



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(BIOLOGIA MARINA)

“ORIGEN DEL DESARROLLO ABREVIADO EN EL GÉNERO *Macrobrachium*:
GENÉTICA MOLECULAR, ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y COMPARADO”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ELIANA PAOLA ACUÑA GÓMEZ

TUTOR

Dr. FERNANDO ÁLVAREZ NOGUERA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

COMITÉ TUTOR:

Dr. LUIS EGUIARTE FRUNS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
Dr. MANUEL URIBE ALCOCER
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
Dr. ADOLFO GRACIA GASCA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
Dra. SUSANA MAGALLÓN PUEBLA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MÉXICO, D. F. JUNIO DE 2015



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.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



ORIGEN DEL DESARROLLO ABREVIADO EN EL GÉNERO
Macrobrachium: GENÉTICA MOLECULAR, ANÁLISIS
FILOGENÉTICO Y COMPARADO.

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

DOCTORA EN CIENCIAS

(Biología Marina)

p r e s e n t a

M en C. Eliana Paola Acuña Gómez

Director de Tesis: Dr. Fernando Álvarez Noguera

Comité Tutor: Dr. Manuel Uribe Alcocer
Dr. Luis Eguiarte Fruns
Dr. Adolfo Gracia Gasca
Dra. Susana Magallón Puebla
Dra. Virginia León Règagnon
Dr: Ramiro Román Contreras

México, D. F.

Junio de 2015



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México

Coordinación del Posgrado, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,

Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510

Teléfono y Fax: (52) 56-22-5803, 5829, 5990 y 5991

Correo electrónico: posgrado@cmarl.unam.mx

http://www.pcml.unam.mx



OFICIO CEP/PCML/01569/14

ASUNTO: Nombramiento

M. en C. ELIANA PAOLA ACUÑA GÓMEZ

Alumna de Doctorado

Presente

Por medio del presente, me permito informar a usted que el Comité Académico de este Posgrado, en su sesión CA/09/14, celebrada el 27 de noviembre de 2014, acordó:

Asignarle Jurado para Examen de Doctorado, el cual evaluará su tesis titulada: "Origen del desarrollo abreviado en el género *Macrobrachium*: genética molecular, análisis filogenético y comparado".

		Fecha	Firma de aceptación
Dr. Manuel Uribe Alcocer	Presidente
Dr. Fernando Álvarez Noguera	Secretario
Dr. Adolfo Gracia Gasca	Vocal
Dr. Luis Eguiarte Fruns	Suplente
Dra. Susana Magallón Puebla	Suplente

Es necesario que usted recabe las firmas de los integrantes propuestos y nos remita una copia, para hacer efectivos estos nombramientos.

Sin más por el momento, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 5 de diciembre de 2014

LA COORDINADORA

DRA. GLORIA VILACLARA FATJÓ

Nota 1: Todos los miembros del jurado lo son en el mismo nivel de jerarquía académica, ya sean titulares o suplentes. El orden en que aparecen en el jurado se asigna exclusivamente con base en su antigüedad laboral en la UNAM, con excepción del Director de Tesis, al cual se nombrará siempre Secretario, con el fin de facilitar el llenado del Acta de Examen.

Nota 2: De conformidad con el Artículo 31 del RGEP, cada miembro del jurado deberá entregar su voto fundamentado por escrito, en un plazo máximo de cuarenta días hábiles, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis. Es importante considerar estos plazos para que cada sinodal entregue sus correcciones con tiempo suficiente para que queden realizadas y pueda emitir el voto correspondiente.

GVAF/CfRG

Este trabajo de investigación fue posible gracias a:

Al apoyo proporcionado por el Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la (UNAM).

La beca complementaria del Centro de Estudios del Cuaternario de Fuego, Patagónica y Antártica o Fundación CEQUA en Chile.

Al aporte de la Colección Nacional de Crustáceos y al Laboratorio de Carcinología del Instituto de Biología de la UNAM.

Al aporte del Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

A la asesoría permanente del Comité Tutorial integrado por:

Dr. Fernando Álvarez Noguera

Dr. Luis Eguiarte Fruns

Dr. Ramiro Román Contreras

A la orientación y constante intercambio de conocimientos del Dr. José Luis Villalobos Hiriart.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, doblemente agradecida por brindarme el privilegio de formarme en investigación y profesionalmente dentro de sus aulas.

Al Centro Regional de Estudios del Cuaternario de Fuego, Patagonia y Antártica (Fundación CEQUA) en Chile por su confianza y por esperarme.

Al Instituto de Biología de la UNAM. Al laboratorio de Genética Molecular, Al laboratorio de Carcinología y a la Colección Nacional de Crustáceos del IBUNAM por todas las facilidades prestadas para desarrollar esta investigación.

Al Dr. Luis Eguiate Fruns por su orientación, sus evaluaciones críticas, comentarios y opiniones pero principalmente por acompañarme en mi examen de candidatura y por la confianza manifestada en cada momento durante este largo periodo.

Al Dr. Fernando Alvarez Noguera por aceptarme en su laboratorio sin hacer preguntas, por su confianza en mi persona, por permitirme desarrollar mi gusto en investigación, por acompañarme en las salidas al campo y decir siempre "SI" a nuevas propuestas de trabajo.

Al Dr. José Luis Villalobos Hiriart por su permanente ocupación e interés en mi trabajo de tesis y en mi bienestar en México. Por las extensas horas dedicadas enseñándome a identificar langostinos y las invertidas en discutir los resultados de la tesis.

A la M. en C. Laura Marquez Valdelamar, definitivamente sin la asistencia técnica y las facilidades inmensas brindadas por Laura en el Laboratorio de Biología Molecular y el secuenciador automático este trabajo no se hubiese podido desarrollar.

A la Dr. Valeria Souza, por su cariño y palabra sincera. Porque siempre me considero un integrante de su laboratorio.

Al comité tutorial ampliado: Dr. Fernando Alvarez, Dr. Luis Eguarte, Dr. Ramiro Román, Dr. Adolfo Gracia, Dr. Manuel Uribe, a la Dra. Susana Magallón y a la Dra. Virginia León por su participación y critica oportuna en todos los comité tutorales. Al Dr. Ramiro Román por no dejarme sacar el dedo del reglón y guardar mi archivo de estudiante todos estos años. Al Dr. Adolfo Gracia por su afecto y cordialidad, por recordarme que siempre se puede; Al Dr. Manuel Uribe por su constante motivación a cerrar el ciclo, A la Dra. Susana Magallón por las horas dedicadas y la atención prestada a mi trabajo y a la Dra. Virginia León, por sus comentarios críticos y refugiarme en su laboratorio cada vez que fue necesario.

Al comité del examen de candidatura, por su academia... fue realmene una experiencia y enseñanza inolvidable.

A mi amiga Gariela Parra, por su cariño y amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Carcinología, por todos los buenos y gratos momentos compartidos: Carmen Hernández, Alejandro Botello, Antonio Celis, Rolando Mendoza, Yolanda Rojas, Lourdez Gonzalez, Antonio Celis, Gema Armendariz y Eduardo Torres.

A todos mis compañeros contemporáneos de doctorado, del Instituto de Biología y del Instituto de Ecología, del Intituto de Ciencias del Mar, con quienes compartí el periodo de formación del programa doctoral. Así como a todas las personas que hicieron grato cada momento vivido en la UNAM y en México, son muchas por lo que no podría individualizar;¡¡

A Erika Aguirre, por su bondad y compañerismo.

A María Eugenia (“La Marujita”) por sus cuidados, su cariño, por su bondad, por sus consejos y su infinita fé. Por compartir conmigo la hora del té.

A Federico por ordenar mis ideas y no dejarme caer, pero principalmente por acompañarme sin hablar.

A mis entrañables amigos y compadres Irene Barriga y Dagoberto Renteria, porque en estos veinte años han estado en todo momento. Por hcerme llevaderos los días difíciles, por integrarme a su y a sus familias.

Hoy día para poder cerrar este ciclo ha sido necesaria el apoyo de grandes amigos:

Fabiola Arcos, quien prácticamente programó el viaje a México sin dar tregua y me asiló en La Paz, Baja California para el reencuentro con mi tesis. A Rocio Canche quien se quedo al mando de mi casa y al cuidado de mis hijos. A Soledad Peña quien atiende y cuida a mis hijos a diario con tal de darme tranquilidad en estos días. A la Sra. Liliana Kusanovic por insistir en que esto es lo prioritario y darme las facilidades para ausentarme. A Máximo Frangópulos por reemplzarme en la Dirección de CEQUA, a todos y cada uno de mis amigos, colegas y colaboradores CEQUAs por darme este tiempo libre y por la fuerza que me dan. A Gabriel Quilahuilque por su infinita paciencia en ayudarme a hacer y rehacer las figuras de la tesis. A Carlos Olave por su infinito cariño, porque siempre estas, porque ddicando tiempo de tu tesis en apurar el tranco de la mía..... a Estelita por sus atenciones diarias a Irene y Dagoberto por el asilo, el cobigo, el cariño, las atenciones, la paciencia, horas de sueño, incomodidades que les he hecho pasar.....por abrirme, una vez más, las puertas de su casa.

A mis hijos por comprender esta usencia necesaria y a mis padres y hermano por no perder la esperanza.

A todos Gracias, infinitas gracias.....

El tiempo, la prioridad, la dedicación y la energía brindada a esta investigación se la debo a ustedes y se los agradezco. Los logros y parabienes que de ella se desprendan se los dedico a ustedes;

A mis hijos Rafael y Camilo

A Walter y Eliana, mis padres y a Walter Guillermo, mi hermano

Al amor que siempre ilumina

A todos los amigos que contribuyeron y especialmente a quienes me han motivado, decididamente, a no quitar el dedo del reglón.

A la memoria de quienes se fueron esperando este momento:

† Maria Gladys

† Delfina

† Mónica Paz

† HaydeeZita

“Haz que valga la pena”

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO I	20
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	20
BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES.....	24
REPRODUCCIÓN.....	25
OSMORREGULACIÓN.....	27
CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS HÁBITAT.....	30
EL GÉNERO <i>Macrobrachium</i> EN MÉXICO.....	34
ORIGEN DEL DESARROLLO LARVARIO ABREVIADO (DLA).....	36
CAPITULO II	42
OBJETIVOS.....	51
HIPÓTESIS.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
<i>Material biológico</i>	52
<i>Extracción, amplificación y secuenciación</i>	58
<i>Análisis de secuencias</i>	60
<i>Variación genética</i>	61
<i>Análisis filogenético y comparado</i>	62
RESULTADOS.....	65
<i>Revisión del acervo de la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR)</i>	65
OBJETIVO 1.....	67
OBJETIVO 2.....	74
OBJETIVO 3.....	80
<i>Variación genética (16S rRNA)</i>	80
<i>Variación genética (Citocromo oxidasa I (COI))</i>	83
<i>Relaciones filogenéticas</i>	87
16S rRNA.....	87
Citocromo oxidasa I (COI).....	87
16S rRNA y Citocromo oxidasa I (COI).....	88
OBJETIVO 4.....	91
16S rRNA.....	91
Citocromo oxidasa I (COI I).....	92
16S rRNA y Citocromo oxidasa I (COI I).....	93
OBJETIVO 5.....	96
DISCUSIÓN.....	104
<i>Especies con desarrollo larval abreviado (DLA)</i>	104
<i>Grupo Olfersii</i>	106
<i>Especies geminadas</i>	108
CAPITULO III	112
MATERIALES Y MÉTODOS.....	118
<i>Material biológico</i>	118
<i>Análisis filogenético</i>	120
<i>Calibración fósil y fechas independientes</i>	120
<i>Fecha</i>	121
RESULTADOS.....	121
<i>Análisis filogenético</i>	121
<i>Fecha</i>	122
DISCUSION.....	126
<i>Origen del género Macrobrachium en México</i>	127
<i>Origen del desarrollo abreviado en las especies de Macrobrachium</i>	128
<i>Especies Geminadas</i>	129
DISCUSION GENERAL	132
El género <i>Macrobrachium</i>	132
Posición filogenética de <i>Palaemon</i> , <i>Palaemonetes</i> y <i>Macrobrachium</i>	135
Marcadores Moleculares.....	137

Modelo de evolución molecular.	138
Filogenia molecular del género <i>Macrobrachium</i>	139
Tamaño de huevo.	141
Origen del desarrollo larvario abreviado.	142
Historia evolutiva.	144
CONCLUSIONES GENERALES	147
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	149
ANEXO I. TABLAS	168
ANEXO II. FIGURAS	173
ANEXO III	180
<i>Reseñando la historia geológica de México y los eventos que pudieron favorecer la formación del hábitat, el establecimiento, distribución y especiación del género Macrobrachium.</i>	180
LITERATURA CITADA	186
ANEXO IV. PUBLICACION	188

RESUMEN

El género *Macrobrachium* es el más importante de la subfamilia Palaemoninae, incluye a un grupo de decápodos dulceacuícolas de amplia distribución geográfica, diversidad de formas y compleja biología. Debido a la peculiaridad en su ciclo reproductivo se reconocen dos grupos ecológicos: el de especies con una amplia distribución geográfica y desarrollo larvario extendido, y el conformado por especies que presentan distribución puntual y desarrollo larvario abreviado. Con la finalidad de conocer el origen de este último desarrollo en las especies de México así como de asociar los eventos histórico - evolutivos que han incidido en la diversificación y distribución de las especies del grupo, se infirió la filogenia molecular de las especies mexicanas y la reconstrucción filogenética con especies de todo el mundo. Para proveer el marco temporal a los procesos de especiación, se estimaron las edades absolutas de eventos importantes en la cladogénesis del grupo. Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron con secuencias del gen mitocondrial 16s rRNA y utilizando análisis de distancia, parsimonia, máxima verosimilitud y bayesiano. Para las especies mexicanas se reafirma la monofilia del grupo y la conformación independiente de las especies con desarrollo abreviado, mientras que la inclusión de especies americanas y de todos los continentes resuelve la monofilia mundial del género. Entre los resultados más relevantes se abordan, la clasificación intragenérica actual y la similitud genética entre diferentes especies, lo que permite proponer la sinonimia de especies mexicanas; se presentan nuevas especies para México y se amplía el rango de distribución de otras.

Para dar el marco temporal a estos procesos de especiación, se estimaron las edades absolutas de eventos importantes en la cladogénesis del grupo, para lo cual se utilizó el método de verosimilitud penalizada, en la calibración se utilizaron datos del registro fósil y se pusieron a prueba eventos geológicos importantes como la formación y cierre del Istmo de Panamá. La edad puntual estimada para la formación de las actuales especies del género *Macrobrachium* es de 69.7 – 66.4 Ma. La divergencia entre las formas con desarrollo abreviado y con desarrollo extendido 47.82 – 41.69 Ma. La radiación geográfica de las especies con desarrollo abreviado en México ha sido un evento rápido y reciente. Los tiempos de divergencia genética para las especies geminadas fueron diferente en cada dupla de ellas *M. tenellum* – *M. acanthurus* (16,11 – 16,04 Ma Mioceno); *M. heterochirus* - *M. occidentale* (4,98 – 4,32 Ma Plioceno) y *M. carcinus* – *M. americanum* (2,03 – 1.92 Ma Plioceno).

Con base en los resultados obtenidos es posible concluir que eventos locales como la configuración territorial de México, el levantamiento del Istmo de Tehuantepec, el efecto global de las corrientes costeras y el proceso de formación y cierre del Istmo de Panamá han sido determinantes para la distribución actual de las especies del generó *Macrobrachium*, en México y América.

ABSTRACT

Macrobrachium is the most important genus within the subfamily Palaemoninae, it includes a group of freshwater decapods with wide distribution, variety of forms and complex biology. Due to the peculiarity of its reproductive cycle, there are recognized two ecological groups: one that includes species with wide distribution and extended larval development and the second one conformed by species with punctual distribution and abbreviated larval development. With the aim to define the origin of the latest group in the species of Mexico and in order to determine the associated historical – evolutionary events that might have an influence in the diversification and distribution of the species of this group, the molecular phylogeny of the species of Mexico and the phylogenetic reconstruction of species worldwide were inferred. To provide a temporal frame of the speciation processes, absolute dates of important events in the cladogenesis of the group were estimated. Phylogenetic reconstructions were obtained by using sequences of the mitochondrial 16s rRNA gene and using distance analysis, parsimony, maximum likelihood and bayesian methods. A monophyly was confirmed for the mexican species as well as the conformation of a separate clade for the abbreviated development, whereas the inclusion of the american species and those from all continents resolved a worldwide monophyly for the genus. Among other relevant results are, the actual intrageneric classification and the genetic similarity between different species, which allows to propose the synonymy of some mexican species; new species for Mexico and the range extension of others.

In order to provide a temporal framework to these processes of speciation, we estimated the absolute ages of major events of the cladogenesis of the group using the penalized likelihood method; data from the fossil record were used for calibration and we tested major geological events such as the formation and closure of the Isthmus of Panama. The estimated age of the formation of the current species of the genus *Macrobrachium* is 69.7 - 66.4 MY. The divergence between the forms with abbreviated development and those with extended development is 47.82 - 41.69 MY. The geographical radiation of species with abbreviated development in Mexico was a rapid and recent event. Genetic divergence times of geminate species were different for each pair. *M. tenellum* - *M. acanthurus* (16.11 to 16.04); *M. heterochirus* - *M. occidentale* (4.98 - 4.32 Ma Pliocene) and *M. carcinus* - *M. americanum* (2.03 - 1.92).

Based on the results obtained, we can conclude that local events such as the territorial configuration of Mexico, the rise of the Isthmus of Tehuantepec, the overall effect of coastal currents and the process of formation and closure of the Isthmus of Panama were decisive for the current distribution of the species of the genus *Macrobrachium* in Mexico and America.

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Especies de <i>Macrobrachium</i> con desarrollo larvario abreviado, en el mundo.	39
Tabla II. Especies mexicanas del genero <i>Macrobrachium</i> incluidas en este estudio. Se indica vertiente de distribución, tipo de desarrollo larvario y tipo de hábitat. Las especies geminadas se marcan en igual color.	41
Tabla III. Especies de crustáceos decápodos para los cuales se ha secuenciado el genoma mitocondrial completo.	49
Tabla IV. Organización del genoma mitocondrial de <i>M. rosenbergii</i> : Trece genes que codifican proteínas y 21 genes de RNA, dos para RNAs ribosomal y 22 para RNAt de transferencia, se representan ordenados según su ubicación en el genoma (en color el segmento del 16S RNA de este estudio).....	50
Tabla V. Ejemplares de los cuales se obtuvieron las secuencias del fragmento mitocondrial, 16S rRNA. Incluyen las especies cuyas secuencias fueron tomadas del GenBank. ST=Serie Tipo, DLA = Desarrollo Larvario Abreviado, DLE = Desarrollo Larvario Extendido, CNCR= Colección Nacional de Crustáceos IBUNAM. S/I: Sin número de ingreso a la CNCR. Ingreso GB resultado de este estudio en negritas.	54
Tabla VI. Número de ejemplares, por especie y localidad, empleados para el análisis genético del fragmento mitocondrial del gen Citocromo oxidasa I (COI).....	58
Tabla VII. Poblaciones de <i>Macrobrachium</i> sin determinación taxonómica ingresadas en la Colección Nacional de Crustáceos e incluidas en este estudio.	66
Tabla VIII. Especies mexicanas de <i>Macrobrachium</i> . Se indica vertiente en la que se distribuyen, tipo de hábitat, tipo de desarrollo larvario, procedencia de las muestras empleadas en este estudio. Los pares de especies geminadas se denotan con igual color.....	67
Tabla IX. Distancias genéticas sin corregir (sobre la diagonal) y número de sustituciones nucleotídicas (bajo la diagonal) entre las 16 especies mexicanas de <i>Macrobrachium</i> , a partir de secuencias de un fragmento de 380 pb del gen 16S rDNA.....	73
Tabla X. Sitios polimórficos y de cambio de nucleótidos en el fragmento mitocondrial del gen 16S rRNA para especies con desarrollo abreviado. Los nucleótidos marcados son los que difieren.....	81
Tabla XI. Índices de variación genética entre las especies analizadas en este estudio, obtenidas a partir de secuencias mitocondriales de un fragmento (380 pb) del gen, 16S rRNA.	82
Tabla XII. Sitios polimórficos y de cambio de nucleótidos en un fragmento mitocondrial del gen Citocromo oxidasa I (COI), para las especies con desarrollo abreviado analizadas en este estudio. Los nucleótidos marcados son los que difieren. HHaplotipos.	85
Tabla XIII. Índices de variación genética entre las poblaciones y especies analizadas en este estudio, obtenidas a partir de secuencias mitocondriales de un fragmento (580 pb) del gen Citocromo oxidasa I (COI).	86
Tabla XIV. Frecuencias de nucleótidos y matriz reversible de tasas de cambio entre nucleótidos a partir de un fragmento de 528 pb del gen Citocromo oxidasa I (COI), para especies de langostinos <i>Macrobrachium</i>	88
Tabla XV. Especies y ejemplares de palemonidos empleados en el análisis de fechación a partir de secuencias mitocondriales de un fragmento del gen 16S rRNA.	119
Tabla XVI. Estimados puntuales derivados de puntos de calibración particular (Edad fósil) mediante el programa r8s y Verosimilitud Penalizada (VP) para los principales eventos de divergencia evolutiva en la subfamilia Palaemonidae.....	124

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema diagnóstico de *Macrobrachium* en el que se muestran espina hepática (EH) y antenal (EA) del caparazón, apéndice masculino, telson y 2° pereiópodo mayor (Modificado de Holthuis, 1952 y Acuña, 2002)..... 22
- Figura 2.** Caracteres diagnósticos del segundo pereiópodo mayor en las especies de *Macrobrachium* (Modificado de Holthuis, 1952)..... 23
- Figura 3.** Especies que conforman el “Grupo Olfersii” y su distribución a través del Istmo de Tehuantepec (Tomado de Villalobos 1967a)..... 35
- Figura 4.** Filograma de parsimonia para 16 especies mexicanas de *Macrobrachium*, generado a partir del análisis de 380 pares de bases del gen 16S rDNA. Valores de bootstrap de MP / NJ están por encima de la rama y los de ML / Posterior Probabilidad de BA están por debajo de la rama. DLA = Desarrollo larvario abreviado; DEL = Desarrollo larvario extendida; OG = especies del “Grupo olfersii”; G sp = especies y geminadas. 71
- Figura 5.** Cladograma de distancia (expresada en porcentaje) entre las especies mexicanas de langostinos *Macrobrachium* a partir de secuencias mitocondriales de un fragmento del gen 16S rRNA. En rojo las especies con DLA. 72
- Figura 6.** Filograma de Máxima verosimilitud (MV) para las especies y poblaciones mexicanas de langostinos *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un fragmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap 500 réplicas por mayoría del 50% es indicado sobre las ramas. Los ejemplares representados por Pb* (1 al 48) provienen de diferentes localidades de México. Los números (1 al 80) corresponden a ejemplares de las especies mexicanas de *Macrobrachium*, colectadas en diferentes localidades. 79
- Figura 7.** Relaciones filogenéticas para especies de langostinos con DLA, a partir de 911 caracteres (383 pb de 16S rRNA y 528 pb de COI). Métodos de reconstrucción (A) = Distancia (NJ); (B) = Máxima Parsimonia (MP) y (C) = Máxima Verosimilitud (MV). Bootstrap de 2000, 2000 y 100 réplicas respectivamente. 90
- Figura 8.** Filograma de Máxima Verosimilitud para tres pares de especies mexicanas geminadas de langostinos *Macrobrachium*, obtenido a partir de 1060 pb (404 de 16S rDNA y 656 de Citocromo Oxidasa I). Bootstrap de 500 réplicas. Vz = Venezuela, Cr = Costa Rica, Bz = Brasil. Resto de secuencias son mexicanas..... 95
- Figura 9.** Cladograma de Máxima Parsimonia (MP) para especies y poblaciones de langostinos *Macrobrachium* de diferentes partes del mundo, realizado a partir de secuencias de un fragmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap 1000 réplicas, por mayoría del 50% es indicado en azul sobre las ramas. Los ejemplares indicados como P*b (1- 48) corresponden a poblaciones mexicanas sin determinación taxonómica (Tabla VIII) y los números (1-80) corresponden a ejemplares de distinta localidad de las especies. En rojo las especies con DLA y con línea punteada las especies que posiblemente lo presenten..... 102
- Figura 10.** Filograma de Parsimonia que incluye secuencias del gen 16S rARN de 50 especies de *Macrobrachium* del mundo. Ubicación del desarrollo larvario abreviado (DLA). 103
- Figura 11.** Cronograma de los principales eventos de divergencia evolutiva de la subfamilia Palaemonidae derivados de la calibración particular (Edad fósil), considerando la menor edad fósil de *Palaemon antonellae* (99 MA*), mediante Verosimilitud Penalizada. 125

INDICE DE ANEXOS. FIGURAS Y TABLAS

- Anexo I.** Distribución mundial de especies del género *Macrobrachium*. Información tomada de Chace y Bruce, 1993; Cai, 2002; Holthuis 1950, 1950a, 1950b, 1951 y 1952; Jayachandran, 2001; Kensley, 1982; Pereira, 1985, 1986, 1989; Shy, 1987; Villalobos-Figueroa, 1967a, 1967b, 1969, 1982; Villalobos-Hiriart 1982; Wicksten, 2005. Más recopilación de descripciones originales, citadas en la bibliografía. 168
- Anexo II a.** Filograma de distancia (NJ) para las especies mexicanas de *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un segmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap 2000 Replicas. DLA = Desarrollo Larvario Abreviado; DLE = Desarrollo Larvario Extendido; Gm = Especies Geminadas. GO = “Grupo Olfersii”..... 173
- Anexo II b.** Filograma de parsimonia para especies mexicanas de langostinos *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un segmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap de 2000 réplicas. Gm sp = Especies Geminadas; GO = “GRUPO OLFERSI”; DLA = Desarrollo Larvario Abreviado; DLE = Desarrollo Larvario Extendido. 174
- Anexo II c.** Filograma de Máxima Verosimilitud (MV) para las especies mexicanas de langostinos *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un fragmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap de 500 réplicas. Gm sp = Especies Geminadas; GO = “GRUPO OLFERSI”; DLA = Desarrollo Larvario Abreviado; DLE = Desarrollo Larvario Extendido. 175
- Anexo II d.** Relaciones filogenéticas para especies de langostinos con DLA, a partir de secuencias de un fragmento mitocondrial del gen 16S rRNA (383 pb). Métodos de reconstrucción (A) = Distancia (NJ); (B) = Máxima Parsimonia (MP) y (C) = Máxima Verosimilitud (MV). Bootstrap de 2000, 2000 y 100 réplicas respectivamente. Gm sp = Especies Geminadas; GO = “GRUPO OLFERSI”; DLA = Desarrollo Larvario Abreviado; DLE = Desarrollo Larvario Extendido. 176
- Anexo II e.** Relaciones filogenéticas para especies de langostinos con DLA, a partir de secuencias de un fragmento mitocondrial del gen COI (528 pb). Métodos de reconstrucción (A) = Distancia (NJ); (B) = Máxima Parsimonia (MP) y (C) = Máxima Verosimilitud (MV). Bootstrap de 2000, 2000 y 100 réplicas respectivamente. 177
- Anexo II f.** Filograma de Máxima Verosimilitud (MV) para los tres pares de especies mexicanas geminadas de langostinos *Macrobrachium*. Obtenido a partir de un fragmento de 404 pb del gen 16S rDNA. Bootstrap de 500 réplicas. Vz = Venezuela, Cr = Costa Rica, Bz = Brasil. El resto de secuencias son mexicanas. 178
- Anexo II g.** Filograma de Máxima Verosimilitud para los tres pares de especies mexicanas geminadas de langostinos *Macrobrachium*. Obtenido a partir de un fragmento de 656 pb del gen Citocromo oxidasa I (COI), Bootstrap 500 réplicas. Vz = Venezuela, Cr = Costa Rica, Bz = Brasil resto de secuencias son mexicanas. 179

INTRODUCCIÓN

El género *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustácea: Decapoda: Palaemonidae) es el género más importante de la subfamilia Palaemoninae, que incluye a un exitoso grupo de decápodos dulceacuícolas, debido al elevado número de especies que lo integran, su amplia distribución geográfica, la diversidad de formas así como por la biología de sus organismos (Villalobos, 1982).

En este último aspecto, las especies del género presentan una peculiaridad en su ciclo reproductivo que permite separarlas en dos grupos ecológicamente distintos: en el primero, las especies de *Macrobrachium* presentan una amplia distribución geográfica y tienen desarrollo larvario extendido (12 a 10 estadios de desarrollo larvario), como el común de los crustáceos, sin embargo por ser dulceacuícolas solo en estado adulto, las hembras ovígeras deben migrar, río abajo, durante el periodo reproductivo, en busca de las condiciones salinas adecuadas para la eclosión de las larvas y el desarrollo de las postlarvas hasta el estado de juvenil. El segundo grupo esta conformado por especies que presentan distribución puntual, son completamente dulceacuícolas y su peculiaridad reproductiva es abreviar el desarrollo larvario (máximo tres estadios) para lo cual generan pocos huevos de mayor tamaño y con alto contenido de vitelo de los que eclosionan ejemplares juveniles (Sollaud, 1923; Jalihal *et al.*, 1993) con todas las características de un adulto pero de tamaño pequeño, los que permanecen por algunas horas cerca de los pleópodos de la madre (González, 2002)

La diversidad de especies del género *Macrobrachium*, sus características biológicas, la amplia distribución geográfica y las implicaciones ecológicas del desarrollo larval abreviado lo convierten en un interesante modelo biológico de estudio, que permite dar respuesta a interrogantes comunes sobre la diversidad biológica como por ejemplo: ¿Por qué hay regiones más ricas en diversidad carcinológica que otras? ¿qué factores han favorecido el proceso de especiación, en este género? En particular, este estudio pretende generar conocimiento y contribuir en responder a las siguientes preguntas: 1) ¿Será que las especies mexicanas del género *Macrobrachium* derivan de un ancestro común no

compartido con especies no mexicanas del género? 2) ¿Habrá en México, tantas nuevas especies *Macrobrachium* con desarrollo abreviado como poblaciones se han encontrado? 3) ¿Las especies geminadas de *Macrobrachium*, realmente serán un resultado del cierre del istmo de Panamá, es decir serán especies tranistmicas? 4) ¿Cuándo se originó el desarrollo larvario abreviado en este grupo? 5) ¿El desarrollo larvario abreviado es un suceso reciente y derivado del desarrollo larvario extendido o es una estrategia de convergencia múltiple de varios géneros de decápodos en respuesta a presiones de selección? 6) ¿El desarrollo abreviado será la forma más antigua o mas reciente de desarrollo larval? 7) ¿El desarrollo larvario abreviado serán una estrategia reproductiva derivada o independiente y simultánea al desarrollo larvario extendido?

Un cambio evolutivo de peculiaridad reproductiva, no es extraño de encontrar en decápodos; sin embargo, su significado adaptativo debe ser bien interpretado. En este caso, el origen del desarrollo larvario abreviado, sus implicaciones ecológicas y el significado evolutivo y filogenético son temas trascendentes y aún inciertos.

En la determinación del origen del desarrollo abreviado hay una serie de opiniones contradictorias, básicamente englobadas entre los que postulan que se trata de una característica muy antigua relacionada a la formación de la familia Palaemonidae en el periodo Cretácico (Pereira, 1989; Pereira y García, 1995; Stren, 1976) incluso se postula que es la característica ancestral de la que deriva el desarrollo larvario extendido (Pereira y García, 1995) y las que proponen que se trata de una característica reciente como resultado de una convergencia múltiple y genérica de Palaemonidae (Maghalaes y Walter, 1988, Villalobos, 1982, Short, 2000).

Por ello, el **objetivo central** de esta investigación fue analizar integralmente el origen del desarrollo larvario abreviado de las especies mexicanas de *Macrobrachium*.

Y los **objetivos específicos** fueron los siguientes:

- Identificar nuevas poblaciones de langostinos *Macrobrachium* con desarrollo larvario abreviado, entre el material biológico disponible en Colección Nacional de Crustáceos del Instituto de Biología de la Unam (IBUNAM).
- Construir la primera filogenia molecular (16S rRNA) de las especies mexicanas de *Macrobrachium*: ubicación gráfica del desarrollo larvario abreviado.
- Construir la filogenia molecular (16S rRNA) para especies de *Macrobrachium* de todos los continentes: ubicación gráfica del desarrollo larvario abreviado.
- Determinar las relaciones filogenéticas (16S rRNA y COI) entre las especies mexicanas de *Macrobrachium* que se encuentran “geminadas” por la masa continental.
- Con base a las reconstrucciones filogenéticas logradas, fechar los clados de mayor relevancia dentro de la subfamilia y del género *Macrobrachium*.

Con los objetivos particulares planteados, este trabajo inicia estudiando las generalidades de las especies de *Macrobrachium*, como son: taxonomía y clasificación, morfología, aspectos biológicos, reproductivos y distribución (**CAPÍTULO I**). El hallazgo de nuevas especies de *Macrobrachium* con desarrollo abreviado en México motivó la revisión del material incluido en la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR), encontrando interesantes registros de langostinos con una peculiar característica reproductiva. Secuencias mitocondriales de un segmento del gen 16S rARN de este material biológico así como secuencias de ejemplares de las 16 especies descritas para México y para especies de otros cinco países sudamericanos colectadas en este estudio, más las secuencias del gen 16S rARN de diferentes especies de *Macrobrachium* del mundo (tomadas del GenBank) acompañadas de secuencias de especies de otros géneros de la subfamilia Palaemonidae fueron la base para generar hipótesis filogenéticas. Los principales análisis filogenético se hicieron a partir de secuencias de fragmentos de los genes 16S rRNA y COI

(**CAPÍTULO II**). Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas fueron el marco de referencia histórico–evolutivo para estimar edades puntuales de los eventos de cladogénesis más importantes en la subfamilia Palaemonidae y en el género *Macrobrachium*. Las estimaciones se hicieron mediante verosimilitud penalizada, método que no restringe al supuesto de constancia en la tasa de sustitución molecular (Sanderson, 2002a) y utilizando puntos de calibración particulares (**CAPTÍTULO III**). Finalmente se presenta una discusión general de los resultados obtenidos en este estudio, las conclusiones y las proyecciones de de esta investigación.

CAPÍTULO I

El género *Macrobrachium* (Crustácea: Decapoda: Palaemonidae): Clasificación taxonómica, Aspectos biológicos, Reproductivos y Distribución geográfica.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La familia Palaemonidae está conformada por el grupo de crustáceos más diverso y exitoso del orden Decápoda, distribuidos en ambientes marinos, estuarinos y dulceacuícolas (Wicksten, 1989; Hendrickx, 1995a). Morfológicamente, se caracterizan por presentar un cuerpo alargado y comprimido, los dos primeros pares de pereiópodos quelados, el segundo par más grande que el primero, el carpo no está subdividido, el rostro con espinas y las mandíbulas, generalmente, tienen un proceso incisivo (Camacho *et al.*, 1997; Holthuis, 1952).

Holthuis (1951) estableció en la familia Palaemonidae cuatro subfamilias de las cuales tres están representadas en América: Eurirhynchinae Holthuis (1950), Pontoninae Kingsley (1878) y Palaemoninae Rafinesque (1815). Las dos últimas se diferencian de Eurirhynchinae porque las dos ramas del flagelo antenular externo están unidas en su parte basal y en el segundo pleópodo, las hembras tienen un apéndice interno y en los machos, además, un apéndice masculino. La subfamilia Palaemoninae se diferencia de Pontoninae por la presencia de una pleurobranquia en el tercer maxilípodo y de dos a más pares de espinas y uno o más pares de cerdas en el margen posterior del telson.

La subfamilia Palaemoninae, está integrada por lo menos por 20 géneros de los cuales 13 se encuentran en América: *Brachycarpus* (Bate, 1988); *Cryphiops* (Holthuis, 1973) (y subgénero *Bythinops*); *Creaseria* (Holthuis, 1950a); *Cryphiops* (Dana, 1852) (y subgénero *Cryphiops*); *Leander* Desmarest, 1849; *Macrobrachium* (Bate, 1868); *Nematopalaemon* (Holthuis, 1950); *Neopalaemon* (Holthuis, 1950); *Palaemon* (Weber, 1795) (y subgéneros *Palaemon* y *Palaeander*); *Palaemonetes* (Heller, 1869) (y subgénero *Palaemonetes*); *Pseudopalaemon* (Sollaud, 1911); *Troglocubanus* (Holthuis, 1949); *Troglomexicanus* (Villalobos y Álvarez, 1999), (Holthuis, 1993; Villalobos *et al.*, 1993; De

Melo, 2003). La clasificación taxonómica del grupo ofrece serias dificultades debido a la escasa variabilidad entre algunas especies, no sólo en función de su similitud morfológica, de sus estados de desarrollo y dimorfismo sexual sino también en cuanto a su distribución geográfica (Villalobos-Figueroa, 1967a; Boulton y Knott, 1984; Short, 2000; Murphy y Austin, 2004; Walker y Poore, 2003).

El género *Macrobrachium*, es el que presenta mayor relevancia dentro de la subfamilia, por el elevado número de especies que lo conforman, por su distribución geográfica; así como por la biología de sus especies (Villalobos, 1982). Morfológicamente se distingue por presentar rostro bien desarrollado, caparazón provisto de espina hepática y antenal (ausencia de espina branquiostegal), palpo mandibular con tres articulaciones, los dos primeros pares de apéndices torácicos quelados, los tres últimos pares de pereiópodos con dactilos simples, el primer par de pleópodos del macho carentes de apéndice interno y el segundo par provisto de apéndice interno y apéndice masculino. En la parte dorsal del telson se ubican dos pares de espinas y otras dos en el borde posterior (Fig. 1).

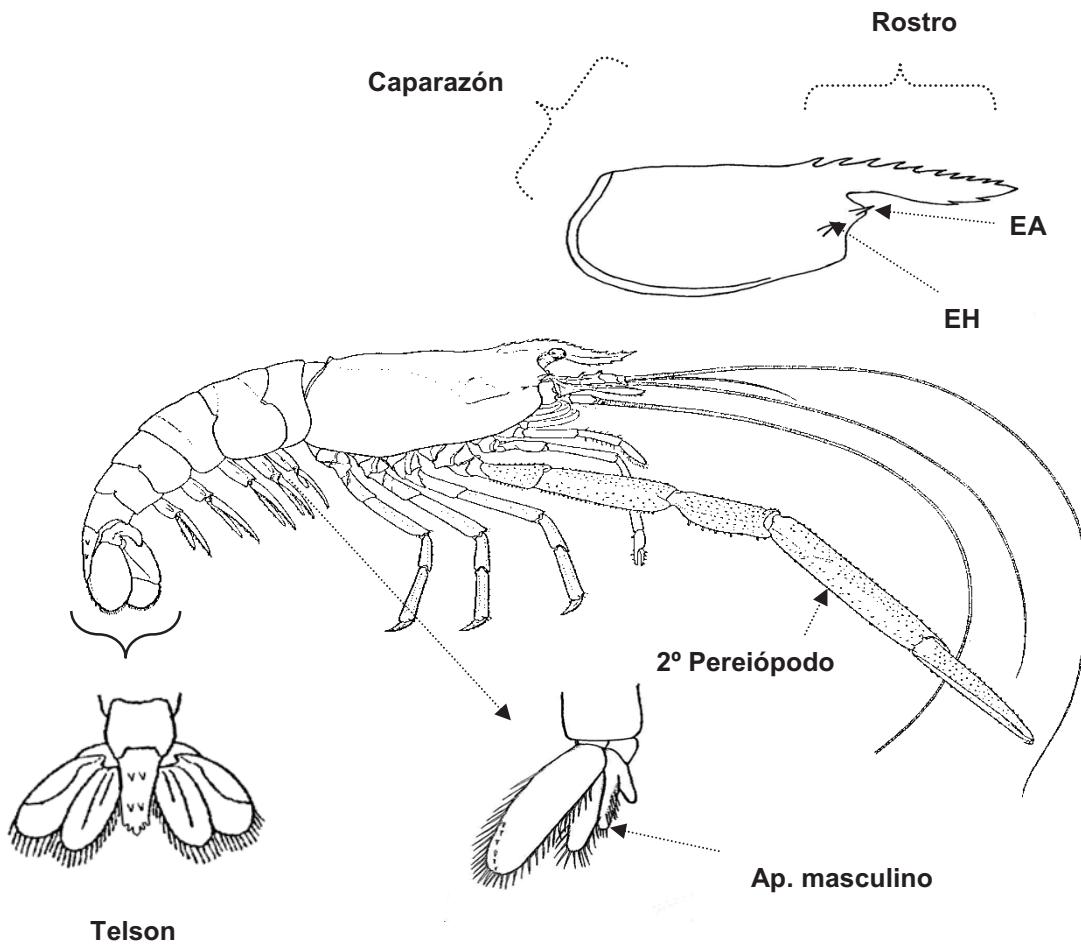


Figura 1. Esquema diagnóstico de *Macrobrachium* en el que se muestran espina hepática (EH) y antenal (EA) del caparazón, apéndice masculino, telson y 2° pereopodo mayor (Modificado de Holthuis, 1952 y Acuña, 2002).

Taxonómicamente el género *Macrobrachium* se clasifica como sigue:

Reino:	Animal
Phylum:	Arthropoda
Subphylum:	Crustacea Brünnich, 1772
Clase:	Malacostraca Latreille, 1802
Subclase:	Eumalacostraca Grobben, 1892
Superorden:	Eucarida Calman, 1904
Orden:	Decapoda Latreille, 1802
Suborden:	Pleocyemata Burkenroad, 1963
Infraorden:	Caridea Dana, 1852
Superfamilia:	Palaemonoidea Rafinesque, 1815
Familia:	Palaemonidea Rafinesque, 1815
Subfamilia:	Palaemoninae Rafinesque, 1815
Género:	<i>Macrobrachium</i> Bate, 1868

Regionalmente, las diferentes especies de *Macrobrachium* se conocen como: “langostinos”, “acamayas”, “camarón de río”, “cauque”, “chacales” o “piguas”, dependiendo de la especie y de su ubicación geográfica (Acuña, 2002).

La determinación taxonómica de las especies que integran el género está basada completamente en caracteres morfológicos como la forma y dentición del rostro (Fig. 1), la forma y la ornamentación del segundo par de quelípedos (Fig. 2) y las proporciones de los artejos que lo constituyen, en particular los dedos y la palma de la quela, el carpopodito y el meropodito (Holthuis, 1950b; Villalobos, 1967a; 1982; Jayachandran, 2001; Hernández *et al.*, 2007) (Fig. 2).

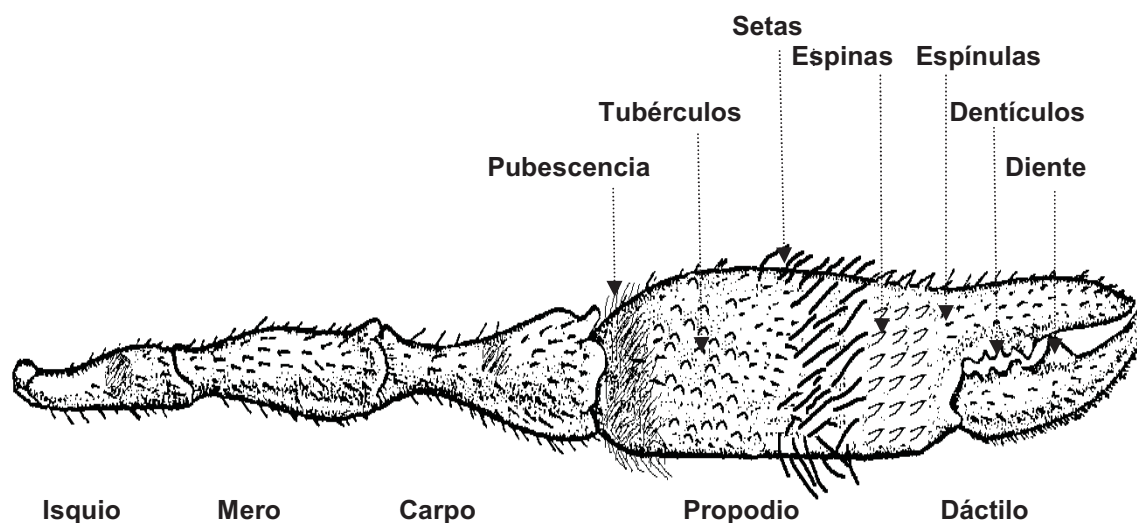


Figura 2. Caracteres diagnósticos del segundo pereópodo mayor en las especies de *Macrobrachium* (Modificado de Holthuis, 1952).

Estos caracteres morfológicos son altamente conservados y con el incremento en el número de especies, muchas veces no son lo suficientemente categóricos para su determinación. Además estos caracteres están sujetos a variabilidad por ontogenia,

dimorfismo sexual y estado de desarrollo de las diferentes especies, como también pueden ser modificados por factores ambientales de la propia distribución geográfica (Villalobos, 1967a; Holthuis, 1952; Acuña, 2002; Hernández *et al.*, 2007).

BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES.

La biología de las especies del género *Macrobrachium* parece obedecer a un patrón común que es el hábitat dulceacuícola de los adultos. Liu *et al.*, (2007) divide el género en dos grupos ecológicamente distintos: el primero, que incluye al 75% de las especies, que son las que presentan una amplia distribución geográfica y tiene desarrollo larvario extendido (DLE), con 10 a 12 estadios de desarrollo como el común de los crustáceos. Sin embargo, durante el período reproductivo, las hembras ovígeras (portando cientos de miles de huevecillos) precisan migrar del agua dulce, hacia lagunas costeras o estuarios con salinidades moderadas a altas necesarias para la eclosión de las larvas y su desarrollo hasta el estadio juvenil. Con frecuencia larvas y juveniles son arrastrados por las grandes avenidas de los ríos hacia las zonas costeras y partes bajas de los ríos, lo que facilita la dispersión de las especies (Villalobos, 1982; Acuña, 2002).

El segundo grupo lo conforman especies de *Macrobrachium* de menor talla, que presentan distribución puntual, completamente dulceacuícolas y con desarrollo larvario abreviado (DLA) (máximo tres estadios). Esto ocurre mediante estrategias fisiológicas notables, por ejemplo: el decremento del tamaño de la puesta (número de huevos), el aumento en el tamaño de los huevos y en aumento en el contenido de vitelo en ellos (Jalihal *et al.*, 1993).

Además de las conspicuas características morfológicas y conductuales que caracterizan a ambos grupos de especies, se deben tener en consideración los aspectos reproductivos y las adaptaciones fisiológicas que regulan el proceso osmoregulatorio para ser exitosos en los diferentes ambientes donde se han establecido.

REPRODUCCIÓN.

El ciclo reproductivo comienza con el apareamiento, que tiene lugar pocas horas después de que la hembra ha mudado. El macho deposita el espermátforo en la coxa del tercer pereiópodo de la hembra e inmediatamente ella oviposita cientos de miles de pequeños huevecillos de 0.04 a 0.07 mm de diámetro por puesta, los que son fecundados al contacto con la esperma que ha depositado el macho. Particularmente en las especies con DLE los huevos son incubados en los pleópodos de la hembra por un promedio de 20 días dependiendo de la especie. Las hembras fertilizadas deben migran río abajo hacia zonas con altas a moderadas concentraciones de solutos disueltos las que estimulan la eclosión de los huevos dando inicio al desarrollo larvario. Después del desarrollo de las laras en agua salobre, los juveniles migran al agua dulce.

En el desarrollo larvario, en los crustáceos en general, es la estrategia reproductiva mediante la cuál el embrión, contenido en un huevo, eclosiona originando una larva planctónica conocida como nauplio, que completa su madurez larval pasando por 10 a 12 estadios larvales hasta alcanzar la etapa de juvenil.

Sollaud (1923) y Jalihal *et al.*, (1993) han propuesto la siguiente clasificación con base en el número de estadios larvarios: Desarrollo Tipo I, prolongado, normal, extendido o completo que a la vez se subdivide en: Tipo IA, con 10 o más estadios larvarios y Tipo IB, con 8 a 9 estadios larvarios. Desarrollo Tipo II, parcialmente abreviado y se subdivide en: Tipo IIA, con tres estadios larvarios y Tipo IIB, con dos estadios larvarios. Desarrollo Tipo III, que es completamente abreviado, aquí todos los estadios larvarios ocurren dentro de un huevo lecitotrófico. Según esta clasificación el desarrollo larvario abreviado (DLA) corresponde al tipo III.

Particularmente en las especies de *Macrobrachium* con DLA, las hembras ovígeras producen alrededor de 50 huevos lecitotróficos de gran tamaño (+/- 2.0 mm de diámetro) con suficiente vitelo para alimentar a las larvas, de tal manera que de los huevos eclosionan organismos juveniles, que tienden a permanecer cerca de sus progenitores

(Álvarez *et al.*, 2002; González, 2002). Se ha descrito que durante la zoea, el único estadio larvario de las especies con DLA, las larvas carecen de las espinas supraorbital y epigástrica o posterolateral en el caparazón y de la espina en el quinto segmento abdominal.

El primer reporte de desarrollo larvario abreviado en el género *Macrobrachium* fue publicado por Müller (1880) en la especie *Macrobrachium potiuna* (Müller, 1880) cuando ésta se conocía como *Palaemon potiuna*. Posteriormente Sollaud (1923) sugiere que *Macrobrachium iheringi* (Ortman, 1897) pudiera presentar esta característica. Hasta 2012 alrededor del 25% de las especies de *Macrobrachium* del mundo presentan DLA. De estas 42 especies son epígeas (habitan en ríos, vertientes sobre la superficie del suelo) y se distribuyen de la siguiente forma: dos en Australia, 11 en Asia, seis en África, dos en la India, una en Japón, 17 en Sudamérica (todas asociadas a la cuenca del Amazonas) y tres en México (Chace y Bruce, 1993; Pereira y García, 1995; Villalobos y Álvarez, 1999; Acuña, 2002). Sin embargo, las poblaciones de *M. nipponense* (De Hann, 1849) y *M. amazonicum* (Heller, 1862) pueden presentar, indistintamente, uno u otro tipo de desarrollo larval, dependiendo de las características hidrogeográficas del medio (Mashiko, 1990; 1992; Armada, 1993; Odinetz y Rabelo, 1996). En *M. amazonicum*, las características del DLA guardan una estrecha relación con la clima geográfica, es decir, a medida que las poblaciones de estas especies se alejan del medio salino el tamaño de la puesta disminuye, el tamaño de los huevos y el contenido de vitelo aumenta. Su significado ecológico puede estar relacionado a continuos cambios en factores ambientales como la estacionalidad, la temperatura y/o la longitud del día (Odinetz y Rabelo, 1996). En *M. nipponense*, el tipo de desarrollo varía entre las poblaciones dependiendo de las características del medio: pocos y pequeños huevos en poblaciones estuarinas, tamaño medio de huevos en lagunas salinas y pocos huevos de gran tamaño en islas dulceacuícolas, independientes de su posición geográfica en las distintas islas del Japón (Mashiko, 1990; Armada, 1993).

Raven (1961) postula que el volumen de los huevos, en algunas especies de crustáceos, está determinado genéticamente. Mashiko (1990, 1992) genera híbridos (F1)

de *M. nipponense* cuyos fenotipos son intermedios en ambos tamaños de huevos, concluyendo que esta peculiaridad reproductiva está controlada por un sistema genético cuantitativo.

OSMORREGULACIÓN.

Los aspectos fisiológicos de las especies de *Macrobrachium* con DLA han sido poco estudiados, principalmente, porque no son un recurso de elevado interés comercial. Sin embargo, es sabido que la capacidad de osmorregulación y la constancia de las tasas metabólicas son parámetros que están asociados a un concomitante costo metabólico y una asignación diferencial de recursos energéticos (Clarke y Johnson, 1999).

Los langostinos con DLE, se clasifican como osmoconformadores. Sin embargo los langostinos completamente dulceacuícolas son osmorreguladores, lo que implica que sus líquidos corporales son hiperosmóticos con relación al agua que los rodea, por ello enfrentan dos tipos de problemas osmorregulatorios. Primero estar sujetos a hidratación por la entrada de agua debido al gradiente osmótico y segundo evitar la pérdida continua de sales corporales al medio. Entonces los langostinos con DLA deben evitar la ganancia neta de agua (extrayendo el exceso en forma de orina diluida) o la pérdida neta de sales. Los mecanismos de como logran esto no han sido estudiados en detalle, pero es *posible* pensar en modificaciones y/o adaptaciones en las membranas de recubrimiento branquial, en el tipo y número de laminillas branquiales, en los órganos excretores, en el número y tipo de células linfáticas.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

A la fecha se conocen aproximadamente 240 especies de *Macrobrachium* en el mundo (Holthuis, 1950; Chace y Bruce, 1993; Jayachandran, 2001; Short, 2004; Wowor *et.al.*, 2009) y numerosas especies crípticas aún sin describir (Cai y Ng, 2002; Acuña, 2002). Estas especies se distribuyen en una amplia variedad de ambientes en las zonas tropicales y subtropicales de todos los continentes: estuarios, lagunas costeras, lagos, ríos

(desde la planicie costera hasta altitudes de 1100 metros), cenotes, cavernas, cañadas, manantiales y arroyos de montaña (Chace y Bruce, 1993; Villalobos, 1982; Villalobos y Álvarez, 1999; De Melo, 2003; Jayachandran, 2001; Murphy y Austin, 2005). Sin embargo, es en la región Indo-Pacífica, particularmente en la India y el sureste asiático, donde se conoce la mayor diversidad de especies (Murphy y Austin, 2005).

Las especies americanas de *Macrobrachium* se distribuyen a través de ambas vertientes oceánicas. En la ribera Atlántica se localizan desde los sistemas ribereños de Illinois, Estados Unidos (Bowles *et al.*, 2000) hasta Argentina (Rodríguez de la Cruz, 1965) y por la vertiente del Pacífico, desde el Golfo de California hasta el Perú (Holthuis, 1952; Wicksten y Hendrickx, 2003). Con presencia en 24 países americanos, se distribuyen al menos 57 especies (aproximadamente el 25% del total de las especies descritas para el mundo) (Anexo I). Veintiocho de ellas (aproximadamente el 50% de las especies americanas) presentan desarrollo larvario abreviado (Tabla I).

En México se han registrado 24 especies de *Macrobrachium*, con presencia en 21 estados de la República. Tres de ellas sólo han sido reportadas una vez: *M. quelchi* De Man, 1900 en el río Otolun al este de Palenque, Chiapas; *M. nattereri* (Heller, 1862) en el río de la Sierra en Tabasco (Rodríguez de la Cruz, 1965) y *M. jelskii* (Miers, 1877) en las cercanías de la ciudad de Veracruz (Wicksten, 2005).

Cinco especies con distribución puntual y DLA fueron descritas posterior al desarrollo de esta investigación por lo cual no fue posible incluirlas en el análisis: *M. sbordonii* Mejia-Ortiz *et al.*, 2008 en el lago terminal del Sistema de la Lucha, Estado de Chiapas; *M. oaxacae* Mejia-Ortiz y López-Mejía, 2011 en el Río La Junta en Oaxaca; *M. cosolapaense* Mejia-Ortiz y López-Mejía, 2011 en el Río La Junta en Oaxaca; *M. mazatecum* Mejia-Ortiz y López-Mejía, 2011 en los dos arroyos de Veracruz y en un nacimiento del Valle de Oaxaca; *M. jacatepecense* Mejia-Ortiz y López-Mejía, 2011 en un nacimiento cercano a Jacatepec, Oaxaca (incluidas en en Anexo I).

Las otras 16 especies mexicanas de *Macrobrachium* (Tabla II) son frecuentes y están distribuidas en diversos ambientes a lo largo de ambas vertientes oceánicas. Once de estas especies presentan DLE, seis de las cuales son consideradas “especies geminadas” (término empleado por Jordan (1908), para referirse a duplas de especies de amplia distribución, similares morfológicamente pero que están separadas por una barrera geográfica por lo cuál no co-existen, por ejemplo la masa continental que limita la distribución de una especie en una vertiente oceánica y a la otra especie en la otra vertiente oceánica. Morfológicamente llegan a ser tan similares que son inidentificables, por ello también se les conoce como especies gemelas o especies geográficas (dependiendo de donde fue colectada es la identificación específica que se le atribuye). Entonces tres especies mexicanas con DEL se distribuyen a través de la vertiente atlántica (*M. acanthurus* Wiegmann, 1836; *M. carcinus* Linnaeus, 1758; *M. heterochirus* Wiegmann, 1836) y sus respectivos simil morfológicos se distribuyen a través de la vertiente pacífica (*M. tenellum* Smith, 1871; *M. americanum* Bate, 1868 y *M. occidentale* Holthuis, 1950) (Tabla II).

Siguiendo con las especies con DLE, *M. hobbsi* Nates y Villalobos, 1990 y *M. olfersii* Wiegmann, 1836 son anfiamericanas, al presentar una amplia distribución a través de ambas vertientes oceánicas, mientras que *M. digueti* Bouvier, 1895; *M. acanthochirus*, Villalobos, 1967b y *M. michoacanus* Nates y Villalobos, 1990 se encuentran sólo en la vertiente pacífica de México (Tabla II).

