



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Variación Genética en *Procambarus (Austrocambarus)*  
*llamasi* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) de la  
Península de Yucatán, México”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

EDUARDO TORRES TORRES



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ALEJANDRO BOTELLO CAMACHO  
2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos de alumno

Torres  
Torres  
Eduardo  
21 59 18 23  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
301139159

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Alejandro  
Botello  
Camacho

### 3. Datos de sinodal 1

Dr.  
Fernando  
Álvarez  
Noguera

### 4. Datos de sinodal 2

Dra.  
Alejandra  
Vázquez Lobo  
Yurén

### 5. Datos de sinodal 3

Dr.  
José Luis  
Villalobos  
Hiriart

### 6. Datos de sinodal 4

Dra.  
Guillermina  
Alcaraz  
Zubeldia

### 7. Datos del trabajo escrito.

Variación genética en *Procambarus (Austrocambarus) llamasii* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) de la península de Yucatán, México.

40  
2009

## AGRADECIMIENTOS

Al programa PAPIIT-DGAPA-UNAM con el proyecto IN203906-3 “Adaptación del acocil *Procambarus llamas* a ambientes contrastantes en la península de Yucatán: Ecofisiología, Ecología Poblacional y Diversificación”. Responsable: Dr. Fernando Álvarez.

Al Dr. Alejandro Botello Camacho por haberme enseñado las técnicas y análisis que conforman el presente trabajo, además por haberme tenido paciencia durante este proceso y ser más que un maestro, un compañero.

Al Dr. Fernando Álvarez Noguera agradezco infinitamente por todo el apoyo y la confianza brindada a lo largo de mi estancia en la Colección Nacional de Crustáceos del IBUNAM y durante la elaboración de la tesis, así como de las aportaciones valiosas que hizo al trabajo.

Al Dr. José Luis Villalobos Hiriart por todos los consejos y sugerencias que enriquecieron esta tesis, además de ayudarme en las cuestiones taxonómicas del grupo.

A la Dra. Virginia León Regagnon por permitirme trabajar en el Laboratorio de Sistemática Molecular 3 del Instituto de Biología.

A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar, encargada del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología y del secuenciador automático, gracias por obtener las secuencias de nucleótidos, pero más aún por seguir de cerca mi trabajo, el apoyo recibido y la amistad brindada durante la elaboración de éste.

A la Dra. Alejandra Vázquez Lobo Yurén por la asesoría, los consejos brindados y la disposición que tuvo para la revisión de este trabajo, muchas gracias.

A la Dra. Guillermina Alcaraz por el tiempo que dedico a la revisión de la tesis.

A la Dra. Carmen Hernández por el apoyo brindado como profesora del Taller “Invertebrados de la zona costera y arrecifal del Golfo de México” y como compañera y amiga de la Colección Nacional de Crustáceos.

A mi amiga Gema por sus consejos, compañía y gran amistad en esas largas horas de trabajo enclaustrados en la Colección Nacional de Crustáceos y fuera de ella, en las salidas al campo.

A toda mi familia tíos, primos y sobrinos, pues de algún u otro modo han influido en mi formación como persona mediante su compañía, que sería de mí sin una familia tan grandiosa como esta.

A todos mis grandes amigos de la carrera Citlalli, Marisol, Luisrael, Giovanni, Tania y José Luis por acompañarme durante el proceso de aprendizaje de esta bella profesión y brindarme tiempo de calidad.

A mis amigos Tania Jaso y Felipe Rincón por su amistad incondicional, pues a pesar de conocernos relativamente de poco tiempo han logrado ser una muy buena compañía, junto con ellos todos mis amigos de la sala de Fisiología Humana y Salud con los que compartí varias horas durante mi estancia en el Museo UNIVERSUM.

A todos mis amigos y profesores integrantes de la Banda Juvenil de Marcha de la Normal de Coacalco pues con ustedes y en esta grandiosa banda he podido desahogar mi inquietud por la música, gracias por confiar en mí y soportar mis locuras.

## **DEDICATORIA**

Con mucho cariño dedico esta tesis a mis padres Juana María Torres y Eduardo Torres por apoyarme en todos los momentos de mi vida, darme consejos y escucharme, también por cuidarme, darme la fuerza y ánimos de cada día para que hoy finalice este proyecto tan importante.

Mis papas nos han enseñado, a mi hermano y a mi, a siempre hacer las cosas de la mejor manera, a trabajar y luchar por nuestros objetivos siempre con humildad, ya sea de consejero o maestro de natación en un curso de verano, o como anfitrión de una sala o jefe de instructores en una pista de hielo, o como diseñador gráfico o mayor de tambores.

Gracias entonces por ser las personas que guían nuestras vidas.

A mi hermano Carlos Eduardo Torres por ser mi compañía en muchos de los proyectos que he emprendido y hacer buena dupla en todas las locuras que aun se nos ocurren. A pesar de ser el menor he aprendido de ti un sinfín de cosas que no cambiaría por nada, simplemente gracias por ser mi hermano.

A mis abuelitos Felita Flores y Benito Torres por apoyarme en todo momento, cuidarme y preocuparse por mí, no ha palabras para describir y agradecer todo lo que han hecho por mi durante toda mi vida y por mi familia.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Páginas</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
Generalidades de los acociles.....	3
La península de Yucatán.....	6
Estudios moleculares.....	6
<b>Antecedentes.....</b>	<b>10</b>
Estudios sobre acociles.....	10
Sistemática molecular.....	11
<b>Objetivo.....</b>	<b>14</b>
General.....	14
Particular.....	14
<b>Hipótesis.....</b>	<b>14</b>
<b>Área de estudio.....</b>	<b>15</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>18</b>
Trabajo de campo y gabinete.....	18
Trabajo de laboratorio.....	18
Análisis.....	19
<b>Resultados.....</b>	<b>22</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>30</b>
Variación genética y tiempo de divergencia.....	30
Análisis de Clados Anidados.....	31
¿Constituye <i>Procambarus (A.) llamasi</i> un complejo de especies?.....	32
<b>Conclusiones.....</b>	<b>34</b>
<b>Literatura citada.....</b>	<b>35</b>

## RESUMEN

La familia Cambaridae agrupa crustáceos decápodos estrictamente dulceacuícolas, dentro de ésta destaca el género *Procambarus* por el número de especies descritas y por su amplia distribución en el continente americano. *Procambarus (Austrocambarus) llamasii* es una especie endémica de la península de Yucatán que habita tanto aguas continentales como marismas y zonas de inundación en localidades relativamente distantes, por lo cual se esperaría encontrar poblaciones genéticamente muy estructuradas con haplotipos propios de cada población. Para describir la variación genética en diferentes poblaciones de *P. (A.) llamasii* y su relación con la distribución geográfica, se realizó un análisis filogeográfico utilizando el gen mitocondrial COI. Se extrajo el ADN total de 53 organismos pertenecientes a 10 poblaciones y se amplificó una región del COI mediante PCR con los promotores LCO 1490 y HCO 2198. Se obtuvieron las secuencias de ADN y se alinearon visualmente. Se identificaron los diferentes haplotipos con los que se construyó una red utilizando el método de parsimonia estadística, para realizar un análisis de clados anidados. El fragmento obtenido tuvo una longitud de 642 pb. Entre las secuencias se observaron 14 sitios variables de los cuales 12 son informativos. Todos los cambios entre nucleótidos fueron transiciones. La diversidad nucleotídica fue de  $\pi = 0.0045$ . El número de haplotipos encontrados fue de 10, con una diversidad HD = 0.532 estando uno de ellos ampliamente distribuido, ubicando el centro de expansión en el sur de la península. El análisis de clados anidados muestra que los haplotipos observados en la actualidad son resultado de una expansión contigua en su distribución geográfica. Esto podría deberse a las inundaciones estacionales que se presentan en la península de Yucatán y a la comunicación temporal entre los cuerpos de agua adyacentes.



## ABSTRACT

The family Cambaridae is composed of strictly freshwater decapod crustaceans. The genus *Procambarus* is especially important due to the number of species it contains and to its wide distribution in the American Continent. *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* is an endemic of the Yucatan Peninsula, occurring in epicontinental bodies of water including lakes, marshes and flood plains, which can be relatively distant. Due to this separation it would be expected to find highly structured populations with unique haplotypes. To describe the genetic variation of the different populations of *P. (A.) llamasi* and their distribution pattern, a phylogeographic analysis was conducted using the COI mitochondrial gene. Total DNA was extracted from 53 organisms from 10 populations, and the COI region was amplified using PCR with the LCO 1490 and HCO 2198 primers. The DNA sequences were obtained with an automatic sequencer and aligned by hand. The different haplotypes were identified and a net was built using statistical parsimony to perform a nested clade analysis. The obtained fragment had a length of 642 bp. 14 variable sites were found, 12 of which were informative. All the nucleotide changes were transitions. The nucleotide diversity was  $\pi = 0.0045$ . Ten haplotypes were found with a diversity of  $HD = 0.532$ , being one of them widely distributed, suggesting that the origin of the range expansion is in the southern portion of the peninsula. The nested clade analysis shows that the present haplotypes are a result of a contiguous range expansion. This could be due to the seasonal floodings that occur in the area which can create temporal connections among populations.

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades de los acociles

Los crustáceos decápodos dulceacuícolas integran un grupo que se distingue por la heterogeneidad de sus formas y la variedad de ambientes que ocupan. Para México se han descrito hasta el momento 167 especies ubicadas en tres infraórdenes (Caridea, Astacidea y Brachyura) y ocho familias (Alpheidae, Atyidae, Parastacidae, Cambaridae, Palaemonidae, Glyptograpsidae, Pseudothelphusidae y Trichodactylidae), de ellas destacan Cambaridae (57 especies) y Pseudothelphusidae (53 especies) como las más diversas (Villalobos, *com. pers*). Un alto porcentaje de las 167 especies de crustáceos decápodos dulceacuícolas (83.8%) son endémicas de México (Villalobos y Rosas, *com. pers*).

El infraorden Astacidea cuenta con cinco superfamilias, de las cuales Glypheoidea, Enoplometopoidea y Nephropoidea comprenden a las especies marinas, mientras que Astacoidea y Parastacoidea, esta última restringida al hemisferio sur, integran a las especies de agua dulce, aunque algunas pueden distribuirse en áreas con salinidades moderadas. La superfamilia Astacoidea esta compuesta de dos familias: Astacidae y Cambaridae (Martin y Davis, 2001). En ellas se encuentran los crustáceos decápodos que comúnmente se conocen como “crayfish” en Canadá y Estados Unidos y “acociles” en México (Villalobos, 1955; Hobbs, 1972b).

Los cambáridos son habitantes comunes de gran parte de los arroyos y depósitos lacustres desde la bahía de Hudson en el sur de Canadá hasta Honduras y Cuba, así como en las cuencas de algunos ríos de la vertiente del Pacífico mexicano y en Asia. Algunos se han adaptado a la vida cavernícola y otros perforan túneles en la tierra húmeda desplegando varias estrategias de enterramiento. Casi todos ellos tienen hábitos nocturnos, de ahí que en la oscuridad deambulen por los arroyos en busca de su alimento y durante el día permanezcan escondidos debajo de las piedras o de la hojarasca, o bien, dentro de los túneles que ellos construyen (Villalobos, 1955).

Dentro de la familia Cambaridae destaca el género *Procambarus* por el número de especies descritas (176) y por su distribución en el continente americano, pues se extiende desde el sur de Nueva Inglaterra a Honduras, encontrándose también en la isla Cuba y la isla de Pinos (Fetzner, 2008).

En los cuerpos de agua continentales de México, las 57 especies de la familia Cambaridae se encuentran organizadas de la siguiente forma: 46 se ubican en el género

*Procambarus*, una en *Orconectes* y 10 en *Cambarellus* (Villalobos, *com. pers*). Las especies del género *Procambarus*, a su vez están agrupadas en 9 subgéneros: *P. (Austrocambarus)*, *P. (Girardiella)*, *P. (Mexicambarus)*, *P. (Ortmannicus)*, *P. (Paracambarus)*, *P. (Pennides)*, *P. (Procambarus)*, *P. (Scapulicambarus)* y *P. (Villalobosus)* (Hobbs, 1989). Al sur de México el género *Procambarus (Austrocambarus)* cuenta con 17 especies descritas que se distribuyen desde el centro de Veracruz y norte de Oaxaca, hasta el sur de Tabasco y Chiapas, así como en los tres estados de la península de Yucatán (Álvarez *et al.*, 2007b).

