

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**



**ESTRUCTURA GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DE  
POBLACIONES DE *Girardinichthys multiradiatus*  
(Meek, 1904), EN DOS CUENCAS HIDROLÓGICAS  
DEL ESTADO DE MÉXICO**

**T E S I S**

Para obtener el título de:

**B I Ó L O G O**

Presenta:

**Francisco Javier Vallejo Cruz**

**Doctor Elías Piedra Ibarra**

Director de tesis

Los Reyes Iztacala, Estado de México. 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Agradecimientos

Agradezco y dedico el presente trabajo a mis padres: Herlinda y Francisco, que siempre estuvieron apoyándome en momentos difíciles; tanto emocional, moral y económicamente. Por formarme a su imagen e ideales. Sin ellos, nada de lo que soy, sería.

A mi compañera Brenda, con quien he compartido casi la mitad mi vida. Que siempre ha estado para escucharme y dejar escucharla. Con quién he vivido y compartido los momentos más significantes de mi vida. Sin ella, habría poco motivo de hacer lo que hago.

A mi hijo Roldán, quién ha compartido casi toda su vida conmigo. Quien me ha enseñado lo importante de la vida a pesar de su poca existencia, y que siempre hay algo por lo que luchar y levantarse al siguiente día. Sin él, no estaría donde estoy ahora.

A mi hermano Omar y hermanas Jennifer y Dulce, que siempre han estado para poner ese toque interesante a lo monótono y llenar de gritos y risas el vacío de la existencia.

A mis amistades de la carrera: Victor (Vic), Ivan (El Raz, El Iguano), a Omar (El Barret), a Francisco (El Francis), a Brenda (La Mishka, Lezama), a Nayeli (La Naye), a Pamela (La Pam), a Jessica (La Jezz) y demás. Los caminos por los que andamos, a veces no podemos preverlos. Tampoco la compañía. Pero si pudiera volver a escoger la compañía por los nuevos caminos que deparan, no dudaría en escogerlos a todos ellos. “Somos *Ka-tet*, uno de muchos, de muchos uno”

A Fernanda, que siempre rebuscaba en las tesis las dedicatorias, soñando poder dedicar una a su amor “Ema”, pero que un mesotelioma apartó del camino antes de tiempo, tanto de la carrera, como de nuestras vidas.

A mi director de tesis, el Doctor Elías Piedra. De él aprendí no solo a trabajar en el laboratorio, sino el *cómo* trabajar. Por su paciencia, por su flexibilidad, su disposición, su comprensión, gracias.

A mis asesores, tanto formales como informales. A la Doctora Diana Moreno, a la Doctora Myriam Aguilar, al Maestro (y doctorante) Antonio “Toño” Jiménez. De ellos aprendí no sólo técnicas de análisis, además de sus correcciones, sugerencias y acertadas propuestas, sino también me transmitieron la pasión hacía la biología, la genética y la evolución.

A mis profesores de carrera, que me transmitieron, cada uno a su manera, los conocimientos y su pasión por el gran mundo de la biología.

A todos y cada uno, mencionado o -no voluntariamente- olvidado, gracias.

“No apunto con mi mano.

El que apunta con su mano, ha olvidado el rostro de su padre.

Apunto con mi **ojo**.

No disparo con mi mano.

El que dispara con su mano, ha olvidado el rostro de su padre.

Disparo con mi **mente**.

No mato con mi pistola.

El que mata con su pistola, ha olvidado el rostro de su padre.

Mato con mi **corazón**.”

“**Disparo con mi mente**”

*Juramento del Pistolero. La Torre Oscura. Stephen King.*

“No juzgues según la apariencia; siempre hazlo con la **evidencia**.

No hay mejor regla.”

Great Expectations. Charles Dickens

# Índice

Resumen .....	1
Introducción.....	2
Antecedentes .....	11
Justificación .....	12
Hipótesis .....	13
Objetivos .....	13
Área de estudio. ....	14
Materiales y Métodos.....	15
Resultados y análisis.....	18
Diversidad genética .....	18
Distancia genética .....	20
AMOVA y $F_{ST}$ .....	21
Inferencias filogenéticas .....	24
Red de haplotipos.....	26
Demografía histórica.....	27
Nicho ecológico .....	29
Discusión .....	32
La estructura poblacional en <i>G. multiradiatus</i> .....	32
Inferencias filogeográficas de <i>G. multiradiatus</i> .....	35
Unidades Evolutivas Significativas y conservación de <i>G. multiradiatus</i> . ..	36
Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	40

## Resumen

*Girardinichthys multiradiatus* presenta alto dimorfismo sexual y variación conductual entre sus poblaciones, por lo que se ha propuesto que deben presentar una fuerte estructuración y alta divergencia genética, como pasa con otras especies de goodeidos dimórficos. Hasta el momento, no se han reportado evidencias que apoyen esa propuesta. El uso del barcoding con el gen mitocondrial COI ha dado éxito en la identificación de especies crípticas, conservación de especies y análisis filogeográficos. Con este recurso se realizó un análisis genético de las poblaciones de *G. multiradiatus* localizadas en dos cuencas del Estado de México con el fin de calcular su diversidad genética, calcular su distancia genética, determinar si existe estructura genética, inferir las relaciones filogeográficas de las poblaciones y determinar el nicho ecológico que ocupan las distintas poblaciones. Se realizó un muestreo en las poblaciones donde habita el organismo, posteriormente se realizó extracción de ADN nucleico utilizando el reactivo DNAzol y se amplificó el gen mediante PCR. Se encontraron ocho haplotipos, todos ellos privados a su correspondiente cuenca, y distintos valores de diversidad genética, siendo la población de El Molino la más diversa. Se encontró baja distancia genética en las poblaciones dentro del Lerma y del Pánuco, exceptuando El Molino, que fue alta. La distancia entre cuencas también fue alta. Los haplotipos mostraron ser en su mayoría monofiléticos para cada cuenca, sin embargo, todos los haplotipos encontrados en El Molino tienen un origen común dentro de esa localidad. La demografía histórica muestra de manera global cuellos de botella recientes, seguido de una expansión poblacional. El nicho ecológico de las poblaciones mostró ser similar, excepto por Brockman y Salazar, e Ignacio Ramírez y El Molino, que fueron similares entre sí. Se encontró que las poblaciones de *G. multiradiatus* se estructuran bajo el modelo de jerarquía por corriente, donde el curso de los ríos determina la estructura genética de las poblaciones. También se encontró que las poblaciones forman 3 UES no descritas previamente, que pueden ser consideradas para planes de conservación de la especie. Por sus características, El Molino es la población con mayor interés para futuras investigaciones.