De las cinco especies con DLA, dos de ellas son estigobioticas (se refiere a especies hipogeas, es decir que viven bajo la tierra en cuevas o cavernas, y que todo su ciclo biológico dentro de las cuevas, sin luz o medio, obscuricola) *M. villalobosi* Hobbs, 1973b y *M. acherontium* Holthuis, 1977; que han adquirido modificaciones morfológicas para la vida hipógea o bajo tierra. Las tres restantes: *M. tuxtlaense* Villalobos y Álvarez, 1999; *M. vicconi* Román, Ortega y Mejía, 2000 y *M. totonacum* Mejía, Álvarez y Hartnoll, 2003, son epigeas (especies que viven sobre el continente es decir en cerpos de agua sobre la superficie terrestre) (Tabla II). Habitantes de cañadas, manantiales y arroyos alejados de la línea de costa y aislados geográficamente entre si. Las poblaciones de estas especies

están genéticamente estructuradas, tienen escaso o nulo intercambio genético y alta endogamia. En conjunto estos factores han favorecido el proceso de especiación (Acuña, 2002).

Además de estas 16 especies nativas, en México, se encuentra la especie exótica *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) conocida como “langostino malayo,” que es una especie introducida desde Asia para el cultivo comercial. Estudios filogenéticos recientes han mostrado que *M. rosenbergii* presenta dos haplotipos mitocondriales diferentes, uno proveniente de las poblaciones asiáticas de la especie, y el otro característico de las poblaciones australianas (De Bruyn *et al.*, 2004; Murphy y Austin, 2005). Actualmente no se sabe con certeza cual de los haplotipos mitocondriales es el que se ha intentado cultivar en México, con pocos avances en el logro de la reproducción en cautiverio (Ponce-Palafox *et al.*, 2002).

CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS HÁBITAT.

En términos generales, las especies de *Macrobrachium* con DLE se caracterizan por presentar mayores tallas corporales, grandes tamaños poblacionales y distribución continua a través de los ríos, lo que mantiene el intercambio de flujo genético (Acuña, 2002). Vale mencionar que dependiendo de la especie, hay poblaciones que se ubican en las partes altas, medias y baja de los ríos, así como las que pueden estar permanentemente en las zonas estuarinas y probablemente en las cabeceras de los ríos (Villalobos, 1982).

Los langostinos con DLA son dulceacuícolas durante todo el ciclo de vida. Los hay de hábitats troglobios (profundidades de las cavernas), cuyas variaciones morfológicas son notables para adaptarse al ambiente estigobiótico, por ejemplo: la disminución de los pigmentos corporales, la elongación de sus pereiópodos y la pérdida total o parcial de la córnea (Culver, 1982; Villalobos, 1982; Mejia-Ortiz y Palacios-Vargas, 2001). Las especies epígeas que se distribuyen en manantiales, arroyos y quebradas de montaña, sin comunicación ni acceso al mar o bien tan distantes de la línea de costa que la migración al mar y después río arriba, es un evento verdaderamente impracticable. Estas especies

mantienen el patrón morfológico común de un langostino, pero han reducido su talla corporal, sus quelas son poco desarrolladas, no presentan dimorfismo sexual conspicuo, tienen distribución puntual, los tamaños poblacionales son reducidos y el flujo genético es mínimo (Villalobos y Álvarez, 1999; Román *et. al.*, 2000; Acuña, 2002).

Villalobos (1982) propuso una clasificación de los ambientes en los que se pueden encontrar las especies de *Macrobrachium* con DLE de Mesoamérica y las Antillas. En esta tesis se incorporan, a esta clasificación, los ambientes en los que podemos encontrar a las especies de *Macrobrachium* con DLA y los hemos complementado incluyendo las características morfológicas de las especies, las características límnicas y físico-químicas de los diferentes cuerpos de agua, logrando una descripción como sigue:

1. En las partes más altas de los ríos (1,500 – 2,000 metros s.n.m) las corrientes son rápidas con mayores condiciones de energía (determinado por la pendiente del río, el caudal que lleve y por la época del año) las aguas son cristalinas, carentes de partículas en suspensión, son templadas (hasta 23 °C), con altas concentraciones de oxígeno (6 a 7 ml/L) y bajas concentraciones de materia orgánica, debido al arrastre continuo de las corrientes (Pérez y Segura, 1980), aún cuando la turbidez, producto de la materia orgánica en suspensión, es mayor antes de la corriente (salto del agua) que durante la misma. Esto se debe a que, mientras más pronunciada sea la pendiente y más irregular la topografía del fondo, el agua se desplazará como flujo turbulento provocando una mayor turbidez. Si el desplazamiento del agua es continuo, sin caídas abruptas, el agua se desplazará en capas de flujo laminar. En ambientes con características, como las mencionadas, se puede encontrar permanentemente y en mayor abundancia a especies como *M. carcinus*, *M. americanum*, *M. heterochirus* y *M. occidentale*. Estas especies de langostinos son las que alcanzan tallas comerciales, presentan marcadas líneas hidrodinámicas o estructuras que le sirven para anclarse a las irregularidades del fondo y evitar ser arrastrados por la corriente. Son marcadamente territorialistas, las poblaciones de machos (de ambiente natural o cultivo) presentan una jerarquía social, en la cual el macho alfa mediante la emisión de cierta feromona provoca un efecto inhibitor del crecimiento de las demás jerarquías de machos, siendo esta una de las causas porque los organismos de la misma

edad presentan un crecimiento o desarrollo desigual de sus estructuras (Ra'anán y Sagi, 1985; Salmeron, 1985; Ra'anán et al., 1991; Jayachndran, 2001). Sus grandes quelas están armadas con fuertes espinas, ornamentaciones que le permiten asirse al fondo rocoso, refugiarse en las oquedades que se forman entre las rocas y bolones del fondo de los ríos para evitar ser arrastrados por las corrientes. Tiene un marcado dimorfismo sexual y sus poblaciones son medianamente abundantes.

2.- El segundo tipo de ambiente está circunscrito a las partes bajas de las cuencas hidrográficas, cuerpos de agua lóticos con menor energía, corrientes lentas con flujo laminar y aguas entre turbias y claras, con temperaturas entre 23 y 26°C. Las concentraciones de oxígeno disuelto van disminuyendo pudiéndose encontrar, en promedio, 4 a 5 ml/L; pero con aumento de la concentración de materia orgánica. En esta zona habitan preferentemente y en mayor porcentaje especies como *M. acanthurus*, y *M. tenellum*, especies que presentan tallas medianas a grandes, el dimorfismo sexual no es un carácter conspicuo, las quelas son medianamente desarrolladas, sus poblaciones son muy abundantes y son explotadas comercialmente. El ciclo reproductivo es similar a las especies que habitan en las partes altas de los ríos, presentan DLE con dependencia de aguas salobres, por lo que migran a los estuarios o lagunas costeras para la eclosión de los huevos y el desarrollo de las postlarvas.

3.- El tercer tipo de hábitat incluye a las aguas tranquilas de las lagunas costeras que alcanzan temperaturas superficiales entre 26 y 28 °C, algunas con salinidades hasta las 15 ppm, con baja concentración de oxígeno (3 a 5 ml/L), son aguas turbias, poco transparentes, cargadas de partículas en suspensión que incluyen una cantidad importante de partículas orgánicas e inorgánicas (arcillas) que tienen un efecto abrasivo en el fondo, y probablemente sobre los huevecillos y las larvas, por el choque constante de éstos con las partículas en suspensión. En este tipo de ambiente, al igual que en los estuarios, donde también puede desembocar algún río, se encuentra la mayoría de las especies del género que tienen desarrollo completo, precisamente porque los estadios larvarios y las postlarvas hasta el estado de juvenil se desarrollan allí. Aún cuando hay poblaciones de especies como *M. tenellum*, que son residentes permanentes de este tipo de ambientes, ocupan

extensas áreas de distribución y son poblaciones tan abundantes que pueden ser explotadas comercialmente.

4.- Algunas especies de *Macrobrachium* con DLA son troglobias, habitantes de cavernas adaptados morfológicamente para vivir en este tipo de ambientes afóticos. Las adaptaciones morfológicas mas aparentes son la pérdida de pigmentación en sus cuerpos, la reducción o ausencia de la córnea, los pereiópodos son elongados lo que les permite arrastrarse en las grietas u oquedades de las cuevas. Al tener un mínimo movimiento, reducen su actividad metabólica y presentan cambios en el ritmo circadiano y probablemente al igual que especies cavernícolas de otros géneros tengan conductas y hábitos nocturnos (Culver, 1982).

Como generalidad, estos ambientes se caracterizan por la presencia de aguas turbias o claras dependiendo de los afluentes que las provean. Las concentraciones de oxígeno varían dependiendo del sector dentro de la cueva, pudiendo encontrar concentraciones verdaderamente anóxicas (0.1 ml/l) y otras muy bien oxigenadas con 7 ml/L (Cruz *et al.*, 2002). La temperatura promedio es de 22 °C, la concentración de materia orgánica también varía dependiendo del sector dentro de la cueva. Para México, el mayor porcentaje de materia orgánica reportado es de 3.9 % y coincide con el lugar que presenta la menor concentración de oxígeno (Mejía-Ortiz *et al.*, 1997). Algunas cuevas, como la de Las Sardinias en Tabasco, México, presentan colonias de bacterias quimiolitotróficas que son sulfato reductoras, por lo tanto, el agua presenta altas concentraciones de sulfato, calcio, potasio, sodio y cloro y el tipo de sedimento generalmente es lodoso (Mejía-Ortiz y Palacios, 2001; Mejía-Ortiz *et al.*, 2003).

5.- La mayoría de las especies de *Macrobrachium* con DLA, son epígeas. Viven en pequeños manantiales, charcos y arroyos de montaña con aguas someras, limpias, cristalinas y frías, alejados de la costa, con sustratos basálticos o rocas grandes, fondo terroso o de bolones pequeños, pobres en sales disueltas lo que favorece la solubilidad de los gases, con altas concentraciones de oxígeno disuelto, llegando casi a la saturación. Estos altos riachuelos de montaña, lo primero que denotan es su escasez, incluso

ausencia, de vegetación acuática y de organismos planctónicos. En este tipo de ambientes podemos encontrar a las especies mexicanas *M. tuxtlaense*, *M. vicconi* y *M. totonacum*. Estas especies han disminuido su talla corporal, el dimorfismo sexual no es aparente, sus quelas no son desarrolladas y sus cuerpos no presentan mayor ornamentación, generalmente tienen conductas bentónicas o se adhieren a la escasa vegetación del área, su distribución es tan puntual que rara vez dos especies coexisten en el mismo hábitat, lo que implica que no hay competencia interespecífica por recursos (Acuña, 2002; J.L. Villalobos com. pers).

EL GÉNERO *Macrobrachium* EN MÉXICO.

Los primeros estudios, en las especies mexicanas de *Macrobrachium* se iniciaron con Villalobos (1967a), quien agrupó a las especies mexicanas conocidas, en ese momento: *M. olfersii*, *M. digueti*, *M. acanthochirus*, *M. hancocki* (Holthuis, 1950b), *M. crenulatum* (Holthuis, 1950b) y *M. faustinum* (Holthuis, 1974b), en lo que denominó el “Grupo Olfersii” al considerar que los caracteres con los que se reconoce taxonómicamente, a cada una de estas formas se relacionaban estrechamente por la morfología y ornamentación de la quela y los artejos del segundo quelípodo mayor. Según el autor dichos rasgos corresponden a modificaciones del patrón morfológico común con el cual se reconoce taxonómicamente a *M. olfersii* (Fig. 3). Villalobos también propuso que la dispersión y distribución geográfica de las especies del “Grupo Olfersii” está determinada por la topografía del istmo de Tehuantepec (Fig. 3).

Hernández *et al.* (2007), basados en un estudio morfológico de las especies de *Macrobrachium*, de la península de Baja California asumen que *M. acanthochirus* es una especie morfológicamente similar a *M. digueti*, ya que al revisar el holotipo de esta última (Depositado en el Museo de Historia Natural de París) advierten el gran parecido en la forma de la quela mayor, del segundo pereiópodo, lo que los lleva a proponer que *M. acanthochirus* debe ser sinonimizada a *M. digueti*.

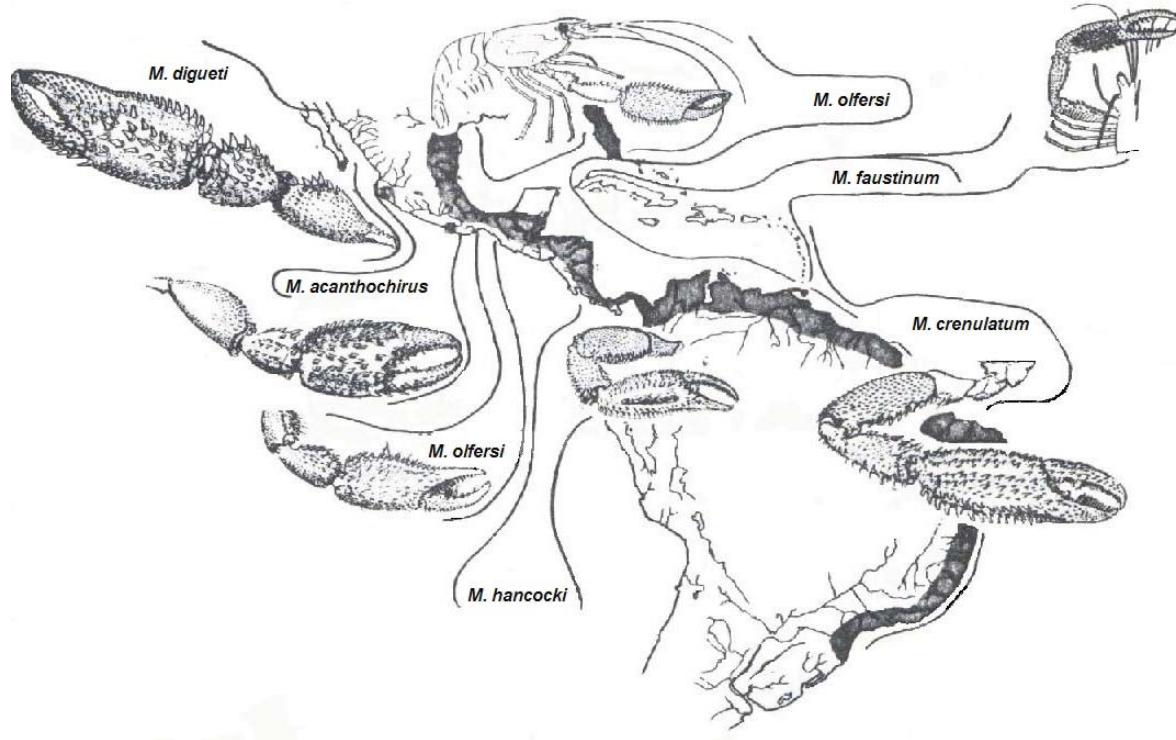


Figura 3. Especies que conforman el “Grupo Olfersii” y su distribución a través del Istmo de Tehuantepec (Tomado de Villalobos 1967a).

En los años setenta se describieron las primeras formas de *Macrobrachium* con DLA para México: Estas son las especies troglobias *M. villalobosi* y *M. acherontium*, con adaptaciones morfológicas para la vida hipógea (Villalobos, 1982; Mejía-Ortiz *et al.*, 1987; Palacios-Vargas, 2001). En lo referente a las formas epígeas de langostinos con DLA, hace quince años, se conocían solo 39 especies en el mundo (Pereira y García, 1995; Chace y Bruce, 1993), pero ninguna en México ni Norteamérica. Fueron Signoret *et al.* (1998) quienes informaron, el DLA en una especie chiapaneca, no descrita, de *Macrobrachium*. A la fecha se han descrito *M. tuxtlaense*, *M. vicinni* y *M. totonacum* y otras dos especies por describir *Macrobrachium* sp. 1 y *Macrobrachium* sp. 2 (Acuña, 2002).

Villalobos (1967a) consideró a *M. offersii* como el tronco original de lo que denominó “El grupo Olfersii”, ya que esta especie se distribuye por todas los sistemas hidrológicos de

la vertiente Atlántica, desde el norte de Tamaulipas (en México) hasta el sur de Brasil, así como muy cerca del litoral Pacífico, donde pudo establecerse gracias a las condiciones hidrológicas del Istmo de Tehuantepec. La presencia de especies afines al grupo *Olfersii*, que habitan en la costa Pacífica, lleva a pensar en una antigua dispersión del tronco original a través del Istmo de Tehuantepec hasta establecerse en la costa oriental de la península de Baja California, teniendo tales especies tiempo suficiente para evolucionar en forma independiente. Caso contrario a las especies geminadas del género *Macrobrachium* (Tabla III), que se ubican a ambos lados del Continente Americano las cuales, aparentemente, quedaron separadas e imposibilitadas de intercambio genético al surgir el Istmo de Panamá en el Mioceno (Jordan, 1908) o en el Plioceno (Mayr, 1946), teniendo también la posibilidad de evolucionar en forma independiente, pero no al grado de adquirir rasgos morfológicos específicos que permitieran diferenciarlas.

Actualmente, el hallazgo de especies epígeas de *Macrobrachium*, con DLA en el Sur de México permite suponer que la presencia del género en la región tropical de América es muy antigua. De esa manera, podría explicarse el patrón de distribución actual, desde la parte meridional de México hasta Sudamérica, haciendo referencia al periodo Jurásico, cuando lo que hoy conocemos como la costa Atlántica de México, Centro y Sudamérica estaba unida al Continente Africano. Este planteamiento coincide con la existencia de langostinos en un hábitat de agua dulce estrictamente bloqueado por una barrera de tierra (Bueno y De Almeida, 1995) manantiales y pequeños arroyos de montaña sin comunicación con la costa (Villalobos y Álvarez, 1999).

ORIGEN DEL DESARROLLO LARVARIO ABREVIADO (DLA).

El origen del DLA en los crustáceos palaemónidos ha generado una intensa polémica entre los especialistas del grupo. Hay quienes suponen un origen marino reciente de los palemónidos en general (Sollaud, 1923), interpretando el DLA como una tendencia de radiación adaptativa al ambiente dulceacuícola en respuesta a la presión de selección del medio (Sollaud, 1923; Shokita, 1979a y b; Magalhaes y Walker, 1988; Mashiko, 1992). La transición del medio ambiente marino al dulceacuícola sería por vía estuarina

(Hedgpeth, 1957). Se considera una evidencia de la invasión de los medios estuarinos, por las especies marinas, al género *Palaemon*, sugiriendo además que esta transición no es un proceso terminado (Tiwari, 1955a). Se considera que los langostinos *Macrobrachium* emergieron recientemente del mar y continúan el proceso de intrusión al agua dulce, donde el incremento del tamaño del huevo y el decremento en el tamaño de la puesta son una tendencia de cambio evolutivo (Ortmann, 1902; Tiwari, 1955a; Shokita, 1979a; Rodríguez, 1982; Magalhaes y Walker, 1988). Johnson (1973) postula el origen marino para la especie dulceacuícola *Macrobrachium lar*. Boulton y Knotts (1984) plantean la teoría de que la invasión de los hábitat dulceacuícolas, debió ser mediante un pequeño y cercano antecesor marino, probablemente una forma similar a *Palaemon intermedium* (antes *Macrobrachium intermedium*). Sin embargo, Pereira (1989) concluye que ninguna de las especies de *Macrobrachium* es realmente marina (ya que un elevado porcentaje de las especies de langostinos requieren de aguas con salinidades moderadas a altas para completar una parte del ciclo reproductivo, pero no son esencialmente marinas) y que sólo unas pocas especies de los géneros *Palaemon* y *Palaemonetes* son marinas litorales.

Magalhaes y Walker (1988) sugieren que el DLA es un fenómeno de convergencia múltiple. En contraste, Pereira (1995) argumenta que los palemónidos como *Euryrhinchidae*, *Troglocubanus*, *Palaemonetes* primitivo y *Pseudopalaemon* (ver Strenth, 1976 y Pereira, 1989) presentan DLA y por tanto, esta característica reproductiva constituye un rasgo plesiomórfico, razón por la que no debería suponerse un fenómeno de convergencia múltiple. Si ese fuera el caso, el desarrollo larvario abreviado aparecería debido a eventos evolutivos que ocurrieron cerca del origen de la familia Palaemonidae, más que debido a procesos recientes ocasionados por la evolución morfológica y por historias de vida independientes de la filogenia del grupo (Pereira, 1989). Este postulado es consistente con la actual distribución de las especies de *Macrobrachium* con DLA alrededor del mundo, (habitantes de grandes cuencas con una larga y compleja historia paleogeográfica), como es el caso de la mayoría de las especies sudamericanas, que están distribuidas en asociación a las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco (Pereira y García, 1995). Pereira y García (1995) concluyen que si el desarrollo larvario abreviado está relacionado con el origen de la familia Palaemonidae, probablemente durante el período

Cretácico, este tipo de desarrollo es común entre palaemónidos estrictamente dulceacuícolas y puede ser explicado con base en su historia filogenética, más que por convergencia independiente debida a presión de selección. Strenth (1976) planteó que el DLA se presenta como un ancestro común, por tanto representa un linaje monofilético independiente para las especies de *Macrobrachium*. En relación a esto, Rabalis y Gore (1985) consideran que las especies de *Macrobrachium* están radiando, mediante intrusión, hacia los medios dulceacuícolas y que la selección natural actúa a favor del DLA en varios linajes independientes. Otras alternativas son posibles, como la sugerida por Pereira y García (1995), plantean que el DLA puede ser un rasgo primitivo del que deriva el DLE que por algún motivo se presenta un segundo proceso de invasión a los ambientes estuarinos y dulceacuícolas. Sin embargo, los autores no explican el mecanismo de una primera y segunda invasión de las formas de agua dulce. Short (2000) indica que dada la gran diversidad genética entre las especies de *Macrobrachium* y su amplia distribución actual, el desarrollo abreviado se debió dar en un periodo de tiempo largo, posiblemente originado en el Oligoceno o a principios del Mioceno. Villalobos (1982) menciona que hay un acuerdo de los autores de que los palaemonidos son de origen muy reciente y su dispersión, a partir de sus ancestros marinos, pudo haberse iniciado durante el Pleistoceno o Postmioceno.

Tabla I. Especies de *Macrobrachium* con desarrollo larvario abreviado, en el mundo.

Especie	Tamaño del huevo (mm)	Número de huevos por puesta	Localidad	Referencia
<i>M. aracamuni</i> Rodríguez	2.8 x 1.6	20	S. América	Rodríguez, 1982
<i>M. atabapense</i> Pereira	¿?	¿?	S. América	Pereira, 1986
<i>M. borelli</i> (Nobili, 1896)	1.6	120	S. América	Boschi, 1961; Sollaud, 1923
	2.0 x 1.1	¿?		Holthuis, 1952
<i>M. brasiliense</i>	2.0 x 1.5	64	S. América	Pereira, 1989
<i>M. cortezi</i> Rodríguez	2.5 x 1.5	30	S. América	Pereira, 1989
	2.83 x 2.58	10 – 20		Rodríguez, 1982
<i>M. depressimanum</i> Pereira	1.5 x 1.8	15	S. América	Pereira, 1993
<i>M. dierythrum</i> Pereira	¿?	¿?	S. América	Pereira, 1988
<i>M. ferrierai</i> Kensley & Walker, 1982	3.66 x 2.44	25 - 35	S. América	Magalhaes y Walker, 1988
<i>M. iheringi</i> (Ortman, 1897)	2.2 x 1.7	55- 110	S. América	de Siquiera y de Almeida, 1995
<i>M. jelskii</i> (Miers, 1877)	2.17 x 1.58	46 - 80	S. América	Gamba, 1980
<i>M. nattereri</i> (Heller, 1862)	2.58 x 2.14	34 - 150	S. América	Pereira, 1989; Magalhaes y Walker, 1988.
<i>M. pectinatum</i> Pereira	2.3 x 1.5	40	S. América	Pereira, 1986
<i>M. potiuna</i> (Müller, 1880)	2.0 x 1.5	¿?	S. América	Sollaud, 1923
	1.9 x 1.3	24 – 66		Bueno y Rodríguez, s/p.
	2.0 – 1.5	8 – 29		Müller, 1892
<i>M. pumillum</i> Pereira	1.6	12	S. América	Pereira, 1986
<i>M. quelchi</i> (de Man)	2.0 x 2.5	15	S. América	Pereira, 1985b
<i>M. reyesi</i> Pereira	2.0 x 2.2	15 - 25	S. América	Pereira y Garcia, 1995
<i>M. rodriguezi</i> Pereira	1.3	22	S. América	Pereira, 1986
<i>M. inpa</i> Kensley & Walter, 1982	1.76 x 1.31	6 – 33	S. América	Walker y Ferreira, 1985
<i>M. villalobossi</i> Hobbs, 1973			Oaxaca, México.	
<i>M. acherontium</i> Holthuis, 1977			México	
<i>M. tuxtlaense</i> Villalobos & Álvarez, 1999			México	
<i>M. vicconi</i> Román, Ortega & Mejia, 2000			México	
<i>M. totonacum</i> Mejia, Álvarez & Hartnoll, 2002			Oaxaca, México.	
<i>M. asperulum</i> (von Martens, 1868)	1.6 x 1.3	26 - 116	S. E Asia	Shokita, 1977
<i>M. cavernicola</i> (Kemp)	2.1	¿?	S. E. Asia	Kemp, 1924
<i>M. fukienise</i> Liang & Yang	2.3 x 1.8	¿?	S. E. Asia	Xiang-Qiu y Shang-Liang, 1980.
<i>M. hendersonianum</i> Tiwan	Large	¿?	S. E. Asia	Jalihal y Sankolli, 1975
<i>M. maculatum</i> Liang & Yang	2.3 x 1.7	¿?	S.E. Asia	Xiang - Qiu & Shang – Liang, 1980
<i>M. malayanum</i> (Roux, 1934)	1.8 x 1.4	Pocos	S. E Asia	Chong y Khoo, 1987 ^a
<i>M. nipponense</i> (De Haan, 1849)	¿?		Asia	Mashiko, 1992; Armada 1993
<i>M. nepalense</i> (Kamita)	2.0 x 1.8	24	S. E Asia	Pereira, 1989
<i>M. palaemonoides</i> Holthuis	1.2 x 1.0	140	S. E. Asia	Kamita, 1974
<i>M. pilimanus</i> (De Man, 1879)	1.85 x 1.2	¿?	S. E. Asia	Chong y Khoo, 1987b
<i>M. sintangense</i> (de Man)	1.0 x 1.5	¿?	S. E. Asia	Holthuis, 1950

Continuacion Tabla I

Especie	Tamaño del huevo (mm)	Número de huevos por puesta	Localidad	Referencia
<i>M. trompii</i> (de Man)	Largo	¿?	S. E. Asia	Chong y Khoo, 1987b
<i>M. australiense</i> Holthuis, 1950	1.1 x 0.8	97 - 197	N. Australia	Fielder, 1970
<i>M. bullatum</i> Fincham	1.5 x 1.1	¿?	N. Australia	Fincham, 1987
<i>M. dierythrum</i> Pereira, 1986	Largos	Pocos	Este Africa	Holthuis, 1949
<i>M. foai</i> (Coutière)	Largos	Pocos	Este Africa	Holthuis, 1949
<i>M. lujae</i> (de Man)	Largos	Pocos	Este Africa	Holthuis, 1949
<i>M. raridens</i> (Hilgendorf)	3.0	62	Este Africa	Sollaund, 1923
<i>M. sollaudii</i> (de Man)	2.7	Pocos	Este Africa	Holthuis, 1949
<i>M. thysi</i> Powell	2.2 x 1.5	¿?	Este Africa	Powell, 1980
<i>M. kistnensis</i> Tiwari	Largos	Pocos	India	Jalihai y Sankolli, 1979; Shokita, 1985
<i>M. lamarrei</i> (Milde Edwarda)	¿?	¿?	India	Rajyalakshmi, 1961 (citado en Shy <i>et al.</i> , 1987); Jalihal <i>et al.</i> , 1980.
<i>M. hainanense</i> (Parisi, 1919)	¿?	30 - 74	India	Wong, 1989
<i>M. scambriculum</i> (Heller, 1862)	¿?		India	
<i>M. gangeticum</i> Bate	¿?		India	
<i>M. malcolmsonii</i> H. Milde-Edwards, 1844.	¿?		India	
<i>M. sankollii</i> Jalihal & Shenoy, 1988	¿?		India	
<i>M. shokitai</i> Fujino & Baba, 1970	2.0 x 1.4	80	Japón	Fujino y Baba , 1973; Shokita, 1973
	2.3 x 1.6	15 - 58		
<i>M. niphae</i> Shokita & Takeda, 1989	1.6 x 1.3	32 - 81	Japón	Shokita <i>et al.</i> , 1991
<i>M. sp 1</i> (Short, 2000)	¿?		Australia	
<i>M. handschini</i> J. roux, 1934			Australia	
<i>M. neglectum</i> (De Man, 1902)	¿?		Tailandia	
<i>M. platycheles</i> Ou & Yeo, 1995			Singapooore	
<i>M. amazonicum</i> Heller, 1862	¿?		Brasil	
<i>M. sbordonii</i> Mejía-Ortiz, Baldari & López-Mejía, 2008.	¿?	¿?	Chiapas, México.	Mejía-Ortiz <i>et al.</i> , 2008
<i>M. oaxacae</i> Mejía-Ortiz & López-Mejía, 2011	¿?	¿?	Oaxaca, México.	Mejía-Ortiz y López-Mejía, 2011
<i>M. cosolapaense</i> Mejía-Ortiz y López-Mejía, 2011	¿?		Oaxaca, México	Mejía-Ortiz y López-Mejía, 2011
<i>M. mazatecum</i> Mejía-Ortiz y López-Mejía, 2011	¿?	¿?	Veracruz, México	Mejía-Ortiz y López-Mejía, 2011
<i>M. jacatepecense</i> Mejía-Ortiz y López-Mejía, 2011	¿?	¿?	Oaxaca, México	Mejía-Ortiz y López-Mejía, 2011

Tabla II. Especies mexicanas del genero *Macrobrachium* incluidas en este estudio. Se indica vertiente de distribución, tipo de desarrollo larvario y tipo de hábitat. Las especies geminadas se marcan en igual color.

	Vertiente	Desarrollo Larvario	Hábitat	Característica
<i>M. acanthochirus</i> Villalobos, 1966	Pacífica	Extendido	Epigeo	Grupo Olfersii
<i>M. acanthurus</i> Wiegmann, 1836	Atlántica	Extendido	Epigeo	Geminada
<i>M. acherontium</i> Holthuis, 1977	Atlántica	Abreviado	Cavernícola	
<i>M. americanum</i> Bate, 1868	Pacífica	Extendido	Epigeo	Geminada
<i>M. carcinus</i> Linnaeus, 1758	Atlántica	Extendido	Epigeo	Geminada
<i>M. digueti</i> Bouvier, 1895	Pacífica	Extendido	Epigeo	Grupo Olfersii
<i>M. heterochirus</i> Wiegmann, 1836	Atlántica	Extendido	Epigeo	Geminada
<i>M. hobbsi</i> Nates & Villalobos, 1990	Anfiamericana	Extendido	Epigeo	Grupo Olfersii
<i>M. michoacanus</i> Nates & Villalobos, 1990	Pacífica	Extendido	Epigeo	Grupo Olfersii
<i>M. occidentale</i> Holthuis, 1950	Pacífica	Extendido	Epigeo	Geminada
<i>M. olfersii</i> Wiegmann, 1836	Anfiamericana	Extendido	Epigeo	Grupo Olfersii
<i>M. tenellum</i> Smith, 1871	Pacífica	Extendido	Epigeo	Geminada
<i>M. totonacum</i> Mejía, Álvarez & Hartnoll, 2003	Atlántica	Abreviado	Epigeo	
<i>M. tuxtlaense</i> Villalobos & Álvarez, 1999	Atlántica	Abreviado	Epigeo	
<i>M. vicconi</i> Román, Ortega & Mejía, 2000	Atlántica	Abreviado	Epigeo	
<i>M. villalobosi</i> Hobbs, 1973	Atlántica	Abreviado	Cavernícola	

CAPITULO II

Evolución Molecular: Análisis Filogenético y Comparado

El conocimiento intuitivo que se tiene de la permanencia de rasgos comunes en la progenie (ancestría-descendencia) y de la variabilidad morfológica (modificación de los caracteres), entre los individuos de una jerarquía determinada fue consolidado con los planteamientos de Darwin y Wallace y los de Mendel. A partir de la teoría de la selección natural, se generaron dos campos de estudio dentro de la biología: el de la historia evolutiva de los organismos y el de las fuerzas evolutivas que moldean la biodiversidad y las adaptaciones que producen (Futuyma, 1986).

La síntesis de la teoría darwiniana de la selección natural, con la teoría de la herencia de Mendel estableció lo que se conoce como el neo-Darwinismo o la síntesis moderna de la evolución, con la que se da inicio a los estudios de la genética de poblaciones y los análisis filogenéticos, A partir de los estudios desarrollados por Zuckerkandl y Pauling en 1962 y en 1965 de variación genética a nivel molecular, empleando proteínas y DNA y mediante la comparación de secuencias de proteínas de diferentes especies, postularon que había una relación lineal entre el tiempo de divergencia y la cantidad de sustituciones aminoacídicas entre parejas de especies. Y que este ritmo de cambio no podía ser el mismo para diferentes proteínas, aunque sea constante para una de ellas. Ya en la década de los años 60, la detección de elevados niveles de variación proteínica intraespecífica no podía ser justificada del todo por acción de la selección natural. Kimura (1968) propuso la teoría neutral de la evolución molecular, en la que postula que la mayor parte de la variación a nivel molecular, no es mantenida por la selección de tipo darwiniano, sino más bien de un balance entre la deriva génica y las mutaciones neutras (Kimura, 1983).

El descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick, en 1953, llevó a implementar técnicas apropiadas para su estudio. De esta forma surgió la técnica de Sanger en 1955, para la comparación manual de secuencias de proteínas. Fue hasta 1966 cuando, Lewontin y Hubby, en el mismo año, propusieron un método objetivo de

cuantificación de la variación, al estudiar los loci de enzimas codificantes mediante la movilidad de las moléculas en función de su tamaño, forma y carga eléctrica. Esta técnica, conocida como electroforesis de proteínas, resultó ser uno de los métodos más utilizados para medir la diversidad genética de las poblaciones naturales (Hillis y Moritz, 1990).

A mediados de la década de 1970 se dio a conocer la estructura de la molécula de DNA mitocondrial (mtDNA), cuyas características la han convertido en la unidad de estudio de la variación genética por excelencia a nivel molecular, debido a sus particulares características. Tiene una estructura circular, es covalentemente cerrada, su tamaño es pequeño (ca. 16-20 kilobases) y está conformada por 37 genes (13 RNAm, 2 RNAr y 22 RNAt), además de la región central o D-loop (ca, 1 Kb), que controla su replicación y transcripción. Tiene una tasa de sustitución nucleotídica excepcionalmente alta. Además, el mtDNA no se recombina, tiene gran variación intraespecífica y se hereda por línea materna (Avice, 1987).

En 1985 Karry B. Mullis, implementó la técnica de amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles), la cual es un proceso bioquímico que consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias, de un segmento específico de DNA, utilizando una polimerasa que puede funcionar a elevadas temperaturas ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive a temperaturas entre 79°C – 85°C y por ello su nombre Taq polimerasa.

La amplificación de DNA por PCR ha permitido la generación de secuencias nucleotídicas de varios organismos, para las cuales se ha realizado la optimización de varios métodos de análisis, dentro de ellos, las estimaciones de relaciones filogenéticas, a partir de datos moleculares, son de particular importancia, donde al igual que con caracteres morfológicos los resultados (cualitativos y cuantitativos) pueden denotarse como estados de carácter y ser analizados mediante métodos de sistemática filogenética.

En la estimación de filogenias a partir de secuencias moleculares es indispensable que estas estén alineadas y tengan la misma extensión. En el análisis comparativo de dos

o múltiples secuencias habrá cambios (sustituciones) en algunas bases nucleotídicas (las más comunes transversiones y transiciones), la medida más simple de cuantificar los cambios es calculando el porcentaje de similitud de nucleótidos lo que se conoce como distancia genética y representa una medida de similitud (Vandamme, 2003). En las reconstrucciones filogenéticas estas distancias genéticas son consideradas como un indicador de los cambios en la evolución de las especies (Page y Holmes, 1998). Cambios que son el resultado de la fijación exitosa de las mutaciones y la tasa a la cual se fijan se conoce como tasa evolutiva o tasa de fijación (Vandamme, 2003), que normalmente se expresa como el número de cambios de nucleótidos por sitio por unidad de tiempo. Una vez obtenidos los valores de distancia, es preciso representar los cambios en un árbol o grafo filogenético.

Las reconstrucciones filogenéticas se sustentan en el concepto darwiniano de “*descendencia con modificación*”, de forma que los caracteres heredados de un ancestro común, son indicativos de una relación genealógica. Desde el punto de vista evolutivo la semejanza puede ser dividida simplemente, en homología y en homoplasia. La homología es el parecido heredado a partir de un ancestro común, mientras que la homoplasia es un parecido no heredado (Simpson, 1961). La homoplasia, a su vez, se subdivide en convergencia y en reversión, mientras que la convergencia (también llamada paralelismo) es la aparición independiente en dos o más especies de un mismo carácter que no había aparecido antes. La reversión es la reaparición del carácter ancestral.

En algunos estudios sobre la sistemática filogenética (Hennig, 1950; 1966; 1968; Wiley, 1981; Nelson y Platnick, 1981) el concepto de homología debe diferenciarse en plesiomorfía (estado compartido ancestral) y apomorfía (estado derivado), de forma que sólo al compartir apomorfías (sinapomorfías) por distintas especies, es indicativo de un parentesco común y los grupos así constitutivos son monofiléticos.

En todos los análisis filogenéticos se debe tener alguna base para seleccionar él o los mejores árboles entre todos los posibles. Los métodos de reconstrucción filogenética buscan este objetivo de dos maneras: (1) definiendo una secuencia específica de pasos o

eventos (un algoritmo) que nos conduce a determinar un árbol (métodos “rápidos” como los de distancia) y (2) definiendo un criterio óptimo para comparar filogenias alternativas y decidir cual es la mejor (o igualmente aceptable) (métodos “lentos” como máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana).

Métodos de distancia: buscan una función de error que minimice las diferencias totales entre las distancias pareadas y las distancias en el árbol, mediante el uso de modelos.

Métodos cladísticos o de parsimonia: tienen como fundamento el principio de parsimonia (Ehrlich, 2001; Farris *et al.*, 1995) que dice: “que las hipótesis más simples son preferibles a aquellas más complejas y las hipótesis *ad hoc* deben ser evitadas siempre que sea posible”. En los métodos de parsimonia cada carácter es ubicado en el árbol, de forma tal que se minimice el número de cambios. Esto se desarrolla para cada carácter y en cada posible árbol. Para cada árbol, se determina la suma del número mínimo de cambios por carácter, o longitud del árbol, donde el grafo más corto es el elegido. Estos métodos utilizan sobre la base de un modelo explícito de cambio evolutivo.

Método de Máxima Verosimilitud (MV): este método evalúa la probabilidad de que un modelo evolutivo y una historia hipotética (árbol) pudieran dar origen a los datos observados, introduciendo los métodos estándares de estadística a un modelo probabilístico de evolución. El método de MV utiliza de manera explícita todos los datos, en lugar de reducirlos a un conjunto de distancias. Considera que los cambios son más probables a lo largo de las ramas largas que en las ramas cortas, por lo que la determinación de la longitud de las ramas es fundamental. En contraste al modelo de parsimonia, el de máxima verosimilitud trata de evaluar la cantidad real de cambios de acuerdo a un modelo evolutivo. Los tres componentes fundamentales del análisis de MV son: los datos, el modelo que describe la probabilidad de los datos observados y el criterio de máxima verosimilitud. Entre las limitaciones y ventajas del método, se tiene que este permite formular hipótesis y contrastarlas, todos los datos son utilizados, es intenso desde el punto de vista del cómputo, es sensible a los datos faltantes, la estimación filogenética

será buena o muy buena solo si el modelo usado es el adecuado.

La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una Filogenia (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio. Es decir, el objetivo final es un árbol filogenético que sea reflejo del proceso de evolución donde las entidades biológicas son el resultado de “descendencia con modificación” entre especies ancestrales y descendientes. Una manera de cumplir este objetivo es mediante la búsqueda de indicios de descendencia con modificación en las especies, ya sea caracteres morfológicos o moleculares (Peña, 2011).

Existen tres métodos comúnmente utilizados en estudios de sistemática filogenética: i) la Cladística, usando el principio de Máxima Parsimonia (MP); ii) Maximum Likelihood (ML) y la iii) Inferencia Bayesiana (IB).

La Inferencia Bayesiana (IB) es un método estadístico basados en modelos de evolución molecular, donde se toma en cuenta conocimiento a priori acerca de los caracteres, especialmente cuando son caracteres moleculares (frecuentemente secuencias de nucleótidos de DNA). La IB estima la probabilidad de qué tan bien los árboles filogenéticos son explicados por los datos (la matriz de caracteres) (Huelsenbeck *et al.* 2001, Brooks *et al.* 2007). Algunos autores prefieren usar la IB sobre el método de Maximum Likelihood (ML) debido a que el primer método utiliza “atajos” para los cálculos al emplear el algoritmo conocido como Markov Chain Monte Carlo (MCMC), el cual permite realizar búsquedas a través de un número menor de árboles según sus valores de probabilidades posteriores (Huelsenbeck *et al.*, 2001). Esto permite que la IB demande menos poder computacional y sea más rápida que el ML.

Los estudios moleculares utilizando genes del mtDNA en crustáceos han proporcionado una nueva visión de las relaciones filogenéticas tanto a nivel de especie como en grupos taxonómicos superiores (Bucklin *et al.*, 1995; Schubart *et al.*, 2000; Daniels, 2002; Crandall y Fitzpatrick, 1996; Crandall *et al.*, 1999; Murphy y Austin, 2002; 2003; 2004; 2005; Porter *et al.*, 2005; Robles *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007).

El mtDNA es una molécula circular de doble cadena, las que difieren en densidad porque las bases nitrogenadas no están distribuidas en forma equilibrada en ellas. Existen muchas copias del genoma mitocondrial en cada mitocondria ubicadas en los nucleoides de la molécula. El contenido de genes del genoma mitocondrial, en distintas especies, es conservado tanto en número como en funciones, pero altamente variable entre distintos organismos. En animales su tamaño es generalmente menor a 20 kilobases (por ejemplo en el hombre es de 16.569 kb), en cambio en las levaduras es de cerca de 80 kb y en las plantas varía entre 100 y 2.000 kb. La mayor diferencia es que en animales el mtDNA codifica algún producto en casi toda su extensión, mientras que en plantas y hongos existen largas secuencias (intrones) que no codifican producto alguno.

El genoma mitocondrial completo del langostino malayo *M. rosenbergii* fue secuenciado por Murphy *et al.* (2005b). Tiene una longitud de 15,772 pb, similar a la de otros crustáceos decápodos (Tabla III). La proporción del contenido de Guanina – Citosina (G+C) es del 37%, mayor que en otros decápodos (Tabla III) y artrópodos en general, para los cuales los valores extremos en contenido de G+C es del 14.7% en *Apis mellifera* (Crozier y Crozier, 1993) y de 37.7% en *Daphnia pulex* (Crease, 1999). Al igual que en la mayoría de los animales el genoma mitocondrial de *M. rosenbergii* contiene 13 marcos de lectura abiertos, basado en la secuencia y comparación de nucleótidos. El mapa genómico lo conforman 13 genes que codifican proteínas: citocromo C oxidasa (subunidades I, II y III), citocromo b, ATPasa sintetasa (subunidades 6 y 8) y NADH deshidrogenasa (subunidades ND-1,2,3,4L,4,5 y 6) y 24 genes de RNA, dos de ellos para RNAs ribosomal (l-rRNA o 16S y s-rRNA o 12S) y los 22 genes para RNAs de transferencia quienes portan diferentes aminoácidos, En la Tabla IV han sido ordenados estos genes según su ubicación en el genoma.

El primer estudio utilizando datos moleculares en especies del género *Macrobrachium* fue realizado por Pereira *et al.*, 1999., quienes determinaron la relación filogenética entre cuatro especies venezolanas de *Macrobrachium* utilizando secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen citocromo oxidasa I (COI). Posteriormente, Murphy y

Austin (2002; 2003; 2004; 2005) han dado seguimiento a dilucidar las relaciones filogenéticas de las especies australianas del género, mediante secuenciación de fragmentos de los genes 16S rRNA; COI y ATPasa. En el trabajo de Murphy y Austin (2005) presentan la relación filogenética de 28 especies del género provenientes de Oceanía (6), el Indo-Pacífico (7), Asia (6), el este de África (1) y centro y Sudamérica (8). Los autores postulan las posibles historias biogeográficas que han favorecido el patrón de distribución actual de estas especies, así como la relación genética del desarrollo larval abreviado dentro del género, su representación geográfica y la topología en los clados del árbol. En la publicación de Murphy *et al.* (2005b), se presenta la secuencia del genoma completo de *M. rosenbergii* y *Pseudocarcinus gigas*. Recientemente Liu *et al.* (2007) presentaron las relaciones filogenéticas de 60 especies del género, las 28 del trabajo de Murphy *et al.* (2005) a más otras 32 especies provenientes principalmente del este de Asia y del Indopacífico. Todos los autores dan especial énfasis a los posibles mecanismos de dispersión de las especies para establecer posibles hipótesis sobre la distribución actual del grupo. Aún cuando las especies del género *Macrobrachium* son importantes en diversos aspectos de la fauna carcinológica mexicana, no se han realizado estudios moleculares para las especies locales como tampoco los hay para las especies americanas del género, salvo algunas especies que han sido incluidas en los trabajos ya citados. Mediante herramientas moleculares se requieren estudios que incluyan un número representativo de especies de todos los continentes y con ambos desarrollos larvarios para poder dilucidar el origen del desarrollo abreviado en el grupo.

Tabla III. Especies de crustáceos decápodos para los cuales se ha secuenciado el genoma mitocondrial completo.

Especie	Número de Ingreso al GenBank	Longitud (pb)	Contenido GC (%)	Referencia
<i>Callinectes sapidus</i>	AY 363392	16,263	30	Sin publicar
<i>Cherax destructor</i>	AY 383557	15,895	37	Muller AD, Nguyen TT, Burr ridge CP, Austin CM. 2004. <i>Gene</i> Apr 28; 331: 65-72
<i>Eriocheir japónica</i>	AY 274302	16,354	28	Sun H, Zhou K, Song D. 2005. <i>Gene</i> . Apr 11; 349: 207-217.
<i>Geothelphusa dean</i>	AB 187570	18,197	25	Segawa RD, Aotsuka T. 2005. <i>Gene</i> . Aug 1; 335: 28-39.
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	AY 659990	15,772	37	Muller AD, Murphy NP, Burr ridge CP, Austin CM. 2005. <i>Mar Biotech</i> . Jul-Aug 7(4): 339-49.
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AP 006346	15,968	33	Yamauchi MM, Miya MV, Machida RJ, Nishida M 2005. <i>Mar Biotech</i> . Sep-Oct 6 (85): 419-29.
<i>Panulirus japonicus</i>	AB 071201	15,717	35	Yamahuchi M, Miya M, Nishida M. 2002. <i>Gene</i> . Jul 24; 295(1): 89-96.
<i>Pagurus longicarpus</i>	AF 150756	15,630	28	Hickerson MJ, Cunningham CW. 2000. <i>Mol. Biol. Evol.</i> Apr 17(4): 639-644.
<i>Penaeus monodon</i>	AF 217843	15,984	29	Sin publicar
<i>Portunus trituberculatus</i>	AB 093006	16,026	29	Yamauchi MM, Miya MU, Nishida M. 2003. <i>Gene</i> . Jun 5; 311: 129-135.
<i>Pseudocarcinus gigas</i>	AY 562127	15,515	29	Muller AD, Murphy NP, Burr ridge CP, Austin CM. 2005. <i>Mar Biotech</i> . Jul-Aug 7(4): 339-49.

Tabla IV. Organización del genoma mitocondrial de *M. rosenbergii*: Trece genes que codifican proteínas y 21 genes de RNA, dos para RNAs ribosomal y 22 para RNAt de transferencia, se representan ordenados según su ubicación en el genoma (en color el segmento del 16S RNA de este estudio).

Genes RNAs	Locus de Proteína	Ubicación	Longitud (pb)	Producto
Transferencia	COX1	1 – 1535	+ 511	Citocromo C oxidasa sub. I + tRNA-Leu
Transferencia	COX2	1536 – 1599	+ 229	Citocromo C oxidasa sub. II + tRNA-Lys
Transferencia		1602 – 2289		+ tRNA-Asp
	ATP8	2290 – 2357		ATPasa sintetasa F0 sub. 8
	ATP6	2358 – 2423	+ 52	ATPasa sintetasa F0 sub. 6
	COX3	2424 – 2582	+ 224	Citocromo C oxidasa sub. III + tRNA- Gly
Transferencia		2576 – 3248	+ 264	NADHdehidrogenasa sub. 3 + tRNA- Ala
	ND3	3249 – 4043	+ 117	+ tRNA- Arg
Transferencia		4050 – 4114		+ tRNA- Asn
Transferencia		4115 – 4468		+ tRNA- Ser
Transferencia		4469 – 4531		+ tRNA- Glu
Transferencia		4531 – 4592		- tRNA- Phe
Transferencia		4594 – 4658		NADHdehidrogenasa sub. 5 - tRNA- His
Transferencia		4659 – 4725		NADHdehidrogenasa sub. 4 - tRNA- Thr
Transferencia		4728 – 4796		NADHdehidrogenasa sub. 4L + tRNA- Thr
Transferencia		4796 – 4861		- tRNA- Pro
	ND5	4862 – 6568	- 568	NADHdehidrogenasa sub. 6 + tRNA- Ile
Transferencia		6568 – 6650		Citocromo b + tRNA- Ser
	ND4	6653 – 7987	- 444	NADHdehidrogenasa sub. 1 - tRNA- Leu
	NDL4L	7981 – 8280	- 99	- I-rRNA
Transferencia		8283 – 8347		- tRNA- Val
Transferencia		8347 – 8412		- s-rRNA
	ND6	8414 – 8928	+ 171	+ tRNA – Ile
	CYTB	8929 – 10060	+ 377	+ tRNA – Gln
Transferencia		10061 – 10129		+ tRNA – Met
	ND1	10150 – 11088	- 312	NADHdehidrogenasa sub. 2 + tRNA – Trp
Transferencia		11088 – 11121		- tRNA – Cys
Ribosomal		11185 – 12489		- tRNA – Tyr
Transferencia		12490 – 12556		
Ribosomal		12557 – 13408		
Transferencia		14340 – 14406		
Transferencia		14435 – 14502		
Transferencia		14514 – 14582		
	ND2	14582 – 15575	+ 331	
Transferencia		15576 – 15644		
Transferencia		15646 – 15709		
Transferencia		157010 – 15772		

Aún cuándo el género *Macrobrachum* es un importante componente de la fauna carcinológica mexicana, no se han realizado estudios moleculares que contribuyan a la sistemática de las especies. Tampoco se han realizado estimaciones puntuales del tiempo de origen del género en los distintos continentes y del tiempo de divergencia de las especies con desarrollo larvario abreviado y extendido. Es importante estudiar la divergencia evolutiva de las especies mexicana geminadas por barreras geográficas. Igualmente, conocer en

un contexto global, la distribución del desarrollo larvario abreviado dentro de la filogenia molecular del género.

En este capítulo se presentan las actividades realizadas para la obtención de los siguientes

OBJETIVOS

1. Construir una filogenia molecular (16S rRNA), de 16 especies mexicanas de *Macrobrachium*. Identificar en la filogenia que se obtenga las especies con DLA.
2. Incluir en la filogenia anterior las secuencias de nuevas poblaciones mexicanas de *Macrobrachium* (con DLA y DLE) y las secuencias de especies de langostinos americanas colectadas para este estudio. Identificar en la filogenia que se obtenga las especies y poblaciones con DLA.
3. Análisis genético (16S rRNA y COI) entre dos propuestas nuevas especies de *Macrobrachium* con DLA (*M. new sp. 1* - *M. new sp. 2*) y *M. tuxtlaense*.
4. Determinar las relaciones filogenéticas (16S rRNA Y COI) de las especies de *Macrobrachium* geminadas que se encuentran en las vertientes del Atlántico y Pacífico.
5. Filogenia molecular (16S rRNA) para las especies de *Macrobrachium* de todos los continentes: Identificar en la reconstrucción que se tenga las especies con DLA

HIPÓTESIS

H0. Si las especies de *Macrobrachium* con DLA están más relacionadas filogenéticamente entre ellas que con las especies con DLE, como respuesta al evento evolutivo de un pulso de invasión al medio dulceacuícola, entonces las especies con DLA se ubicaran como un grupo monofilético en la filogenia.

H1. Si las especies de *Macrobrachium* con DLA están menos relacionadas filogenéticamente entre ellas que con las especies con DLE, como respuesta al evento evolutivo de sucesivos pulsos de invasión al medio dulceacuícola, entonces las especies con DLA se ubicaran en diferentes ramas de la filogenia.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

Esta etapa de la investigación comienza con una revisión de los ejemplares de *Macrobrachium* sin determinación taxonómica, que han sido incorporados en la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR). El objetivo de esto fue determinar poblaciones que pudieran corresponder a nuevas especies con DLA. La condición del desarrollo larvario se determinó mediante la presencia de hembras ovígeras en las muestras. Hembras con pocos huevos grandes fue el indicador de DLA.

En los análisis genéticos realizados se incluyeron 201 secuencias del fragmento de 16S rRNA. Ochenta de las cuales corresponden a ejemplares de diferentes poblaciones de las 16 especies mexicanas de *Macrobrachium*, las muestras de estos ejemplares fueron tomadas de la CNCR. Para siete de estas 16 especies se trabajó con tejido de ejemplares de la serie tipo (Tabla. V). Otras 48 secuencias corresponden a igual número de diferentes poblaciones de *Macrobrachium* sin determinación taxonómica, las muestras de estos ejemplares fueron tomadas de la CNCR. Catorce secuencias son de ejemplares de doce especies de *Macrobrachium* colectadas en cinco países sudamericanos (Tabla V).

Cuarenta y tres secuencias pertenecieron a 37 especies de *Macrobrachium* tomadas del GenBank (Tabla V) y 15 secuencias pertenecieron a 14 especies de seis diferentes géneros de la subfamilia Palaemoninae, algunos tomados de la CNCR, otros facilitados en Colección Nacional de Crustáceos de Sao Paulo, Brasil y algunas provenientes del GenBank (Tabla V), además de la secuencia del camarón árido *Paratya australiensis* utilizados como grupo externo en los análisis filogenéticos (Tabla V). Adicionalmente, se incluye en los análisis genéticos, 48 secuencias del fragmento COI. Estas secuencias corresponden a siete especies mexicanas y dos nuevas especies mexicanas de *Macrobrachium* con DLA (Tabla VI). Como grupo externo en los análisis filogenéticos de este fragmento génico se utilizó la secuencia del camarón *Paratya australiensis*.

Todo el análisis genético incluyó secuencias parciales de dos genes mitocondriales de langostinos *Macrobrachium*. El primero es un fragmento de 380 pb de la subunidad mayor del gen ribosomal rRNA de la mitocondria o 16S rRNA, el que es un gen estructural con una tasa de cambio de 0.9% por millón de año, lo que es equivalente a la mutación de 4 a 6 pb por millón de año (Murphy y Austin, 2005). El segundo es un fragmento de 580 pb de la subunidad I de citocromo oxidasa (COI), que es un gen funcional con una tasa de cambio de 3% por millón de año o lo que es equivalente a la mutación de 15 a 20 pb por millón de años (Trontelj *et al.*, 2005).

Tabla V. Ejemplares de los cuales se obtuvieron las secuencias del fragmento mitocondrial, 16S rRNA. Incluyen las especies cuyas secuencias fueron tomadas del GenBank. ST=Serie Tipo, DLA = Desarrollo Larvario Abreviado, DLE = Desarrollo Larvario Extendido, CNCR= Colección Nacional de Crustáceos IBUNAM. S/I: Sin número de ingreso a la CNCR. Ingreso GB resultado de este estudio en negritas.

