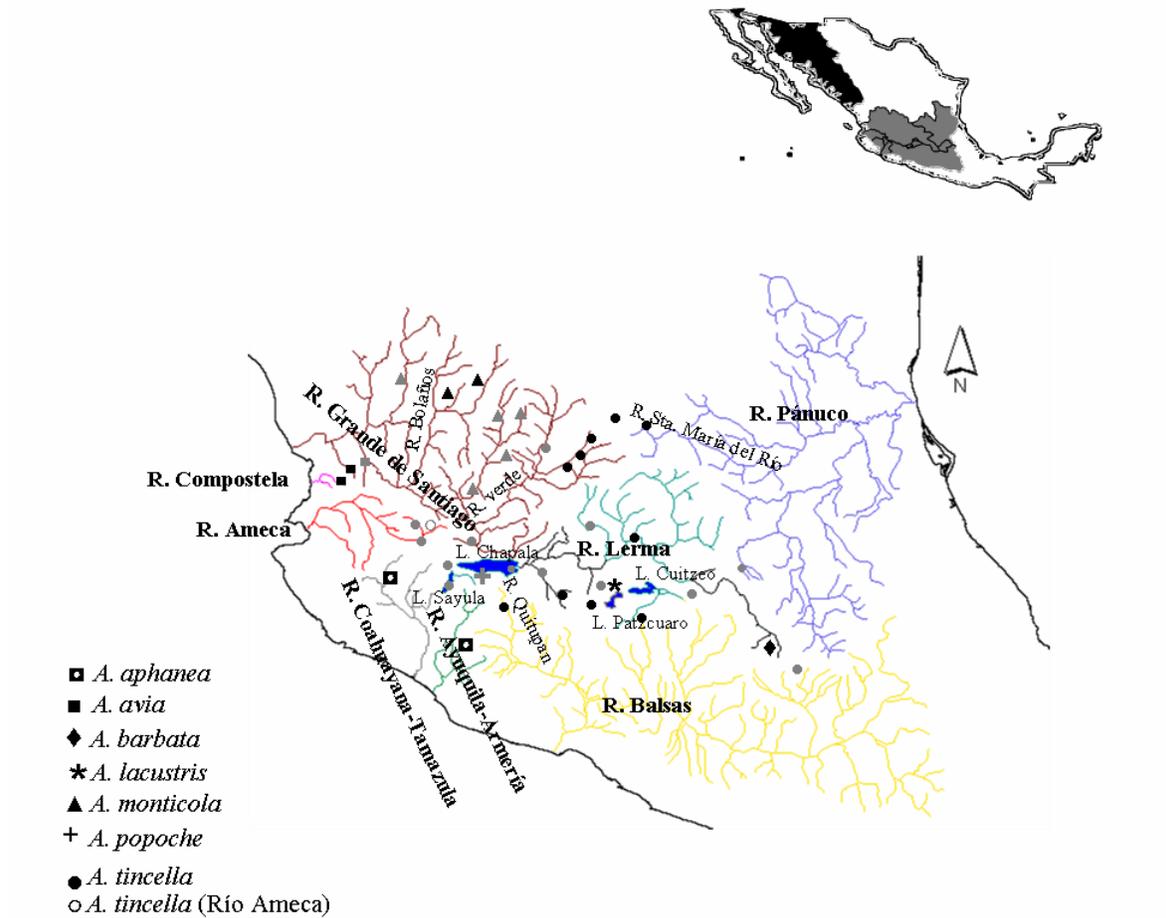


Figura 3. Distribución del género *Algansea* en la Mesa Central de México. El área sombreada de gris corresponde a la distribución del género *Algansea*; el área sombreado de negro corresponde a la distribución de *Agosia chrysogaster*. Los símbolos en negro corresponden a las localidades muestreadas; los símbolos grises corresponden al resto de la distribución de las especies.

4 Materiales y métodos

4.1. Colecta de peces

Los sitios de colecta se establecieron con base los siguientes criterios: 1) localidad de los ejemplares tipo de cada una de las siete especies reconocidas, y 2) poblaciones de cada una de las especies. Se consultaron los registros de Barbour y Miller (1978), así como diferentes colecciones ictiológicas [Colección de Peces de la Universidad Michoacana (CPUM); Colección Nacional de Peces del Instituto de Biología, UNAM (CNPE-UNAM); Colección Nacional de Peces de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IP (ENCBP-IP); y Colección de Peces del Museo de Zoología de la Universidad de Michigan (UMMZ)].

La única especie que no se logró colectar a pesar del esfuerzo realizado en más de una ocasión, fue *Algansea popoche*, especie endémica de Lago de Chapala. Aunque oficialmente esta especie presenta un estatus de conservación de amenazada según la NOM-059-ECOL-2001, de acuerdo con testimonios de pescadores y de algunos investigadores que trabajan en la región (Carlos Escalera, *comunicación personal*), se considera extinta. Incluso en la revisión del género de Barbour y Miller, (1978) se hace mención de la ausencia de *A. popoche* en el cuerpo de agua, atribuyéndosele a la destrucción de la vegetación acuática que es considerada como el principal hábitat de la especie, a causa de la construcción de un dique a lo largo de la parte este del lago de Chapala, cercana al Río Lerma.

De acuerdo con el tipo de cuerpo de agua, es decir, arroyos, ríos, embalses o lagos, se empleó el método de captura más adecuado. En los sistemas lóticos se usó un equipo de electropesca y redes de mano; mientras que en los sistemas lénticos naturales y artificiales, se emplearon redes tipo chinchorro, que variaron de 10 a 50 metros de longitud.

Una vez que fueron capturados los organismos, se obtuvo un pedazo de tejido, a través de un corte de las aletas caudal o pectoral, dependiendo del tamaño del individuo. Posteriormente el tejido fue preservado en etanol 96°, en criotubos de 2 ml. Todos los especímenes fijados y depositados en la Colección de Peces de la Universidad Michoacana.

4.2. Muestreo taxonómico

El muestreo se basó en las siete especies reconocidas actualmente, *A. aphaea*, *A. avia*, *A. barbata*, *A. lacustris*, *A. monticola*, *A. popoche*, y *A. tincella* (Mayden *et al.*, 1992; Espinosa *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2005). Todos los taxa excepto *A. popoche*, fueron incluidos en los análisis. Con la excepción de *A. barbata*, se incluyó más de una población por especie (tabla 1). Cabe destacar que *A. lacustris*, endémica del lago de Pátzcuaro, es un tradicional recurso pesquero en la región y además de su captura *in situ*, ha sido sujeta a un manejo acuícola externo al Lago, por lo que se ha introducido en diferentes cuerpos de agua aledaños a la localidad tipo. Tal es el caso de su presencia en la laguna de San Gregorio, ubicada al Sur de Pátzcuaro, localidad que fue incluida en el presente trabajo como otra población (tabla 1), con la finalidad de corroborar su identificación y confirmar su presencia en dicho cuerpo de agua.

El muestreo realizado cubrió casi por completo el intervalo de distribución del género (fig. 3), que incluyó la visita de todas las localidades de los ejemplares tipo de las diferentes especies. Cabe señalar que en cuatro de ellas se logró capturar las especies tipo, incluyendo la subespecie *A. monticola archidion* (Barbour y Miller, 1994); por su parte, la extensa distribución de *A. tincella* estuvo bien representada por el muestreo realizado, puesto que se logró obtener organismos de la mayoría de las cuencas hidrológicas donde se registra esta especie (fig. 3).

Con la finalidad de probar la monofilia del género *Algansea*, se incluyeron tres especies de ciprínidos representantes de géneros cercanos a *Algansea*. De acuerdo con lo encontrado en la hipótesis filogenética obtenida por Schönhuth (2002), basada en los genes mitocondriales 16S y *cit-b*, el género monotípico *Agosia* fue el ciprínido que presentó la relación más cercana con *Algansea*, seguido por los géneros *Dionda* y *Campostoma*. Con base en dicha hipótesis, en el presente trabajo se incluyeron los ciprínidos *Agosia chrysogaster*, *Dionda melanops*, *Campostoma ornatum*, y como grupo externo funcional al ciprínido norteamericano que resultó más alejado en Schönhuth (2002), *Gila robusta*.

4.3. Obtención de secuencias

4.3.1 Extracción de DNA

Los tejidos fueron lavados con H₂O para eliminar el exceso de etanol, posteriormente se obtuvo una porción de tejido, la cuál varió de 300 a 500 mg. Con la ayuda de un bisturí fue reducido el tamaño de partícula del tejido. Una vez obtenido el menor tamaño de partícula posible, se empleó el método convencional de extracción proteinasa K/fenol/cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989), sólo que remplazando el cloroformo por una mezcla de diclorometano-alcohol isoamílico (24:1); esta mezcla cumple la misma función que el cloroformo, eliminar el exceso de fenol, y es menos tóxica (anexo 1).

4.3.2. Amplificación

La amplificación de los fragmentos de ambos marcadores, mitocondrial y nuclear, se realizó mediante la técnica de PCR (por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction), ver protocolo en anexo 2. Para el *cit-b* se emplearon los primers, GLUDG-5' (5'-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG-3' Palumbi, 1996) y H16460 (5'-CGAYCTTCGGATTACAAGACC-3' <http://nmg.si.edu/bermlab.htm>). El primer intrón del gen de la proteína ribosomal S7, fue amplificado utilizando los primers S7RPEX1F (5'-TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC-3') y S7RPEX2R (5'-AACTCGTCTGGCTTTTC GCC-3') (Chow y Hazama, 1998).

4.3.3. Secuenciación

Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el kit ExoSAP-IT™ (USB), que se basa en la eliminación de pequeños fragmentos de DNA, mediante la acción de una exonucleasa, lo que garantiza la eliminación de excesos de nucleótidos y primers que sobraron de la PCR (anexo 3). Una vez purificados los productos de PCR, se secuenciaron usando el Big Dye Deoxy Terminator cycle-sequencing kit (Applied Biosystems Inc.), ver protocolos de reacción de secuenciación y purificación en anexos 4 y 5, respectivamente. Todas las muestras se secuenciaron en un secuenciador de DNA Applied Biosystems 3700 en SECUGEN, Madrid, España.

4.4. Análisis de secuencias

4.4.1. Alineamiento y variación de las secuencias

El alineamiento de las secuencias de *cit-b* se realizó de manera manual. Por el contrario, debido a que el primer intrón del S7 sí presentó indels (vacíos a causa de inserciones o deleciones), se empleó el programa Clustal X 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) utilizando los parámetros predeterminados del el programa (Gap opening: 15, Gap extension: 6.66). Después se revisó y corrigió el alineamiento de manera visual.

Se obtuvo la composición nucleotídica y las frecuencias de las bases, así como la prueba de homogeneidad de las frecuencias de bases entre todos los taxa, para el *cit-b* [completo (con las tres posiciones simultáneamente) y particionado (cada una de sus posiciones por separado)] y el intrón S7, utilizando PAUP 4.1 (Swofford, 2004).

Debido al limitado número de estados posibles de los caracteres moleculares (A, T, C, G), en la secuencias de DNA se presenta un fenómeno conocido como saturación. Con la finalidad de detectar si alguno de los marcadores se ve afectado por este fenómeno, se comparó la progresión de los cambios nucleotídicos en relación a las distancias genéticas entre taxones. Para esto se calcularon las “distancias absolutas” (cambios nucleotídicos totales) pareadas, y las distancias genéticas pareadas corregidas de acuerdo al modelo de evolución más adecuado para cada uno de los marcadores, utilizando el programa PAUP 4.1 (Swofford, 2004). Después se realizó una regresión lineal con el programa SigmaPlot 7 (SPSS Inc., 2001). Puesto que en el *cit-b* cada una de las posiciones tiene diferente tasa de sustitución de nucleótidos, se calcularan las distancias para cada tipo de sustitución (transición y transversión) en cada una de las tres posiciones del codón.

Para las divergencias genéticas entre poblaciones, especies y linajes principales, se calculó el promedio de los cambios nucleotídicos totales y la proporción de los proporción de los mismos (distancias no corregidas “*p*”) para el *cit-b* y S7, utilizando el programa MEGA v.3.1 (Kumar *et al.*, 2004). También se calcularon las distancias genéticas corregidas con el modelo que resultó más adecuado en cada uno de los marcadores. Es importe señalar que para el cálculo de estas distancias se utilizaron los 19 individuos secuenciados con ambos marcadores (tabla 1), con el fin de comparar las divergencias genéticas nucleares y mitocondriales.

4.4.2. Análisis filogenéticos

Los métodos de análisis de inferencia filogenética utilizados en el presente estudio fueron “Análisis de Máxima Parsimonia” (**MP**) e “Inferencia Bayesiana” (**BY**). Las secuencias obtenidas de cada marcador se analizaron de manera independiente (cit-*b* y S7 por separado) y de manera simultánea, combinando ambas matrices de secuencias (cit-*b*+S7). Previo a los análisis combinados, se realizó un consenso estricto con las topologías obtenidas por separado para detectar los conflictos y las congruencias entre ambos marcadores. También se llevó a cabo una prueba de homogeneidad de particiones mediante el “Incongruence Length Difference Test” (ILD) (Farris *et al.*, 1995a, 1995b), con la finalidad de evaluar si bajo este criterio las particiones (cit-*b* y el intron S7) son combinables.

Se realizó un **MP** con pesajes iguales, para cada conjunto de datos por separado y combinados, utilizando el programa PAUP v.4.1 (Swofford, 2004). Los análisis se basaron en una búsqueda heurística, con 100 repeticiones usando “stepwise-random addition”, y el algoritmo “Tree-Bisection-Reconnection (**TBR**)”; simultáneamente, con el fin de evaluar la robustez de las topologías obtenidas se realizó un análisis de bootstrap no paramétrico (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas. Dado que el bootstrap no paramétrico es un estimador de soporte conservador (Hillis y Bull, 1993; Wilcox *et al.*, 2002), el criterio para determinar el apoyo de los clados basados en los valores de bootstrap (Bt) fue el siguiente: se consideraron altamente apoyados, si $Bt \geq 90$; moderadamente apoyados, si $70 \leq Bt < 90$; poco apoyados, si $50 \leq Bt < 70$; y sin apoyo alguno, si $Bs < 50$ (Pedersen *et al.*, 2007). Para el caso particular de los conjuntos de datos S7 y cit-*b*+S7, se realizó un **MP** adicional, siguiendo la misma estrategia de búsqueda donde se consideró a los indels como un quinto estado de carácter.

Para determinar el modelo evolutivo que refleje con mayor verosimilitud los cambios evolutivos ocurridos en cada uno de los genes utilizados para los taxa incluidos en este análisis, se utilizó el programa Modeltest v.3.7 (Posada y Crandall, 1998), basado en el criterio de información bayesiana (BIC). Con base en las diferentes tasas de evolución en cada una de las tres posiciones del codón en el cit-*b* (Lydeard y Roe, 1997), se obtuvo el modelo para cada posición, así como también para el S7 (tabla 2).

Una vez determinados los modelos, se procedió con el **BY** mediante el programa MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Para cada uno de los tres conjuntos de datos, *cit-b*, *S7* y el combinado de ambos genes, se utilizaron los modelos correspondientes y los parámetros por default del programa MrBayes, que consistieron en lo siguiente: se corrieron dos cadenas de Markov para 1,000,000 generaciones, partiendo de un árbol al azar, y muestreando árboles cada 100 generaciones. Dado que los valores de probabilidades posteriores (Pr) representan la probabilidad de que un clado sea verdadero, según el modelo de sustitución, las hipótesis previas y los datos (Huelsenbeck *et al.*, 2002), y dado que las Pr presentan mayor exactitud y con frecuencia son significativamente mayores a los Bt (Wilcox *et al.*, 2002; Alfaro *et al.*, 2003, Erixon *et al.*, 2003), se adoptó el criterio de que los clados con $Pr \geq 95\%$ son altamente apoyados, mientras que los clados con Pr menores a dicho valor no se sustentan (Pedersen *et al.*, 2007).