*Procambarus (Austrocambarus) llamasi* Villalobos, 1954, es una especie endémica de la península de Yucatán que habita ríos, lagos, zonas de inundación estacional, pantanos costeros, arroyos, canales en campos de agricultura, cenotes, aguadas y marismas en gran parte de la península. Son omnívoros, su alimentación preferente en el estado juvenil es de insectos, moluscos y peces, en su fase adulta prefieren la materia en descomposición, raíces y organismos muertos. Presentan un ciclo de vida corto y directo, su edad máxima observada es de dos años y comienzan a reproducirse a partir de los 40 mm de longitud total (Rodríguez, 1999). Las características diagnósticas de *P. (A.) llamasi* son las siguientes (Fig. 1). Caparazón con dos espina laterales y normalmente tres espinas branquiostegales en cada lado. Rostro ancho en su base con espinas laterales y una espina acuminal larga y puntiaguda, alcanzando el borde articular distal del tercer artejo del pedúnculo antenular. Dedos de la quela mayor cubiertos con cerdas. Primer par de pleópodos en el macho forma I con el proceso mesial aplanado en sentido cefalocaudal; proyección central poco desarrollada y hombro cefálico muy inclinado en la porción distal y con una depresión bien marcada en el declive, *annulus ventralis* de la hembra hendido en la porción cefálica por un surco que se extiende desde la base hasta el ápice (Villalobos, 1954).

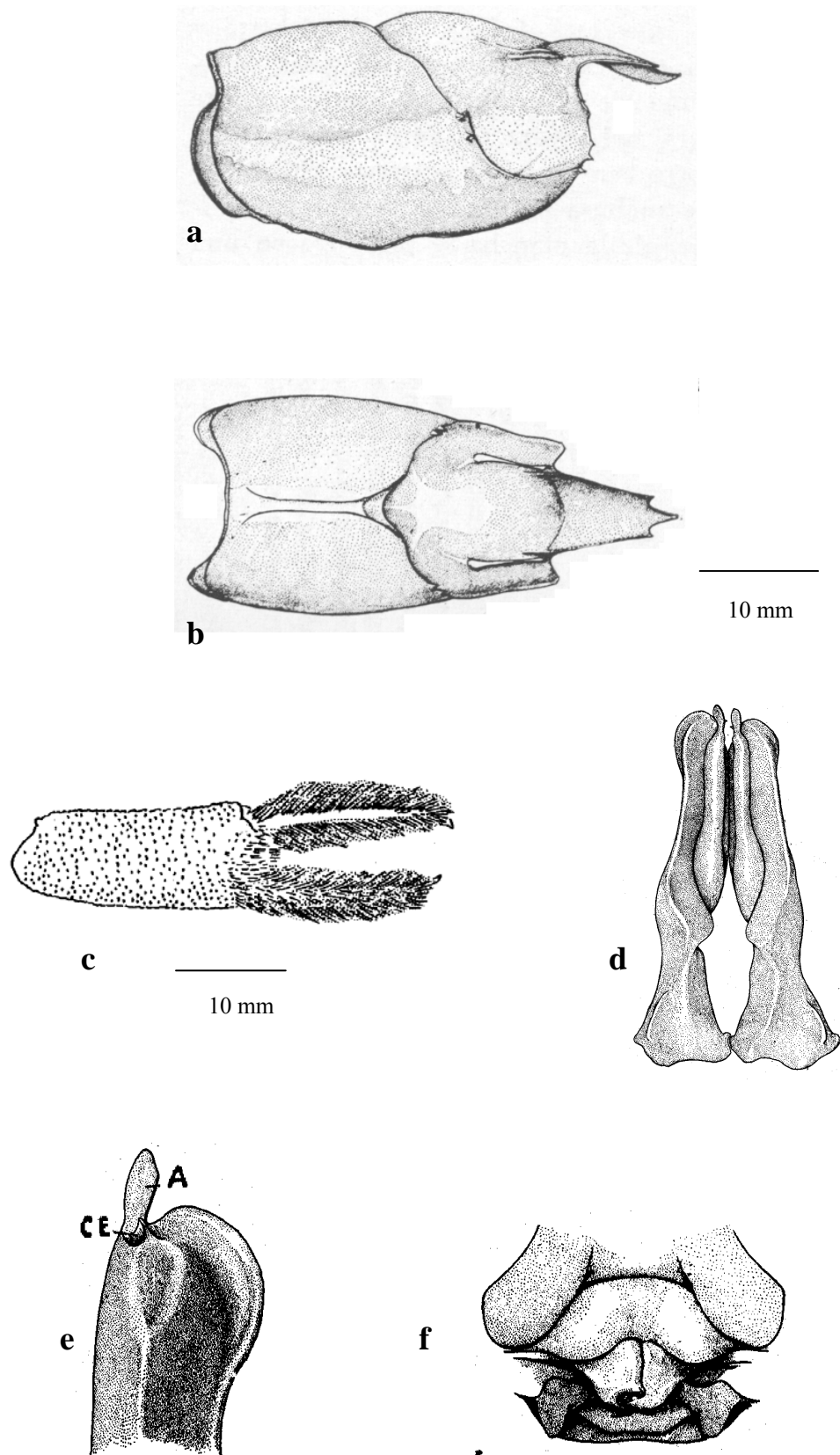


Figura 1. a. Vista lateral del caparazón con dos espina laterales y tres espinas branquiostegales en cada lado. b. Vista dorsal del caparazón con el rostro ancho en su base, espina acuminada larga y puntiaguda. c. Quela mostrando la pubescencia de los dedos. d. Primer par de pleópodos en el macho forma I. e. Proceso mesial (A) aplanado en sentido cefalocaudal y proyección central (CE) poco desarrollada; hombro cefálico muy inclinado en la porción distal y con una depresión en el declive. f. *Annulus ventralis* de la hembra hendido en la porción cefálica por el surco. Tomado de Villalobos (1954).

## **La península de Yucatán**

La península de Yucatán es la porción expuesta de la Plataforma de Yucatán, la cual separa al Golfo de México del Mar Caribe. La plataforma tiene una extensión de 300 000 km<sup>2</sup> (López, 1981) y el área de tierra expuesta representa aproximadamente la mitad del total. En México, los movimientos tectónicos posteriores al periodo Cretácico, combinados con las fluctuaciones en el nivel del mar, causaron que la porción norte de la península de Yucatán, que se encontraba en la plataforma continental a poca profundidad, emergiera y quedaran expuestas la piedra caliza y el material de arrecife de coral que la forman. La porción meridional inició su emersión sobre el nivel del mar durante el Oligoceno y Mioceno, el resto se levantó gradualmente a partir del Plioceno, y en el Cuaternario el ascenso continuó al norte y hacia la periferia. La topografía cárstica de esta región es resultado de la erosión de la roca caliza que produce una superficie áspera y porosa, numerosos acuíferos y la percolación del agua superficial (Lugo *et al.*, 1992; Graham, 2003).

A causa de esta historia geológica, la península de Yucatán ofrece una variedad de hábitats únicos que sólo algunas especies dulceacuícolas epigeas han logrado colonizar. Además, cambios periódicos en el nivel del mar, debido a las glaciaciones, han ocasionado expansiones y contracciones de los cuerpos de agua dulce de la península, resultando en la fragmentación de las poblaciones actuales. El tipo de distribución discontinua que se observa sugiere que la dispersión de los organismos y el flujo génico entre poblaciones dulceacuícolas no ocurren regularmente (Beddows, 2003).

## **Estudios moleculares**

La incorporación de técnicas moleculares a la sistemática tiene una breve historia que se inicia en la década de 1980 y le ha dado un nuevo impulso a esta área de la biología. En la búsqueda de caracteres que pudieran ser utilizados como evaluadores de la filogenia, se han integrado los recientes avances de las técnicas de estudio en “anatomía comparada” con marcadores genéticos, de los cuales existe una gran diversidad que va de la estructura cromosómica a las secuencias del ADN (Navarro y Hernández, 1999; Botello, 2009). Los marcadores moleculares son una herramienta útil en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina y estudios forenses. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos

o múltiples (Rentería, 2007). Todos los marcadores genéticos cuantifican la variación en el ADN, sin embargo, son las secuencias el único método que identifica los pares exactos de bases que difieren entre los individuos (Freeland, 2005). Botello (2008) hizo una revisión bibliográfica donde aparecen estudios que utilizan técnicas moleculares con especies mexicanas de crustáceos entre los años 1985 y 2005. Las técnicas más utilizadas fueron las secuencias basadas en genes mitocondriales completos o parciales y las enzimas (alozimas e isozimas).

En animales los genes mitocondriales son marcadores genéticos ampliamente usados debido a que tienen características útiles para estudios inter e intraespecíficos. Entre tales características están, que muchos de los oligonucleótidos o primers son universales lo que permite utilizarlos para amplificar regiones a través de diferentes taxa. También existe un gran número de copias de ADN mitocondrial en las células, permitiendo obtener amplificaciones de muestras provenientes de museos o en ocasiones de restos arqueológicos como huesos o dientes. Además, el ADN mitocondrial presenta una mayor tasa de mutación que el genoma nuclear, lo cual se debe a los mecanismos de reparación poco eficientes con que cuenta, comparados con el ADN nuclear. Otra característica relevante es que el tamaño efectivo de la población con el ADNmt es un cuarto de la que se obtiene con los genes nucleares diploides, por lo que la frecuencia de haplotipos puede derivar rápidamente, creando diferencias genéticas entre poblaciones en poco tiempo. Los haplotipos son una forma particular de un gen o de una secuencia de ADN haploide, en ecología molecular son comúnmente utilizados para referir los genomas de los organelos, mitocondria y cloroplasto. Finalmente, debido a que no hay recombinación entre el ADNmt, cada haplotipo heredado tiene sólo un ancestro en la generación previa, lo que permite usar la distribución de haplotipos y la frecuencia relativa para inferir relaciones históricas entre poblaciones, en animales esta herencia es matrilineal, con algunas excepciones (Beebee y Rowe, 2004; Freeland, 2005).

Se puede acceder al genoma mitocondrial utilizando oligonucleótidos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, *et al.* 1988). La PCR fue creada en el año 1985 por Kary Mullis y colaboradores, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de sintetizar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Además de la ADN polimerasa y de los promotores también se requieren un buffer que establezca la reacción, dNTP's que son los nucleótidos que arman la cadena complementaria y cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) pues sin este la ADN polimerasa es

inactiva. Son tres los pasos que se realizan en la PCR, el primero es la desnaturalización de la molécula de ADN para lo cual se debe elevar la temperatura aproximadamente a 94 °C, cada cadena actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación se baja la temperatura, entre 40 y 60 °C, para que ocurra el alineamiento de los cebadores a su región específica dentro de la cadena de ADN. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa a 72 °C, estos tres pasos se repiten por varios ciclos incrementándose la cantidad de amplificado de manera exponencial. El amplificado de la PCR se puede después secuenciar y así comparar genes homólogos de especies estrechamente relacionadas y de poblaciones dentro de las especies (Hillis *et al.*, 1996).

El gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) es un gen funcional, es decir codifica para una proteína. Presenta una tasa de cambio aproximada de 2% por millón de años (Cox y Hebert, 2001) y sus secuencias de aminoácidos son altamente conservadas a través de los niveles jerárquicos superiores al de especie, haciendo fácil alinear una secuencia con respecto de otra. Debido a este nivel de conservación, las sustituciones en los aminoácidos son raras entre las especies, lo cual permite ser una herramienta para distinguir las. Además, las secuencias de sus aminoácidos pueden ser usadas en reconstrucciones filogenéticas de ramas evolutivas basales (Hillis *et al.*, 1996).