Género y especie	Autor	Número de muestra	Localidad	Tipo de desarrollo	Ingreso al GB	Ingreso al CNCR
Género Paratya						
<i>P. australiensis</i>	Kemp, 1917	1	Australia		AF 374469	
Género Palaemonetes						
<i>P. australis</i>	Dakin, 1915	1	Australia	DLE	AF 439517	
<i>P. atrinubes</i>	Bray, 1976	1	Australia	DLE	AF 439520	
<i>P. kadiakensis</i>		1	Coahuila, México	DLA		326
Género Palaemon						
<i>P. intermedius</i>	Stimpson, 1860	1	Rio Swan, Este de Australia.	DLE	AF 439516	
<i>P. longirostris</i>	H. Milde-Edwards, 1837	1	Noreste Atlántico, Ria de Arosa, España.	DLE	AJ 640125	
<i>P. northropi</i>	Rankin, 1898	1	Ubatumirin, Brasil	DLE		S/I
<i>P. serenus</i>	Heller, 1862	1	Rio Hopkins, Victoria. Australia	DLE	AF 439518	
<i>P. ritteri</i>	Colmes, 1895	1	México	DLE		21015
<i>P. pandaelformis</i>	Stimpson, 1871	1	Ubatumirin, Brasil	DLE		S/I
Género Creaseria						
<i>C. morleyi</i>	Creaser, 1936	2	Península de Yucatán. México México	DLA		22723
					DQ 079710	
Género Cryphyops						
<i>C. caementarius</i>	Molina, 1782	1	Coquimbo, Chile	DLE	DQ 079711	
<i>C. luscus</i>	Holthuis, 1973	1	Chiapas, México	DLA		5759
Género Pseudopalemon						
<i>P. chryseus</i>	Kensley & Walter, 1982	1	Brasil	DLE		S/I
Género Troglomexicanus						
<i>T. tamaulipensis</i>	Villalobos-Alvarez y M. Iliffe, 1999.	1	Tamaulipas, México	DLA		17030
Género Macrobrachium						
<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	17	Los tuxtlas, Veracruz. Méx. (6) Tampico, Tamaulipas. Méx (3) Jalcomulco, Veracruz. Méx (3) Rio San Juan, C. Rica-Nicaragua (1) Praia Dura, Ubatuba, S. P. Brasil (2) México Brasil	DLE	KF383300 AY377838 AY 282780	S/I S/I S/I S/I S/I
<i>M. tenellum</i>	Smith, 1871	5	Chamela. Méx (3) Baja California (2)	DLE	KF383310	S/I S/I
<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	17	Isla Margarita. Venezuela. (4) Rio San Juan, Costa Rica (1) Isla Margarita. Venezuela. (4) Los Tuxtlas, Veracruz. Méx. (3)	DLE DLE		S/I S/I S/I KF383303 S/I

Género y especie	Autor	Número de muestra	Localidad	Tipo de desarrollo	Ingreso al GB	Ingreso al CNCR
Género <i>Macrobrachium</i>						
			Jalcomulco, Veracruz. Méx. (4)			17380
<i>M. americanum</i>	Bate, 1868	7	Puerto Rico (1) Chamela, Jalisco. México. (4)	DLE	AY 282779 KF303302	S/I S/I
			Baja California, México.(1)			S/I
			Guerrero, México. (1)			S/I
<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836	9	Colima, México. (1) Los Tuxtlas, Veracruz. México. (3)	DLE		18675 S/I
			Jalcomulco, Veracruz. México. (2)			S/I
			Río Máquinas, Veracruz. Méx. (2)		KF383305	13333 ST
			Trilha do Fundao, Brasil (1)			S/I
			Puerto Rico (1)		AY 377848	
<i>M. occidentale</i>	Holthuis, 1950	3	Chamela, Jalisco. México. (3)	DLE	KF383308	S/I
<i>M. acanthochirus</i>	Villalobos, 1967	6	Chamela, Jalisco. México. (3)	DLE	KF383299	S/I
			Oaxaca. México.(1)			18694
			Oaxaca, México. (1)			18894
			Río Papagayo, Guerrero (1)			S/I
			México		AY 377838	
<i>M. michoacanus</i>	Nates y Villalobos, 1990	2	Chamela, Jalisco. México. (1)	DLE		S/I
			Michoacán, México (1).		KF383307	3550 ST
<i>M. olfersii</i>	Wiegmann, 1836	6	Chamela, Jalisco. México. (1)	DLE	KF383309	S/I
			Nayarit, México. (1)			13433
			Brasil (1)		AY 377848	
			México (1)		AY 377849	
			Ilhabela, SP. Brasil (2)			S/I
<i>M. olfersii isthmicum</i>	Villalobos-Figueroa (SP)	1	Arroyo Las lajas, Tehuantepec, Méx.	DLE		254
<i>M. hobbsi</i>	Nates y Villalobos, 1990	4	Veracruz, México. (1)	DLE		21700
			Tabasco, México. (1)			16578
			Pijijiapán, Chiapas. México (1)		KF383306	2239a ST
			Tabasco, México. (1)			22676
<i>M. digueti</i>	(Bouvier, 1895)	1	Baja California, Mx	DLE	KF383304	S/I
<i>M. hanckoki</i>		1	¿? (1)	DLE		327
<i>M. villalobosi</i>	Hobbs, 1973b	1	Cueva de San Gabriel, Oaxaca, Méx.	DLA	KF383314	19220 ST
<i>M. totonacum</i>	Álvarez y Mejía, 2001	1	Oaxaca, México	DLA	KF383311	19915 ST
<i>M. tuxtlaense</i>	Villalobos y Álvarez, 1999	3	Catemaco, Veracruz. Méx. (3)	DLA	KF383312	13174 ST
<i>M. acherontium</i>	Holthuis, 1977	1	Cocona, Tabasco, Méx. (1)	DLA	KF383301	8694 ST
<i>M. vicconi</i>	Román, Ortega & Mejía, 2000.	1	Ocosingo, Chiapas, Méx. (1).	DLA	KF383313	17034 ST
<i>M. new sp. 1</i>		3	Stgo. Tuxtla; Veracruz. Méx. (3)	DLA		S/I - ST
<i>M. new sp. 2</i>		2	San Antonio, Tabasco. Méx. (2)	DLA		S/I - ST
<i>M. rosenbergii</i>	De Man, 1879.	5	México. (1)	DLE		Cultivo
			Vageado, Botucatu. Brasil (1)			
Género y especie	Autor	Número de muestra	Localidad	Tipo de desarrollo	Ingreso al GB	Ingreso al CNCR

especie		muestra		desarrollo	GB	CNCR
Género <i>Macrobrachium</i>						
			Tailandia(1)		AY 203908	
			Australia (1)		AY 203916	
<i>M. jelski</i>	Miers, 1877.	1	Río Prieto, SP. Brasil 1(1)	DLA		S/I
<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862.	2	Río Prieto, SP. Brasil 2(1)	DLE /DLA		S/I
			Brasil 13(1)			S/I
<i>M. borelli</i>	Nobili, 1896	2	Bahía de Jacuí, Brasil (1)	DLA		S/I
			Río de la Plata, BA. Argentina (1)	DLA		S/I
<i>M. potiuna</i>	Müller, 1880	2	Cacapava, SP.Brasil (1)	DLA		S/I
			Brasil (1)		KC 2094	
<i>M. iheringe</i>	Ortmann, 1897	1	Santo Antonio do Pinhal, SP. Brasil (1)	DLA		S/I
<i>M. surinamicum</i>	Holthuis, 1948	1	Estuario Río Caete, Edo. De Pará, Brasil (1)	DLE		S/I
<i>M. mammidactylum</i>	Thallwitz, 1891	3	NI (1)	DLE		S/I
			Australia (1)		AY 282776	
			Indonesia (1)		AY 377845	
<i>M. crenulatum</i>	Holthuis, 1950b.	1	Puerto Rico (1)	DLE	AY 377840	
<i>M. zariqueyi</i>	Holthuis, 1949.	1	Este de África (1)	DLE	AY 377847	
<i>M. australiensis</i>	Holthuis, 1950b.	3	Australia (3)	DLA	AY 203923	
					AY 316583	
					AY 316577	
<i>M. aemulum</i>	Nobili, 1906.	1	Nueva Caledonia (1)	DLE	AY 282769	
<i>M. lar</i>	Fabricius, 1798.	2	Indonesia (1)	DLE	AY 203922	
			Australia		AY 377843	
<i>M. latimanus</i>	Von Martens, 1868.	1	Indonesia (1)	DLE	AY 282765	
<i>M. sp. 1</i>	Short, 2000.	1	Australia (1)	¿DLA?	AY 282767	
<i>M. sp. 2</i>	Short, 2000.	1	Australia (1)	DLE	AY 287575	
<i>M. neglectum</i>	De Man, 1902.	1	Tailandia (1)	¿DLA?	AY 377846	
<i>M. malcolmsonii</i>	H. Milde Edwards, 1844	1	India (1)	¿DLA?	AY 730050	
<i>M. gangeticum</i>	Bate	1	India (1)	¿DLA?	AY 730054	
<i>M. sankollii</i>	Jalihai & Shenoy, 1988.	1	India (1)	¿DLA?	AY 730052	
<i>M. lamarrei</i>	H. Milde Edwards, 1837	1	India (1)	¿DLA?	AY 730051	
<i>M. platycheles</i>	Ou & Yeo, 1995.	1	Singapooore (1)	DLA	AY 377850	
<i>M. bullatum</i>	Fincham, 1987.	1	Australia (1)	¿DLA?	AY 282778	
<i>M. idea</i>	Heller, 1862.	1	Australia (1)	DLE	AY 282777	
<i>M. equidens</i>	Dana, 1852.	1	Australia (1)	DLE	AY 282773	
<i>M. novaehollandiae</i>	De Man, 1908.	1	Australia (1)	DLE	AY 282772	
<i>M. nipponense</i>	De Haan, 1849.	1	Asia (1)	DLE/ DLA	AY 282771	
<i>M. hainanense</i>	Parisi, 1909.	1	Hong-Kong (1)	DLA	AY 377841	
Género y especie	Autor	Número de muestra	Localidad	Tipo de desarrollo	Ingreso al GB	Ingreso al CNCR

Género <i>Macrobrachium</i>					
<i>M. handschini</i>	J. Roux, 1934.	1	Australia (1)	DLA	AY 282781
<i>M. latidactylus</i>	Thallwitz, 1891.	1	Australia (1)	DLE	AY 282770
<i>M. scabriculum</i>	Heller, 1862.	1	India (1)	DLA	AY 730055
<i>M. trompii</i>	De Man, 1898.	1	Singapoore (1)	DLA	AY 377852
<i>M. brasiliense</i>	Heller, 1862.	1	Brasil (1)	DLA	AY 377839
<i>M. tolmerum</i>	Riek, 1951.	1	Australia (1)	DLE	AY 282768
<i>M. malayanum</i>	J. Roux, 1934.	1	Singapoore (1)	DLA	AY 377844
<i>M. atactum</i>		1		DLE	AF 374468

Tabla VI. Número de ejemplares, por especie y localidad, empleados para el análisis genético del fragmento mitocondrial del gen Citocromo oxidasa I (COI).

Especie / Población	Localidad	Número de ejemplares	Tipo de desarrollo
<i>Paratya australiensis</i>	Australia	1	DLE
<i>Macrobrachium tuxtlaense</i>	Catemaco, Veracruz.	3	DLA
<i>Macrobrachium new sp. 1</i>	Santiago Tuxtla, Veracruz		DLA
<i>Macrobrachium new sp. 2</i>	San Antonio, Tabasco		DLA
<i>Macrobrachium acanthurus</i>	Los Tuxtlas, Veracruz	7	DLE
	Tampico, Veracruz	3	
	Costa Rica	1	
	Brasil	2	
<i>Macrobrachium tenellum</i>	Chametla	3	DLE
<i>Macrobrachium americanum</i>	Chametla	3	DLE
	Baja California	1	
	Colima	1	
	Oaxaca	1	
<i>Macrobrachium carcinus</i>	Jalcomulco, Veracruz	3	DLE
	Los Tuxtla, Veracruz	3	
	Costa Rica	1	
	Venezuela	3	
	Brasil	1	
<i>Macrobrachium occidentale</i>	Chametla	3	DLE
		3	
<i>Macrobrachium heterochirus</i>	Los Tuxtlas, Veracruz	2	DLE
	Jalcomulco, Veracruz	3	
	Brasil	1	

DLA= Desarrollo Larvario Abreviado; DLE= Desarrollo Larvario Extendido.

Extracción, amplificación y secuenciación.

El DNA total (DNAt) se extrajo a partir de un trozo (0.5 a 1.0 grs.) de tejido de músculo abdominal. El tejido fue fragmentado y sometido a digestión durante 24 horas a 57 °C, en una solución preparada con: 500 µl de buffer STE, 25 µl de 10 mg/ml de proteinasa K (sigma) y de 75 µl SDS al 10%.

La extracción del DNAt se realizó mediante la técnica de fenol cloroformo alcohol isoamílico (Hillis *et al.*, 1996) adaptada para palemónidos (Acuña, 2002). Mediante PCR se amplificaron los dos segmentos de las regiones mitocondriales.

Para la amplificación del segmento de 380 pb del gen 16S rRNA se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados por Vázquez *et al.* (2004), para un estudio en camarones peneidos. En el presente estudio, estos oligonucleótidos fueron utilizados quitando el sitio de restricción, quedando como siguen: 16ScF (5' GAC CGT GCG AAG GTA GCA 3'), 16 ScR (5' AAT TCA ACA TCG AGG TCG CA 3'). Los regímenes de temperatura determinados para la amplificación del fragmento de 16S rRNA fueron: denaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de denaturalización a 95°C por 30 seg., alineación a 50°C por 30 seg. y extensión a 72°C por 30 seg., para finalizar con una extensión adicional a 72°C por 3 min.

Para la amplificación del segmento de 580 pb del gen COI se utilizaron los oligonucleótidos universales COIa-H (5'-AGT ATA AGC GTC TGG GTA GTC-3') y COIf-L (5'-CCT GCA GGA GGA GGA GAT CC -3 (Palumbi *et al.*, 1991). Los regímenes de temperatura determinados para la PCR de este fragmento fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 10 min., seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 92°C por 1 min., alineación a 48°C por 1 min y extensión a 72°C por 1min. 30 seg., para finalizar con una extensión adicional a 72°C por 10 min.

Para ambos fragmentos mitocondriales, la reacción de amplificación se preparó a volumen final de 50 μ L, conteniendo: 5 μ L de buffer para PCR 10 x (Invitrogen), 0.4 mM de cada dNTP, 0.8 μ M de cada primer, 4 mM MgCl₂, 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen), 2 μ L de extracto de DNAt con una concentración entre 100 y 120 μ g/ μ L y la diferencia de volumen fue completada con agua bi-destilada estéril.

Los productos de la amplificación fueron purificados usando el kit para purificación de PCR QIA quick de QIAGEN purification en un volumen final de recuperación de 50 μ l por muestras. Tanto el DNAt, los amplificados y los amplificados purificados fueron valorados mediante corrimientos electroforéticos (25 minutos a 100 volts) en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio (marcador fluorescente para ácidos nucleicos) el que fue visualizado mediante luz ultravioleta.

Los productos de PCR purificados fueron sometidos a un ciclo de secuenciación usando un protocolo estándar de Perkin Elmer, cuya reacción de secuencia fue preparada a volumen final de 10 µl conteniendo ABI Prism Big Dye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, v. 3.0 polymerase (Applied Biosystems) más los oligonucleótidos correspondientes al amplificado. Los dideoxinucleótidos incorporados fueron removidos mediante filtración usando el polisacárido dextrán (Sephadex; G-25 Sigma). Los productos de la reacción de secuencia purificados fueron secuenciados, en ambas direcciones (forward y reverse), en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems Inc.).

Análisis de secuencias.

Los electroferogramas obtenidos para cada muestra fueron alineadas, obteniendo una secuencia consenso por muestra la que fue editada manualmente en el programa CROMAS (versión 1.45). Cada una de las secuencias compiladas se sometió a un análisis de BLASTN <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> para su verificación.

Dependiendo de los objetivos planteados se elaboraron las correspondientes bases de datos, las que fueron alineadas en BIOEDIT (Hall, 1997-2001), CLUSTAL X (Thompson et al. 1997) y DNAMAN ver. 4.15 Lynnon BioSoft. 1994-99 (www.Lynnon.com). Los extremos incompletos de las alineaciones fueron removidos.

Las bases de datos alineadas fueron exportadas al programa DNASP 4.10.9 (Rozas et al., 2003) para el análisis de poblaciones y otras exportados a PAUP 4.0b10 (Swofford, 1998) para el análisis y reconstrucción filogenética.

Análisis poblacional.

Para determinar la variación genética entre dos nuevas especies epígeas de *Macrobrachium* con DLA (*Macrobrachium new sp. 1* y *Macrobrachium new sp. 2*) (Acuña, 2002) que, entre ellas, son muy parecidas morfológicamente y, a su vez, muy similares a

M. tuxtlaense (especie epigea, de distribución puntual y con DLA) se hizo un análisis poblacional a partir de secuencias de los dos fragmentos de genes mitocondriales, 16S rRNA y COI.

En las bases de datos, para este análisis, incluyeron tres secuencias de ejemplares de las poblaciones de *Macrobrachium new sp. 1* y *Macrobrachium new sp. 2* y tres secuencias de ejemplares de la serie tipo de *M. tuxtlaense*. Además de seis secuencias de dos diferentes poblaciones de *M. acanthurus* (especie de amplia distribución y con DLE) que fueron utilizada como referencia en el análisis de variación genética. Las bases de datos con los alineamientos de ambos genes se analizaron de forma independiente.

Variación genética.

En el programa DNASP 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003) se determinó la variación genética total mediante el Índice de diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987), que es una medida del polimorfismo en las secuencias de DNA y se interpreta como el promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias. También se determinó la diversidad haplotípica (Hd) (Nei y Tajima, 1981; 1983) que se define como el número de haplotipos entre el total de individuos de una muestra.

El grado de diferenciación entre las poblaciones se determinó calculando las distancias genéticas pareadas (Dxy) que corresponde al número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones y mediante el índice de fijación o de diferenciación (*Fst*) (Weir y Cockerham, 1984).

Con el programa DNAMAN se determinaron las matrices de distancia genética (Kimura-2) y el porcentaje de similitud entre secuencias.

Análisis filogenético y comparado.

Para cada uno de los objetivos propuestos se construyeron y alinearon las matrices de datos. Cada una de ellas fue analizada en el programa PAUP* versión 4.0b (Swofford, 1998) de la siguiente forma: Se determinó los sitios variables y parsimoniosamente informativos; la posición y tipo de sustituciones nucleotídicas y la frecuencia de cada nucleótido. Las reconstrucciones filogenéticas se hicieron mediante los métodos de distancia (NJ), máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (MV). El modelo de mejor ajuste evolutivo, para MV, fue obtenido probando los modelos alternativos de evolución mediante el programa MODELTEST versión 3.7 (Posada y Crandall, 1998), usando el criterio de información de Akaike (AICc, Akaike, 1974). Para el análisis de MV se hicieron búsquedas heurísticas con 100 réplicas al azar como secuencias adicionales y el nivel de confianza fue determinado con bootstrap no paramétrico (BP; Felsenstein, 1985) de 100 réplicas con 10 secuencias al azar adicionales. Los análisis de NJ y MP se hicieron mediante búsquedas heurísticas y el nivel de confianza se determinó con bootstrap no paramétrico de 2000 réplicas. Cuando se hizo análisis Bayesiano se realizó con MrBAYES 3.0b4 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), el inicio de la cadena de Monte Carlo Markov fue a partir de un árbol azaroso de cinco millones de generaciones.

Con la finalidad de construir una filogenia molecular (16S rRNA), para las 16 especies mexicanas de *Macrobrachium* e identificar la ubicación de las especies con DLA en el árbol (**Objetivo 1**), se analizó en PAUP* versión 4.0b (Swofford, 1998), siguiendo la descripción del párrafo anterior. Se trabajó a partir de una matriz alineada que incluyó un total de 32 ejemplares, dos de cada una de las 16 especies de *Macrobrachium* presentes en México, estos ejemplares fueron tomados de la CNCR. Para siete de estas especies el tejido fue obtenido de ejemplares de la serie tipo. En el análisis se incluyeron secuencias de cinco especies de los estrechamente relacionados géneros de palemónidos, *Palaemon* y *Palaemonetes*, estas especies son: *Palaemon northropi* (Rankin, 1898) colectado en Ubatumirin, Brasil (CNCR); *Palaemon serenus* (Heller, 1862) (acceso GenBank AF 439518); *Palaemonetes atrinubes* (Bray, 1976) (acceso GenBank AF 439520), *Palaemonetes australis* (Dakin, 1915) (acceso GenBank AF 439517.1) y la secuencia de *Palaemon*

intermedius (Stimpson, 1860) (acceso GenBank AF 439516). Hasta hace poco esta especie era considerada como un representante atípico del género *Macrobrachium* por ser la única especie marina del grupo, sin embargo, Walker y Poor en 2003, la han reubicado taxonómicamente y hoy se conoce como *Palaemon intermedius*.

Al obtener una filogenia de las especies mexicanas de *Macrobrachium* e identificar la ubicación de las especies con DLA en el árbol, se quizó analizar la consistencia de la reconstrucción filogenética incluyendo secuencias de ejemplares de diferentes poblaciones de las 16 especies mexicanas (muestras que fueron tomadas de la CNCR del IBUNAM tabla V). También se incluyeron secuencias de ejemplares de las especies de *Macrobrachium* colectadas en cinco países sudamericanos y secuencias de los ejemplares de 39 diferentes nuevas poblaciones mexicanas de *Macrobrachium* (tanto con DLA y DLE) encontradas en el acervo de la CNCR. De esta forma logramos una visión global de la filogenia incluyendo un mayor número de especies americanas y poblaciones del género en estudio, siempre identificando la ubicación de DLA en el árbol (**Objetivo 2**). En este análisis también se incluyeron las secuencias de las especies de los géneros *Palaemon* y *Palaemonetes* y la secuencia de *Paratya australiensis* como grupos externos. Los análisis se hicieron en PAUP* versión 4.0b (Swofford, 1998), siguiendo el mismo procedimiento del análisis anterior.

El resultado anterior permitió, entre otros, conocer la relación filogenética de dos propuestas nuevas especies epigeas de *Macrobrachium* con DLA, éstas son *M. sp 1* - *M. new sp 2*. Por ello se realizó un análisis genético (16S rRNA y COI) presuntivo que ayudara a definir evidencia genética para considerarlas nuevas especies de *Macrobrachium* con desarrollo abreviado o se trata de poblaciones de la especie *M. tuxtlense*, de la que son morfológica y localmente muy cercanas (**Objetivo 3**).

Otra de las finalidades del objetivo dos fue conocer la ubicación de las especies geminadas en la reconstrucción filogenética y complementar con análisis genéticos (16S rRNA Y COI) de tres duplas de especies mexicanas de *Macrobrachium* que se encuentran separadas geográficamente, tres de ellas distribuidas en la vertiente Atlántica y su par

morfológico en la vertiente Pacífica (**Objetivo 4**). Se analizaron en forma independiente y en conjunto las matrices de ambos fragmentos de genes, las que incluyen secuencias de al menos dos poblaciones de cada una de las seis especies geminadas. Para *M. acanthurus*, *M. americanum* y *M. cancinus* también se incluyeron secuencias de ejemplares provenientes de Costa Rica, Venezuela y Brasil (Tabla VI). Los análisis se hicieron en PAUP* versión 4.0b (Swofford, 1998), siguiendo el mismo procedimiento de los análisis anteriores y utilizando a *Paratya australiensis* como grupo externo.

Finalmente el **Objetivo 5** presenta una filogenia molecular (16S rRNA) para las especies de *Macrobrachium* del mundo con secuencias disponibles incorporando las secuencias generadas en este estudio. Identificar en la reconstrucción que se tenga las especies con DLA.

RESULTADOS.

Revisión del acervo de la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR).

En la CNCR se resguardan aproximadamente 80 especímenes de poblaciones de *Macrobrachium* (con ambos tipos de desarrollo larvario) sin determinación taxonómica. El parecido morfológico entre estas muestras es notable, por tal razón se eligieron las poblaciones más distantes geográficamente como un indicador de potenciales diferentes especies. La presencia de hembras ovigeras determinó si se trataba de poblaciones con tipo de desarrollo abreviado o completo, sin embargo se dio el caso de tener muestras carentes de hembras ovigeras, pero estos ejemplares presentaron alguna particularidad morfológica o distribución geográfica interesante por lo que también fueron incluidas dentro de las poblaciones seleccionadas.

En total se incluyeron 39 registros de poblaciones de *Macrobrachium* sin determinación taxonómica. Seis de ellas presentan DLE (4 poblaciones mexicanas y 2 venezolanas), 25 son poblaciones con DLA y en las 8 restantes indeterminadas para el tipo de desarrollo larvario (Tabla VII).

La distribución geográfica de las poblaciones mexicanas involucra nueve Estados de la República mexicana: Baja California Sur, Jalisco, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Específicamente las poblaciones con DE se encuentran en los Estados de Jalisco y Veracruz. Dentro de las poblaciones con desarrollo larvario indeterminado se presenta el primer registro de *Macrobrachium* en un cenote de Yucatán (Pb*13) y uno en Chemuyil, Quintana Roo (Pb*14). Las poblaciones con DLA se distribuyen en cuatro Estados de la república; Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Tabasco (Tabla VII).

Tabla VII. Poblaciones de *Macrobrachium* sin determinación taxonómica ingresadas en la Colección Nacional de Crustáceos e incluidas en este estudio.

Población	Localidad	Tipo de desarrollo	EM	Fecha Colecta
Pb* 1	Manantial Platanillo, Veracruz	DLE?	10560	Oct 1984
Pb* 2	Veracruz	¿?	16622	
Pb* 3	Tapijulapa, Tabasco	¿?	18650	31 Mar 1998
Pb* 4	Rio Palenque, Chiapas	¿?	9795	01 Jul 1988
Pb* 6 **	Isla Margarita, Cerro Copey en Venezuela	DLE		Jul 2004
Pb* 7	Parte Alta de Los Tuxtlas, Veracruz (Fernando)	DLE		
Pb* 8	Estación de Los Tuxtlas, Veracruz	DLE	5847	19 Mar 1985
Pb* 9	San Luis Potosí	DLE?	17442	
Pb* 10**	Isla Margarita, Cerro Copey en Venezuela	DLE		12 Oct 2004
Pb* 12	Xxc			
Pb* 13	Cenote en Yucatán			
Pb* 14	Chemuyil, Quintana Roo	¿?	9811	26 Jun 1988
Pb* 16		DLE	18251	
Pb* 18		¿?		
Pb* 20	Ixtacomitan, Tuxtla Chiapas	DLA	5768	04 Abr 1986
Pb* 21	Carlos A. Madrazo, Tabasco	DLA	18661	25 Mar 1998
Pb* 22	San Andrés Tuxtla, Veracruz	DLA	13110	05 Ago 1994
Pb* 23	Ruinas de Palenque, Chiapas	DLA	5594	09 Abr 1986
Pb* 25	La Playita, Santiago Tuxtla, Veracruz	DLA	xxb	22 Mar 1997
Pb* 26	Rio Santiaguillo, Santiago Tuxtla, Veracruz	DLA	18249	05 Feb 1999
Pb* 28	Manantial Tres Marías, Tuxtepec Oaxaca	DLA	18691	20 Abr 2000
Pb* 29	Santiago Tuxtla, Veracruz	DLA	18250	05 Nov 1999
Pb* 30	Santiago Tuxtla, Veracruz	DLA	18253	05 Nov 1999
Pb* 31	La Playita, Santiago Tuxtla, Veracruz	DLA	18654	03 May 1999
Pb* 32	La Playita, Santiago Tuxtla, Veracruz	DLA	18659	03 May 1995
Pb* 33	Lago de Catemaco, Veracruz	DLA	6134	31 Ago 1966
Pb* 34	Los Tuxtlas, Veracruz	DLA	13118	04 Ago 1994
Pb* 35	Las Margaritas de Catemaco, Veracruz	DLA	13349	06 May 1995
Pb* 37	Coyame, Veracruz	DLA	13112	01 Jul 1994
Pb* 38	Cueva de Las Sardinas, Tabasco	DLA	18678	29 Mar 1998
Pb* 39	Pichucalco, Reforma Chiapas	DLA	5758	03 Abr 1986
Pb* 41	Las Choapas, Tabasco.	DLA	xxd	1 Jun 1997
Pb* 42	San Antonio, Las Choapas, Tabasco	DLA	17085	X
Pb* 43	Benemerito de las Américas, hacia Pico de Oro, Chipas.	DLA	11203	26 Abr 1995
Pb* 44	Benemérito de Las Américas, Chiapas	DLA	12296	29 Jul 1990
Pb* 45	Palenque, Bonampax, Chiapas	DLA	8698	19 Oct 1987
Pb* 46	Afluente Lacanjá, Ocosingo Chiapas	DLA	11198	29 May 1991
Pb* 47	Arroyo San Javier, Ocosingo Chiapas	DLA	8693	19 Oct 1987
Pb* 48	Ocosingo, Chiapas	DLA	8686	19 Oct 1987

** Note que las poblaciones de M. sp 6 y M. sp 10 provienen de Venezuela.

DLA = Desarrollo Larvario Abreviado, DLE = Desarrollo Larvario Extendido, EM =Entrada de muestra.

OBJETIVO 1.

Filogenia molecular (16S rRNA) de las especies mexicanas de *Macrobrachium*: ubicación del DLA en el árbol.

Dos ejemplares de cada una de las 16 especies mexicanas de *Macrobrachium* fueron empleadas para desarrollo de este objetivo, vale destacar que para siete de estas especies se trabajó con ejemplares de la serie tipo (Tabla VIII).

Tabla VIII. Especies mexicanas de *Macrobrachium*. Se indica vertiente en la que se distribuyen, tipo de hábitat, tipo de desarrollo larvario, procedencia de las muestras empleadas en este estudio. Los pares de especies geminadas se denotan con igual color.

Espece	Localidad	Vertiente	Desarrollo Larvario	Hábitat	Serie Tipo CNCR	N°ingresp GenBank
<i>M. acanthochirus</i> Villalobos, 1966	Chamela, Jalisco	Pacífica	DLE	Epígeo	--	KF383299
<i>M. acanthurus</i> Wiegmann, 1836	Los Tuxtlas Veracruz	Atlántica	DLE	Epígeo	--	KF383300
<i>M. acherontium</i> Holthuis, 1977	Oaxaco	Atlántica	DLA	Cavernícola	8694 -	KF383301
<i>M. americanum</i> Bate, 1868	Chamela, Jalisco	Pacífica	DLE	Epígeo	--	KF383302
<i>M. carcinus</i> Linnaeus, 1758	Veracruz	Atlántica	DLE	Epígeo	--	KF383303
<i>M. digueti</i> Bouvier, 1895	Baja California Sur	Pacífica	DLE	Epígeo	--	KF83304
<i>M. heterochirus</i> Wiegmann, 1836	Los Tuxtlas, Veracruz	Atlántica	DLE	Epígeo	13333	KF383305
<i>M. hobbsi</i> Nates & Villalobos, 1990	Pijijiapan, Chiapas	Anfi americana	DLE	Epígeo	2239a	KF383306
<i>M. michoacanus</i> Nates & Villalobos, 1990	Michoacán	Pacífica	DLE	Epígeo	3550	KF303307
<i>M. occidentale</i> Holthuis, 1950	Chamela, Jalisco	Pacífica	DLE	Epígeo	--	KF383308
<i>M. olfersii</i> Wiegmann, 1836	Chamela, Jalisco	Anfi americana	DLE	Epígeo	--	KF383309
<i>M. tenellum</i> Smith, 1871	Chamela, Jalisco	Pacífica	DLE	Epígeo	--	KF383310
<i>M. totonacum</i> Mejía, Alvarez & Hartnoll, 2003	Rivera San Antonio, Oaxaca	Atlántica	DLA	Epígeo	19915	KF383311
<i>M. tuxtlaense</i> Villalobos & Álvarez, 1999	Catemaco, Veracruz	Atlántica	DLA	Epígeo	13174	KF383312
<i>M. vicconi</i> Román, Ortega & Mejía, 2000	Ocosingo, Chiapas	Atlántica	DLA	Epígeo	17094	KF383313
<i>M. villalobosi</i> Hobbs, 1973	Cueva San Gabriel, Oaxaca	Atlántica	DLA	Cavernícola	19220	Kf383314

Secuencias alineadas con una extensión de 385 pares de bases fueron utilizadas para el análisis filogenético. Un total de 179 bases fueron variables y 133 parsimoniosas. El modelo de mejor ajuste evolutivo seleccionado, obtenido con el criterio de AIC, fue el de Hasegawa - Kishino - Yano (Hasegawa et al., 1985) con cuantificación de posiciones invariables y diferentes tasas de sustitución bajo distribución gamma. Los parámetros específicos bajo este modelo (HKY + I + G) son las siguientes: frecuencias de nucleótidos A = 0,318; C = 0,100; G = 0.185; T = 0,396, modelo de sustitución con una proporción de transiciones / transversiones (ti/tv) = 3,625; proporción de sitios invariables (I) = 0,368; sitios variables siguieron una distribución gamma igual a 0,622.

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas con los cuatro métodos utilizados; distancia (NJ), máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) y análisis Bayesiano (AB) reflejan una tendencia general similar. Específicamente las reconstrucciones filogenéticas obtenidas por NJ (tres árboles) y MP (un árbol) (Anexo II a y b) son muy similares, el único cambio es el orden en la ubicación de las especies que conforman el clado de ejemplares con Desarrollo larvario abreviado (DLA), pero el clado está bien apoyado por valores de 100 a 92% bootstrap respectivamente. Mientras que por NJ las cinco especies se ubican escalonadamente a partir de un primer clado formado por los taxa más cercanos genéticamente (*M. tuxtlaense* y *M. acherontium* con D = 0.02) (Anexo II c y Tabla IX). Por MP cuatro de las especies forman dos clados resueltos; uno integrado por *M. tuxtlaense* y *M. totonacum* y el otro por *M. acherontium* y *M. vicconi*. *M. villalobosi* se ubica como una especie hermana al clado conformado por las dicotomías señaladas. Las reconstrucciones anteriores son similares a las obtenidas con MV y AB (Anexo IIc). La principal diferencia entre los árboles por NJ y MP y los logrados por MV y AB es que en estos últimos la ubicación de las especies geminadas *M. acanthurus* - *M. tenellum* más cercanas a las especies con DLA

Con base en la congruencia en las reconstrucciones filogenéticas y en el número de árboles encontrado con los diferentes métodos, la presentación de los resultados se realizó en base al árbol consenso de MP (Fig. 4).

Las especies mexicanas de *Macrobrachium* forman un grupo monofilético apoyado por la separación del clado que conforman las especies de los géneros *Palaemonetes* y *Palaemon* que claramente conforman un grupo hermano. La identidad genética promedio entre las secuencias de las 16 especies mexicanas de *Macrobrachium* analizadas fue de 91.17% (Tabla IX).

El grupo monofilético de las especies mexicanas de *Macrobrachium* está conformado por dos clados bien definidos y estadísticamente apoyados: uno que incluye las 11 especies con DLE y un segundo con las cinco especies de DLA (Fig. 4). Las sustituciones nucleotídicas promedio entre ambos es de 14%, lo que corresponde a un máximo de 54 sustituciones, principalmente transiciones nucleotídicas. Casi en todos los sitios donde se presenta un cambio de nucleótido, este es compartido por la mayoría de las especies con DLA o por la mayoría de las especies con DLE, sin embargo cuatro sitios tienen un nucleótido específico para todas las especies de cada uno de los dos clados. La posición 61 presenta una Adenina (A) en todas las especies con DLE la que cambia a Guanina (G) en todas las especies con DLA; las posiciones 79 y 100 es una (G) para todas las especies con DLE que cambia a (A) en todas las especies con DLA y la posición 113 del segmento amplificado, es caracterizada por una Citosina (C) en todas las especies con DLA.

En el clado de las especies con DLA, el promedio de similitud entre las secuencias fue del 96%, correspondiendo a un mínimo de seis y a un máximo de 30 sustituciones nucleotídicas, principalmente transiciones (Fig.4; Tabla IX; Fig. 5) De las cinco especies que conforman el clado, *Macrobrachium villalobosi* es la única especie, en los cuatro topologías, que resuelve por sí solo. *M. vicconi* es la más distante con una similitud del 93% respecto a las otras cuatro especies. Al comparar la secuencia de *M. vicconi* con la de las otras especies se pueden encontrar de 20 a 30 sustituciones nucleotídicas, tanto transiciones como transversiones (Tabla IX). Las distancias genéticas entre las especies con DLA parece ser independiente de su habitat epígeo o estigobiótico, ya que las especies estigobióticas: *M. villalobosi* y *M. acherontium* presentan un 96.3% de similitud genética,

igual a la que presentan las especies epígeas *M. totonacum* y *M. tuxtlaense* (Tabla IX, Fig. 5). Sin embargo, entre las cinco especies las más similares genéticamente son *M. acherontium* y *M. tuxtlaense* con una identidad genética del 98% (seis sustituciones nucleotídicas, todas transiciones). La secuencia de *M. totonacum* presenta la delección de una Timina (T) en la posición 27 y la inserción de una C en la posición 71 del segmento.

El clado de las once especies con DLE se subdivide en dos clados, el primero es un nodo resuelto en cuya dicotomía se ubican las especies geminadas, *M. tenellum* y *M. acanthurus*, las que presentan un 8% de diferencias nucleotídicas entre ellas (corresponde a 28 sustituciones: 23 transiciones y 5 transversiones) y la inserción de una C en la posición 84 de la secuencia de *M. tenellum*. Este clado diverge, en promedio, del segundo clado, que incluye a las otras nueve especies con DLE, en 13% de los nucleótidos lo que corresponde a 54 sustituciones nucleotídicas (Fig.4; Tabla IX; Fig. 5).

El segundo clado, de las especies con DLE, está conformado por tres subclados, dos de ellos con nodos resueltos. El primer de estos muestra una dicotomía entre las especies geminadas, *M. americanum* y *M. carcinus* las que tienen 98% de similitud nucleotídica (9 cambios: 7 transiciones y 2 transversiones). En la dicotomía de las ramas del segundo clado se ubican las especies geminadas, *M. occidentale* y *M. heterochirus*, las que tienen 95% similitud nucleotídica (18 cambios: 15 transiciones y 3 transversiones). El tercer clado está conformado por las especies originales del “Grupo Olfersii” (*M. olfersii*, *M. digueti*, *M. acanthochirus*, *M. faustinum* y *M. crenulatum*) en relación a lo propuesto por Villalobos (1967a), a las que ahora se debe incluir a: *M. michoacanus* y *M. hobbsi* (Fig.4; Tabla IX; Fig. 5).

M. olfersii y *M. hobbsi* tienen un 99% de similitud genética y por su parte *M. digueti*, *M. michoacanus* y *M. acanthochirus* muestran 100% de similitud, consecuentemente forman una tricotomía sin resolver. El resultado obtenido con MV, BA y el consenso produce diferencias topológicas cuando se incluyen en el análisis especies con 100% de similitud genética, si éstas son removidas del análisis, las topologías obtenidas por cuatro métodos (distancia (NJ), máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) y análisis Bayesiano (AB) son muy similares.

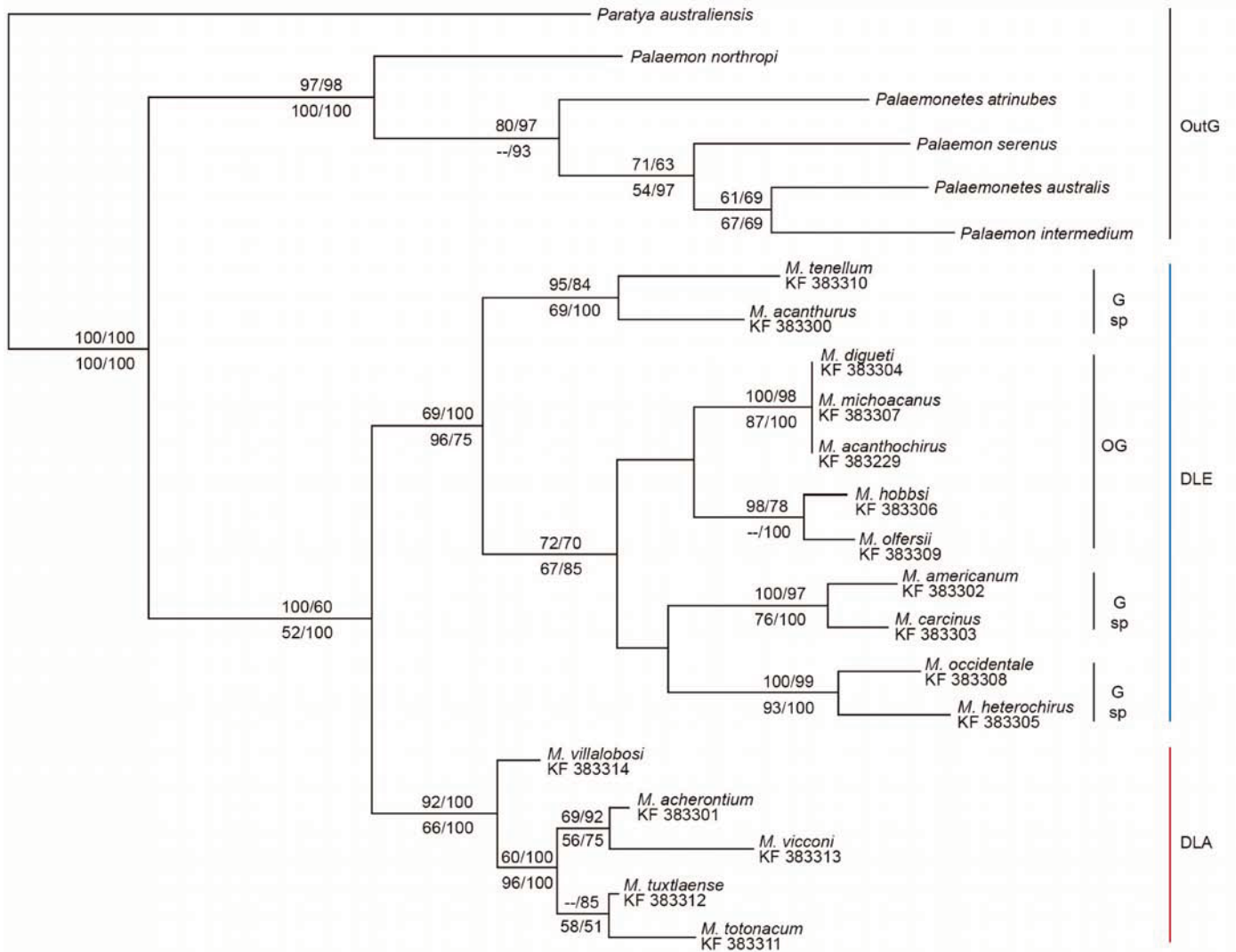


Figura 4. Filograma de parsimonia para 16 especies mexicanas de *Macrobrachium*, generado a partir del análisis de 380 pares de bases del gen 16S rDNA. Valores de bootstrap de MP / NJ están por encima de la rama y los de ML / Posterior Probabilidad de BA están por debajo de la rama. DLA = Desarrollo larvario abreviado; DEL = Desarrollo larvario extendida; OG = especies del “Grupo offersii”; G sp = especies y geminadas.

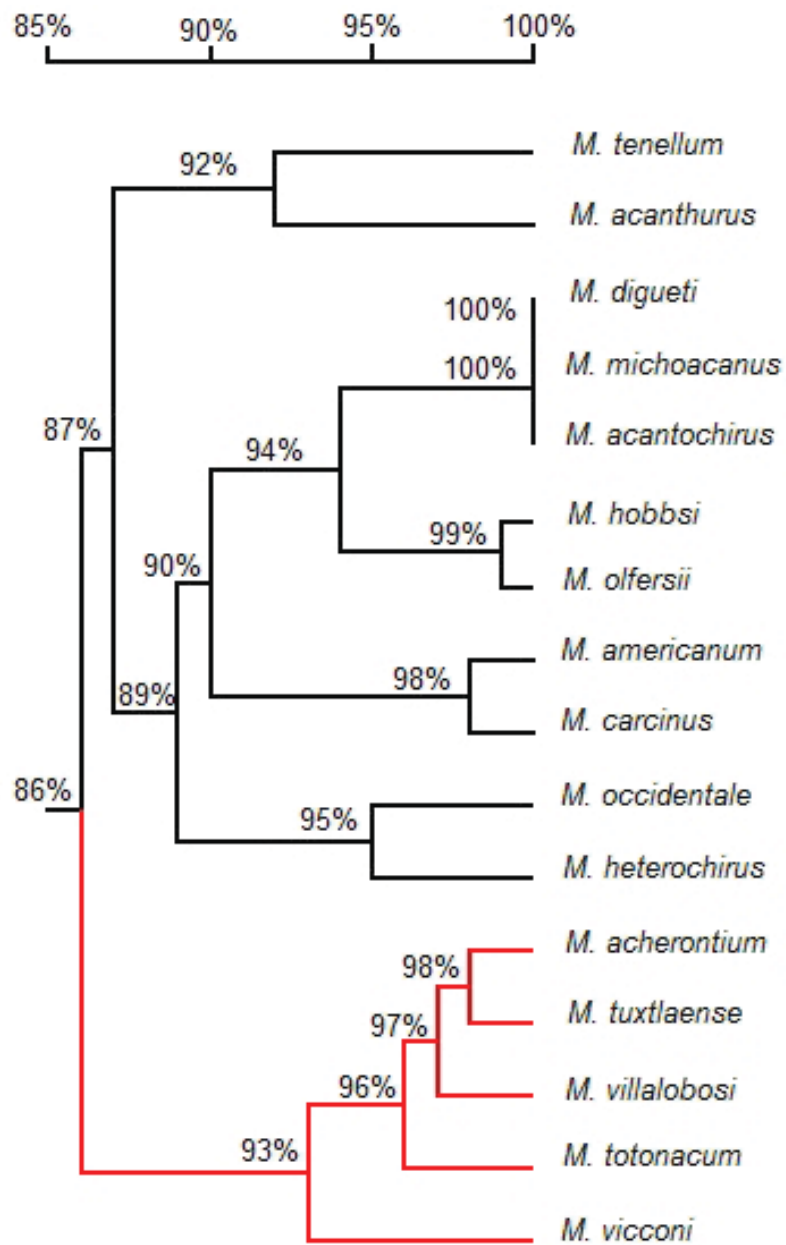


Figura 5. Cladograma de distancia (expresada en porcentaje) entre las especies mexicanas de langostinos *Macrobrachium* a partir de secuencias mitocondriales de un fragmento del gen 16S rRNA. En rojo las especies con DLA.

Tabla IX. Distancias genéticas sin corregir (sobre la diagonal) y número de sustituciones nucleotídicas (bajo la diagonal) entre las 16 especies mexicanas de *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un fragmento de 380 pb del gen 16S rDNA.

ESPECIES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>M. tenellum</i>	X	0.075	0.129	0.129	0.129	0.131	0.132	0.139	0.129	0.129	0.129	0.167	0.134	0.144	0.124	0.145
2. <i>M. acanthurus</i>	29	X	0.134	0.134	0.134	0.118	0.118	0.131	0.129	0.134	0.131	0.151	0.126	0.136	0.116	0.142
3. <i>M. digueti</i>	49	50	X	0.000	0.000	0.059	0.065	0.097	0.094	0.099	0.115	0.151	0.124	0.136	0.134	0.153
4. <i>M. michoacanus</i>	49	50	0	X	0.000	0.059	0.065	0.097	0.094	0.099	0.115	0.151	0.124	0.136	0.134	0.153
5. <i>M. acanthochirus</i>	49	50	0	0	X	0.059	0.065	0.097	0.094	0.099	0.115	0.151	0.124	0.136	0.134	0.153
6. <i>M. hobbsi</i>	50	45	23	23	23	X	0.013	0.105	0.102	0.088	0.102	0.134	0.110	0.125	0.110	0.147
7. <i>M. olfersi</i>	50	45	25	25	25	5	X	0.102	0.099	0.091	0.110	0.134	0.111	0.112	0.111	0.142
8. <i>M. americanum</i>	53	50	37	37	37	40	39	X	0.024	0.115	0.123	0.151	0.126	0.136	0.132	0.145
9. <i>M. carcinus</i>	49	49	36	36	36	39	38	9	X	0.113	0.115	0.147	0.124	0.133	0.129	0.142
10. <i>M. occidentale</i>	49	50	38	38	38	34	35	44	43	X	0.048	0.151	0.129	0.141	0.124	0.153
11. <i>M. heterochirus</i>	49	50	44	44	44	39	42	47	44	18	X	0.151	0.129	0.144	0.121	0.155
12. <i>M. acherontium</i>	51	46	47	47	47	41	41	46	45	46	46	X	0.020	0.037	0.037	0.064
13. <i>M. tuxtlaense</i>	51	48	47	47	47	42	43	48	47	49	49	6	X	0.030	0.030	0.070
14. <i>M. totonacum</i>	55	52	52	52	51	47	43	52	51	53	55	11	12	X	0.044	0.071
15. <i>M. villalobosi</i>	47	45	53	51	51	42	43	51	49	46	46	11	12	17	X	0.078
16. <i>M. vicconi</i>	55	54	59	59	58	56	54	56	54	58	59	20	27	27	30	X

OBJETIVO 2.

Filogenia molecular (16S rRNA) de especies y poblaciones americanas de *Macrobrachium*: coelctadas en est estudio. Ubicación del DLA en el grafo.

En esta reconstrucción se incluyeron 148 secuencias de un fragmento de 391 pb del gen mitocondrial 16S rRNA, de las cuales 103 corresponden a ejemplares de 26 especies americanas de *Macrobrachium*, provenientes de diferentes localidades de México, Costa Rica, Brasil, Venezuela y Argentina (Tabla V). Otras 39 secuencias son de ejemplares de *Macrobrachium* colectados en diferentes localidades en México, las cuáles aún no han sido identificadas taxonómicamente (Tabla VII). Cinco secuencias corresponden a especies de otros géneros de palemónidos y *Paratya australiensis* como grupo externo (Tabla V).

En el análisis filogenético, se alinearon 391 caracteres de los de cuales 167 son constantes, 69 variables y 155 parsimoniosas. El modelo de mejor ajuste evolutivo, obtenido con el criterio de AIC, fue el de Hasegawa–Kishino–Yano (Hasegawa *et al.*, 1985). Los parámetros específicos bajo el modelo (HKY+G) fueron los siguientes: frecuencia de nucleótidos A = 0.318; C = 0.108, G = 0.192 y T = 0.382, el modelo de sustitución tiene una proporción de transiciones / transversiones (t_i / t_v) = 2.230 y distribución gamma igual a 0.388.

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas con los tres métodos utilizados (distancia (NJ), máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) revelan tendencias similares en lo general y buen apoyo estadístico. La descripción de los resultados se hizo a partir del resultado del análisis por MV (Fig. 6).

Las cinco especies de los géneros *Palaemon* y *Palaemonetes* conforman un clado hermano, con buen apoyo estadístico y completamente independiente del clado de las especies de *Macrobrachium*. Se observa una relación más estrecha entre las especies de los géneros *Palaemon* y *Palaemonetes* que entre las especies congénicas lo que discrepa de la clasificación morfológica tradicional.

El total de grupo de poblaciones y especies de *Macrobrachium* conforman dos clados bien definidos los que fueron identificados como Clado 1 y Clado 2. El Clado 1 reunió poblaciones mexicanas y especies americanas con DLE y revela interesantes relaciones genéticas que para fines de una clara descripción se subdivide en 5 subclados identificados como subclados 1 del (a) al (e). El Clado 2 esta integrado por poblaciones mexicanas y especies americanas de especies con DLA, el que se subdivide en dos subclados identificados como subclado 2a y 2b (Fig. 6).

Clado 1: la primera dicotomía de este gran Clado presenta en uno de sus extremos el subclado 1a y el otro extremo es la rama que reúne los subclados 1b al 1e. El subclado 1a en una de sus ramas reúne los haplotipos, mexicanos y brasileños, de la especie geminada *M. acanthurus* y los haplotipos del par geminado *M. tenellum*. Específicamente, los ejemplares de *M. acanthurus* de las diferentes poblaciones de México se agrupan en un clado genéticamente diferente al de los ejemplares colectados en centro América (secuencias 6, 7) aún así todos los ejemplares de *M. acanthurus* se agrupan separadamente de los haplotipos de su especie geminada *M. tenellum*. Una secuencia de *M. tenellum* proveniente de la península de Baja California Sur resulta ser 100% idéntica a las secuencias de los ejemplares continentales de esta especie. A pesar de alta similitud morfológica entre ejemplares de *M. acanthurus* (porveneintes de la costa Pacífica) y los ejemplares de *M. tenellum* (provenientes de la costa Atlántica) recordar que son una dupla de especies geográficas o geminadas, en esta reconstrucción filogenética se ubicaron entre ellas otras especies más cercanas, genéticamente, a *M. acanthurus* como son: *M. amazonicum*, *M. jelski* y dos haplotipos (*M. sp. 1* y *M. new sp. 2* de Veracruz, Tabla V y VII; Fig. 6; subclado 1a). Las poblaciones provenientes de Veracruz identificadas como M.sp1 y sp.2 no han sido identificadas taxonómicamente, por lo que es interesante hacer notar que la similitud genética de l población M.sp.1 con *M. amazonicum* y la de M. sp. 2 a *M. jelski*, ya que estas dos especies no han sido descritas para México.

La rama opuesta del subclado 1a reúne a los haplotipos de *M. rosebergii* provenientes de Brasil y México.

La segunda dicotomía del Clado 1 tiene en una rama el subclado 1b y en la opuesta los subclados 1c al e. El subclado 1b alberga a las especies geminadas *M. carcinus* y *M. americanum*, si bien en el clado se muestra la separación entre estas especies, también indica que un importante número de ejemplares que han sido determinados como *M. carcinus* corresponden, genéticamente, a haplotipos de *M. americanum*, particularmente los que provienen de Venezuela y Costa Rica. La secuencia (20) corresponde a un ejemplar de *M. americanum* de la península de Baja California Sur y es idéntica (100%) a las secuencias de ejemplares continentales. Dentro del subclado 1b también se ubican la población M.sp 3 proveniente de Tabasco, Chiapas y Veracruz y la M. sp 4 proveniente de Palenque Chiapas (Tabla V y VII; Fig. 6; subclado 1b).

La tercera dicotomía del Clado 1 incluye por un extremo a los subclados 1c y subclado 1d y por el otro al subclado 1e. Los subclados 1c y 1d en conjunto están integrados por las especies del “Grupo *olfersii*” (según la clasificación de Villalobos, 1967). Específicamente en el subclado 1c se reúnen, con 100% de similitud genética, las secuencias de las especies *M. michoacanus* (muestra tomada de la serie tipo) y de *M. acantochirus* (muestra tomada de la serie tipo) y la de un ejemplar de *M. digueti* colectado en las cercanías de Mulegé, localidad tipo de la especie. En este clado también se ubica la secuencia de *M. hancocki* y de dos haplotipos relacionados, a los taxa mencionados, pero sin determinación taxonómica; *M. sp. 6* colectado en Isla Margarita, Venezuela y *M. sp. 7* y *8*, provenientes de los Tuxtlas, Veracruz (Tabla V y VII; Fig. 6; subclado 1c).

El subclado d está conformado por el complejo de especies anfiamericanas *M. olfersii* y *M. hobbsi*, para las que no hay una clara separación de haplotipos. La secuencia número (43) corresponde a un ejemplar de *M. olferssi isthmicum* subespecie (sin publicar) determinada por el Dr. Villalobos-Figueroa quien observa en estos ejemplares modificaciones morfológicas referente a *M. olferssi*. De este

estudio se desprende que *M. olferssi isthmicum* es genéticamente cercana, pero diferente, al complejo de haplotipos *M. olfersii* - *M. hobbsi*. Entre los haplotipos de este clado aparece la secuencia de un ejemplar que ha sido ingresado a la CNCR como un *M. digueti* ya que fue colectado en la localidad tipo de esta especie, sin embargo es un ejemplar mutilado (carente de una de las quelas mayores y parte del abdomen) lo que pone en duda su identidad, este estudio, lo define genéticamente como un haplotipo de *M. olfersii* (100% de similitud). También dentro del subclado d, se encuentran las secuencias de los haplotipos *M. sp.* 13 y *M. sp.* 14 (colectadas en Quintana Roo y en un cenote de Yucatán, respectivamente) son secuencias relacionadas al complejo *M. olfersii* - *M. hobbsi* pero diferentes genéticamente, es posible que estos sean nuevas especies con DEL, (Tabla V y VII; Fig. 6; subclado 1d).

El subclado 1e en uno de sus extremos porta el haplotipo indeterminado *M. sp.* 16, colectado en Veracruz y que parece ser una nueva especie de *Macrobrachium* con DLE. En el Clado hermano se presenta la divergencia entre el tercer par de especies geminadas por un lado los haplotipos de *M. heterochirus* y en la otra a los haplotipos de *M. occidentale* especies geográficas claramente diferenciadas genéticamente (Tabla V y VII; Fig. 6; subclado 1e).

El Clado 2, está constituido por las especies y las poblaciones (sin determinación taxonómica) con DLA, a su vez este clado está conformado por los subclados 2a y 2b. El subclado 2a esta conformado de cinco clados menores y en cada uno de ellos se encuentra una especie de DLA y varias poblaciones cercanas genéticamente provenientes de cuatro diferentes regiones geográficas mexicanas: Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas y a *M. borelli* del Brasil, entre las secuencias de los ejemplares de Chiapas y Oaxaca. Las potenciales nuevas especies *New sp1* y *New Sp.2* de *Macrobrachium* con DLA propuestas por Acuña, 2002 aparecen separadas genéticamente (Tabla V y VII; Fig. 6; subclado 2a).

El subclado 2b agrupa genéticamente a tres especies sudamericanas con DLA, *M. potiuna* y *M. iheringi*, colectadas en Brasil, y *M. borelli* proveniente de Argentina (Tabla V y VII; Fig. 6; subclado 2b).

A través de los diferentes clados se fueron revelando algunas inconsistencias taxonómicas, como son:

1. Los ejemplares de *M. borelli* colectados en Brasil y Argentina son genéticamente diferentes y se agrupan en clados diferentes (subclado 2^a y 2b).
2. Un ejemplar de *M. americanum* proveniente de Oaxaca, ingresado a la CNCR con el número EM 18694, es 100% genéticamente idéntico a los ejemplares de *M. acanthochirus*. De igual forma el ejemplar de *M. hobbsi* proveniente de Oaxaca ingresado a la CNCR con el número EM 18894, es genéticamente 100% idéntico a los ejemplares de *M. acanthochirus*.
3. Un ejemplar identificado como *M. surinamicum* proveniente de un estuario del río Caeté en el Estado de Pará en el litoral norte del Brasil, resultó ser una especie distante genéticamente y externa del clado de *Macrobrachium*, incluso externa al clado de los otros géneros de palaemonidos, aparentemente un género diferente de palaemonido. En el análisis de Blast hecho contra las especies del GenBank se confirma como un palemónido con una similitud inferior al 80% de otras especies de *Macrobrachium*, la mayor similitud la presenta con *M. tolmerum* y *M. malayanum*.