En todos los análisis realizados, la especie *Gila robusta* fue considerada el grupo externo.

4.4.3 Reloj Molecular

Se estimaron los tiempos de divergencia basados en el *cit-b*, con el objetivo de discutir e interpretar las implicaciones biogeográficas de las hipótesis filogenéticas obtenidas del género. Para probar si se cumple con la hipótesis de reloj molecular estricto, que consiste básicamente en que diferentes linajes presentan tasas de sustitución constantes (Hillis *et al.*, 1996), se compararon las tasas de sustitución de las secuencias del *cit-b* entre las diferentes especies del género *Algansea* mediante la “prueba de tasas relativas entre grupos” (Relative Rate Test) (Sarich y Wilson, 1973; Wu y Li, 1985). Dicha prueba se realizó con el programa RRTree v 1.1 (Robinson –Rechavi y Huchon, 2000).

Una vez determinada la constancia de los linajes, se procedió con el análisis de reloj molecular utilizando el programa Tree-Puzzle 5.2 (Schmidt *et al.*, 2004). Debido a la carencia de fósiles lo suficientemente confiables de las especies incluidas, la calibración del reloj molecular se basó en la tasa de evolución del *cit-b* del 1.31 % por millón de años (m.a.) establecida para ciprínidos norteamericanos (Dowling *et al.*, 2002). Dicha tasa fue calculada mediante la regresión lineal de los porcentajes de divergencia molecular *versus* los tiempos de divergencia del registro fósil. Cabe señalar que esta tasa de evolución del

cit-*b* del 1.31 % en los ciprínidos norteamericanos es consistente con las calculadas para los ciprínidos euro-asiáticos con 1.52 y 1.32% por m.a. (Zardoya y Doadrio, 1999; Machordon y Doadrio, 2001).

Tabla 1. Localidades muestreadas

Especies	Localidad	Cuenca	Voucher de tejido ^T	
			Cyt b	1 st intron S 7
<i>Algansea aphanea</i>	Río Ayutla, 5 Km al SE del poblado de Ayutla , Jalisco *	Sistema Armeria-Ayuquila	CPUMDNA28 CPUMDNA29 CPUMDNA30 CPUMDNA1267	CPUMDNA28 CPUMDNA29 - -
	Tributario del Río Tamazula, poblado el Tule, Jalisco	Sistema Tamazula-Coahuayana	CPUMDNA1268 CPUMDNA1269	CPUMDNA1268 -
<i>Algansea avia</i>	Tributario del Río Grande de Santiago, camino Santa María del Oro-la Cofradía, Nayarit *	Río Grande de Santiago	CPUMDNA4075 CPUMDNA4076 CPUMDNA4077	- CPUMDNA4076 CPUMDNA4077
	Río Compostela, poblado Compostela, Nayarit	Río Compostela	MNCNM150 CPUMDNA93 CPUMDNA94	- - CPUMDNA94
<i>Algansea barbata</i>	Río Sila, Granja Piscicola de Tiacaque, Estado de México	Alto Lerma	CPUMDNA1278	CPUMDNA1278
<i>Algansea lacustris</i>	Lago de Patzcuaro, Uranden, Michoacán *	Cuenca Interior	CPUMDNA614 CPUMDNA615 MNCNM3025	CPUMDNA614 - -
	Lago San Gregorio, Santa Clara del Cobre, Michoacán	Cuenca interior	CPUMDNA21 MNCNM4065	- -

- = secuencia no realizada.

*= localidad tipo.

T= tejidos depositados en la Colección de Peces de la Universidad Michoacana (CPUM); Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (MNCNM)

Continuación de la **Tabla**

Especies	Localidad	Cuenca	Voucher de tejido ^T	
			Cyt b	1 st intron S 7
	Arrollo San Jose, Huejuquilla, Jalisco*		CPUMDNA848	CPUMDNA848
<i>Algansea monticola</i>	Río Huejuquilla, Huejuquilla, Jalisco	Sistema Bolaños-Santiago	CPUMDNA849	-
			CPUMDNA850	-
	Presa Tesoreros, Jalisco		CPUMDNA869	-
	Umecuaru River, Morelia, Michoacán	Lago de Cuitzeo	CPUMDNA1215	-
			CPUMDNA1216	-
CPUMDNA1217			CPUMDNA1217	
CPUMDNA1218			-	
			CPUMDNA1219	-
Presa Orandino, Zamora, Michoacán	Bajo Lerma	MNCNM3734	-	
<i>Algansea tincella</i>	Laguna de Zacapu, Zacapu Michoacán	Laguna de Zacapu	MNCNM3450	-
	Río Querétaro, Querétaro	Medio Lerma	MNCNM3307	-
	Arroyo en el poblado de la Paz , Ojuelos, Jalisco	Sistema Verde-Santiago	CPUMDNA4212	-
CPUMDNA842			CPUMDNA842	
Arroyo en el poblado de Guadalupe Victoria, Jalisco	Sistema Verde-Santiago	CPUMDNA856	-	
		CPUMDNA858	-	
		CPUMDNA859	-	
		CPUMDNA860	-	
Arroyo en el poblado de Matanzas, Jalisco			CPUMDNA852	-

- = secuencia no realizada.

*= localidad tipo.

T= tejidos depositados en la Colección de Peces de la Universidad Michoacana (CPUM); Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (MNCNM)

Continuación de la **Tabla**

Especies	Localidad	Cuenca	Voucher de tejido ^T	
			Cyt b	1 st intron S 7
<i>Algansea tincella</i>	Ticolote River, Los Pinos town, Zacatecas	Río Verde (Río grande de Santiago)	CPUMDNA407	-
			CPUMDNA964	-
			CPUMDNA965	-
	Arroyo en el poblado la Coronilla, Jalisco	Río Ameca	CPUMDNA1202	CPUMDNA1202
			CPUMDNA1203	CPUMDNA1203
			CPUMDNA3658	-
	Arrollo en el poblado de Jesús Maria , San Luis Potosí	Río Santa Maria (Pánuco)	CPUMDNA718	-
			CPUMDNA719	CPUMDNA719
			CPUMDNA720	-
<i>Agosia chrysogaster</i>	Quitupan River, Michoacan	Tepalcatepet-Balsas System	CPUMDNA1314	-
			CPUMDNA1854	CPUMDNA1854
<i>Campostoma ornatum</i>	Primero River	Conchos River	CPUMDNA1926	CPUMDNA1926
<i>Dionda melanops</i>	Río Nazas, Emilio Carranza ,Durango	Nazas River	CPUMDNA1941	CPUMDNA1941
<i>Gila robusta</i>	Batopilas River		CPUMDNA1868	CPUMDNA1868

- = secuencia no realizada.

*= localidad tipo.

T= tejidos depositados en la Colección de Peces de la Universidad Michoacana (CPUM); Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (MNCNM)

5 Resultados

5.1. Patrones de variación genética

Se obtuvieron 52 secuencias de *cit-b*, 48 correspondientes a las diferentes especies y poblaciones del género *Algansea*, y cuatro a cada uno de los ciprínidos empleados como grupos externos (tabla 1). El tamaño del gen mitocondrial en el alineamiento final con todas las secuencias fue de 1140 pares de bases (pb) y no presentó indels a lo largo de las secuencias. Menos del 25% de los sitios del *cit-b* fueron filogenéticamente informativos bajo el criterio de parsimonia, concentrándose en su mayor parte, en las terceras posiciones del codón (tabla 2).

Tabla. 2 Parametros del análisis de Máxima Parsimonia con cada matriz de datos

	citocromo <i>b</i>				S7
	1 ^{era} pos	2 ^{nda} pos	3 ^{era} pos	Todas	
No. sitios	380	380	380	1140	965
No. sitios variables	74	31	320	425	279
No. sitios pars-info.	34 (9%)	2 (0%)	243 (64%)	279 (24%)	83 (9%) ^a 103 (11%) ^b
Modelo de sustitución	TrNef+G	HKY	TrN+G	TrN+G	HKY+G
Proporción de sitios invariables	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Distribución gamma (α)	0.23	t.i.	2.45	0.21	1.41
Proporción de Adenina	24%±	20%±	35%±	26%±	31%±
Proporción de Citosina	25%±	26%±	34%±	29%±	15%±
Proporción de Guanina	26%±	13%±	11%±	17%±	20%±
Proporción de Timina	25%±	40%±	20%±	28%±	34%±
Prueba de homogeneidad de frecuencias de bases	X ² =4.62 gl= 153 P= 1.00	X ² =1.28 gl = 153 P=1.00	X ² =1.28 gl = 153 P= 1.00	X ² = 21.68 gl = 153 P = 1.00	X ² = 3.71 gl = 54 P = 1.00

^asin indels

^bcon indels

La composición de las bases fue considerablemente diferente entre las tres posiciones del codón, se observó el sesgo antiguáninas en las segundas (13%) y terceras (11%) posiciones, común no solo dentro de la familia Cyprinidae (Dowling y Naylor, 1997; Cunha *et al.*, 2002), sino en los peces (Lydeard y Roe, 1997; Farias *et al.*, 2001) y vertebrados en general (Johns y Avise, 1998). La composición de las bases entre los diferentes taxa fue homogénea en las tres posiciones (tabla 2).

El número de sustituciones incrementó linealmente a lo largo de las distancias genéticas existentes entre todos los taxa analizados, presentándose una relación lineal casi perfecta ($R^2 \geq 0.99$) para todas las sustituciones, excepto en las transversiones de la segunda posición del codón ($R^2 = 0.87$) y las transiciones de la tercera posición ($R^2 = 0.83$) del *cit-b* (fig. x). Debido a la carencia de cambios nucleotídicos a pesar del incremento de las divergencias genéticas, estos dos últimos casos indicaron la presencia de saturación. Cabe señalar que dicho fenómeno solo se observó entre el género *Algansea* y el resto de los ciprínidos; con *C. ornatum* y *G. robusta* en las transversiones de la segunda posición (fig. x), y con los cuatro ciprínidos en las transiciones de la tercera posición (fig. x).

Por otro lado, las secuencias obtenidas con el intrón del S7 correspondieron a 19 de los mismos individuos muestreados con *cit-b* (tabla 1). Al editar las secuencias del intrón se presentaron dobles picos con la misma intensidad en el cromatograma; uno correspondiente a Timina y el otro a Citosina en los sitios 333 en *A. barbata* (individuo CPUMDNA1278) y 31 en *A. lacustris* (individuo CPUMDNA614). Dichos polimorfismos genéticos indicaron la condición de heterocigocidad, que debido a su escasa ocurrencia fueron considerados como incertidumbres.

El alineamiento final incluyendo los indels fue de 965pb. Los sitios informativos fueron pocos, aún cuando los indels fueron incluidos como quinto estado (tabla 2). Similar a lo reportado en otras familias de peces (Ortí *et al.*, 1996; Lavoué *et al.*, 2003), el primer intrón del S7, presentó un alto contenido de Adeninas y Timinas (tabla 2), característica peculiar de las regiones no codificantes, libres de cualquier limitante funcional (Prychitko y Moore, 1997). Se presentó una relación lineal ($R^2 = 0.99$) entre las distancias genéticas y los cambios nucleotídicos, indicando la ausencia de saturación (fig. 4). A diferencia del *cit-b*, el número de cambios nucleotídicos y distancias genéticas alcanzados con transiciones y transversiones, fueron similares, siendo incluso ligeramente mayores las segundas (fig. 4).

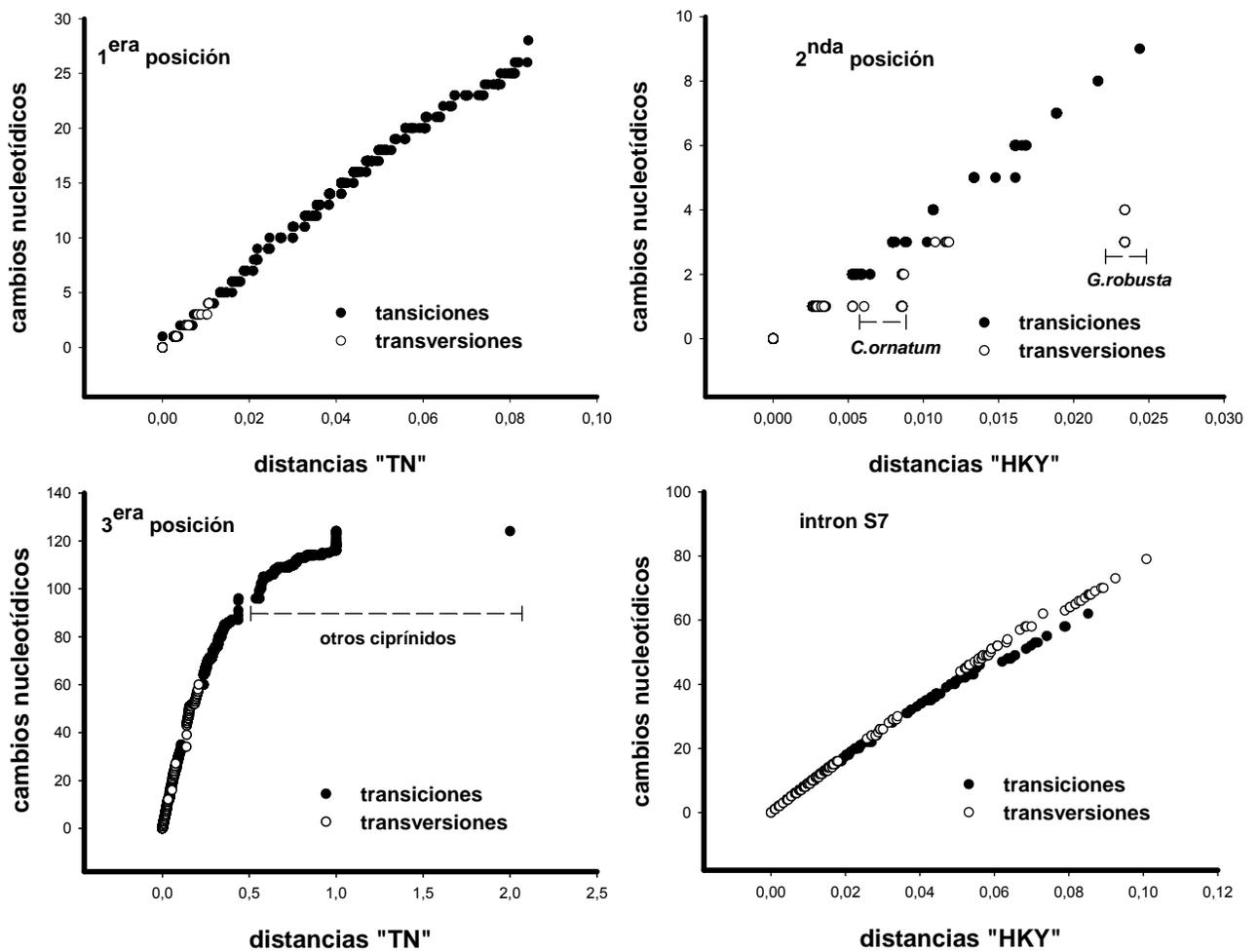


Figura 4. Curvas de saturación de cada una de las posiciones del citromo *b*, y del intron S7. "TN"= modelo de evolución Tamura-Nei; "HKY"= modelo de evolución Hasegawa-Kishino-Yano 85.

Las divergencias genéticas con *cit-b* fueron mayores que las observadas con el S7 (tabla 3). La máxima divergencia genética entre todos los taxa fue de 0.20 con *cit-b* y 0.16 con S7, registrándose entre especies del grupo externo, mientras que las mínimas con ambos genes fueron observadas entre individuos de la misma población.