A la par del perfeccionamiento de las técnicas moleculares de secuenciación se han desarrollado aproximaciones metodológicas para analizar los datos generados, por ejemplo los métodos que hacen estimaciones filogenéticas del parentesco de los organismos, los cuales pueden ser de varios tipos, siendo los más utilizados los métodos de reconstrucción y los métodos de optimización. Los primeros convierten la información de las secuencias alineadas en una matriz de distancias pareadas de acuerdo a alguna medida predeterminada, que generalmente es la cantidad de disimilitud entre secuencias, desechando así los datos reales. Los segundos consideran la variación en cada nucleótido directamente y estiman cual es la topología más probable con base en los datos. Dentro de los métodos de distancia se encuentran los algoritmos de mínima evolución, UPGMA y Neighbour Joining (NJ), este último agrupa las secuencias más cercanas tratando de minimizar la longitud total del árbol. Para los métodos de optimización o de búsqueda de árboles, el más común es el de máxima parsimonia y los métodos probabilísticos como el de máxima verosimilitud y el bayesiano (Page y Holmes, 1998; Goyenechea y Contreras, 2007). Otra aproximación para analizar los

datos generados son los estudios de filogeografía, como el utilizado en el presente trabajo, los cuales son relativamente nuevos. Los estudios filogeográficos se desprenden de la ecología y más específicamente de la ecología molecular por la utilización de marcadores moleculares para explorar problemas en ecología y evolución. El término fue introducido por John Avise y colaboradores en 1987. La filogeografía relaciona la variación genética que hay entre las poblaciones de la misma especie, o de especies cercanamente emparentadas, con su distribución geográfica (Vázquez, 2007).

En ese mismo año Templeton (1987) propuso el NCPA (Nested Clade Phylogeographic Analysis), o análisis filogeográfico de clados anidados, para distinguir los distintos procesos que pudieron influenciar la distribución geográfica actual de la variación genética observada. El anidamiento se forma sobre una red de haplotipos agrupando los clados o conjuntos de ramas terminales de la red que estén separados por una mutación anterior, después por dos pasos y así sucesivamente, los datos se escriben en una hoja de texto y se analizan con el programa GeoDis 2.5 (Posada *et al.*, 2000). El archivo resultante de este análisis consiste en estadísticos que pueden interpretarse en términos biológicos mediante la clave de inferencia de Posada y Templeton (2005). Las claves de inferencia están basadas en la relación entre diferentes medidas de distancia geográfica y genética que resultan en tres diferentes factores biológicos: flujo génico restringido, particularmente debido a aislamiento por distancia, eventos de fragmentación típicamente alopátricos y la expansión de rango. Por lo anterior, es importante para el NCA el tamaño de muestra, el número de sitios muestreados y la resolución genética de los marcadores (Templeton *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2007). Al analizar los clados anidados de una red de haplotipos es posible relacionar la variación genética entre las poblaciones con la distribución geográfica de los haplotipos (Templeton, 1998).

Tomando en cuenta que *P. (A.) llamas* habita en diferentes tipos de cuerpos de agua y rangos de salinidad en regiones diversas de la península de Yucatán, se planteó un estudio para efectuar comparaciones entre poblaciones. Utilizando una región del gen mitocondrial COI para obtener la variación genética y relacionarla con la distribución geográfica de este acocil, se pretendió investigar si existen especies crípticas o si existen niveles bajos de diferenciación, así como encontrar los mecanismos que expliquen ese patrón y los que expliquen la distribución actual.



## ANTECEDENTES.

### Estudios sobre acociles

Las investigaciones taxonómicas para los cambáridos en México se iniciaron en el siglo XIX con las publicaciones de investigadores europeos, quienes mediante colectas propias y de otros naturalistas, trataron de integrar los primeros conocimientos de estos crustáceos en el continente americano. Entre ellos destaca Erichson quien en 1846 realizó el primer estudio de los cambáridos mexicanos describiendo dos nuevas especies del género *Astacus* (*Cambarus*): *A. (C) weigmanni* y *A. (C) mexicanus* apuntando como localidad a México. A principios del siglo XX, Ortmann (1905a) publicó un trabajo en el que reconoce cuatro subgéneros del género *Cambarus*: *Bartoni*, *Cambarus*, *Faxonius* y *Cambarellus*. En ese mismo año Ortmann (1905b) cambia el nombre del subgénero *Cambarus* a *Procambarus*. Finalmente Hobbs (1942) eleva el subgénero *Procambarus* a nivel de género (Villalobos, 1955; Hobbs, 1972b, 1989).

De 1943 a 1950, Alejandro Villalobos inicia una serie de estudios taxonómicos sobre los cambáridos de México recolectando material de distintas zonas del territorio nacional, con lo cual registra la presencia de varias especies. Esto lo lleva a modificar la diagnosis propuesta por Ortmann (1905b) y Hobbs (1942) para el género *Procambarus*. En 1954 describe la especie *Procambarus* (*A.*) *llamasi* cuya localidad tipo es Santa Rita, 47 km al Este de Escárcega en Campeche, y un año después (Villalobos, 1955) realiza la primera síntesis de los cambáridos mexicanos en la que incluye datos ecológicos, describe las localidades de las formas conocidas y fue el primero en organizar a las especies mexicanas en secciones de acuerdo a sus caracteres morfológicos (Rojas, 1998).

Entre 1972 y 1989, el carcinólogo estadounidense H. H. Hobbs, Jr., realizó importantes aportaciones taxonómicas para el grupo, dividió el género *Procambarus* en 16 subgéneros y unió a los grupos *mexicanus*, *pilosimanus* y *cubensis* en el subgénero *Austrocambarus* (Hobbs, 1972a). Desarrolló claves de identificación para las familias Astacidae y Cambaridae (Hobbs, 1972b). Estableció el arreglo taxonómico que actualmente se usa para el infraorden Astacidea incluyendo en él a las familias Astacidae y Cambaridae (Hobbs, 1974) y, finalmente, integró listas de las especies de ambas familias en América con detalles de su distribución, observaciones y dibujos de los rasgos más importantes para su identificación taxonómica (Hobbs, 1989).

Con respecto a la biología de *P. (A.) llamasi*, Carmona *et al.* (2002, 2003, 2004, 2005) y Rodríguez (1999) realizaron diferentes estudios donde incluyen maduración y crecimiento de los huevos de estos acociles en condiciones diferentes de luz y nutrientes, su desarrollo gonadal, así como diferentes dietas para utilizarlos en acuicultura. Álvarez *et al.* (2007a) realizaron estudios de fisiología y morfometría en poblaciones de *P. (A.) llamasi* para estudiar las adaptaciones que presentan estos acociles que les permiten habitar ambientes con características diferentes. Ellos analizaron la respuesta fisiológica de los organismos en tres poblaciones con diferentes salinidades, que van desde agua dulce hasta salobre. Los acociles presentaron una capacidad para hiperregular, lo cual les permite adaptarse a condiciones cambiantes por debajo de salinidades de 10 ppm (Muñoz, 2009). En el análisis morfométrico se observó una variación típica entre las poblaciones al relacionar la longitud del acumen con la longitud total; sin embargo, al observar otros parámetros se obtienen diferencias significativas que varían entre diferentes poblaciones. Este estudio sugiere un cierto grado de adaptación local en *P. (A.) llamasi*, dejando abierta la interrogante de cual es el grado de diferenciación genética y si ésta tiene alguna correspondencia con los patrones de distribución observados.

### **Sistemática molecular**

En diferentes estudios, y en función del nivel taxonómico así como del objetivo del trabajo, se han utilizado diferentes marcadores genéticos. Schubart *et al.* (1998b) utilizaron secuencias publicadas en estudios previos donde se ocupa el gen 16S ARNr para cuestiones de sistemática o comparación de poblaciones de crustáceos, además de presentar nuevas secuencias del gen. Este gen presenta estructura secundaria por lo que en sus secuencias de nucleótidos se combinan regiones conservadas con variables, las regiones conservadas facilitan el alineamiento y permiten hacer reconstrucciones filogenéticas entre las especies y estudios a nivel de población.

Crandall *et al.* (2000) utilizaron secuencias de las regiones 18S ADNr, 28S ADNr y 16S ADNmt para estimar las relaciones filogenéticas entre la familia Astacidae, Cambaridae y Parastacidae que comprenden a los acociles, pues pese a que estos organismos sirven como modelo biológico para varios estudios, su estado filogenético no era claro. En este estudio se confirma la hipótesis sobre el origen monofilético de las tres familias propuesto anteriormente con caracteres morfológicos. En sus resultados se agrupa al género *Cambaroides* con la familia Astacidae y no con

Cambaridae donde comúnmente se ubicaba. Crandall y colaboradores apuntan que el fuerte soporte del origen monofilético y la distribución geográfica del grupo sugiere el origen de los acociles en la Pangea durante el periodo Triásico (185-225 millones de años atrás) y que la separación de las dos superfamilias esta dada por la división de la Pangea en Laurácea y Gondwana.

Grishanin *et al.* (2005) exploraron la variedad que existe en el número de cromosomas, tamaño del genoma y similitudes en las secuencias del gen 18S ADN ribosomal para el complejo de especies crípticas de *Acanthocylops vernalis* (Copepoda) del Norte de América en los lagos de Wisconsin y Ohio. Ellos observan similitudes en su morfología y el tamaño de su genoma, no así en el cariotipo y en las secuencias del ADN. Lo anterior permite que *A. vernalis* pueda adaptarse a diferentes hábitats de manera exitosa. Finalmente exponen que la fragmentación en los hábitats de este copépodo terminará por aislar las diferentes formas del complejo *A. vernalis*.

Buhay y Crandall (2005) utilizaron la región 16S ADNmt para estudiar la filogenia y filogeografía de los acociles subterráneos del género *Orconectes* en la placa de Cumberland, al sureste de los Estados Unidos. Este género comprende tres especies estigobíticas: *O. incomptus*, *O. australis* (con dos subespecies *australis* y *packardi*) y *O. sheltage*. A pesar de la creencia sobre el estado en riesgo de las especies estigobíticas, sus resultados muestran que las especies de acociles subterráneos han alcanzado niveles de diversidad genética que va de moderada a alta, con tamaños poblacionales más altos de lo esperado, además el Análisis de Clados Anidados muestra un extenso flujo génico dentro del sistema cárstico.

En cuanto a la utilización de COI para resolver problemas taxonómicos en crustáceos se pueden mencionar los siguientes estudios. Gurney *et al.* (2006) secuenciaron este gen mitocondrial en 17 organismos de la especie *Sacculina carcini* que parasita tres especies diferentes de portúnidos *Carcinus maenas*, *Liocarcinus marmoreus* y *L. holsatus* en diferentes regiones del norte de Europa. Debido a que existen pocos caracteres morfológicos en los cuales se pueda basar un análisis taxonómico, los autores utilizaron el COI para advertir que es la misma especie de *S. carcini* la que parasita a los tres hospederos. Finalmente sugieren que el análisis de las secuencias del gen COI puede ser un método que resuelva problemas sobre filogeografía, genética de poblaciones y taxonomía de los rizocéfalos.

Taylor y Hardman (2002) obtuvieron secuencias del gen mitocondrial COI para establecer relaciones filogenéticas entre acociles en el subgénero *Crockerinus*, del

género *Orconectes*. Los análisis filogenéticos se realizaron con criterios de máxima parsimonia y máxima verosimilitud obteniendo dendrogramas que no apoyan la monofilia del subgénero sin embargo, sustentan parcialmente la clasificación basada en la morfología del primer pleópodo del macho. Ellos demostraron el uso potencial del COI para inferir relaciones interespecíficas entre los cambáridos.

Trontelj *et al.* (2004) realizaron un estudio filogenético y filogeográfico de dos especies del género *Austropotamobius*, *A. torrentium* y *A. pallipes* que se distribuyen a lo largo de Europa. Determinaron la genealogía y distribución geográfica de los haplotipos y obtuvieron, por los métodos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud, dos árboles con topologías congruentes que establecen la monofilia del género en Europa.

Carini y Hughes (2004) estudiaron la estructura genética poblacional de *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae), un camarón de agua dulce que habita en ríos altamente fragmentados al oeste de Queensland, Australia. Estudiaron los patrones de dispersión, obteniendo del análisis de diferencia poblacional un alto grado de subdivisión genética y flujo génico restringido. En el análisis filogenético detectaron rangos históricos de expansión que pudieron ser ocasionados por las fluctuaciones climáticas durante el Pleistoceno.

Buhay y Crandall (2008) continuaron con el estudio de los acociles de cavernas del género *Orconectes* en la Placa de Cumberland al sur de los Apalaches, Estados Unidos, esta vez utilizaron tres genes mitocondriales, el 12S, 16S y COI. Describieron una nueva especie, *Orconectes barri*, y elevaron a nivel de especie a la subespecie *O. a. packardi*, además de incluir sus estatus de conservación. Los autores llegan a la conclusión de que el sólo uso de la morfología del pleópodo del macho forma I no es suficiente para la descripción de estas especies estigobíticas.