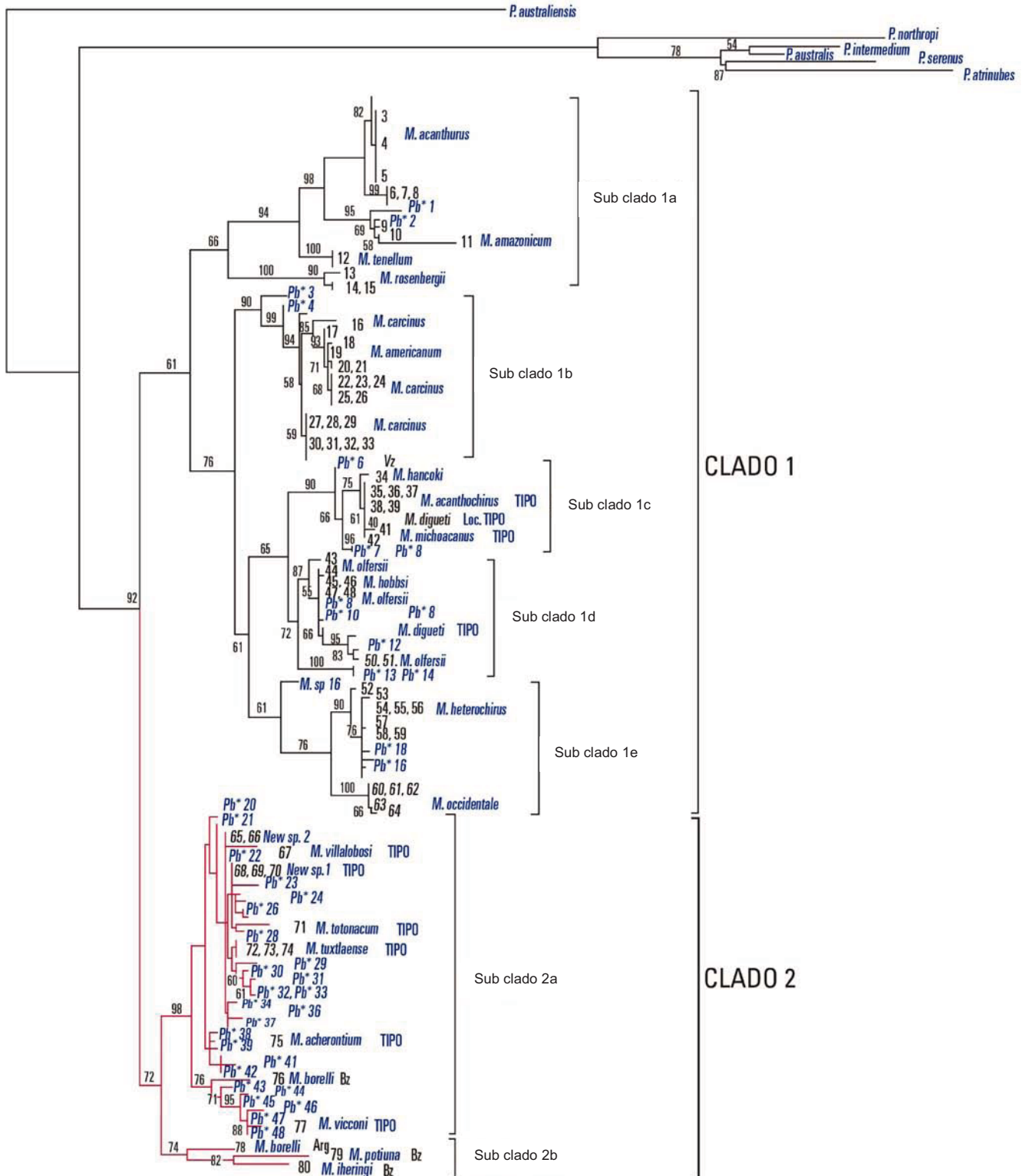


Figura 6. Filograma de Máxima verosimilitud (MV) para las especies y poblaciones mexicanas de langostinos *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un fragmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap 500 réplicas por mayoría del 50% es indicado sobre las ramas. Los ejemplares representados por Pb* (1 al 48) provienen de diferentes localidades de México. Los números (1 al 80) corresponden a ejemplares de las especies mexicanas de *Macrobrachium*, colectadas en diferentes localidades.

OBJETIVO 3.

Análisis genético (16S rRNA y COI) entre dos propuestas nuevas especies de *Macrobrachium* con DLA (*M. new sp. 1* - *M. new sp. 2*) y *M. tuxtlaense*.

Variación genética (16S rRNA).

Se obtuvieron 15 secuencias de un fragmento de 383 pb del gen mitocondrial 16S rRNA, correspondiendo a tres ejemplares de las especies con DLA: *M. tuxtlaense* (incluye muestras de la serie tipo) y tres ejemplares de cada potencial nueva especie *M. new sp. 1*, *M. new sp. 2* (incluye los primeros ejemplares colectados). Se adicionaron seis ejemplares de dos poblaciones de *M. acanthurus*, especie con DLE. El fragmento del gen amplificado se ubica entre las posiciones 98 y 500 del gen 16S rRNA completo, que tiene una longitud total de 1304 pb en *M. rosenbergii* (número de acceso al GenBank AY 659990).

Entre las especies con DLA sólo se identificaron tres sitios polimórficos informativos (sitios 178, 187 y 234). Todos los cambios nucleotídicos observados corresponden a transiciones entre purinas (Tabla X). Las frecuencias nucleotídicas fueron A = 0.3185; C = 0.0951; G = 0.2060 y T = 0.3804, no encontrando diferencia significativas en la composición de nucleótidos entre las diferentes secuencias. El contenido de G+C varía entre 30% y 30.8%. No hay diversidad nucleotídica entre los ejemplares de cada especie con DLA y entre estas (π) = (0.0048 – 0.0725). La diversidad haplotípica dentro de las poblaciones con DLA fue igual a cero y entre ellas H_d = 0.600, encontrando un haplotipo para cada población estudiada. Los valores de distancia genética pareadas varió entre D_{xy} = 0.027 a 0.081. El índice de diferenciación F_{st} resultó ser igual a uno entre todas poblaciones (Tabla XI).

Entre las dos poblaciones de *M. acanthurus* (especie con DLE) no hay sitios polimórficos y entre éstas poblaciones y las que presentan DLA hay entre 45 y 47 sitios polimórficos. El contenido de G+C para las poblaciones con DLE fue del 35%

y no presentan diversidad nucleotídica dentro ni entre las poblaciones (lo que es esperable por el bajo numero muestral). Sin embargo, entre las poblaciones de *M. acanthurus* y cualesquiera de las poblaciones con DLA presentan un $P_i (\pi) = 0.0723 - 0.0756$ (Tabla XI). La diversidad haplotípica fue igual a cero entre las poblaciones con DLE, por lo que presentar un haplotipo característico cada una de ellas y el valor de $H_d = 0,600$ entre las poblaciones con DLE y DLA las que en conjunto presentan 4 haplotipos. Los valores de distancia genética pareada entre las poblaciones de *M. acanthurus* es igual a cero y entre las poblaciones con DLE y DLA varió entre $D_{xy} = 0.121 - 0.124$. El índice de diferenciación entre las poblaciones con DLE es igual a cero y entre las poblaciones con DLE y DLA igual la $F_{st} = 1$.

Tabla X. Sitios polimórficos y de cambio de nucleótidos en el fragmento mitocondrial del gen 16S rRNA para especies con desarrollo abreviado. Los nucleótidos marcados son los que difieren.

Poblaciones y Ejemplares	Haplotipo	SITIOS POLIMORFICOS		
		278	287	234
<i>M. tuxtlaense</i>				
1	A	A	A	A
2	A	A	A	A
3	A	A	A	A
<i>M. new sp. 1</i>				
1	B	G	G	A
2	B	G	G	A
3	B	G	G	A
<i>M. new sp. 2</i>				
1	C	A	G	G
2	C	A	G	G
3	C	A	G	G

Tabla XI. Índices de variación genética entre las especies analizadas en este estudio, obtenidas a partir de secuencias mitocondriales de un fragmento (380 pb) del gen, 16S rRNA.

Especie y/o Localidad	n	G+C (%)	Número de sitios polimórficos	Diversidad Nucleotídica (π)	Diversidad Haplótipica (Hd)	Haplotipos (h)	Distancias pareadas (Dxy)	Distancias Corregidas (Da)
<i>M. tuxtlaense</i>	3	30.0	0	0	0	1	---	---
<i>Macrobrachium new sp. 1</i>	3	30.9	0	0	0	1	---	---
<i>Macrobrachium new sp. 2</i>	3	30.8	0	0	0	1	---	---
<i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas)	3	34.6	0	0	0	1	---	---
<i>M. acanthurus</i> (Tampico)	3	34.6	0	0	0	1	---	---
<i>M. new sp.1</i> / <i>M. tuxtlaense</i>		30.5	3	0.005	0.600	2	0.081	0.081
<i>M. new sp. 1</i> / <i>M. new sp. 2</i>		32.3	3	0.072	0.600	2	0.027	0.027
<i>M. new sp. 1</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas)		32.7	45	0.072	0.600	2	0.121	0.121
<i>M. new sp. 1</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tampico)		32.7	45	0.072	0.600	2	0.121	0.121
<i>M. tuxtlaense</i> / <i>M. new sp. 2</i>		30.3	3	0.005	0.600	2	0.054	0.054
<i>M. tuxtlaense</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas)		32.3	47	0.076	0.600	2	0.124	0.124
<i>M. tuxtlaense</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tampico)		32.3	47	0.076	0.600	2	0.124	0.124
<i>M. new sp. 2</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas)		33.1	45	0.072	0.600	2	0.121	0.121
<i>M. new sp. 2</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tampico)		33.1	45	0.072	0.600	2	0.121	0.121
<i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas) / (Tampico)		34.6	0	0	0	1	0	0

Variación genética (Citocromo oxidasa I (COI)).

Se obtuvieron 15 secuencias de un fragmento de 528 pb del gen mitocondrial COI, correspondiendo a tres ejemplares de las especies con DLA: *M. tuxtleense* (incluye muestras de la serie tipo) y tres ejemplares de cada potencial nueva especie *M. new sp. 1*, *M. new sp. 2* (incluye los primeros ejemplares colectados). Se adicionaron seis ejemplares de dos poblaciones de *M. acanthurus*, especie con DLE. El fragmento del gen amplificado se ubica entre las posiciones 692 y 1320 del gen COI completo, el que tiene una longitud total de 1534 pb en el decápodo *Callinectes sapidus* (número de acceso al GenBank AY 682075).

Entre las poblaciones con DLA hay 55 sitios polimórficos 48 de ellos informativos (Tabla XII). El mayor porcentaje de cambios nucleotídicos observados corresponden a transiciones entre purinas, sin embargo también hay transiciones entre pirimidinas y transversiones, estas últimas principalmente entre la población de *M. tuxtleense* y la de *Macrobrachium new sp. 1* (Tabla XII). Las frecuencias nucleotídicas fueron A = 0.2888; C = 0.2282; G = 0.2017 y T = 0.2814 no encontrándose diferencias significativas en la composición de nucleótidos entre las diferentes secuencias. El contenido de G+C varía entre 35.6% y 38.8%. No hay diversidad nucleotídica entre los ejemplares de cada población con DLA, pero sí entre las poblaciones (π) = 0.0250 – 0.0503 (Tabla XIII). La diversidad haplotípica dentro de las poblaciones con DLA fue igual a cero y entre ellas H_d = 0.600 encontrando tres haplotipos, uno por población. Los valores de distancia genética pareadas encontrados varían entre D_{xy} = (0.0407 a 0.0835) y la distancia genética corregida (K2) está dentro del rango de D = (0.0420 a 0.0840). El índice de diferenciación F_{st} resultó ser igual a 1 entre todas las poblaciones.

Entre las poblaciones de *M. acanthurus* (especie con DLE) hay 12 sitios polimórficos informativos y entre éstas poblaciones y las que presentan DLA hay entre 278 y 337 sitios polimórficos. El contenido de G+C para las poblaciones con DLE fue igual al 49.7%. La diversidad nucleotídica dentro y entre las poblaciones

con DLE es igual a $(\pi) = 0.0084$ a 0.0090 , la variación de P_i entre las poblaciones de *M. acanthurus* v/s cualesquiera de las poblaciones con DLA va de $(\pi) = 0.3332$ a 0.3878 (Tabla XIII). La diversidad haplotípica entre las poblaciones con DLE fue igual a $0,096$ con 6 diferentes haplotipos. La diversidad haplotípica (H_d) entre las poblaciones con DLE y DLA esta entre (0.161 y 0.933). La distancia genética pareada entre las poblaciones de *M. acanthurus* es $D_{xy} = 0.0076$ entre las poblaciones de *M. acanthurus* y las que presentan y DLA varió entre $D_{xy} = 0.5360$ a 0.5736 . El índice de diferenciación entre las poblaciones con DLA y DLE es igual a 0.9928 (Tabla XIII).

Tabla XIII. Índices de variación genética entre las poblaciones y especies analizadas en este estudio, obtenidas a partir de secuencias mitocondriales de un fragmento (580 pb) del gen Citocromo oxidasa I (COI).

Especie y/o Localidad	n	G+C (%)	Número de sitios polimórficos	Diversidad Nucleotídica (π)	Diversidad Haplotípica (Hd)	Haplotipos (h)	Distancias pareadas (Dxy)	Distancias Corregidas (Da)
<i>M. tuxtlaense</i>	3	37.4	0	0	0	1	---	---
<i>Macrobrachium new sp. 1</i>	3	35.6	0	0	0	1	---	---
<i>Macrobrachium new sp. 2</i>	3	38.8	0	0	0	1	---	---
<i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas)	3	49.6	7	0.0090	1	3	---	---
<i>M. acanthurus</i> (Tampico)	3	49.7	7	0.0090	1	3	---	---
<i>M. sp. 1</i> / <i>M. tuxtlaense</i>		36.5	21	0.0250	0.6000	2	0.0407	0.0407
<i>M. sp. 1</i> / <i>M. sp. 2</i>		37.1	36	0.0430	0.6000	2	0.0692	0.0692
<i>M. sp. 1</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas)		42.4	278	0.3364	0.8000	4	0.5631	0.5631
<i>M. sp. 1</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tampico)		42.5	279	0.3368	0.8000	4	0.5360	0.5594
<i>M. tuxtlaense</i> / <i>M. sp. 2</i>		38.1	42	0.0503	0.6000	2	0.0835	0.0835
<i>M. tuxtlaense</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas)		41.9	337	0.3878	0.9330	4	0.5729	0.5689
<i>M. tuxtlaense</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tampico)		43.3	285	0.3447	0.8000	4	0.5736	0.5695
<i>M. sp. 2</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas)		45.0	273	0.3332	0.9000	4	0.5526	0.5485
<i>M. sp. 2</i> / <i>M. acanthurus</i> (Tampico)		45.1	274	0.3333	0.1610	4	0.5532	0.5492
<i>M. acanthurus</i> (Tuxtlas) / (Tampico)		49.7	12	0.0084	0.0960	6	0.0077	0.0004

**Relaciones filogenéticas.
16S rRNA.**

Se alinearon 383 caracteres, de los cuales 274 fueron constantes, 62 variables y 47 parsimoniosos. El modelo de mejor ajuste evolutivo obtenido con el criterio de AICc, fue el de Hasegawa–Kishino–Yano (Hasegawa *et al.*, 1985). Los valores de los parámetros para los datos bajo el modelo (HKY+G) son los siguientes: frecuencia de nucleótidos A = 0.3185; C = 0.0951, G = 0.2060 y T = 0.3804, modelo de sustitución con una proporción de transiciones / Transversiones (ti / tv) = 5.9495 y distribución gamma (G = 0.1558).

Las reconstrucciones filogenéticas se obtuvieron mediante tres diferentes métodos: con distancia (NJ); con máxima parsimonia (MP) y con máxima verosimilitud (MV). Las variaciones en las topologías, mediante cada método, correspondieron a la ubicación de los haplotipos lo que no hizo variar la tendencia general de las relaciones filogenéticas entre los diferentes métodos y árboles obtenidos. De todas las reconstrucciones se desprenden un clado dos ramas hermanas una de ellas agrupa las secuencias de los ejemplares de las dos poblaciones de *M. acanthurus* (DLE), y en la otra rama se ordenan separadamente los ejemplares de la especie *M. tuxtlaense* y los ejemplares de las potenciales nuevas especies *M. sp 1* y *M. sp 2* todas con DLA. Los valores de bootstrap apoyan la diferenciación de las ramas que distinguen a cada una de las especies (Anexo II d).

Citocromo oxidasa I (COI).

Se alinearon 528 caracteres, de los de cuales 132 fueron constantes, 98 variables y 298 parsimoniosos. El modelo de mejor ajuste evolutivo, obtenido con el criterio de AIC, fue el GTR+G “General Time Reversible” (Tavaré, 1986), donde la frecuencia de cada nucleótido en la matriz de datos es variable y considera las tasas de cambio reversible (Tabla XIV), este modelo incluye una proporción de sitios invariables (I) = 0. 1018.

Tabla XIV. Frecuencias de nucleótidos y matriz reversible de tasas de cambio entre nucleótidos a partir de un fragmento de 528 pb del gen Citocromo oxidasa I (COI), para especies de langostinos *Macrobrachium*.

Frecuencias de nucleótidos				
	A	C	G	T
	0.2843	0.2378	0.1919	0.2860
	Matriz de Probabilidad de Transición. Matriz P(t)			
A		0.0000	5.0642	0.1019
C	0.0000		0.0000	2.4060
G	5.0642	0.0000		1.0000
T	0.1019	2.4060	1.0000	

Las reconstrucciones filogenéticas se obtuvieron con tres diferentes métodos: distancia (NJ); máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (MV). Las variaciones en las topologías, mediante cada método, correspondieron a la ubicación de los haplotipos lo que no hizo variar la tendencia general de las relaciones filogenéticas entre los diferentes métodos y árboles obtenidos. Los valores de bootstrap apoyan la diferenciación de las ramas que distinguen a cada una de las especies (Anexo II e).

16S rRNA y Citocromo oxidasa I (COI).

En el análisis filogenético a partir de ambos fragmentos mitocondriales se alinearon 911 caracteres (383 pb 16S rRNA y 528 pb COI), de los de cuales 406 fueron constantes, 160 variables y 345 parsimoniosamente informativos. El modelo de mejor ajuste evolutivo, obtenido con el criterio de AIC, fue el modelo concatenado K81uf+G. Los frecuencias nucleótidicas bajo este modelo son A = 0.3006; C = 0.1789; G = 0.2021 y T = 0.3183 y con distribución gamma (G = 0.3948).

Las reconstrucciones filogenéticas se obtuvieron con tres diferentes métodos; distancia (NJ); máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (MV). Las variaciones en las topologías, mediante cada método de distancia y parsimonia correspondieron a la ubicación de los haplotipos lo que no hizo variar la tendencia general de las relaciones filogenéticas entre los diferentes métodos y árboles obtenidos. De todas las reconstrucciones se desprenden dos ramas hermanas e independientes, una de ellas agrupa las secuencias de los ejemplares de las dos poblaciones de *M. acanthurus* (DLE) y en la otra rama se ordenan separadamente los ejemplares de la especie *M. tuxtlaense* y los ejemplares de las potenciales nuevas especies *M. sp 1* y *M. sp 2* todas con DLA. Los valores de bootstrap apoyan la diferenciación de las ramas que distinguen a cada una de las especies (Fig. 7).

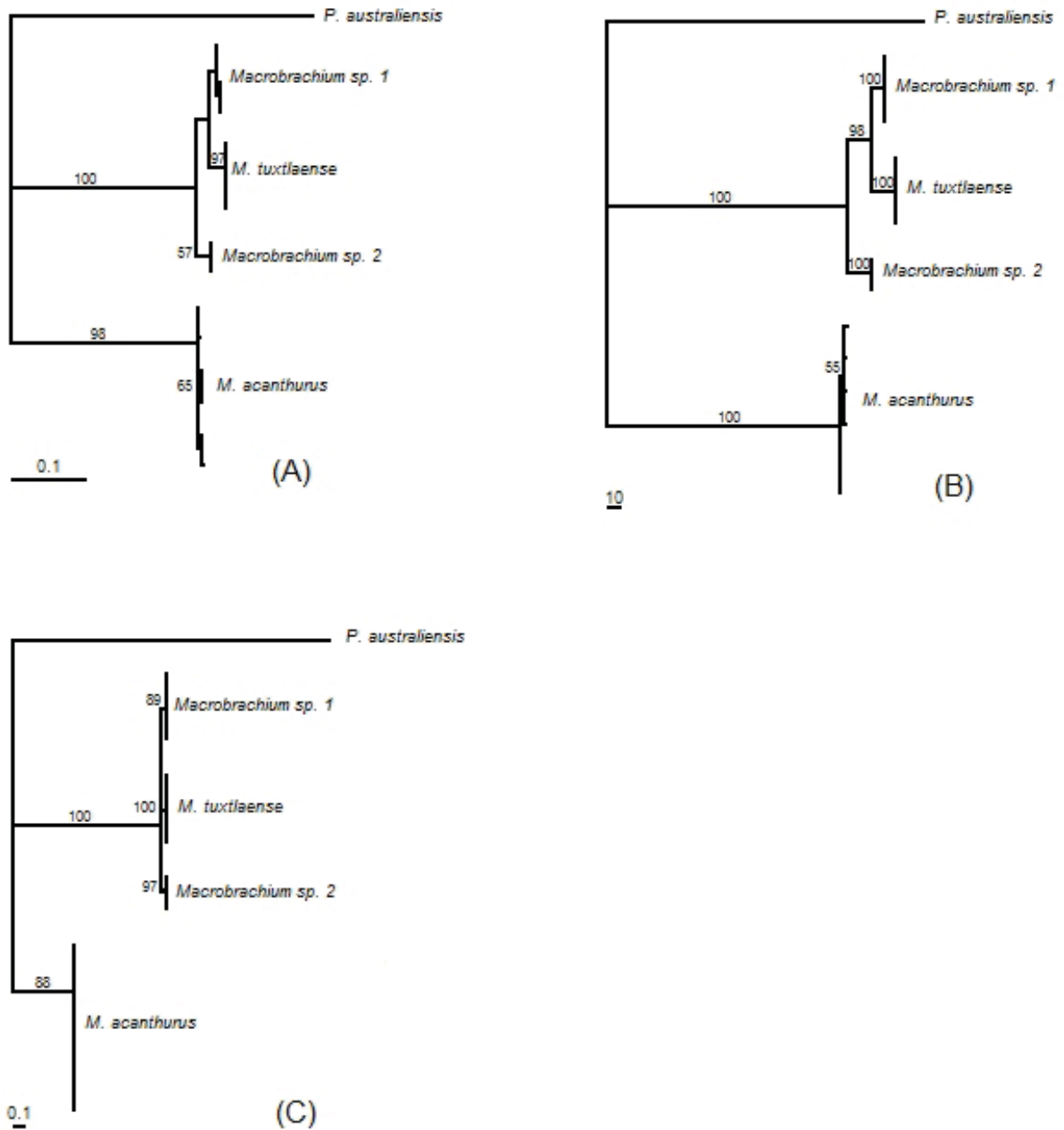


Figura 7. Relaciones filogenéticas para especies de langostinos con DLA, a partir de 911 caracteres (383 pb de 16S rRNA y 528 pb de COI). Métodos de reconstrucción (A) = Distancia (NJ); (B) = Máxima Parsimonia (MP) y (C) = Máxima Verosimilitud (MV). Bootstrap de 2000, 2000 y 100 réplicas respectivamente.

OBJETIVO 4.

Relación filogenética (16S rRNA y COI) entre las especies mexicanas de Macrobrachium que se encuentran geminadas por la masa continental.

16S rRNA

El análisis incluye 51 secuencias: 15 de *M. acanthurus*, 3 de *M. tenellum*, 5 de *M. occidentale*, 8 de *M. heterochirus*, 13 de *M. carcinus*, 6 de *M. americanum* y *Paratya australiensis* como grupo externo (Tabla VI). Para el análisis filogenético se alinearon 404 caracteres de los cuales 263 fueron constantes, 45 variables y 96 parsimoniosamente informativos. El modelo de mejor ajuste evolutivo, obtenido tanto con el criterio de AIC como con hLRTS, fue el de Hasegawa–Kishino–Yano (Hasegawa *et al.*, 1985), con diferentes tasas de sustituciones bajo distribución gamma. Los parámetros específicos bajo el modelo (HKY+G) son los siguientes: frecuencia de nucleótidos A = 0.289; C = 0.121, G = 0.208 y T = 0.383, modelo de sustitución con una proporción de transiciones / transversiones (t_i / t_v) = 4.1177 y distribución gamma ($G = 0.2197$).

Las reconstrucciones filogenéticas se obtuvieron con los tres diferentes métodos; distancia (NJ), un árbol; máxima parsimonia (MP), dos árboles y máxima verosimilitud (MV), dos árboles. Las variaciones en las topologías, mediante cada método, correspondieron a la ubicación de los haplotipos.

Los resultados son claros y coincidentes en las reconstrucciones obtenidas con los diferentes métodos. Un gran clado con un subclado, en el cual una de sus ramas muestra la dicotomía entre las especies geminadas *M. americanum* y *M. carcinus* y en la otra rama, la dicotomía entre *M. heterochirus* y *M. occidentale*. El otro extremo del clado porta la dicotomía entre el tercer par de especies geminadas, *M. acanthurus* y *M. tenellum* (Anexo II f).

Específicamente en el clado de *M. americanum* y *M. carcinus*, se aprecia la dicotomía entre los haplotipos mexicanos de esta especie, sin embargo lo que se ha determinado como *M. carcinus* para Centroamérica (Venezuela y Costa Rica) integran el clado del morfotipo mexicano determinado como *M. americanum* (Anexo II f). El haplotipo de *M. americanum* de la península de Baja California Sur y los continentales son idénticos genéticamente.

En la segunda dupla de especies geminadas *M. heterochirus* y *M. occidentale* se encuentra una clara diferenciación genética entre las especies (Anexo II f). En el par geminado *M. acanthurus* y *M. tenellum* se observa una clara diferenciación genética entre las especies, sin embargo los haplotipos de *M. acanthurus* provenientes de Brasil y Costa Rica son diferentes genéticamente a los haplotipos mexicanos de esta especie (Anexo II f). El haplotipo de *M. acanthurus* de la península de baja California Sur y los continentales son idénticos genéticamente.

Los resultados obtenidos están apoyados por valores de bootstrap superiores a 70% en la mayoría de las ramas.

Citocromo oxidasa I (COI I).

El análisis incluye 44 secuencias: 12 de *M. acanthurus*, 3 de *M. tenellum*, 6 de *M. occidentale*, 5 de *M. heterochirus*, 6 de *M. carcinus*, 11 de *M. americanum* y *Paratya australiensis* como grupo externo (Tabla VI). Para el análisis filogenético se alinearon 656 caracteres de los de cuales 128 fueron constantes, 62 variables y 466 parsimoniosamente informativos. El modelo de mejor ajuste evolutivo, obtenido tanto con el criterio de AIC como con hLRTS, fue el modelo concatenado K81uf+I+G. Este modelo incluye una proporción de sitios invariables (I) = 0.1018 con diferentes tasas de sustituciones bajo distribución gamma. Los parámetros específicos bajo este modelo son: frecuencia de nucleótidos A = 0.2814; C = 0.2240, G = 0.2108 y T = 0.2839 y distribución gamma (G = 0.5790).

Las reconstrucciones filogenéticas se obtuvieron con los tres diferentes métodos; distancia (NJ), 45 árboles; Máxima Parsimonia (MP), 200 árboles y Máxima Verosimilitud (MV), 1 árbol. Las variaciones en las topologías, mediante los métodos de NJ y MP correspondieron a la ubicación de los haplotipos y de los clados, sin embargo la tendencia general de las relaciones filogenéticas se mantuvo.

Con este gen se obtiene una mayor resolución de las variaciones tanto entre las especies como entre los haplotipos de las diferentes poblaciones. Los resultados son claros y coincidentes entre los diferentes métodos. Un gran clado que en uno de sus extremos tiene un subclado en el cual se muestra la dicotomía entre las especies geminadas *M. americanum* y *M. carcinus*, sin embargo lo que se ha determinado como *M. carcinus* para Venezuela y Costa Rica, genéticamente integran el Clado del morfotipo mexicano de *M. americanum* (Anexo II g). El haplotipo de *M. americanum* de la península de Baja California Sur y los continentales son idénticos genéticamente.

En otra rama, la dicotomía entre *M. heterochirus* y *M. occidentale*. El otro extremo del clado porta la dicotomía entre *M. acanthurus* y *M. tenellum* bien diferenciada, aún cuándo los haplotipos de *M. acanthurus* provenientes de Brasil y Costa Rica difieren genéticamente de los haplotipos mexicanos (Anexo II g). Los resultados obtenidos están apoyados por valores de bootstrap superiores a 95% en todas las ramas que muestran la dicotomía entre las especies.

16S rRNA y Citocromo oxidasa I (COI I).

El análisis en conjunto para los dos segmentos génicos incluye 41 secuencias: 12 de *M. acanthurus*, 3 de *M. tenellum*, 5 de *M. occidentale*, 5 de *M. heterochirus*, 6 de *M. carcinus*, 8 de *M. americanum* y *Paratya australiensis* como grupo externo (Tabla VI). Para el análisis filogenético se alinearon 1063 caracteres (404 pb del fragmento 16S rRNA y 656 del fragmento COI) de los de cuales 398 fueron constantes, 117 variables y 548 parsimoniosamente informativos. El

modelo de mejor ajuste evolutivo, obtenido tanto con el criterio de AIC como con hLRTS, fue el modelo concadenado K81uf+I+G, este modelo incluye una proporción de sitios invariables (I) = 0.1569 con diferentes tasas de sustituciones y distribución gamma (G) = 0.8065. Las frecuencia de nucleótidos bajo este modelo fueron A = 0.2845; C = 0.1903, G = 0.2099 y T = 0.3152.

Se realizaron reconstrucciones filogenéticas mediante los métodos de: Distancia (NJ), Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (MV). Las variaciones en las topologías, mediante los métodos de NJ y MP correspondieron a la ubicación de los haplotipos sin embargo la tendencia de las relaciones filogenéticas es similar. La descripción de los resultados para el análisis en conjunto de ambos genes no varía al que se hizo para los segmentos génicos por separado (Fig. 8).

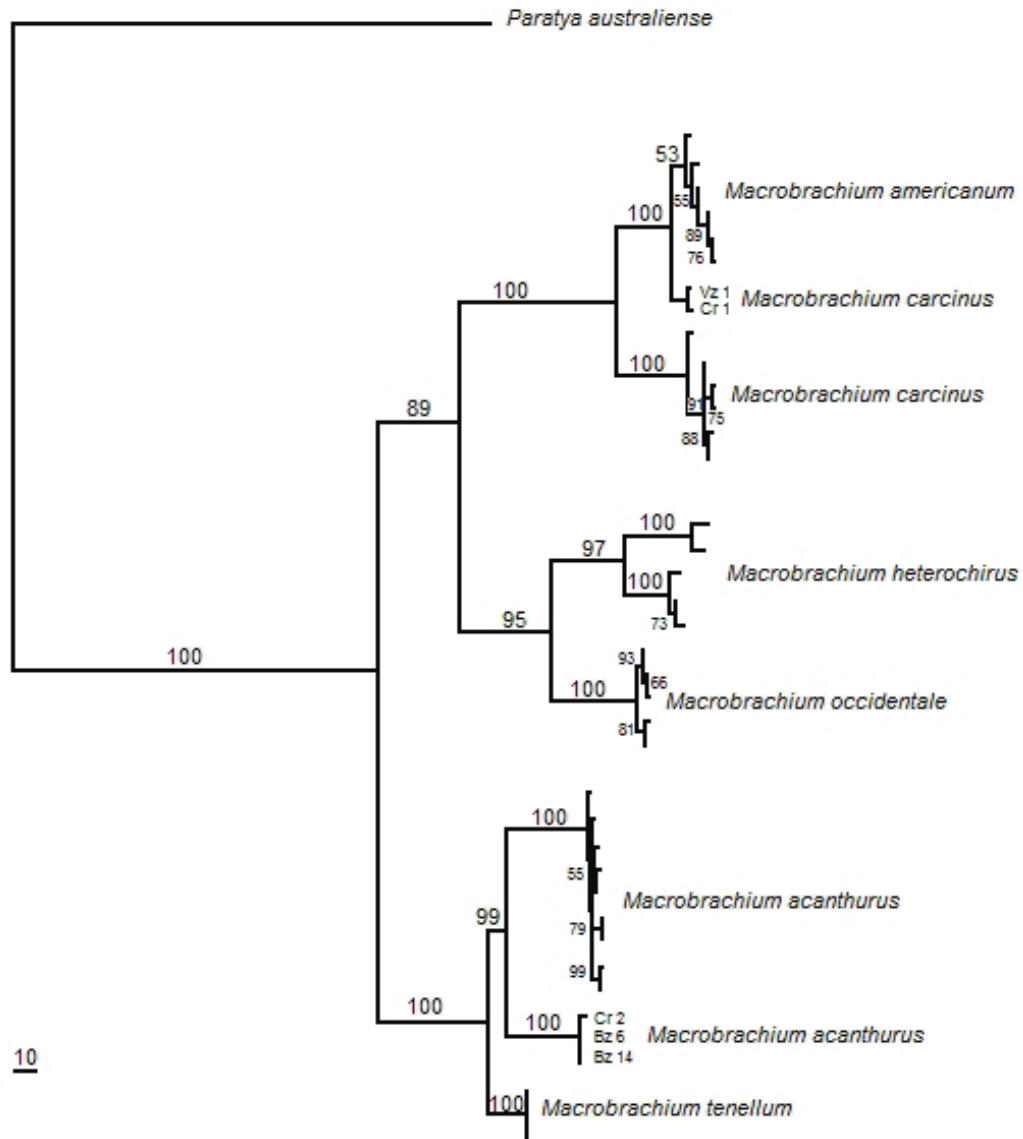


Figura 8. Filograma de Máxima Verosimilitud para tres pares de especies mexicanas geminadas de langostinos *Macrobrachium*, obtenido a partir de 1060 pb (404 de 16S rDNA y 656 de Citocromo Oxidasa I). Bootstrap de 500 réplicas. Vz = Venezuela, Cr = Costa Rica, Bz = Brasil. Resto de secuencias son mexicanas

OBJETIVO 5.

Filogenia molecular (16S rRNA) para especies de Macrobrachium de todos los continentes: ubicación del desarrollo abreviado en el clado.

En esta reconstrucción se incluyen 148 secuencias de las cuales 103 representan a 57 especies de *Macrobrachium* de diferentes partes del mundo (Tabla V), 39 corresponden a igual número de poblaciones mexicanas, sin determinación taxonómica (Tabla VI), cinco secuencias son de otros dos géneros de palemónidos y utilizamos la secuencia de *Paratya australiensis* como grupo externo.

Para el análisis filogenético, se alinearon 399 secuencias de los cuales 152 fueron constantes, 63 variables y 184 parsimoniosas. El modelo de mejor ajuste evolutivo, obtenido con el criterio de AIC, fue el de Hasegawa–Kishino–Yano (Hasegawa *et al.*, 1985), con diferentes tasas de sustituciones bajo distribución gamma. Los parámetros específicos bajo el modelo (HKY+G) son los siguientes: frecuencia de nucleótidos A = 0.319; C = 0.087, G = 0.186 y T = 0.409, modelo de sustitución con una proporción de transiciones / transversiones (t_i / t_v) = 2.723 y distribución gamma igual a 0.3495.

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas con los métodos de Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (MV) reflejan, en lo general, una tendencia similar. La presentación de los resultados y discusión se realiza con base en el cladograma de consenso estricto obtenido mediante MP a partir de 100 reconstrucciones. El nivel de confianza se determinó con bootstrap no paramétrico de 1000 réplicas (Figura 9).

Como el objetivo principal era determinar la ubicación de las especies con DLA dentro de la reconstrucción filogenética, en esta se incluyeron las 5 especies mexicanas con DLA, las dos nuevas especies mexicanas (*M. new sp. 1* y *M. new sp. 2*), las 28 poblaciones mexicanas (sin determinación taxonómica) y 21

especies más distribuidas como sigue: 6 en Brasil (una de estas especies es común a Argentina); 6 en Asia; 4 en Australia y 5 en India. Para facilitar la descripción de los resultados mas relevantes, las ramas que terminan con especie con DLA esta destacada en rojo y siguiendo los objetivos de esta investigación los se han identificados los clados de las especeis mexicanas con DLA, las especies del “Grupo Olfersii” las tres duplas mexicanas de especies geminadas y las especies con DLA de la India, Australia, Asia y Centroamérica.

El Clado 1: reúne a todas las especies y poblaciones mexicanas de *Macrobrachium* con DLA y a la especie brasileña *M. borelli*. *Macrobrachium sp new1* y *M. sp new 2* que son potenciales nuevas especies mexicanas con DLA. Las que por la similitud morfológica también han sido consideradas poblaciones de la especie *M. tuxtlaense*, sin embargo en la filogenia se ubican en ramas separadas y distantes de *M. tuxtlaense*.

El Clado 2: está conformado por especies y poblaciones mexicanas con DEL. Particularmente integra a todos las especies del “Grupo Olferssi” (*M. michoacanus*, *M. acanthochirus*, *M. digueti*, *M. olfersii* y *M. hobbsi*) con ejemplaresde *M. olfersii* y *M. hobbsi* de diferentes localidades nacionales y de sudamerica. *M. acanthochirus*, *M. digueti* y *M. michoacanus* conforman una tricotomía con idéntica identidad genética. Interesante es que hay una rama no resulta, con alto apoyo estadístico, que incluye a las especies *M. crenulatum* proveniente de Puerto Rico y *M. zariqueyi* del este de Africa (ambas son especie de amplia distribución en la costa Atlántica (las secuencia para ambas especies, fueron tomadas del Gen Bank), junto a ellas se ubican las poblaciones Pb*7 y Pb*8 colectadas en Veracruz, México. La similitud morfológica entre ambas especies a llevado a pensar que son solo una que correspondería a *M. crenulatum*. La similitud genética de las cuatro secuencias (dos especies y dos poblaciones) es del 100%, hasta el momento no había reporte de *M. crenulatum* en México.

La secuencia de la población Pb*6 colectada en la Isla Margarita Cerro Copey en Venezuela, si bien se integra al “Grupo Olfersii” es una especie genéticamente diferente. Los haplotipos de *M. hobbsi* – *M. olfersii* se mezclan sin patrón de separación, sin embargo *M. olfersii* itshmicum (Villalobos-Figueroa, sin publicar) revela ser, genéticamente, diferente al complejo citado.

Las secuencias de las poblaciones Pb*13 (colectada en un Cenote de Yucatán, México) y Pb*14 (colectada en Chemuyil, Quintana Roo, México) tienen una estrecha relación genética y aparentemente son una nueva especie, en términos genéticos, para México.

El Clado 3: es muy amplio y está formado por dos subclados, el primero incluye a las especies geminadas mexicanas *M. carcinus* y *M. americanum*. Se revela que los haplotipos de *M. carcinus* provenientes de Venezuela y Costa Rica (costa Atlántica) tiene una alta similitud genética con los ejemplares de *M. americanum* de México (que solo se distribuye en la costa Pacífica). El otro clado está integrado por otra dupla de especies geminadas mexicanas *M. heterochirus* y *M. occidentale*. El Clado 4: incluye en una de las ramas del clado especies australianas con DLA, en el otro extremo se ubican especies con DLE de Australia y Tailandia.

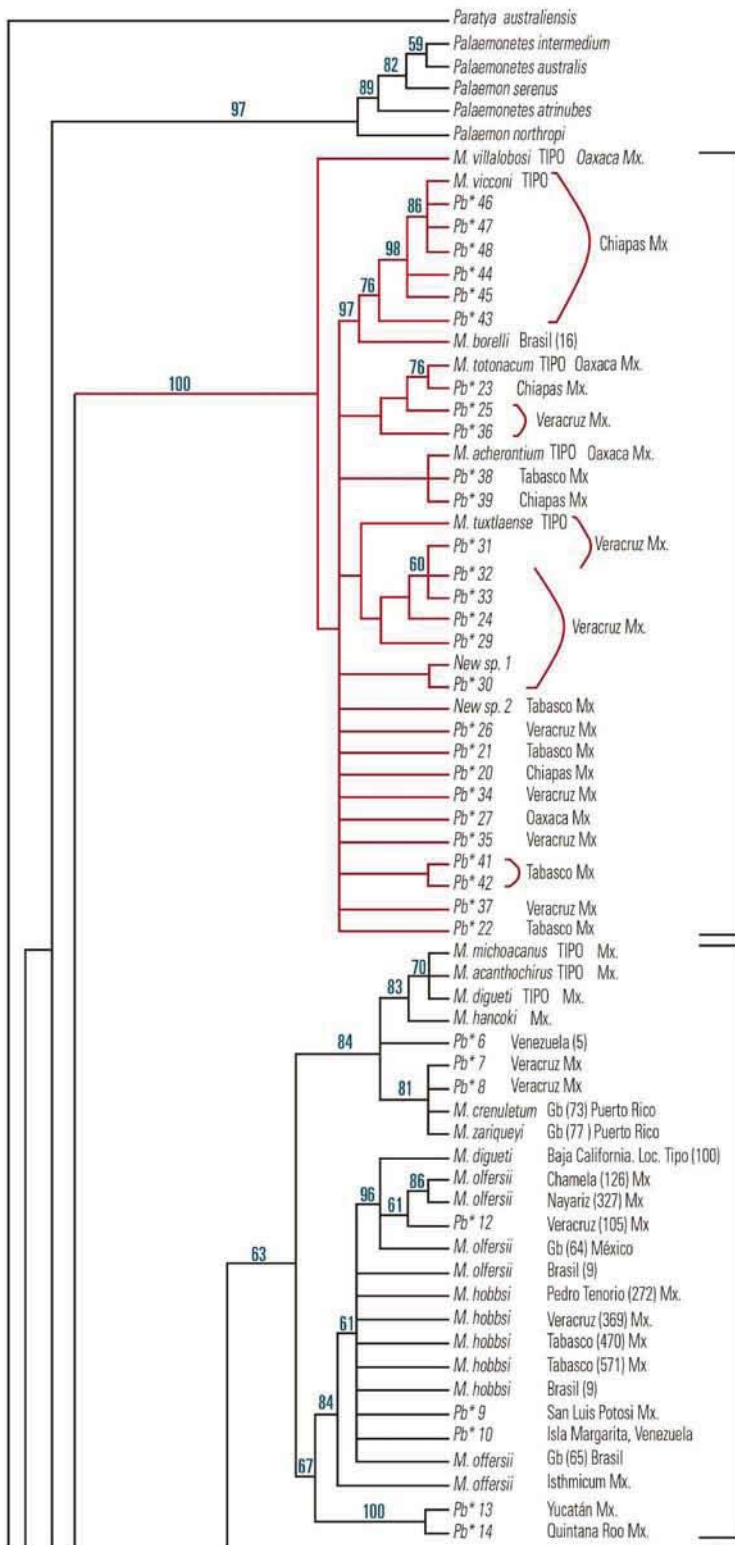
El clado 5: en una de sus subclados muestra la divergencia entre los haplotipos de *M. acanthurus* y *M. tenellum*, especies que conforman la tercera dupla de especies geminadas para México. Importante de destacar es que en la otra rama del clado se ubican las especies brasileñas, *M. jelski* y *M. amazonicum*, ninguna de estas dos especies están descritas para México. *M. tenellum* está tan distante genéticamente de *M. acanthurus* como lo está del clado de especie brasileñas que incluye las secuencias de *M. sp. 1* (colectado en Platanillo, Veracruz, México población con DLE) y *M. sp. 2* (Colectado en Veracruz, México; sin determinación taxonómica y para las que se desconoce su tipo de desarrollo

larvario). Estas poblaciones mexicanas están estrechamente relacionadas a *M. amazonicum* y *M. jelski*.

El Clado 6: en un extremo del clado reúne a los diferentes haplotipos de la especie *M. rosenbergii*. El haplotipo mexicano es cercano genéticamente al haplotipo de Tailandia en cambio las secuencias de los ejemplares de Brasil parecen derivar de las poblaciones australianas, recordar que *M. rosenbergii* es una especie introducida en América desde Asia. La otra parte del clado incluye seis especies con DLA, provenientes de la India.

Clado 7: incluye varias especies con DLE y entre ellas la especie brasileña *M. bullatum* con DLA. A este clado también se integran, aunque distante genéticamente especies con DLA de Asia y otras especies con DLA de Australia, India y Singapur pero con baja relación genética.

El clado 8: está conformado por cuatro especies con DLA por un lado una rama con una especie de Brasil y una de proveniente de Argentina y la rama opuesta incluye otras dos especies de Brasil. Finalmente, *M. malayanum* (especie proveniente de Singapur, tomada del Gen Bank) aparece en una rama hermana completamente independiente del clado que incluyen a la totalidad de las especies de *Macrobrachium* del mundo indicando esto que pudieran ser especie de un género de palaemonido diferente o una incorrecta identificación de especie.



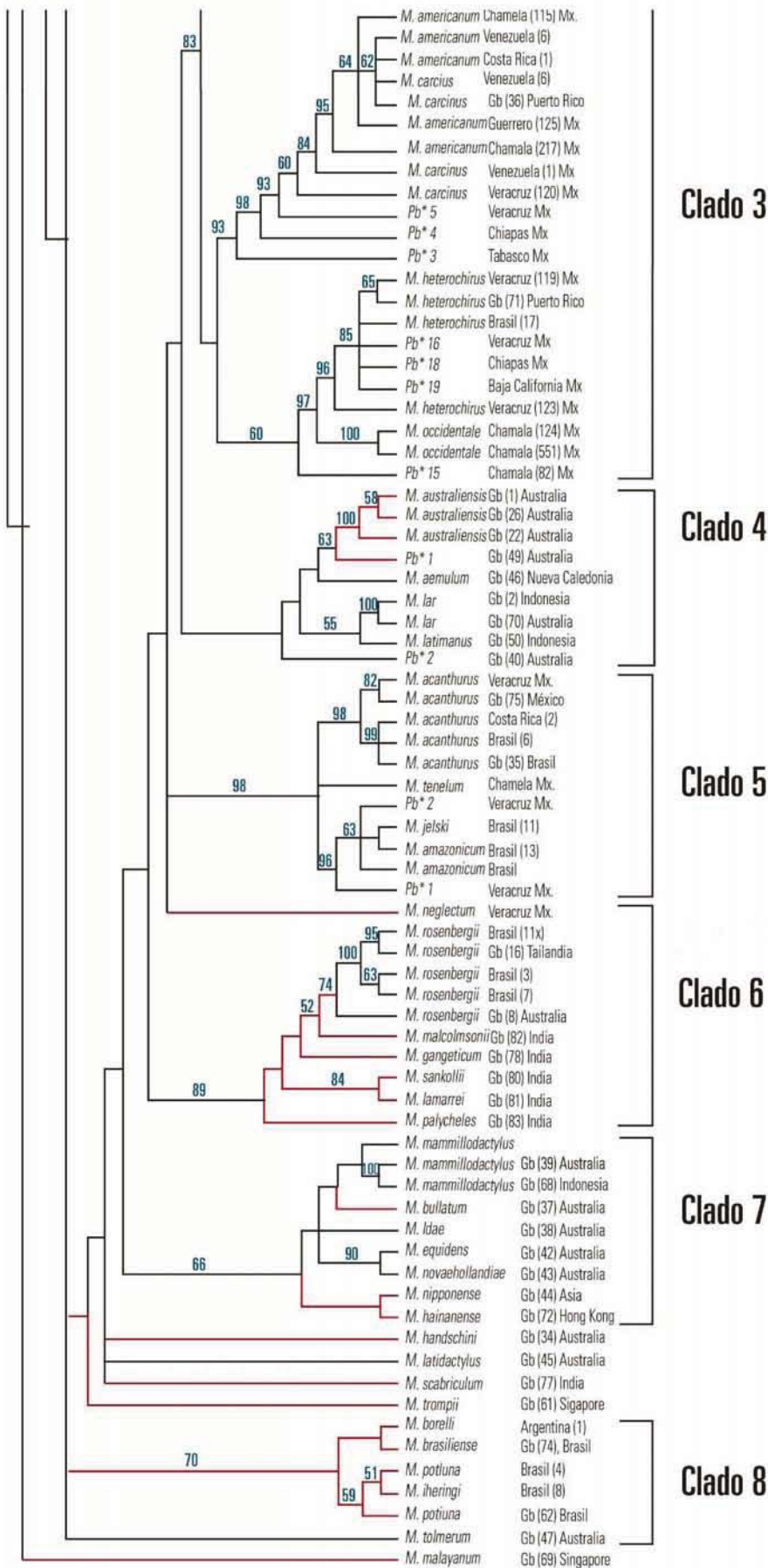


Figura 9. Cladograma de Máxima Parsimonia (MP) para especies y poblaciones de langostinos *Macrobrachium* de diferentes partes del mundo, realizado a partir de secuencias de un fragmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap 1000 réplicas, por mayoría del 50% es indicado en azul sobre las ramas. Los ejemplares indicados como P*b (1- 48) corresponden a poblaciones mexicanas sin determinación taxonómica (Tabla VIII) y los números (1-80) corresponden a ejemplares de distinta localidad de las especies. En rojo las especies con DLA y con línea punteada las especies que posiblemente lo presenten.

Con la finalidad de mostrar la ubicación del DLA según la distribución de especies de *Macrobrachium* se realizó una filogenia que incluyó las 50 especies de *Macrobrachium* del mundo para las que se cuenta con secuencia del gen 16S Rarn, tomadas del Gen Bank y las generadas en este estudio (Figura 10).

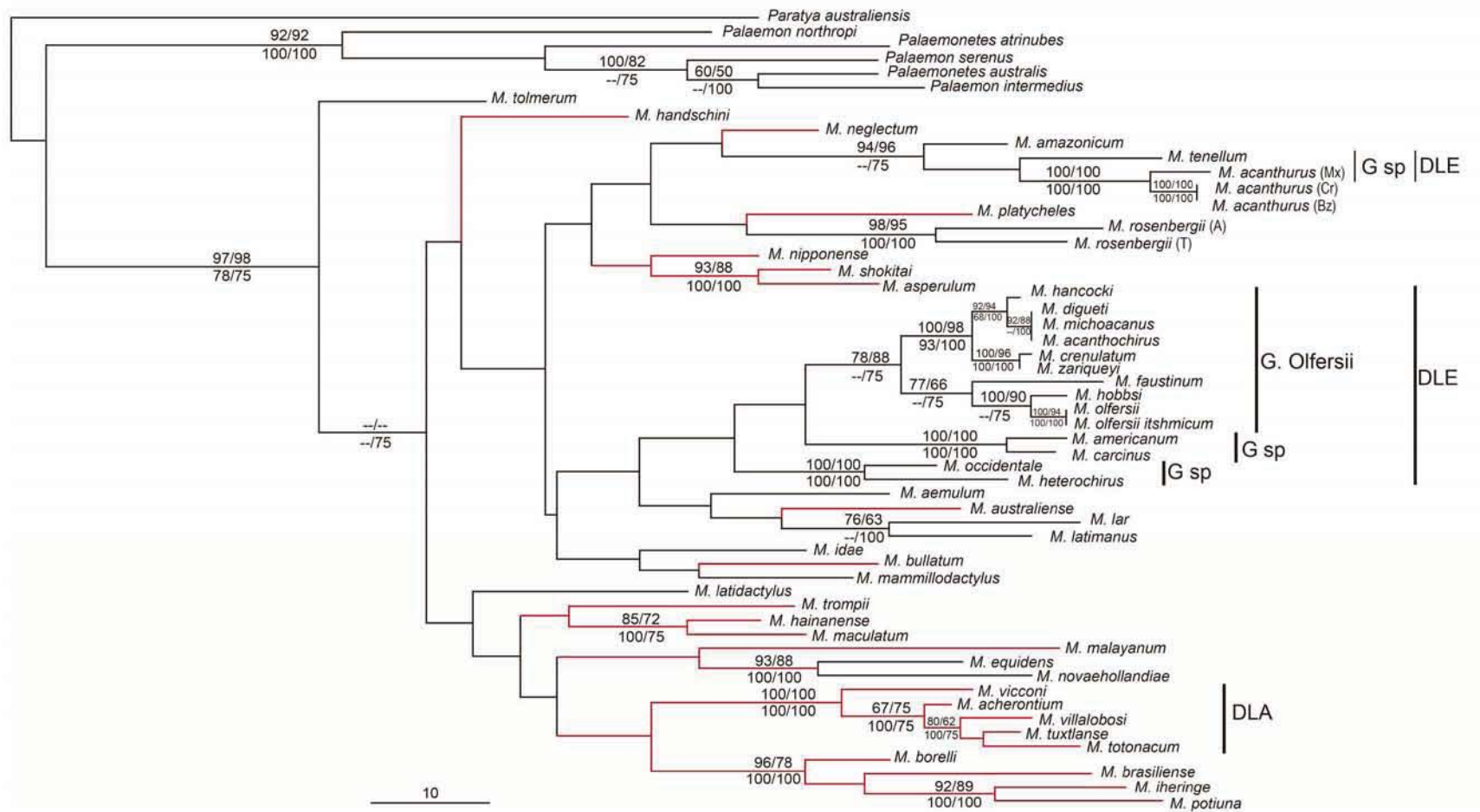


Figura 10. Filograma de Parsimonia que incluye secuencias del gen 16S rARN de 50 especies de *Macrobrachium* del mundo. Ubicación del desarrollo larvario abreviado (DLA).

DISCUSIÓN.

Los diferentes métodos usados para los análisis filogenéticos presentan, en general, resultados congruentes los que en gran medida reflejan las ideas taxonómicas actuales del grupo *Macrobrachium* en México (Villalobos, 1967a; Hernández, 2007). Los resultados más relevantes del presente capítulo indican: **1).** Que las especies mexicanas de *Macrobrachium* son un grupo monofilético, **2).** Que las especies mexicanas con DLE están claramente separadas de las que presentan DLA **3).** Que las especies geminadas presentan una clara divergencia genética **4).** Se da evidencia genética para la determinación de nuevas especies de *Macrobrachium* para México.

De los estudios moleculares en crustáceos, para lo que se han empleado el gen 16s rRNA como marcador molecular, se ha establecido que los niveles de variación genética entre las especies congénéricas varía entre el rango del 2 al 17% (Suno-Ughi *et al.* 1997; Ponniah y Hughes, 1998; Jarman *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2000; Murphy y Austin, 2002; 2003; 2004; 2005; Liu *et al.*, 2007), el intervalo de variación genética, entre las especies mexicanas de *Macrobrachium* obtenidas en este estudio, está entre los 0 a 16.7%. La máxima diferencia genética la presentan *M. acherontium* especie con DLA adaptada al ambiente estigobiótico (todo su ciclo biológico dentro de las cuevas (sin luz, adaptados al medio oscuro) y *M. tenellum* especie epigea estuarina con DLE.

Especies con desarrollo larval abreviado (DLA).

La marcada diferencia en la ontogenia y morfología entre las especies de *Macrobrachium* con DEL y las que presentan DLA a promovido la idea de considerarlas como dos linajes separados que divergieron muy temprano en la historia evolutiva del grupo, durante el periodo Cretácico. Las especies con DLA, presentan una relación estrecha (Pereira y García, 1995). Sin embargo, la

distribución actual de las especies con DLA, a través del mundo, sugiere orígenes diferentes para las especies con DLA de las distintas regiones geográficas (Murphy y Austin, 2005). De algunos de estos estudios, se desprende que las especies con DLA de Sudamérica, son probablemente el resultado de una invasión diferente al de las especies dulceacuícolas de *Macrobrachium* que se encuentran en el sur-este de México. Las diferentes reconstrucciones filogenéticas obtenidas en este estudio muestran una clara divergencia entre las especies mexicanas con DLE y DLA. El promedio de la diferencia genética entre ambos grupos es del 14%, lo que corresponde a 54 nucleótidos diferentes, en el fragmento de gen estudiado. Este resultado apoyaría la propuesta de Pereira y García (1995) de separar el género en dos diferentes, sin embargo tanto las especies con DLA y DLE a pesar de la alta diferenciación genética entre los grupos y dentro de ellos presentan un alta similitud de forma propicia la confusión en la determinación taxonómica. Por otra parte la característica del DLA está bien representada entre las especies de *Macrobrachium* pero sólo ese presenta en algunos géneros de palemónidos, por lo que no es un carácter robusto para la discriminación taxonómica del grupo.

En el contexto mundial el DLA, aparece representado en diferentes ramas de la mayoría de los clados, con una tendencia a la distribución geográfica, aún cuando existe mezcla de localidades. El clado de especies de langostinos mexicanos con DLA, se mantiene como un grupo compacto genéticamente cerrado al que se incluye únicamente la especie *M. borelli* de Brasil.