Tabla. 3 Distancias genéticas promedio entre los principales grupos

	citocromo <i>b</i>			intrón S7		
	absolutas	<i>p</i>	T-N	absolutas	<i>p</i>	T-N
<i>A. aphanea</i>						
<u>Poblaciones</u>						
Arm–Ayu x Coa–Tam	2.000±0.808	0.002±0.001	0.002±0.001	4.000±1.412	0.004±0.002	0.004±0.002
<u>Especies</u>						
<i>A. aphanea</i> x <i>A. avia</i> =	93.333±8.302	0.090±0.008	0.092±0.012	24.333±4.683	0.027±0.005	0.028±0.005
<i>A. aphanea</i> x <i>A. barbata</i> =	84.667±8.299	0.082±0.008	0.098±0.012	24.667±0.005	0.026±0.005	0.027±0.005
<i>A. aphanea</i> x <i>A. lacustris</i> =	87.667±8.310	0.084±0.008	0.101±0.012	25.667±4.712	0.028±0.005	0.028±0.006
<i>A. aphanea</i> x <i>A. monticola</i> =	83.667±8.497	0.081±0.008	0.099±0.011	32.667±5.646	0.036±0.006	0.037±0.006
<i>A. aphanea</i> x <i>A. tincella</i> ¹ =	87.417±8.187	0.084±0.008	0.101±0.012	29.583±4.748	0.034±0.005	0.034±0.006
<i>A. aphanea</i> x <i>A. tincella</i> ² =	85.667±8.845	0.083±0.009	0.092±0.011	26.667±4.633	0.030±0.005	0.031±0.006
<i>A. avia</i>						
<u>Poblaciones</u>						
Santiago bajo x Compostela	12.444±3.133	0.011±0.003	0.011±0.003	2.500±1.457	0.003±0.002	0.003±0.002
<u>Especies</u>						
<i>A. avia</i> x <i>A. barbata</i> =	89.000±8.619	0.086±0.008	0.094±0.012	11.667±3.485	0.012±0.004	0.013±0.004
<i>A. avia</i> x <i>A. lacustris</i> =	92.333±8.630	0.089±0.008	0.089±0.011	12.667±3.295	0.014±0.004	0.014±0.004
<i>A. avia</i> x <i>A. monticola</i> =	80.667±8.265	0.078±0.008	0.078±0.009	22.667±4.421	0.025±0.005	0.026±0.005
<i>A. avia</i> x <i>A. tincella</i> ¹ =	87.833±8.284	0.085±0.008	0.086±0.011	15.917±3.377	0.019±0.004	0.019±0.004
<i>A. avia</i> x <i>A. tincella</i> ² =	91.333±8.821	0.088±0.008	0.092±0.011	13.667±3.422	0.016±0.004	0.016±0.004

p= distancias no corregidas; T-N= distancias de Tamura-Nei.

Arm–Ayu= Armería–Ayuquila; Coa–Tam= Coahuayana–Tamazula.

Continuación de **Tabla. 3**

	citocromo <i>b</i>			intrón S7		
	absolutas	<i>p</i>	T-N	absolutas	<i>p</i>	T-N
<i>A. barbata</i>						
<i>A. barbata</i> x <i>A. lacustris</i> =	37.000±5.227	0.036±0.006	0.030±0.006	11.000±3.384	0.012±0.004	0.012±0.004
<i>A. barbata</i> x <i>A. monticola</i> =	92.000±9.326	0.089±0.009	0.091±0.011	19.000±4.236	0.020±0.005	0.020±0.005
<i>A. barbata</i> x <i>A. tincella</i> =	34.750±5.227	0.033±0.005	0.033±0.006	16.000±3.563	0.018±0.004	0.018±0.004
<i>A. barbata</i> x " <i>A. tincella</i> "=	30.000±5.369	0.030±0.005	0.028±0.006	13.000±3.431	0.014±0.004	0.014±0.004
<i>A. lacustris</i>						
<u>Poblaciones</u>						
Patzcuaro x San Gregorio	5.167±1.470	0.006±0.002	0.006±0.002	—	—	—
<u>Especies</u>						
<i>A. lacustris</i> x <i>A. monticola</i> =	88.000±8.819	0.085±0.009	0.081±0.010	24.000±4.754	0.027±0.005	0.027±0.006
<i>A. lacustris</i> x <i>A. tincella</i> =	20.750±3.670	0.020±0.004	0.017±0.004	8.250±2.249	0.008±0.002	0.008±0.002
<i>A. lacustris</i> x " <i>A. tincella</i> "=	39.000±5.669	0.038±0.006	0.028±0.006	5.500±1.865	0.005±0.002	0.005±0.002
<i>A. monticola</i>						
<u>Especies</u>						
<i>A. monticola</i> x <i>A. tincella</i> =	85.250±8.447	0.082±0.008	0.076±0.010	28.250±4.945	0.032±0.005	0.033±0.006
<i>A. monticola</i> x " <i>A. tincella</i> "=	93.000±9.352	0.090±0.009	0.085±0.010	26.000±4.900	0.029±0.005	0.030±0.006

p= distancias no corregidas; T-N= distancias de Tamura-Nei.

Continuación de **Tabla. 3**

	citocromo <i>b</i>			intrón S7		
	absolutas	<i>p</i>	T-N	absolutas	<i>p</i>	T-N
<i>A. tincella</i>						
<u>Poblaciones</u>						
Balsas x Lerma medio	19.000±4.261	0.018±0.004	0.019±0.004	—	—	—
Balsas x Zacapu	19.000±4.109	0.018±0.004	0.019±0.004	—	—	—
Balsas x Lerma bajo	17.000±4.114	0.016±0.004	0.017±0.004	—	—	—
Balsas x Verde-Santiago	15.857±3.559	0.015±0.004	0.016±0.004	4.000±1.716	0.005±0.002	0.005±0.002
Lerma medio x Zacapu	15.000±3.732	0.014±0.004	0.015±0.004	—	—	—
Pánuco x Balsas	14.667±3.619	0.014±0.004	0.014±0.004	10.000±2.919	0.011±0.003	0.012±0.003
Cuitzeo x Balsas	14.600±3.655	0.014±0.004	0.014±0.004	7.000±2.489	0.008±0.003	0.008±0.003
Lerma bajo x Zacapu	12.000±3.334	0.012±0.003	0.012±0.003	—	—	—
Cuitzeo x Lerma medio	11.600±3.143	0.011±0.003	0.011±0.003	—	—	—
Verde-Santiago x Zacapu	11.286±2.805	0.011±0.003	0.011±0.003	—	—	—
Verde-Santiago x Lerma medi	11.143±2.893	0.011±0.003	0.011±0.003	—	—	—
Lerma medio x Lerma bajo	11.000±3.343	0.011±0.003	0.011±0.003	—	—	—
Lerma medio x Pánuco	10.667±3.106	0.010±0.003	0.010±0.003	—	—	—
Zacapu x Cuitzeo	10.600±3.014	0.010±0.003	0.010±0.003	—	—	—
<u>Especies</u>						
<i>A. tincella</i> x " <i>A. tincella</i> "=	35.250±5.093	0.034±0.005	0.028±0.005	8.250±1.910	0.009±0.002	0.009±0.002

p= distancias no corregidas; T-N= distancias de Tamura-Nei.

Continuación de **Tabla. 3**

	citocromo <i>b</i>			intrón S7		
	absolutas	<i>p</i>	T-N	absolutas	<i>p</i>	T-N
Linajes principales						
<i>aphanea</i> x <i>tinc-lacus-barb</i> =	70.813±7.081	0.093±0.010	0.102±0.011	25.250±4.158	0.031±0.005	0.032±0.005
<i>aphanea</i> x <i>monti-avia</i> =	66.800±6.475	0.087±0.009	0.097±0.010	21.917±3.718	0.027±0.005	0.027±0.005
<i>monti-avia</i> x <i>tinc-lacus-barb</i> =	65.056±6.149	0.085±0.008	0.093±0.010	14.719±2.665	0.018±0.003	0.018±0.003
<i>Agosia</i> x <i>monticola-avia</i> =	109.600±7.933	0.143±0.011	0.166±0.014	38.500±8.028	0.047±0.010	0.049±0.011
<i>Agosia</i> x <i>tinc-lacust-barba</i> =	104.594±8.456	0.137±0.011	0.157±0.015	40.625±8.169	0.050±0.010	0.051±0.011
<i>Agosia</i> x <i>aphanea</i> =	102.333±8.555	0.134±0.012	0.153±0.015	48.667±8.860	0.059±0.011	0.062±0.012
Grupo externo						
<i>Algansea</i> x <i>Agosia</i> =	105.354±7.864	0.138±0.010	0.159±0.014	41.667±5.788	0.051±0.007	0.053±0.007
<i>Algansea</i> x <i>Dionda</i> =	122.333±8.534	0.160±0.011	0.186±0.015	79.467±7.984	0.097±0.010	0.104±0.011
<i>Algansea</i> x <i>Campostoma</i> =	137.771±9.326	0.180±0.012	0.211±0.017	79.333±8.075	0.097±0.010	0.104±0.011
<i>Algansea</i> x <i>Gila</i> =	123.604±8.407	0.162±0.011	0.187±0.015	111.067±9.255	0.135±0.011	0.151±0.014

p= distancias no corregidas; T-N= distancias de Tamura-Nei.

tinc-lacus-barb= *tincella-lacustris-barbata*.

monti-avia= *monticola-avia*.

5.2. Análisis filogenéticos

5.2.1. Citocromo *b*

5.2.1.1. Máxima Parsimonia

El **MP** generó un solo árbol con una longitud (L) de 872 pasos, un índice de consistencia (IC) de 0.63 y un índice de retención (IR) de 0.83. En la topología obtenida (fig. 5), la monofilia del género *Algansea* fue apoyada por un alto valor de bootstrap (Bt= 97%). El género se dividió en dos clados principales, el primero estuvo integrado por las poblaciones de *A. aphaea* incluidas en el análisis, apoyándose (Bt= 100%) aunque sin resolución la monofilia de esta especie. El segundo clado con bajo valor de bootstrap (Bt= 65%), está conformado por el resto de las especies, que a su vez se subdivide en dos clados compuestos. Uno de estos muestra la relación con un moderado valor de bootstrap (Bt= 80%), entre *A. avia* y *A. monticola*, mientras que el otro, bien apoyado (Bt= 100%), está integrado por las especies *A. barbata*, *A. lacustris* y *A. tincella*.

Dentro del clado *A. avia*–*A. monticola*, ambas especies formaron grupos monofiléticos con alto valor de bootstrap (Bt= 100%). Dentro de cada uno de estos grupos, se mantuvo una estructura con altos valores de bootstrap, misma que refleja las diferentes poblaciones de ambas especies incluidas en el análisis. Por su parte, en el clado integrado por las especies *A. barbata*, *A. lacustris* y *A. tincella*, esta última especie resultó ser un grupo parafilético, a causa de la población del Río Ameca (“*A. tincella*”). Esta población presentó una relación más cercana, relativamente poco apoyada con *A. barbata* (Bt= 83%). El resto de las poblaciones de *A. tincella* forman un clado con bajo valor de bootstrap, donde las poblaciones de Cuitzeo y del Balsas son altamente apoyadas (Bt= 86% y 100% respectivamente) como grupos monofiléticos. Las dos poblaciones incluidas de *A. lacustris*, formaron un grupo monofilético bien apoyado (Bt= 94%), que a su vez es grupo hermano de *A. tincella*, relación que es bien apoyada por altos valores de bootstrap (Bt= 90%).

Respecto a las relaciones con los otros ciprínidos incluidos, *A. chrysogaster* resultó ser el género hermano de *Algansea*; mientras que *D. melanops* y *C. ornatun* formaron un clado poco apoyado (Bt= 62%). *G. robusta* se ubicó como el ciprínido más alejado del género *Algansea*.

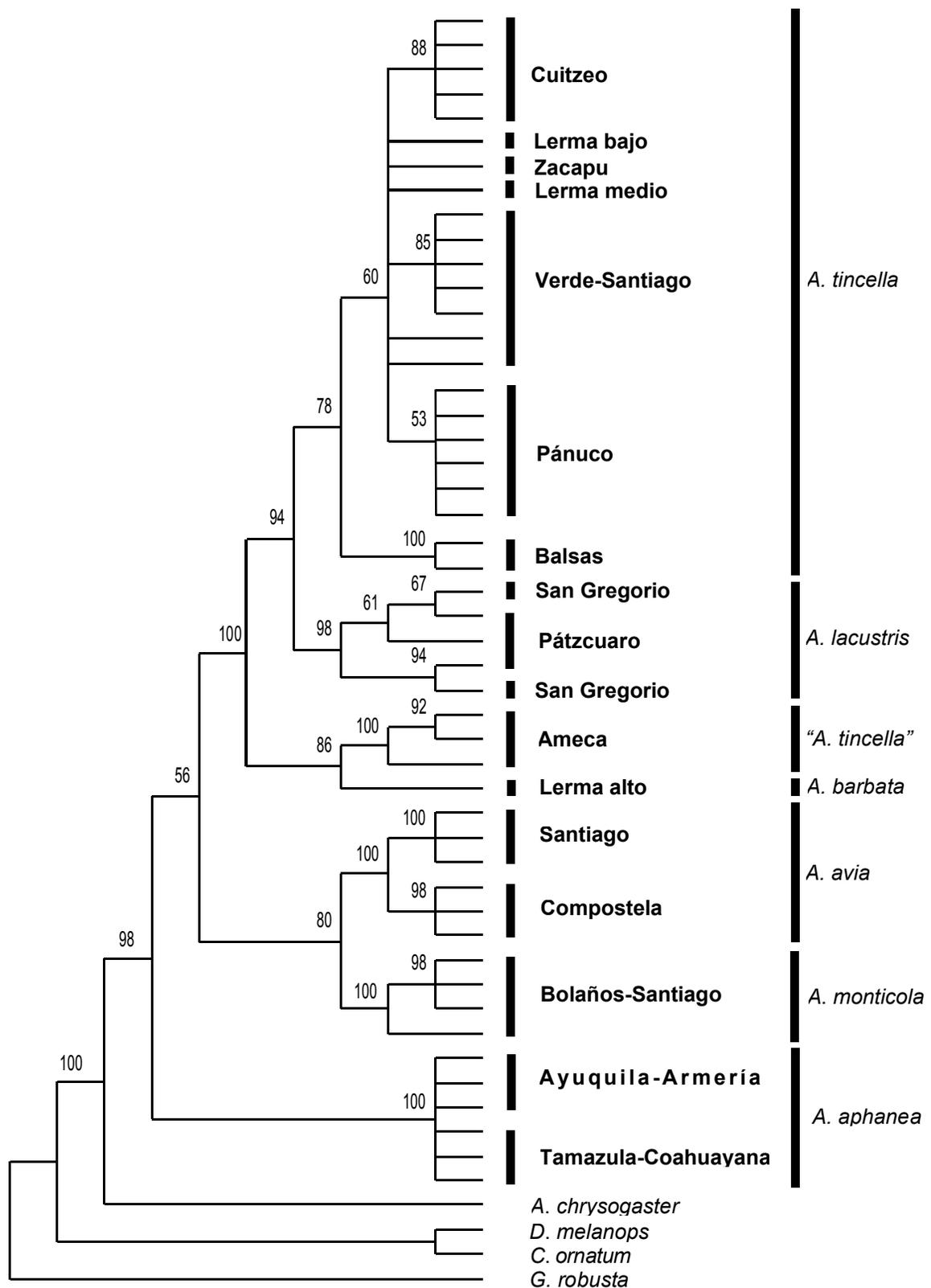


Figura 5. Hipótesis filogenética del género *Algansea* basada en el gen mitocondrial citocromo *b*, obtenida mediante Máxima Parsimonia.