## **Introducción**

En la naturaleza, los organismos se encuentran distribuidos en poblaciones, las cuáles establecen diversas interacciones con poblaciones de otras especies y con las condiciones ambientales. De esa manera, su persistencia a través del tiempo requiere de un equilibrio entre cualidades de la población con el medio circundante. Así a través del tiempo las poblaciones establecen relaciones de las que depende el mantenimiento de todas ellas. La desaparición o extinción de alguna ocasiona alteraciones en el estado que la evolución biológica había logrado. Una de las cualidades intrínsecas de las poblaciones necesarias para persistencia en el tiempo es la variación tanto morfológica y fisiológica, que están determinadas por la variación genética. De manera general se considera que una población con variación elevada tendrá mayor capacidad de adaptarse a diversas presiones ambientales.

Así pues, el afán de mantener las poblaciones naturales requiere en primera instancia de determinar su composición genética, es decir determinar si la interacción de esa población con el medio y con las poblaciones interactuantes no ha generado una disminución en su variabilidad. Una herramienta importante para esta finalidad es la Genética de Poblaciones, con ella podemos determinar las cualidades genéticas de poblaciones aisladas y con esa información elaborar programas de manejo tendientes al mantenimiento o recuperación de las que han sido afectadas.

### **La genética poblacional y la estructura genética**

El estudio de las poblaciones biológicas, -grupo de organismos que pueden reproducirse-, es complejo debido a la dificultad para medir y evaluar cada individuo que las compone. Por esta razón, la genética de poblaciones es una herramienta importante para su estudio. Básicamente consiste en el estudio de las frecuencias alélicas y su variación, generada por mutaciones y recombinación, en tiempo y espacio como resultado la acción de fuerzas evolutivas como la selección natural y deriva genética por mencionar algunas. En esta disciplina el concepto de estructura

genética poblacional (estructura poblacional o estructura geográfica) combina elementos de la demografía y la genética poblacional (Janes y Batista, 2016). Así, decimos que una población biológica se encuentra estructurada cuando, genéticamente se desvía del estado determinado por la reproducción en la cual el azar determina la pareja reproductiva (Barton et al.,2007).

Una población puede estar constituida por componentes con flujo genético restringido (subpoblaciones), La ausencia de flujo genético entre las subpoblaciones puede deberse a causas etológicas, geográficas, ecológicas o incluso biológicas. En estos casos nuevas mutaciones surgidas en las subpoblaciones se vuelven “exclusivas” favoreciendo así la divergencia y estructura genética. La divergencia entre las subpoblaciones se acelera por efecto de su tasa de mutación y el tamaño de la descendencia, por otro lado se retrasa debido al flujo genético entre ellas (Chakraborty, 1993).

El estudio de la estructura genética contribuye a la comprensión de la demografía y también al de la genética poblacional de las especies. Los métodos genéticos proveen nueva información sobre la demografía y el proceso evolutivo, a su vez el proceso evolutivo ayuda a comprender la naturaleza de la variación genética. De este modo, el estudio de la estructura genética aporta conocimiento a la ecología y evolución de los organismos (Rodderick, 1996).

### **Filogeografía.**

La filogeografía es una disciplina de la genética de poblaciones, mediante la cual se analiza la distribución geográfica de linajes para inferir la historia de las poblaciones, subespecies y especies (Emerson y Hewitt, 2005).

Los análisis filogeográficos resultan del uso de ADN mitocondrial para elaborar filogenias y su integración con la distribución geográfica. Los análisis filogeográficos dan, de esta manera, una perspectiva histórica a la estructura genética poblacional, esclarecen orígenes geográficos, rangos de expansión y



contracción de las poblaciones, así como los efectos de cambios ambientales y climáticos en los eventos de dispersión de las poblaciones (Janes y Batista, 2016).

Una meta de la filogeografía es usar los recursos genéticos para inferir las fuerzas históricas y contemporáneas que producen la configuración genealógica actual de las poblaciones sabiendo que la genealogía puede verse afectada por cambios demográficos y/o eventos geológicos (Avice, 2009). Además de la importancia que tiene para comprender la historia de las especies, la filogeografía tiene un papel importante en la biología de la conservación y en la comprensión del proceso de especiación (Avice, 2001).

### **El Código de Barras y la sistemática molecular.**

El término “código de barras genético” (*DNA Barcoding*) hace referencia al uso de una secuencia de ADN estandarizada para la identificación rápida y precisa de las especies. La región genética estandarizada en animales para usarse como código de barras es un fragmento de aproximadamente 658 pb del gen *COI* (Citocromo Oxidasa I) contenido en el genoma mitocondrial (Valentini et al., 2008). Esta secuencia ha demostrado ser útil en 98% de los estudios realizados con peces provenientes de mares australianos. Este marcador también ha sido utilizado junto con marcadores de origen nuclear, para la reconstrucción filogenética a un nivel superior de especie (Ward et al., 2005).

La secuencia COI ha permitido la rápida y precisa identificación de varios taxa y también ha servido para revelar especies no reconocibles a simple vista (especies crípticas) en varios grupos animales (Arif y Khan, 2009). En miembros de las familias Sciaenidae y Cyprinodontiformes, se ha usado diversos propósitos; desde la identificación de nuevas especies hasta análisis filogeográficos (Pfleiderer et al. 2014; Lakra et al. 2009; Kreiser et al. 2001).

## **Análisis molecular y la conservación de especies.**

La información provista por las herramientas moleculares, incluyendo el barcoding y la filogeografía, han sido aprovechadas para la conservación de varias especies de peces. Li y colaboradores en el 2016 realizaron un análisis filogeográfico con marcadores nucleares (RAG-2), y mitocondriales (16r RNA y Cytb), en *Gymnodypticus dybowskii* en China. Encontraron al menos tres unidades evolutivas significantes (ESU, *Evolutionary Significant Units*), correspondientes a tres subespecies. Estos linajes demostraron ser únicos e imposibles de recuperar una vez perdidos. Se pone especial énfasis en la especie de la cuenca Junggar, debido a su baja diversidad genética y su alta estructura geográfica.