La aparición del DLA en diferentes ramas de la filogenia, quizás, no ha sido analizada filogenéticamente en el contexto de determinar: a) si ha aparecido en un mismo tiempo geológico, es decir, como un pulso de invasión único o en varios pulsos a través del tiempo; b) si es un pulso de invasión ocurrido en un tiempo determinado ¿como aparece en los diferentes regiones geográficas? c) si tiene un origen diferente al DLE o si uno de ellos deriva del otro. En contraste con estas ideas, algunos autores han propuesto un origen mas reciente, en el Mioceno, para

la mayor radiación del género (Murphy y Austin, 2005) y para el origen del DLA el Postmioceno o Plioceno (Shokita, 1979a; Villalobos, 1982; Magalhaes y Walter, 1988; Mashiko, 1992).

Nuestros resultados permiten aceptar la hipótesis alternativa planteada, ya que en el contexto local, las especies mexicanas con DLA están más estrechamente relacionadas entre ellas que con las especies con DEL, por tal razón en la reconstrucción filogenética aparecen todas agrupadas en una de las ramas del clado, evidenciando un sólo pulso de invasión al medio dulceacuícola. En el contexto de la filogenia mundial las especies mexicanas de *Macrobrachium* con DLA (asi como poblaciones con DLA indeterminadas taxonómicamente) siguen manteniendo una estrecha relación genética y siguen ubicándose, juntas, en solo una ramas de la filogenia. No obstante las especies con DLA del mundo, varias de ellas, están más emparentadas con especies con DLE, al parecer siguiendo un patrón de distribución geográfica, por tanto las especies con DLA aparecen indistintamente en las ramas de varios clados del grafo, probablemente como resultado de varios pulsos de invasión al medio dulceacuícola.

Grupo *Olfersii*.

En este estudio, en base a secuencias de ADN, las especies del “Grupo *Olfersii*” se mantienen agrupadas en una rama del árbol, similar a lo propuesto por Villalobos (1967a) en su estudio morfológico. El grupo en general presenta una variación genética inferior al 2%. Para *M. digueti*, *M. michoacanus* y *M. acanthochirus* las secuencias obtenidas fueron idénticas. Haciendo una rápida referencia a la descripción de estas especies tenemos que Bouvier en 1895 describe a *Macrobrachium digueti* de la localidad de Mulegé, en Baja California Sur, posteriormente Villalobos-Figueroa en 1967, describe a *M. acanthochirus* a partir de muestras provenientes de Tecomán, Colima y otra del Río Valdeflores en Oaxaca y Nates y Villalobos en 1990 realiza lo mismo para *M. michoacanus* con ejemplares del río Mexcalhuacán en Michoacán. Sin embargo las tres especies son similares morfológicamente y prácticamente infidenciabiles, las dos primeras.

Hernández *et al.* (2007) abordaron en extenso el tema detallando la dificultad morfológica con la que Villalobos (1967b) describió a *M. acanthochirus*. Estos autores dan evidencia morfométrica para proponer que *M. digueti* y *M. acanthochirus* son una misma especie y proponen su sinonimización.

En este estudio genético se realizó la comparación de las secuencias moleculares de un fragmento de 16S rRNA de diferentes ejemplares de las especies mexicanas, importante de destacar es que en el análisis se incluyen secuencias de ejemplares de la serie tipo de *M. acanthochirus* y *M. michoacanus* y ejemplares de Muleje (cerca de la localidad tipo de *M. digueti*) (La serie tipo de esta especie está depositada en el Museo de Historia Natural de París). Los resultados indican una similitud genética del 100% entre las secuencias de las tres especies, dando evidencia genética que apoya la sinonimización propuesta por Villalobos (1967b) y Hernández *et al.* (2007). En este estudio ampliamos la problemática taxonómica, incluyendo a *M. michoacanus*, aún cuando Nates y Villalobos (1990) y Hernández *et al.* (2007) son capaces de diferenciarla morfológicamente de *M. digueti*. Genéticamente, en este estudio se determinó un solo haplotipo para el gen 16S rRNA en las tres especies en discusión.

Según las observaciones hechas por Villalobos-Hiriart (com. pers.), en las localidades compartidas por la ocupación de *M. michoacanus* y *M. acanthochirus* no se tiene registros de coexistencia de ambas especies en una misma temporada anual, por tal razón la presencia de una u otra forma parece ser estacional, siendo influenciado directamente por la variación en las condiciones ambientales locales como el nivel de agua en los ríos, la temperatura del agua, la disponibilidad de alimento, la rapidez de las corrientes, la composición del sedimento, la concentración de los solutos en suspensión, la fauna acompañante competitiva y el tipo de vegetación entre otros, lo que permite pensar que *M. michoacanus* y *M. acanthochirus* sean dos morfotipos de una misma especie adaptados a condiciones medioambientales.

Una situación semejante se puede apreciar con *M. olfersii* y *M. hobbsi*, de las que se tampoco se tiene registros de abundante coexistencia en un mismo periodo estacional y los resultados genéticos obtenidos no definen haplotipos que diferencien a una de otra especie más bien entre ellos hay un 99% de similitud genética. Del complejo *M. olfersii* – *M. hobbsi* tenemos la experiencia, en el (Laboratorio de Carcinología del IBUNAM), de haber observado como ejemplares machos de *M. olfersii*, en una etapa de su desarrollo, modificaban sus lisas y alargadas quelas en las robustas y ornamentadas quelas, características de *M. olfersii*, dando pie a pensar que para llegar a la compleja ornamentación de las quelas de *M. olfersii*, (morfología que le dan la especificidad), hay etapas de crecimiento y desarrollo corporal que pueden llevar a la identificación errónea de estos morfos. Considerando entonces que ambas especies presentan un cierto grado de variabilidad en su morfo, que son especies de distribución anfiamericanas y la similitud genética encontrada se plantea la incertidumbre en su clasificación. Estos resultados plantean la necesidad de hacer estudios de genética de poblaciones, análisis moleculares con otros marcadores (genes codificantes como el Citocromo oxidasa I o genes de la región control o D-Loop), estudios morfológicos y de ultraestructura, por ejemplo del apéndice masculino (Acuña, 2002).

En el contexto de la reconstrucción filogenética global, el “Grupo Olfersii” originalmente propuesto por Villalobos (1967a), más las especies que posteriormente fueron atribuidas a éste, genéticamente aparecen conformando un clado único y estrechamente cerrado confirmado que es un grupo biológico natural y un grupo genético natural.

Especies geminadas.

La relación genética entre los pares de especies geminadas es claramente representada en los análisis filogenéticos realizados con los diferentes métodos, tanto para los análisis específicos en los que se incluyeron secuencias de genes

16s rRNA y COI como en el contexto general incluyendo la totalidad de las poblaciones y especies.

Es interesante indicar que los marcadores moleculares utilizados en este estudio permiten separar, en mayor o menor medida, la divergencia entre los pares de especies geminadas, aún cuando la separación morfológica de los especímenes de ambas especies es difícil de lograr sin conocer su lugar de procedencia. Por ejemplo, los ejemplares de las especies *M. acanthurus* – *M. tenellum* son extremadamente similares morfológicamente, con dificultad pueden diferenciarse por su rostro y segundos pereiópodos. Aun cuando intraespecíficamente estas especies, particularmente *M. acanthurus*, presenta un alto grado de variación morfológica dependiendo de la ubicación geográfica (Villalobos, 1982; Villalobos y Álvarez, 1999; Román *et al.*, 2000). Genéticamente *M. acanthurus* y *M. tenellum* presentan una notable variación genética (8%) entre ellas, una diferenciación genética similar en especies tan conservadas morfológicamente también ha sido determinada para camarones peneidos (Palumbi y Benzie, 1991).

Dos resultados relevantes a destacar de este estudio, es que los ejemplares de *M. acanthurus* de centroamerica presentan un haplotipo marcadamente diferente a los característicos de México, permitiendo suponer una evolución geográfica independiente dentro de esta especie. Otro punto importante es que la amplia divergencia genética entre *M. acanthurus* y *M. tenellum* ha permitido que haya especies más cercanas genéticamente a *M. acanthurus* que su propio par geminado, así como *M. yelski*, *M. amazonicum* y un par de potenciales nuevas especies mexicanas aparecen compartiendo el clado de las geminadas *M. acanthurus* – *M. tenellum*. Este clado tiene buen soporte estadístico las cuatro especies son consistentes al momento de realizar las reconstrucciones filogenéticas, en conjunto parecen ser un complejo de especies con DLE de antiguo origen en el género.

En el caso del par geminado *M. occidentale* – *M. heterochirus* los ejemplares de estas especies pueden ser diferenciados morfológicamente por que en *M. occidentale* el 2° pereiópodo mayor es más robusto y la proporción relativa de los artejos de dicho apéndice en ambas especies son casi idénticos (Holthuis, 1952). Genéticamente este par de especies es claramente divergente.

M. carcinus y *M. americanum* son el tercer par de especies del tipo geminadas, la primera se distribuye de Florida a Brasil y la segunda tiene su localidad tipo en Guatemala y se distribuye a través de la vertiente pacífica. Este par geminado es el que presenta la mayor similitud morfológica, su correcta identificación depende verdaderamente de su lugar de colecta (por ello también se conocen como especies geográficas, dependiendo de donde provengan recibirán su identificación específica). Como resultado de este estudio es interesante destacar que genéticamente también presentan un alto grado de similitud, incluso los ejemplares de *M. carcinus* colectados en Venezuela y Costa Rica y la secuencia de Puerto Rico (tomada del Gen Bank) se agrupan con un 99% a 100% de similitud con los ejemplares de *M. americanum* de diferentes localidades de México. Considerando a este par de especies geminadas una consecuencia transistmicos y cabe suponer que después del cierre del Istmo de Panamá, *M. carcinus* mantuviera una *distribución* a través de la vertiente atlántica y *M. americanum* a través de la vertiente pacífica. Sin embargo la contradicción, de las formas centroamericanas permite especular que la presencia de *M. americanum* en la Vertiente atlántica se deba: (1) A ser una especie anfiamericana de reciente divergencia que no ha tenido tiempo suficiente para evolucionar en forma independiente, (2) Que las condiciones del borde costero Atlántico de Centroamérica haya favorecido el desarrollo de *M. americanum*, (3) Que durante el proceso de cierre definitivo del Istmo centroamericano, las formas se hayan mezclado y cruzado; las del Atlántico norte hayan pasado al Pacífico centro y sur y las de Pacífico hayan pasado a las costas del caribe y Atlántico Sur y que en esta zona se haya adaptado mejor *M. americanum*, (4) Que por el proceso que haya sido, las dos formas estén presentes en ambas vertientes, en centro y sur

América, y que no haya sido documentado antes por la falta de estudios genéticos que incluyan un muestreo sistemático y representativo de estas regiones.

De los resultados obtenidos podemos concluir que al menos tres importantes eventos se relacionan con la diversificación de las especies mexicanas del género *Macrobrachium*: (1) presentan una clara separación de las especies de langostinos con desarrollo abreviado de las que presentan desarrollo extendido, (probablemente debido a la invasión generalizada de los hábitats dulceacuícolas que originaron el stock ancestral de especies con DLA desde donde surgen las cinco especies reconocidas hoy y las potenciales por determinar), (2) dentro del clado con DLE el "Grupo Olfersii" está conformado por especies altamente adaptables. Dos de sus especies con marcada distribución anfiamericana. Es un complejo natural de especies que surge con moderada variabilidad morfológica y relativamente baja variación genética. La diferenciación de algunas especies de grupo no está completamente entendida. Y su diversificación se debe haber visto favorecida por la formación del Istmo de Tehuantepec y la propia conformación del territorio mexicano (3) Entre las especies con DLE, algunas presentan una amplia de distribución en ambos lados del continente, las que por algún evento geológico como la formación de América central y el proceso de cierre del formación del istmo de Panamá dieron origen a especies geminadas.

CAPITULO III

Determinación de la época del desarrollo abreviado en el género *Macrobrachium* con base en secuencias de DNA mitocondrial.

En este capítulo se proporcionan estimaciones puntuales, de la edad de los principales clados de la subfamilia Palaemoninae y particularmente los estimados puntuales de la edad de divergencia del clado de especies mexicanas de *Macrobrachium* con desarrollo larvario abreviado (DLA) y del que incluye a las especies con desarrollo larvario extendido (DLE). También se da fecha al tiempo de divergencia de las especies mexicanas de *Macrobrachium* que se encuentran geminadas por la masa continental. A partir de secuencias moleculares de un fragmento de 380 pb del gen 16S rRNA se construyó, bajo el criterio de máxima verosimilitud, la filogenia de la subfamilia Palaemoninae incluye: 28 especies de siete géneros más nueve poblaciones de *Macrobrachium* sin determinación taxonómica. La reconstrucción obtenida no pasó la prueba de reloj molecular, por tanto estimamos la edad de los clados con verosimilitud penalizada, incorporando datos fósiles e información cronológica independiente como puntos de calibración. Los datos fósiles correspondieron a las especies: *Palaemon antonellae* (99 – 112 Ma); *Alburria paktinensis* (99 – 112 Ma) y los eventos geológicos considerados fueron, la virtual Línea de Huxley's que delimita biogeográficamente las poblaciones (haplotipos) de *M. rosenbergii* provenientes de islas asiáticas de las que vienen de Oceanía. El significado filogenético de la división observada entre los haplotipos del este y del oeste de la Línea de Huxley's indica que la coalescencia entre estos dos clados fue originado a mediados del Mioceno (5.3 -11.7 Ma). De igual forma incorporamos la edad de formación del Istmo Centroamericano, para el cual se estima haber iniciado su formación hace (11.8 – 12.9 MA) y su cierre definitivo hace (3.1 – 3.5 Ma).

Las edades estimadas variaron discretamente utilizando las edades de los fósiles y la de los eventos geológicos, en forma independiente cada uno de ellos, lo que brinda confianza en las edades inferidas. Los resultados obtenidos se discuten

con los resultados de otros estudios para la diversificación basal de la subfamilia y en base a la orografía del territorio mexicano.

La subfamilia Palaemoninae esta conformada por lo menos por 20 géneros, de los cuales 13 se encuentran en América: *Braquiocharpus* (Bate 1988); *Bythinops* Holthuis 1973 (y subgénero *Cryphiops*); *Creaseria* Holthuis 1950a; *Cryphiops* Dana 1852 (y subgénero *Cryphiops*); *Leander* Desmarest, 1849; *Macrobrachium* Bate 1868; *Nematopalaemon* Holthuis 1950; *Neopalaemon* Hobbs 1973a; *Palaemon* Weber 1795 (y subgéneros *Palaemon* y *Palaeander*); *Palaemonetes* Heller 1869 (y subgénero *Palaemonetes*); *Pseudopalaemon* Sollaud 1911; *Troglocubanus* Holthuis 1949; *Troglomexicanus* Villalobos y Álvarez, 1999; (Holthuis, 1952; Holthuis, 1993; Villalobos *et al.*, 1993; De Melo, 2003). Sin lugar a dudas el género *Macrobrachium* es el más relevante de la subfamilia, debido al elevado número de especies y a la amplia distribución geográfica de estas (Villalobos, 1982). Bajo la denominación genérica de *Macrobrachium* se conocen alrededor de 240 especies en el mundo (Holthuis, 1950; 1952; Chace and Bruce, 1993; Jayachandran, 2001; Short, 2004), las que tienen una distribución pantropical en África, Asia, Oceanía y en Norte, Centro y Sudamérica donde se ubican en una amplia variedad de ambientes como: estuarios, lagunas costeras, lagos, ríos, cenotes, cavernas, cañadas, manantiales y arroyos de montaña (Chace y Bruce, 1993; Villalobos, 1982; Villalobos y Álvarez, 1999; Acuña, 2002; De Melo, 2003; Jayachandran, 2001; Murphy y Austin, 2005).

Las especies del género *Macrobrachium* presentan una forma muy conservada, sin embargo, ecológicamente, pueden dividirse en dos grupos conspicuamente diferentes: el primero se caracteriza por presentar desarrollo larvario extendido (DEL) con 10 a 12 estadios de desarrollo larvario, y esta integrado por el 75% de las especies del mundo. El segundo grupo está conformado por especies que presentan desarrollo larvario abreviado (DLA) con máximo tres estadios de desarrollo larvario (Jalihal *et al.*, 1993)

Los primeros estudios sistemáticos del género *Macrobrachium* fueron realizados por Holthuis (1950; 1952) y Villalobos (1967a). En las últimas tres décadas ha surgido el interés por estudiar la diversidad de las especies de *Macrobrachium*, así como el de establecer la monofilia regional del género en los diferentes continentes (Pereira, 1989; 1995; Pereira y García, 1995; Short, 2001; 2004; Hernández *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). Por los resultados obtenidos ha sido necesario reevaluar las clasificaciones morfológicas tradicionales, principalmente de los géneros; *Palaemonetes*, *Palaemon* y *Macrobrachium*, incorporando reconstrucciones filogenéticas a partir de datos moleculares (Short, 2000; 2004; Murphy y Austin, 2002; 2003; 2004; 2005; Walker y Poore, 2003; Liu *et al.*, 2007).

El primer intento por establecer una filogenia molecular y determinar tiempos de divergencia evolutiva para crustáceos decápodos es el estudio de Porter *et al.* (2005), en el que los autores incluyen la mayoría de los infraórdenes de decápoda y utilizaron las edades de siete fósiles, como puntos de calibración. No hay trabajos de fechación específicos para *Macrobrachium*, sin embargo hay autores que consideran el origen del grupo a partir de un ancestro marino similar a *Palaemon intermedius* (antes *Macrobrachium intermedium*), como la especie precursora de las actuales especies dulceacuícolas de *Macrobrachium*. Otros han considerado la característica reproductiva del desarrollo larval para proponer fechas de divergencia, es así como hay quienes consideran el DLA como una peculiaridad antigua del grupo ocurrida en el período Cretácico y de la cual se deriva el DLE (Pereira, 1989). Para otros autores en cambio, el DLA es un suceso reciente de intrusión al medio dulceacuícola desde el Oligoceno o Mioceno (Short, 2000; Villalobos, 1982).

Para la familia Palaemonidae se cuenta con al menos tres registros fósiles: *Palaemon antonellae* (112 – 99 Ma) (Garassino y Bravi, 2003); *Alburria paktinensis* (112 – 99 Ma) (Garassino y Bravi, 2003) y el fósil de reciente hallazgo *Bechleja rostrata* (54 – 38 Ma) (Feldman *et al.*, 1981) el cual ha sido catalogado

como un nuevo género para la familia. Además existen eventos biogeográficos y geológicos importantes que tienen una estrecha relación con los procesos de diferenciación o especiación del grupo, como sucede con los haplotipos mitocondriales de *Macrobrachium rosenbergii* o camarón malayo (especie exótica, comercial, introducida en América desde Asia). Dentro de la filogenia del género *Macrobrachium* es claramente distinguible el clado conformado por los haplotipos de la especie *M. rosenbergii*, donde por un lado del clado se concentran los haplotipos provenientes de las poblaciones que se distribuyen en las islas asiáticas y en el otro los que provienen de las islas de Oceanía. Esta diferenciación está delimitada biogeográficamente por la “Línea de Huxley”, que separa ambas masas continentales, Asia y Oceanía. Esta línea virtual, al igual que lo es la “Línea de Wallace” son un concepto clasificatorio que marca un límite biogeográfico muy preciso capaz de separar las regiones florísticas y faunísticas entre Asia y Oceanía. La fauna, y en menor medida la flora son notablemente distintas a cada lado de las Líneas de Wallace y de Huxley, pese a la proximidad geográfica y la relativa similitud climática, reflejando historias evolutivas separadas. Una observación superficial y contemporánea las hacen parecer imaginarias, sin embargo se corresponden con un importante límite físico, la Fosa de Wallace, extendida sima submarina producida por subducción cerca del límite entre las placas tectónicas de Australasia y la de Eurasia. El significado filogenético de la división observado entre los haplotipos de *M. rosenbergii* del este y del oeste de la Línea de Huxley’s indica que la separación de estos dos clados fue probablemente originada a mediados del Mioceno (11.7 – 5.3 Ma).

El otro evento geológico continuamente utilizado para estimar tasas de evolución molecular entre especies geminadas es el Istmo de Panamá. Se ha determinado que este puente centroamericano comenzó a formarse hace (12.9 – 11.8 Ma) (Coates *et al.*, 1992) con un cierre definitivo aproximadamente (3.5 – 3.1 Ma) (Coates *et al.*, 1992) generando una barrera geográfica entre lo que fue un amplio ambiente marino neotropical (Coates y Obando, 1996). Si bien es cierto las

especies geminadas, hermanas, transísmicas o geográficas (como se les ha llamado a las especies morfológicamente similares) y que han quedado separadas por la masa continental entre el actual Mar del Caribe y el Pacífico Este, son una importante herramienta para estimar tasas y patrones de evolución molecular. No obstante, en muchos grupos acuáticos se debe tener cuidado de adjudicar el tiempo de clausura del Istmo de Panamá como el principal o único evento de término del flujo génico entre las poblaciones de especies geográficamente separadas. Recientes estudios moleculares, con puntos de calibración fósil, han revelado errónea la suposición de que pares de especies geminadas divergieron al mismo tiempo que sucedió la clausura final del Istmo centroamericano (Knowlton *et al.*, 1993).

Porter *et al.* (1995) publicaron la primera filogenia molecular que incluye representantes de casi todos los infraórdenes de Crustacea. En este trabajo se fecha la aparición de los principales grupos de crustáceos a partir del registro fósil. Las fechas de los fósiles fueron utilizadas como puntos de calibración de diferentes formas, dependiendo del método de análisis utilizado (asumiendo o no el supuesto de reloj molecular). Según este estudio, la superfamilia Palaemonoidea divergió durante el periodo Cretácico.

La hipótesis de reloj molecular asume que los cambios en el material genético se acumulan a una tasa constante en el tiempo (Zuckerlandl y Pauling, 1965). Sin embargo la mayoría de los linajes de los cuales se ha obtenido su filograma presentan violaciones a esta hipótesis (Soltis *et al.*, 2002). Una de las principales explicaciones a estas desviaciones es que entre linajes se pueden presentar diferencias en el tiempo generacional (Mooers y Harvey, 1994; Bromhan *et al.*, 1996) o diferencias en la riqueza de especies (Barracough y Savolainen, 2001), las que interfieren en la estimación de la tasa de cambio molecular. Estudios recientes en plantas, muestran que dentro de un mismo linaje la tasa de divergencia molecular es heterogénea tanto entre genes como en las posiciones del codón (Magallón y Sanderson, 2005). Por otra parte se ha

considerado que las edades asignadas a los puntos de calibración influyen en las edades estimadas a través del árbol (Soltis *et al.*, 2000, Near *et al.*, 2004) y también se sabe que los errores en las estimaciones filogenéticas aumentan la incertidumbre en las estimaciones de las edades (Sanderson y Doyle, 2001). Sea cual fuere la fuente de error que pueda presentarse en la estimación de edades, este es inherente, dificultando la estimación de tiempos de divergencia, por tal razón es recomendable utilizar estrategias de muestreo de taxones que den un marco teórico al grupo que se quiere fechar así como también es recomendable usar una combinación de genes, en función de disminuir la magnitud del error (Sanderson y Doyle, 2001).

Una alternativa para aminorar el error en las estimaciones de edades es el desarrollo de métodos que no se restringen al supuesto de reloj molecular (e.g., Sanderson, 1997; Thorne *et al.*, 1998; Yoder y Yang, 2000; Aris-Brosou y Yang, 2002; Sanderson, 2002). Entre estos métodos, quizás el de Verosimilitud Penalizada (Sanderson, 2002) sea el más utilizado, ya que además de tener la ventaja de permitir la calibración del reloj con información cronológica independiente, es un método semiparamétrico que combina un modelo que estima la tasa de sustitución de cada rama en una filogenia con una penalización numérica que impide cambios repentinos en las tasas de sustitución en las ramas de la reconstrucción filogenética, ya que está basado en el principio de autocorrelación temporal (Gillespie, 1991).

En este estudio se estimaron las edades de los principales nodos de la filogenia molecular de las especies mexicanas del género *Macrobrachium* (obtenida mediante máxima verosimilitud) con ayuda del programa r8s que contiene verosimilitud penalizada. Utilizamos el criterio de reloj molecular y como puntos de calibración las edades (mayor y menor) del fósil más antiguo y la edad estimada para el cierre del Istmo de Panamá, además de la formación de la Línea de Huxley. Como ninguno de los ejercicios anteriores pasó la prueba de reloj molecular, estimamos la edad de los principales nodos, utilizando el método de

Verosimilitud Penalizada y la calibración puntual del fósil más antiguo, *Palaemon antonellae* (112 – 99 Ma) (Garassino y Bravi, 2003).

De esta forma se ofrecen las primeras estimaciones e hipótesis con base en observaciones de distribución geográfica y geológica de los tiempos de origen del desarrollo abreviado en las especies mexicanas de *Macrobrachium*, los tiempos de diversificación del grupo y de la divergencia de las especies de *Macrobrachium* que hoy conocemos como geminadas en las vertientes atlántica y pacífica.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

Para construir la filogenia molecular sobre la que se fecharon los diferentes eventos de divergencia evolutiva se consideraron 44 secuencias nucleotídicas de un segmento de 380 pb del gen mitocondrial 16S rRNA. Estas secuencias incluyen ejemplares de 28 especies que representan siete géneros de palaemónidos. La finalidad de incluir otros géneros de la subfamilia fue dar contexto a la fechación del desarrollo larvario abreviado (DLA) dentro del grupo (Tabla XV). Específicamente, del género *Macrobrachium* se incluyeron secuencias de todas las especies mexicanas, además de dos secuencias de *M. rosenbergii*; una de Australia y otra de Tailandia y secuencias de 9 potenciales nuevas especies de *Macrobrachium* mexicanos. Como grupos externos se incorporaron las secuencias de las especies *Lysmata wundermani* (acceso GenBank DQ 09719) y *Paraty australiensis* (acceso GenBank AF 374469) (Tabla XV).

Tabla XV. Especies y ejemplares de palemonidos empleados en el análisis de fechación a partir de secuencias mitocondriales de un fragmento del gen 16S rRNA.

Especie / Población	Localidad	Tipo de desarrollo	Ingreso GenBank
<i>Paratya australiensis</i>	Australia		AF 374469
<i>Lysmata wurdemanni</i>			DQ 09719
<i>Troglomexicanus tamaulipensis</i>	Tamaulipas, México	DLA	
<i>Pseudopalaemon chryseus</i>	Brasil	DLA	
<i>Cryphyops luscus</i>	Chiapas, México	DLA	
<i>Cryphyops caementarius</i>		DLC	DQ 079711
<i>Creaseria morleyi</i>	Yucatán, México	DLA	
<i>Palaemon intermedius</i>	Australia	DLE	AF 439516
<i>Palaemon serenus</i>	Australia	DLE	AF 439518
<i>Palaemon northropi</i>	Ubutumirin, Brasil	DLE	
<i>Palaemon longirostris</i>	España	DLE	AJ 640125
<i>Palaemonetes australis</i>	Australia	DLE	AF 439517
<i>Palaemonetes atrinubes</i>	Australia	DLE	AF 439520
<i>Palaemonetes kadiakensis</i>	Coahuila, México	DLA	
<i>Palaemonetes ritteri</i>	México	DLE	
<i>Macrobrachium acanthurus</i>	Veracruz, México	DLE	KF 383300
<i>Macrobrachium acanthochirus</i>	Jalisco, México	DLA	KF 383299
<i>Macrobrachium acherontium</i>	Oaxaca, México	DLE	KF 383301
<i>Macrobrachium americanum</i>	Jalisco, México	DLE	KF 383302
<i>Macrobrachium carcinus</i>	Veracruz, México	DLE	KF 383303
<i>Macrobrachium digueti</i>	Veracruz, México	DLE	KF 383304
<i>Macrobrachium heterochirus</i>	Veracruz, México	DLE	KF 383305
<i>Macrobrachium hobbsi</i>	Chiapas, México	DLE	KF 383306
<i>Macrobrachium michoacanus</i>	Michoacán, México	DLE	KF 383307
<i>Macrobrachium occidentale</i>	Jalisco, México	DLE	KF 383308
<i>Macrobrachium olfersii</i>	Jalisco, México	DLE	KF 383309
<i>Macrobrachium tenellum</i>	Chamela, México	DLE	KF 383310
<i>Macrobrachium totonacum</i>	Oaxaca, México	DLA	KF 383311
<i>Macrobrachium tuxtlaense</i>	Veracruz, México	DLA	KF 383312
<i>Macrobrachium vicconi</i>	Chiapas, México	DLA	KF 383313
<i>Macrobrachium villalobosi</i>	Oaxaca, México.	DLA	KF 383314
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Tailandia	DLE	AY 203908
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Australia	DLE	AY 203916
<i>Macrobrachium sp. 8</i>	Veracruz	DLE	
<i>Macrobrachium sp. 14</i>	Quintana Roo	DLE	
<i>Macrobrachium sp. 20</i>	Ixtacomitan, Chiapas	DLA	
<i>Macrobrachium sp. 23</i>	Palenque, Chiapas	DLA	
<i>Macrobrachium sp. 33</i>	Veracruz	DLA	
<i>Macrobrachium sp. 36</i>	Veracruz	DLA	
<i>Macrobrachium sp. 39</i>	Reforma, Chiapas	DLA	
<i>Macrobrachium sp. 44</i>	Benemérito de las Americas, Chiapas	DLA	
<i>Macrobrachium sp. 46</i>	Ocosingo, Chiapas	DLA	

DLA = Desarrollo larvario abreviado, DLE = Desarrollo Larvario extendido

Análisis filogenético.

Las secuencias fueron alineadas con el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), mejorando manualmente el alineamiento con el programa BIOEDIT (Hall, 1997-2001). El modelo de evolución de mejor ajuste a los datos fue determinado con el criterio de información de Akaike (Akaike, 1973) mediante MODELTEST v3.04 (Posada y Crandall, 1998). Para estimar las topologías y largo óptimo de las ramas se utilizó el criterio de Máxima Verosimilitud con 100 réplicas al azar. La robustez de la topología fue asignada con Bootstrap no paramétrico (BP; Felsenstein, 1985) con 500 réplicas. En ambos casos se hizo una búsqueda heurística con TBR en el programa PAUP *4.0 (Swofford, 1998).

Calibración fósil y fechas independientes.

Las edades fósiles con las que se calibra una filogenia constituyen una información independiente del parámetro tiempo y consiste en asignar una edad absoluta a un nodo para convertir los tiempos de divergencia relativos en unidades absolutas de tiempo (millones de años). En este estudio se utilizaron las edades puntuales (mayor y menor) de los tres fósiles registrados para la familia palaemonidae; *Palaemon antonellae* (112 – 99 Ma); *Alburria paktinensis* (112 – 99 Ma) y *Bechleja rostrata* (50 – 40 Ma). Además se consideraron las edades puntuales estimadas para la coalescencia entre los haplotipos de *M. rosenbergii* que proviene del este y del oeste de la Línea de Huxley asumidas a mediados del Mioceno (11.7- 5.3 Ma) y de la formación y cierre definitivo del Istmo de Panamá (12.9 – 11.8 Ma y 3.5 - 3.1 Ma respectivamente), asumiendo esta última como la causa del cese de flujo génico entre las especies mexicanas geminadas de *Macrobrachium*. Estos dos puntos de calibración geológicos fueron sometidos a prueba mediante la fechación con el registro fósil. Con estos datos se realizaron varios análisis de fechación alternando la posición del punto fijo en la calibración.

Fechación.

Sobre la reconstrucción filogenética obtenida, mediante Máxima Verosimilitud, se realizó una prueba de constancia de tasa de cambio molecular, utilizando el método de Langley – Fitch (1974), implementado en el programa r8s (Sanderson, 2002a). Esta prueba compara la longitud de las ramas del árbol filogenético con las longitudes obtenidas al forzar la constancia de tasas. Si las diferencias entre ambas son estadísticamente significativas, se rechaza la hipótesis nula de constancia de tasas. Este ejercicio se repitió para los diferentes puntos de calibración.

Posteriormente se realizó una validación cruzada para determinar el parámetro de heterogeneidad que establece la transición entre la tasa de sustitución del antecesor y la del descendiente. Obtenido este parámetro, se utilizó un análisis de verosimilitud penalizada con el algoritmo TN (Sanderson, 2002b). Cuando el punto de calibración fue la edad (mayor y menor) de los fósiles, indirectamente, se sometió a prueba la edad de divergencia asumida como simultánea a la “Línea de Huxley” y a la de formación y cierre del Istmo de Panamá, comparando estas con la edad puntual estimada, con la calibración fósil, para el nodo formado por los haplotipos de *M. rosenbergii* y la edad puntual estimada para los nodos formados por las especies geminadas respectivamente.

RESULTADOS.

Análisis filogenético.

Con la matriz de secuencias obtenida se realizó el análisis de Máxima Verosimilitud, del cual se obtuvo solo una reconstrucción filogenética, la que resuelve todas las ramas del árbol excepto la tricotomía del clado conformado por

las secuencias de las especies *M. acherontium*, *M. digueti* y *M. michoacanus*, por ser éstas 100% idénticas.

Con la nueva matriz de 42 secuencias, incluidos los dos grupos externos, se alinearon 448 caracteres de los de cuales 232 fueron constantes, 62 variables y 178 parsimoniosamente informativos. El modelo de mejor ajuste evolutivo, obtenido con el criterio de AIC, fue el GTR+G+I donde la frecuencia de cada nucleótido en la matriz de datos (A = 0.3350; C = .0804; G = 0.197; T = 0.388) es variable y considera las tasas de cambio reversible, este modelo incluye una proporción de sitios invariables (I) igual a 2994.

El cladograma resultante presenta una primera dicotomía que separa a *Creaseria morleyi* del clado conformado por todas las otras secuencias. Este gran clado, está subdividido en la rama que incluye las especies de los géneros *Palemon* y *Palemonetes*, en un extremo y a las especies de *Macrobrachium* y *Troglomexicanus tamaulipenis*, en el otro. las especies de *Macrobrachium*, se separan en dos grupos definidos; el de las especies con DLA y el de las especies con DLE, clados en los que han quedado inmersas las especies de los géneros *Chryphyops* y *Pseudopalaemon* (Fig. 11).

Fechación.

Ninguno de los ensayos, con los diferentes puntos de calibración, paso la prueba de constancia de tasas de Langley-Fitch ($\chi^2 = 739.9933$; $gl = 40$ $\times = 2.062 \times 10^{-128}$), lo que indica que las tasas de cambio no son constante y varían entre las diferentes ramas. En la tabla XVI se presentan los estimados puntuales derivados de los puntos de calibración particular, tanto con el supuesto de reloj molecular (r8s) como las fechas obtenidos mediante verosimilitud penalizada. Es importante destacar que los resultados en la fechación de los diferentes nodos no vario significativamente utilizando uno u otro punto de calibración tanto fósiles como tampoco se encuentra una gran discrepancia en las fechas obtenidas empleando el supuesto de reloj molecular o al emplear verosimilitud penalizada.

Las edades de divergencia evolutiva de los haplotipos de *M. rosenbergii* y las de formación y cierre del Istmo de Panamá sometidos a prueba con el registro fósil como punto de calibración puntual, se encuentran dentro del intervalo de edades estimados para estos eventos geológicamente (Tabla XVI).

Sobre la base de la fechación hecha con la edad del fósil *Palaemon antonellae* (112 – 99 Ma) y utilizando el método de verosimilitud penalizada hemos determinado que las primeras formas de *Macrobrachium* divergen de los otros géneros de palemonidos hace 69.7 - 66.4 Ma (finales del Cretácico inicios del periodo terciario), que la divergencia entre las especies de langostinos con desarrollo larvario extendido y desarrollo larvario abreviado ocurrió hace (47,82 - 41,69 Ma Eoceno), que la diversificación de las especies mexicanas de *Macrobrachium* con desarrollo extendido ocurrió hace (33,07 – 29,55 Ma, durante el Oligoceno) y que la diversificación de las especies mexicanas con desarrollo abreviado inicio hace (9,02 – 8.71 Ma, Mioceno). En cuanto a la divergencia de las especies geminadas, se han determinado diferentes fechas para los tres pares de especies, es así como *M. tenellum* – *M. acanthurus* divergieron hace (16,11 – 16,04 Ma Mioceno); *M. heterochirus* de *M. occidentale* hace (4,98 – 4,32 Ma Plioceno) y las especies *M. carcinus* – *M. americanum* divergen hace (2,03 – 1.92 Ma en el Plioceno) Fig. 11; Tabla XVI.

Tabla XVI. Estimados puntuales derivados de puntos de calibración particular (Edad fósil) mediante el programa r8s y Verosimilitud Penalizada (VP) para los principales eventos de divergencia evolutiva en la subfamilia Palaemonidae.

Edad del Nudo	r8s Fósil		r8s Línea Huxley	r8s Línea Huxley	r8s Istmo Panamá	r8s Istmo Panamá	VP Fósil		Periodo /Epoca Geológica	
	(MA)	112 Ma	99 Ma	11,70	5,30	12,90	3,10	112 Ma		99 Ma
A		92,3	88,4	85,30	79,90	83,24	78,90	84,22	79,85	Cretácico Tardío
B		91,5	78,9					69,74	66,43	Cretácico Tardío
C		51,2	45,6	50,33	44,49	48,93	42,36	47,82	41,69	Eoceno
D		9,40	8,64	9,34	8,25	9,27	8,53	9,02	8,71	Mioceno
E		6,12	5,94	5,45	4,82	5,93	5,43	5,96	5,48	Mioceno
F		5,93	5,55					5,23	4,97	Plioceno
G		2,53	2,37					2,66	2,45	Plioceno
H		3,78	3,44					3,37	3,08	Plioceno
I		1,67	1,26					1,67	1,20	Pleistoceno
J		1,35	1,14					1,03	0,77	Pleistoceno
K		4,89	4,41	3,11	2,75	4,36	4, 12	4,52	4,07	Plioceno
L		1,97	1,81					1,85	1,51	Pleistoceno
M		4,08	3,83					3,66	3,27	Plioceno
N		3,42	2,95					3,17	2,84	Plioceno
Ñ		34,12	30,22	33,59	29,69	34,87	31,47	33,07	29,55	Oligoceno
O		25,32	22,40					22,38	19,39	Mioceno
P		23,87	21,21	22,20	19,60	23,99	22,69	20,35	17,80	Mioceno
Q		20,63	18,15					16,43	14,73	Mioceno
R		16,34	15,66	15,26	13,92	15,78	12,63	15,81	12,52	Mioceno
S		13,26	10,50					9,37	8,61	Mioceno
T		8,04	6,69					8,79	5,68	Mioceno
U		2,63	2,28					2,68	2,40	Plioceno
V		3,21	2,95					2,89	2,36	Plioceno
W		2,82	2,63	2,68	2,37	2,66	2,37	2,32	1,92	Plioceno
X		5,96	5,61	6,18	5,47	5,77	5,38	5,54	4,32	Plioceno
Y		9,49	7,11					5,87	5,42	Mioceno
Z		16,45	13,17	13,90	12,29	14,31	16,34	16,11	16,04	Mioceno
Aa		39,77	36,98					37,26	35,14	Eoceno
Bb		21,74	18,41					18,83	17,36	Mioceno
Cc		19,97	17,13					16,45	14,01	Mioceno
Dd		16,72	13,17					13,76	11,27	Mioceno
Ee		11,06	8,38	7,16	6,33	5,97	5,22	6,14	4,99	Mioceno
Ff		7,51	5,48					5,19	4,44	Plioceno
Gg		2,92	2,67					3,21	2,49	Plioceno

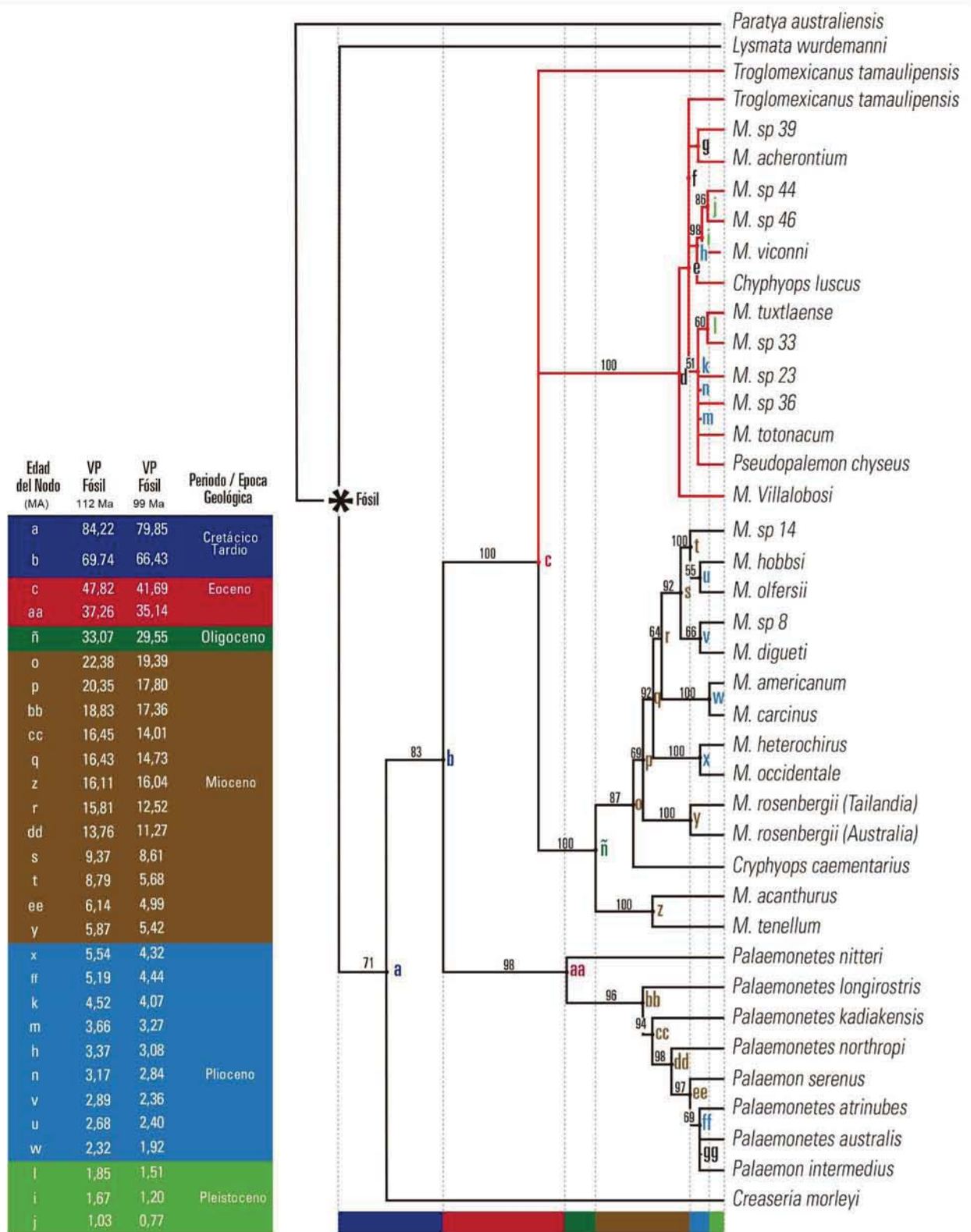


Figura 11. Cronograma de los principales eventos de divergencia evolutiva de la subfamilia Palaemonidae derivados de la calibración particular (Edad fósil), considerando la menor edad fósil de *Palaemon antonellae* (99 MA*), mediante Verosimilitud Penalizada.

DISCUSION.

Las edades de formación estimadas para los eventos geológicos sometidos a prueba son consistentes con las edades determinadas con el registro fósil. Con la finalidad de dar contexto al tiempo de evolución de *Macrobrachium*, incluimos, en el estudio, especies de otros géneros de palemónidos con ambos tipos de desarrollo larvario, entre ellas *Cryphyops luscus* y *Pseudopalemon chryseus* con DLA y *Cryphyops caementario* con DLE, las cuales contrariamente a conformar clados hermanos, como las especies de otros géneros de la familia, quedaron inmersas en los clados de especies mexicanas con DLA y DLE, respectivamente. La ubicación de estas especies en la reconstrucción filogenética pudiera entenderse si atendemos a los planteamientos de Maghalaes y Walker (1988) donde expone que el DLA pudiera ser un fenómeno de convergencia múltiple incluso mayor a lo genérico. En este caso se observa una mayor afinidad entre las especies de *Cryphyops* y *Pseudopalemon* con las especies de *Macrobrachium* lo que ya había sido descrita por Pereira (1979) en un detallado estudio morfológico de los géneros y especies de Palemónidos. Por lo tanto, esta estrecha relación de los géneros de Palaemónidos apuntaría a ser un problema de clasificación de especies, principalmente por el poco peso taxonómico de caracteres morfológicos que son dependientes de la ontogenia de las especies, etapa de desarrollo y dimorfismo sexual como ocurre con la presencia y posición de las espinas hepática y branquiostegal.

Porter y colaboradores (2005), basados en un estudio de reloj molecular utilizando marcadores mitocondriales y nucleares estimaron que el género *Creaseria* divergió de la familia Palaemonidae, en el periodo Cretácico hace unos 110 millones de años, lo que es congruente a los resultados de nuestra estimación para la divergencia de *Creaseria* hace 90 ma.

Origen del género Macrobrachium en México.

El tiempo de la divergencia estimada del género *Macrobrachium* de los otros géneros de Palaemonidos mexicanos, estimados en este estudio, es a finales del periodo Cretácico (69.7 - 66.4 Ma). Similar a la estimación de edad para la divergencia de *Macrobrachium* realizada por Porter, *et al.*, (2005) alrededor de 70 ma. No obstante hay estimaciones de quienes postulan una muy reciente separación del género de *Macrobrachium* de los otros géneros de la familia en 11 a 27 ma (Murphy y Austin, 2005; Schubart *et al.*, 2000).

En el Cretácico tuvieron lugar importantes eventos, como la separación de Norte y Sudamérica, en el margen oeste y sur del Golfo de México se encontraban algunas islas efímeras, aisladas del continente, la plataforma continental estaba cubierto por aguas someras, había intercambio de aguas entre el Mar de Thetys, que se encontraba al Sur y al este y el Golfo de México. También en este período la elevación del nivel del mar y los cambios ambientales en México aumentaron el material terrígeno y la migración de la línea costera al este. Durante todo el Cretácico la costa de Yucatán fue un área estable, en este período se produce la expansión de la cuenca del Caribe producto de la deriva de continentes, aunque los detalles del proceso y eventos que lo originaron son pobremente conocidos.

La dispersión de las primeras formas de *Macrobrachium* ocurrió en el Eoceno (47.8 - 41.69 Ma), dando origen a las actuales especies mexicanas del género. Hay estimaciones de que en ese periodo o un poco antes inicia la formación de la sierra madre occidental, que es una plataforma alargada de material volcánico del Cenozoico y la diversificación del especies con DLE ocurrió en el Oligoceno (33.07 - 29.55 Ma), cuando la formación de sierras y cuencas ocupan la parte central y norte de México y el tectonismo en los márgenes de la provincia de la Sierra madre occidental comienza. En la formación de la Sierra Madre Occidental y Oriental y del Sur, se formaron depresiones que abarcaron los estados de Oaxaca y Guerrero en las que quedan constituidas aguas superficiales

someras. La diversificación del DLA ocurre a finales del Mioceno (9.02 – 8.71 Ma) un poco antes de la formación del eje Neovolcánico, cuya importancia radica en la historia geológica de México, además de convertirse en el límite entre las regiones Neártica y Neotropical.

Origen del desarrollo abreviado en las especies de *Macrobrachium*.

En la determinación del origen del desarrollo abreviado hay una serie de opiniones contradictorias, básicamente englobadas entre los que postulan que se trata de una característica muy antigua relacionada a la formación de la familia Palaemonidae en el periodo Cretácico (Pereira, 1989; Pereira y García, 1995; Strenth, 1976) incluso se postula que es la característica ancestral de la que deriva el DLE (Pereira y García, 1995) y las que proponen que se trata de una característica reciente como resultado de una convergencia múltiple y genérica de Palaemonidae (Maghalaes y Walter, 1988; Villalobos, 1982; Short, 2000). Específicamente Short (2000) hace referencia a la elevada variabilidad genética entre las especies de *Macrobrachium* y la amplia distribución de las formas con DLA postulan que la diversificación se debió dar en un periodo de tiempo significativo, probablemente en el Oligoceno o a inicios del Mioceno coincidente a los tiempos de dispersión del grupo propuestos por Villalobos (1982). Particularmente Rabalis y Gore (1985) plantean que el DLA en *Macrobrachium* ha radiado por intrusión al medio dulceacuícola y que la selección natural ha favorecido este tipo de desarrollo en varios linajes independientes. En cuanto a esto Acuña (2002) identifica alelos isoenzimáticos especie específicos para especies mexicanas de de *Macrobrachium* con DLA, para las mismas especies (*M. new sp. 1* y *M. new sp. 2*) que en este estudio se han determinado nucleótidos específicos en los dos fragmentos génicos estudiados.

Como resultado de este estudio se ha determinado que la diversificación de las formas con DLA en México ocurre desde el Mioceno, como fue postulado por Villalobos (1982) y Short (2000). Ambos tipos de desarrollo larvario estaban presentes en el Eoceno (47.8 - 41.7 Ma) cuando *Macrobrachium* se separa de los

clados, de ambos desarrollos, que originaron las formas actuales. Las especies mexicanas con desarrollo larvario abreviado aparecen todas en un clado hermano al conformado por todas las especies nacionales con DLE, por lo que no se tiene evidencia de si un tipo de desarrollo derivó al otro. Aunque es importante destacar que nuestra fechación indica que la diversificación de las especies actuales de *Macrobrachium* con DLA de México, ocurrió a partir del Plioceno (9.02 -8.71 ma).

Especies Geminadas.

Para los tres pares de especies geminadas mexicanas del género *Macrobrachium* como para muchas otras especies, de diferentes grupos taxonómicos, que presentan un símil morfológico en ambas vertientes oceánicas americanas ha sido común atribuir su separación geográfica y divergencia evolutiva a la formación del Istmo de Panamá (Knowlton *et al.*, 1993; Sturmbaner *et al.*, 1996), sin embargo ante esto hay dos puntos relevantes a considerar: (1) hay muchos otros eventos geológico que pudieron originar la separación geográfica de especies gemelas o hermanas dentro de la conformación tectónica y orogénesis de América en general y de México y centro América en particular. Eventos que han contribuido a la amplia y exitosa distribución de especies y otros que han generado la separación geográfica y su evolución independiente. Por ejemplo: la disgregación de la Pangea, la conexión Tethyana entre el Protoatlántico y Pacífico (Knowlton y Weigt, 1998), la formación del bloque tectónica de Chortis (Iturralde Vicent y MacPhee, 1999), la separación de la Península de Baja California, la formación del Golfo de California, la historia geológica de los ríos Amazonas y Orinoco, la orogenia de la Cordillera de los Andes (Gentry, 1982), entre otros y (2) que la formación del Istmo de Panamá es un evento geológico que se inicio hace unos 12.9 - 11.8 Ma (Coates *et al.*, 1992) pero que involucra un proceso de formación, desarrollo y cierre para el cual se estima una edad de clausura definitiva hace 3.5 – 3.1 Ma (Coates *et al.*, 1992).

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas para los tres pares de especies geminadas mexicanas de *Macrobrachium* (**CAPÍTULO II**) sugieren que la

separación pudo haber ocurrido en tiempos diferentes para cada uno de ellos, quizás como resultado de eventos distintos a la formación del Istmo de Panamá. Estos supuestos son corroborados con la fechación que hemos obtenido, a partir puntos de calibración puntual del registro fósil de la especie *Palaemon antonella* (Garassino, 2003).

El tiempo de divergencia estimado entre *M. acanthurus* – *M. tenellum* fue de 16.1 – 16.0 Ma Miceno, lo que implica que su separación fue antes de la formación del Istmo de Panamá. Asumiendo que el antecesor de ambos *M. acanthurus* – *M. tenellum* tenía una amplia distribución a lo largo de la costa del bloque de Chortis, que es una placa continental actualmente comprende el centro y sur de Guatemala, además de Honduras, El Salvador y Nicaragua, probablemente estaba localizado a lo largo de la costa suroeste de México y luego migró a su posición actual al final del Cretáceo.

La diferenciación genética entre este par de especies geminadas es mayor que la diferenciación morfológica entre *M. acanthurus* y *M. tenellum*. De no ser por el alto grado de variación geográfica y certero conocimiento del lugar de procedencia de los ejemplares sería incierto determinar a especie mediante los caracteres del rostro y/o segundo par de pereiópodos, utilizados para discriminar.

De acuerdo a nuestros resultados, el segundo par de especies geminadas compuesto por *M. heterochirus* – *M. occidentale* se separaron hace 4.9 – 4.3 Ma Plioceno, una estimación claramente relacionada con el proceso gradual de formación del Istmo de Panamá, el tiempo de divergencia de estas especies es cercano al tiempo estimado para la clausura del Istmo 3.5 – 3.1 Ma. Cuando las áreas costeras estaban cubiertas de aguas someras y la fauna de foraminíferos son reconocidos como especies indicadoras (Coates *et al.*, 1992), así la separación de *M. heterochirus* – *M. occidentale* puede atribuirse a la barrera que se forma antes de la clausura definitiva del Istmo. Morfológicamente estas

especies presentan un grado de variación en el segundo pereiópodo mayor y en la proporción de los artejos de este pereiópodo.

El tercer par de especies geminadas, compuesto por *M. carcinus* – *M. americanum* se separó hace 2.0 – 1.9 Ma Plioceno. Claramente la separación de estas especies ocurrió posteriormente a la clausura definitiva del Istmo de Panamá, en un escenario que sugiere sea una consecuencia de este evento o que son otros los procesos que han influenciado para ello, tales como la adaptación a los diferentes regimenes hidrobiológicos entre ambas vertientes continentales. De los tres pares de especies geminadas de *Macrobrachium*, este es el que presenta la mayor similitud morfológicamente, su correcta identificación depende del conocimiento de su lugar de colecta.

DISCUSION GENERAL

El género *Macrobrachium*

Después del desarrollo de esta investigación puedo concluir que el género *Macrobrachium* es verdaderamente complejo. Presenta un elevado número de especies, es cosmopolita, los caracteres morfológicos en los que se basa la determinación de especies no son robustos, algunos son caracteres ontogénicos y muchas veces inducen a error en la clasificación. La variabilidad morfológica intra-específica es alta, lo que indica un alto grado de plasticidad fenotípica. Ocupan una diversidad de ambientes, todas dulceacuícolas, aunque un importante número de ellas requiere de condiciones salobres para completar el ciclo reproductivo. Hay especies completamente alejadas de la línea de costa, otras se distribuyen desde la cabecera de los ríos hasta los estuarios. Las hay epigeas (habitantes de aguas sobre el continente); hipogeas (habitantes de cuevas, cavernas y cenotes bajo tierra); hipogeos estigobióticas (que parte de su vida habitan en cuevas o cenotes); hipogeos cavernícolas (que toda su vida están asociada a la vida cavernícola) hay especies crípticas. Las hay de amplia distribución como las anfiamericanas (que están presentes en ambas vertientes oceánicas del continente americano), hay especies morfológicamente idénticas o muy similares pero separadas por barreras geográficas (por ejemplo la masa de tierra continental), son las llamadas especies gemelas que a pesar de conservar el morfotipo, son diferentes genéticamente y han evolucionado de manera independiente. En México se han descrito tres pares de especies gemelas, pero no los tres son producto del cierre del istmo de Panamá, como se creía.

El registro fósil para el género es escaso. La diversificación del género es un evento reciente y dependiente de la historia geológica del área geográfica en que se distribuyen, al menos para México. Las especies mexicanas de *Macrobrachium*, son un grupo monofilético y hay una clara separación genética

entre el grupo que presenta desarrollo larvario abreviado y las que presentan desarrollo larvario extendido. Hay complejos de especies, por ejemplo para México, el “Grupo Olfersii” que reúne especies que han ido modificando moderadamente un patrón morfológico tipo, dependiendo del área geográfica en que se distribuyen (en este caso fueron evolucionado conforme se produjo el levantamiento del istmo de Tehuantepec), las especies de este “Grupo Olfersii” presenta baja diferenciación genética y algunas especies notable variabilidad morfológica intraespecífica. Hay especies cuyos machos alfa inhiben, mediante la generación de feromonas, el desarrollo de caracteres secundarios de otros machos confundiendo con ello la clasificación taxonómica. El género tiene una relevante importancia ecológica dada las contrastantes estrategias reproductivas: por un lado desarrollo larvario abreviado (DLA) (que por las características que implica puede ser considerados como especies estrategias K) y desarrollo larvario extendido (DEL) (que por las características que implica puede ser considerados como especies estrategias r) este último lo que practican alrededor del 75% de las especies de *Macrobachium* descritas para el mundo, pero en definitiva ambas estrategias responden a perpetuar la especie en el tiempo. Importante de mencionar que al menos hay dos especies, *M. nipponense* y *M. amazonicum*, que presentan ambos tipos de desarrollo larvario, dependiente del lugar geográfico en que se ubiquen sus poblaciones (eurihalinos o alejadas de la línea de costa). Entonces ¿Cuál es el origen del desarrollo larvario abreviado? ¿La condición de DLA responde a una alternativa reproductiva por presión de selección o es una condición genética, mediante un mecanismo de activación génica que favorece a uno u otro tipo de desarrollo larvario? Si ese fuera el caso sería interesantísimo avanzar en la investigación para conocer ¿Cómo se gatilla la expresión génica, cómo funciona, cuál es el mecanismo? el resultado de esta interrogante tiene implicancia ecológica, taxonómica (el DLA podría ser un carácter absolutamente ineficiente en la sistemática del grupo), social y productiva. Sería información útil para establecer protocolos de conservación de especies y también en la geneación de pie de crias de cultivo de las especeis nativas comerciales (que naturalmente presentan DLE y no se ha avanzado mucho en las técnicas de

cultivo, básicamente en el asentamiento larval). Si es posible activar a voluntad el desarrollo larvario abreviado y el rendimiento del cultivo es el adecuado sería una interesante iniciativa productiva. Por tanto dentro de las perspectivas futuras de esta investigación se propone estudiar los genes involucrados al proceso y el mecanismo que activa el desarrollo larvario abreviado, si es que lo hubiera, de lo contrario es importante determinar si es una condición adquirida por presión de selección del medio y poder aplicarlo al cultivo de especies nativas de interés comercial.