5.2.1.2. Inferencia Bayesiana

En virtud de la variación en la tasa evolutiva existente entre cada una de las posiciones del codón, y en el tipo de sustitución de nucleótidos registradas para el *cit-b* (Lydeard y Roe, 1997), cada una de las tres posiciones del codón presentó un modelo de evolución diferente. El más complejo correspondió a la tercera posición, que evidentemente influyó de manera contundente en el modelo obtenido para el *cit-b* con todas las posiciones (tabla 2).

Se obtuvieron 10,000 árboles. Se proyectaron los valores de likelihood *versus* el número de generaciones, y la estabilidad de dichos valores fue alcanzada antes de la generación 200,000 (asíntota de la gráfica no mostrada), por consiguiente en el calentamiento de las cadenas (burn-in), proceso que consistió en la eliminación de los árboles cuyos valores de log-likelihood aun presentaban considerable variación conforme al incremento de generaciones, fue a partir de la generación 200,000 con un valor log-likelihood de -5761.443. De esta manera con los 8,000 árboles restantes, se llevó a cabo un consenso de mayoría del 50%.

El árbol consenso (Fig. 6), resultó en gran medida congruente con el generado con **MP**. La monofilia del género fue altamente apoyada (Pr=100%); el clado *A. tincella*–*A. lacustris*–“*A. tincella*”–*A. barbata*, se mantuvo casi idéntico, tanto en las relaciones establecidas como en los valores de apoyo de las mismas. Por la posición en el cladograma de la población del Río Ameca, la especie *A. tincella* resultó un grupo parafilético. El ciprínido más cercano al género *Algansea* fue *A. chrysogaster*, relación que fue altamente apoyada (Pr=100%); *D. melanops* y *C. ornatum* formaron un clado que se colapso en una politomía en la raíz del árbol junto con *G. robusta*.

Las diferencias con respecto a la hipótesis de **MP** radicarón en la base del cladograma; el clado *A. avia*–*A. monticola* que está bien apoyado (Pr=100%), resultó ser grupo hermano de *A. apahanea*, sin embargo, con base en el criterio adoptado (Pedersen *et al.*, 2007) el Pr= 84% que presentó dicha relación se consideró bajo. Cabe señalar que las diferencias entre ambas hipótesis están asociadas con bajos valores de bootstrap en **MP** y de probabilidades posteriores en el **BY**.

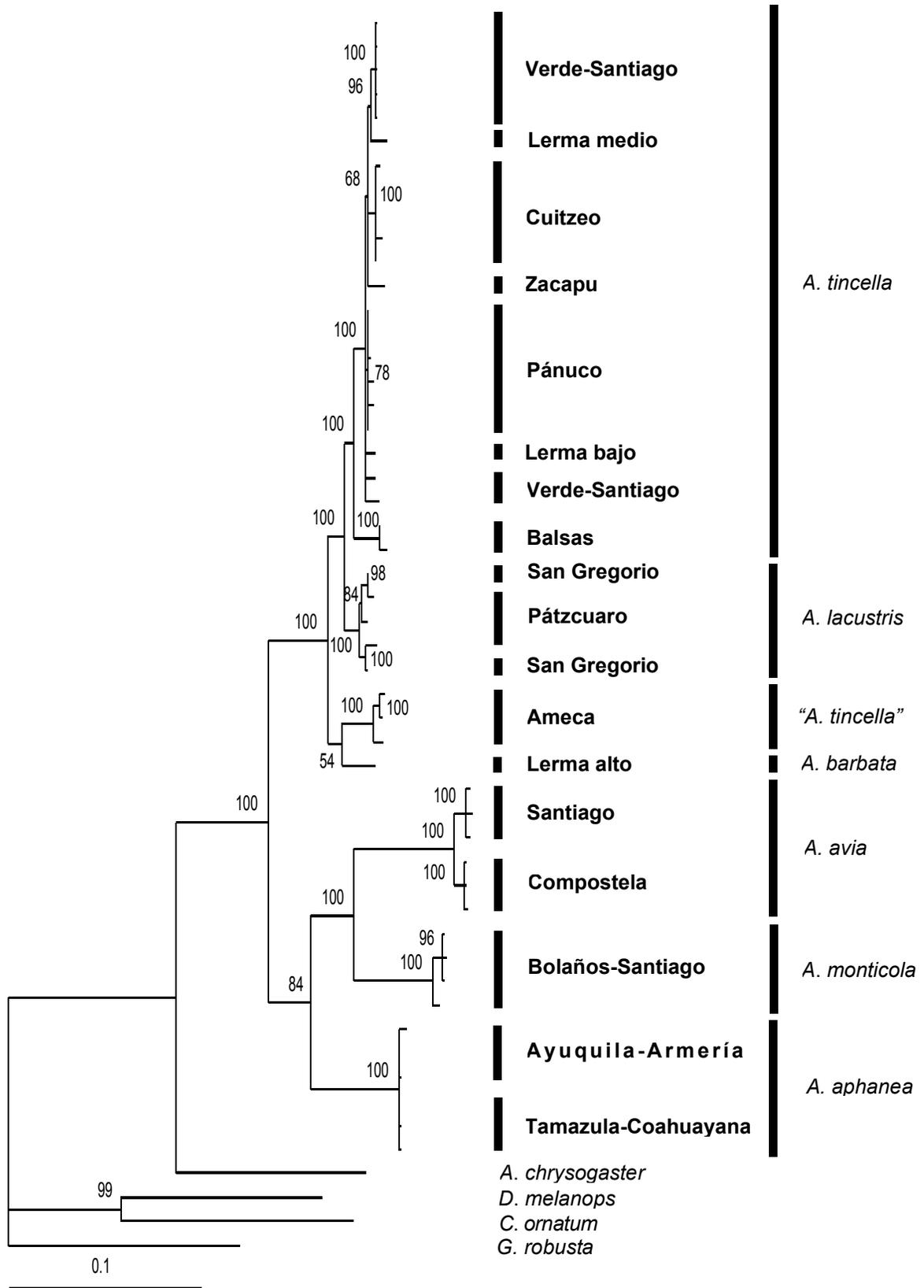


Figura 6. Hipótesis filogenética del género *Algansea* basada en el gen mitocondrial citocromo *b*, obtenida mediante inferencia bayesiana

5.2.2. Intron S7

5.2.2.1. Máxima Parsimonia

Con este método se obtuvo un sólo árbol con L= 343 pasos, IC= 0.907 e IR= 0.819 (fig. 7). Al igual que el *cit-b*, la monofilia del género fue altamente apoyada (Bt=100%), sin embargo, hubo poca resolución en las relaciones dentro del género, presentándose una politomía en la base. Se presentan cuatro grupos dentro de *Algansea*, alcanzando cada uno de ellos un valor alto de bootstrap con excepción del clado compuesto por *A. barbata* y *A. monticola*. *Algansea aphanea* y *A. avia* mantuvieron la monofilia bien apoyada (Bt= 100% y 97%, respectivamente).

A diferencia de ambas hipótesis con *cit-b*, se estableció una relación más cercana entre *A. monticola* y *A. barbata*, aunque con bajo apoyo (Bt=58%); *A. tincella*, *A. lacustris* y “*A. tincella*” formaron un clado bien apoyado (97%), y nuevamente se presenta la parafilia de *A. tincella*, puesto que uno de los individuos correspondiente a la población del Río Ameca no queda anidado con el resto. Tal como resultó en las hipótesis con *cit-b*, el ciprínido más cercano al género fue *A. chrysogaster*, mientras que en esta ocasión la relación inmediata fue *C. ornatum* con alto valor de apoyo, seguido de *D. melanops*, y por último *G. robusta* como el ciprínido mas alejado.

5.2.2.2. Inferencia Bayesiana

Se obtuvieron 10,000 árboles, de los cuales aquellos que precedieron a la generación 25,000 (árbol 250) fueron descartados, y el resto (9750 árboles) fueron utilizados para realizar un consenso de mayoría del 50%.

La hipótesis **BY** con S7 (fig. 7) resultó prácticamente idéntica a la obtenida con **MP**, excepto que los ciprínidos *D. melanops* y *G. robusta* se colapsaron en la raíz del árbol.

El género resultó un grupo monofilético, absolutamente apoyado (Pr=100%); al interior del género se mantuvieron los mismos clados que en el **MP** con una politomía, alcanzando altos valores de apoyo en las probabilidades posteriores; *A. chrysogaster* fue el grupo hermano de *Algansea*.

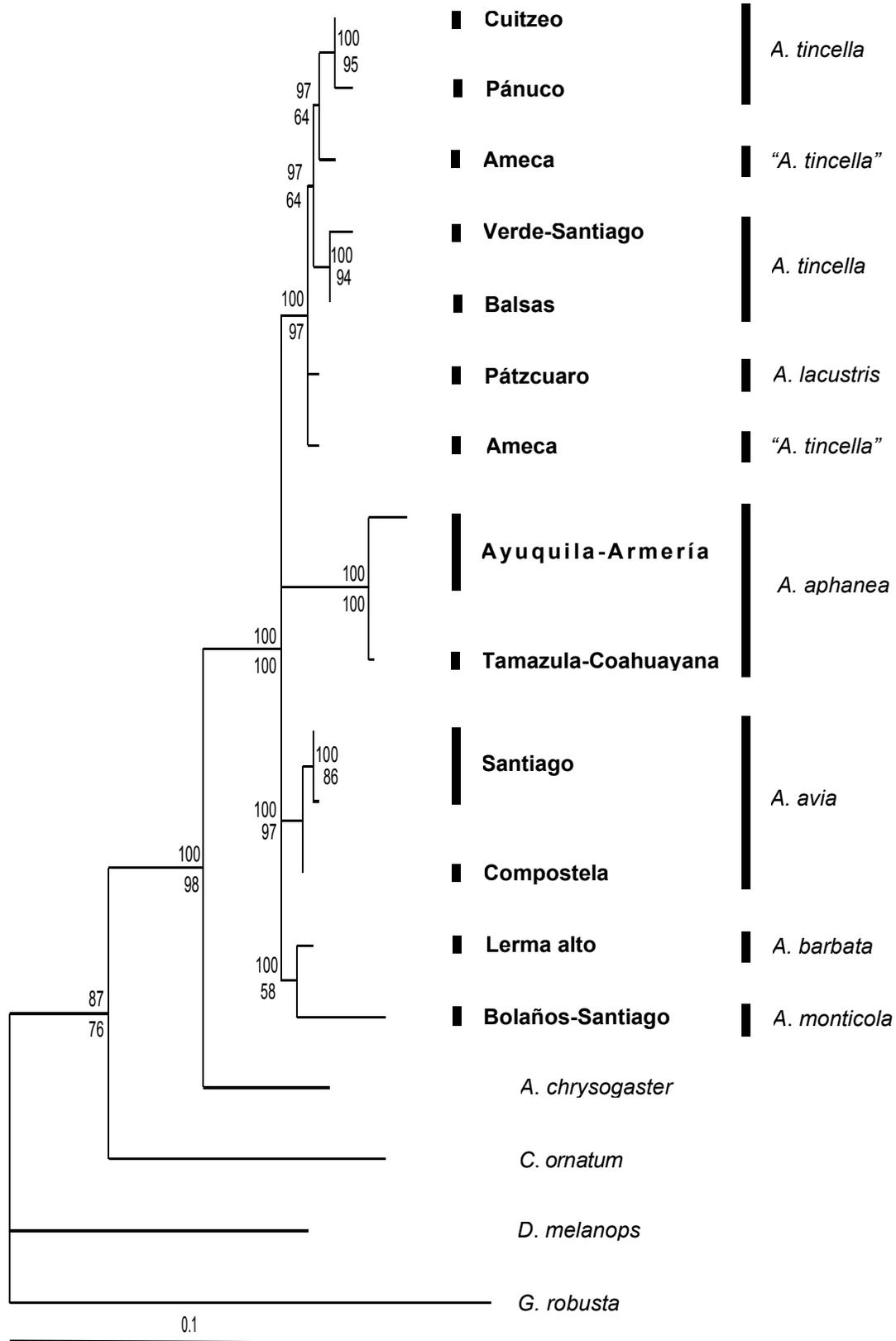


Figura 7. Hipótesis filogenética del género *Algansea* basada en el primer intrón s7, obtenida mediante inferencia bayesiana y Máxima Parsimonia. Los valores de la parte superior de los nodos corresponden a las probabilidades posteriores; los de la parte inferior a los valores de bootstrap.

5.2.3. Consenso de *cit-b* y S7

Debido a que las topologías obtenidas con los distintos métodos de inferencia filogenética presentaron inconsistencias, sobre todo en aquellas basadas en *cit-b*, se obtuvo tanto el consenso de las hipótesis **MP** del *cit-b* y S7, como el consenso de las hipótesis **BY** de ambos marcadores. Cabe señalar que las topologías obtenidas con *cit-b* mediante los dos métodos de análisis utilizados, se basaron en una matriz reducida en el número de taxa, puesto que se emplearon los mismos individuos incluidos en los análisis con el intrón S7 (ver tabla 1).

El consenso estricto de las dos hipótesis **MP** generó una topología donde el género *Algansea* resultó monofilético, así también los clados integrados por las poblaciones de *A. aphanea* y *A. avia*; sin embargo, el resto de las especies se colapsaron en una politomía basal (fig. 8A).

Por su parte, el consenso estricto de las hipótesis **BY** generado a partir de todos los árboles restantes después del calentamiento de las cadenas (8,000 con *cit-b* y 9,750 con S7) en los análisis bayesianos, generó una topología totalmente colapsada en una politomía (no mostrada). Es importante señalar que previo al consenso, la hipótesis **BY** con *cit-b* con la matriz reducida, no soportó la monofilia del género debido a la inclusión de *A. chrysogaster* dentro de *Algansea* (topología no mostrada). Además se establecieron relaciones inconsistentes con la hipótesis de **BY** con *cit-b* donde se empleó la matriz completa. Evidentemente estas inconsistencias ocurrieron por efecto del submuestreo en la matriz incompleta de *cit-b*.

5.2.4. Análisis combinado

5.2.4.1. Homogeneidad de particiones

La prueba de homogeneidad de particiones (ILD) con un intervalo de confianza de 0.05, determinó que el *cit-b* y el intrón S7 son significativamente incongruentes ($P=0.0200$), sin embargo, con base en que el incremento en el número de caracteres aumenta la probabilidad de que la señal filogenética supere al ruido filogenético (Queiroz *et al.*, 1995), se combinaron las matrices del *cit-b* y S7 y se llevaron a cabo un **MP** y un **BY**.