Por otro lado, Domingues et al en el 2018, analizaron la diversidad genética, conectividad genética y filogeografía usando la secuencia completa del gen mitocondrial y su región control en *Carcharhinus signatus* en el océano Atlántico occidental. Se encontró poca conectividad entre las regiones norte y sur, proponiéndolas como unidades de manejo (UM) diferentes para su protección.

Guo y colaboradores en el 2019 realizaron un análisis filogeográfico con dos regiones mitocondriales (Cyt b y Región Control) y siete microsatélites con *Schizothorax waltoni* en el Tíbet así, se pudo definir al menos una ESU, sin embargo, se propusieron tres UM diferentes para su protección y aprovechamiento. Gracias a sus resultados, se encontró que los peces de la región oeste son diferentes a la de la población *Mainling*, donde se estaba llevando a cabo un programa de *re stock* con peces de otras poblaciones, por lo que incitan a cancelar o replantear el programa para evitar la pérdida de la diversidad en esa población.

### *Condiciones que favorecen la divergencia genética o evolución*

La evolución biológica, es el conjunto de cambios o transformaciones acaecidas en las poblaciones a través del tiempo y han originado la diversidad de especies que hoy existen sobre la tierra. Estos eventos son resultado de varios factores y mecanismos que influyen de distintas formas. Los factores geográficos producen una distribución particular de los individuos; los cambios climáticos

determinan que ciertas especies puedan adaptarse. Los factores genéticos tales como, mutación y recombinación son las fuentes de variación que al ser moldeadas por la selección natural o bien la deriva génica podrán dar lugar a la divergencia genética. Un alto grado de divergencia podría ocasionar aislamiento reproductivo entre los miembros de una especie favoreciendo así el proceso de especiación. Como es evidente, el proceso de divergencia y especiación se ve favorecido por la heterogeneidad ambiental, así poblaciones de la misma especie pueden quedar aisladas genéticamente y sometidas a distintas presiones selectivas.

### **Los goodeidos: Peces endémicos de México**

México es un país con una diversidad biológica elevada debido a la heterogeneidad ecológica determinada por sus características geográficas. Por ejemplo, la Franja volcánica Transversal Mexicana o Cinturón volcánico Transversal Mexicano es un conjunto de cordilleras y volcanes de diferentes edades alineados sobre una franja que cruza el territorio mexicano de oeste a este. Esta franja de volcanes que se ha formado durante los últimos 19 millones de años es un área muy compleja en origen y ambiente. Contiene 30 tipos climáticos diferentes que pertenecen a los cuatro grandes grupos climáticos reconocidos para México. La heterogeneidad ambiental y seccionamiento de áreas repercuten en una gran diversidad al interior de la Franja y en el elevado porcentaje de especies endémicas constituyéndose como la provincia biogeográfica más heterogénea y compleja en historia geológica y biótica de México.

La familia Goodeidae (con alrededor de 40 especies) son peces vivíparos endémicos mexicanos de medios dulceacuícolas (Miller et al., 2009). Su distribución se limita a la Mesa Central y son un elemento dominante de la ictiofauna del Río Lerma. Habitan en aguas someras de cuerpos lénticos, desde manantiales calientes y fríos hasta lagos, arroyos, grandes ríos y canales además de otros hábitats artificiales. La altitud en la que pueden vivir va de los 1000 a los 2300m sobre el nivel del mar (y *Girardinichthys multiradiatus* que alcanza los 2800 msnm). Presentan una gran divergencia en sus adaptaciones tróficas y suelen presentar un

marcado dimorfismo sexual (Miller et al. 2009). Debido a sus estrategias de reproducción y desarrollo embrionario (fecundación interna y matrotrofia) han sido considerados como un “tesoro natural”.

Se atribuye a esas estrategias la causa de su divergencia y supervivencia, lamentablemente sus poblaciones se encuentran en riesgo debido a que presentan intervalos de distribución restringidos (micro endemismos), fuerte estructuración genética y alta diferenciación genética en las especies de amplia distribución. Esto provoca que la sobre explotación y contaminación de cuerpos de agua o la deforestación de cuencas hidrológicas afecten gravemente a las poblaciones (Domínguez y Ponce de León, 2007).

### ***Girardinichthys multiradiatus*, habitante de las cuencas del Estado de México.**

*Girardinichthys multiradiatus* es un goodeido que se distribuye en las cuencas del Balsas, Lerma y Pánuco. Es originario de la cuenca del Lerma y su presencia fuera de ella se atribuye a eventos de captura hidrológica por otras cuencas y levantamientos recientes (Gesundheit y Macías, 2005).

Suele vivir en aguas someras y tranquilas o de movimiento ligero, como manantiales alimentados por arroyos o estanques. Varios sistemas donde habita el pez sufren periodos de desecación durante las temporadas de estiaje, mientras que otros tienen agua durante casi todo el año. En la presa Ignacio Ramírez, Huapango y El Molino el volumen de agua se ve afectado durante el año mientras que Villa Victoria, Presa Brockman y Salazar son perenes (observaciones de campo).

Su época de reproducción va de diciembre a mayo (Miller et al. 2009). No presenta competición intraespecífica entre cohortes (Navarrete et al., 2007; a y b), y su supervivencia en estos sistemas está influenciada por cambios ambientales.

Se ha encontrado que en localidades como Ximojay *G. multiradiatus* es la especie más importante ecológicamente debido a su dominancia favorecida por las características fisicoquímicas del cuerpo de agua (Rodríguez et al., 2015).

## Descripción morfológica (Meek, 1904)

La longitud de la cabeza está contenida de  $3 \frac{3}{4}$  a 4 veces en la distancia que hay desde el hocico hasta el final de la última vertebra caudal; el ancho del pez está contenida de  $2 \frac{3}{4}$  a  $3 \frac{1}{4}$  en la misma distancia. Posee una aleta dorsal única con 26 a 30 radios blandos, una aleta anal con 26 a 30 radios blandos (Meek, 1904).