Posición filogenética de *Palaemon*, *Palaemonetes* y *Macrobrachium*.

Los trabajos filogenéticos más recientes que incluyen filogenias moleculares en diferentes especies de *Macrobrachium* y palemónidos en general (Murphy y Austin, 2005; y Liu *et al.*, 2007), siguen considerando a *Palaemon intermedium* (antes *Macrobrachium intermedium*) como la única especie marina de *Macrobrachium*. Sin embargo Walker y Poore (2003) han dado evidencia y propuesto la sinomización de *Macrobrachium intermedium* a *Palaemon intermedium*. Murphy y Austin (2002) sostienen que *Macrobrachium intermedium* presenta una estrecha relación genética con *Palaemonetes serenus*, de igual forma hacen los resultados de Boulton y Knott (1984) y los de Murphy y Austin (2003), en los que se señala la más cercana relación genética de *M. intermedium* con *Palaemonetes australis* que con otras especies de *Macrobrachium* australianas. En nuestro estudio también se refleja la estrecha relación filogenética entre el antes *Macrobrachium intermedium* con las especies de los géneros *Palaemon* y *Palaemonetes*, ya que aparece conformando el clado de especies del grupo externo. Una forma de explicar lo anterior es considerando que los caracteres morfológicos involucrados en la determinación genérica son filogenéticamente irrelevantes y permiten poner en duda su definición taxonómica.

El género *Palaemon* se diferencia de *Palaemonetes*, de *Macrobrachium* y de otros géneros de palemónidos por la presencia y forma del surco branquiostegal, la presencia o ausencia de las espinas branquiostegal y hepática, la forma del segundo pereiópodo y la presencia o ausencia de un palpo mandibular. *Palaemon* se diferencia específicamente de *Macrobrachium* por la presencia de una espina branquiostegal y dentición en el segundo pereiópodo mientras que *Macrobrachium* presenta una espina hepática y espinuloso segundo pereiópodo en los machos de muchas de sus especies. En *Palaemon* las hembras adultas son más grandes que los machos, contrariamente a la generalidad en *Macrobrachium*. *Palaemonetes* por su parte, se diferencia de *Palaemon* solamente por la ausencia de un palpo mandibular, sin embargo parece ser que la espina hepática de *Macrobrachium* y la espina branquiostegal de *Palaemon* son un

carácter homólogo, así durante el proceso ontogénico una espina hepática puede ser una branquiostegal que cambia de posición en el caparazón durante el desarrollo de postlarva y juvenil. De esta forma, solo ejemplares adultos de ambos géneros pueden ser diferenciados por este carácter, los juveniles necesitan caracteres complementarios para su determinación taxonómica. El dudoso status de *Palaemonetes* ha sido planteado como resultado de estudios morfológicos (Chace, 1972), morfológicos y aloenzimáticos (Boulton y Knott, 1984) y moleculares (Murphy y Austin, 2003; 2005), por ello Walker y Poore (2003) hacen una nueva diagnosis de las especies australianas de *Palaemon* y proponen sinonimizar, al menos, las especies australianas de *Palaemonetes* a *Palaemon*.

Derivado de la controversia en la clasificación de *Palaemon intermedius* y de las especies más estudiadas de *Palaemon* y *Palaemonetes* australianas que Pereira (1997), Short (2000) y Murphy y Austin (2002) propusieron un origen polifilético del género *Macrobrachium*. Posteriormente la no-monofilia del género *Palaemonetes* fue propuesta por Murphy y Austin (2003) y los mismos autores en el año 2005, postulan la no-monofilia del género *Palaemon*. Sin embargo fue la contribución de Walker y Poore (2003), con un enfoque específico, quienes proponen la sinonimización de *Macrobrachium intermedium* a *Palaemon intermedius* y a proponer que algunas de las especies de *Palaemonetes* pudieran conformar un solo grupo taxonómico con las especies de *Palaemon*. Estos autores plantean la necesidad de redefinir si realmente existen especies bajo la denominación genérica de *Palaemonetes*. Con el presente estudio, se refuerza la incongruencia entre la clasificación taxonómica actual y los bajos niveles de variación genética entre las especies de los géneros *Palaemonetes* y *Palaemon* incluidas en el análisis y se deja en evidencia otras especies que también son determinadas en base a caracteres dependientes de la ontogenia como son *Chryphiops caementario*, *Chryphiops luscus*, *Pseudopalaemon chryseus*. Los resultados obtenidos confirman que los géneros *Macrobrachium* y *Palaemon* son géneros monofiléticos.

Si nos referimos a la determinación de especies crípticas dentro del género *Macrobrachium*, nuestro estudio aporta evidencia genéticas (16S rARN y COI)

para considerar a las poblaciones identificadas como *M. sp 1* y *M. sp 2* provenientes de Santiago Tuxtla, Veracruz y San Antonio Tabasco, respectivamente, como dos nuevas especies con DLA para México. *M. sp 1* y *M. sp 2* son muy parecidas morfológicamente a ejemplares de la especie *M. tuxtlaense* por ello se consideraban poblaciones de esta especie. Acuña, (2002) ya había entregado evidencia de morfología geométrica, ultraestructura del apéndice masculino, análisis de isoenzimas y citogenética que discriminar a las tres como especies diferentes, no obstante se precisaba de datos genéticos que fortalecieran. Aun teniéndolo la evidencia molecular no hay caracteres morfológicos conspicuos que logren diferenciarlas con facilidad. Es la situación en la que podremos encontrar, al final de este estudio, al menos una decena de poblaciones que son genéticamente nuevas especies de langostinos *Macrorachium* para México, pero morfológicamente difícil de clasificar.

Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares pueden ser útiles en la determinación de especies por ende aportar en la interpretación de los patrones de biodiversidad de las mismas particularmente en grupos tan amplios como *Macrobrachium*. En la literatura específica que aplica marcadores moleculares para especies de *Macrobrachium* (nueve publicaciones), algunos autores critican el uso del gen 16S rARN y buscan mejorar las resoluciones filogenéticas empleando el gen COI y/o el 28S (Chen *et al.*, 2009). Hay quienes suman genes nuclear la histona H3 (Rossi y Mantelato, 2013) sin embargo los resultados no cambian mayormente entre los genes utilizados en cada investigación ni en relación a los estudios de Murphy y Austin (2004; 2005) que fueron los primeros en emplear el gen 16S rARN. Incluso los genes en forma conjunta resuelven en forma congruente.

Misma situación se observa con los diferentes métodos de análisis filogenéticos, en términos generales las reconstrucciones siguen una tendencia similar, los mayores cambios están dados en el mejor soporte estadístico de algunas métodos. Nuestro estudio filogenético fue desarrollado básicamente con

el gen 16S rARN aun así y se lograron resultados congruentes tanto a studios moleculares como los precitados como congruentes a estudios morfológicos para las diferentes especies de *Macrobrachium*, destaco entre ellos el realizado por Pereira (1995) y Hernández *et al.*, (2007). Las relaciones filogenéticas no resueltas en las dilogenias podrían ser el resultado de una diversificación reciente y rápida del genero y no necesariamente al resultado de un mal marcador molecular.

Modelo de evolución molecular.

En cuanto al criterio del modelo de evolución que mejor ajusta a los datos para una reconstrucción filogenética el programa de Modeltest entrega el modelo de mejor ajuste evolutivo en base a dos criterios de selección, el hLRT (Hierarchical Likelihood Ratio Test) y criterio de selección de AIC (Akaike Information Criterion) ¿cuál es el mejor? Para muchos investigadores y evaluadores de revistas especializadas es obligatorio el tener que usar el criterio de AIC. Para Posada (com. pers.) no existe un método mejor que otro, depende de las propiedades de cada criterio para la selección y la decisión la toma el investigador, ya que algunas reconstrucciones filogenéticas pueden variar mucho usando diferentes modelos de evolución, resultado de uno u otro criterio. Por lo mismo son las cualidades de los datos las que indican el criterio a usar y el que la reconstrucción que se obtenga sea congruente a las clasificaciones morfológicas tradicionales, ya que las filogenias moleculares estrictamente son la reconstrucción filogenética del gen estudiado que se asume a la evolución del grupo taxonómico en estudio. En términos prácticos, el criterio de selección AIC penaliza o castiga la adición de parámetros, mientras que hLRT no lo hace, por lo que el primer método, generalmente escoge un modelo con un mejor ajuste pero con mayor número de parámetros para los cuales la base de datos debe ser capaz de sustentar la penalización.

Para las reconstrucciones filogenéticas obtenidas en nuestro estudio se ha seguido el criterio de selección de AIC. Sin embargo, para todas la

reconstrucciones logradas (con bases de datos de 15 otus y no más de 400 pb, bases de datos con 50 otus y no más de 1040 pb y bases de datos con 160 otus y 404 pb), el modelo seleccionada fue el de HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) o este modelo con parámetros adicionales como proporción de sitios invariables (I) y distribución Gamma (G). Para cuatro de las cinco reconstrucciones, el criterio de hLTR eligió el mismo modelo y en la única reconstrucción que el modelo elegido por ambos criterios fue diferente, el elegido por AIC fue el segundo mejor elegido por hHLTRs. El modelo evolutivo de mejor ajuste de datos elegido fue el de Hasegawa–Kishino–Yano, HKY y en algunos casos con sus parámetros I + G (Hasegawa *et al.*, 1985), este modelo es el mismo seleccionado para la base de datos de los trabajos de Murphy y Austin (2005); el de Liu *et al.*, (2007) y el de Chen *et al.*, (2009). Estos últimos ya incluyendo un importante número de especies de *Macrobrachium* de todos los continentes.

Filogenia molecular del género *Macrobrachium*

Basado en el fragmento del gen 16S rARN tanto para las especies mexicanas de *Macrobrachium* como para las especies del mundo, en análisis por separado, se confirma la monofilia del género *Macrobrachium*. Se encuentra una clara diferencia genética entre el clado que incluye a la totalidad de las especies mexicanas con DEL y el clado paralelo que incluye a la totalidad de las especies mexicanas con DLA. A diferencia de los estudios de filogenia molecular para especies de *Macrobrachium* de otras partes del mundo, las especies mexicanas con DLA se encuentran todas reunidas en un clado con posición basal, similar y paralelo al que integran las especies mexicanas con DEL sugiriendo que las especies mexicanas con DLA tiene un ancestro común único o son producto de un único pulso de invasión continental, el que además asido reciente y de rápida diversificación. En la reconstrucción de la filogenia mundial, las especies mexicanas con DLA se mantienen en un mismo clado.

Nuestros datos nos permiten discrepar de las conclusiones de los estudios realizados para *Macrobrachium* de otras regiones del mundo en cuanto ellos dicen que *Macrobrachium* de Asia, América Central / América del Sur, Australia e incluso algunas muestras de México infiere relaciones filogenéticas que demuestran que estas regiones geográficas contienen especies de *Macrobrachium* que no comparten un ancestro común lo que sugiere que la dispersión a gran escala ha sido una característica importante de la historia evolutiva del género. En nuestro caso las especies mexicanas indican tener un ancestro común del que divergen las especies con DLA y las con DEL, este clado tiende a mantenerse juntas en la reconstrucción mundial sin embargo el par de especies mexicanas geminadas *M. acanthurus* y *M. tenellum* tiene una distancia genética del 8% lo que permite que otras especies, más cercanas genéticamente, se intercalen, de esta forma se observa un complejo interesante conformado por *M. amazonicum*, *M. jelski* provenientes de Brasil junto a *M. tenellum* y *M. acanthurus* provenientes de México. Vale mencionar que este complejo de especies es antiguo en formación.

Por otra parte en la filogenia mundial, incluyendo poblaciones de especies mexicanas con DLA, hay una tendencia a ordenarse geográficamente, así es posible encontrar estratificado especies y/o poblaciones de especies mexicanas con DLA provenientes de los Estados de Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Chiapas, siempre arraigadas a un origen único.

En cuanto al “Grupo Olfersii” este reúne genéticamente a la totalidad de especies que lo integran morfológicamente. Por tanto se confirma como un grupo natural de especies con alta adaptación al medio ambiente, moderada variabilidad morfológica y relativamente baja variación genética. Los resultados obtenidos apoyan los planteamientos de Villalobros 1967a cuando postula el “Grupo Olfersii” como resultado del surgimiento del istmo de Tehuantepec.

Aun cuando el 16s rARN es uno de los genes más conservados (Schubart *et al.*, 2000), resuelve en la filogenia de *Macrobrachium*, particularmente la

separación entre las especies con DLA y las con DEL con una divergencia de más del 15%. De igual forma resuelve la divergencia genética entre los pares de especies geminadas (a pesar de su notable similitud morfológica), particular es el caso de *M. acanthurus* y *M. tenellum* que siendo un par geminado tiene un 8% de divergencia entre ellas.

Tamaño de huevo.

En la evolución de los crustáceos decápodos, la variación interespecífica en el tamaño del huevo es considerada como una importante peculiaridad relacionada con la duración de la embriogénesis, el desarrollo larvario, el número y tipo de estados larvales y con el tamaño de los juveniles (Jalihal *et al.*, 1993; Gonzalez, 2002). Por otra parte el tipo de desarrollo larvario varía significativamente con los cambios estacionales, en cuanto a temperatura y longitud del día, por ejemplo veranos largos versus veranos cortos hacen cambiar el tamaño de los huevos en las poblaciones del camarón *Crangon crangon* del Mar del Norte (Boddeke, 1982), en esta misma especie Kattner *et al.*, (1994) encuentran variación interanual en el tamaño de los huevos.

En especies eurialinas hay diferencias fisiológicas y genéticas entre las poblaciones que se encuentran aisladas o distribuidas en el gradiente de agua dulce, estuario agua salina, como sucede con *M. nipponense* y *Palaemon paucidens* (Mashiko y Numachi, 2000). En el caso de *M. amazonicum* que presenta una amplia distribución entre el sistema de rivera del Amazonas, desde la Costa Atlántica a más de 3400 km la diferencia observada en el tamaño de los huevos posiblemente se correlacione con la distancia de las poblaciones desde el estuario (Odinetz y Rabelo, 1996).

Origen del desarrollo larvario abreviado.

La revisión hecha por Holthuis en 1952 representa actualmente, el trabajo taxonómico más completo realizado para camarones palaemonidos. Sin embargo a más de 60 años de ese trabajo aún existen áreas geográficas del continente americano inexploradas en cuanto a su riqueza carcinológica. En la década de los 80's, carcinólogos como Kensley y Walter (1982), Rodríguez (1982) y Pereira (1985 y 1986) describieron especies importantes de *Macrobrachium* y *Palaemonetes* asociados a la cuenca del Amazonas – Orinoco y recién en el año 1999 se describe la primera especie epigea de *Macrobrachium* con DLA para México y América, para el 2004 ya se conocían cinco, durante la realización de este estudio se describieron otras cuatro y este estudio entrega evidencia genética para que se puedan describir otras seis.

También derivado de este estudio sabemos que el género *Macrobrachium* en México divergió de los otros géneros de Palaemónidos a finales del periodo Cretácico, pero que la separación entre las especies con DLA y DLE fue durante el Eoceno y que la diversificación de las formas actuales con DLE fue en el Oligoceno, primero que lo hicieran las formas con DLA en el Mioceno, pero no por ello estas últimas derivan de las anteriores. Si Pereira y García (1995) están en lo correcto y el DLA es la característica ancestral relacionada al origen de la Familia, inclusive, de la que se originó el DLE y a partir de estas reaparece el DLA habría modo de explicarlo pensando en las aguas interiores que se formaron durante el periodo Cretácico producto de la elevación del nivel del mar, favorecido por los cambios ambientales que pudieron haber facilitado el DLA en pozas y acumulaciones de agua interiores continentales. Posteriormente, con el movimiento tectónico, particularmente la placa de Chortis y la expansión de la cuenca del Caribe, así como el movimiento tectónico y reordenación de los continentes y la formación de los bordes continentales que generaron el movimiento de las corrientes marinas, particularmente la corriente de Benguela o la parte de esta que tiene el giro hacia América central, América norte y África, pudieron haber favorecido la aparición de las especies de *Macrobrachium* con

DLE y la dispersión de estas. Este es un postulado que permite entender como especies genética y morfológicamente similares se encuentran en lugares geográficos tan distantes, por ejemplo, *M. crenulatum* en Puerto Rico y *M. zariqueyi* en las costas de África y las formas similares a las especies mencionadas que se encuentran en México. Finalmente, la elevación del Istmo de Tehuantepec y la fisiografía de los estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas han facilitado el desarrollo de especies de *Macrobrachium* con DLA, como las que existen actualmente.

Esta interpretación puede explicar la diversificación de las especies de *Macrobrachium* en México, porque la filogenia de las especies locales claramente separa y agrupa en forma consistente las especies con DLA de las que presentan DLE. Sin embargo, para otras regiones del planeta la separación de las especies de *Macrobrachium* por su característica del tipo de desarrollo abreviado no es tan clara. En la filogenia aparecen mezcladas especies de los dos tipos desarrollos, de una región geográfica, en un mismo clado, o bien especies de diferentes regiones aparecen en diferentes clados sin mostrar un patrón claramente distinguible que permita explicar la aparición global de las especies con desarrollo abreviado como consecuencia de la configuración de los diferentes lugares geográficos (Ver Murphy y Austin, 2007; Liu *et al.*, 2007, Chen y Tzeng, 2009).

La dinámica general de la formación de México y centro América permite explicar la presencia de las especies de *Macrobrachium*, en el tiempo y el espacio. Por ejemplo no había certeza de si las especies peninsulares de *Macrobrachium* son la misma especies que las continentales, como resultado de este estudio hemos podido definir que los ejemplares continentales y peninsulares de *M. tenellum* son idénticos genéticamente y que han evolucionado en forma paralela. Pero también sabemos que la Península de Baja California, se encontraba unida a la parte continental de México antes de la apertura del Golfo de California, y quizá es uno de los ejemplos más evidentes de la dinámica de generación de terrenos y de migración de márgenes continentales. Esta península es un terreno compuesto

que fue separado de Norte América por un salto en el límite entre las placas de Norteamérica y Pacífica hacia el interior de México, lo que aconteció hace aproximadamente 6 millones de años (Pleistoceno). El Golfo de California es una zona de corteza continental fuertemente extendida; contiene corteza oceánica reciente bordeando los segmentos del nuevo límite entre las placas. El magmatismo del arco continental que existió en baja California hace 12 millones de años, fue el resultado de la subducción de la Placa de Cocos y de otra serie de placas menores relacionadas con esta. Al tiempo que la unión triple entre las placas Pacífica-Cocos-Norteamericana migró hacia el sur, la subducción en la parte sur de baja California fue sustituida por un límite transformante de corrimiento lateral derecho (12 a 14 Ma) a lo largo de la zona de fallas de Tosco-Abreojos.

Eventos que han generado barreras geográficas naturales, modificado el clima, el sentido de las corrientes oceánicas y los afluentes de aguas litorales, han creado micro ambientes favorables para el establecimiento, la dispersión, la especiación y diversificación de un gran número de especies de crustáceos dulceacuícolas. México es un país privilegiado por la riqueza de ambientes y diversidad faunística, particularmente el género *Macrobrachium* en México es un grupo taxonómico importante que sirve modelo para entender los procesos de adaptación y evolución de otras especies (Dirzo, 1990).

Historia evolutiva.

Hasta el momento este es el primer trabajo que fecha la historia evolutiva del género *Macrobrachium* a partir de datos puntuales de registro fósil y para corroborar también se estimaron edades a partir de fechas de eventos geológicos relevantes (Inicio y cierre del Istmo de Panamá; Formación de la Línea de Huxley) obteniendo resultados congruentes. La divergencia de *Macrobrachium* de los otros géneros de Palaemónidos mexicanos la estimamos a finales del periodo Cretácico (69.7 a 66.4 Ma). La dispersión de las primeras formas de

Macrobrachium ocurrió en el Eoceno (47.8 – 41.69 Ma). La especiación de las especies con DEL ocurrió en el Oligoceno (33.07 – 29.55 Ma) y la diversificación de las especies con DLA ocurrió en a finales del Mioceno (9.02 – 8.71)

Schubart *et al.*, (2000), aludiendo a la carencia de registro fósil para el grupo, estimó edades a partir de la divergencia genética entre las especies (10%) y la tasa de cambio de crustáceos decápodos aproximadamente 0,6 a 0,9% por Ma, obteniendo las siguientes estimaciones: divergencia entre las especies en 11-16 Ma, lo que es concordante a la fecha obtenida en nuestro estudio para la diversificación de las actuales especies de *Macrobrachium* con DLA (9.02 -8,71 Ma). Con mayores niveles de divergen (16%) se traducen en aprox. 18-27 Mya lo que en nuestro estudio es cercano a las fecha de diversificación de las especies de *Macrobrachium* con DEL (33.07 – 29.55 Ma). Desde ese momento en adelante la capacidad de adaptación, plasticidad fenotípica, estrategias reproductivas, historia de vida, y la ecología del género ha favorecido el éxito actual del género.

Porter, *et al.*, (2005) estimaron la divergencia entre el género *Macrobrachium* de *Cryphyops* hace 70 ma. Lo que no se corrobora con las estimaciones obtenidas en nuestro estudio, el que indica que esta divergencia sucedió entre (19.39 – 22.38 Ma). Sin embargo propone que la distribución actual de *Macrobrachium* se puede deber a una invasión al agua dulce mientras estaba abierto el itsmo de Tehuantepec, hace 24 Ma (Villalobos *et al.*, 1989) debido al levantamiento de la Sierra Madre del Sur la divesificación de *Macrobrachium* ocurrió entre 11 a 27 Ma (Mutphy Austin, 2005; Schubart *et al.*, 2000)

Si consideramos la amplia distribución de varias de las especies mexicanas de *Macrobrachium*, con exitosas estrategias de adaptación es posible que hayan ido dispersándose y adquiriendo capacidades de evolucionar en nuevos medios. Las estimaciones obtenidas en este estudio permiten concluir que la mayor especiación de *Macrobrachium* con DLA ocurrió en el Mioceno, desde ese momento en adelante la capacidad de adaptación, plasticidad fenotípica,

estrategias reproductivas, historia de vida, y la ecología del género ha favorecido el éxito actual del género.

CONCLUSIONES GENERALES

1. La filogenia molecular realizada confirma la monofilia del género *Macrobrachium*.
2. Dependiendo del contexto espacial de la reconstrucción filogenética se aceptan ambas hipótesis propuestas al inicio de ésta investigación: La reconstrucción local de las especies de *Macrobrachium* indica que en México el desarrollo larvario abreviado surge como un pulso de invasión único ya que todas las especies con esta característica reproductiva se ubican en las ramas de un único clado con DLA para México. En el contexto mundial, la característica del DLA se representa en varias ramas de los diferentes clados del árbol, lo que indica varios pulsos de invasión. Aún cuando, en la filogenia mundial, las especies mexicanas con DLA se mantienen todas en un solo clado basal.
3. Se corrobora que el “Grupo Olfersii”, es un grupo natural con moderada variación morfológica y baja variación genética. Que las especies del grupo “Olfersii” (*M. digueti*, *M. acanthochirus* y *M. michoacanus*) son genéticamente idénticas (100%) para el fragmento del gen 16S rRNA estudiado, dando evidencia genética que apoya la sinonimización de estas especies propuesta por Hernandez *et al.*, (2007).
4. La divergencia evolutiva de *Macrobrachium* de los otros géneros de Palaemónidos mexicanos se estimó a finales del periodo Cretácico (69.7 a 66.4 Ma). La dispersión de las primeras formas de *Macrobrachium* ocurrió en el Eoceno (47.8 – 41.69 Ma). La especiación de las especies con DEL ocurrió en el Oligoceno (33.07 – 29.55 Ma) y la diversificación de las especies con DLA ocurrió en a finales del Mioceno (9.02 – 8.71).
5. La divergencia evolutiva de las especies geminadas de *M. acanthurus* – *M. tenellum* fue antes de la formación del Istmo de Panamá. La divergencia evolutiva de las especies geminadas *M. heterochirus* – *M. occidentale* y de *M. carcinus* – *M. americanum* fue durante el proceso de formación y cierre del Istmo de Panamá, respectivamente.

6. Que los haplotipos (16s rRNA Y COI) de *M. carcinus* de Venezuela y Costa Rica son genéticamente idénticos (100%) a *M. americanum*. Evidencia de que no es un par de especies completamente geminado.
7. Los haplotipo de *M. tenellum* y de *M. americanum* (16s rRNA Y COI) de Baja California Sur son idénticos (100%) a los haplotipos continentales de esas especies. Por tanto la dispersión de estas especies fue cuando Baja California estaba unido al continente.
8. Los haplotipos de *M. acanthurus* de Centroamérica presentan un haplotipo marcadamente diferente al de México, lo que permite suponer una evolución geográfica independiente.
9. Se entrega evidencia genética para nombrar dos nuevas especies de *Macrobrachium* (DLA) para México y que existen potenciales nuevas especies con DLE para México, provenientes de un cenote de Yucatán y de Chemuyil, Quintana Roo, las cuales están relacionadas, genéticamente al complejo de *M. olfersii* - *M. hobbsi*.
10. Las secuencias de *P*b 7* y *P*b 8* (16s rRNA) de Veracruz, tienen una identidad genética del 99% con los haplotipos de *M. crenulatum* de Costa Rica y de *M. zariqueyi* de la costa de África, (estos últimos presentan 100% de identidad genética entre ellos). Primer reporte para *M. crenulatum* en México.
11. La dinámica general de la formación de México y Centro América permite explicar la presencia de las especies de *Macrobrachium* en tiempo y espacio.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Acuña, G. E. P. 2002.** Estructura genética, variación isoenzimática y morfología de tres especies de *Macrobrachium spp.* de Veracruz y Tabasco, México. *Tesis de Maestría*. Universidad Nacional Autónoma de México. 187 pp.
- Akaike, H. 1974.** A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19: 716-723.
- Álvarez, F., Villalobos, J.L., Robles, R. 2002.** Abbreviated larval development of *Macrobrachium tuxtleense* Villalobos y Alvarez, 1999 reared in the laboratory. *Crustaceana*, 75: 717-730.
- Aris-Brosou, S., Yang, Z. 2002.** Effects of models of rate evolution on estimation of divergence dates with special referente to the metazoan 18S ribosomal RNA phylogeny. *Systematic Biology*, 51: 703-714.
- Armada, A. N. 1993.** Differentiation of the Palaemonid shrimp, *Macrobrachium nipponense* in Japanese Islands. *Tesis Doctoral*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Avise, J.C., J. RNAold, R.M. Ball, B. E, T. Lambt, J.E. Neigel, C.A. Rebb, y N.C. Saunders 1987.** Intraspecific Phylogeography : The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18:489-522.
- Baldwin, B., Sanderson, M.J. 1998.** Age and rate of diversification of diversification of the Hawaiian silversword alliance (Compositae). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 9402-9406.
- Becerra, J. X. 2005.** Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *Proceedings of the National Academy of sciences USA*, 102: 10919 10923.
- Boddeke, R. 1982.** The occurrence of winter and summer eggs in the brown shrimp (*Crangon crangon*) and the pattern of recruitment. Netherlands *Journal of Sea Research*, 16, 151-162.

- Boschi, E. E. 1961.** Sobre el primer estadio larval de dos especies de camarones de agua dulce (Crustacea, Palaemonidae). Actas y Trabajos del 1° Congreso Sudamericano de Zoología, La Plata, Argentina 2: 69-77.
- Boulton, A., Knott, J. B. 1984.** Morphological and electrophoretic studies of the Palaemonidae (Crustacea) of the Perth region, Western Australia. *Aust J. Mar. Fresh. Res.*, 35: 769-783.
- Bouvier, E. L. 1895.** Sur les palaemons recueillis dans les eaux douces de la Basse-Californie par M. L. Diguët. *Bulletin du Muséum de Histoire Naturelle Paris*, 1: 159 – 162.
- Bowles, D. E., Aziz, K., CH. L. Knight, CH.L. 2000.** *Macrobrachium* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) in the contiguous United States: a review of the species and assessment of threats to their survival. *Journal of Crustacean Biology*, 20: 158-171.
- Bromham, L., Rambaut, A., Harvey, P.H. 1996.** Determinants of rate variation in mammalian DNA sequence evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 610-621.
- Bromham, L., Woolfit, M. 2004.** Explosive Radiations and the Reliability of Molecular Clocks: Island Endemic Radiations as a Test Case. *Systematic Biology*, 53: 758-766.
- Brooks, D.R., J. Bilewitch, C. Condy, et al. 2007.** Quantitative Phylogenetic Analysis in the 21st Century. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78: 225–252.
- Bucklin, A. B., Frost, W., Kocher, T.D. 1995.** Molecular systematics of six *Calanus* and three *Metridia* species. *Marine Biology*, 121: 655-664.
- Bueno, S. L. de S, De Almeida, S. 1995.** Abbreviated larval development of the freshwater prawn, *Macrobrachium iheringi* (Ortmann, 1897) (Decapoda: Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana*, 68: 665-686.
- Cai, Y., NG, P.K.L. 2002.** The freshwater palaemonid prawns (Crustacea:Decapoda: caridea) of Myanmar. *Hydrobiologia*, 487: 59-83.
- Camacho, M. E., Álvarez, F., Villalobos, J.L. 1997.** Langostinos (Decapoda: Palaemonidae). pp. 411-414. In, E. González, R. Dirzo and R. Vogt (eds.), *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Instituto de Biología, UNAM.

- Cantú, A.,** Eccardi, F., Lira, E., Ramirez, J., Serrato, M., A. Zavala, A. **1991.** México diverso: un encuentro con su naturaleza. ISSSTE, México. 254 pp.
- Cevallos-Ferriz, S.R.S.,** González-Torres, E. A. **2005.** Geological setting and phytodiversity in Mexico. Pp: 1-18. En: *Studies on Mexican Paleontology.* Vega, F. J., T. G. Nyborg, M. C. Perrilliat, M. Montellano-Ballesteros, S.R.S. Cevallos-Ferriz y S. A. Quiroz Barroso (eds). Springer. The Netherlands Mas. 308 pp.
- Chace, F.,** Bruce, A. **1993.** The caridean shimps (Crustacea: Decapoda) of the Albatros Philippine Expedition 1907-1910, part 6: superfamily Palaemonoidea. *Smithsonian Contribution. Zool., 543: 1-152.*
- Clarke, A.,** Jonhson, N. M. **1999.** Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J. Ameim. Ecol., 68: 893 – 905*
- Coates, A. G. 1997.** The forging of Central America. Pp. 1-37. In: Central America: A Natural and Cultural History. A. G. Coates (ed.). Yale University Press, New Haven, Conneticut.
- Coates, A. G.,** Jackson, J.B., Collins, L.S., Cronin, T.M., Dwsett, H.J., Bybell, L.M., Jung, P., Obando, J.A. **1992.** Closure of the Isthmus of Panama: The near shore marina record of Costa Rica and Western Panama. *Geological Society of America Bulletin, 104: 814-828.*
- Crandall, K.,** Fetzner, J.W., Lawler, S.H., Kinnersley, M., Austin, C.M. **1999.** Phylogenetic relationships among the Australian and New Zealand genera of freshwater crayfishes. *Australian Journal of Zoology, 47: 199-214.*
- Crandall, K.,** Fitzpatrick, J.F. **1996.** Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biology, 45: 1-26.*
- Crease, T. J. 1999.** The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene, 233:89–99.*
- Crozier, R.H.,** Crozier, Y.C. **1993.** The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics, 133(1):97-117.*
- Cruz, J.C.,** Mejia-Ortiz, L.M., Signoret, M., Viccon-Pale, J. **2002.** Distribution and abundance of *Diacyclops sp.* (Crustacea: Copepoda) in Gabriel Cave, Oaxaca. México. (91- 94 pp) In: Modern Approaches to the study of Crustacea. Escobar–Briones y Álvarez Eds. Klumer Academic / Plenum Publishers.

- Culver, D.C. 1982.** Cave Life: Evolution and Ecology. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Daniels, S. R., Stewart, B.A., Cook, P.A. 2002.** Congruent patterns of genetic variation in a burrowing freshwater crab revealed by allozymes and mtDNA sequence analysis. *Hidrobiologia*, 468: 171-179.
- De Bruyn, M., Wilson, J.A., Mather, P.B. 2004.** Huxley's line demarcates extensive genetic divergence between eastern and western forms of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 251-257.
- De Melo, G.A.S. **2003.** Familias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae. In: Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. (Ed. G.A.S. Melo) Editora Loyola Sao Paulo, 289-415pp.
- Dirzo, R. 1990.** La biodiversidad como crisis ecológica actual ¿Qué sabemos? *Ciencias número especial 4 julio de 1990*.
- Ehrlich, P.R. 2001.** La sistemática y la conservación de la biodiversidad. Pp. 201-220. In: *Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad*. H. M. Hernández, A. Garcia Alderete, F. Álvarez y M. Ulloa (eds). Instituto de Biología, UNAM, México.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C. 1995.** Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10: 315-319.
- Felsenstein, J. 2004.** Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fischer, A. G. 1960.** Latitudinal variations in organic diversity. *Evolution*, 14: 64-81.
- Futuyma, 1986.** Evolutionary biology. 2a. Ed. Sinauer associates Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Gamba, L. 1980.** Desarrollo larval abreviado del camarón de agua dulce *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877). pp. 169-189. In, Biología, Ecología y Cultivo de Organismos Acuáticos. Simposio 16, Editorial Equinoccio, Caracas.

- Garassino, A., Bravi, S. 2003.** *Palaemon antonellae* new species (Crustacea, Decapoda, Caridea) from the lower Cretaceous "Platylodomite" of Profeti (Caserta, Italy). *Journal of Palaentology*, 77: 589-592 pp
- Gentry, A. H. 1982.** Neotropical floristic diversity. Phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of Andean orogeny? *Annals of the National academy of Sciences USA*, 103: 9124-9129.
- Gillespie, J. H. 1991.** The causes of molecular evolution. Oxford Univ. press, oxford, U. K.
- González, L. 2002.** Desarrollo larval de *Macrobrachium* sp. (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) en condiciones de laboratorio. Tesis Profesional, Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B.S., Eguiarte, L.E. 2006.** Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103: 9124-9129.
- Haffer, J. 1969.** Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131-137.
- Hall, T. 1997-2001.** BIO-EDIT. Biological sequence alignment editor for Windows 95/08/NT (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Department of Microbiology. North Carolina State University.
- Harris, 1966.** Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society Series B*, 164:298-331.
- Harrison, J. S. 2004.** Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa* (Decapoda: Pinnotheridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 743-754.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. 1985.** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
- Hedgpeth, J. 1957.** The North American species of *Macrobrachium* (river shrimps). *The Texas Journal of Science*, 1: 28-38.
- Hendrickx, M. E. 1995a.** Camarones. 417-538. *En: Fisher W., F. Kupp, W. Shneider. C. Sommer, K. carpenter y V. H. Niem, eds. Guía para la identificación de*

especies para los fines de la pesca. Pacífico centro Oriental. Plantas e Invertebrados.

- Hernandez, L.,** Murugan, G., Ruíz-Campos, G., Maeda-Martínez, A. **2007.** Freshwater shrimp of the genus *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) from the Baja California Península, México. *Journal of crustacean Biology*, 27(2): 331-369.
- Hillis, D. M.,** Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K., Zimmer, E.A. **1996.** Nucleic Acids IV Sequencing and Cloning. Pp: 321-381. En: *Molecular Systematics*. Hillis, D. M., C. Moritz and B. K. Mable (eds). Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U.S.A. 2nd Ed. 655pp.
- Hills, D.M.,** Allard, M.W. Miyamoto, M.M. **1993.** Analysis of DNA sequences data: Phylogenetic inference. *Methods in enzymology*, 224: 456-587.
- Hobbs, H.H. 1973b.** An illustrated checklist of the american crayfishes (Decapoda: Astacidae: Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 480: 1-236.
- Holthuis, L. B. 1950.** Preliminary descriptions of the twelve new species of palaemonid prawns from american waters (Crustacea. Decapoda) *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademiec van Wetenschappen*, 53: 93-99.
- Holthuis, L. B. 1950a.** The Palaemonidae collected by the Siboga and Snellius expeditions, with remarks on other species. I. The Decapoda of the Siboga Expedition. Part X. Siboga Expeditie, Monograph 39: 1-268.
- Holthuis, L. B. , 1950b.** Preliminary descriptions of twelve new species of palaemonid prawns from American waters (Crustacea Decapoda). *Proceedings van de Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen*, 53: 93-99.
- Holthuis, L. B. 1951.** A general revision of the Palaemonidae (Crustacea. Decapoda. Natantia) of the Americas. I. The subfamilies Euryrhynchinae and Pontoninae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation*, 11: 1 332.
- Holthuis, L. B. 1952.** A general revision of the Palaemonidae (Crustacea. Decapoda. Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation*, 12: 1-396.

- Hubby, J. L., Lewontin, R.C. 1966.** A molecular approach to the study of genio heterozygosity in natural populations. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 577-59.
- Huelsebeck, J. P., Crandall, K. A. 1997.** Phylogeny estimation and hypothesis testing using Maximum Likelihood. *Annual Review of Ecological Systematic*, 28: 437-466 Pp.
- Huelsebeck, J. P., Ronquist, F. 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Huelsenbeck, J.P., B. Rannala. 1997.** Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, 276, 227–232.
- Huelsenbeck, J.P., F. Ronquist, R. Nielsen, J.P. Bollback. 2001.** Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310–4.
- Hughes, C., Eastwood, R. 2006.** Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103: 10334-10339
- Hurwood, D. A., Hughes, J.M., Bunn, S.E., Cleary, C. 2003.** Population structure in the freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) inferred from allozymes and mitochondrial DNA. *Heredity*, 90: 64-70.
- Iturralde-Vinnent, M. A., Macphee, R.D.E. 1999.** Paleogeography of the Caribbean region: implications for the Cenozoic biogeography. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 238: 1-95.
- Jalihai, D. R., Sankolli, K.N., Shenoy, S. 1993.** Evolution of larval Development patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda: Palaemonidae). *Crustaceana*, 65: 365-376.
- Jarman, S. N., Elliot, N.G., Nicol, S., Mcminn, A. 2000.** Molecular phylogenetics of circumglobal *Euphausia* species (Euphausiacea: Crustacea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 57: 51-58.
- Jayachandran, K. V. 2001.** Palaemonid Prawns. Biodiversity, Taxonomy Biology and Management. *Enfield Science Publisher. India*. 624 pp.
- Johnson, D.S. 1973.** Notes on some especies of the genus *Macrobrachium*, *J. Singapore Nat. Acad. Sci.*, 3: 273-291.

- Jordán, D. S. 1908.** The law of geminates species. *American Naturalist* 42: 73-80.
Journal of Crustacean Biology, 15: 117-133.
- Kattner, G., Wehrtmann, I.S., Merck, T. 1994.** Interannual variations of lipids and fatty acids during larval development of *Crangon spp.* in the German Bight, North Sea. *Comp. Biochem. Phys. B* 107, 103-110.
- Kensley, B., Walter, I. 1982.** Palaemonid shrimp from the Amazon Basin, Brasil (Crustacea:Decapoda:Nanantia). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 362,28p.
- Kimura, M. 1968.** Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217(129): 624-626.
- Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution*, 16, 110-120.
- Kimura, M. 1983.** The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press.
- Kitaura, J., Wada, K., Nishida, M. 1998.** Molecular phylogeny and evolution of unique mud using territorial behaviour in ocypodid crabs (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Molecular Biology and Evolution*, 15: 626-637.
- Knowlton, N., Weigt, L.A., Solorzano, L.A., Mills, D.K., Bermingham, E. 1993.** Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive incompatibility across the isthmus of Panama. *Science*, 260: 1629-1632.
- Knowlton, N., Weigt, L.A., 1998.** New dates and new rates for divergence across the isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London*, 265: 2257-2263.
- Langley, C. H., Fitch, W. 1974.** An estimation of the constancy of the rate of molecular evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 3: 161-177.
- Lavin, M., Schrire, B.P., Lewis, G., Pennington, R.T., Delgado-Salinas, A., Thulin, M. Hughes, C.E., Matos, A.B., Wojciecowski, M.F. 2004.** Metacommunity process rather than continental tectonic history better explains geographically structured phylogenies in legumes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 359: 1509-1522.
- Liu, M., Cai, Y., Tzeng, C. 2007.** Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea:Decapoda:Palaemonidae) inferred

from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. *Zoological Studies*, 46: 272-289.

Liu, M., Cai, y., Tzeng,C. **2009**. 16S AND 28S rDNA Sequences in phylogenetic analyses of freshwater prawns (*Macrobrachium* bate, 1868) from taiwan. *Journal of Crustacean Biology*, 29(3): 400-412, 2009

Maddison, W., Pérez, T.M. **2001**. Biodiversidad y lecciones de la historia. Pp 201-220. In: *Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad*. H.M. Hernández, a. García Alderete. F. Álvarez y M. Ulloa (eds.) Instituto de Biología, UNAM, México.

Magalhaes, C., Walker, I **1988**. Larval development and ecology distribution of central Amazonian palaemonid shrimps (Decapoda: Caradea) *Crustaceana*, 55: 279 – 292 pp.

Magallón, S., Crane, P.R., Heredeen, P.S. **1999**. Phylogenetic patter, diversity, and of eudicots. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86: 297 - 372.

Magallón, S., Sanderson, M.J. **2001**. Absolute diversification rates in angiosperm clades. *Evolution*, 55: 1762-1780.

Magallón, S., Sanderson, M.J. **2005**. Angiosperm divergence times: the effect of genes, codon positions, and time constraints. *Evolution*, 59: 1653-1670.

Marko, P. B. **2002**. Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2005-2021.

Mashiko, K., Numachi, KI. **2000**. Derivation of populations with different-sized eggs in the palaemonid prawn *Macrobrachium nipponense*. *J. Crustacean Biol.*, 20:118-127.

Mashiko, K. **1990**. Diversified egg and clutch sizes among local populations of the fresh-water prawn *Macrobrachium nipponense* (de Haan). *J. Crustacean Biol.*, 10, 306-314.

Mashiko, K. **1992**. Genetic egg and clutch size variations in freshwater prawn populations. *Oikos*, 63: 454-458.

Mayr, E. **1946**. History of the North American Bird Fauna. *Wilson Bulletin*, 58:3 - 41 pp.

- Mejía-Ortiz, L. M., Álvarez, F., Hartnoll, R. 2003.** A new species of freshwater prawn, *Macrobrachium totonacum* (Decapoda, Palaemonidae), with abbreviated development from Mexico. *Crustaceana*, 76: 77-86.
- Mejía-Ortiz, L., Palacios-Vargas, M. 2001.** Estigofauna de la Cueva de las Sardinias, Tabasco, México. *Mundos Subterráneos UAEM N° 11-12:10–16.*
- Mejía-Ortiz, L., Palacios-Vargas, M., Cardona, J. 2001.** Microartrópodos de la Cueva San Gabriel y en la Cueva Nacimiento, Oaxaca, México. *Mundos Subterráneos UAEM. 8: 21-2.*
- Mittermeier, R., Goettsch-Mittermeier, C. 1997.** Megadiversidad. Los países biológicamente mas ricos. del mundo. CEMEX, México.
- Mooers, A. O., Harvey, P.H. 1994.** Metabolic rate, generation time and the rate of molecular evolution in birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3: 344-350.
- Murphy, N. P., Austin, C.M. 2002.** A preliminary study of 16S rRNA sequence in Australian *Macrobrachium* shrimps (Palaemonidae: decapoda) reveals inconsistencies in their current classification. *Invertebrate Systematics*, 16: 697-701.
- Murphy, N. P., Austin, C.M. 2003.** Molecular taxonomy and phylogenetics of some species of Australian palaemonid shrimps. *Journal of Crustacean Biology*, 23: 169-177.
- Murphy, N. P., Austin, C.M. 2004.** Phylogeography of the widespread Australian freshwater prawn, *Macrobrachium australiense* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Biogeography*, 31: 1065-1072.
- Murphy, N. P., Austin, C.M. 2005.** Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zoologica Scripta*, 34: 187-197 Pp.
- Nates-Rodríguez, J.C., Villalobos-Hiriart, J.L. 1990.** Dos especies nuevas de camarones de agua dulce del género *Macrobrachium* Bate, (Crustacea, Decapada, Palaemonidae) de la vertiente occidental de México. *An. Inst. Biol., Universidad Nacional Autonoma de México*, 61(1):1-11.

- Near, T. J., Meylan, P.A., Schaffer, H.B. 2004.** Assessing concordance of fossil calibration points in molecular clock studies: an example using turtles. *American Naturalist*, 165: 137-146.
- Nei, M., Tajima, F. 1981.** DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.
- Nei, M., Tajima, F. 1983.** Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions for restriction sites data. *Genetics*, 105: 207-216.
- Nei, M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nelson, G., Platnick, N. 1981.** *Systematics and biogeography*. Columbia University Press. Nueva York.
- Odinetz-Collart, O; Rabelo, H. 1996.** Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda:Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, 16(4): 684-688.
- Ortmann, A. E. 1902.** The geographical distribution of freshwater decapods and its bearing upon ancient geography. *Proc. Amer. Philos. Soc.*, 41 (171): 261–401 pp; figs. 1-8.
- Page, R.D.M., Holmes, E.C. 1998.** *Molecular Evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell. Gran Bretaña, 347 pp.
- Page, T.J., Short, J.W., Humphrey, C.L., Hillyer, M.J., Hughes, J.M. (2008).** Molecular systematics of the Kakaducarididae (Crustacea:Decapoda: Caridea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46:1003-1014.
- Palumbi, S.R. Benzie, J. 1991.** Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. *J. Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 1:27-34.
- Peña, C. 2011.** Métodos de inferencia filogenética. *Rev. Peru Biol.*, 18(2):265-267.
- Pennington, R. T., Lavin, M., Prado, D.E., Pendry, C.A., Pell, S., Butterworth, C. 2004.** Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both tertiary and quaternary diversification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 395: 515-538.

- Pereira, G. 1985.** Freshwater shrimps from Venezuela. III. *Macrobrachium quelchi* (de Man) and *Euryrhynchus pemoni*, n. sp. (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from La Gran Sabana. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 98: 615-621.
- Pereira, G. 1986.** Freshwater shrimps from Venezuela I. Seven new species of Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 99: 198-213.
- Pereira, G. 1989.** Cladistics, taxonomy, biogeography and the evolutionary history of the Palaemoninae (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). Ph.D. Dissertation, University of Maryland, College Park, Maryland, U.S.A. 350 pp.
- Pereira, G. 1993.** A description of a new species of *Macrobrachium* from Peru and distributional records for *Macrobrachium brasiliense* (Heller) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 106: 339-345.
- Pereira, G., García, J. 1995.** Larval development of *Macrobrachium reyesi* (Decapoda: Palaemonidae) with a discussion on the origin of abbreviated development in palaemonids. *Journal of Crustacean Biology*, 15:117-133.
- Pereira, G. 1997.** A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Caridea). *Acta Biologica Venezuelica*, 17(1), 1-69.
- Pérez, H., Segura, M.J. 1980.** Contribución al conocimiento de la estructura poblacional y algunos aspectos de la biología de las especies de langostinos *M. acanthurus* (Wiegmann 1836) y *M. carcinus* (Linne 1788) en el Estado de Tabasco. *Tesis profesional*. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Ponce-Palafox, J., Arana-Magallon, F.C., Cabanillas-Beltran, H., Esparsa-Leal, H. 2002.** Bases biológicas y técnicas para el cultivo de los camarones de agua dulce nativos del Pacífico Americano *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) y *Macrobrachium americanum* (Bate, 1868). CIVA 2002 : 534-546.
- Ponniah, M., Hughes, J.M. 1998.** Evolution of Queensland spiny mountain crayfish of the genus *Euastacus* Clark (Decapoda: Parastacidae): preliminary 16S mtDNA phylogeny. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 119: 9-19.

- Porter, M.L., Pérez-Losada, D., Crandall, K.A. 2005.** Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergent times. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 355-369.
- Posada, D., Crandall, K.A. 1998.** MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9): 817-818.
- Prance, G. T. 1973.** Phylogeographic support for the theory of Pleistocene forestrefuges in the Amazon Basin, based upon evidence from distribution pattern in Caryocaraceae, Chrysobalanaceae, Dichapetalaceae and Lecythidaceae. *Acta Amazónica*, 3: 5-28.
- Ra'anan, Z. y A. Sagi. 1985.** Alternative mating strategies in male morphotypes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Biological Bulletin*, 169 (1985), pp 592-601.
- Ra'anan, Z., A. Sagi, Y. Wax, I. Karplus, G. Hulata y A. Kuris, 1991.** Growth, size rank, and maturation on the Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Analysis of aarked prawns in a experimental population. *Biological Bulletin*, 18 (1991), pp. 377 -386.
- Raven, C. P. 1961.** Oogenesis: The Storage of Development Information. Pergamon Press, Oxford.
- Robles, R., Schubart, C, Conde, J.E., Carmona-Suarez, C., Alvarez, F., Villalobos-Hiriart, J.L., Felder, D.L. 2007.** Molecular phylogeny of the American *Callinectes* Stimpson, 1869 (Brachyura : Portunidae), based on two partial mitochondrial genes. *Marine Biology*, 150: 1265- 1274.
- Rodríguez de la Cruz, M. C. 1965.** Contribución al conocimiento de los Palemónidos de México II. Palemónidos del Atlántico y vertiente oriental de México con descripción de dos especies nuevas. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Biológico-Pesqueras*, 1: 72-112.
- Rodríguez, G. 1982.** Fresh-water shrimps (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Orinoco River Basin and the Venezuelan Guayana. *Journal of Crustacean Biology*, 2: 378-391.
- Román, R., Ortega, L., Mejía, L. 2000.** *Macrobrachium vicconi*, new species, a fresh-water shrimp from a rain forest in southeast México, and a comparison with

congeners (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, 29: 186-194.

Rosenberg, M. S., Kumar, S. 2003. Heterogeneity of nucleotide frequencies among lineages and phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 610-621.

Rossi, N., y F. Mantelato. 2013. Molecular Analysis of the Freshwater Prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) Supports the Existence of a Single Species throughout Its Distribution. PLoS ONE 8(1): e54698. doi:10.1371/journal.pone.0054698

Rozas, J., Sánchez del Barrio, J.C., Messenguer, X., Rozas, R. 2003. DnaS, DNA polymorphism analices by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.

Sánchez-Cordero, V., A. T. Peterson, P. Pliego-Escalante. 2001. Modelado de la distribución de especies y conservación de la diversidad biológica. Pp. 359-379. In: Enfoques Contemporáneos en el Estudio de la Diversidad Biológica. A. García-Aldrete, F. Alvarez & H. Hernández. Instituto de Biología, UNAM y Academia Mexicana de Ciencias, A.C. México, D.F.

Salmeron, J., 1985. Efectos de la densidad, interacción química, interacción visual, preferencia de color y efecto del color de sustrato en el crecimiento de postlarvas del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), tesis de maestría, Instituto tecnológico y estudios Supriores de Monterrey, Guaymas, México.

Sanderson, M. J. 1997. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and evolution*, 14: 1218-1232.

Sanderson, M. J. 2002a. R8s 1.70. User's manual. Computer program and documentation available from <http://phylo.ucdavis.edu/r8s/r8s.html>.

Sanderson, M. J. 2002b. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 101-109.

Sanderson, M. J., Doyle, J.A. 2001. Sources of error and confidence intervals in estimating the age of angiosperms from *rbcL* and 18S rDNA data. *American Journal of Botany*, 88: 1499-1516.

- Schubart, C. D., Neigel, J.E., Felder, D.L., 2000.** Use of the mitochondrial 16S Rrna gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. *Crustacean Issues*, 12: 817-830.
- Shokita, S. 1977.** Abbreviated metamorphosis of landlocked fresh-water prawn, *Macrobrachium asperulum* (Von Martens) from Taiwan. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, 50: 110-122.
- Shokita, S. 1979a.** The distribution and speciation of the inland water shrimps and prawns from the Ryukyu Islands II. *Bulletin of the College of Science, University of the Ryukyus*, 28: 193-278.
- Shokita, S. 1979b.** Early life history of the genus *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae). *Aquabiology*, 4: 9-17.
- Shokita, S. Takeda, M., Sittilert, S., Polpakdee, T. 1991.** Abbreviated larval development of freshwater prawn, *Macrobrachium niphanae* Shokita and Takeda (Decapoda: Palaemonidae), from Thailand. *Journal of Crustacean Biology*, 11: 90-102.
- Short, J. 2000.** Systematics and biogeography of Australian *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) with descriptions of other new freshwater Decapoda. *Ph.D. Thesis*, University of Queensland.
- Short, J.W. 2004.** A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) *Hidrobiologica*, 525: 1-100.
- Shy, J.Y., Yu, H.P. 1987.** Freshwater shrimps of Taiwan Kaohsiung Taiwan: *National Museum of Marine Biology and Aquarium Press*.
- Signoret, G., Ortega, A.L., Brailousky, D. 2000.** Partiality abbreviated larval development in an underscribed species of the genus, *Macrobrachium* from Chiapas, México. In Proceedings and abstracts of the 4th International Crustacean Congress. Anstrerdam, The Netherlands 20-24 july, 1998.
- Simmons, M., Ochoterena, P. 2000.** Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 49: 369-381.
- Simpson, G.G. 1961.** Principles of animal taxonomy. Columbia University Press. U.S.A. 155pp.

- Sites**, J. W., Crandall, K.A. **1997**. Testing species boundaries in biodiversity studies. *Conservation Biology*, 11: 1289-1297.
- Soltis, D.E.**, Soltis, P.S. 2000. Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant. Mol. Biol.*, 42: 45–75
- Soltis**, P.S., Soltis, D.E., Savolainen, V., Crane, P.R., Barraclough, T. **2002**. Rate heterogeneity among lineages of land plants: integration of molecular and fossil data and evidence for molecular living fossils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 4430–4435
- Soulland**, M. E. **1923**. Le developpement larvaire des “palaemoninae” I. Partie descriptive. La condensation progressive de L` ontogenése. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*, 57: 509-603.
- Stebbins**, G. L. **1974**. *Evolution above the species level*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Streth**, N. **1976**. A review of the systematics and zoogeography of the Freshwater Species of Palaemonetes Heller of North America (Crustacea: Decapoda). *Smithsonian Contribution to Zoology*, 228: 1-27.
- Sturmbauer**, C., Levinggton, J.S., Christy, J. **1996**. Molecular phylogeny analysis of fiddler crabs: test of the hypothesis of increasing behavioral complexity in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 228: 1-27.
- Suno-Ughi**, N., Sasaki, F., Chiba, S., Kawata, M. **1997**. Morphological stasis and phylogenetic relationships in tadpole shrimps *Triops* (Crustacea: Notostraca). *Biological Journal of the Linnean Society*, 61: 439-457.
- Swofford**, D. L. **1998**. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0 beta 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford**, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M. **1996**. Phylogenetic inference. En: D.M. Hillis, C. Moritz y B.K. Mable [eds.]. *Molecular systematics*. Sinauer. Sunderland, Massachusetts.
- Tavaré**, S. **1986**. Some probabilistic and statistical problems in the analysis od DNA sequences. In: some mathematical questions in biology. DNA sequence analysis (ed. Miura RM),pp. 57-86. Amer. Math. Soc., Providence, RI.

- Thompson, J. D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. 1997.** The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4673-4680.
- Thompson, J. D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994.** CLUSTAL W: improving, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Thorne, J. L., Kishino, H., Painter, I.S. 1998.** Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1647-1657.
- Tiwari, K.K. 1955a.** Distribution of Indo-Burmese freshwater prawns of the genus *Palaemon* Fabr., and its bearing on the Satpura hypothesis. *Bull.Natl. Inst. Sci. India.*, 7: 230-239.
- Toledo, V.M. 1988.** La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*, 81. 17-30.
- Tong, J.G., Chan, T.Y., Chu, Y.K.H. 2000.** A preliminary phylogenetic analysis of *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) based on mitochondrial DNA sequences of selected species from the Indo-West Pacific. *Journal of Crustacean Biology*, 20: 541-549.
- Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B. 2005.** Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 212-226
- Vandamme, A. 2003.** Basic concepts in molecular evolution. 1-23. En Salemi y Vadamme , eds. The phylogenetic handbook a practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge, Gran Bretana.
- Vázquez-Bader, A. R., Carrero, J.C., García-Varela, M., Gracia, A., Laclette, J.P. 2004.** Molecular phylogeny of the superfamily Penaeoidea Rafinesque Schmaltz, 1815, based on mitochondrial 16S partial sequence analysis. *Journal of Shellfish Research*, 23:911-917.
- Villalobos, A. 1967a.** Problemas de especiación en América de un grupo de Palaemonidae del género *Macrobrachium*. Actas de Conferencia Científica Mundial sobre Biología y Cultivo de Camarones y Gambas. FAO Document FR: BCSP/67/E/62, 11 p.