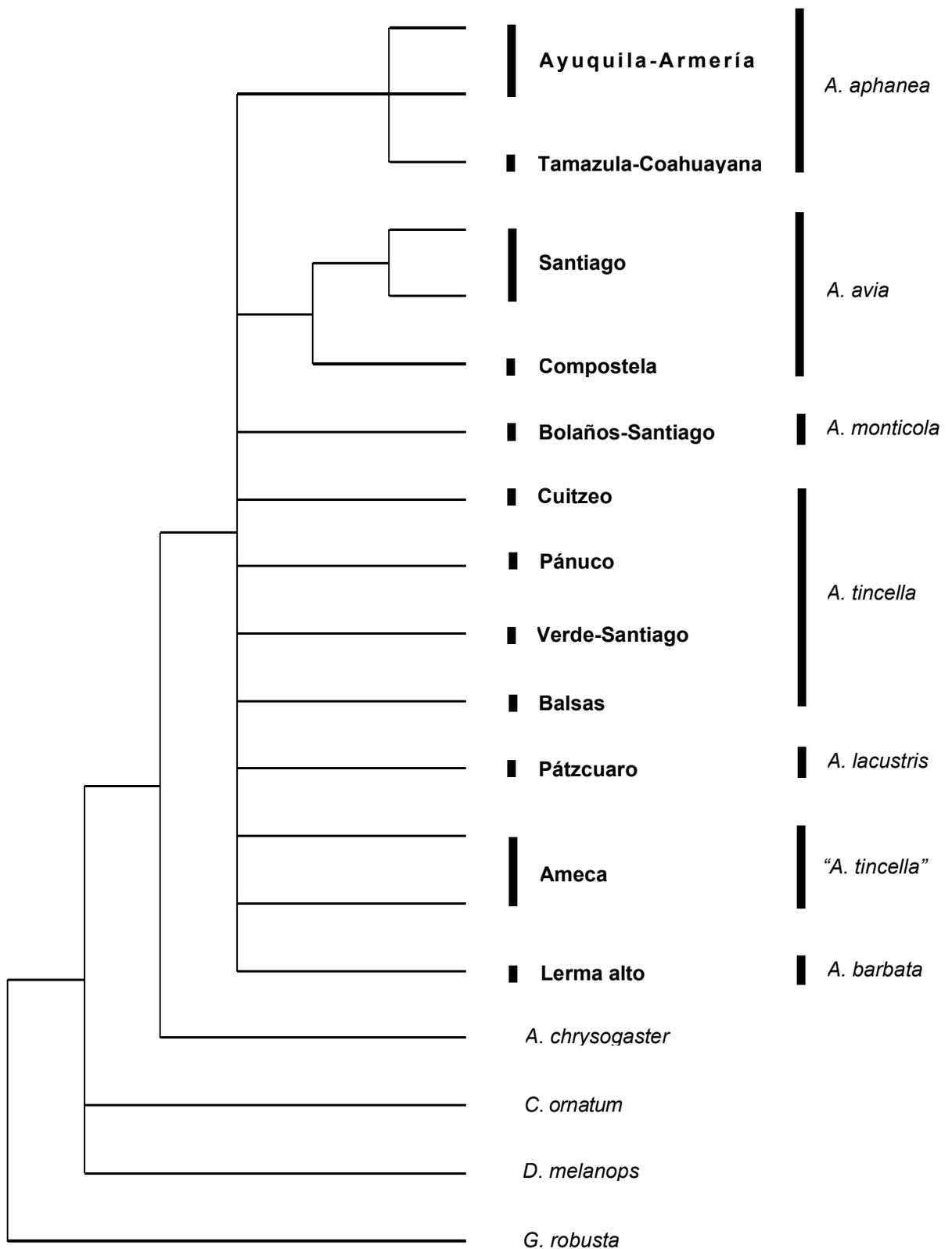


Figura 8. Consenso estricto de las hipótesis filogenéticas del género *Algansea* obtenidas con citocromo *b* y el intrón *s7* mediante Máxima Parsimonia.

5.2.4.2 *Máxima Parsimonia*

Con la matriz combinada (cit-*b* + S7) se obtuvieron 2105 pb, de los cuales sólo el 16% (345pb) de los sitios fueron informativos. Se obtuvo un solo árbol con L= 1183 pasos, IC= 0.693, e IR= 0.666.

La topología obtenida (fig. 9) es altamente consistente con la hipótesis **MP** con cit-*b* (fig. 5). Además de los clados principales y los correspondientes a las especies, se establecieron las mismas relaciones, excepto que en esta ocasión *A. barbata* resultó ser especie hermana del clado *A. tincella*–*A. lacustris*–“*A. tincella*”. El clado *A. tincella*–*A. lacustris*–“*A. tincella*”–*A. barbata*, se recuperó como monofilético con alto valor de bootstrap (Bt= 100%). Al igual que el MP mitocondrial el clado *A. avia*–*A. monticola*, presentó un moderado apoyo (Bt= 73%), y al interior de este se mantuvieron bien apoyadas la monofilia de *A. avia* y una de sus poblaciones; a su vez dicho clado quedó como grupo hermano del clado *A. tincella*–*A. lacustris*–“*A. tincella*”–*A. barbata* con bajos valores de bootstrap (Bt= 55%). El otro clado principal, conformado por las poblaciones de *A. aphanea*, también resultó monofilético, y fue grupo hermano del resto de las especies de *Algansea*. Al igual que los análisis por separado **MP** mitocondrial, en el análisis combinado, *A. chrysogaster* resultó ser el grupo hermano del género *Algansea*, con un alto valor de bootstrap (Bt= 100%).

5.2.4.3 *Inferencia Bayesiana*

De los 10,000 árboles obtenidos, se descartaron los que precedieron a la generación 10,000 (árbol 100), utilizando los 9,900 árboles restantes para hacer el consenso de mayoría del 50%. La topología obtenida (fig. 10) mantuvo el clado *A. tincella*–*A. lacustris*–“*A. tincella*”–*A. barbata* con las mismas relaciones encontradas en el MP combinado, aunque con diferencias en los valores de apoyo de algunos clados (fig. 9). Todos los valores de probabilidades posteriores dentro de este clado, presentaron un absoluto apoyo (Pr= 100%). El otro clado incluye a *A. aphanea* como el grupo hermano de *A. monticola*+*A. avia*. De igual manera, el ciprínido *A. chrysogaster* es el grupo hermano de *Algansea*, relación apoyada por un alto valor de probabilidades posteriores (Pr= 100%). En términos generales, esta topología es consistente con la obtenida utilizando BY con cit-*b*.(fig. 6).

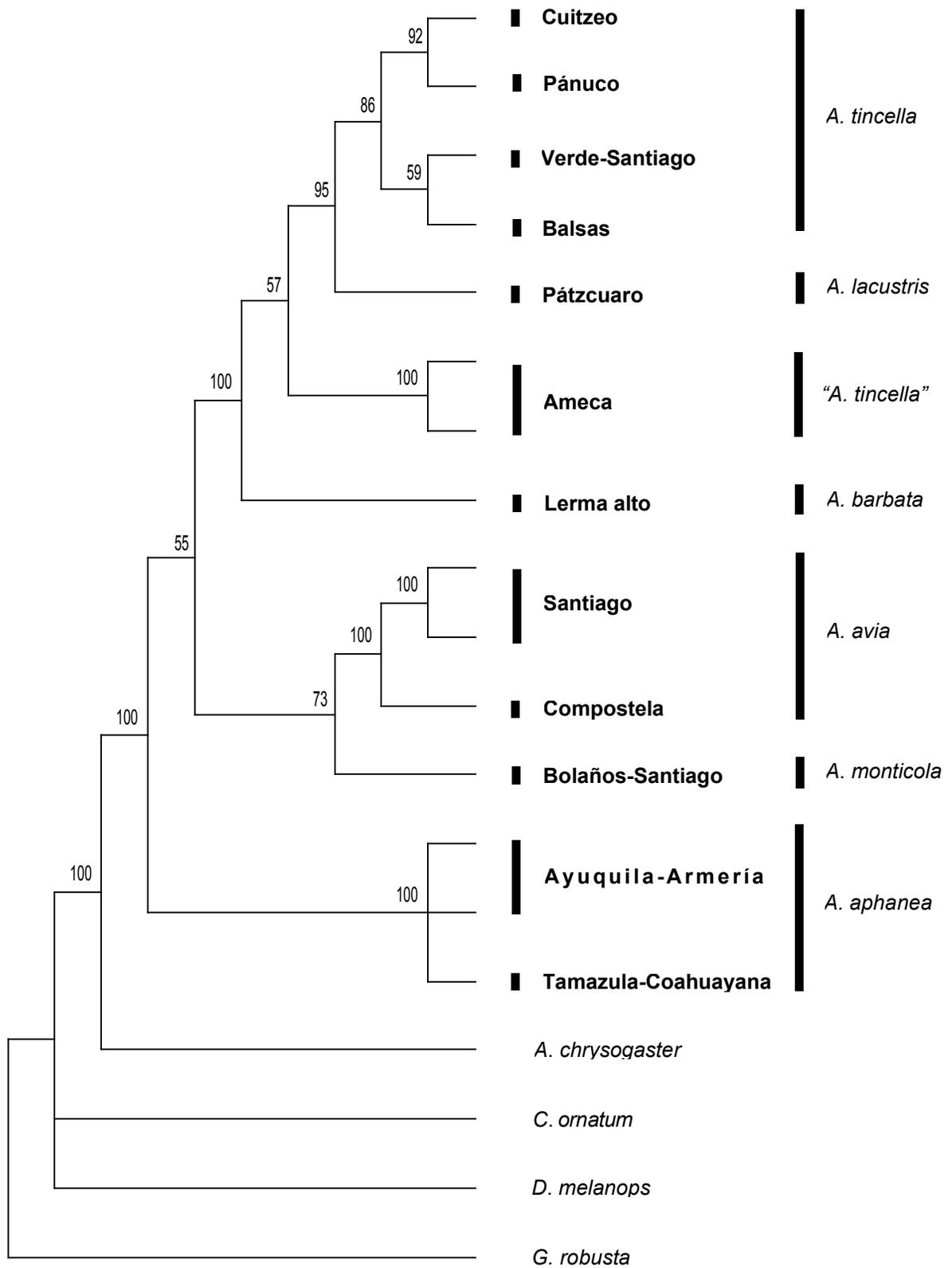


Figura 9. Hipótesis filogenética del género *Algansea* basada en el análisis combinado cit-*b* + s7, obtenida mediante Máxima Parsimonia

5.3. Reloj molecular

Los resultados del “Relative Rate Test” mostraron dificultades para el cálculo de las transiciones sinónimas, a causa de la saturación en las transiciones, como las ocurridas en la tercera posición del *cit-b* (fig. 4). Para este caso, Robinson-Rechavi y Huchon (2000) sugieren utilizar las transversiones sinónimas, partiendo de la premisa de que la tasa de transversiones no depende de la frecuencia de bases (Galtier y Gouy, 1995). Los valores de probabilidad de las transversiones sinónimas (B4), y las sustituciones no sinónimas (Ka) no mostraron diferencias significativas entre los diferentes linajes del género *Algansea*, por lo que las tasas de sustitución no fueron heterogéneas (tabla 4). Una vez cumplida la hipótesis del reloj molecular, las divergencias genéticas fueron convertidas directamente a tiempo absoluto (Doadrio y Perdices, 2005).

La escala obtenida por el programa Tree-Puzzle del 10% por linaje por millón de años (M.a.) fue calibrada empleando la tasa de evolución del 1%, establecida para los phoxinini norteamericanos (Cyprinidae) con *cit-b* por Dowling *et al.*, (2002). De acuerdo con el modelo de evolución del *cit-b*, se emplearon las distancias Tamura-Nei en el cálculo del reloj molecular.

Tabla 4. Resultados del análisis “Relative Rate Test”

	aphanea	avia	barbata	lacustris	monticola	Tincella	ameca
aphanea	–	0.444 n.s.	0.480 n.s.	0.228 n.s.	0.117 n.s.	0.309 n.s.	0.259 n.s.
avia	0.848 n.s.	–	0.986 n.s.	0.180 n.s.	0.325 n.s.	0.465 n.s.	0.302 n.s.
barbata	0.876 n.s.	0.988 n.s.	–	0.402 n.s.	0.405 n.s.	0.644 n.s.	0.494 n.s.
lacustris	0.527 n.s.	0.591 n.s.	0.280 n.s.	–	0.742 n.s.	0.138 n.s.	0.729 n.s.
monticola	0.712 n.s.	0.545 n.s.	0.605 n.s.	0.342 n.s.	–	0.729 n.s.	0.658 n.s.
tincella	0.612 n.s.	0.692 n.s.	0.413 n.s.	0.158 n.s.	0.408 n.s.	–	0.500 n.s.
ameca	0.542 n.s.	0.611 n.s.	0.359 n.s.	0.988 n.s.	0.293 n.s.	0.675 n.s.	–

Las columnas inferiores corresponden a las probabilidades de B4 (transversiones sinónimas), y las columnas superiores a las probabilidades de Ka (sustituciones no sinónimas).

De acuerdo con la topología obtenida con el reloj molecular (fig. 11), el origen ancestro del género *Algansea* se remonta al menos al Mioceno medio, hace 15 M.a. aproximadamente. Posteriormente, en el Mioceno superior ocurrió la diversificación de los tres principales clados: *A. tincella*–*A. lacustris*–*A. barbata*, *A. monticola*–*A. avia*, y *A. aphanea*. La politomía basal dentro del género, indica que el origen de estos tres linajes ocurrió en el mismo tiempo. El segundo evento de especiación, que consistió en el origen

de las especies *A. monticola* y *A. avia*, data de hace 7 M.a. aproximadamente. A finales del Plioceno ocurrió el origen a las especies *A. tincella* y *A. lacustris*.

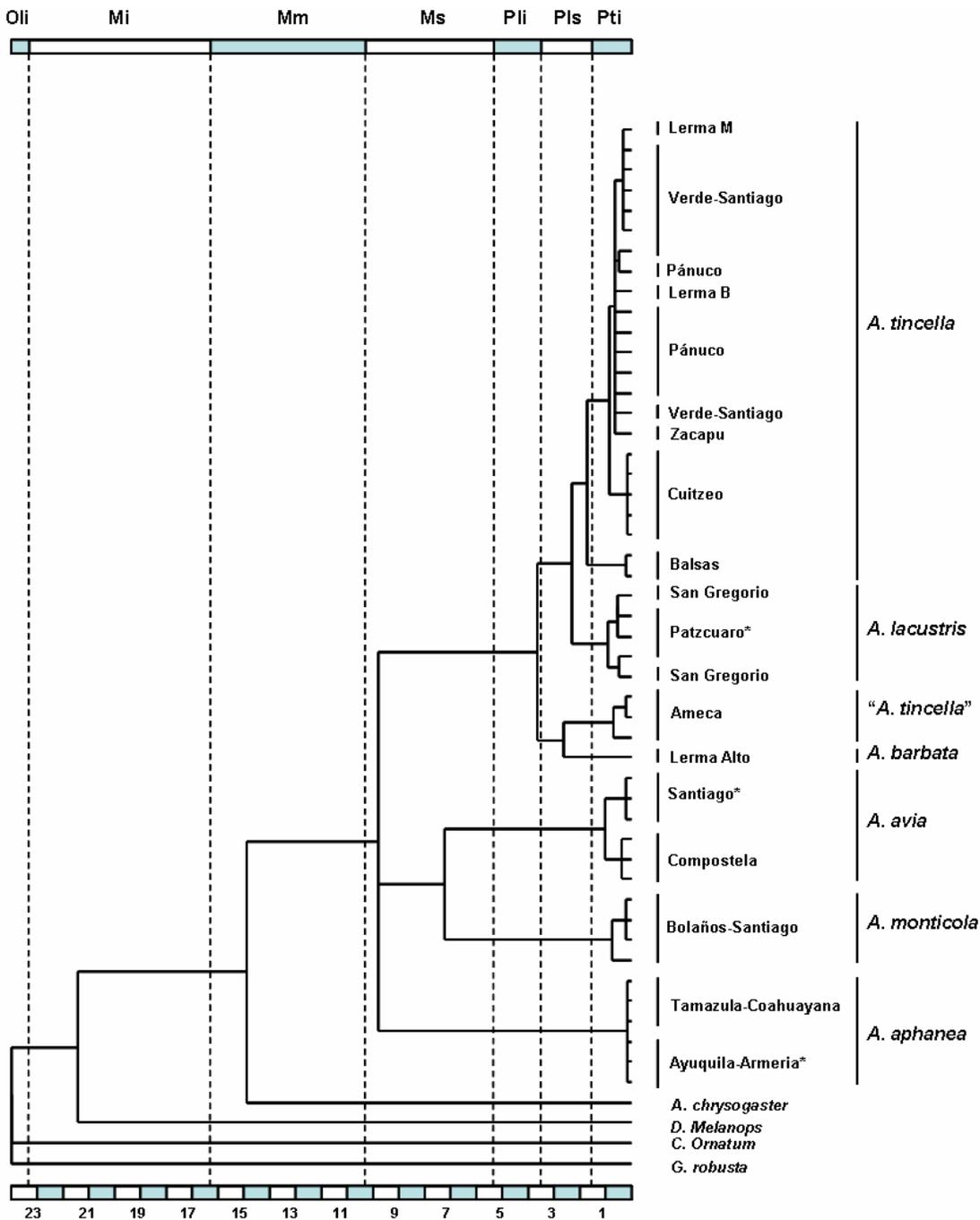


Figura 11. Árbol de reloj molecular. La escala superior muestra los periodos geológicos y la escala inferior, muestra la duración de cada periodo. Oli= Oligoceno; Mi= Mioceno inferior; Mm= Mioceno medio; Ms= Mioceno superior; Pli= Plioceno inferior; Pls= Plioceno superior; Pti= Pleistoceno.