El cuerpo es moderadamente alargado (cerca de 4.572 cm) algo comprimido, la cabeza es pequeña, la boca mediana, las mandíbulas están provistas de dientes bicúspidos similares a incisivos. El diámetro del ojo es ligeramente más grande que la longitud del hocico (equivale a  $3 \frac{1}{4}$  de la longitud de la cabeza), la aleta dorsal es alargada, su base iguala a la longitud de la cabeza en hembras y en machos a la mitad del largo. El origen de la aleta dorsal avanzada a la anal, a medio camino entre la base de la caudal y ojo (hembras) a cerca de la punta de la nariz hasta la base de la caudal (machos); la aleta pectoral es pequeña, su longitud es  $1 \frac{1}{2}$  con respecto a la de la cabeza; la ventral es 2 veces el tamaño de la cabeza; los rastrillos branquiales son cortos, menos que el diámetro del ojo, cerca de 15 en el primer arco branquial. El color es oliváceo oscuro, presentan marcas oscura con una tendencia a formar franjas; una mancha oscura a los lados arriba del espacio entre las aletas ventral y anal; los machos presentan márgenes en las aletas medias (Meek 1904).

## Clasificación taxonómica

*Phylum Chordata*

*Subphylum Vertebrata*

*Infraphylum Gnathostomata*

Superclase *Actinopterygii*

Clase *Teleostei*

Superorden *Acanthopterygii*

Orden *Cyprinodontiformes*

Suborden *Cyprinodontoidei*

Familia *Goodeidae*

Subfamilia *Goodeinae*

Género *Girardinichthys*

Especie *multiradiatus* (Meek, 1904)

Mexcalpique de Zempoala

Fuente: ITIS Report, 2019

## **El dimorfismo sexual y la divergencia genética entre poblaciones de *G. multiradiatus*.**

El dimorfismo sexual en *G. multiradiatus* se encuentra muy marcado (Figura 1), como en casi todos los goodeidos, consiste en diferencias en las aletas anal y caudal así como cambios en la coloración. Entre las poblaciones también difieren conductualmente, especialmente en sus danzas de cortejo. El dimorfismo sexual y el comportamiento han sido los más estudiados en la especie. Se ha visto que existen machos dominantes y otros sumisos, que los machos con jerarquía menor en la población suelen presentar un punto en el vientre imitando la pigmentación en hembras cuya finalidad es acercarse y lograr la reproducción furtiva evitando la competencia con otros machos (Macías y Valero, 2001). Por otro lado, la elección del macho por las hembras parece estar determinado por patrones de coloración solo visibles en el espectro ultravioleta (Macías y Burt de Perera, 2002). Otro fenómeno interesante en el comportamiento reproductivo en esta especie es la multipaternidad, es decir la descendencia de una puesta tiene diferentes padres, en este caso, el cortejo que despliega el macho se ha relacionado con la producción de esperma y por tanto con la cantidad de descendencia (Macías y Saborío, 2004).

Debido a variaciones de estos rasgos (diferencias en la elección parejas reproductoras por la hembra) se ha sugerido el posible aislamiento reproductivo de los miembros de distintas poblaciones. Para probar esta hipótesis, González y Macías (2006) realizaron un experimento, cuyos resultados mostraron la preferencia de las hembras por machos homogaméticos. Sin embargo, encontraron que en las cruces de machos y hembras heterogaméticas la descendencia también es viable. De esta manera se concluyó que existe una barrera pre-copulatoria, pero aún no post-copulatoria.

Estudios con otros goodeidos (Ritchie et al., 2007; Piller et al., 2015), indican que entre poblaciones con dimorfismo sexual y amplia distribución existe alta diferenciación genética. Estas evidencias apuntan la posibilidad que entre las poblaciones de *G. multiradiatus* podría ocurrir lo mismo. Debido a ello Macías y colaboradores (2012) analizaron la divergencia genética de varias poblaciones con

microsatélites y las diferencias morfológicas de los machos, encontraron que la divergencia genética era alta, pero menor a la esperada.

Encontraron además que la variación en la morfología del macho no explica la divergencia genética y que la diferenciación genética que existe en poblaciones de distintas cuencas corresponde más a un patrón de deriva génica y asilamiento por distancia que a selección sexual.



**Figura 1.** *Girardinichthys multiradiatus*, mostrando dimorfismo sexual. Izquierda macho, derecha hembra. Cortesía del Laboratorio de Ecología de Peces, FES Iztacala.

## Antecedentes

La divergencia entre especies de goodeidos fue abordada por Ritchie y colaboradores (2007), en su estudio con cuatro especies asociaron la selección sexual con la divergencia genética. Reportaron que las especies con mayor dimorfismo sexual tenían divergencia genética mayor. El  $F_{ST}$  para las especies dimórficas fue 0.25 y 0.16 entre las poblaciones con dimorfismo menor.

Macías y colaboradores (2012) en un análisis similar con *G. multiradiatus* encontraron mayor divergencia genética entre poblaciones de distinta cuenca que entre las provenientes de la misma cuenca. La distancia genética, aunque significativa, no alcanzaba la mostrada por otras poblaciones dimórficas de goodeidos de amplia distribución. Concluyeron que la diferenciación se asociaba con la distancia más que con el dimorfismo sexual.

Piller y colaboradores (2015) realizaron un análisis filogeográfico con marcadores genéticos nucleares (ITS-1) y mitocondriales (Cyt b) en *Xenotoca eiseni*, una especie que habita en la Costa del Pacífico y la cuenca endorreica del Lago de Magdalena y Etzatlán. Los resultados agrupan a las poblaciones en dos clados, correspondientes a las cuencas, la divergencia entre ellos fue elevada. Según este análisis, la separación de los clados coincide con la separación de la cuenca endorreica de Magdalena. Por otro lado, la estructuración de las poblaciones dentro de estos clados parece estar afectada más por eventos recientes del tipo antropogénico que por su historia filogeográfica.

Por su parte, Mossop y colaboradores (2015), estudiaron la dispersión del pez *Chlamydogobius eremius* en el desierto de Australia, el pez vive en sistemas cuyo contacto se pierde en periodos de sequía. Para su análisis utilizaron aloenzimas y ADN mitocondrial, encontraron que los haplotipos se distribuyen en tres grupos genéticos y que su distribución geográfica apuntaba a la existencia de un componente espacial subyacente a la estructura genética.