En resumen, estos antecedentes sugieren que el uso de marcadores moleculares como el COI en crustáceos decápodos ha sido de gran utilidad, en particular este gen mitocondrial ha demostrado tener un grado de resolución a nivel de especie suficientemente bueno. Es decir, ha sido posible en su caso identificar poblaciones que integraban diferentes especies, o bien, grupos de poblaciones altamente variables morfológicamente que en realidad constituyen una sola especie.

## OBJETIVO

### General

- Contribuir al conocimiento de los crustáceos de agua dulce de México, por medio de un estudio sobre la variación genética en *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* de la península de Yucatán.

### Particulares

- Describir la variación genética en el gen mitocondrial COI, en diferentes poblaciones de *Procambarus (A.) llamasi*.
- Relacionar la variación genética de *P. (A.) llamasi* con su distribución geográfica.
- Identificar la posible presencia de especies crípticas del género *Procambarus* en la península de Yucatán, utilizando un marcador mitocondrial.

## HIPÓTESIS

Ya que *Procambarus (A.) llamasi* presenta un patrón de distribución fragmentado en diferentes regiones y habita en ambientes contrastantes de la península de Yucatán, se esperaría encontrar poblaciones genéticamente estructuradas con haplotipos propios de cada población.

## ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio comprende la porción mexicana de la península de Yucatán que se encuentra entre los 86° y 92° longitud oeste y los 18° y 22° latitud norte y representa el 2% de la superficie del país, con 39,340 km<sup>2</sup>. La península de Yucatán presenta una superficie sensiblemente plana, su principal rasgo fisiográfico es la sierrita de Ticul con una extensión de 110 km y una altura máxima de 275 msnm. Este rasgo separa la topografía de la región en dos, la parte norte con extensas planicies y pendientes desde los 50 m hasta el nivel del mar y lomeríos prolongados con pequeños valles hasta de 150 msnm en la parte sur oriental. Los principales ejes estructurales de la península están asociados con la sierrita de Ticul (falla de tipo normal) y el sistema Bacalar-Río Hondo (fallas normales escalonadas) que va desde el sur del estado de Yucatán hasta la zona de Tulúm, Quintana Roo. Otros rasgos estructurales son las fracturas que se encuentran en la parte noreste de la península conocida como la zona de fracturas de Holbox, que se extiende por el este desde Cabo Catoche a Chetumal y pudiera estar relacionada con el sistema Bacalar-Río Hondo (Fig. 2) (Marín *et al.*, 2004). Estas fallas definen la existencia de tres cuencas hidrológicas, lo que provoca que el agua de cenotes y ríos subterráneos corra en dirección distinta dependiendo del lugar de la península de que se trate (Beddows, 2003).

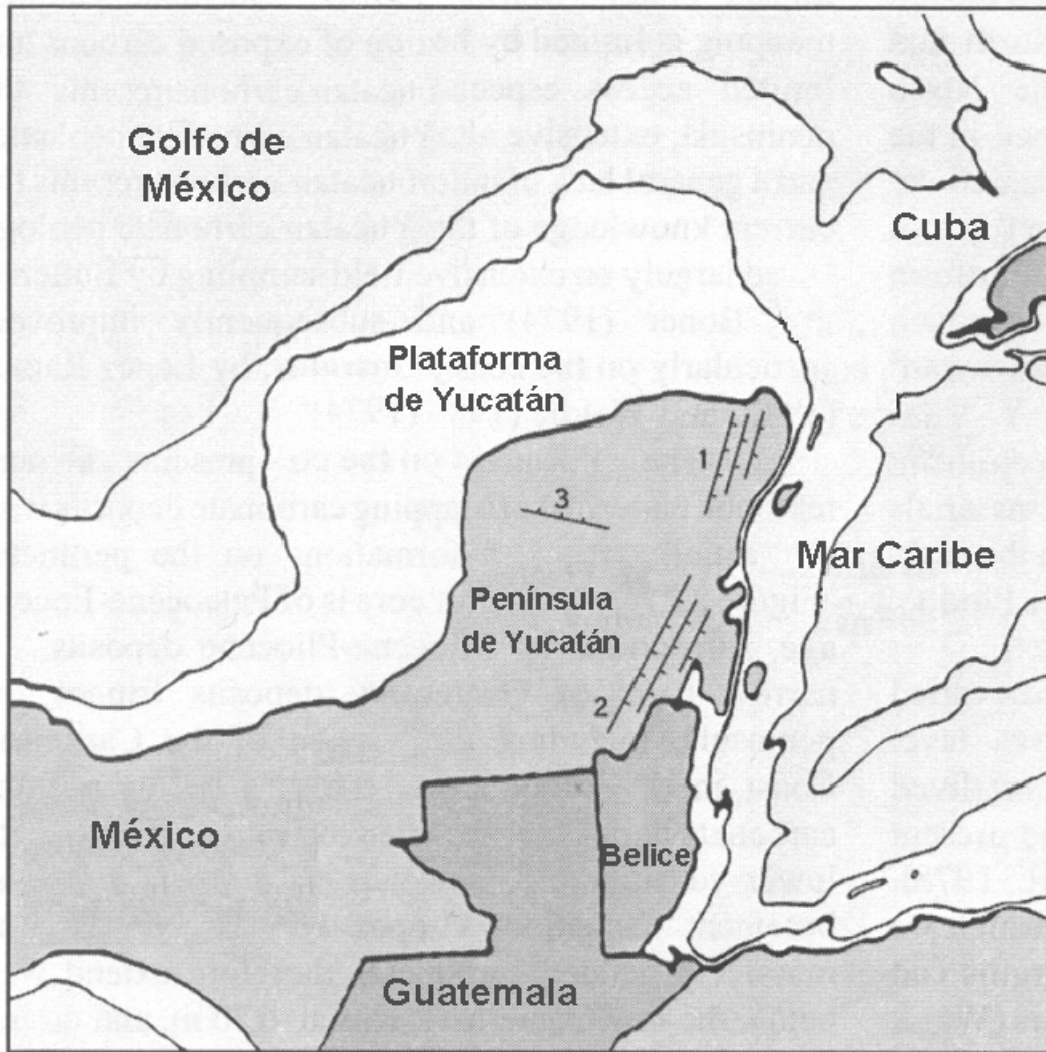


Figura 2. Plataforma de Yucatán y península de Yucatán con las zonas de falla: (1) Holbox, (2) Río Hondo y (3) Sierrita de Ticul. Modificado de Beddows (2003).

Las colectas se realizaron en 10 poblaciones de *P. (A.) llamas* en la península de Yucatán cubriendo los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Tabla 1; Fig. 3). Algunas características químicas de las localidades son salinidades que van de 0.09 a 16.7 ppm., con concentraciones de oxígeno disuelto de 1.8 a 6.7 mg/l<sup>-1</sup>. Dentro de las características físicas se presentaron temperaturas de 21.6 a 30.2 °C, ambientes como lagunas, ríos o humedales con suelos de tipo rocoso, arcilloso, grava o arena.

Tabla 1. Ubicación de las localidades muestreadas de *Procambarus (A.) llamas* en la península de Yucatán, abreviación en los mapas y número de organismos para el análisis.

Estado	Localidad	Abreviación	Latitud (N)	Longitud (W)	Número de organismos
Campeche	Sabancuy	Sa	18°53'21.9"	91°02'21.9"	7
	Blanca Flor	Bl	18°54'43"	88°28'39.5"	3
	Cacao	Ca	18°12'03.3"	88°45'17"	5
	Chichankaanab	Ch	19°49'12"	88°46'48"	7
Quintana Roo	González Ortega	Go	18°29'15.1"	88°38'25.8"	6
	Mahahual	Ma	18°58'17.9"	87°57'25.9"	5
	Nueva Jerusalém	Nu	18°59'20.5"	88°33'33.6"	3
	Río Hondo	Rí	18°11'12.3"	88°41'40.4"	9
	Xpujil	Xp	18°29'22.3"	89°15'46.1"	5
Yucatán	Sisal	Si	21°10'17.9"	89°59'50.5"	3

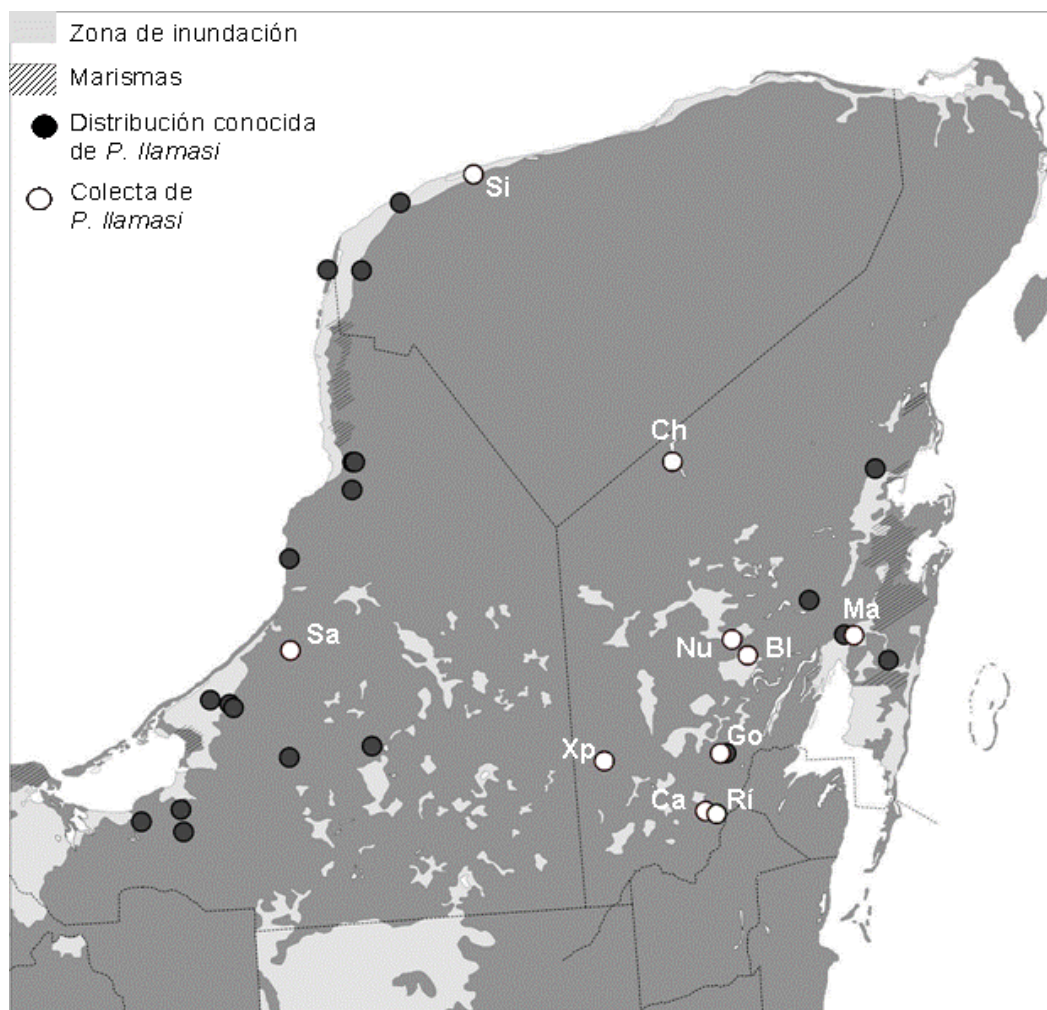


Figura 3. Distribución de *Procambarus (A.) llamas* en la península de Yucatán de acuerdo a los registros de ejemplares depositados en la Colección Nacional de Crustáceos y puntos de colecta.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Trabajo de campo y gabinete

Se recolectaron 53 organismos en 10 poblaciones de *P. (A.) llamasi* en la península de Yucatán. Los muestreos se realizaron con una red de cuchara en lugares con cuerpos de agua permanentes o con poco movimiento, preferentemente en las orillas del cuerpo de agua y donde abundaba la vegetación. Los organismos se preservaron en alcohol al 96% (Dessauer *et al.*, 1996) y se trasladaron a la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR), Instituto de Biología, UNAM. Los números de catálogo y localidades son: Sabancuy CNCR 24892, 24889 y 24893, Blanca Flor CNCR 24897, Cacao CNCR 24896, Chichankanab CNCR 24883, González Ortega CNCR 24900, Mahahual CNCR 24902, Nueva Jerusalém CNCR 24898, Río Hondo CNCR 24903 y Xpujil CNCR 24885 y Sisal CNCR 24895.

Los acociles se identificaron con las claves taxonómicas de Hobbs (1972a) y Villalobos (1955).