6 Discusión

En este trabajo se recuperaron seis hipótesis filogenéticas, en general congruentes, pero que mostraron algunas diferencias como resultado del uso de dos marcadores moleculares, analizados de manera independiente y combinada, además de haber utilizado dos métodos de análisis filogenéticos, máxima parsimonia e inferencia bayesiana.

6.1. *Incongruencia entre métodos de análisis (MP y BY)*

Los análisis basados en el gen S7, tanto **MP** como **BY**, recuperaron sustancialmente una misma hipótesis (fig. 7 A-B). Por su parte, los datos de *cit-b* y la matriz combinada (*cit-b*+S7), tuvieron algunas diferencias entre las hipótesis generadas por ambos métodos, mismas que radicarón básicamente en la posición variable de el linaje *avia-monticola* y en la relación de algunos de los otros ciprínidos.

Las hipótesis de **MP** basadas en *cit-b* (fig. 6 A) y *cit-b*+S7 (fig. 8 A) que fueron considerablemente resueltas y consistentes entre sí, proponen un escenario donde *A. aphanea* es la especie o linaje basal y es grupo hermano del clado que contiene al resto de las especies. Este último, con un bajo valor de apoyo obtenido con ambos conjuntos de datos (Bt= 65% con *cit-b*, Bt= 57% con *cit-b*+S7), está compuesto por otros dos linajes principales, *monticola-avia*, y *tincella-lacustris-barbata*. Por el otro lado, las hipótesis **BY** con los mismos conjuntos de datos, relativamente resueltas y consistentes entre sí (fig. 6 B y 8 B), establecieron otro escenario diferente al **MP**, conformado también por dos grupos principales pero diferentes en su composición. El primero de estos, poco apoyado (Pr= 65% con *cit-b*, Pr= 84% con *cit-b*+S7), está compuesto por los linajes *aphanea* y *monticola-avia*, y el segundo con absoluto soporte (Bt= 100%, Pr= 100%) por el linaje *tincella-lacustris-barbata*.

Las inconsistencias entre los métodos pueden ser ocasionadas por diferentes causas, sin embargo, una de las más frecuentes, particularmente entre **MP** y alguno de los métodos paramétricos, es la atracción por ramas largas (Wilcox *et al.*, 2004). Las especies involucradas en este conflicto, *A. monticola* y *A. avia*, son junto con *A. aphanea*, las que presentan las mayores divergencias genéticas del género (tabla 3). Dadas estas condiciones,

es posible que particularmente el escenario **MP** este siendo influido por un efecto de atracción de ramas largas (Felsenstein, 1978), mismo que ha sido señalado como una de las principales desventajas de este método (Holder y Lewis, 2003). Probablemente lo anterior explica la asociación entre los linajes *tincella-lacustris-barbata* y *monticola-avia*.

Por otra parte, en el escenario **BY**, los internodos que sustentan la relación, *monticola-avia* con *aphanea*, obtenida mediante *cit-b* (fig. 6 B) y *cit-b+S7* (fig. 8 B), son muy cortos y presentan un apoyo muy bajo en términos de los valores de las probabilidades posteriores (Pr= 84%, Pr= 65%, respectivamente). Esto indica que, a pesar de la alta sensibilidad de **BY-Pr** para detectar señal filogenética y dar altos valores de apoyo cuando el número de caracteres es relativamente pequeño (Alfaro *et al.*, 2003), la relación *monticola-avia* con *aphanea* no está sustentada por un número de caracteres suficiente. Por consiguiente, ninguno de los escenarios proveen por si mismos, los elementos suficientes para resolver dicho conflicto.

6.2. *Incongruencias entre los marcadores moleculares (cit-b, S7 y cit-b+S7)*

De los tres conjuntos de datos distintos que se utilizaron en el presente trabajo, las hipótesis generadas con el S7 (fig. 7 A-B) presentaron las diferencias más conspicuas, a pesar de recuperarse la monofilia con un apoyo absoluto (Bt= 100%, Pr= 100%), las relaciones entre las especies de *Algansea* fueron inciertas. Por otro lado, las topologías obtenidas al usar *cit-b* (fig. 6 A-B) y la combinación de *cit-b+S7* (fig. 8 A-B), fueron similares. Dicha similitud, se atribuye a una considerable influencia de la señal filogenética del *cit-b*, que contribuyó con un mayor número de caracteres informativos sobre la matriz combinada *cit-b+S7* (tabla 2).

A pesar de que la tasa de divergencia molecular del gen mitocondrial fue considerablemente más alta que aquella del gen nuclear (tabla 3), como se había registrado por otros autores (Sullivan *et al.*, 2002; Bernardi *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2004), el intrón presentó un buen desempeño en los clados terminales, apoyando la monofilia de *A. aphaenea*, *A. avia*, y el linaje *tincella-lacustris*. Con base en estos grupos, se establece que la señal filogenética del primer intrón del S7 dentro del género *Algansea* presentó un intervalo de divergencia de entre el 0.3% y 0.9% de divergencia genética (tabla 3). Las relaciones establecidas fuera de este intervalo se consideran incorrectas, particularmente la

asociación *A. monticola*+*A. barbata*. Dicha relación presentó un bajo apoyo (Bt= 59%) en la hipótesis con **MP** (fig. 6 A), y un absoluto apoyo (Pr= 100%) en la hipótesis con **BY** (fig. 7 B), sin embargo, en esta última, el internodo corto indica que la relación está sustentada por pocos caracteres. Alfaro *et al.* (2003), mencionan que en esta particular situación, bajos valores de bootstrap y altos valores de probabilidades posteriores en internodos pequeños, la alta sensibilidad del análisis **BY** tiende a asignar altos valores de apoyo a internodos incorrectos, especialmente cuando el muestreo de caracteres no fue lo suficiente para recuperar las relaciones correctas. Algunas de las posibles causas que determinan esta relación pueden ser atribuidas a diferentes factores tales como: el sesgo en la composición de las bases, con un bajo contenido de CG en el S7 (tabla 2), al enraizamiento del árbol, o debido a la longitud de la rama de *A. monticola* (fig. 7 B), o bien, a un posible efecto de atracción por ramas largas documentado también en los métodos paramétricos (Sanderson y Shaffer, 2002).

Dentro del linaje *tincella-lacustris*, la no monofilia de la población del Río Ameca de *A. tincella*, se atribuye a los polimorfismos ancestrales, resultado de un sorteo de linajes incompleto (Moran y Konrfield, 1993). Por un lado, uno de los individuos de esta población está dentro del clado de *A. tincella*, agrupándose con un clado formado por las poblaciones correspondientes al lago de Cuitzeo y al Río Pánuco, y por el otro, el individuo restante queda fuera del clado *A. tincella*, haciéndolo parafilético.

La particular versatilidad del *cit-b*, dada por la presencia de una región conservada y otra variable, y desde luego por las diferentes tasas de sustitución en cada una de las posiciones del codón en el *cit-b* (Lydeard y Roe, 1997; Farías *et al.*, 2001), generaron las hipótesis basadas en *cit-b* y *cit-b*+S7 totalmente resueltas. El conflicto observado en estas hipótesis fue incorporado por los diferentes métodos de análisis empleados. No obstante, las relaciones dentro del linaje *tincella-lacustris-barbata* obtenidas mediante la matriz combinada, son más congruentes con los patrones biogeográficos sugeridos en el presente trabajo (ver implicaciones biogeográficas), con base en ello se considera que la matriz combinada tuvo el mejor desempeño en el establecimiento de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Algansea*.

6.3. Implicaciones biogeográficas

Los datos del presente trabajo indican que el origen del género *Algansea* es a partir de una población ancestral que amplió su intervalo de distribución en una trayectoria del noroeste de los Estados Unidos hacia el centro de México. Esto confirma lo establecido para otros componentes de la ictiofauna del centro de México, en particular los miembros de la familia Goodeidae, y los ciprínidos asociados con la cordillera oeste de México (Miller y Smith, 1986; Webb, 1998), como el complejo *Notropis calientis* (Chernoff y Miller, 1986), y el mismo género *Algansea*, cercanamente emparentado con el género *Agosia* (Schönhuth, 2002) (ver figura 3).

De acuerdo con los tiempos de divergencia estimados en el presente estudio, el evento cladogenético que da origen al linaje *Algansea* se remonta al Mioceno medio (Mm), hace aproximadamente 15 M.a. (fig. 9). Webb *et al.* (2004) estimaron que la separación entre las subfamilias Goodeinae y Empetrichthyinae data de hace 16.8 M.a., y que se dio justo con la aparición del desierto de Sonora; por otro lado, Doadrio y Domínguez (2004) fecharon el mismo evento cladogenético en 11.5 m.a., también dentro del Mm, asociado también a la formación del desierto de Sonora. Se considera que esta desertificación, junto con la actividad volcánica ocurrida en el Oligoceno (Oli) – Mioceno (M) en la Sierra Madre Occidental (Ferrari *et al.*, 1999), son los posibles eventos que dieron lugar a la separación de los linajes *Algansea* y su grupo hermano *Agosia*.

Siguiendo los tiempos de divergencia estimados y los patrones biogeográficos de los goodeidos (Domínguez *et al.*, 2006), se considera que una vez que el ancestro de *Algansea* colonizó el centro de México, experimentó el primer evento vicariante hace aproximadamente 10 M.a., mismo que consistió en el levantamiento de la Mesa Central, que ocasionó la formación de los sistemas hidrológicos de la vertiente del Pacífico, tales como, Ayuquila–Armeria y Coahuayana–Tamazula, Balsas, Purificación y Mascota, y Ameca, en algunos de estos se originó el linaje *aphanea*. Dicho evento coincide con la separación experimentada en dos grupos de peces del centro de México: 1) el evento cladogenético que dio origen a la tribu Ilyodontini, aislándola del resto de los goodeidos del centro (Doadrio y Domínguez, 2004; Domínguez *et al.*, 2006); y 2) la posible separación de los dos grupos de especies de *Notropis* bien definidos del centro de México, uno

correspondiente a la Mesa Central (*N. altus*, *N. sallei* y *N. calientis*) y otro a la cuenca del Río Balsas (*N. boucardi*, *N. imeldae* y *N. moralesi*) (Schönhuth, 2002; Schönhuth y Doadrio, 2003). De esta manera, el linaje *aphanea* quedó aislado en los sistemas hidrológicos de la vertiente del pacífico, ya fuera en la cuenca de los ríos Ayuquila–Armería, o bien el Coahuayana–Tamazula, donde actualmente se distribuyen.

Se sugiere que los mismos eventos tectónicos, como el levantamiento de la Mesa Central y el comienzo de la actividad volcánica en la parte noroeste del Cinturón Volcánico Transversal Mexicano en el Mioceno superior, así como el extenso sistema de fallas en la región (Ferrari et al., 1999 y 2000), pudieron ocasionar una separación entre los linajes restantes, *monticola–avia*, y *tincella–lacustris–barbata*, de manera casi simultánea con el aislamiento del linaje *aphanea*. Dicha separación consistió en el aislamiento del linaje *monticola–avia* dentro del sistema hidrológico del Río Grande de Santiago y por otro lado, el aislamiento del linaje *tincella–lacustris–barbata*, dentro del sistema hidrológico Lerma-Chapala. A pesar de que se ha mencionado la independencia de ambos sistemas hidrológicos hasta el Terciario tardío, cuando el Lerma-Chapala fue capturado por el Río Grande de Santiago, no se cuenta con evidencia contundente acerca del aislamiento y conexión entre ambos sistemas (Miller et al., 2005). Esta interpretación es consistente con el escenario **MP** obtenido con el cit-*b* (fig. 6 A) y la matriz combinada (fig 8 A). Sin embargo, también existe la posibilidad de que se hubiera llevado a cabo el escenario **BY**, aunque desafortunadamente tampoco se cuenta con la evidencia geológica que apoye dicho escenario.

Siguiendo los tiempos de divergencia estimados, el siguiente evento cladogenético se presentó dentro del linaje *monticola–avia*, con la separación de *A. monticola* y *A. avia*, ambas especies cohabitantes del sistema hidrológico del Río Grande de Santiago. De acuerdo con Barbour y Miller (1994), el evento vicariante que dió origen a estas dos especies fue causado por la formación de un cañón en el cauce principal del Río Grande de Santiago. Esta separación data aproximadamente de hace 7 m.a., en el Mioceno superior, período en el que se registró una intensa actividad tecto-volcánica en la región limítrofe de la Sierra Madre Occidental con el Cinturón Volcánico Transversal Mexicano, dentro de la cuál se ubica el Cañón del Río Grande de Santiago, considerablemente influenciado por dichos eventos (Ferrari et al., 2002). La presencia de *A. avia* en el Río Compostela es

atribuida a la captura de tributarios, evento frecuentemente registrado en las cuencas de la vertiente pacífica (Webb *et al.*, 2004).

Dentro del linaje *tincella-lacustris-barbata*, se presentó la mayor parte de los eventos cladogenéticos del género *Algansea*. De acuerdo con las hipótesis obtenidas en el presente estudio, a partir de dicho linaje derivaron tres de las especies del género y una población, *A. tincella* del río Ameca con suficiente estructura y diferencia genética para ser considerada una entidad distinta. Una vez que se aisló el ancestro del linaje *tincella-lacustris-barbata*, éste posiblemente se distribuyó a lo largo de los paleolagos miocénicos cuya extensión actual corresponde en su mayoría al Río Lerma (Tamayo y West, 1964; Israde-Alcántara y Garduño-Monroy, 1999), donde el ancestro de dicho linaje evolucionó hacia una forma adaptada al medio lacustre, preservándose algunos de sus rasgos en las especies derivadas, como una mayor talla (*A. barbata*= 78.5-108.6mm; *A. tincella*= 60.7-175mm; *A. lacustris*= 149.8-168.3mm; *A. popoche*= 83.9-230mm), un mayor número de poros preoperculomandibulares (*A. barbata*= 24-26; *A. tincella*= 20-32; *A. lacustris*= 35-48; *A. popoche*= 34-45), y un enrollamiento del intestino más complejo (las cuatro especies al menos con un doblez en la parte media) (Barbour y Miller, 1978).