## Justificación

Las cuencas del río Lerma y Pánuco están conformadas por sistemas de agua que se encuentran aislados geográficamente. Este aislamiento puede tener repercusiones en la diversidad genética de las poblaciones que habitan en estos al no haber un flujo génico constante entre ellas. Esto, aunado a la contaminación e impacto ambiental causado por actividades antropogénicas incrementa el riesgo de extinción de las poblaciones. Un claro ejemplo es la cuenca del río Lerma, la cual es una de las más contaminadas y deterioradas en México (Domínguez y Ponce de León, 2007), lo que ha repercutido en la desaparición de *G. multiradiatus* en Ixtlahuaca y Acambay (Macías et al., 2012). La presa Ignacio Ramírez se han reportado posibles efectos del agroquímico Paration metílico en la viabilidad de la prole (De la Vega et al., 1997) provocando daño hepático y decoloración en machos afectando así su éxito reproductivo y por lo tanto, pone en riesgo su supervivencia y permanencia (Arellano y Macías, 2008; Arellano y Macías, 2009).

Finalmente, aun cuando la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 no contempla a *G. multiradiatus* como especie en peligro de extinción, la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (*Red List*, *IUCN* por sus siglas en inglés) la clasifica en la categoría “En peligro” (*Endangered*), (Koeck et al., 2019). Debido a todo lo anterior, es necesario caracterizar la diversidad genética de las poblaciones, y aportar información que ayude al diseño de planes de conservación para la especie.

## **Hipótesis**

Las poblaciones de *Girardinichthys multiradiatus* se encuentran estructuradas genéticamente, dada la falta de conectividad entre los cuerpos de agua y a la variación en los volúmenes de agua durante el año.

## **Objetivos**

### *General*

Analizar la divergencia genética y determinar las relaciones filogeográficas de poblaciones de *Girardinichthys multiradiatus*, distribuidas en las cuencas del Lerma y Pánuco en el Estado de México mediante el uso del marcador mitocondrial COI.

### Objetivos Particulares

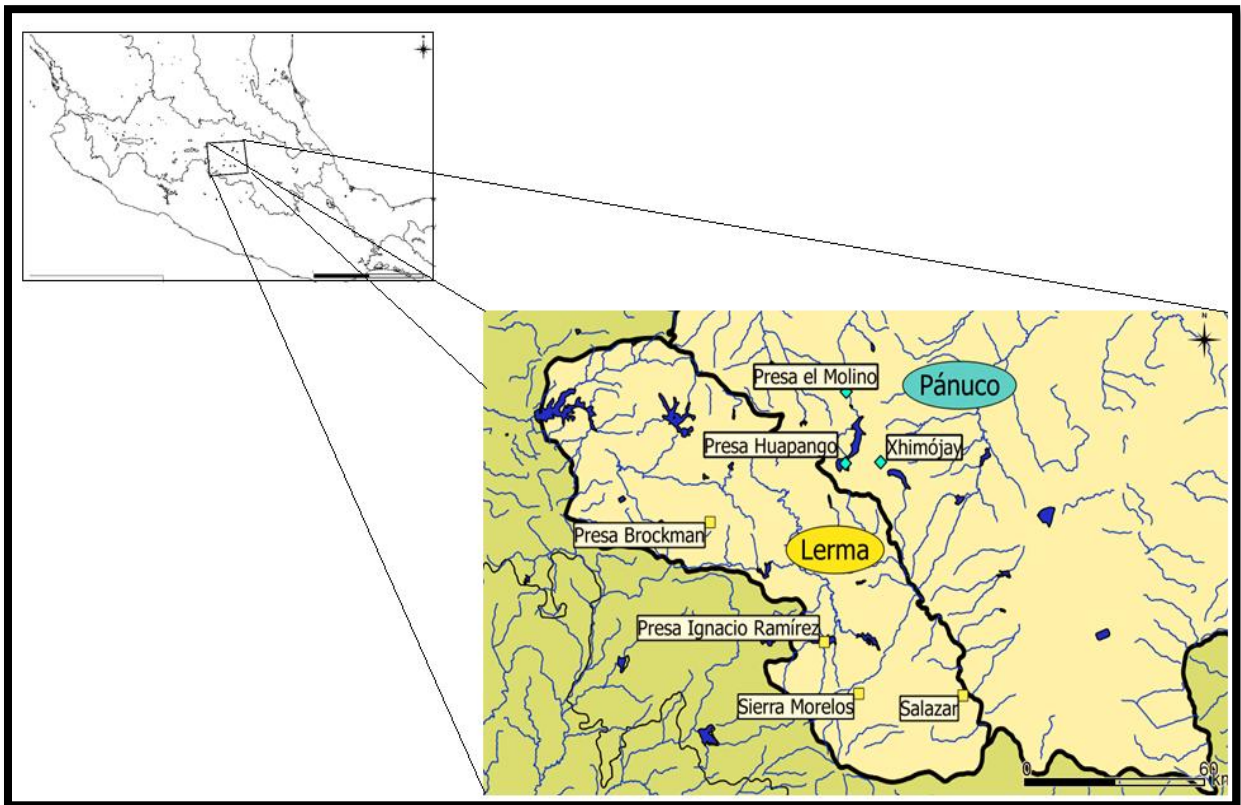
- Estandarizar protocolos de extracción de DNA y las condiciones de amplificación por PCR del fragmento COI.
- Secuenciar el amplicón COI de organismos de seis poblaciones de *G. multiradiatus*
- Determinar haplotipos, frecuencias haplotípicas, diversidad haplotípica y nucleotídica de las poblaciones.
- Describir la estructura genética de las poblaciones.
- Inferir relaciones filogeográficas de las poblaciones.
- Determinar el nicho ecológico que ocupan las distintas poblaciones.

## Área de estudio.

El área de estudio comprende poblaciones de dos cuencas hidrológicas: la Cuenca del Lerma y la Cuenca del Pánuco. La cuenca del Río Lerma está representada por cuatro poblaciones: Ignacio Ramírez, Presa Brockman, Sierra Morelos y Salazar. Mientras que la cuenca del Pánuco está representada por: El Molino, Huapango y Xhimójay (Tabla 1, Imagen 2).