### Trabajo de laboratorio

Posteriormente se realizaron disecciones en el abdomen (0.5 cm) para obtener tejido muscular. Se siguió el protocolo de extracción de fenol-cloroformo para la obtención de ADN total, cuyo último paso es suspenderlo en 100 µl de agua bidestilada y almacenar a -20 °C (Hillis *et al.*, 1996). Posteriormente se amplificó mediante PCR (Hillis *et al.*, 1996) un fragmento del gen COI mitocondrial utilizando los oligos LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer, 1994). El programa de amplificación utilizado se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Programa utilizado en la PCR para la amplificación del ADN.

	<b>T (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Acción</b>
1	94	01:00	Desnaturalización
2	94	00:30	Desnaturalización
3	48	00:30	Alineamiento
4	72	01:30	Síntesis
	Ir al paso 2 y repetir 35 veces		
5	72	01:30	Síntesis
6	4	∞	

Los productos de la PCR se purificaron con columnas Montage™ PCR (Millipore, Bedford U. S. A.), resuspendiendo en 20 µl de ddH<sub>2</sub>O. El paso siguiente fue la secuenciación cíclica en ambas direcciones (Hillis *et al.*, 1996) utilizando el kit BigDye Terminador y los mismos oligonucleótidos (Tabla 3). Para recobrar el ADN se utilizaron las columnas Centri Sep Spin Columns (Princeton Separations, Adelphia N. J.). Los productos fueron procesados en el secuenciador automático 3100 Genetic Analyzer (16 capilares) ABI Prism. El termociclador utilizado tanto en la PCR como en la reacción de secuencias fue un Eppendorf Mastercycler Gradient. Para comprobar si se tenía ADN después de la extracción y amplificado al término de la PCR, se hicieron electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con un UV transiluminador UVP.

Tabla 3. Programa utilizado en la reacción de secuencias.

	<b>T (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
1	94	02:00
2	94	00:05
3	48	00:10
4	60	04:00
	Ir al paso 2 y repetir 25 veces	
5	60	05:00
6	4	∞

### **Análisis**

Una vez obtenidas, las secuencias se visualizaron con el programa Chromas 2 y se alinearon manualmente con el programa BioEdit 7 (Hall, 1999). Al tener todas las secuencias alineadas, se calculó la frecuencia de nucleótidos con el programa PAUP (Swofford, 2002) y la diversidad nucleotídica “ $\pi$ ” con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) la cual permite determinar el grado de variación entre las diferentes secuencias (Avice, 1999), con la siguiente fórmula:

$$\pi = \sum f_i f_j p_{ij}$$

donde  $p_{ij}$  es la divergencia de secuencias entre los haplotipos  $i$  y  $j$ . También se calculó la distancia  $p$  que se obtiene dividiendo la proporción de sitios variantes entre el total de nucleótidos, y la chi cuadrada ( $\chi^2$ ) para saber si existen diferencias significativas entre las secuencias. Lo anterior con el programa PAUP (Swofford, 2002).

Se identificaron los diferentes haplotipos y se obtuvo su diversidad “HD” con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009), que utiliza la fórmula:

$$HD = 1 - \sum f_i^2$$

donde  $f_i$  es la frecuencia de  $i$  haplotipos. Utilizando el programa PAUP (Swofford, 2002) se elaboró un dendrograma de distancia sin corregir, con el método de agrupamiento del vecino más cercano (NJ) y la distancia  $p$  como modelo nucleotídico. Para probar el soporte de las ramas se llevó a cabo un *bootstrap* con 1000 réplicas. Como grupo externo se utilizó una secuencia de *Procambarus (A.) sp.* obtenida de organismos colectados en San Antonio Tzujula y Las Rosas, Chiapas.

Para estimar el grado de diferenciación entre las poblaciones se utilizó el coeficiente de diferenciación entre haplotipos  $F_{ST}$  con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009).

Se elaboró un análisis de clados anidados (NCA; Templeton *et al.*, 1995) donde como primer paso se obtuvo una red de haplotipos utilizando el método de parsimonia estadística con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), para saber el grado de relación entre las poblaciones. La red de haplotipos se utiliza como base para definir una serie jerárquica de clados anidados. El anidamiento se elaboró manualmente de acuerdo a los criterios propuestos por Templeton *et al.* (1995). Se inicia desde los extremos hasta el interior del árbol, agrupando los haplotipos separados por una mutación para formar clados de un paso. Posteriormente estos clados de un paso que estén separados por una mutación se agrupan en clados de dos pasos y así hasta que el último nivel de anidación abarque todo el árbol. Esta serie de ramas anidadas constituye un diseño estadístico evolutivo. Para realizar el análisis cladístico anidado se utilizó el programa GEODIS 2.5 (Posada *et al.*, 2000), donde se introducen las coordenadas geográficas de las poblaciones. En los clados anidados se calculan dos distancias: la distancia al clado ( $D_c$ ) que mide la dispersión geográfica de cada uno de los clados y la distancia al clado anidado ( $D_n$ ) que mide como está distribuido geográficamente el clado con relación a otros clados en el mismo nivel de categoría anidada (Hernández *et al.*, 2007). Las distancias y sus valores de significancia fueron revisados en los diferentes clados y se buscaron los patrones de distribución entre haplotipos como fragmentación, expansión de la distribución, aislamiento por distancia u otros, empleando la clave de inferencia revisada por Posada y Templeton (2005). El objetivo de este procedimiento

es el de relacionar la variación de haplotipos con la distribución geográfica (Templeton *et al.*, 1995).

Para calcular el tiempo de divergencia de las secuencias se utilizaron dos tasas de mutación del COI, la que presentan especies hermanas de camarones chasqueadores del Istmo de Panamá *Alpheus* spp. de 1.2% por millón de años (Ketmaier *et al.*, 2003) y la que presentan los grápsidos de género *Sesarma* en la isla de Jamaica de 2.3% por millón de años (Schubart *et al.* 1998a). Con las tasas de mutación se hizo una regla de tres de la siguiente manera: divergencia genética observada en *Procambarus (A.) llamas* por un millo entre 1.2 para calcular el mayor tiempo de divergencia o 2.3 para el menor tiempo.

## RESULTADOS

Se analizaron 53 secuencias de 10 poblaciones. La longitud de la región amplificada en el gen mitocondrial COI fue de 642 pb que corresponde al intervalo entre los sitios 40 y 681 del gen completo (1534 pb) de la jaiba *Callinectes sapidus* (GenBank número de acceso AY682075). La frecuencia de nucleótidos en el alineamiento fue de A= 0.2604, C= 0.1371, G= 0.2038, T= 0.3987, no existiendo diferencias significativas entre los nucleótidos de las secuencias ( $\chi^2 = 0.295$ , gl= 156, p=1). La diversidad nucleotídica total de la especie con este gen fue de  $\pi = 0.0045$  (Tabla 4). Las secuencias muestran 14 sitios variables de los cuales 12 son informativos. Las distancias genéticas, sin corregir, entre secuencias van de  $p = 0$  a 0.01713, lo que equivale a de 0 a 11 sitios variables. Todos los cambios encontrados entre las bases son transiciones en la tercera posición del codón. Existen 10 haplotipos (Tabla 5) con una diversidad total de HD = 0.532 (Tabla 4). La Tabla 4 muestra la diversidad nucleotídica y la diversidad de haplotipos por población, se puede observar que Cacao, Río Hondo y Sabancuy son las únicas localidades que presenta una  $\pi$  y HD diferente de cero. La distribución de los haplotipos en la península de Yucatán se muestra en la figura 2.

Tabla 4. Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y diversidad de haplotipos (HD) por población y total.

<b>Población</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>HD</b>
Cacao	0.00156	0.800
Mahahual	0	0
Río Hondo	0.00130	0.694
Sabancuy	0.00119	0.524
Blanca Flor	0	0
González Ortega	0	0
Nueva Jerusalém	0	0
Xpujil	0	0
Sisal	0	0
Chichankanab	0	0
<b>Total</b>	<b>0.00446</b>	<b>0.532</b>



Sisal	5	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	6	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Chichankanab	1	J	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	4	J	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	5	J	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	1	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	2	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
3	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
4	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
5	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
7	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
12	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	

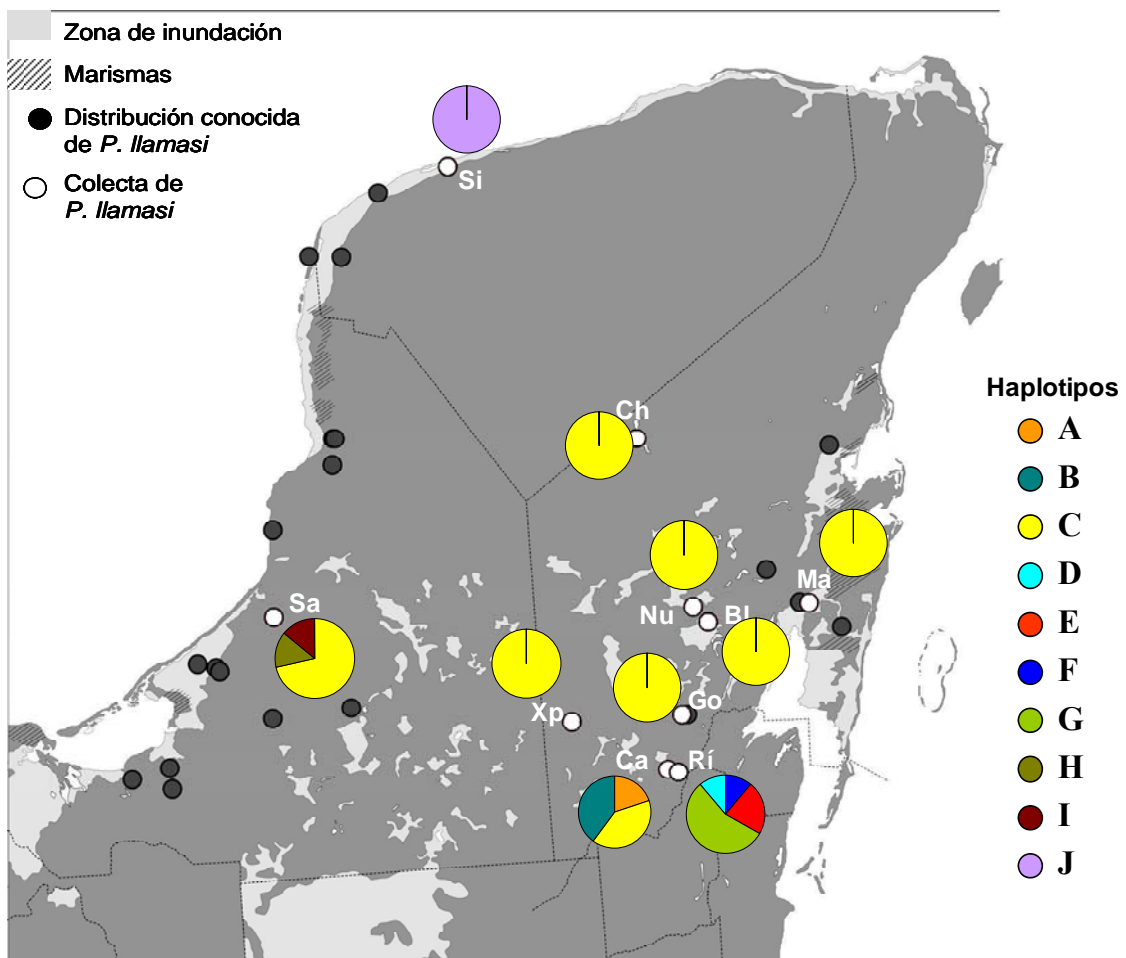


Figura 2. Mapa de las localidades de *Procambarus (A.) llamasi* con la frecuencia de los haplotipos del gen COI propios de cada población en la península de Yucatán.