De acuerdo con Moncayo *et al.*, (2001), a causa de la actividad volcánica y tectónica (fallamiento Taxco-Querétaro) en el Mioceno superior-Plioceno inferior (7 a 3.5 M.a), las regiones del alto y medio Lerma fueron aisladas. Dicho aislamiento coincide con los estimados de tiempo de divergencia en que tuvo lugar el evento cladogenético que dio lugar a *A. barbata*, en el alto Lerma (fig. 9). Por otro lado, Domínguez *et al.*, (2006), reportaron un evento vicariante que experimentó la tribu Girardinichthyini en goodeidos, el cual fue ocasionado por la actividad tectónica de la falla Chapala-Tula, registrada entre el Mioceno superior y el Pleistoceno inferior, en las regiones del medio Lerma. Con este evento la tribu fue dividida en dos grupos bien definidos, el grupo *Allotoca* ubicado al oeste (medio Lerma) y el grupo conformado por el resto de la tribu, con ubicación al este (alto Lerma). Se sugiere que *Algansea* pudo haber estado sujeto a dicho evento, quedando al este (alto Lerma), *A. barbata*. Cualquiera de los dos eventos mencionados, coinciden con el fechamiento obtenido del evento cladogenético de *A. barbata*.

Por otro lado, la población suficientemente estructurada y diferenciada de *A. tincella* correspondiente al Río Ameca ("*A. tincella*"), no sólo sugiere una histórica

conexión entre este Río y el sistema Lerma-Chapala, como se ha registrado en otros peces dulceacuícolas como *Notropis* (Chernoff y Miller, 1986), *Chirostoma* (Barbour, 1973), e *Ictalurus* (Miller y Smith, 1986), sino que, además indica que dicha conexión data de alrededor de 4-2.5 M.a.; posteriormente, la actividad tectónica ocasionada por diferentes fallas geológicas, aislaron los paleolagos, dando lugar a un evento vicariante que se considera el responsable de diferentes eventos cladogenéticos, tales como el origen de las especies de goodeidos, *Allotoca goslinae*, *Ameca splendens* y *Zoogoneticus tequila* en la cuenca del Río Ameca (Domínguez *et al.*, 2006), así como también a dos clados bien definidos de poblaciones de *Poeciliopsis infans* (Mateos *et al.*, 2002). Además de compartir especies hermanas en ambos sistemas hidrológicos, las divergencias genéticas con *cit-b* observadas en los taxa mencionados (Mateos *et al.*, 2002; Doadrio y Domínguez, 2004), son similares a los encontrados en *A. tincella* del Río Ameca con respecto a las otras poblaciones de *A. tincella* (tabla 3). Con base en lo anterior, se sugiere que el aislamiento de la población del Río Ameca tiene el suficiente tiempo y divergencias acumuladas para ser considerada como una entidad independiente.

Algansea lacustris, especie endémica del Lago de Pátzcuaro, presenta divergencias genéticas relativamente pequeñas con respecto a *A. tincella*, inclusive por debajo de las observadas entre *A. tincella* y “*A. tincella*” (tabla 3). Esto sugiere alguna posible conexión entre el lago de Pátzcuaro y el sistema Lerma-Chapala. De Buen (1943), basado en criterios ictiofaunísticos, propuso que había un tributario del Río Lerma que fluía a través de los lagos de Zirahuén, Pátzcuaro y Cuitzeo. Se considera que dicho tributario fue interrumpido hace 700 mil años (Israde-Alcantara, 1999). Por su parte, Álvarez (1972) consideró la existencia de un tributario que pasaba a través de Zacapu, Zirahuén y Pátzcuaro, cuyo flujo fue interrumpido por actividad tectónica hace aproximadamente 1 M.a.-700 mil años. No obstante la posible conexión entre el lago de Pátzcuaro con el sistema Lerma-Chapala, el tiempo de aislamiento de estos sistemas, se encuentra desfasado, tanto de los tiempos de divergencia, como de las divergencias genéticas estimadas en el presente trabajo.

Dentro del clado *A. tincella*, la población con estructura y mayor diferencia es la del Río Quitupan, uno de los tributarios que drena hacia el Río Grande, correspondiente a la parte noroeste del sistema hidrológico del Río Balsas. La ictiofauna compartida entre ríos y lagos de la Mesa Central, con el Río Balsas, particularmente miembros de la familia

Goodeidae, es atribuida a la captura de tributarios, debido a la erosión de las partes altas de la Mesa Central, particularmente del Río Lerma, fenómeno que se considera reciente (Doadrio y Domínguez, 2004). La presencia de *A. tincella* en el Balsas puede ser atribuida al mismo fenómeno. Sin embargo, con base en las divergencias genéticas observadas entre la población del Balsas y el resto de las poblaciones de *A. tincella*, y la región donde fue muestreada esta población, se considera otra posible ruta de *A. tincella* hacia el Balsas. El muestreo dentro de esta cuenca, fue realizado en la región del Valle de Tocuambo, donde a principios del siglo XX, fueron vertidas las aguas del Lago de San Juanico, localidad tipo de lo que alguna vez se consideró *Algansea paratincella* (Alvarez, 1963). Desgraciadamente, no se muestreo el suficiente número de organismos para corroborarlo morfológicamente.

La población de *A. tincella* correspondiente a la cuenca de Cuitzeo, bien estructurada aunque con menor divergencia genética, tiene relativamente poco tiempo de haber sido aislada de lo que es el sistema Lerma-Chapala. De acuerdo a los tiempos estimados, este aislamiento data de hace aproximadamente 1 M.a., tiempo que corresponde a la interrupción del flujo del tributario lermense a través de Zirahuén, Pátzcuaro y Cuitzeo, hace 1 M.a.-700 mil años (Israde-Alcantara, 1999).

La presencia de ictiofauna lermense en otras cuencas que actualmente son unidades independientes, sugiere que la cuenca del Río Lerma tuvo una estructura geográfica diferente a la actual (Alvarez, 1972). Tal es el caso de la presencia de *A. tincella* en el Río Verde, uno de los principales tributarios norteños del Río Grande de Santiago. Por otro lado, la erosión de la Mesa Central hacia la cuenca del Pánuco, explica la presencia de especies lermenses, tales como los goodeidos *Goodea gracilis*, *Xenotoca variata*, y *Girardinichthys multiradiatus* (Doadrio y Domínguez, 2004) y el ciprínido *N. sallei* (Chernoff y Miller, 1981; Schönhuth y Doadrio, 2003) y por supuesto la presencia de *A. tincella*.

6.4. Implicaciones en la clasificación y sistemática de *Algansea*

Cada una de las hipótesis filogenéticas obtenidas en el presente trabajo, recuperaron la monofilia del género *Algansea*, delimitaron de manera contundente a las poblaciones y especies reconocidas (fig. 6 A-B, 7 A-B y 8 A-B), y corroboraron el parentesco cercano

entre *Agosia* y *Algansea* (Schönhuth, 2002), a excepción de la hipótesis **MP** con *cit-b* (fig. 6 A). No obstante, la resolución en la base fue incierta. A pesar de las aparentes diferencias entre dichas hipótesis, localizadas principalmente en la base, el resto de la estructura se mantuvo relativamente consistente, destacando la hipótesis basada en *cit-b+S7* por mostrar influencia de ambos conjuntos de datos, además de la congruencia con los patrones biogeográficos del género.

De acuerdo con la hipótesis con *cit-b+S7*, los linajes con o sin barbillas maxilares de las hipótesis previas (Barbour y Miller, 1978; Jensen y Barbour, 1981), a pesar de ser monofiléticos (condición nunca puesta a prueba en las hipótesis previas), no se apoyaron, por el contrario, se corroboró el nivel de homoplasia del carácter barbillas maxilares (Gilbert, 1978; Howes, 1991; Simons *et al.* 2003), puesto que *A. barbata* se asoció con las especies carentes de barbillas, *A. lacustris* y *A. tincella*. Con base no sólo en las relaciones filogenéticas, si no también en las divergencias genéticas observadas entre *A. barbata* y el resto de las especies del género (tabla 3), y por los patrones biogeográficos que determinaron la distribución actual de esta especie, se postula que ésta tuvo que derivar del linaje *tincella-lacustris-barbata*.

A pesar de haberse obtenido un valor bajo de probabilidades posteriores en la hipótesis **BY** con *cit-b+S7*, se forma una asociación entre especies con barbillas, *A. aphaea* y *A. monticola*, y esta última presenta una relación más cercana con *A. avia*, reflejando el parentesco propuesto por Barbour y Miller (197, 1994). Por el otro lado, se rechaza la polifilia de estas dos últimas especies, sugerida por Jensen y Barbour (1981).

La especie *A. aphaea* descrita en la revisión del género realizada por Barbour y Miller (1978), limita su intervalo de distribución a los sistemas hidrológicos Armería-Ayuquila y Coahuayana-Tamazula (Barbour y Miller, 1978; Miller *et al.*, 2005). En cada una de las hipótesis obtenidas en el presente trabajo, se recuperó la monofilia de las dos poblaciones incluidas, representantes cada una de ellas de los sistemas hidrológicos que comprenden la distribución de esta especie. Sin embargo, con ninguno de los dos marcadores moleculares empleados se logró tener resolución a nivel intraespecífico, y las divergencias genéticas observadas entre estas poblaciones fueron mínimas, alcanzándose a registrar 0.002 ± 0.001 con *cit-b* y 0.004 ± 0.002 con *S7* (promedio de distancias $p \pm$ error estandar). Esto sugiere que estos dos sistemas hidrológicos adyacentes, Armería-Ayuquila y

Coahuayana-Tamazula, estuvieron conectadas hace relativamente poco tiempo, por su cercanía geográfica, posiblemente mediante una captura de ríos, que de acuerdo con Webb *et al.*, (2004), es de los procesos más comunes tanto en las cuencas de la vertiente atlántica, como en las de la vertiente pacífica.

El linaje sin barbillas (*sensu* Barbour y Miller, 1978; Jensen y Barbour, 1981) es congruente con el consistente linaje *tincella-lacustris-barbata*, excepto por la presencia de *A. barbata*, y por supuesto por la posición incierta de la especie ausente en el presente estudio *A. popoche*. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la presencia/ausencia de barbillas maxilares resultó ser un carácter homoplásico; por otro lado, la condición de una mayor talla, mayor número de poros preoperculomandibulares, y un enrollamiento del intestino más complejo, son características asociadas a ambientes lacustres, y aunadas a las implicaciones biogeográficas, sugieren la teórica incorporación de *A. popoche* al linaje consistente de *tincella-lacustris-barbata*.

Como fue reportado por Barbour y Miller (1978), la especie *A. tincella* es la que presenta el mayor rango de distribución. Sin embargo, de las poblaciones incluidas en el presente estudio, aquella correspondiente al Río Ameca presentó una serie de condiciones que la sugieren como una posible entidad taxonómica diferente y bien definida, debido a los siguientes argumentos: a) la contundente relación parafilética que guardó con el resto de las poblaciones de *A. tincella*, en todas las hipótesis excepto en las basadas en S7 (fig. 7 A-B); b) las divergencias genéticas con respecto a las otras poblaciones (tabla 3); y c) la monofilia de la población bien estructurada y apoyada. No obstante estos argumentos, se requieren otros estudios comparativos para determinar la consistencia de esta hipótesis. Por otro lado, la población del Balsas, que presenta estas mismas cualidades, aunque en un menor grado, podría considerarse otra entidad taxonómica diferente. Tomando en consideración que la especie de *Algansea* correspondiente a la presa de San Juanico fue descrita por primera vez como *A. paratincella* por Álvarez (1963), y que a mediados del siglo XX el agua del embalse fue canalizada hacia el valle de Tocombo, por donde se conecta al Balsas (Álvarez, 1963), se considera que esta población de *A. tincella*, puede ser una entidad taxonómica diferente, reconsiderándose de esta manera su estado de especie original. Sin embargo, al igual que el caso previo, se requiere de estudios morfométricos detallados y de mayor profundidad, para una determinación más contundente.

7 Conclusiones

- La monofilia del género *Algansea* se evidenció en las hipótesis generadas con los dos marcadores moleculares (Cit-b+S7) y con los dos métodos de análisis (Maxima Parsimonia y Análisis Bayesiano).
- La mejor resolución de la historia evolutiva del género *Algansea* se obtuvo al combinar la información de los dos marcadores (Cit-b+S7).
- La topología del cladograma entre las especies del género *Algansea* muestra tres linajes bien definidos, uno que está representado por *A. aphaea*, otro por *A. monticola* y *A. avia*, y uno más por *A. tincella*, *A. lacustris* y *A. barbata*.
- La hipótesis filogenética propuesta en el presente trabajo es altamente consistente con la clasificación actual del género *Algansea*. Se reconocen las seis especies incluidas en el análisis como entidades válidas.
- La especie *A. tincella* es parafilética. La población de esta especie correspondiente al río Ameca es el grupo hermano del clado formado por *A. lacustris* y el resto de las poblaciones de *A. tincella*.
- Los caracteres morfológicos, con base en los cuales se establecieron las hipótesis filogenéticas previas del género *Algansea*, resultaron altamente homoplásicos.
- De acuerdo con el tiempo de divergencia estimado y los eventos geológicos que ocurrieron en el noroeste de México, el origen del género *Algansea* se remonta al Mioceno medio, hace 15 M.a. aproximadamente.

- El patrón biogeográfico del género *Algansea* en la Mesa Central de México es congruente con el de otros grupos de peces dulceacuícolas , incluyendo godeidos, ciprínidos y poecilidos.

Bibliografía

- Alfaro M. E., S. Zoller y F. Lutzoni. 2003. Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Molecular Biology and Evolution* 20:255-266.
- Álvarez, J. 1963. Ictiología michoacana III. Los peces de San Juanico y de Tocumbo, Michoacán. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas México* 12:111-138.
- Álvarez, J. 1972. Ictiología michoacana V. Origen y distribución de la ictiofauna dulceacuícola michoacana. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas México* 19:155-161.
- Barbour, C. D. 1973a. The systematic and evolution of the genus *Chirostoma* Swainson (Pisces, Atherinidae). *Tulane studies in Zoology and Botany*. 18: 97-141.
- Barbour, C. D. 1973b. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): a species flock from the Mexican Plateau. *Copeia*, 1973, 533–556.
- Barbour, C. D. y R. R. Miller. 1978. A revision of the mexican cyprinid fish genus *Algansea*. *Miscellaneous publications. Museum of Zoology, University of Michigan*, 1-172.
- Barbour, C. D. y R. R. Miller. 1994. Diversification in the mexican cyprinid fish *Algansea monticola* (Pisces: Cyprinidae), with description of a new subspecies. *Copeia* 662-676.
- Bernardi, G., G. Bucciarelli; D. Costagliola; D. R. Robertson y J. B. Heiser. 2004. Evolution of coral reef fish *Thalassoma* spp. (Labridae). 1. Molecular phylogeny and biogeography. *Marine Biology* 144:369-375.
- Briolay, J., N. Galtier; R. M. Brito e Y. Bouvets. 1998. Molecular Phylogenetics and *Evolution* 9:100-108.
- Brito, R. M., J. Briolay; N. Galtier; Y. Bouvet y M. M. Coelho. 1997. Phylogenetic Relationships within genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in portuguese

- freshwaters, based on mitochondrial dna cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:435-442.
- Burr, B. M. y R. L. Mayden. 1992. Phylogenetics and north american freshwater fishes. En: Mayden R. L. (Ed.) *Systematics, Historical Ecology & North American Freshwater Fishes*. Stanford University Press, pp. 18-75.
- Cavender, T. M. y M. M. Coburn. 1992. Phylgenetic relationships of north american cyprinidae. En: Mayden, R. L. (Ed.) *Systematics, Historical Ecology & North American Freshwater Fishes*. Stanford University Press, pp. 328-373.
- Chen, X. L., P. Q. Yue y R. D. Lin. 1984. Major groups within the family Cyprinidae and phylogenetic relationships. *Acta Zootaxonómico Sinicia* 4:424-440.
- Chernoff, B. y R. R. Miller. 1981. Systematics and variation of the aztec shiner, *Notropis sallei*, a cyprinid fish from central Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 94: 18–36.
- Chernoff, B. y R. R. Miller. 1986. Fishes of the *Notropis calientis* complex with a key to the southern shiners of Mexico. *Copeia* 170:183.
- Chow, S. y K. Hazama. 1998. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology* 7:1247-1263.
- Chow, S., V. P. Scholey; D. Margulies; J. B. Wexler; R. J. Olson y F. Hazama. 2001. *Marine Biotechnology* 3:22-26.
- Cunha, C., N. Mesquita; T. E. Dowling; A. Gilles y M. M. Coelho. 2002. Phylogenetic relationships of eurasian and american cyprinids using cytochrome b sequences. *Journal of Fish Biology* 61:929-944.
- De Buen, F. 1943. Los lagos de michoacanos. I. Caracteres generales. El lago de Zirahuén. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 4:211-232.
- Doadrio, I. y O. Domínguez. 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 416–430.
- Doadrio, I. y A. Perdices. 2005. Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (Cobitis, Cobitidae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:484-493.