**Tabla 1.** Coordenadas y altura de las zonas de muestreo consideradas en el trabajo

Cuenca	Sistemas estudiados.	Longitud	Latitud	Elevación (msnm)
Lerma	Ignacio Ramírez.	-99.80279°	19.44662°	2558
	P. Brockman.	-100.14443°	19.76737°	2944
	Sierra Morelos.	-99.69934°	19.30792°	2722
	Salazar.	-99.38788°	19.30322°	2996
Pánuco	El Molino.	-99.73727°	20.11687°	2491
	Huapango	-99.73979°	19.92495°	2622
	Xhimójay	-99.63443°	19.92828°	2635



**Figura 2.** Mapa de distribución de las zonas de muestreo. Se señalan las cuencas de los ríos Lerma y Pánuco (Vallejo-Cruz, 2019).

## **Materiales y Métodos.**

### **Extracción y amplificación de ADN**

La extracción de ADN se realizó usando el buffer de extracción DNAzol. Aproximadamente 1 gramo de tejidos variados se congeló con nitrógeno líquido y se maceró hasta obtener un polvo fino. Se mezcló con 1 mL de buffer de lisis para su homogeneización. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 500 µL de alcohol al 100%. Se mezcló con vortex y se centrifugó 15 minutos a 13,000 rpm. La pastilla fue lavada con alcohol al 70%, centrifugándola 5 minutos a 4,000 rpm dos veces. Finalmente, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se suspendió con 50µL de agua ultra pura. La muestra se mantuvo en congelación hasta su uso en las reacciones de PCR. La integridad del material extraído se verificó mediante su corrimiento en geles de agarosa al 1%.

Para la amplificación de la región COI completa (627pb) se utilizó un oligo Forward diseñado para amplificar específicamente con organismos de la familia Goodeidae cuya secuencia es 5'-TCTTACCTGTGGCAATCACACG-3' y se utilizó el oligo Reverse de Folmer (Folmer et al. 1994) HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'.

El programa para amplificación consta de una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de tres tiempos cada uno los cuales consisten en 30 segundos a 94°C, el segundo de 30 segundos a 45°C para hibridación y 1 minuto a 72°C para extensión; la extensión final consta de 5 minutos a 72°C.

Los amplicones obtenidos de organismos de cada localidad se secuenciaron en el Laboratorio de Bioquímica Molecular en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala.

### **Alineamiento y corrección de las secuencias de COI.**

Para el análisis de los cromatogramas obtenidos se usó el programa Geneious 11.0.5. (Kearse et al. 2012) Con este software se realizó el alineamiento

y edición de las secuencias obtenidas, procesándolas primero por par (directo y reverso), después por localidad y al final por zona de muestreo.

## **Análisis Bioinformáticos.**

### *Diversidad Genética*

Con en el programa DNASP Versión 6.10.01 (Rozas et al. 2017), se obtuvo el número de haplotipos, sitios segregativos, frecuencia y distribución de haplotipos, así como la diversidad haplotípica y nucleotídica por población.

### *Distancia genética*

Se calculó en el programa MEGA Versión 7.0.26 (Kumar et al. 2015), con el modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros (K2P), los valores fueron convertidos en porcentaje para su interpretación.

### *AMOVA y $F_{ST}$*

Con el programa Arlequín versión 3.5.2.2 se establecieron dos grupos equivalentes a las cuencas. El AMOVA se realizó con la opción de locus por locus con un número de 10,000 permutaciones.

Los análisis se realizaron bajo dos criterios. El primero se consideró una población estructurada en las cuencas y el segundo criterio en las sub poblaciones.

### *Inferencias filogenéticas*

Los árboles fueron construidos con el software en línea PhyML 3.0, usando el criterio de AIC (*Akaike Information Criterion*: Criterio de información Akaike) para seleccionar el modelo de sustitución que más se ajustará a los datos Se usó la opción de soporte de rama aLRT SH-like, con 1,000 *bootstrap*.

### *Relación entre haplotipos*

Las relaciones ancestro descendiente entre los haplotipos (red de haplotipos) fue determinada con el programa PopART versión 1.7 (Leight y Bryant, 2015) con el modelo de Median Joining. En este programa también se obtuvo un mapa con la distribución de haplotipos según la población.

### *Demografía histórica*

Las pruebas se hicieron en dos partes, primero con los estadísticos de Tajima (D de Tajima) y el de Fu (Fs de Fu), en el programa Arlequin (Excoffier, 2010), con 10,000 permutaciones de muestras simuladas.

Con los datos de la cuenca del Pánuco se realizó la prueba de *Mismatch distribution* (con el programa DNASP), debido a que se detectó más complejidad en su historia demográfica.

### *Nicho ecológico*

Para el análisis se usó el programa Maxent (*Maximum Entropy Modeling of Species Geographic Distributions*) versión 3.3.3k para realizar el modelado de nicho de las poblaciones, con las capas de Bioclim y WorldClim para modelos ecológicos.

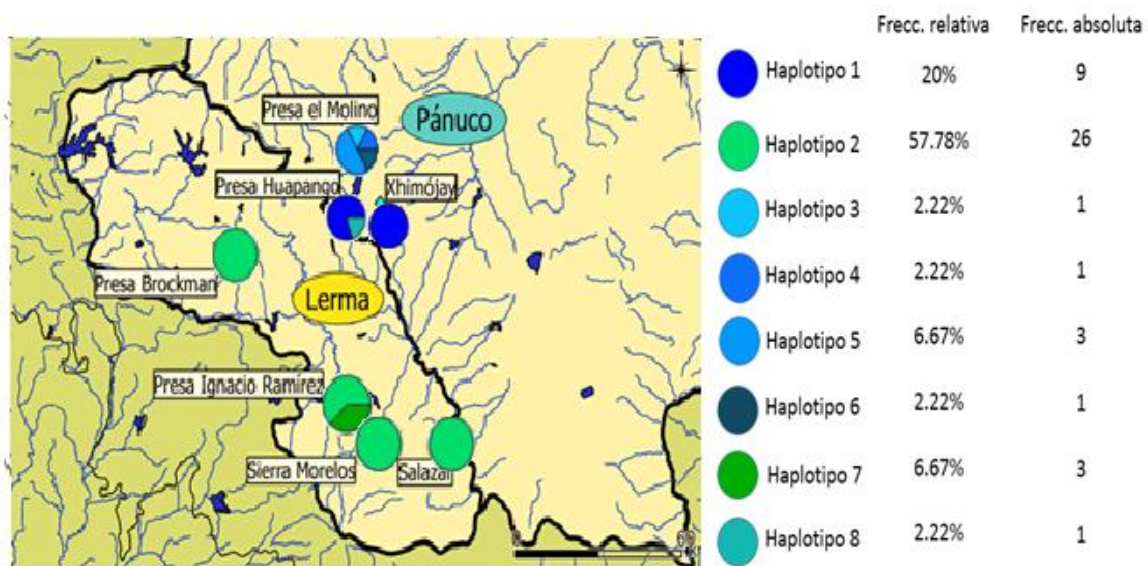
Para procesar los datos obtenidos y graficarlos se utilizó el paquete nicheROVER: *Niche Region and Niche Overlap Metrics for Multidimensional Ecological Niches*, contenido en R. (RStudio Team, 2015).