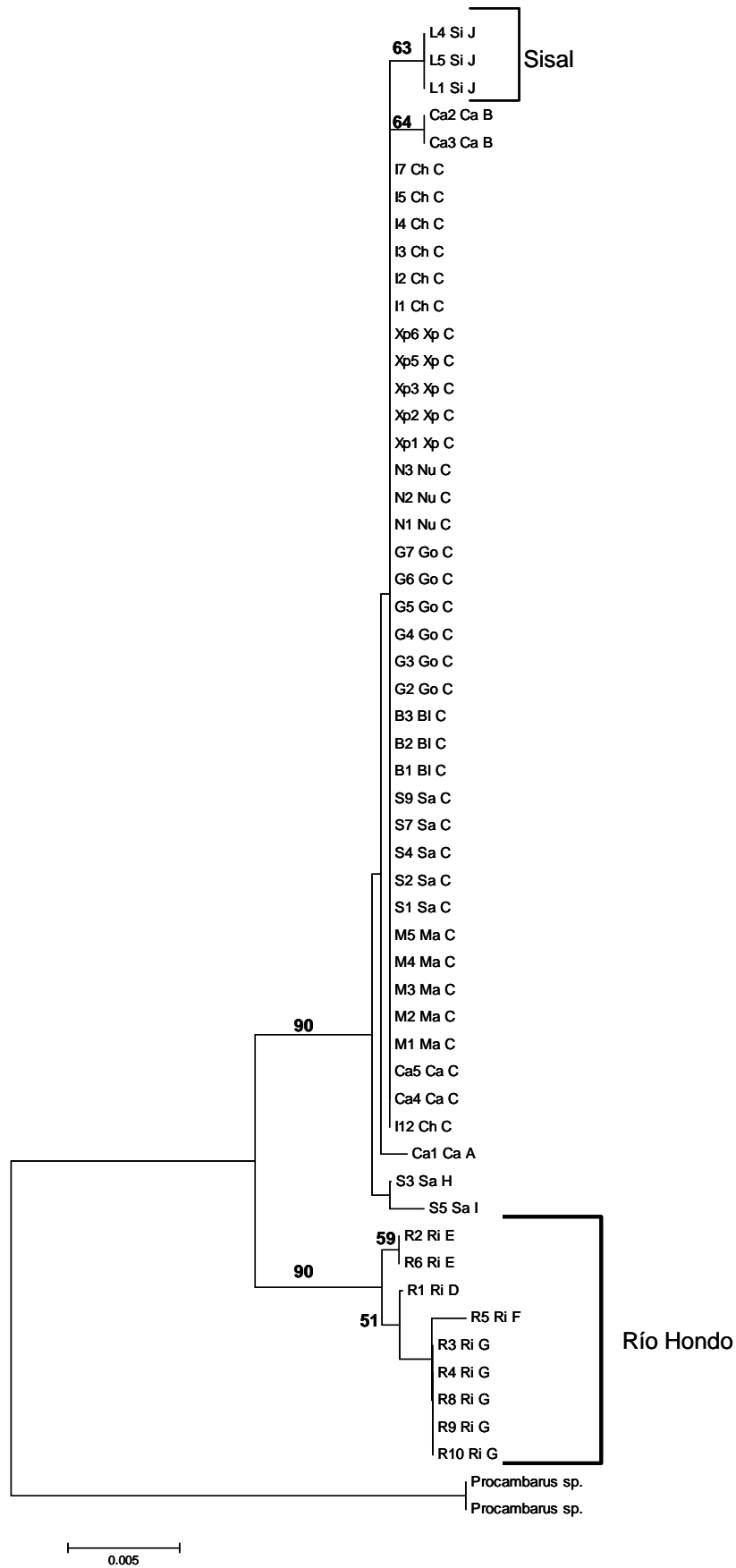


Figura 3. Árbol de distancia (Neighbor Joining) de 53 secuencias con distribución, haplotipos y grupo externo, basado en el modelo nucleotídico: distancia p. Valores de *bootstrap* en la parte superior de las ramas.



El análisis de distancia (NJ) sin corregir, muestra el agrupamiento de los haplotipos por población. Se observa que todos los haplotipos pertenecientes a Río Hondo forman un grupo que se separa de los demás (Fig. 3).

Los estadísticos de  $F_{ST}$  muestran que la población de Río Hondo presenta una alta diferenciación genética, mientras que Cacao y Sabancuy presentan una diferenciación genética moderada, el resto de las poblaciones no presenta variación.

Tabla 6. Poblaciones de *Procambarus (A.) llamas* con  $F_{ST}$  pareadas, los números en negritas muestran los valores más altos de  $F_{ST}$ , los números subrayados muestran valores diferentes de cero.

	<b>Ca</b>	<b>Ma</b>	<b>Rí</b>	<b>Sa</b>	<b>Bl</b>	<b>Go</b>	<b>Nu</b>	<b>Xp</b>	<b>Si</b>	<b>Ch</b>
<b>Ca</b>										
<b>Ma</b>	<u>0.167</u>									
<b>Rí</b>	<b>0.729</b>	<b>0.850</b>								
<b>Sa</b>	<u>0.143</u>	<u>0.111</u>	<b>0.727</b>							
<b>Bl</b>	<u>0.167</u>	0.000	<b>0.850</b>	<u>0.111</u>						
<b>Go</b>	<u>0.167</u>	0.000	<b>0.850</b>	<u>0.111</u>	0.000					
<b>Nu</b>	<u>0.167</u>	0.000	<b>0.850</b>	<u>0.111</u>	0.000	0.000				
<b>Xp</b>	<u>0.167</u>	0.000	<b>0.850</b>	<u>0.111</u>	0.000	0.000	0.000			
<b>Si</b>	<u>0.167</u>	0.000	<b>0.850</b>	<u>0.111</u>	0.000	0.000	0.000	0.000		
<b>Ch</b>	<u>0.167</u>	0.000	<b>0.850</b>	<u>0.111</u>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

En la red de haplotipos el haplotipo C es el que presenta la distribución más amplia en la península. Los haplotipos D, E, F y G se encuentran en una sola localidad, Río Hondo, separándose de los demás por 7 sustituciones hipotéticas. Sisal muestra un haplotipo exclusivo J con un sitio diferente al haplotipo C, mientras que en la localidad de Sabancuy se presentan los haplotipos H, I y C. El tamaño de ovalo es proporcional al número de secuencias que presentaron ese haplotipo (Fig. 4).

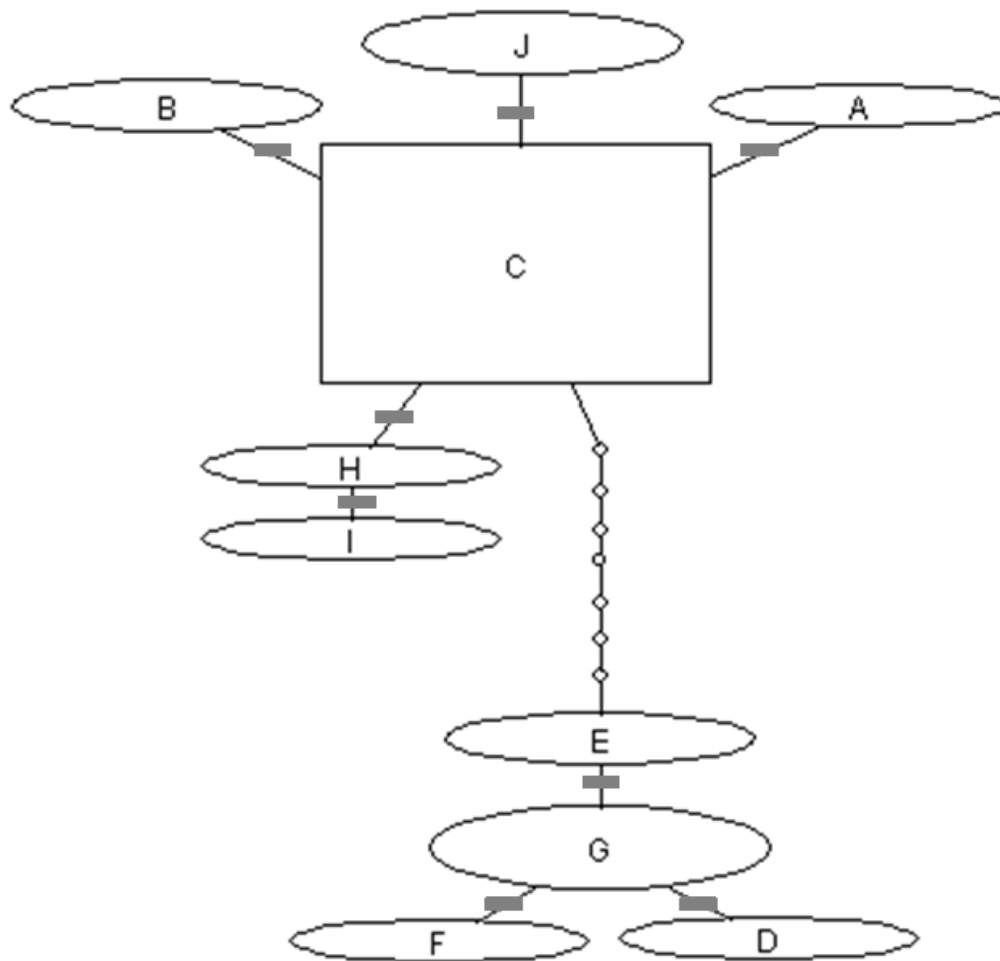


Figura 4. Red de haplotipos del COI mitocondrial en *Procambarus (A.) llamas* de la Península de Yucatán. Los rectángulos grises indican transiciones, los círculos pequeños indican haplotipos intermedios no encontrados en la muestra. Las letras indican los diferentes haplotipos.

El anidamiento de los clados en la red de haplotipos resultó en tres clados de primer nivel, dos de segundo y el clado general (Fig. 5). El análisis de clados anidados del clado 1-2, que incluye al haplotipo más distribuido en la península que podría ser el ancestral, dando como resultado en la clave de inferencias (Posada y Templeton, 2005) una expansión del área de distribución contigua (Tabla 7). Los clados 2-2 y 3-1 dieron resultados no concluyentes pues sus Dc y Dn no son significativas, el resto de los clados se excluyen del análisis pues sus haplotipos no presentan variación geográfica.

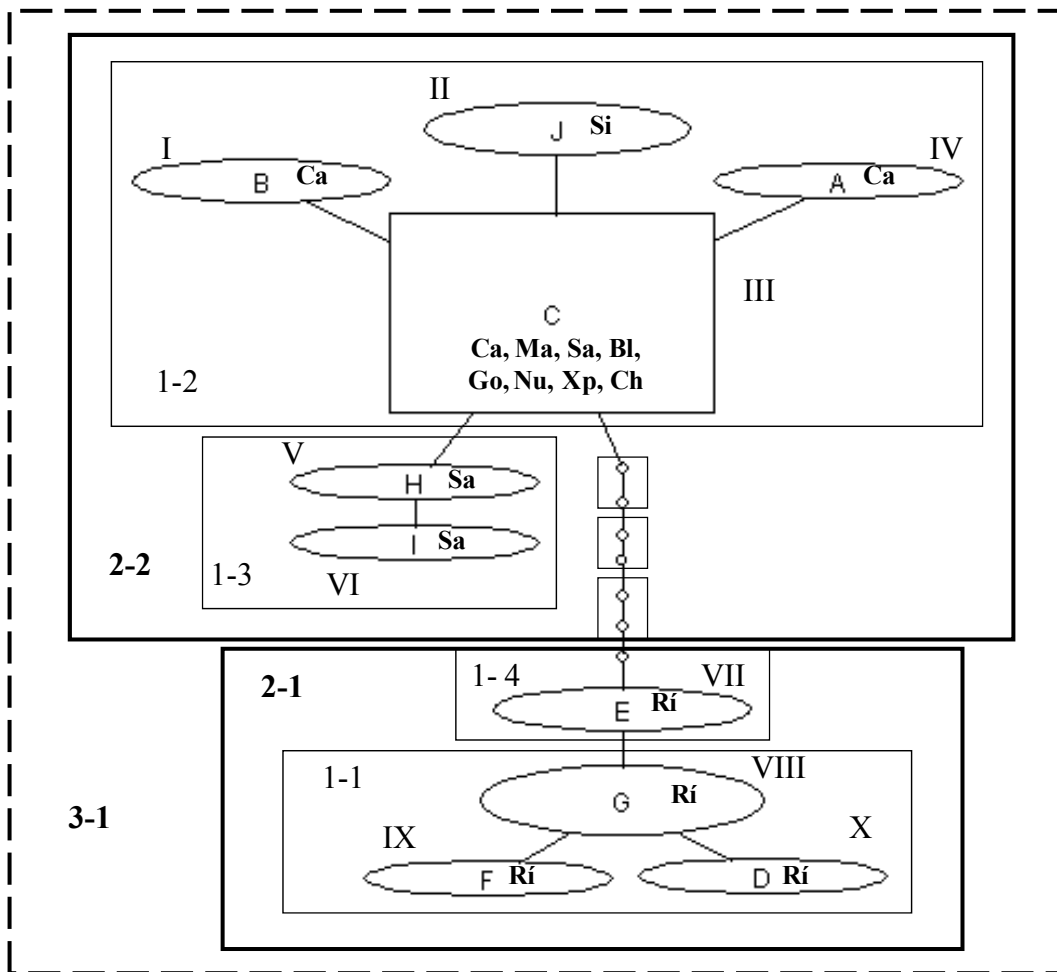


Figura 5. Clados anidados de la red de haplotipos. Al centro de cada ovalo se encuentra el haplotipo. Las letras en negritas indican las localidades. Las letras en mayúscula indican los diferentes haplotipos. Los números dentro de cada rectángulo indican el nivel de anidamiento.