- Villalobos, A. 1967b.** Estudio de los Palaemónidos de México. I. *Macrobrachium acanthochirus* una nueva especie del SE de México. *Anales Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología*, 25: 167-174.
- Villalobos, A. F. 1969.** Problemas de especiación en América de un grupo de Palaemonidae del género *Macrobrachium*, *FAO Fisheries Report*, 57(3): 1055-1066.
- Villalobos, A. 1982.** Decapoda. pp. 215-239. In, S. H. Hurlbert and A. Villalobos (eds.), *Aquatic Biota of Mexico, Central America and West Indies*. San Diego State University, San Diego, California.
- Villalobos, J. L., Álvarez, F. 1999.** A new species of *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), with abbreviated development, from Veracruz, México. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 112: 746-753.
- Villalobos, J.L., Cantú, A., Lira, E. 1993.** Los crustáceos de agua dulce de México. 267-290 pag. In: R. Gío-Argaéz, Y., E. López-Ochoterena, (Eds.) *Diversidad biológica de México. Volumen especial, Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, XLIV: 1 – 457 pp.
- Walker, T. M., Poore, G. C. B. 2003.** Rediagnosis of *Palaemon* and differentiation of southern Australian species (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Memoirs of Museum Victoria*, 60: 243-256.
- Webster, A. J., Payne, R.J.H., Pagel, M. 2003.** Molecular phylogenies link rates of evolution and speciation. *Science*, 301: 478.
- Weir, B. S., Cockerham, C.C. 1984.** Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Wicksten, M. K. 2005.** Palaemonid shrimps. pp. 67-98. In, J. L. Hernández Aguilera, J. A. Ruiz Nuño, R. E. Toral-Almazán, and V. Arenas-Fuentes (eds.), *Camarones, Langostas y Cangrejos de la Costa Este de México*. Econatura Conabio, MÉxico, D.F.
- Wicksten, M.K., Hendrickx, M.E. 1989.** A key to palaemonid shrimp to the Eastern Pacific región. *Bulletin of Southern California Academy of Sciences*, 88(1): 11-20.
- Wicksten, M.K., Hendrickx, M.E. 2003.** An updated checklist of benthic marine and brackish water shrimps (Decapoda: Panoidea: Stenopodidea: Caridea) from the

Eastern Tropical Pacific. 49-76. In: M. Hendrickx ed. Contributions to the study of Eastern Pacific Crustaceans. 2. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico.

Wiley, E. 1981. Vicariance biogeography. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 19: 513-542.

Yoder, A. D., Yang, Z. 2000. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1081-1090.

Zuckerkandl, E. y Pauling, L. 1962. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V. and H. J. Vogel (eds.) *Evolving genes and proteins*. Pp.77-166. Academic, New York.

Zuckerkandl, E., Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theoret. Biol.*, 8:357-366.

ANEXO I. TABLAS

Anexo I. Distribución mundial de especies del género *Macrobrachium*. Información tomada de Chace y Bruce, 1993; Cai, 2002; Holthuis 1950, 1950a, 1950b, 1951 y 1952; Jayachandran, 2001; Kensley, 1982; Pereira, 1985, 1986, 1989; Shy, 1987; Villalobos-Figueroa, 1967a, 1967b, 1969, 1982; Villalobos-Hiriart 1982; Wicksten, 2005. Más recopilación de descripciones originales, citadas en la bibliografía.

Especie		Distribución	
Estados Unidos	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	Atlántico
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. olfersii</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. ohione</i>	Smith	
	<i>M. hancockii</i>	Holthuis, 1950	
México	<i>M. acantochirus</i>	Villalobos, 1967	Pacífico, Oaxaca, Rio Valdeflores.
	<i>M. acherontium</i>	Holthuis, 1977	Pacífico, Tabasco, Gruta del Cocona.
	<i>M. digueti</i>	Bouvier, 1895	Pacífico, Muleje, B. California.
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836	Costa este de México
	<i>M. hobbsi</i>	Nates y Villalobos, 1990	Pacífico y Atlántico
	<i>M. michoacanus</i>	Nates y Villalobos, 1990	Pacífico, Michoacán
	<i>M. villalobosi</i>	Hobbs, 1973b	Acatlán, Oaxaca,
	<i>M. tenellum</i>	Smith, 1871	Pacífico
	<i>M. americanum</i>	Bate, 1868	Pacífico
	<i>M. olfersii</i>	Wiegmann, 1836	Pacífico
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	Atlántico
	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	Atlántico
	<i>M. tuxtlaense</i>	Villalobos y Álvarez, 1999	Atlántico
	<i>M. totonacum</i>	Álvarez y Mejía, 2001	Atlántico
	<i>M. vicconi</i>	Román y Col., 2000	Atlántico
	<i>M. occidentale</i>	Holthuis, 1950	Pacífico
	<i>M. rosenbergii</i>	De Man, 1879	Introducida
Guianas	<i>M. jelskii</i>	Miers, 1877	
	<i>M. quelchi</i>	De Man, 1900	
	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862	
	<i>M. brasiliense</i>	Heller, 1862	
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
	<i>M. inpa</i>	Kensley y Walker, 1982	
	<i>M. nattereri</i>	Heller, 1862	
	<i>M. olfersii</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. surinamicum</i>	Holthuis, 1948	
Argentina	<i>M. borellii</i>	Nobili, 1896	
	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862	
	<i>M. jelskii</i>	Miers, 1877	
Bolivia	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862	
	<i>M. inpa</i>	Kensley y Walker, 1982	
	<i>M. jelskii</i>	Miers, 1877	
	<i>M. nattereri</i>	Heller, 1862	
Paraguay	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862	
	<i>M. borellii</i>	Nobili, 1896	
Uruguay	<i>M. borellii</i>	Nobili, 1896	
Venezuela	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862	Amazonas
	<i>M. aracamuni</i>	Rodríguez. 1982	Amazonas y cerro Aracamurri
	<i>M. atabapense</i>	Pereira, 1968	Amazonas, Río Atabapo
	<i>M. cortezi</i>	Rodríguez, 1982	Río Orinoco

M. dieythrum

Pereira, 1986

Río Aguaro

Continuacion Tabla 1.

Especie		Distribución
	<i>M. pectinatum</i>	Pereira 1986, 2000
	<i>M. praecox</i>	J. Roux, 1928
	<i>M. pumilum</i>	Pereira, 1986
	<i>M. reyesi</i>	Pereira, 1986
	<i>M. rodriguezi</i>	Pereira, 1986
		Quebrada Corral de Piedra, Maracay, Aragua. Río Caris, Anzoátegui
Venezuela	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836
	<i>M. brasiliense</i>	Heller, 1862
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836
	<i>M. inpa</i>	Kensley y Walker, 1982
	<i>M. jelskii</i>	Miers, 1877
	<i>M. nattereri</i>	Heller, 1862
	<i>M. offersii</i>	Wiegmann, 1836
	<i>M. surinamicum</i>	Holthuis, 1948
	<i>M. rosenbergii</i>	De Man, 1879
		Introducida
Guatemala	<i>M. americanum</i>	Bate, 1868
	<i>M. occidentale</i>	Holthuis, 1950 ^a
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836
Surinam	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836
	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862
	<i>M. brasiliense</i>	Heller, 1862
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758
	<i>M. inpa</i>	Kensley y Walker, 1982
	<i>M. jelskii</i>	Miers, 1877
	<i>M. offersii</i>	Wiegmann, 1836
	<i>M. surinamicum</i>	Holthuis, 1948
Brasil	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836
	<i>M. birai</i>	Loba, Melo y Fernández, 1986
	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862
	<i>M. brasiliense</i>	Heller, 1862
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758
	<i>M. ferreirai</i>	Kensley y Walker, 1982
	<i>M. holthuisi</i>	Genofre y Lobao, 1978
	<i>M. iheringi</i>	Ortmann, 1897
	<i>M. inpa</i>	Kensley y Walker, 1982
	<i>M. borellii</i>	Nobili, 1896
	<i>M. denticulatum</i>	Ostrovski, Fonseca y Silva-Ferreira, 1996
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836
	<i>M. jelskii</i>	Miers, 1877
	<i>M. offersii</i>	Wiegmann, 1836
	<i>M. potiuna</i>	Müller, 1880
	<i>M. nattereri</i>	Heller, 1862
	<i>M. petronioi</i>	Melo, Lobao y Fernández, 1986
	<i>M. surinamicum</i>	Holthuis, 1948
	<i>M. rosenbergii</i>	De Man, 1879
		Aguas litorales Aguas litorales. Endémico. Cuenca del Amazonas Cuenca del Amazonas Aguas litorales Igarape, Aripuana, Mato Grosso, Cuenca del Amazonas. Endémica Aguas litorales. Endémico Aguas interiores. Endémico Iganpe de Cachoeira, Cuenca del Amazonas Aguas interiores o continentales de Brasil meridional Aguas interiores. Endémica Aguas litorales Cuenca del Amazonas y aguas interiores Aguas litorales Aguas interiores o continentales de Brasil meridional (Edo. Sta. Catarina) y aguas litorales Río Negro en la Cuenca del Amazonas y aguas litorales Río Branco en Aguas litorales Endémico São Paulo Cuenca del Amazonas. Introducida
Puerto Rico	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836

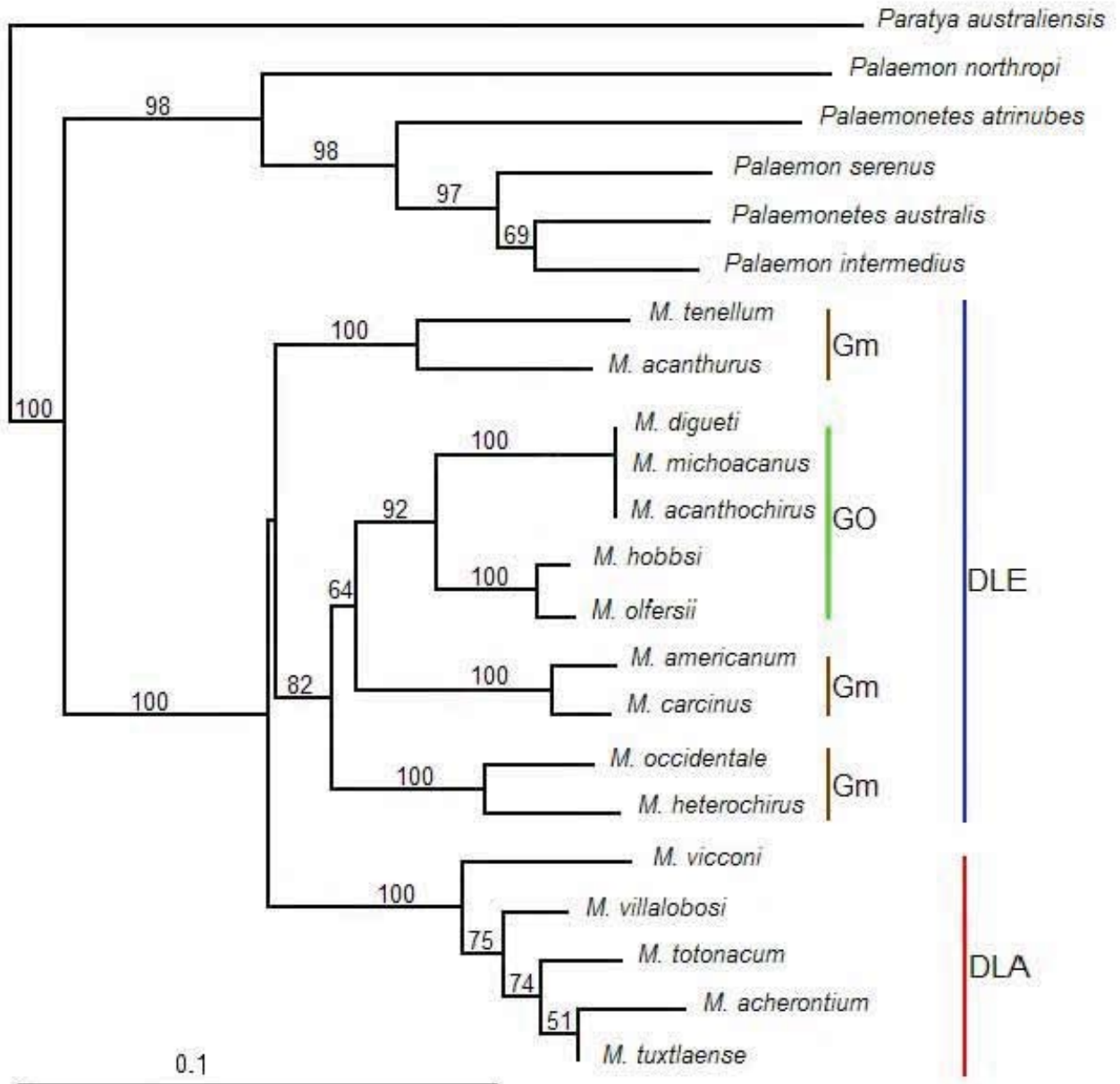
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836	
Jamaica	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836	
Barbados	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
Especie		Distribución	
Nicaragua	<i>M. tenellum</i>	Smith, 1871	
	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
Colombia	<i>M. praecox</i>	J.Roux, 1928	
	<i>M. transandicum</i>	Holthuis, 1950b	Sur-este, Rio Telembi.
	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. brasiliense</i>	Heller, 1862	
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
	<i>M. offersii</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. surinamicum</i>	Holthuis, 1948	
Costa Rica	<i>M. cocoense</i>	Abele y Kim, 1984	Isla de Coco
	<i>M. hancocki</i>	Holthuis, 1950b	Esparta (Rio Barranca)
	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. crenulatum</i>	Holthuis, 1950b	
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
	<i>M. inpa</i>	Kensley y Walker, 1982	
	<i>M. jelskii</i>	Miers, 1877	
Panamá	<i>M. cebrum</i>	Abele y Kim, 1989	Miraflores, Canal de Panamá
	<i>M. crenulatum</i>	Holthuis, 1950b	Río Peje Bobo
	<i>M. digitum</i>	Abele y Kim, 1989	Miraflores, Canal de Panamá
	<i>M. panamense</i>	Rathbun, 1912	Río Calabre
	<i>M. rathbunae</i>	Holthuis, 1950b	Golfo de Panamá, archipiélago las Perlas.
	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
Cuba	<i>M. faustinum</i>	Holthuis, 1974b	Cueva de agua de Yara
	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
Ecuador	<i>M. gallus</i>	Holthuis, 1952	Río Peripa
	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862	
	<i>M. brasiliense</i>	Heller, 1862	
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
Perú	<i>M. inca</i>		Río Moche, cerca Salavery.
	<i>M. amazonicum</i>	Heller, 1862	
	<i>M. brasiliense</i>	Heller, 1862	
	<i>M. carcinus</i>	Linnaeus, 1758	
Haiti	<i>M. faustinum</i>	De Saussure, 1857	Cerca de Jacmel
	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836	
Santo Domingo	<i>M. acanthurus</i>	Wiegmann, 1836	
	<i>M. heterochirus</i>	Wiegmann, 1836	
Trinidad	<i>M. inpa</i>	Kensley y Walker, 1982	
	<i>M. jelskii</i>	Miers, 1877	
Australia	<i>M. adscriptum</i>	Riek, 1951	Queensland
	<i>adscitum</i>		
	<i>M. atactum atactum</i>	Riek, 1951	Conondale, Rivera Mary, Queensland
	<i>M. atactum</i>	Riek, 1951	Elimbah, Queensland
	<i>ischromorphum</i>		
	<i>M. australiense</i>	Holthuis, 1950 ^a	Eastern, Queensland
	<i>australiense</i>		
	<i>M. australiense</i>	Riek, 1951	Cairns, Queensland
	<i>crassum</i>		
Especie		Distribución	

Australia	<i>M. australiense cristatum</i>	Riek, 1951	Pallal, Horton River, near Bingara, New South Wales.
	<i>M. australiense eupharum</i>	Riek, 1951	Rivera Burdekin, macrossan, Queensland
	<i>M. bullatum</i>	Fincham, 1987	Territorio norte
	<i>M. danae</i>	Heller, 1865	Sidney
	<i>M. glypticum</i>	Riek, 1951	Norte Queensland
	<i>M. intermedium</i>	Simpson, 1860	(Marino) Puerto Jackson.
	<i>M. novaehollandiae</i>	De Man, 1908	Sydney
	<i>M. tolmerum</i>	Riek, 1951	Río Black, Macrossan, Queensland
	<i>M. handschini</i>		
India	<i>M. ahkowi</i>	Chong y Koo, 1987	Pondicherry sur de India
	<i>M. altifrons altifrons</i>	Henderson, 1893	Norte de India
	<i>M. assamense assamense</i>	Tiwari, 1985	Rivera Somerwari cerca siju GaroHills
	<i>M. assamense peninsulare</i>	Tiwari, 1958	Rivera Nerbudda
	<i>M. canarae</i>	Tiwari, 1958	Rivera Sitanadi cerca Ghata Sur de Kamara, Stado Madras
	<i>M. cavernicola</i>	Kemp, 1924	Siju Cave, Garo Hills, Assam
	<i>M. choprai</i>	Tiwari, 1949	
	<i>M. dayanum</i>	Henderson, 1893	
	<i>M. rude</i>		
	<i>M. hendersoni</i>	Tiwari, 1952	
	<i>M. hendersoni hendersoni</i>	De Man, 1906	Darjeeling, western Bengal
	<i>M. hendersoni cacharensis</i>	Tiwari, 1952	
	<i>M. hendersoni platyrostre</i>	Tiwari, 1952	Darjeeling wester Bengal
	<i>M. idella georgii</i>	Jayachandran y Joseph, 1985	
	<i>M. indicum</i>	Jayachandran y Joseph, 1985	
	<i>M. johnsoni</i>	Ravindranath, 1979	
	<i>M. kistnensis</i>	Tiwari, 1952	
	<i>M. lamarrei lammarroides</i>	Tiwari, 1952	
	<i>M. lar</i>	Fabricius, 1798	
	<i>M. malcolmsonii malcolmsonii</i>	H. Milde Edwards, 1844	
	<i>M. manipurensis</i>	Tiwari, 1952	Manippur Assam States
	<i>M. nobilii</i>	Henderson y Matthai, 1910	
	<i>M. siwalikense</i>	Tiwari, 1952	
	<i>M. unikRNAatakae</i>	Jalihal, Shenoy & Sankolli, 1988	KRNAatak
	<i>M. veliense</i>	Jayachandran & Joseph, 1985b	Veli Lake, near Trivandrum southwestern
	<i>M. dux</i>	Lenz, 1910	Ituri River Avakubi, Zaire
	<i>M. lujae</i>	De Man, 1912	
	<i>M. gangeticum</i>		
	<i>M. sankollii</i>		
	Pakistan	<i>M. altifronsranjhaj</i>	Tiwari, 1964
Ghana	<i>M. vollenhovenii</i>	Herklots, 1857	
	<i>M. rodriguezi</i>	Pereira, 1986	Río Caris, Edo. Anzoátegui
China	<i>M. asperulum</i>	Von Martens, 1868	
	<i>M. edentatum</i>	Liang y Yan, 1986	Sicuan

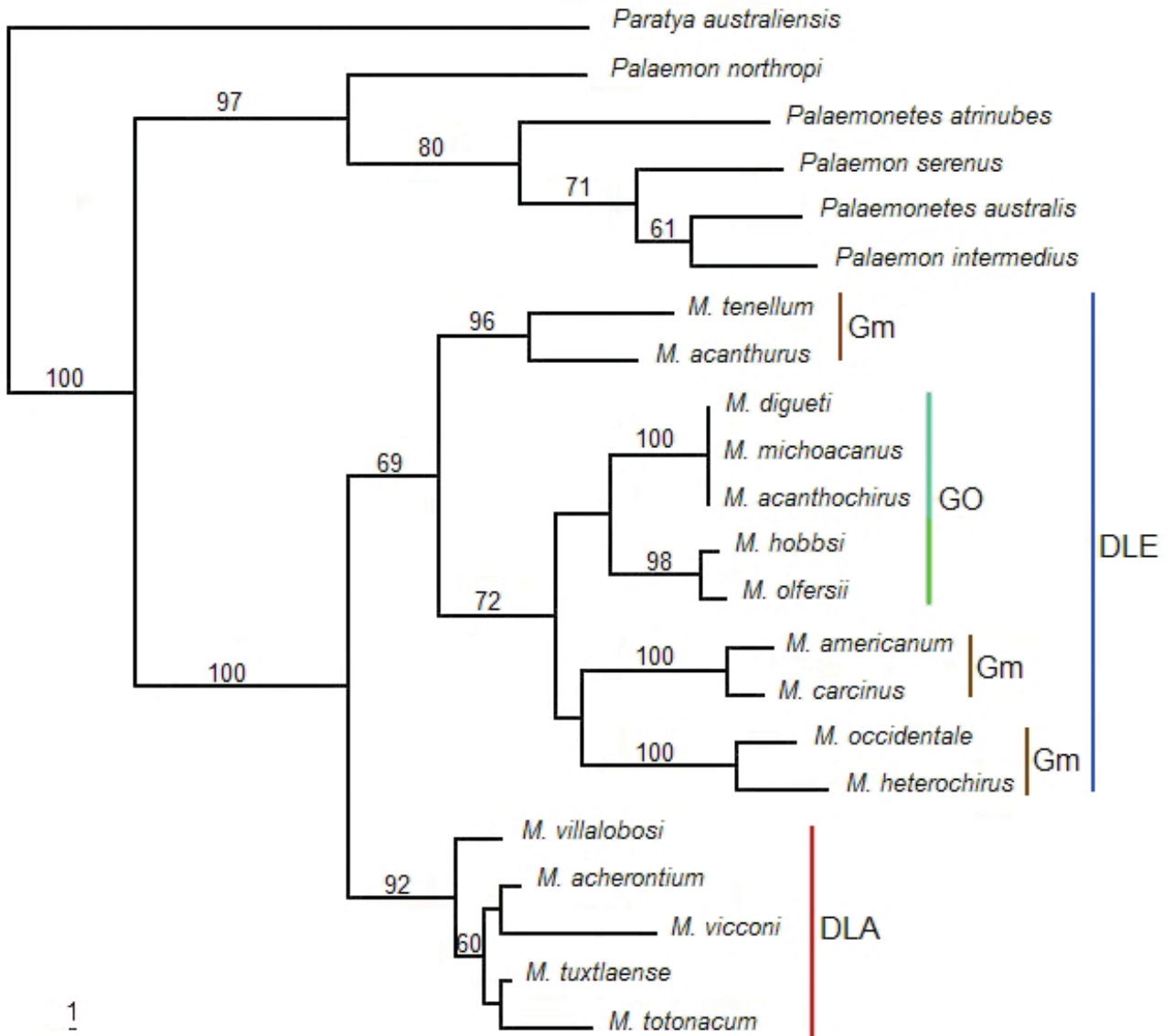
	Especie		Distribución
China	<i>M. eriocheirum</i>	Dai, 1984	Jungsan, Xishuangbanna
	<i>M. fukinense</i>	Liang and Yan, 1980	Provincia de Fujian
	<i>M. guangxiense</i>	Liang y Yan, 1981	Provincia de Guangxi

	<i>M. inflatum</i>	Liang y Yan, 1985	
	<i>M. jiangxiense</i>	Liang y Yan, 1985	
	<i>M. kiukianense</i>	Yu, 1931	
	<i>M. longidigitum</i>	Dai, 1984	
	<i>M. maculatum</i>	Liang y Yan, 1980	Provincia Fujian
	<i>M. meridionalis</i>	Liang y Yan, 1983	Hainan Island
	<i>M. obtusifrons</i>	Dai, 1984	Reserva Guanting, Miyun County, Beijing
	<i>M. shokitai</i>	Fujino y Baba, 1973	Amoy
	<i>M. superbum</i>	Séller, 1862	Shangai
	<i>M. yui</i>	Holthuis, 1950a	Ning-Erh, Yunnan, southern China
	<i>M. hianenese</i>		Hong Kong.
Tahiti	<i>M. australe</i>	Guerin-Méneville, 1838	
	<i>M. venustum</i>	Parisi, 1919	Hainana, South China
Nueva Caledonia	<i>M. caledonicum</i>	J. Roux, 1926	
	<i>M. aemulum</i>		
Vietnam	<i>M. yeti</i>	Dang Ngoc Thanh, 1975	
	<i>M. mieni</i>	Dang, 1975	
Filipinas	<i>M. cowlesi</i>	Holthuis, 1950 a	Manila water supplí, Luxon
	<i>M. latimanus</i>	Von Martens, 1868	Coquilocon.
	<i>M. mammillodactylus</i>	Thallwitz, 1892	
	<i>M. surinamicum</i>	Holthuis, 1948	Luzon
Singapore	<i>M. equidens</i>	Dana, 1852	
	<i>M. platycheles</i>		
	<i>M. malayanum</i>		
Taiwan	<i>M. formosense</i>	Bate, 1868 a	Río Tansui
	<i>M. insulare</i>	Parisi, 1919	
	<i>M. grandimanus</i>	Randall, 1840	
Madagascar	<i>M. hildebrandti</i>	Hilgendorf, 1893	Central de Madagascar
	<i>M. patsa</i>	Coutiere, 1899	
	<i>M. petiti</i>	J Roux, 1934	
	<i>M. therezieni</i>	Holthuis, 1965	Río Maningory, Provincia de Tamatave
Tailandia	<i>M. hirsutimanus</i>	Tiwari, 1952	
	<i>M. lanchesteri</i>	De Man, 1911	Songkhla
	<i>M. neglectum</i>		
Japón	<i>M. japonicum</i>	De Haan, 1849	
	<i>M. nipponense</i>	De Haan, 1849	
Burma	<i>M. mirabile</i>	Kemp, 1917	Rangoon
	<i>M. naso</i>	Kemp, 1918	Inle Lake region.
	<i>M. rogersi</i>	Tiwari, 1952	
	<i>M. rosenbergii schenkeli</i>	Johnson, 1973	Tavoy.
	<i>M. peguense</i>	Tiwari, 1952	
Zaire	<i>M. dux</i>	Lenz, 1910	Ituri River Avakubi.
	<i>M. sollaudii</i>	De Man, 1912	Near Mobayi-Mbongo.
Angola	<i>M. felicinum</i>	Holthuis, 1949 a	Catumbela near Benguela.
Vietnam	<i>M. mieni</i>	Dang, 1975	
Africa	<i>M. zariqueyi</i>	Holthuis, 1949	Este de Africa
	<i>M. dierythrum</i>	Pereira, 1986	Este de Africa
	<i>M. foai</i>	Coutière	Este de Africa
	<i>M. lujae</i>	de Man	Este de Africa
	<i>M. raridens</i>	Hilgendorf	Este de Africa
	<i>M. sollaudii</i>	de Man	Este de Africa
	<i>M. thysi</i>	Powell	Este de Africa

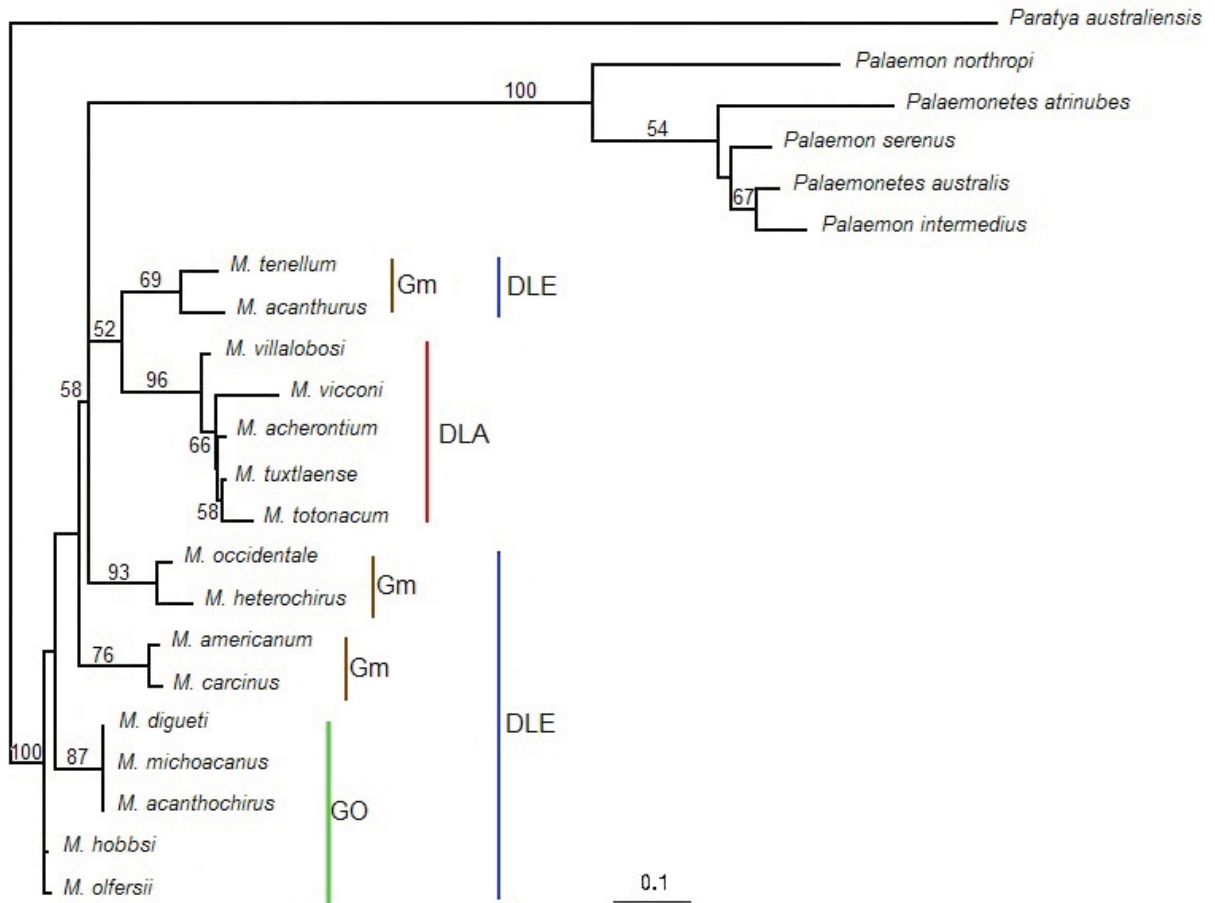
ANEXO II. FIGURAS



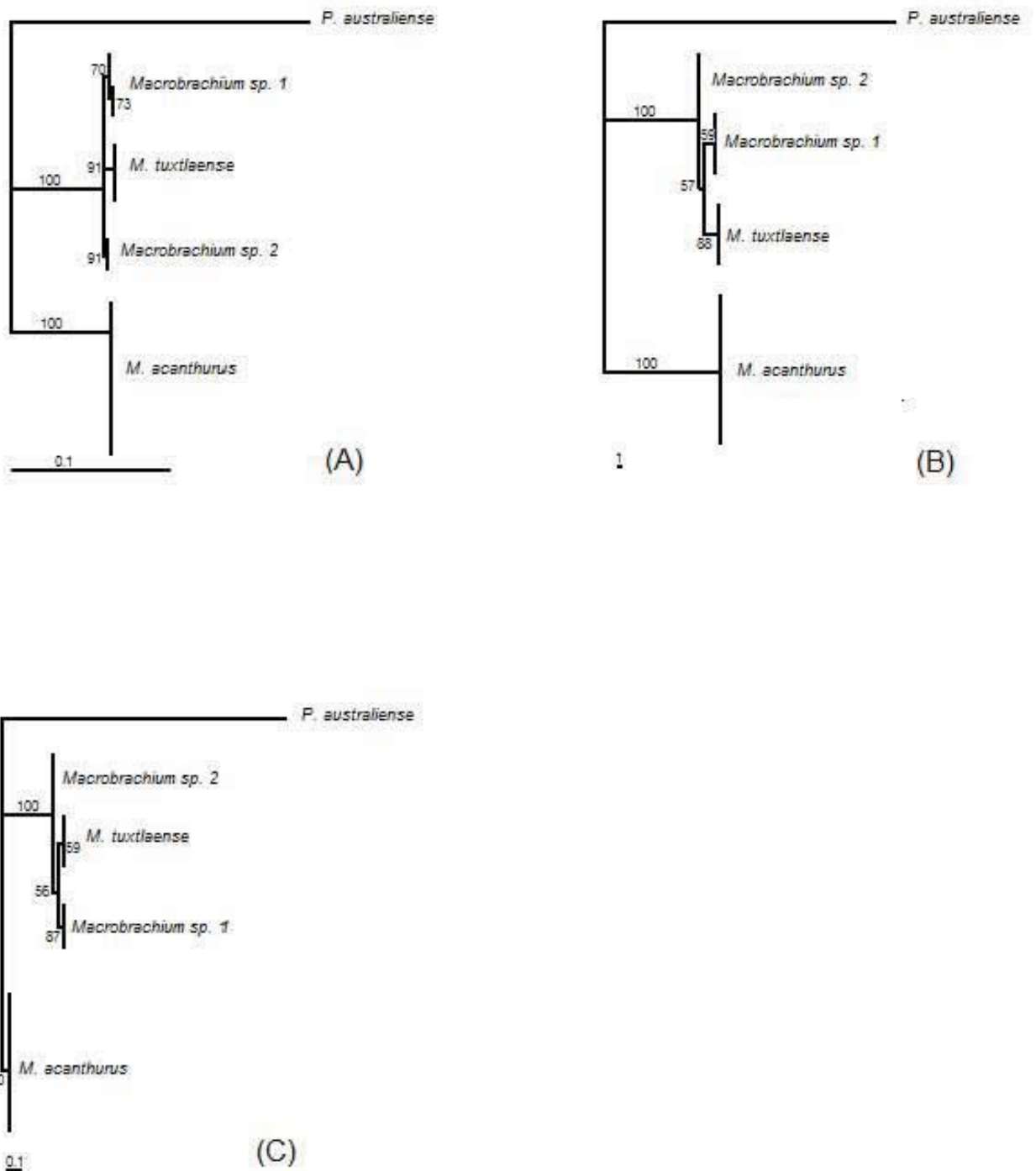
Anexo II a. Filograma de distancia (NJ) para las especies mexicanas de *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un segmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap 2000 Replicas. DLA = Desarrollo Larvario Abreviado; DLE = Desarrollo Larvario Extendido; Gm = Especies Geminadas. GO = "Grupo Olfersii".



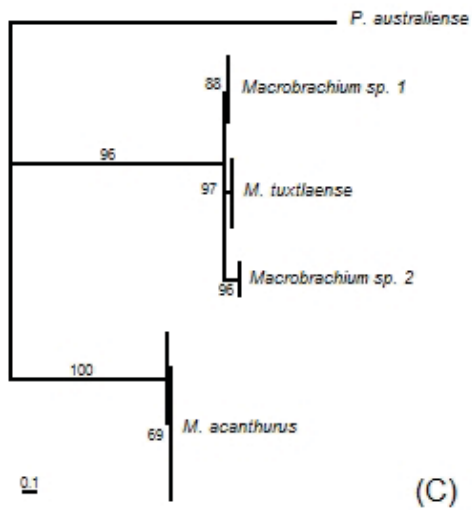
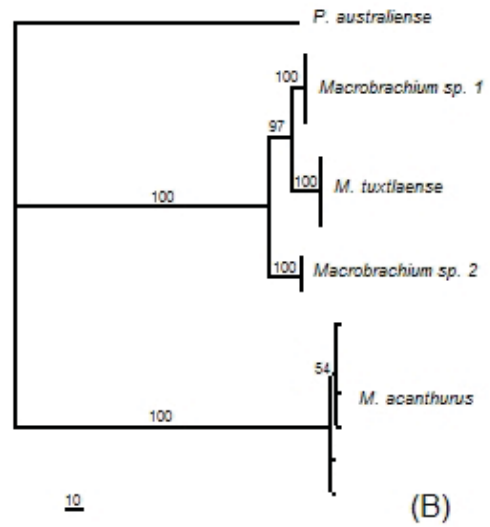
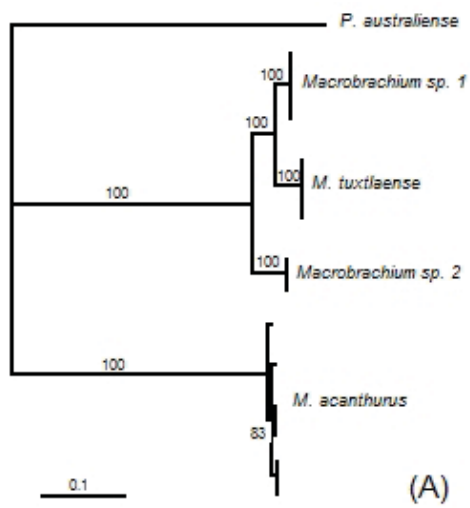
Anexo II b. Filograma de parsimonia para especies mexicanas de langostinos *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un segmento de 380 pb del gen 16S rRNA. Bootstrap de 2000 réplicas. Gm sp = Especies Geminadas; GO = "GRUPO OLFERSI"; DLA = Desarrollo Larvario Abreviado; DLE = Desarrollo Larvario Extendido.



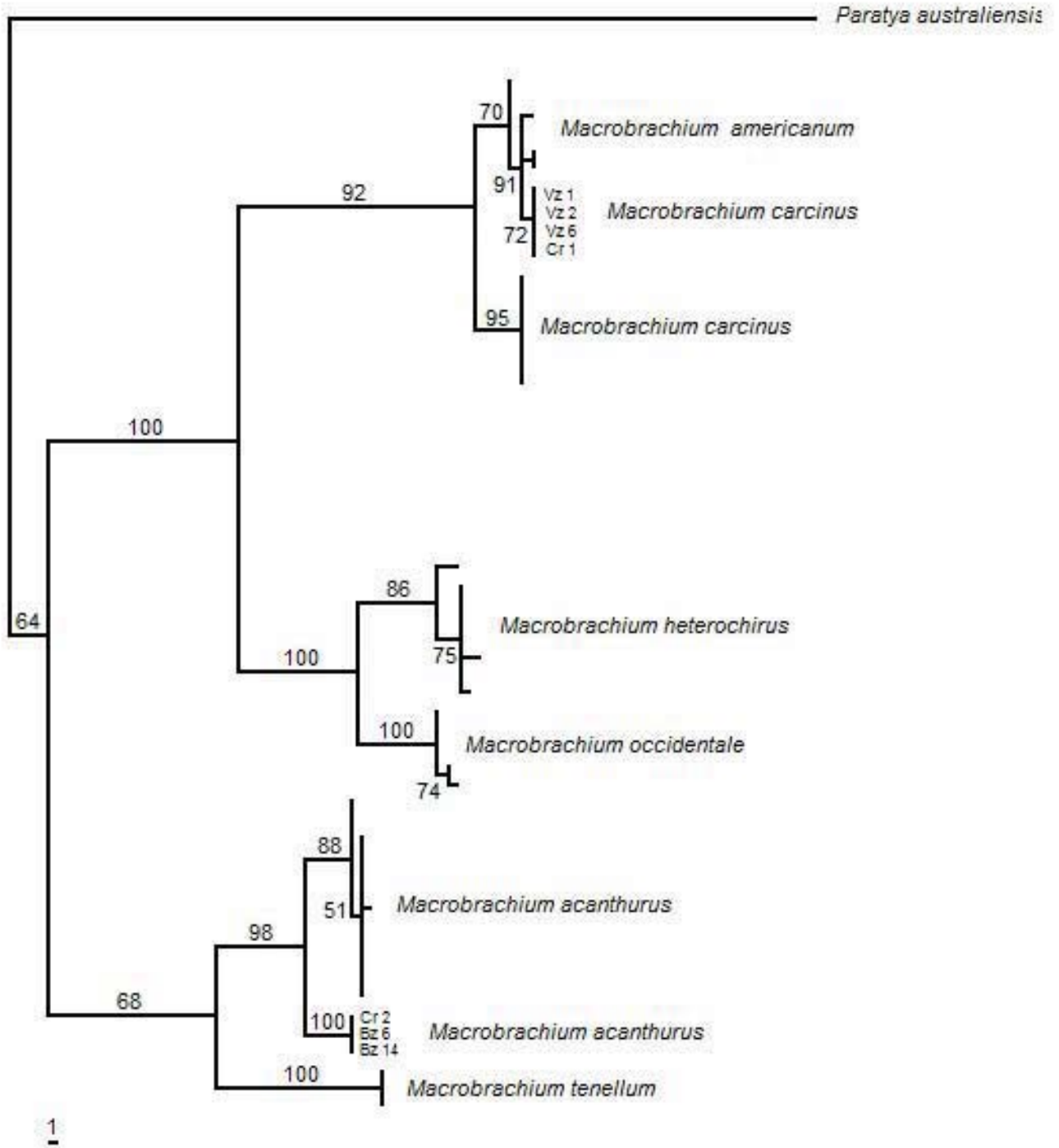
Anexo II c. Filograma de Máxima Verosimilitud (MV) para las especies mexicanas de langostinos *Macrobrachium*, a partir de secuencias de un fragmento de 380 pb del gue 16S rRNA. Bootstrap de 500 réplicas. Gm sp = Especies Geminadas; GO = "GRUPO OLFERSI"; DLA = Desarrollo Larvario Abreviado; DLE = Desarrollo Larvario Extendido.



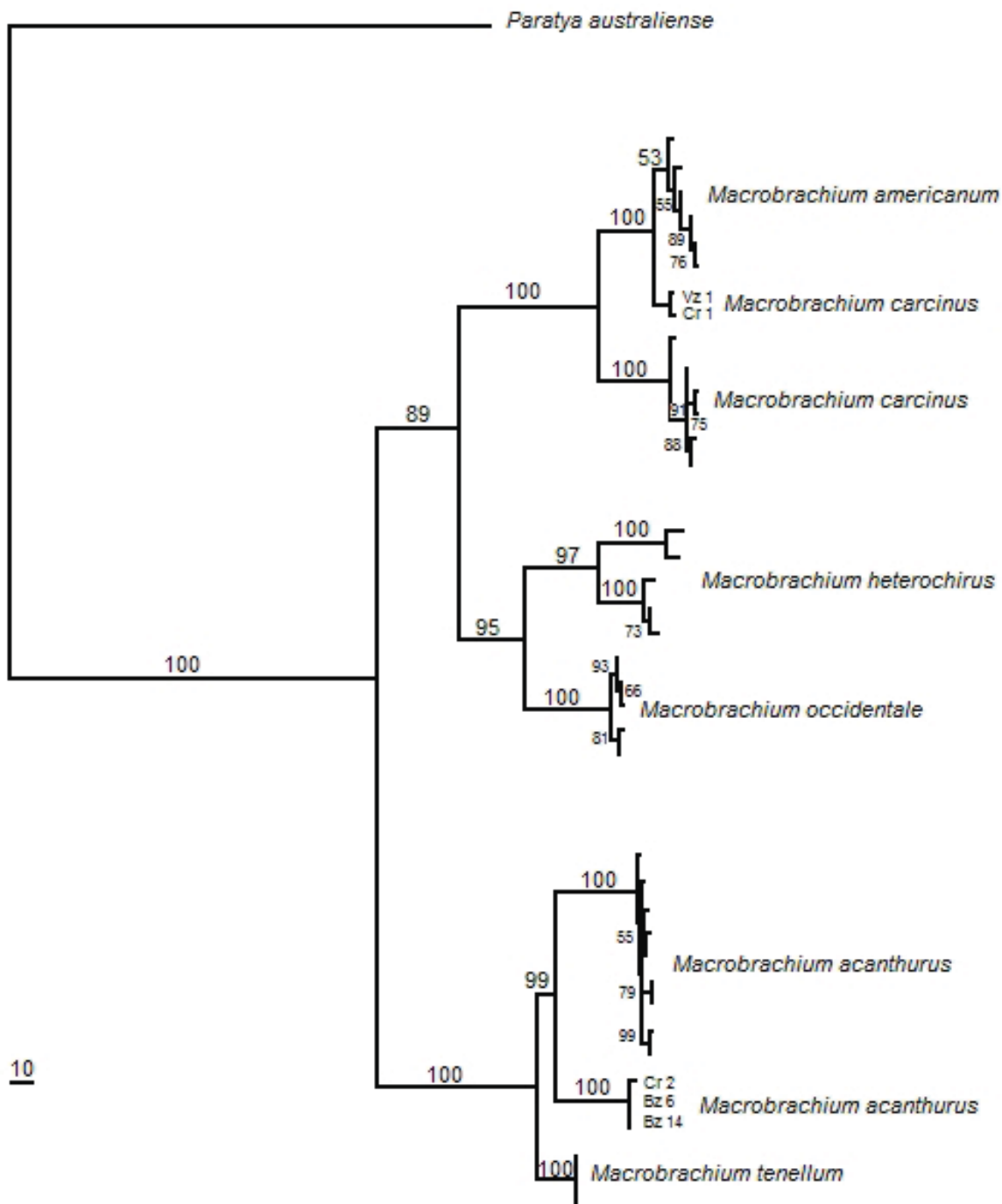
Anexo II d. Relaciones filogenéticas para especies de langostinos con DLA, a partir de secuencias de un fragmento mitocondrial del gen 16S rRNA (383 pb). Métodos de reconstrucción (A) = Distancia (NJ); (B) = Máxima Parsimonia (MP) y (C) = Máxima Verosimilitud (MV). Bootstrap de 2000, 2000 y 100 réplicas respectivamente. Gm sp = Especies Geminadas; GO = “GRUPO OLFERSI”; DLA = Desarrollo Larvario Abreviado; DLE = Desarrollo Larvario Extendido.



Anexo II e. Relaciones filogenéticas para especies de langostinos con DLA, a partir de secuencias de un fragmento mitocondrial del gen COI (528 pb). Métodos de reconstrucción (A) = Distancia (NJ); (B) = Máxima Parsimonia (MP) y (C) = Máxima Verosimilitud (MV). Bootstrap de 2000, 2000 y 100 réplicas respectivamente.



Anexo II f. Filograma de Máxima Verosimilitud (MV) para los tres pares de especies mexicanas geminadas de langostinos *Macrobrachium*. Obtenido a partir de un fragmento de 404 pb del gen 16S rDNA. Bootstrap de 500 réplicas. Vz = Venezuela, Cr = Costa Rica, Bz = Brasil. El resto de secuencias son mexicanas.



10

Anexo II g. Filograma de Máxima Verosimilitud para los tres pares de especies mexicanas geminadas de langostinos *Macrobrachium*. Obtenido a partir de un fragmento de 656 pb del gen Citocromo oxidasa I (COI), Bootstrap 500 réplicas. Vz = Venezuela, Cr = Costa Rica, Bz = Brasil resto de secuencias son mexicanas.

ANEXO III

Reseñando la historia geológica de México y los eventos que pudieron favorecer la formación del hábitat, el establecimiento, distribución y especiación del género *Macrobrachium*.

Estos sucesos, dieron inicio después de la “estabilidad” que tuvo el supercontinente de la pangea a finales de la era Paleozoica (Período Pérmico 286 – 245 Ma) y a principio de la Mesozoica (Período Triásico 245 - 208 Ma), cuando comenzó la disgregación de este supercontinente y se formaron dos grandes subcontinentes: Laurasia y Gondwana. En el período Triásico (245 – 208 ma), el Territorio Nacional formaba parte de la Pangea y solo tenía emergida una franja central, se presentaron hundimientos a lo largo de la costa Pacífica que formaron lagunas, esteros y pantanos. Incluso es posible que haya habido una conexión entre el Protoatlántico y el Pacífico a la altura de Cabo Corrientes, Jalisco. Ya que en esta zona se encontraron indicios de una geodepresión que continuó hasta el norte inundando la zona occidental de Sonora (Tamayo, 1949). López-Ramos (2001), confirman la presencia de esta depresión en la zona de Romanche, la que dio origen a la Cuenca del Golfo de México y permitió una comunicación entre el Protoatlántico y el Pacífico.

La orogenia de la porción occidental del país, particularmente en lo que ahora constituye la Península de Baja California, fue el resultado de los movimientos y colisiones entre las placas tectónicas de Farallón y la Norteamericana (Sistema de fallas de San Andrés). Estos movimientos que se iniciaron a finales del Triásico (208 Ma) y se continuaron durante el Cretácico (146 - 65 Ma) hasta el Mioceno (23 – 5 Ma) en la Era Cenozoica, promovieron la emersión de grandes bloques de la Península de Baja California, hasta completar su forma actual y su separación final de los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit. La intensa actividad tectónica y volcánica que se presentó entre esos períodos dio origen a las Sierras que la recorren longitudinalmente, así como a la mayoría de las islas que ahora forman el archipiélago del Mar de Cortés, (De Cserna, 1989; Bourillón *et al.*, 1991; Ferrusquía, 1993).

En el resto del territorio, a finales del Triásico (208 Ma), hubo un poco más estabilidad y se formaron los basamentos orográficos que posteriormente dieron origen a las sierras Madre Occidental, Oriental y del Sur. También, se formaron depresiones que abarcaron los estados de Oaxaca y Guerrero, que quedaron constituidas como aguas continentales someras, ya que al parecer hubo una transgresión marina que inundó áreas limitadas del poniente y oriente del país (De Cserna, 1989).

Fue en el período Jurásico (208 - 146 Ma), cuando el territorio mexicano formaba parte de la porción suroeste de Laurasia y solo estaba conformado por la mitad norte de lo que es ahora su extensión. En el Jurásico, el área continental se redujo conectándose el Golfo de México con el Pacífico por un corredor angosto que coincide con la desembocadura actual del Río Santiago, Nayarit. El área emergida ocupó la porción noroccidental del territorio actual e incluyó el norte de Chihuahua y Sonora, al Norte-Noreste la futura península de Baja California, así como la planicie costera de Sonora y Sinaloa. Hacia el suroeste, la planicie costera de los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, tampoco estuvo sumergida (Ferrusquía, 1993).

La transgresión marina abarcó el occidente y oriente del país, fue más prolongada y profunda que la que se presentó durante el Triásico (245 – 208 Ma), y se le ha relacionado con la apertura occidental del mar de Tethys, durante la disgregación de la Pangea. En la porción oriental del país, los movimientos de extensión de las placas de Norteamérica y Sudamérica dieron origen al Golfo de México, el que en un principio era una cuenca prácticamente cerrada.

La separación de las placas fue compleja y estuvo acompañada de la formación de gravámenes, asociados con vulcanismo basáltico, a lo largo de la costa de México y EUA. Al final del periodo Jurásico, el desplazamiento horizontal de los bloques tectónicos alcanzó una distancia de 450 km, hacia el sureste, debido a la deriva entre Yucatán y la costa del Golfo. Asociada a esta separación se presentó

una rotación y desplazamiento del bloque Yucatán, estructura que dará origen a la placa del Protocaribe a finales del Cretácico (Ortega-Gutiérrez, *et al.*, 2000; López-Román, 2001).

Durante el Cretácico (146 - 65 Ma) todos los procesos tectónicos que se iniciaron en el Jurásico se hacen más evidentes, dejando una profunda huella en la delimitación actual del territorio nacional. En el cretácico inferior, la transgresión marina se acentúa e inunda otras zonas del país y la franja noroccidental, que permaneció emergida durante el Jurásico, reduce su tamaño. La comunicación entre el Golfo de México y el Pacífico se ensancha, producto de la separación de los dos continentes Laurasia y Gondwana. Hacia el sur, solo una estrecha porción de la planicie costera de los actuales estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, se mantenía al descubierto. En la porción oriental, el Golfo de México incrementa considerablemente su amplitud, la estrecha península de los estados de Coahuila y Tamaulipas se convierte en una serie de islas (De Cserna, 1989; Ferrusquía, 1993).

En la mayor parte del Cretácico medio, se conservó la situación general de la transgresión marina, pero hacia el final del periodo las áreas sumergidas ascendieron de manera estratificada hasta alcanzar el nivel que tenían en los tiempos del Jurásico y se conserva la comunicación entre el Atlántico y el Pacífico a través del canal del Balsas. También, se infiere un levantamiento en la Sierra Madre Occidental, como resultado de procesos volcánicos y tectónicos provocados por un movimiento de subducción de la placa del Pacífico con la placa Norteamericana. El litoral del occidente se retira y la isla de la Baja California se convierte en una península (De Cserna, 1989; Ferrusquía, 1993).

En el Cretácico superior se evidencia un levantamiento generalizado del territorio mexicano en dirección oeste-este, asociado a este movimiento se presentaron pliegues y fallas que formaron montañas y valles regionales. La Península de Tamaulipas sufrió un levantamiento y posteriormente se convirtió en parte del continente, debido a que la meseta central inició también un levantamiento. Se

acentúan los fenómenos orogénicos a lo largo de la falla Clarión, que posteriormente dará origen al Eje Neovolcánico. La placa del Caribe inicia su delimitación de las placas Norteamericana y Sudamericana.

La era Cenozoica, se caracterizó por la intensa actividad orogénica que se presenta en toda la tierra. Particularmente, en el territorio mexicano se formaron o se acabaron de formar los principales accidentes orográficos del país. Esta era se puede dividir en tres fases: la primera fue, esencialmente, marina y se distinguió por los fenómenos de sedimentación marina que se registraron a lo largo del litoral del Golfo de México. La segunda fue ígnea, ya que se presentó una intensa actividad volcánica durante la cual, además, se elevó la plataforma continental hasta emerger de las aguas marinas; múltiples procesos tectónicos y de vulcanismo, formaron gran parte de la orografía actual. Por la importancia que tuvieron en la conformación topográfica, del territorio nacional, destacaron entre estos procesos:

(1) La separación de la Península de Baja California, proceso que se formó durante el período Jurásico (208 – 146 Ma) y que en los primeros períodos y hasta finales del Terciario (65 – 1.8 Ma), en la era cenozoica, presentó varios levantamientos y hundimientos. Finalmente, en el Mioceno (23 - 5 Ma), cuando la mayor parte de la península se encontraba sumergida, ocurrieron una serie de movimientos tectónicos que culminaron con su total emersión y separación del continente formando así al Golfo de California, con la apariencia actual, el cual se calcula que tiene una edad de 4,5 millones de años (Bourillón *et al.*, 1991).

(2) La formación del eje Neovolcánico que se inició durante el Oligoceno (38 - 23 Ma) y en el Mioceno superior (a principios del Plioceno 5 Ma) se presentaron fenómenos que le dieron su configuración actual. El movimiento de subducción de las placas tectónicas, de Rivera y de Cocos, repercutió directamente en la actividad de la fractura de Clarión con la erupción de gran cantidad de materia magmática y la formación de numerosos volcanes que le dieron su intrincada topografía (Cantú *et al.*, 1991; Miller y Smith, 1986). Durante el Plio-Cuaternario (5 - 1.8 Ma), por la

generación de rocas basáltica asociada con sedimentos, se formaron mesetas, sierras, picos y volcanes prominentes a través del Eje; estos últimos, se desarrollaron espectacularmente hacia la mitad oriental de la formación orográfica, como el Nevado de Toluca, el Iztaccihuatl, el Popocatepetl, la Malinche y el Pico de Orizaba (Tamayo, 1949). El eje Neovolcánico, es uno de los principales accidentes geográficos que se formaron durante el Cenozoico y constituye la cordillera montañosa en sentido este-oeste, más importante del continente americano (Halfter, 1987). Su importancia, no solo radica en la historia geológica del país sino que, desde su conformación, se convirtió en el límite biogeográfico entre las dos provincias bióticas más importantes, que se establecieron en la superficie continental de México, la Neártica y la Neotropical (Cantú, *et al.*, 1991).

(3) El desarrollo del Altiplano mexicano o Meseta Central y su origen, se remonta a finales del Cenozoico, donde se produjo una intensa actividad volcánica, una serie de reacomodos tectónicos y un constante proceso de sedimentación. Probablemente, hacia el Mioceno medio esta meseta alcanzó su máxima elevación, la lava de los volcanes cubrió grandes porciones del territorio mexicano, con ello se elevó el relieve y dio mayor altura a las montañas. Las fuertes lluvias y los vientos erosionaron los sistemas montañosos y rellenaron extensas áreas del país, procesos que sumados al levantamiento de la corteza terrestre dieron origen a la gran meseta central de México (Cantú *et al.*, 1991).

(4) El desarrollo geomorfológico final de la Sierra Madre del Sur, que se llevó a cabo entre el Terciario tardío y el Cuaternario, fue consecuencia de procesos tectónicos y magmáticos, provocados por un movimiento de subducción a lo largo de la Trincheras Media Americana (De Cserna, 1989). Los fenómenos orogénicos posteriores, que completaron el levantamiento de esta Sierra, y las lavas provenientes del Eje Neovolcánico formaron un dique que obstruyó temporalmente la salida del río Balsas creando una cuenca cerrada transitoria en donde se formó un súper lago que, hipotéticamente, abarcó gran parte del centro de México.

(5) La Sierra Madre Oriental terminó su formación durante el Cenozoico, con la acumulación de sedimentos en los pliegues de las pequeñas cordilleras que se formaron durante el Cretácico. Después de que las cadenas montañosas terminaron su levantamiento, se formaron depósitos fluviolacustrines en los valles intermontanos y en las cuencas (Cantú *et al.*, 1991).

(6) De la misma forma, la Sierra Madre Occidental finaliza su levantamiento durante el Cenozoico, particularmente, en la porción sur de su extensión se registraron procesos de vulcanismo que arrojaron lavas y productos piroclásticos, que se acumularon en los márgenes orientales de la Sierra, rellenando valles y cuencas, y dándole una inclinación más suave a esta vertiente. Es probable que el levantamiento que sufrió la Sierra Madre Occidental entre el Oligoceno (38 – 23 Ma) y Mioceno (23 – 5 Ma), haya sido provocado por los movimientos tectónicos que se presentaron durante la apertura del Golfo de California.