## Resultados y análisis.

### Diversidad genética

Se obtuvo una secuencia consenso de 627 nucleótidos del gen mitocondrial COI, en donde se encontraron 13 sitios segregativos.

El número total de muestras fue de 45 entre las que se encontraron 8 haplotipos, el más frecuente (57.78 %) fue el Haplotipo 2 exclusivo de la Cuenca del Lerma. Los haplotipos menos frecuentes fueron el 3, 4, 6 y 8 con una frecuencia relativa de 2.22%, correspondiente a un solo organismo (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución de haplotipos y su frecuencia en las poblaciones.

La distribución de los haplotipos presentó un carácter privado entre las cuencas del Lerma y Pánuco, es decir, no se comparte ninguno. Esto nos indica que no existe flujo genético reciente entre las poblaciones de distintas cuencas. El haplotipo con mayor distribución entre las poblaciones fue el Haplotipo 2, encontrándose en todas las poblaciones del Lerma. Existen dos posibles explicaciones para esta observación las cuales serían que aún existe un flujo génico entre estas poblaciones, o bien la separación fue reciente por lo que no se han acumulado un número significativo de mutaciones.

En el Pánuco el haplotipo con mayor distribución es el Haplotipo 1, siendo el segundo más frecuente a nivel global, se encuentra en dos de las tres poblaciones, indicando, al igual que en el caso del haplotipo 2, que su el flujo génico es continuo o su separación es reciente.

La diversidad haplotípica total fue de  $Hd$ : 0.62929, mientras que la diversidad nucleotídica total fue de  $\pi$  T%: 0.361 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Diversidades genéticas encontradas en las poblaciones de *G. multiradiatus*

Cuenca	Población	<i>n</i>	# <i>H</i>	<i>Hd</i>	$\pi$ %
Ler	<b>Sal</b>	7	1	0	0
	<b>SM</b>	7	1	0	0
	<b>IR</b>	8	2	0.53571	0.257
	<b>Br</b>	7	1	0	0
Pán	<b>Hp</b>	5	2	0.4	0.257
	<b>Xi</b>	5	1	0	0
	<b>Mo</b>	6	4	0.8	0.725

Cuenca del Lerma (Ler) y del Pánuco (Pan); Salazar (Sal); Sierra Morelos (SM); Ignacio Ramírez (IR); Presa Brockman (Br); Huapango (Hp); Ximojay (Xi); El Molino (Mo).

Las poblaciones que mostraron la diversidad más alta fueron El Molino con  $Hd$ : 0.8000, la de Ignacio Ramírez con  $Hd$ : 0.53571 y la de Huapango con  $Hd$ : 0.40000. El resto tuvieron diversidades de 0. Las poblaciones con diversidad nucleotídica más altas fueron El Molino con  $\pi$  =: 0.00725, Ignacio Ramírez con  $\pi$  = 0.00257 y Huapango con  $\pi$  = 0.00257.

Estos resultados nos indican que en una población hay distintos haplotipos divergentes. En El Molino encontramos alta diversidad haplotípica y nucleotídica, implicando que los distintos haplotipos existentes difieren mucho unos de otros. Las poblaciones de Ignacio Ramírez y Huapango, pese a tener una diversidad haplotípica elevada la diversidad nucleotídica no es muy alta, los distintos haplotipos encontrados difieren en pocos sitios. La interpretación a esto es que los haplotipos existentes dentro de esas poblaciones son muy parecidos entre sí y que tienen un origen común reciente. Esto no necesariamente indica poco flujo genético con otras poblaciones, sino que la diversidad dentro de la población se debe más a divergencia dentro de la misma que al contacto con otras.



### Distancia genética

En la Tabla 3 se muestra que la población del Molino es la que presenta mayor distancia con respecto a las demás poblaciones, inclusive con aquellas distribuidas en la misma cuenca. Las distancias menores fueron encontradas entre las poblaciones del Lerma, que van del 0% al 0.1809%. El porcentaje más bajo fue de 0.0963%, entre Huapango y Ximojay.

La distancia entre poblaciones de diferente cuenca van de 0.2886% a 0.9883%, el valor menor corresponde a Huapango y Salazar, Sierra Morelos y Brockman (0.2886%) mientras que el más alto es entre Ignacio Ramírez y El Molino (0.9883%).

**Tabla 3.** Porcentaje de distancias genéticas entre las poblaciones de las cuencas del Lerma (Ler) y Pánuco (Pan)

Ca.	Pob.	Sal	SM	IR	Br	Hp	Xi	Mo
Ler	Sal							
	SM	0.0000						
	IR	0.1809	0.1809					
	Br	0.0000	0.0000	0.1809				
Pán	Hp	0.2886	0.2886	0.4702	0.2886			
	Xi	0.3207	0.3207	0.5025	0.3207	0.0963		
	Mo	0.8866	0.8866	0.9883	0.8866	0.7736	0.7251	

Salazar (Sal); Sierra Morelos (SM); Ignacio Ramírez (IR); Presa Brockman (Br); Huapango (Hp); Ximojay (Xi); El Molino (Mo).

De acuerdo con estos resultados, al hacer las comparaciones dentro de cada cuenca se observó que las tres poblaciones de la cuenca del Lerma son muy parecidas entre sí. Mientras que para la cuenca del Pánuco se encontró mayor diferenciación entre las poblaciones; en donde el Molino mostró ser la población más distante genéticamente mientras que la población de Ximojay presentó una mayor similitud con respecto a la población de Huapango

## AMOVA y $F_{ST}$

Se realizó un AMOVA considerando dos poblaciones, las cuáles se estructuran geográficamente según las dos cuencas. Se encontró que la mayor parte de la variación provino de las diferencias entre las dos cuencas (61.39%), el  $F_{ST}$ : 0.6139 ( $P < 0.05$ ), fue elevado y significativo (Tabla 4).