Tabla 7. Tabla de contingencia del análisis de relación geográfica de la red de haplotipos e interpretación de resultados según la clave de Posada y Templeton (2005)

Clados	Chi-cuadrada	P	Cadena de inferencias
1-2	65.800	0.000	1-2-11-12 Expansión del área de distribución contigua.
2-2	11.074	0.108	1-2-11-17 Resultado no concluyente.
3-1	53.000	0.000	1-2-11-17 Resultado no concluyente.

Utilizando una tasa de divergencia de 1.2% por millón de años en especies hermanas de camarones chasqueadores del Istmo de Panamá *Alpheus spp.* (Ketmaier *et al.*, 2003) y una divergencia genética observada entre el haplotipo C y J de 0.15% se calculó el

tiempo de divergencia, el cual fue de 125 mil años. Del mismo modo pero con la tasa de divergencia de 2.3% por millón de años en los grápsidos de género *Sesarma* de la isla de Jamaica (Schubart *et al.* 1998a) el tiempo de divergencia es de 65 mil años. Se tomaron estos dos haplotipos pues el C es el más distribuido y el J es exclusivo de Sisal, mientras que A y B sólo están en Cacao y H e I sólo están en Sabancuy ambas poblaciones también presentan el haplotipo C (Fig. 6). Se calculó el tipo de divergencia promedio para el nodo entre los haplotipos de Río Hondo y el resto de los haplotipos utilizando las mismas tasas de divergencia por millón de años y una divergencia genética promedio de 1.47% (Fig. 6.).

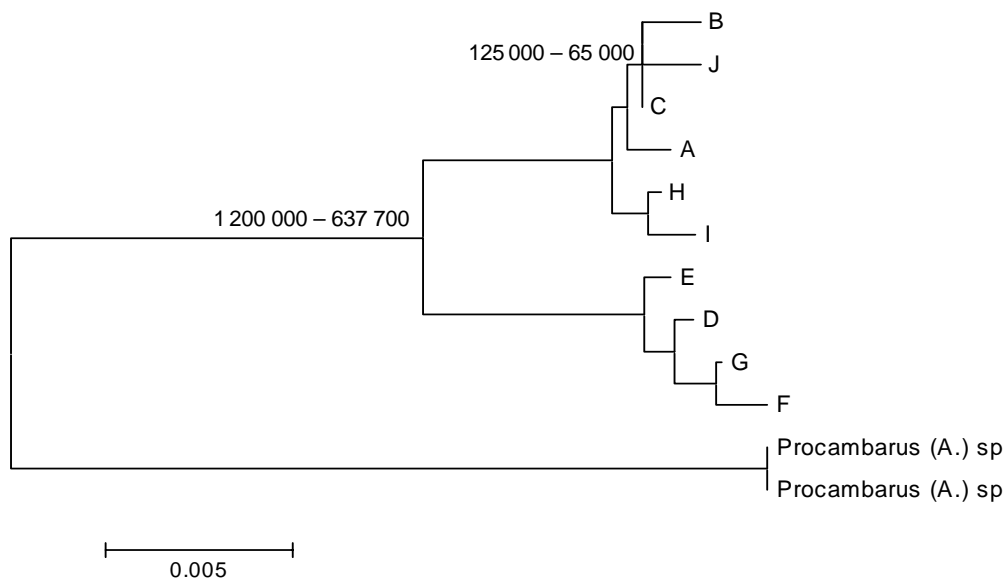


Figura 6. Árbol de distancia (Neighbor Joining) de haplotipos y grupo externo, basado en el modelo nucleotídico: distancia p. Los números muestran el tiempo de divergencia de los nodos.

## DISCUSIÓN

### Variación genética y tiempo de divergencia

Crandall y Fitzpatrick (1996) mencionan que la combinación de técnicas para obtener cladogramas intraespecíficos con los métodos tradicionales de aproximación filogenética puede mejorar la resolución en el conjunto de datos. Además el uso de métodos comparativos para probar las hipótesis evolutivas cada vez es más común en ambos niveles, tanto macro como micro evolución. Los estudios filogeográficos permiten esta combinación entre la microevolución y la macroevolución al relacionar las variaciones entre las secuencias genéticas de los organismos y su distribución geográfica haciendo aproximaciones sobre los procesos fisiográficos que ocasionan la distribución de haplotipos.

Las tablas 4 y 6 muestran que solo en tres de las 10 localidades existe un cierto grado de diferenciación genética, siendo estas Cacao, Sabancuy y Río Hondo, con valores de HD entre 0.52 y 0.8 y de  $F_{ST}$  entre 0.11 y 0.85. La poca diferenciación genética entre poblaciones de *P. (A.) llamas* distantes geográficamente podría deberse a aislamientos que han ocurrido recientemente. Algo similar encontraron Buhay y Crandall (2005) quienes mencionan que una expansión de rango contiguo seguido de periodos de aislamiento es el principal mecanismo que provoca una variación genética mayor de lo que esperaban para las especies de acociles de cavernas, siendo esta  $\pi = 0.23$  a 0.89 % en el gen COI mitocondrial.

*Procambarus (A.) llamas* mostró valores bajos de divergencia genética entre secuencias que van de 0.15% a 1.71%. Cox y Hebert (2001) reportan para las poblaciones del cladócero *Sida crystallina* en los Estados Unidos una divergencia entre las secuencias del gen COI que va de 4.8% a 7.4%, con una tasa de divergencia igual a 2% por millón de años pudieron calcular el tiempo en que compartieron un ancestro común hace 2.4 y 3.7 millones de años. Ellos proponen que la separación de las poblaciones se dio durante el Pleistoceno y que a partir de refugios las poblaciones diversificaron. Comparando el tiempo de divergencia entre las secuencias del cladócero *Sida crystallina* con las de los haplotipos C y J de *Procambarus (A.) llamas* las de éste último divergieron más recientemente, hace entre 125 y 65 mil años, ambos tiempos estimados con el mismo marcador genético. El tiempo de divergencia entre estos dos haplotipos de *Procambarus (A.) llamas* coincide con un periodo de cambios constantes en el nivel del mar ya que hace 125 mil años el nivel del mar era 7 metros más y hace

18 mil años de 100 metros menos sobre el nivel actual (Beddows, 2003), estas fluctuaciones en el nivel del mar pudieron ocasionar que algunas poblaciones de *Procambarus (A.) llamas*i quedaran aisladas o eliminadas provocando una disminución en la variación genética. El tiempo de divergencia entre los haplotipos de *Procambarus (A.) llamas*i de Río Hondo y los del resto de la península de Yucatán indica que se separaron durante el Pleistoceno, tiempo en el cual estaban emergiendo la parte norte y periferias de la península y a su vez sucedían las grandes glaciaciones. Pese al gran tiempo de divergencia de estos haplotipos no existen diferencias importantes taxonómicamente en caracteres morfológicos que sugieran se trate de una nueva especie.

### **Análisis de Clados Anidados**

Para explicar el resultado del clado 1-1, donde se propone una expansión contigua de la distribución entre estas poblaciones, se considera que algunas zonas de la península de Yucatán se han encontrado bajo la influencia de inundaciones estacionales que por temporadas, comunican cuerpos de agua que se encuentran adyacentes. Buhay y Crandall (2005) reportan que los acociles estigobíticos son severamente limitados en sus habilidades para dispersarse a través de barreras superficiales y subterráneas excepto cuando los niveles de agua son altos, y los acociles pueden migrar fuera de sus cavernas y recorrer distancias cortas lo que ocasiona una expansión del rango por zonas contiguas.

Otros organismos que habitan en la península de Yucatán presentan el mismo patrón respecto a la distribución de haplotipos que *Procambarus (A.) llamas*i, lo que hipotéticamente puede deberse a que las poblaciones se reducen cuando el nivel del mar ha descendido ocasionando cuellos de botella. Al subir nuevamente el nivel del mar y crearse más hábitats disponibles se lleva a cabo una recolonización que expande el área de distribución de las especies. Como consecuencia de este proceso se tendría que la variabilidad genética se reduce en el cuello de botella y después los haplotipos sobrevivientes se distribuyen ampliamente durante la recolonización. Por ejemplo, el análisis del fragmento d-loop del ADN mitocondrial en el pez *Poecilia orri* colectado en tres humedales y tres cenotes de la zona central de la Reserva de la Biósfera de Sian Ka'an presenta aislamiento por distancia (Rojas, 2008) mientras que el palemónido estigobítico *Creaseria morleyi* colectado en 14 cenotes al norte de la península presenta un flujo génico restringido con aislamiento por distancia, análisis hecho con una región

del gen COI mitocondrial (Botello, 2008). En cada uno de estos estudios se muestra una zona a partir de la cual el haplotipo propuesto como ancestral comienza a diversificarse. Se ha sugerido que para *Creaseria morleyi* la región de origen se ubica en la parte noreste de la península, mientras que para el pez *Poecilia orri* se ubica en la zona centro-este. Para *P. (A.) llamas* el sur de la península de Yucatán muestra una zona con alto dinamismo y diversificación en donde se ubica el haplotipo que resultó como ancestral.

### **¿Constituye *Procamburus (A.) llamas* un complejo de especies?**

La baja variación genética y el coeficiente de diferenciación  $F_{ST}$  encontrados entre las localidades muestreadas sugiere que *P. (A.) llamas* es una sola especie ampliamente distribuida en la península de Yucatán. Una revisión morfológica preliminar indica también que no existen diferencias en caracteres diagnósticos a nivel de especie que pudieran sustentar la idea de que *P. (A.) llamas* represente un complejo de especies. Lo que si existe es un cierto grado de adaptación fisiológica local, como lo ha evidenciado el estudio de Muñoz (2009), en donde se muestra que las diferentes poblaciones de *P. (A.) llamas* pueden adaptarse a condiciones particulares, especialmente con respecto a la salinidad. También Álvarez *et al.* (2007a) mostraron que puede haber cierto grado de diferenciación en relaciones alométricas cuando se consideran varias medidas corporales en esta especie. Únicamente se ha descrito recientemente la especie *P. (A.) maya* de la zona de Sian Ka'an, Quintana Roo, que muestra diferencias morfológicas importantes con respecto de *P. (A.) llamas*, como lo son unos quelípedos más esbeltos y carentes de pubescencia (Álvarez *et al.*, 2007b).

Como se observa en la red de haplotipos y en el dendograma de las poblaciones de *P. (A.) llamas*, los organismos pertenecientes a la localidad de Río Hondo muestran una alta diferenciación genética, con un coeficiente de diferenciación  $F_{ST} = 0.85$ . Este hecho es interesante pues los acociles son similares al resto de las poblaciones colectadas en lo que respecta a la morfología de caracteres taxonómicamente importantes. Existen algunos factores fisiográficos que podrían estar ocasionando la variación genética encontrada entre la población de acociles de Río Hondo y las del resto de la península, por ejemplo, la falla de Río Hondo que podría ser una barrera física que impide el flujo genético entre ellas. Esta falla provoca un contraste altitudinal de 10 metros con respecto a la población de Cacao a tan solo 6 km de distancia. Por otro lado, la localidad de Río Hondo, que se encuentra en una cañada tiene un flujo de agua

en dirección este, contraria del flujo que corre por la localidad de Cacao. Este escenario sugiere que dos poblaciones que están geográficamente muy cerca en realidad están completamente aisladas una de otra.

En la península de Yucatán, *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* al igual que otros acociles, pueden ser utilizados como recurso alimenticio cultivado en granjas (Rodríguez, 1999; Carmona *et al.*, 2003, 2005). Un mayor conocimiento sobre la biología, la variación genética y los procesos evolutivos en este acocil permitiría aprovechar de mejor manera este recurso. En ocasiones es necesario elegir que poblaciones o áreas pueden tomarse como unidades de manejo y cuales pueden desaparecer debido a alguna actividad humana y las poblaciones que presentan un nivel alto de variación genética son consideradas reservorios de diversidad y pueden ser tomadas para futuros repoblamiento (Fetzner y Crandall, 2001; Buhay y Crandall, 2008; Botello, 2008).