(7) Por último, el levantamiento gradual de la Península de Yucatán, el sur de Chiapas y parte de Tabasco, que se había iniciado al final del Cretácico (65 Ma), se continuó hasta la mitad o finales del Mioceno (23 – 5 Ma).

La secuencia sedimentaria indica que los mares epicontinentales someros de esta región se redujeron gradualmente durante principios del Terciario (65 Ma), transformándose en una zona de levantamientos asociada a la actividad tectónica que se presentó en lo que constituye hoy Centroamérica. Durante el Cuaternario (1.8 Ma) el mar retrocedió aún más dejando al descubierto parte de Tabasco y la Península de Yucatán; a fines del Pleistoceno (1.8 Ma – 11.000 a) los terrenos aluviales se transformaron en zona continental y llegaron a adquirir la extensión que presentan en la actualidad.

El corto periodo Cuaternario (a partir de los pasados 1.8 Ma), se caracterizó por una intensa actividad volcánica, por la presencia de la última glaciación en las latitudes altas del planeta y por una fase de pluvialismo, producto del deshielo de

las grandes capas glaciares que cubrieron una extensa porción de los continentes (Tamayo, 1949).

En México, el estado glacial quedó circunscrito en una curva de nivel irregular por arriba de los 3,300 msnm; por lo tanto, las depresiones por debajo de esta altitud fueron colmadas por grandes avalanchas de lodos, durante la fase del pluridiluvismo. Estos fenómenos dejaron una marca evidente en el altiplano meridional, donde los acarreo de origen diluvial causaron azolves de cuencas y grandes acumulaciones de material fragmentario y piroclástico (Tamayo, 1949).

La tercera fase ocurrida en la era cenozoica fue lacustre, las cuencas originadas durante los procesos tectónicos fueron cerradas por invasiones de rocas ígneas, que formaron barreras naturales y cerraron los cursos de agua con su consecuente acumulación. De esta forma se originaron lagos como el de Chapala, en Jalisco; los de Sirahuen y Pátzcuaro en Michoacán, así como el de Yuriria en Guanajuato (Tamayo, 1949; Miller y Smith, 1986).

LITERATURA CITADA

Bourillón, L., Cantú, A., Eccardi, F., Lira, E., Velarde, E., Ramirez, J., Zavala, A. 1991. Islas del Golfo de California. 2a Ed. Secretaría de Gobernación-Universidad Nacional Autónoma de México. México. 292 pp.

Cantú, A., Eccardi, F., Lira, E., Ramirez, J., Serrato, M., Zavala, Y. 1991. México diverso. Un encuentro con su naturaleza. ISSSTE. 255 pp.

De Cserna, Z. 1989. An outline of the geology of Mexico (p. 223-264). IN: A. W. Bally y A. R. Palmer (eds.), The geology of North America. An overview. The Geological Society of America, Vol. A.

Ferrusquilla, I. 1993. Geology of Mexico: A synopsis. 3-107 p. In: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot & J. Fa (eds.), Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press. New York. 812 pp.

Halfter, G., 1987. Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. Ann. Rev. Entomol., 32: 95-114.

López-Ramos, E., 2001. Evolución tectónica de América Central, del Sur y el Caribe (p. 15-22) In: J. Llorente y J. J. Morrone (eds.), Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: Teorías, conceptos, métodos y aplicaciones. 277 pp.

Miller, E., Smith, 198X. Origin and geography of the fishes of central Mexico (p. 491-517). In: C. H. Hocutt y E. O. Wiley, (EDS.), The zoogeography of North American freshwater fishes. John Wiley & Sons, New York. 866 pp.

Ortega-Gutiérrez, F., Sedlock, R. L., Spedd, R. C., 2000. Evolución tectónica de México durante el Fanerozoico (p. 3-59). In: J. Llorente, E. González y N. Papavero (eds.), Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento. UNAM, CONABIO y BAYER. 676 pp.

Tamayo, J. L., 1949. Geografía general de México. Geografía física. Cooperativa de los Talleres Gráficos de la Nación. México. Tomo I. 628 pp.

ANEXO IV. PUBLICACION

Molecular phylogeny of Mexican species of freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae: Palaemoninae)

Filogenia molecular de las especies mexicanas de camarones dulceacuícolas del género *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae: Palaemoninae)

Eliana Paola Acuña Gómez,^{1,2} Fernando Álvarez,³ José Luis Villalobos Hiriart³ and Luis E. Eguiarte⁴

¹Laboratorio de Ecología Molecular, Centro Regional Fundación CEQUA (R13A1002), 21 de mayo N° 1690, Punta Arenas – Chile

²Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n C.P. 04510. México

³Colección Nacional de Crustáceos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-15 Coyoacán, México, D. F., 04510. México

⁴Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México.

Apartado Postal 70-275, Coyoacán, México, D. F., 04510. México
e-mail: ag.paola@gmail.com

Acuña Gómez E. P., F. Álvarez, J. L. Villalobos Hiriart and L. E. Eguiarte. 2013. Molecular phylogeny of Mexican species of freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae: Palaemoninae). *Hidrobiológica* 23 (3): 399-409.

ABSTRACT

Molecular phylogenetic analyses of 16 species of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* from Mexico are presented. The phylogenetic reconstructions are based on partial sequences from 16S rDNA mitochondrial gene. The results show a clear separation of the species with extended larval development (ED) from those with abbreviated larval development (AD). Within the ED clade, the species of the Olfersii Group clustered together, which is in agreement with their morphological similarity, whereas the position of the three pairs of geminate species within this clade suggests different origins. Five Mexican species are grouped into a single clade suggesting a common origin in a species with few larval stages and relatively large eggs. The estimated time of evolutionary divergence suggests that the ED and AD clades diverged in the Middle Eocene; the three geminate pairs differentiated at different times, and the species of the AD group originated during the Early Pliocene.

Key words: *Macrobrachium*, mitochondrial r16S, phylogenetic reconstruction.

RESUMEN

Se presenta una filogenia molecular para las 16 especies mexicanas de camarones dulceacuícolas del género *Macrobrachium*. La reconstrucción filogenética está basada en secuencias parciales del gen mitocondrial 16S ADNr. Los resultados muestran una clara separación entre las especies con desarrollo larval extendido (ED) y las de desarrollo larval abreviado (AD). Dentro del clado ED se agrupan las especies del Grupo Olfersii, taxa morfológicamente similares, aunque la posición de los tres pares de especies geminadas dentro de este clado sugiere diferentes orígenes para las mismas. Las cinco especies mexicanas con AD se agruparon en un solo clado, sugiriendo un origen común de las especies con pocos estadios larvales y ovas relativamente grandes. El tiempo de divergencia evolutiva estimado sugiere que los clados ED y AD se separaron en el Eoceno medio que los tres pares de especies geminadas presentaron diferentes tiempos de divergencia evolutiva y que las especies del clado AD se originaron durante el Plioceno temprano.

Palabras clave: *Macrobrachium*, r16S mitocondrial, reconstrucción filogenética.

INTRODUCTION

The freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* are successful decapods with a circumtropical distribution. Species occupy a wide variety of habitats, such as estuaries, coastal lagoons, lakes, rivers (from the coastal plain to an altitude of 1100 m), sinkholes and caves. Approximately 75% of the species have an extended larval development (ED) with 10-12 larval stages. At different stages these species require brackish water to complete their development. Adults of *Macrobrachium* species may be associated to estuaries as well or can be permanent freshwater inhabitants. The other 25% of species correspond to those with strictly freshwater species characteristics typical of abbreviated larval development (AD) with only 1-3 larval stages (Sollaud, 1923; Jalihal *et al.*, 1993; Álvarez *et al.*, 2002; Gonzalez, 2002). Females lay up to 70 large eggs, rich in vitelium. After 58 days on average, the egg hatches an advanced form that quickly reaches the juvenile stage (Sollaud, 1923; Boschi, 1961; Holthuis, 1952; Shokita, 1977; Gamba, 1980; Rodríguez, 1982; Pereira, 1985, 1986, 1989, 1993; Pereira & García, 1995; Magalhaes & Walker, 1988; Mashiko, 1992; Bueno & de Almeida, 1995; Álvarez *et al.*, 2002; González, 2002). To date, more than 200 species are described and there are numerous yet undescribed cryptic species (Cai *et al.*, 2004; Short, 2004). All the species within the genus show a highly conserved morphology. The species identity has been traditionally based on: the shape and dentition of the rostrum, and the shape, ornamentation and relative length of the articles of the second pair of pereopods (Holthuis, 1950, 1952; Villalobos, 1967a, 1982; Jayachandran, 2001). Some species groups were proposed based on morphological similarities, mainly of the rostrum and the second pereopod (Johnson, 1973). The phylogenetic affinities between *Macrobrachium* world species has not been resolved, even when in the last decade major contributions like Murphy and Austin (2002, 2003, 2004, 2005) who based on studies of mitochondrial DNA (mtDNA), 16S rDNA and cytochrome c oxidase I (COI) gene, have contributed to the classification of Australian species of *Macrobrachium*. Liu *et al.* (2007), also using mitochondrial DNA sequences, have contributed in molecular systematics of East Asia; Pileggi and Mantelatto (2010) analyzed the phylogeny of Indo-Pacific species and some American species of *Macrobrachium*. In Mexico, nineteen species of *Macrobrachium* have been recorded, three of them have been reported only once: *M. quelchi* De Man, 1900, in the Otolun River, east from Palenque, Chiapas (Rodríguez de la Cruz, 1965); *M. nattereri* Heller, 1862 in the Sierra River, Tabasco (Rodríguez de la Cruz, 1965) and *M. jelskii* Miers, 1877 nearby the Port of Veracruz, Veracruz (Wicksten, 2005). However, given the lack of other records in Mexico and the likelihood of misidentifications, these species are not included in this study. The remaining 16 species are widely distributed on both Pacific and Atlantic slopes or their records have been well documented, however their relations have not been previously determined.

Eleven of the Mexican *Macrobrachium* species have ED. Six of these species (three pairs) share similar morphology and they are considered to be geminate species or twin sibling species, where every geminated species inhabits an opposite side of the geographic barrier that separates them (Jordan, 1908). At the present study geminate species are separated by the continental mass, so one of the pair species is present along the Pacific slope of the Americas and the other one along the Atlantic slope. The three species that are found along the Pacific slope are: *M. tenellum* (Smith, 1871); *M. americanum* Bate, 1868; *M. occidentale* Holthuis, 1950, and their respective geminate pairs along the Atlantic slope are: *M. acanthurus* (Wiegmann, 1836); *M. carcinus* (Linnaeus, 1758) and *M. heterochirus* (Wiegmann, 1836). The remaining ED species have amphiamerican distributions, *M. hobbsi* Villalobos & Nates, 1990 and *M. offersii* (Wiegmann, 1836) or are only distributed along the Pacific slope, such as *M. digueti* (Bouvier, 1895), *M. acanthochirus* Villalobos, 1967b, and *M. michoacanus* Villalobos & Nates, 1990.

In an early study of Mexican *Macrobrachium* species based on the similarity on the morphology of the second pereopod, Villalobos (1967a) proposed that the "Olfersii Group" included six species from Mexico, Central and South America: *M. digueti*, *M. acanthochirus*, *M. hancocki* Holthuis, 1950, *M. faustinum* de Saussure, 1857; *M. crenulatum* Holthuis, 1950, and *M. offersii*, and suggested that they probably derived from a type species similar to *M. offersii*. Villalobos (1967a) hypothesized that both, the Isthmus of Tehuantepec and the Isthmus of Panama played a significant role in the diversification of this species group. Recently, Hernández *et al.* (2007) based on a morphological study of the *Macrobrachium* species distributed along the Baja California Peninsula, suggested the synonymy of *M. acanthochirus* with *M. digueti*, a proposal that could modify the original Olfersii Group.

From the five Mexican species of *Macrobrachium* with AD, *M. villalobosi* Hobbs, 1973b and *M. acherontium* Holthuis, 1977 are stygobitic with adaptations to cave life. The other three *M. tuxtlaense* (Villalobos & Álvarez, 1999), *M. vicconi* (Román *et al.*, 2000) and *M. totonacum* (Mejía *et al.*, 2003) are epigeic species, occurring in geographically isolated springs or small streams distant from the coast. None of the species with AD co-occur with species with ED. The populations of species with AD are small genetically structured, have no gene flow among them and are highly endogamic (low genetic variation), characteristics that favour genetic differentiation (Acuña, 2002). The first description of *Macrobrachium* species with AD in Mexico was that of *M. tuxtlaense* (Villalobos & Álvarez, 1999) followed by that of *M. vicconi* (Román *et al.*, 2000) and *M. totonacum* (Mejía *et al.*, 2003). However, a careful examination of voucher specimens from the Colección Nacional de Crustáceos (CNCR) at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), revealed that a number of popula-

tion samples dated from 1921, were collected from the states of Chiapas, Oaxaca, Veracruz and Tabasco and had small females carrying few large eggs, a characteristic typical of species with AD. Despite the difficulty in finding enough characters to describe new species within the *Macrobrachium* with AD, it is clear that many more species from southern Mexico will be recognized in the future.

The 16S rDNA mitochondrial gene is a structural, non-coding gene that has been widely used in phylogenetic and phylogeographic studies of crustaceans (Bucklin *et al.*, 1995; Crandall & Fitzpatrick, 1996; Kitaura *et al.*, 1998; Crandall *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2002; Murphy & Austin, 2002, 2003, 2004, 2005), basically because their maternal inheritance, its rapid substitution rates, and because permit to test if speciation patterns of endemic species result from multiple lineages or from a single event, and allow to elucidate cryptic species that are difficult to distinguish using more-traditional techniques (Schubart *et al.*, 2000; Knowlton, 2000; Ellis *et al.*, 2006).

The objective of the present study was to infer the molecular phylogenetic relations of the Mexican representatives of *Macrobrachium* species based on partial sequences of the 16S rDNA mitochondrial gene and by using sequences available from GenBank and to test various hypotheses on the origin of geminate species, the conformation of Olfersii Group and the divergence between species with ED and AD.

MATERIALS AND METHODS

We used two specimens of each of the 16 species of *Macrobrachium* described for Mexico until 2007. We worked with biological material preserved in the CNCR of the Institute of Biology, UNAM; for seven of these species was possible to work with type series (Table 1). Several external groups were selected as out-groups for the analysis as follows: *Paratya australiensis* Kemp, 1917, from Australia (GenBank accession number AF374469) was selected because it has been used in several phylogenetic analyses of species of *Macrobrachium*, making it a useful reference for comparisons (Murphy & Austin, 2003; 2005), five species of the related genera *Palaemon* and *Palaemonetes* (subfamily Palaemoninae) were included in the analysis: *Palaemon northropi* Rankin, 1898, from Ubatumirin, Brasil (CNCR), (GenBank accession number JF491339); *Palaemon serenus* Heller, 1862, from Hopkins River, Victoria, Australia (GenBank accession number AF439518); *Palaemonetes atrinubes* Bray, 1976, from Australia (GenBank accession number AF439520); *Palaemonetes australis* Dakin, 1915, from Australia (GenBank accession number AF439517) and *Palaemon intermedium* Stimpson, 1860 from Swan River, Western Australia, (GenBank accession number AF439516).

DNA Extraction, amplification and sequencing. DNA was extracted from abdominal muscle samples (0.5-1.0 g). The tissue was

fragmented and digested for 24 h at 57 °C in a solution containing: 500 µl STE buffer, 10 mg/ml of proteinase K and 75 µl of 10% SDS. DNA extraction was carried out using a phenol-chloroform-isoamyl alcohol technique (Hillis *et al.*, 1996). A fragment of the 16S rDNA gene was amplified by PCR using primers developed by Vázquez-Bader *et al.* (2004) for penaeid shrimp: 16ScF (5' GAC CGT GCG AAG GTA GCA 3'), 16 ScR (5' AAT TCA ACA TCG AGG TCG CA 3'). The amplification reaction was prepared in a final volume of 50 µl containing: 5 µl of 10x PCR buffer, 0.4 mM of each dNTP, 0.8 µM of each primer, 0.4 mM MgCl₂, 1 unit of Taq polymerase, 2 µl of DNA extract and bi-distilled water. The PCR amplification was done in a 9700 PE Applied Biosystems Cyclor under the following temperature profile: initial denaturation 95 °C for 3 min, 30 cycles of 95 °C for 30 sec, annealing temperature of 50 °C for 30 sec, extension temperature of 72 °C for 30 sec, and additional extension of 72 °C for 3 min. PCR products were purified with a Qiagen QIA quick PCR Purification Kit with a final recovery volume of 50 µl. The purified PCR products were sequenced following a standard Perkin-Elmer protocol; the final sequence reaction was carried out using a final volume of 10 µl containing ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, v. 3.0 polymerase (Applied Biosystems) and the corresponding oligonucleotides. The incorporated dideoxynucleotides were removed through Sephadex filtering (G-25 Sigma). The purified products of the sequence reaction were sequenced in both directions in an automatic ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) sequencer.

Phylogenetic reconstruction. Electropherograms from each sample were manually aligned and edited using CHROMAS 2.01 (Pro Version, Technelysium Pty Ltd) and Sequencer (Gene Codes) to create a consensus sequence for each species. The initial sequence alignment was done with CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) and multiple alignments with BIOEDIT (Hall, 1997-2001). Pairwise sequence comparisons provided an assessment of levels of saturation when plotting the number of transitions and transversions against the uncorrected proportional distances (p-distances) for each pair of unique sequences. Sequences were analyzed with DNAMAN 4.15 (bio soft 1994-2001, Lynnon Corporation, Quebec, Canada) to determine the genetic distance/identity matrix and the similarity percentages among sequences. Aligned sequences were imported into PAUP 4.0b (Swofford, 1998) to run Minimum Evolution (ME), Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood (ML) analyses.

Inter and intra-specific genetic distances were calculated using the Kimura (1980) 2-parameter model with the pairwise deletion option in the MEGA 4 program (Tamura *et al.*, 2007).

The best-fit model of evolution for ML was obtained with MODELTEST 3.7 (Posada & Crandall, 1998) using the Hierarchical Likelihood Ratio test (Huelsenbeck & Crandall, 1997). For the ML analysis (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) heuristic searches were performed with 100 random replicates as sequence additions; the

Table 1. Mexican species of the genus *Macrobrachium* sequenced for a fragment of the 16S rDNA gene. Collecting site and Ocean slope are indicated as well as habitat, larval stage, and identification number at the CNCR and GenBank.

Species	Collection locality	Slope	Habitat	Larval development	Type Series Catalog number in CNCR	GenBank Access Number
<i>M. acanthochirus</i> Villalobos, 1966	Chamela, Jalisco	Pacific	Epigeal	Extended	—	KF383299
<i>M. acanthurus</i> Wiegmann, 1836	Los Tuxtlas, Veracruz	Atlantic	Epigeal	Extended	—	KF383300
<i>M. acherontium</i> Holthuis, 1977	Oaxaca	Atlantic	Caves	Abbreviated	8694	KF383301
<i>M. americanum</i> Bate, 1868	Chamela, Jalisco	Pacific	Epigeal	Extended	—	KF383302
<i>M. carcinus</i> (Linnaeus, 1758)	Veracruz	Atlantic	Epigeal	Extended	—	KF383303
<i>M. digueti</i> (Bouvier, 1895)	Baja California Sur	Pacific	Epigeal	Extended	—	KF383304
<i>M. heterochirus</i> (Wiegmann, 1836)	Los Tuxtlas, Veracruz	Atlantic	Epigeal	Extended	13333	KF383305
<i>M. hobbsi</i> Villalobos & Nates, 1990	Pijijiapan, Chiapas	Amphiamerican	Epigeal	Extended	2239a	KF383306
<i>M. michoacanus</i> Villalobos & Nates, 1990	Michoacán	Pacific	Epigeal	Extended	3550	KF383307
<i>M. occidentale</i> Holthuis, 1950	Chamela, Jalisco	Pacific	Epigeal	Extended	—	KF383308
<i>M. olfersii</i> (Wiegmann, 1836)	Chamela, Jalisco	Amphiamerican	Epigeal	Extended	—	KF383309
<i>M. tenellum</i> (Smith, 1871)	Chamela, Jalisco	Pacific	Epigeal	Extended	—	KF383310
<i>M. totonacum</i> Mejía, Álvarez & Hartnoll, 2003	River San Antonio, Oaxaca	Atlantic	Epigeal	Abbreviated	19915	KF383311
<i>M. tuxtlaense</i> Villalobos & Álvarez, 1999	Lake Catemaco, Veracruz KF383312	Atlantic	Epigeal	Abbreviated	13174	
<i>M. vicconi</i> Román, Ortega & Mejía, 2000	Ocosingo, Chiapas	Atlantic	Epigeal	Abbreviated	17034	KF383313
<i>M. villalobosi</i> Hobbs, 1973b	Cave of San Gabriel, Oaxaca	Atlantic	Caves	Abbreviated	19220	KF383314

confidence level was determined with 100 non-parametric bootstrap replicates and 10 sequence additions. Maximum Parsimony and ME analyses were carried out through heuristic searches with 2000 non-parametric bootstrap replicates. A Bayesian Analysis (BA) was performed with MrBAYES 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) by running a Markov chain Monte Carlo algorithm for 10 millions of generations, sampling 1 tree every 100 generations starting with a random tree. A burn-in value of 10,000 generations was applied before obtaining a 50% majority rule consensus tree was obtained from the remaining saved trees. An additional 50% majority consensus tree was computed using all the obtained reconstructions with PAUP 4.0b (Swofford, 1998), computing the bootstrap values for: ME, MP and ML analyses and Posterior Probabilities for the BA analysis.

The divergence times between the ED and AD clades and between the nodes that support the geminate species pairs were estimated under a molecular clock model with the ML reconstruction using the Langley-Fitch method with r8s (Sanderson, 2002a). The fossil species *Palaemon antonellae* (Garassino & Bravi, 2003)

from the lower Cretaceous (99-112 million years ago, mya) was used for calibration at the well-supported node where *Macrobrachium* separates from *Palaemon* and *Palaemonetes*. Estimates were obtained using two values, 99 and 112 mya for this particular calibration point.

RESULTS

A total of 385 base pairs were aligned, excluding primers and ambiguous regions, of which 179 were variable and 133 parsimony-informative. The best-fit model selected with the Hierarchical Likelihood Ratio test was the Hasegawa-Kishino-Yano model (Hasegawa *et al.*, 1985), accounting for invariable positions and differential substitution rates under a gamma distribution; the specific parameters under this model (HKY+I+G) are as follows: nucleotide frequencies A = 0.318, C = 0.100, G = 0.185, T = 0.396; substitution model with a transition/transversion ratio = 3.625; proportion of invariable sites I = 0.368; variable sites followed a gamma distribution with shape parameter = 0.622.

The four methods of phylogenetic analysis resolved similar results, particularly the trees obtained with ME and MP. Topologies obtained with ML (two trees) and BA (two selected trees) were also similar, but with few variations in the position of the *M. acanthurus*-*M. tenellum* and *M. hobbsi*-*M. olfersii* geminate pairs. Based on the few observed changes, high congruency across the four different methodologies and their agreement to current taxonomic classification we will direct the remaining analyses and discussion to the tree obtained by MP (Fig. 1).

The Mexican species of *Macrobrachium* form a monophyletic group resolving two well defined and statistically supported clades: one including the 11 species with ED and a second clade with the five AD species (Fig. 1). The species in the two clades diverged on average 14%, corresponding to a maximum of 54 nucle-

otides (Table 2). The monophyly of the *Macrobrachium* species is well supported; with the species of *Palaemonetes* and *Palaemon* clearly forming a sister group (Fig. 1).

Within the AD clade, the average similarity among sequences was 96%, corresponding to a minimum of four and a maximum of 30 nucleotide substitutions (Table 2). From the five species in the clade, the most divergent is *M. vicconi* with a similarity of 93% (Table 2; Fig. 1); whereas *Macrobrachium villalobosi* is the only species in all four topologies that resolves on its own, not grouping in to any node. The genetic distances among AD species seems to be independent of being epigeal or stygobitic. The epigeal species, *M. tuxtlaense*, has a similar genetic distance (0.030) with the epigeal species *M. totonacum* and with the stygobitic *M. villalobosi*. A similar result occurs between the stygobitic spe-

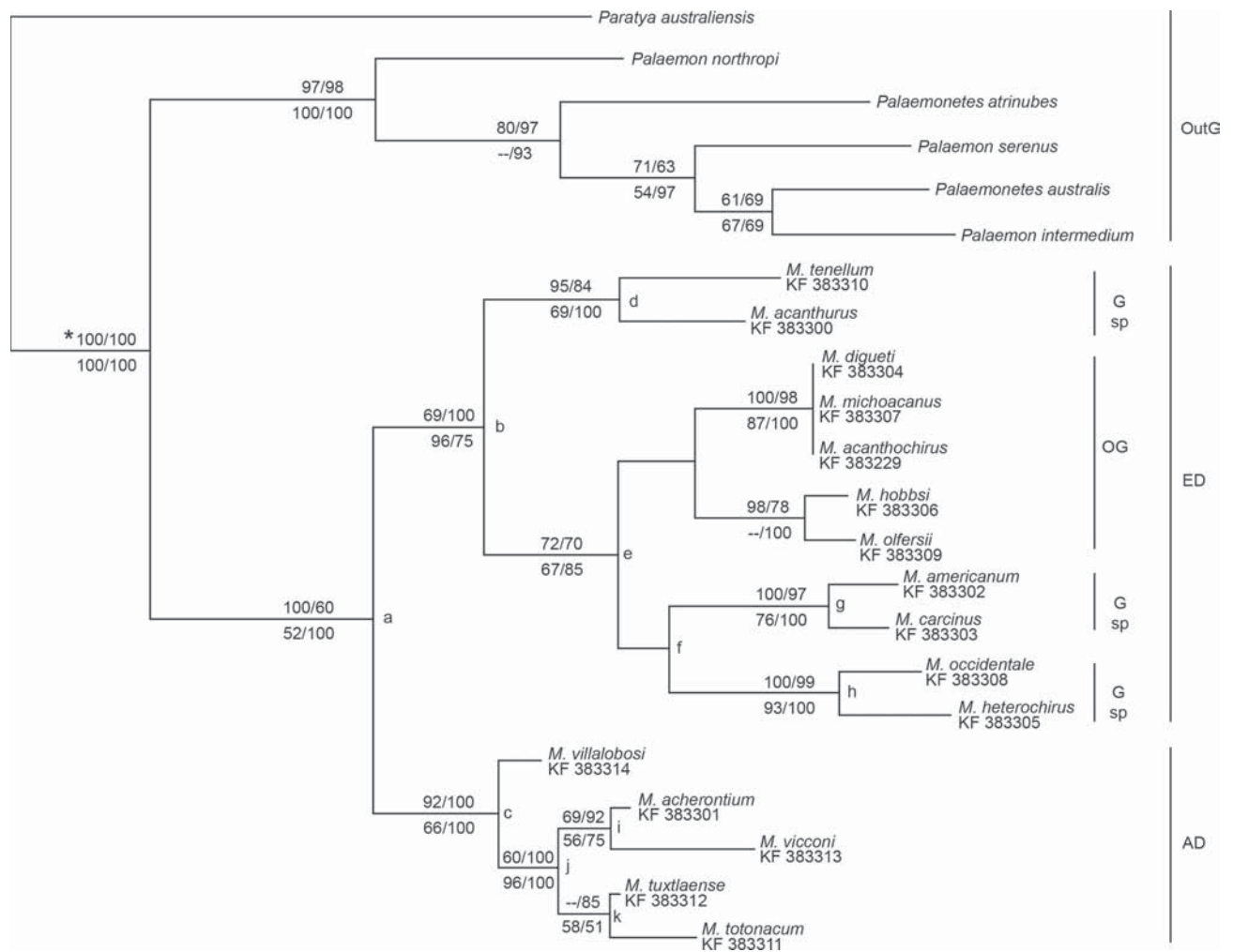


Figure 1. Parsimony tree for the 16 species of Mexican *Macrobrachium* generated from the analysis of 380 base pairs of the 16S rDNA gene. Bootstrap values of MP/ME are above the branch, and ML/Posterior Probabilities of BA are below the branch. Letters to the right of nodes denote nodes for which divergence estimates were obtained (Table 3). AD, species with abbreviated larval development; ED, species with extended larval development; OG, species in the Olfersii Group; G sp, geminate species and (*) calibration point.

Table 2. Genetic distances (above diagonal) and number of nucleotide substitutions (below diagonal) for the 16 species of *Macrobrachium* included in this study, based on a 380 bp fragment of the 16S rDNA gene.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>M. tenellum</i>		0.075	0.129	0.129	0.129	0.131	0.132	0.139	0.129	0.129	0.129	0.167	0.134	0.144	0.124	0.145
2. <i>M. acanthurus</i>	29		0.134	0.134	0.134	0.118	0.118	0.131	0.129	0.134	0.131	0.151	0.126	0.136	0.116	0.142
3. <i>M. digueti</i>	49	47		0.000	0.000	0.059	0.065	0.097	0.094	0.099	0.115	0.151	0.124	0.136	0.134	0.153
4. <i>M. michoacanus</i>	49	47	0		0.000	0.059	0.065	0.097	0.094	0.099	0.115	0.151	0.124	0.136	0.134	0.153
5. <i>M. acanthochirus</i>	49	47	0	0		0.059	0.065	0.097	0.094	0.099	0.115	0.151	0.124	0.136	0.134	0.153
6. <i>M. hobbsi</i>	50	45	23	23	23		0.013	0.105	0.102	0.088	0.102	0.134	0.110	0.125	0.110	0.147
7. <i>M. olfersi</i>	50	45	25	25	25	5		0.102	0.099	0.091	0.110	0.134	0.111	0.112	0.111	0.142
8. <i>M. americanum</i>	53	50	37	37	37	40	39		0.024	0.115	0.123	0.151	0.126	0.136	0.132	0.145
9. <i>M. carcinus</i>	49	49	36	36	36	39	38	9		0.113	0.115	0.147	0.124	0.133	0.129	0.142
10. <i>M. occidentale</i>	49	53	38	38	38	34	35	44	43		0.048	0.151	0.129	0.141	0.124	0.153
11. <i>M. heterochirus</i>	49	50	44	44	44	39	42	47	44	18		0.151	0.129	0.144	0.121	0.155
12. <i>M. acherontium</i>	64	58	58	58	58	53	52	58	56	58	58		0.020	0.037	0.037	0.064
13. <i>M. tuxtleense</i>	53	48	47	47	47	42	43	48	47	50	49	8		0.030	0.030	0.070
14. <i>M. totonacum</i>	55	52	52	52	52	47	43	52	51	54	55	4	12		0.044	0.071
15. <i>M. villalobosi</i>	48	45	53	53	53	42	43	51	49	46	46	4	12	17		0.078
16. <i>M. vicconi</i>	55	54	59	59	59	56	54	56	55	59	60	25	27	27	30	

cies, *M. acherontium*, (genetic distance 0.037) and the stygobitic species *M. villalobosi* and the epigeic *M. totonacum*. However, when comparing among the five AD species, *M. tuxtleense* and *M. acherontium* are the closest genetic species (genetic distance 0.020). While *M. vicconi*, has a greater genetic distance with other AD species (Table 2).

The ED clade groups 11 species in two main subgroups, the first one containing the geminate pair *M. tenellum*-*M. acanthurus* which differ 8% from each other and 13% on average from the rest of the species in the subgroup (Table 2; Fig. 1). The second subgroup is divided into two resolved nodes, each with a pair of geminate species: *M. americanum*-*M. carcinus*, with 98% similarity and *M. occidentale*-*M. heterochirus*, with 95% similarity; and the Olfersii Group, which includes the species proposed by Villalobos (1967a): *M. digueti*, *M. olfersi* and *M. acanthochirus*, this analysis also includes *M. michoacanus* and *M. hobbsi*. *Macrobrachium olfersii* and *M. hobbsi* have 99% similarity, whereas *M. digueti*, *M. michoacanus* and *M. acanthochirus* have 100% similarity and consequently form an unresolved trichotomy (Fig. 1).

The divergence time analyses using the Langley-Fitch method indicate that the molecular change rates were not constant. Therefore, the age of the clades was then estimated through the penalized maximum likelihood test (Sanderson, 2002b), a semiparametric method that allows the molecular clock assumption and independent calibrations (Table 3). The estimated divergence time between the ED and AD clades ranged between 47.8 and 41.7 mya.

Table 3. Estimated divergence times at selected branch nodes for *Macrobrachium*, with particular calibrations for 99 and 112 mya, obtained through the penalized maximum likelihood test.

Node	99 mya	112 mya
a	41.69	47.82
b	29.55	33.07
c	8.71	9.02
d	16.04	16.11
e	12.50	14.81
f	17.80	20.35
g	1.92	2.03
h	4.32	4.98
i	5.48	5.96
j	4.99	6.14
k	4.07	4.52

Within the ED clade, the geminate pair *M. acanthurus*-*M. tenellum* shows an early separation from the rest of the subgroup, with a divergence of 16.1-16.0 mya from each other; the other two geminate pairs suggested a later formation, *M. heterochirus*-*M. occidentale* 4.9-4.3 mya and *M. americanum*-*M. carcinus* 2.0-1.9 mya. Within the AD clade, it is suggested that the five species included in this subgroup appeared 9.0-8.7 mya, with the more recent separation of *M. tuxtleense* and *M. totonacum* occurring 4.5-4.0 mya.

DISCUSSION

The nucleotide frequencies obtained for the 16S rDNA gene fragment studied here are similar to those reported by Murphy and Austin (2005) for 30 species of *Macrobrachium* around the world.

The results of the four methods used to infer the phylogenetic relationships of the *Macrobrachium* species from Mexico were highly congruent. We selected the tree obtained with MP in order to further discuss the relationships of these species, basically because with this method we obtained one single tree and because it better reflects current taxonomic information (Villalobos, 1967b; Hernández *et al.*, 2007). The two most important features of the analyses are that the Mexican *Macrobrachium* species form a monophyletic group and that the species with ED are clearly separated from those with AD. Although the resolved monophyly of the group is not surprising when only Mexican species are included in the analysis, it is important to highlight it, particularly *a posteriori* in testing if the hypothesis of the monophyly of the Mexican group is retained when including the characteristic separation of a single clade for species with DA and another with species with ED, and to probe it in the overall phylogeny of the genus.

Compiled information from several studies of crustaceans using r16S sequences revealed that the levels of variation estimated among con-generic species range from 2 to 17% (Sunoughi *et al.*, 1997; Ponniah & Hughes, 1998; Jarman *et al.*, 2000; Tong *et al.* 2000; Murphy & Austin, 2002, 2003, 2004, 2005; Lefebure *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007). The results presented herein show a range of variation from 0 to 16.7%, with the maximum genetic difference observed between *M. acherontium*, a cave adapted species with AD, and *M. tenellum*, an epigeal, estuarine species with ED.

Species with abbreviated development. The marked ontogenetic and morphological divergence between *Macrobrachium* species with ED from those with AD has promoted the idea of considering them as two separate lineages that split very early in the history of the group during the Cretaceous, being all the species with AD closely related (Pereira & García, 1995) (the AD species are more closely related among them than to those ED species). However, the worldwide distribution of species with AD can also suggest independent origins in each geographic region (Murphy & Austin, 2005). In other words, the species with AD from South America, for example, are probably the result of different invasion events of the freshwater habitat relative to those species present in southern Mexico.

The phylogeny resolved in this study, also suggest the divergence between the species with ED from those with AD. The mean genetic difference between the two groups was 14% or 54 nucleotides. This difference could be used to erect two different genera, as Pereira and García (1995) proposed. However, AD is

a widespread characteristic among the *Macrobrachium* species and it is also present in several other related palaemonid genera, so it may not be a very informative character as has been concluded in a similar study (Murphy & Austin, 2005). Furthermore, the emergence of AD in every lineage has not been analyzed within a phylogenetic context in order to determine if: a) it has arisen one or many times, b) it has evolved several times, with each event corresponding to a different geographic region, and c) it has a different origin relative to ED or if one gave rise to the other one.

In contrast to those ideas other authors proposed a more recent origin of this fauna placing major radiations in the Miocene (Murphy & Austin, 2005) and the origin of AD in post-Miocene or Pliocene times (Shokita, 1979a; b; Villalobos, 1982; Magalhaes & Walker, 1988; Mashiko, 1992).

The Olfersii Group. In our study, the species in the Olfersii Group clustered together in agreement to Villalobos (1967b). Low genetic differences (below 2%) were found among all of the species within this clade. For *M. digueti*, *M. michoacanus* and *M. acanthochirus* the resolved sequences were identical. Hernández *et al.* (2007) described in detail the misunderstanding on the morphology of *M. digueti* and *M. acanthochirus*, which prompted Villalobos (1967b) to describe *M. acanthochirus*. Furthermore, the morphological analyses of *M. digueti* and *M. acanthochirus* by Hernández *et al.* (2007) are supported by our molecular data, both in agreement to the synonymization of *M. acanthochirus*. Interestingly, in our analysis *M. michoacanus* also exhibited a 100% similarity to *M. digueti* and *M. acanthochirus*; however, as Hernández *et al.* (2007) concluded, the morphology of *M. michoacanus* clearly separates this species from *M. digueti*. We agree with his result after the examination of specimens of both species. This apparent contradiction deserves further studies in order to determine if in fact *M. michoacanus* represents a different species, or to elaborate more on the nature of this species complex. Synonymization of species based on evidence drawn from mitochondrial genes alone should be avoided as processes such as introgressive hybridization can have a confounding effect (Sites & Crandall, 1997; Harrison, 2004).

The remaining two species in the Olfersii Group, *M. hobbsi* and *M. olfersii*, with 99% genetic similarity can be distinguished by morphological analyses. However, both species exhibit a certain degree of variation and have an amphiamerican distribution (with co-occurrence in the same localities both on the Pacific and the Atlantic coasts; Villalobos Hiriart & Nates Rodríguez, 1990; Hernández *et al.*, 2007), two conditions that can create uncertainty in their identification.

Geminate species. The geographic separation of a species with widespread distribution and a continuous gene flow for an extended period of time due to the formation of geographical barriers (ei. oceans, deserts or ridges), lead to the conformation of two

big but isolated populations, with restricted gene flow and with adaptations to local environments that lead to their independent evolution and geographic speciation (Jordan, 1908; Knowlton *et al.*, 1993; Knowlton 2000). The formation of the Isthmus of Panama led to the isolation of many species populations, particularly aquatic, which currently inhabit both the Pacific and Atlantic oceanic slopes, but which are subjected to independent evolution, an example of them are shrimps of the genus *Alpheus*, for which seven species pairs have been reported, with one unit of each pair located on each of the oceanic slopes, maintaining considerable morphological similarity but completely genetic isolated, therefore they are recognized as sibling species or geographic. Molecular evidence indicated that these morphologically similar *Alpheus* species are genetically different and that divergence followed after the geographical barrier, in this case the Isthmus of Panama (Knowlton *et al.*, 1993; Knowlton, 2000).

In this study of *Macrobrachium*, the close relationship between the species in the geminate pairs is clearly represented in the phylogenetic analysis. Their positions resolved by MP, ME and ML analyses suggest that the splitting of the pairs occurred at different times, although previously all three pairs were believed to have derived as a result of the closing of the Isthmus of Panama (Villalobos, 1982; Camacho *et al.*, 1997). In this study the divergence time estimates derived from calibrating the molecular clock with an unrelated event, which is the record of the fossil species *Palaemon antonellae* (Garassino & Bravi, 2003), can be used to test if the closing of the Isthmus was the single most important event in the formation of the geminate pairs or if there were other processes involved in their differentiation.

The divergence time estimate of 16.1-16.0 mya obtained for the *M. acanthurus*-*M. tenellum* pair clearly sets back their splitting well before the formation of the Isthmus of Panama. Assuming that the ancestor of both *M. acanthurus* and *M. tenellum* had a widespread distribution along the coast of the Chortis Block, which consisted of Guatemala, Honduras and Nicaragua, the northward movement of the southern Central America land mass and its final connection with the Chortis Block, could have separated the primitive species giving rise to the two species. This geological setting is depicted in Iturralde-Vinent and MacPhee (1999) for the Middle Miocene. Coates *et al.* (1992) have proposed that the Isthmus of Panama started forming 12.9-11.8 mya, at a time when these two species had already diverged. Interestingly, although the most genetically different of the geminate pairs, the morphological separation of specimens of the two species without knowing where they were collected can be very difficult since their rostrum and second pair of pereopods are extremely similar and both species also exhibit a high degree of geographic variation (Camacho *et al.*, 1997).

According to our results, the pair composed by *M. heterochirus*-*M. occidentale* split 4.9-4.3 mya, an estimate that is clearly

related to the formation of the Isthmus of Panama. Although the final closure of the Isthmus is situated at 3.5-3.1 mya, this was a gradual process that had probably started by the end of the Miocene (7.0-6.3 mya) when a rising of the coastal areas occurred as indicated by the fauna of foraminiferans (Coates *et al.*, 1992). Thus, the differentiation of *M. heterochirus* and *M. occidentale* could be attributed to the barrier that was effectively operating before the final closure of the Isthmus. Morphologically, the two species can be distinguished by the more robust second pereopod of *M. occidentale*, since the relative proportions of the articles of the second pereopod of both species are almost identical (Holthuis, 1952).

The third geminate pair, composed by *M. carcinus* and *M. americanum* diverged 2.0-1.9 mya. In this case the two species started diverging long after the Isthmus of Panama had closed, a scenario that suggests that other processes, such as the adaptation to different hydrological regimes along both continental slopes, might have influenced their differentiation. Among the three geminate pairs of *Macrobrachium*, this pair contains the two most morphologically similar species and their correct identification depends on knowing where they were collected.

The different divergence estimates obtained for the three geminate pairs in this study are consistent with those views that consider the emergence of the Isthmus of Panama as a gradual process that took place over at least 3.0 my (Coates *et al.*, 1992). Marko (2002) questioned the validity of using the time of the final closure of the Isthmus as the fixed time at which all geminate pairs originated. It seems unlikely that the differentiation of populations for all taxa occurred exactly when water exchange between the eastern Pacific and Caribbean ceased, and thus molecular clock calibrations based on this final event ignore the long previous process. Knowlton and Weigt (1998) using multiple geminate pairs of the genus *Alpheus* identified the staggered speciation pattern as we do in this study; however, studies with one or a few geminate pairs and no independent calibrations might be underestimating divergence times.

Therefore at least three important events have been involved in the differentiation of the Mexican species of *Macrobrachium*. First, there is an early separation of the species with ED from those with AD, probably due to a generalized invasion of the freshwater habitat in the Middle Eocene that originated the ancestral freshwater stock from which the five species with AD later derived. Second, within the clade with ED, the Olfersii Group is formed with highly adaptable forms, two species remain with amphiamerican distributions and a species complex emerges with moderate morphological variability and low genetic variation whose differentiation is not yet completely understood. Third, also within the ED clade, species with large distribution ranges on both continental slopes were impacted by the formation of Central

America and then by the closure of the Isthmus of Panama, giving rise to the geminate pairs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is part of the doctoral thesis of Acuña Gómez EP. supported by Grant PhD student abroad, Universidad Nacional Autónoma de México, Quaternary Studies Center Fire Patagonia and Antarctica (CEQUA) and CONICYT Center GORE Magellan. Special thanks to the Laboratory of Carcinology of the Institute of Biology for their logistical support during collection of live specimens; to M. en C. Laura Márquez Valdebenito of the Laboratory of Molecular Biology where this work was realized.

REFERENCES

- ACUÑA, E. P. 2002. Estructura genética, variación isoenzimática y morfología de tres poblaciones de *Macrobrachium* spp. de Veracruz y Tabasco, México. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología de Sistemas y Recursos Acuáticos), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 187 p.
- ÁLVAREZ, F., J. L. VILLALOBOS & R. ROBLES. 2002. Abbreviated larval development of *Macrobrachium tuxtlaense* Villalobos y Álvarez, 1999 reared in the laboratory. *Crustaceana* 75: 717-730.
- BOSCHI, E. E. 1961. Sobre el primer estadio larval de dos especies de camarones de agua dulce (Crustacea, Palaemonidae). *Actas y Trabajos del 1° Congreso Sudamericano de Zoología* 2: 69-77.
- BUCKLIN, A. B., W. FROST & T. D. KOCHER. 1995. Molecular systematics of six *Calanus* and three *Metridia* species. *Marine Biology* 121: 655-664.
- BUENO, S. L. & S. DE ALMEIDA. 1995. Abbreviated larval development of the freshwater prawn, *Macrobrachium iheringi* (Ortmann, 1897) (Decapoda: Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana* 68: 665-686.
- CAI, T., P. NAIYANETR & P. K. L. NG. 2004. The freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* Bate, 1868, of Thailand (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Natural History* 38: 581-649.
- CAMACHO, M. E., F. ÁLVAREZ & J. L. VILLALOBOS. 1997. Langostinos (Decapoda: Palaemonidae). In: González, E., R. Dirzo & R. Vogt (Eds.). *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Instituto de Biología, UNAM. México. pp. 411-414.
- COATES, A. G., J. B. C. JACKSON, L. S. COLLINS, T. M. CRONIN, H. J. DOWSETT, L. M. BYBELL, P. JUNG & J. A. OBANDO. 1992. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Bulletin* 104: 814-828.
- COSTA, F., J. R. DE WAARD, J. BOUTILLIER, S. RATNASINGHAM, R. DOOH, M. HAJIBABAEI & P. HEBERT. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64 (2): 272-295.
- CRANDALL, K. & J. F. FITZPATRICK. 1996. Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biology* 45: 1-26.
- CRANDALL, K., J. W. FETZNER, S. H. LAWLER, M., KINNERSLEY & C. M. AUSTIN. 1999. Phylogenetic relationships among the Australian and New Zealand genera of freshwater crayfishes. *Australian Journal of Zoology* 47: 199-214.
- DANIELS, S. R., B. A. STEWART & P. A. COOK. 2002. Congruent patterns of genetic variation in a burrowing freshwater crab revealed by allozymes and mtDNA sequence analysis. *Hydrobiologia* 468: 171-179.
- ELLIS, J. S., M. E. KNIGHT, C. CARVELL & D. GOULSON. 2006. Cryptic species identification: a simple diagnostic tool for discriminating between two problematic bumblebee species. *Molecular Ecology Notes* 6: 540-542.
- GAMBA, L. 1980. Desarrollo larval abreviado del camarón de agua dulce *Macrobrachium jelskii* (Miers, 1877). In: *Biología, Ecología y Cultivo de Organismos Acuáticos*. Simposio 16. Editorial Equinoccio, Caracas. pp. 169-189.
- GARASSINO, A. & S. BRAVI. 2003. *Palaemon antonellae* new species (Crustacea, Decapoda, Caridea) from the Lower Cretaceous "Platylodomite" of Profeti (Caserta, Italy). *Journal of Paleontology* 77: 589-592.
- GONZÁLEZ, L. 2002. Desarrollo larval de *Macrobrachium* sp. (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) en condiciones de laboratorio. Tesis Profesional, Facultad de Estudios Superiores- Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- HALL, T. 1997-2001. BioEdit. Biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT Department of Microbiology. North Carolina State University. Available on line at: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>.
- HARRISON, J. S. 2004. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austynixia* (Decapoda: Pinnotheridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 743-754.
- HASEGAWA, M., H. KISHINO & T. YANO. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- HERNÁNDEZ, L., G. MURUGAN, G. RUIZ-CAMPOS & A. MAEDA-MARTÍNEZ. 2007. Freshwater shrimp of the genus *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) from the Baja California Peninsula, Mexico. *Journal of Crustacean Biology* 27: 231-369.
- HILLIS, D. M., C. MORITZ & B. K. MABLE. 1996. *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland. 655 p.
- HOLTHUIS, L. B. 1950. The Palaemonidae collected by the *Siboga* and *Snelius* expeditions, with remarks on other species. I. *The Decapoda of the Siboga Expedition. Part X. Siboga Expeditie, Monograph* 39: 1-268.

- HOLTHUIS, L. B. 1952. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. *Occasional Papers of the Allan Hancock Foundation* 12: 1-396.
- HUELSENBECK, J. P. & K. CRANDALL. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 437-466.
- HUELSENBECK, J. P. & F. RONQUIST. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- ITURRALDE-VINENT, M. A. & R. D. E. MACPHEE. 1999. Paleogeography of the Caribbean region: implications for the Cenozoic biogeography. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 238: 1-95.
- JALIHAL, D. R., K. N. SANKOLLI & S. SHENOY. 1993. Evolution of larval development patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda: Palaemonidae). *Crustaceana* 65: 365-376.
- JARMAN, S. N., N. G. ELLIOT, S. NICOL & A. McMINN. 2000. Molecular phylogenetics of circumglobal *Euphausia* species (Euphausiacea: Crustacea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 57: 51-58.
- JAYACHANDRAN, K. V. 2001. *Palaemonid Prawns: Biodiversity, Taxonomy, Biology and Management*. Science Publishers, Enfield. 640 p.
- JOHNSON, D. 1973. Notes on some species of the genus *Macrobrachium*. *Journal of the Singapore National Academy of Science* 3: 273-291.
- JORDAN, D. S. 1908. The law of geminate species. *American Naturalist* 42: 73-80.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- KITaura, J., K. WADA & M. NISHIDA. 1998. Molecular phylogeny and evolution of unique mud-using territorial behaviour in ocypodid crabs (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Molecular Biology and Evolution* 15: 626-637.
- KNOWLTON, N., L. A. WEIGT, L. A. SOLÓRZANO, D. K. MILLS & E. BERMINGHAM. 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive incompatibility across the isthmus of Panama. *Science* 260: 1629-1632.
- KNOWLTON, N. & L. A. WEIGT. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London* 265: 2257-2263.
- KNOWLTON, N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420: 73-90.
- LEFÉBURE, T., C. J. DOUADY, M. GOUY & J. GIBERT. 2006. Relationship between morphological, taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetic Evolution* 40 (2): 435-47.
- LIU, M., Y. CAI & C. TZENG. 2007. Molecular systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. *Zoological Studies* 46 (3): 272-289.
- MAGALHAES, C. & I. WALKER. 1988. Larval development and ecology distribution of central Amazonian palaemonid shrimps (Decapoda: Caridea). *Crustaceana* 55: 279-292.
- MARKO, P. B. 2002. Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2005-2021.
- MASHIKO, K. 1992. Genetic egg and clutch size variations in freshwater prawn populations. *Oikos* 63: 454-458.
- MEJÍA, L. M., F. ÁLVAREZ & R. HARTNOLL. 2003. A new species of freshwater prawn, *Macrobrachium totonacum* (Decapoda, Palaemonidae), with abbreviated development from Mexico. *Crustaceana* 76: 77-86.
- MURPHY, N. P. & C. M. AUSTIN. 2002. A preliminary study of 16S rDNA sequence in Australian *Macrobrachium* shrimps (Palaemonidae: decapoda) reveals inconsistencies in their current classification. *Invertebrate Systematics* 16: 697-701.
- MURPHY, N. P. & C. M. AUSTIN. 2003. Molecular taxonomy and phylogenetics of some species of Australian palaemonid shrimps. *Journal of Crustacean Biology* 23: 169-177.
- MURPHY, N. P. & C. M. AUSTIN. 2004. Phylogeography of the widespread Australian freshwater prawn, *Macrobrachium australiense* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Biogeography* 31: 1065-1072.
- MURPHY, N. P. & C. M. AUSTIN. 2005. Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zoologica Scripta* 34: 187-197.
- PEREIRA, G. 1985. Freshwater shrimps from Venezuela. III. *Macrobrachium quelchi* (de Man) and *Euryrhynchus pemoni* sp. (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from La Gran Sabana. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 98: 615-621.
- PEREIRA, G. 1986. Freshwater shrimps from Venezuela I. Seven new species of Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 99: 198-213.
- PEREIRA, G. 1989. Cladistics, taxonomy, biogeography and the evolutionary history of the Palaemoninae (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). Ph.D. Dissertation, University of Maryland, College Park, Maryland. 350 p.
- PEREIRA, G. 1993. A description of a new species of *Macrobrachium* from Peru and distributional records for *Macrobrachium brasiliense* (Heller) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 106: 339-345.
- PEREIRA, G. & J. GARCÍA. 1995. Larval development of *Macrobrachium reyesi* (Decapoda: Palaemonidae) with a discussion on the origin of abbreviated development in palaemonids. *Journal of Crustacean Biology* 15: 117-133.

- PILEGGI, L. G. & F. L. MANTELATTO. 2010. Molecular phylogeny of the fresh-water prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebrate Systematic* 24: 194-208.
- PONNIAH, M. & J. M. HUGHES. 1998. Evolution of Queensland spiny mountain crayfish of the genus *Euastacus* Clark (Decapoda: Parastacidae): preliminary 16S mtDNA phylogeny. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 119: 9-19.
- POSADA, D. & K. A. CRANDALL. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- RODRÍGUEZ, G. 1982. Fresh-water shrimps (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Orinoco River Basin and the Venezuelan Guayana. *Journal of Crustacean Biology* 2: 378-391.
- RODRÍGUEZ DE LA CRUZ, M. C. 1965. Contribución al conocimiento de los palemónidos de México II. Palemónidos del Atlántico y vertiente oriental de México con descripción de dos especies nuevas. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Biológico-Pesqueras* 1: 72-112.
- ROMÁN, R., L. ORTEGA & L. MEJÍA. 2000. *Macrobrachium vicconi*, new species, a fresh-water shrimp from a rain forest in southeast Mexico, and a comparison with congeners (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology* 29: 186-194.
- SANDERSON, M. J. 2002a. User's manual. Computer program and documentation available from <<http://phylo.ucdavis.edu/r8s/r8s.html>>
- SANDERSON, M. J. 2002b. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* 19: 101-109.
- SCHUBART, C. D., J. E. NEIGEL & D. L. FELDER. 2000. Use of the mitochondrial 16S rDNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacean. *Crustacean Issues* 12: 817-830.
- SHOKITA, S. 1977. Abbreviated metamorphosis of landlocked fresh-water prawn, *Macrobrachium asperulum* (Von Martens) from Taiwan. *Announcements Zoologicae Japonenses* 50: 110-122.
- SHOKITA, S. 1979a. The distribution and speciation of the inland water shrimps and prawns from the Ryukyu Islands II. *Bulletin of the College of Science, University of the Ryukyus* 28: 193-278.
- SHORT, J. W. 2004. A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Hydrobiologia* 525: 1-100.
- SITES, J. W. & K. A. CRANDALL. 1997. Testing species boundaries in biodiversity studies. *Conservation Biology* 11: 1289-1297.
- SOULLAD, M. E. 1923. Le développement larvaire des "palaemoninae" I. Partie descriptive. La condensation progressive de L' ontogenése. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* 57: 509-603.
- SUNO-UGHI, N., F. SASAKI, S. CHIBA & M. KAWATA. 1997. Morphological stasis and phylogenetic relationships in tadpole shrimps *Triops* (Crustacea: Notostraca). *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 439-457.
- SWOFFORD, D. L. 1998. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (*and Other Methods) v. 4.0 beta 10. Sunderland, Sinauer Associates.
- TAMURA K., J. DUDLEY, M. NEI & S. KUMAR. 2007 MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIK, F. JEANMOUGIN & D. HIGGENS. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4673-4680.
- TONG, J. G., T. Y. CHAN & K. H. CHU. 2000. A preliminary phylogenetic analysis of *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) based on mitochondrial DNA sequences of selected species from the Indo-West Pacific. *Journal of Crustacean Biology* 20: 541-549.
- VÁZQUEZ-BADER, A. R., J. C. CARRERO, M. GARCÍA-VARELA, A. GRACIA & J. P. LACLETTE. 2004. Molecular phylogeny of the superfamily Penaeoidea Rafinesque-Schmaltz, 1815, based on mitochondrial 16S partial sequence analysis. *Journal of Shellfish Research* 23: 911-917.
- VILLALOBOS, A. 1967a. Problemas de especiación en América de un grupo de Palaemonidae del género *Macrobrachium*. Actas de Conferencia Científica Mundial sobre Biología y Cultivo de Camarones y Gambas. *FAO Document FR: BCSP/67/E/62*: 1-11.
- VILLALOBOS, A. 1967b. Estudio de los Palaemónidos de México. I. *Macrobrachium acanthochirus* una nueva especie del SE de México. *Anales Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 25: 167-174.
- VILLALOBOS HIRIART, J. L. & J. C. NATES RODRÍGUEZ. 1990. Dos especies nuevas de camarones de agua dulce del género *Macrobrachium* Bate, (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae), de la vertiente occidental de México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 61: 1-11.
- VILLALOBOS, A. 1982. Decapoda. In: Hurlbert, S. H. & A. Villalobos (Eds.). *Aquatic Biota of Mexico, Central America and West Indies*. San Diego State University, San Diego. pp. 215-239.
- VILLALOBOS, J. L. & F. ÁLVAREZ. 1999. A new species of *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), with abbreviated development, from Veracruz, México. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 112: 746-753.
- WICKSTEN, M. K. 2005. Palaemonid shrimps. In: Hernández-Aguilera, J. L., J. A. Ruiz-Nuño, R. E. Toral-Almazán & V. Arenas-Fuentes (Eds.). *Camarones, Langostas y Cangrejos de la Costa Este de México*. Ecolnatura - CONABIO, Mexico. pp. 67-98.

Recibido: 9 de mayo de 2013.

Aceptado: 4 de septiembre de 2013.