- Domínguez-Domínguez, O., I. Doadrio y G. Pérez- Ponce de León. 2006. Historical biogeography of some river basins in central Mexico evidenced by their goodeine freshwater fishes: a preliminary hypothesis using secondary Brooks parsimony analysis. *Journal of Biogeography* 33: 1437-1447.
- Domínguez-Domínguez, O., Adrian Pompa Domínguez y I.Doadrio. 2007. A new species of the genus *yuriria* Jordan & Evermann, 1896 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Ameca basin of the central Mexican plateau. *Graellsia* 63: 1-13.
- Dowling, T. E. y G. J. P. Naylor. 1997. Evolutionary relationships of monnows in the genus *Luxilus* (Teleostei: Cyprinidae) as determined from cytochrome b sequences. *Copeia* 758-765.
- Dowling, T. E., C. A. Tibbets; W. L. Minckley y G. R. Smith. 2002. Evolutionary relationships of the plagopterins (Teleostei: Cyprinidae) from cytochrome b sequences. *Copeia* 665-678.
- Erixon, P., B. Svennblad; T. Britton y B. Oxelman. 2003. Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics. *Systematic Biology* 52:665-673.
- Espinosa, H., M. T. Gaspar y P. Fuentes. 1993. Listados faunísticos de México; III. Los peces dulceacuícolas de mexicanos. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, 123 p.
- Farias, I. P., G. Ortí; I. Sampaio; H. Schneider y A. Meyer. 2001. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution* 53:89-103.
- Ferrari, L., M. López-Martínez; G. Aguirre-Díaz y G. Carrasco-Núñez. 1999. Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central Mexico: from the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology* 27:303-306.
- Ferrari, L., S. Conticelli; G. Vaggelli; C. M. Potrone y P. Manetti. 2000. Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Transmexican Volcanic Belt. *Tectonophysics* 318:161-185.
- Felsenstein, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27:401-410.

- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Gilbert, C. R. 1978. Type catalogue of the north american cyprinid fish genus *Notropis*. *Bulletin of the Florida State Museum Biological Sciences* 23:1-104.
- 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.
- Hillis, D. M., B. K. Mable y C. Moritz. 1996. Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. En: Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (Ed.) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, inc. Sunderland, Massachusetts. USA.
- Holder, M., y P. O. Lewis. 2003. Phylogenetics estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature* 275-284.
- Howes, G. J. 1991. Systematics and biogeography: an overview. En: Winfield, I. J., J. S. Nelson (Ed.) *Cyprinids fishes: Systematics, biology and exploitation*. Chapman & Hall, London, pp. 1-33.
- Huelsenbeck, J. P. y F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Huelsenbeck, J. P., Larget, B., Miller, R. E., y Ronquist, F. 2002. Potential applications and pitfalls of bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology* 51:673-688.
- Israde-Alcántara, I. y V. H. Garduño-Monroy. 1999. Lacustrine record in a volcanic intra-arc setting: the evolution of Late Neogene Cuitzeo basin system (central-western Mexico, Michoacan). *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology* 151: 209-227.
- Jensen R. J. y C. D. Barbour. 1981. A phylogenetic reconstruction of the mexican cyprinid fish genus *Algansea*. *Systematic Zoology* 30: 41-57.
- Johns, G. C. y J. C. Avise. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution* 15:1481-1490.
- Jonson, J. B., T. E. Dowling y M. C. Belk. 2004. Neglected taxonomy of rare desert fishes: congruent evidence for two species of leatherside chub. *Systematic Biology*. 53:841-855.

- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lavoué, S., J. P. Sullivan y C. D. Hopkins. 2003. Phylogenetic utility of the first two introns of the S7 ribosomal protein gene in african electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and congruence with other molecular markers. *Biological Journal of the Linnean Society* 78: 273-292.
- Li, W. H. 1993. Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *Journal of Molecular Evolution* 36: 96-99.
- Lydeard, C. y K. Roe. 1997. The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. En: Kocher, T. D. y C. A. Stepien (Ed) *Molecular systematics of fishes*. Academic Press. pp. 285-302.
- Machordom, A. e I. Doadrio. 2001. Evidence of a Cenozoic betic-kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:252-263.
- Mateos, M., O. I. Sanjur y R. C. Vrijenhoek. 2002. Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Evolution* 56:972-984.
- Mayden, R. L. 1991. Cyprinids of the New World. En: Winfield, I. J., Nelson, J. S. (Ed.) *Cyprinids fishes: Systematics, biology and exploitation*. Chapman & Hall, London, pp. 240-263.
- Mayden R. L., B. M. Burr; L. M. Page y R. R. Miller. 1992. The native freshwater fishes of North America. En: Mayden R. L. (Ed). *Systematics, Historical Ecology & North American Freshwater Fishes*. Stanford University Press, pp 827-863.
- Miller, R.R. y M. L. Smith. 1986. Origin and geography of the fishes of Central Mexico. En: Hocutt, C. H. y E. O. Wiley (Ed.) *The zoogeography of North American freshwater fishes*. Wiley-Intersciences, New York, pp. 487-519.
- Miller, R. R., W. L. Minckley y S. M. Norris. 2005. *Freshwater Fishes of Mexico*. The University of Chicago Press, Chicago, USA, 652 p.

- Moncayo-Estrada, R., I. Israde-Alcántara y V. H. Garduño-Monroy. 2001. La cherehuita *Hubbsina turneri* De Buen (1941) (Pisces, Goodeidae): origen, distribución y su uso en la regionalización de la cuenca del Lerma. *Hidrobiologica*, 11:1–13.
- Moran, P. y I. Kornfield. 1993. Retention of an ancestral polymorphism in the mbuna species flocks (Teleostei: Cichlidae) of Lake Malawi. *Molecular Biology and Evolution* 10:1015-1029.
- Ortí, G., Petry, P., Porto, J. I. R., Jégu, M. y A. Meyer. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *Journal of Molecular Evolution* 42: 169-182.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: polymerase chain reaction. En: Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (Ed.) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, inc. Sunderland, Massachusetts. USA.
- Pedersen, N., D. T. Holyoak y A. E. Newton. 2007. Systematics and morphological evolution within the moss family Bryaceae: A comparison between parsimony and Bayesian methods for reconstruction of ancestral character states. *Molecular Systematics and Evolution* 43:891-907.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Prychitko, T. M. y W. S. Moore. 1997. The utility of DNA sequences of an intron from the beta-fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves:Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 193-204.
- Robinson-Rechavi, M. y D. Huchon. 2000. RRTree: relative-rate tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. *Bioinformatics* 16:296-297.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2da edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanderson M. J. y H. B. Shaffer. 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Annual Review of Ecology & Systematics* 33: 49-72.
- Sarich, V. M. y A. C. Wilson. 1973. Generation time and genomic evolution in primates. *Science*. 179:1144-1147.
- Schönhuth, M. S. 2002. Sistemática, filogenia e implicaciones biogeográficas de las poblaciones del género *Notropis* Rafinesque, 1817 (Actinopterygii: Cyprinidae) en

- el centro y sur de México, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España. 166 p.
- Schönhuth, M. S. y I. Doadrio. 2003. Phylogenetic relationships of Mexican minnows of the genus *Notropis* (Actinopterygii: Cyprinidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 80: 323–337.
- Schmidt, H.A., K. Strimmer; M. Vingron, y A. von Haeseler. 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*. 18:502-504.
- Simons, A. M., P. B. Berendzen y R. L. Manden. 2003. Molecular systematics of North American phoxinin genera (Actinopterygii: Cyprinidae) inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society* 139: 63-80.
- Stepien, C. A. y T. D. Kocher. 1997. Molecules and morphology in studies of fish evolution. En: Kocher, T. D. y C. A. Stepien (Ed) *Molecular systematics of fishes*. Academic Press. pp. 1-11.
- Sullivan, J. P., S. Lavoué y Carl D. Hopkins. 2002. Discovery and phylogenetic analysis of a riverine species flock of african electric fishes (Mormyridae: Teleostei). *Evolution* 56:597-616.
- Swofford, D. L. 2004. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamayo, L.T. y R. C. West, R.C. 1964. The hydrology of Middle America. En: R. Wauchope y R.C. West (Ed.) *Handbook of Middle America indians*. University of Texas Press, Austin, TX. pp. 84–121.
- 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 Res.* 24:4876-4882.
- Wilcox T. P., D. J. Zwickl; T. A. Heath y D. M. Hillis. 2002. Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25:361-371.

- Webb, S. A., 1998. A phylogenetic analysis of the Goodeidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). Tesis Doctoral, Universidad de Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA.
- Webb, S. A., J. A. Graves; C. Macías-García; A. E. Magurran; D. Ó Foighil y M. G. Ritchie. 2004. Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 30:527-544.
- Wilcox, T. P., F. J. García de León; D. A. Hendrickson y D. M. Hillis. 2004. Convergence among cave catfishes: long-branch attraction and a Bayesian relative rates test. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:1101-1113
- Wu, C. I. y W. H. Li. 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitutions in rodents than in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:1741-1745.
- Zardoya, R. y I. Doadrio. 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution* 49:227-237.

Anexo 1. Extracción de DNA, con el método de Sambrook et al (1989) modificado.

1.- Se colocó el tejido triturado en un tubo de 1.5 ml, con 600 μ l de buffer extracción (CTAB) a 65 °C, se añadieron 6 μ l de proteinasa K (stock a 20 mg/ml), y después se dejó agitando en un equipo Termomix a 300 revoluciones por minuto (rpm), a una temperatura constante de 37 °C, durante 12 horas.

2.- Después del periodo de agitación, se prosiguió con la extracción orgánica, que consistió en verter todo el contenido del tubo de 1.5 ml a un tubo de 2 ml, al que después le fue añadido 300 μ l de fenol y 300 μ l de diclorometano-alcohol isoamílico, y se dejó mezclándose en un rotor durante 10 min.

3.- Se continuó con la centrifugación, que fue 13000 rpm durante 10 min, después se recuperó el sobrenadante (fase superior de la mezcla separada) el cuál contiene los ácidos nucleicos y se colocó en un tubo nuevo de 2 ml.

4.- Se añadieron 600 μ l de diclorometano-alcohol isoamílico, con la finalidad de eliminar restos de desechos orgánicos, incluyendo el fenol. Se mezcló en un rotor durante 10 min.

5.- Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 10 min, al término, se recuperó el sobrenadante el cuál varió de 300 μ l a 600 μ l.

6.- En la precipitación del DNA, de acuerdo al volumen final, se añadió el 10% de acetato sódico a una concentración de 0.3 M, y el 200% del volumen final, de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión. Se dejó precipitando a -20 °C durante 2 horas.

7.- Se centrifugó 12000 rpm durante 10 min, y se eliminó el sobrenadante.

8.- Una vez más se añadieron dos volúmenes de etanol frío pero esta vez al 70%, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y se desecho el sobrenadante.

9.- El DNA precipitado se secó al vacío durante 20 min a 35 °C.

10.- El precipitado se resuspendió con 100 µl de H₂O miliQ.

11.- Para comprobar la presencia y calidad de DNA, se corrió un gel de agarosa al 0.8% en el tampon TAE (tris-acetato+EDTA) y 0.5 µl de bromuro de ethidio, a 80 V y se visualizó en una lampara de UV.

Anexo 2. Amplificación de citocromo b y el primer intrón del S7, mediante PCR

Preparación de las reacciones a un volumen total de 25 μ l

Para cada muestra por amplificar se agregaron:

Buffer Tris-HCl 10X con MgCl ₂ (Biotools)	2.5 μ l
dNTP [10 mM]	0.5 μ l [0.2 μ M] c/dinucleotido
Primer (forward) [100 μ M]	0.5 μ l [10 μ M]
Primer (reverse) [100 μ M]	0.5 μ l [10 μ M]
<i>Taq</i> polimerasa (Biotools)	0.25 μ l
DNA	1-2 μ l (diluciones 1/100, 1/50 o 1/25 [50 ng/MI])
H ₂ O miliQ	aforo a 25 μ l

Programa de Termociclador

	<i>Cyt-b</i>	S7
Desnaturalización	T= 94 °C 2 min	T= 95°C 5 min
	35 ciclos	40 ciclos
Desnaturalización	T= 94 °C 45 seg	T= 94 °C 1 min
Alineamiento	T= 46 °C 1 min	T= 54 °C 1.30 min
Extensión	T= 72 °C 1.30 min	T= 72 °C 1.30 min
Extensión final	T= 72 °C 5 min	T= 72 °C 5 min

**Anexo 3. Protocolos de limpieza de los productos de PCR,
mediante el kit ExoSAP-IT.**

1.- Por cada 5 μ l del producto de PCR se añade 2 μ l de enzima.

Producto de PCR	15 μ l
ExoSAP-IT	6 μ l
Total	21 μ l

2.- Activación de ExoSAP-IT

Mezcla

Incubación en termociclador, 37 °C durante 15 min

3.- Desactivación de ExoSAP-IT

Elevación de la Temperatura a 80 °C durante 15 min

4.- DNA listo para secuenciar directo

Anexo 4. Protocolos de reacción de secuenciación, mediante el kit Big Dye Deoxy Terminator cycle-sequencing (Applied Biosystems Inc.).

1.- Preparación de las muestras

Para cada muestra se agregaron:

Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye)	2 µl
Buffer 2.5X (concentración diluida)	2 µl
Primers (p/cada uno)	1 µl (2 µl)
DNA	1 µl
H ₂ O miliQ	3 µl
Total	10 µl

2.- Programa para la reacción

Desnaturalización previa = 96 °C 5 min

25 ciclos:

Desnaturalización = 96 °C 10 seg

Alineación *cyt-b* = 46 °C 5 seg

S7 = 54 °C 5 seg

Extensión = 60 °C 4 min

Anexo 5. Protocolos de purificación del amplificado después de la reacción de secuenciación, mediante columnas Centri-sep (Princeton Separations P/N CS-901)

- 1.- Se agregan 800 μ l de H₂O miliQ a la columna con sephadex
- 2.- Se tapa la columna y se agita en el vortex para mezclar el H₂O con el sephadex
- 3.- Se remueven las burbujas de aire invirtiendo la columna
- 4.- Se deja hidratando el sephadex a temperatura ambiente por menos durante 2 horas
- 5.- Se quitan ambas tapas, superior e inferior y se pone la columna sobre los tubos colectores, dejándose secar completamente por gravedad. Se desecha el H₂O del tubo colector
- 6.- Se centrifuga la columna a 2, 800 rpm durante 2 min
- 7.- Se agregan 10 μ l de H₂O miliQ a los tubos que tienen el producto amplificado
- 8.- Se coloca la columna dentro de un tubo nuevo de 1.5 ml, y se le agrega todo el contenido del producto amplificado
- 9.- Se centrifuga a 2, 800 rpm durante 3 min
- 10.- Se desecha la columna, y se pone a secar la muestra ahora contenida en el

tubo de 1.5 ml, durante 30 min en una centrifuga al vacío a temperatura ambiente