## CONCLUSIONES

1. Se obtuvo una diferenciación genética de 1.7 con 11 sitios variables y 10 haplotipos utilizando el gen mitocondrial COI de 10 poblaciones de *Procambarus (Austrocambarus) llamasii*.
2. Existe un haplotipo distribuido en toda la península que podría ser el ancestral.
3. La población de Río Hondo presenta 4 haplotipos únicos, que difieren del más abundante en 7 sustituciones transicionales.
4. El sureste de la península de Yucatán constituye el centro de dispersión geográfica para *P. (A.) llamasii*.
5. Con el Análisis de Clados Anidados se identificaron dos clados. El primero de ellos, que incluye a la mayoría de las poblaciones, donde los haplotipos han expandido su área de distribución de manera contigua.
6. El tiempo de divergencia entre los haplotipos C y J de *Procambarus (A.) llamasii* contenidos en el clado con la mayoría de las poblaciones muestreadas fue de entre 125 a 65 mil años entre ellos.
7. La baja variación genética en poblaciones de *Procambarus (A.) llamasii* puede ser resultado de diferentes cuellos de botella a causa de los constantes cambios en el nivel del mar.
8. La variación encontrada entre los haplotipos de Río Hondo y el resto de las poblaciones puede deberse a la diferencia altitudinal y la dirección del flujo de agua.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez, F., J.L. Villalobos, A. Botello, E. Torres. 2007a. The distribution of the crayfish *Procambarus llamas* in extreme environments in the Yucatan Peninsula. The Crustacean Society Mid-year Meeting. Coquimbo, Chile.
- Álvarez, F., M. López-Mejía, J.L. Villalobos. 2007b. A new species of crayfish (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) from a salt marsh in Quintana Roo, Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 120(3): 311-319.
- Avise, J., J. Arnold, M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. Neigel, C. Reeb y N. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, J. C. 1999. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Massachusetts Harvard University, 417 p.
- Beddows, P. 2003. Cave hydrology of the Caribbean Yucatan coast. *Association for Mexican Cave Studies* 11:1-96.
- Beebe, T. y G. Rowe. 2004. An introduction to molecular ecology. Oxford. Oxford University. U.S.A., 346 p.
- Botello, A. 2008. Estudios de variación genética en crustáceos de México. *En*: F. Álvarez y G. Rodríguez-Almaraz (eds.). Crustáceos de México: estado actual de su conocimiento. Universidad Autónoma de Nuevo León. 522 p.
- Botello, A. 2007. Variación morfológica y genética en *Creaseria morleyi* (Decapoda: Palaemonidae) de la península de Yucatán. *Tesis de Doctorado*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 93 p.
- Buhay, J. y K. Crandall. 2005. Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow and surprisingly large population sizes. *Molecular Ecology* 14: 4259-4273.
- Buhay, J. y K. Crandall. 2008. Taxonomic revision of cave crayfishes in the genus *Orconectes*, subgenus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae) along the Cumberland Plateau, including a description of a new species, *Orconectes barri*. *Journal of Crustacean Biology* 28(1): 57-67.
- Carmona, C., M. Rodríguez y M. Olvera. 2002. The influence of the absence of light on the onset of first maturity and eggs laying in the crayfish *Procambarus (Austrocambarus) llamas* (Villalobos, 1995). *Aquaculture* 212: 289-298.
- Carmona, C., M. Rodríguez, M. Olvera y P. Gutierrez. 2003. Gonadal development, spawning, growth and survival of the crayfish *Procambarus llamas* at three different water temperatures. *Aquaculture* 232: 305-316.

- Carmona, C., M. Rodríguez, M. Olvera y P. Gutierrez. 2004. Effect of density and sex ratio on gonad development and spawning in the crayfish *Procambarus llamasii*. *Aquaculture* 236: 331-339.
- Carmona, C., M. Olvera y M. Rodríguez. 2005. Effect of the protein–lipids ratio on growth and maturation of the crayfish *Procambarus (Astrocambarus) llamasii*. *Aquaculture* 250: 692- 699
- Crandall, K. y J. Fitzpatrick, Jr. 1996. Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biology* 45(1):1-26.
- Crandall, K., D. Harris y J. Fetzner, Jr. 2000. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* 267: 1679-1686.
- Carini, G. y J. M Hughes. 2004. Population structure of *Macrobrachium australiense* (Decapoda: Palaemonidae) in Western Queensland, Australia: the role of contemporary and historical processes. *Nature Publishing Group* 93: 350-363.
- Clement, M., D. Posada y K. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.
- Cox, A. y P. Hebert. 2001. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology* 10: 371-386.
- Dessauer, H.C., C.J. Cole y M.S. Hafner. 1996. Collection and Storage of Tissues. pp 29-47. *En: Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (eds). Molecular Systematics. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U.S.A., 382 p.*
- Erichson, W. F. 1846. Übersicht der Arten der gattung *Astacus*. *Archives für Naturgeschichte. Zwölfter Jahrgang Erster Band mit Zwölf Knpferften. Berlin. 12(1): 86-103.*
- Fetzner, J. Jr. y K. Crandall. 2001. Genetic variation. *En: Holdich D. Ed. Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science, Oxford. 291-326 pp.*
- Fetzner, J. Jr. 2008. The crayfish (and lobster) taxonomy browser. Section of Invertebrate Zoology Carnegie Museum of Natural History. <http://iz.carnegiemnh.org/crayfish/NewAstacidea/genus.asp?g=Procambarus>
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.
- Freeland, J. R. 2005. *Molecular Ecology*. Chichester, West Sussex, England, John Wiley & Sons, Ltd. 388 p.

- Goyenechea, I. y A. Contreras. 2007. Controversias en sistemática filogenética. *En* Contreras, A., C. Cuevas, I. Goyenechea y U. Iturbe. Ed. La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 158 p.
- Graham, A. 2003. In the beginning: Early events in the development of Mesoamerica and the lowland Maya area. *En*: Gómez-Pompa, A., M. F. Allen, S. L. Fedick, J. J. Jiménez-Osornio (eds.). The Lowland Maya Area Three Millennia at the Human-Wildland Interface. NY. Food Products Press, 659 p.
- Grishanin, A., E. Rasch, S. Dodson y G. Wyngaard. 2005. Variability in genetic architecture of the cryptic species complex of *Acanthocylops vernalis* (Copepoda). I. Evidence from karyotypes, genome size and ribosomal DNA sequences. *Journal of Crustacean Biology* 25(3): 375-383.
- Gurney, R., P. Grewe y R. Thresher. 2006. Mitochondrial DNA haplotype variation in the parasitic cirripede *Sacculina carcini* observed in the cytochrome oxidase gene (COI). *Journal of Crustacean Biology* 26(3): 326-330.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hernández, B., M. Honey, M. Cortés y G. Gercía. 2007. Filogeografía de aves mexicanas. *En*: Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). Ecología Molecular. SEMARNAT, 592 p.
- Hillis, D.M., B.K. Mable, A. Larson, S.K. Davis y E.A. Zimmer. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. Pp 321-381. *En*: Hillis, D. M., C. Moritz y B.K. Mable (eds). Molecular Systematics. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U. S. A. 2a Ed, 655 p.
- Hobbs, H. H., Jr. 1942. A generic revision of the crayfishes of the subfamily *Cambarinae* (Decapoda, Astacidae) with the description of a new genus and species. *American Midland Naturalist* 28(2): 334-357.
- Hobbs, H. H., Jr. 1972a. Biota of Freshwater Ecosystems Identification Manual No. 9. Environmental Protection Agency. 173 p.
- Hobbs, H. H., Jr. 1972b. The subgenera of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Astacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 117: 1-22.
- Hobbs, H. H. Jr. 1974. Synopsis of the families and genera of crayfishes (Crustacea: Decapoda). *Smithsonian Contribution to Zoology* 164: 1-32
- Hobbs, H. H., Jr. 1989. An illustrated checklist of the American crayfish (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contribution to Zoology* 480: 1-236.

- Ketmaier, V., R. Argano y A. Caccone. 2003. Phylogeography and molecular rates of subterranean aquatic stenaseiid isopods with a peri-Tyrrhenian distribution. *Molecular Ecology* 12: 547-555
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Versión 3.1. *Bioinformatics* 5:150-163.
- Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- López, E. 1981. Geología de México. Volumen III. México, D.F. 265 p.
- Lugo, J., J. Aceves y R. Espinasa. 1992. Rasgos geomorfológicos mayores de la península de Yucatán. *Revista del Instituto de Geología, UNAM* 10(2): 143-150
- Marín, L., J. Pacheco, R. Méndez. 2004. Hidrogeología de la península de Yucatán. *En: Jiménez, B. y L. Marín (eds.). El agua en México vista desde la academia. Academia Mexicana de Ciencias, México. 389 p.*
- Martin, J. W. y G. E. Davis. 2001. An updated classification of the recent crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County. Science Series No. 39, Los Angeles, California. 124 p.
- Muñoz, A. N. 2009. Diferencia de la capacidad osmótica y metabolismo entre tres poblaciones del acocil *Procambarus llamasii* de la península de Yucatán. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Navarro, S.A. y B. Hernández. 1999. Filogenia y clasificación de las aves: una nueva visión. *En: Núñez-Farfán, J. y L. Eguiarte (comps.). Evolución Biológica. Ciencias. México. 283 p.*
- Ortmann, A.E. 1905a. The mutual affinities of the species of the genus *Cambarus*, and their dispersal over the United States. *Proceedings of the American Philosophical Society* 44(180): 91-136.
- Ortmann, A.E. 1905b. *Procambarus*, a new subgenus of the genus *Cambarus*. *Annals of the Carnegie Museum* 3(3): 435-442.
- Page, R. y E. Holmes. 1998. Molecular evolution a phylogenetic approach. Blackwell Science. 346 p.
- Posada, D., K.A. Crandall y A.R. Templeton. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9: 487-488.
- Posada, D., A.R. Templeton. 2005. Inference Key for the Nested Haplotype Tree Analysis of Geographical Distances, available in: <http://darwin.uvigo.es/>.

- Rentaría, M.A. 2007. Breve Revisión de los Marcadores Moleculares. *En*: Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología Molecular*. SEMARNAT. 592 p.
- Rodríguez, M. S. 1999. Biología y sistemática de los Cambáridos del Sudeste de México y su potencial aprovechamiento en la acuicultura. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 101 p.
- Rojas, A. 2008. Estructura mitocondrial (d-loop) de *Poecilia orri* en cenotes y humedales de la Recerva de la Biósfera de Sian Ka'an, Quintana Roo. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 49 p.
- Rojas, Y. 1998. Revisión taxonómica de ocho especies del género *Procambarus* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) del centro de Veracruz, México. Tesis de Licenciatura Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 158 pp.
- Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis y H. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplifications of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Schubart, C., R. Diesel y S. Hedges. 1998a. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* 393: 363-365.
- Schubart, C., J. Neigel y D. Felder. 1998b. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *En*: von Vaupel J. y F. Schram eds. *The Biodiversity Crisis and Crustacea*. Balkema Pub. Rotterdam. 817-830 pp.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods)*. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taylor, C. y M. Hardman 2002. Phylogenetics of the crayfish subgenus *Crockerinus*, genus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae), based on Cytochrome Oxidase I. *Journal of Crustacean Biology* 22(4): 874-881.
- Templeton, R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7: 381-397.
- Templeton, R., E. Boerwinkle y F. Sing. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophyla*. *Genetics Society of America* 117: 343-351.
- Templeton, R., E. Routman y C.A. Phillips. 1995. Separating population structure from population Hhistory: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Trontelj, P., Y. Machino, y B. Sket. 2004. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 212-226

- Vázquez, E.D. 2007. Filogeografía y vertebrados. *En*: Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre (comps). *Ecología Molecular*. SEMARNAT. 592 p.
- Villalobos, A. 1954. Revisión de las especies afines a *Procambarus mexicanus* (Erichson), con descripción de nuevas formas. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 25(1-2): 364-371.
- Villalobos, A. 1955. Cambarinos de la Fauna Mexicana (Crustacea, Decapoda). *Tesis de Doctorado*, Facultad de Ciencias, UNAM. México.