**Tabla 2.** Porcentaje de variación entre las cuencas que habita *G. multiradiatus*.

Origen de la variación	Porcentaje de la variación	Índice de Fijación $F_{ST}$
Entre las cuencas	61.39	0.61393
Dentro de las cuencas	38.61	

Estos resultados sugieren que la variación genética presente en las poblaciones es consecuencia de la separación de los organismos por las cuencas *i.e.* por su estructuración geográfica.

Posteriormente se realizó un segundo AMOVA, esta vez separando las poblaciones por cuerpo de agua y que estas poblaciones pertenecían a diferentes cuencas. Con esto se buscó comparar las poblaciones entre una cuenca con la otra y comparar las poblaciones dentro de una misma cuenca (Tabla 5).

Nuevamente se encontró que la variación entre las dos cuencas fue la más alta (57.29%), seguida de la variación dentro de la población (26.39%), y por último la variación entre poblaciones de la misma cuenca (16.32%). El  $F_{ST}$ : 0.73614 ( $P < 0.05$ ), en este caso también fue alto y significativo (Tabla 6.).

**Tabla 3.** Porcentaje de variación entre las poblaciones de *G. multiradiatus*.

Origen de la variación	Porcentaje de la variación	Índices de Fijación
Entre las cuencas	57.29	$F_{CT}=0.57291$
Entre poblaciones dentro de la misma cuenca	16.32	$F_{ST}=0.73614$
Dentro de las poblaciones	26.39	$F_{SC}=0.38219$

Un valor de  $F_{ST}$  cercano a 1 corresponde a la separación total entre los grupos. Estos resultados indican que las poblaciones de diferente cuenca están muy diferenciadas. Sin embargo, la variación genética es mayor y estadísticamente significativa entre poblaciones de la misma cuenca.

La comparación de  $F_{ST}$  entre las poblaciones se muestra en la tabla 6. El  $F_{ST}$  más elevado corresponde a las diadas Ximojay/Brockman, Ximojay/SierraMorelos y Ximojay/Salazar, alcanzando el valor de 1 ( $P < 0.05$ ). El valor  $F_{ST}$  más bajo se corresponde a las diadas Brockman/SierraMorelos, Brockman/Salazar, SierraMorelos/Salazar y Huapango/Ximojay, todas con un valor de 0 y poco significativo, lo que sugiere que estas poblaciones son panmícticas.

**Tabla 4.** Comparación de  $F_{ST}$  pareada entre las poblaciones de las dos cuencas.

Ca	Pob	Br	SM	IR	Sal	Hp	Xi	Mo
Ler	Br	/						
	SM	0.0000	/					
	IR	0.2612	0.2612	/				
	Sal	0.0000	0.0000	0.26121	/			
Pán	Hp	<b>0.8355*</b>	<b>0.8355*</b>	<b>0.5199*</b>	<b>0.8355*</b>	/		
	Xi	<b>1.0000*</b>	<b>1.0000*</b>	<b>0.6757*</b>	<b>1.0000*</b>	0.0000	/	
	Mo	<b>0.6267*</b>	<b>0.6267*</b>	<b>0.3437*</b>	<b>0.6267*</b>	<b>0.3869</b>	<b>0.5684</b>	/

En negritas valores significativos estadísticamente ( $P_{val} < 0.05$ ). Marcados con asterisco (\*), las interacciones entre poblaciones de distinta cuenca.

El promedio de  $F_{ST}$  entre las comparaciones significativas es de (0.705776). Las comparaciones de  $F_{ST}$  entre poblaciones de la misma cuenca generan resultados bajos y sin significancia estadística. La única excepción fue para la comparación de El Molino con poblaciones de su misma cuenca, que fueron valores altos y significativos. Se observa lo mismo entre las poblaciones de la cuenca del Lerma y El Molino.

Estos resultados nos dicen que entre las poblaciones de la Cuenca del Lerma no hay divergencia genética, lo cual coincide con los datos de distancia genética. Con respecto a la cuenca del Pánuco, las diferencias entre las poblaciones son casi nulas entre las poblaciones de Ximojay y Huapango), sin embargo, en El Molino se encontró una divergencia grande y significativa entre las poblaciones de su propia cuenca así como de diferente cuenca.

Como se esperaba, entre las poblaciones de la misma cuenca es baja la divergencia, sin embargo la población de El Molino se diverge más que el resto de poblaciones. Esta divergencia genética no puede ser explicada solamente por la distancia geográfica entre poblaciones de la cuenca, pudiendo existir otros mecanismos que fomenten las particularidades genéticas dentro de ésta población.

## Inferencias filogenéticas

Se usaron secuencias de referencia depositadas en la base de datos del GenBank de *Girardinichthys multiradiatus* (AY356576), y como grupo externo se usaron las secuencias de la especie congénérica *G. viviparus* (AY356575.1), *Skiffia multipunctata* (AY356585.1), *Xenotoca eiseni* (AY356587.1) y *Goodea atripinis* (AY356577.1)

El modelo de sustitución que mejor explica la filogenia fue TN93 +G+I, dando una proporción de sitios invariables de 0.476.

La figura 4 muestra el filograma, las secuencias de *G. multiradiatus* se dividen en dos clados; El primero comprende al Haplotipo 7 presente en tres organismos de Ignacio Ramírez, en la Cuenca del Lerma. El otro clado constituye el resto de las secuencias.

Este segundo clado agrupa todas las secuencias del Lerma y de él diverge un grupo que incluye las secuencias del Pánuco con excepción del Haplotipo 8 perteneciente a un individuo de Huapango, el cual se agrupa con las secuencias correspondientes al Lerma. De la misma manera la secuencia de referencia de *G. multiradiatus* (AY356576) se agrupó dentro de este clado. Este resultado es consistente dado que la secuencia pertenece a un individuo de la población de Chapultepec, Estado de México el cual se ubica en la Cuenca del Lerma (Webb et al. 2004).

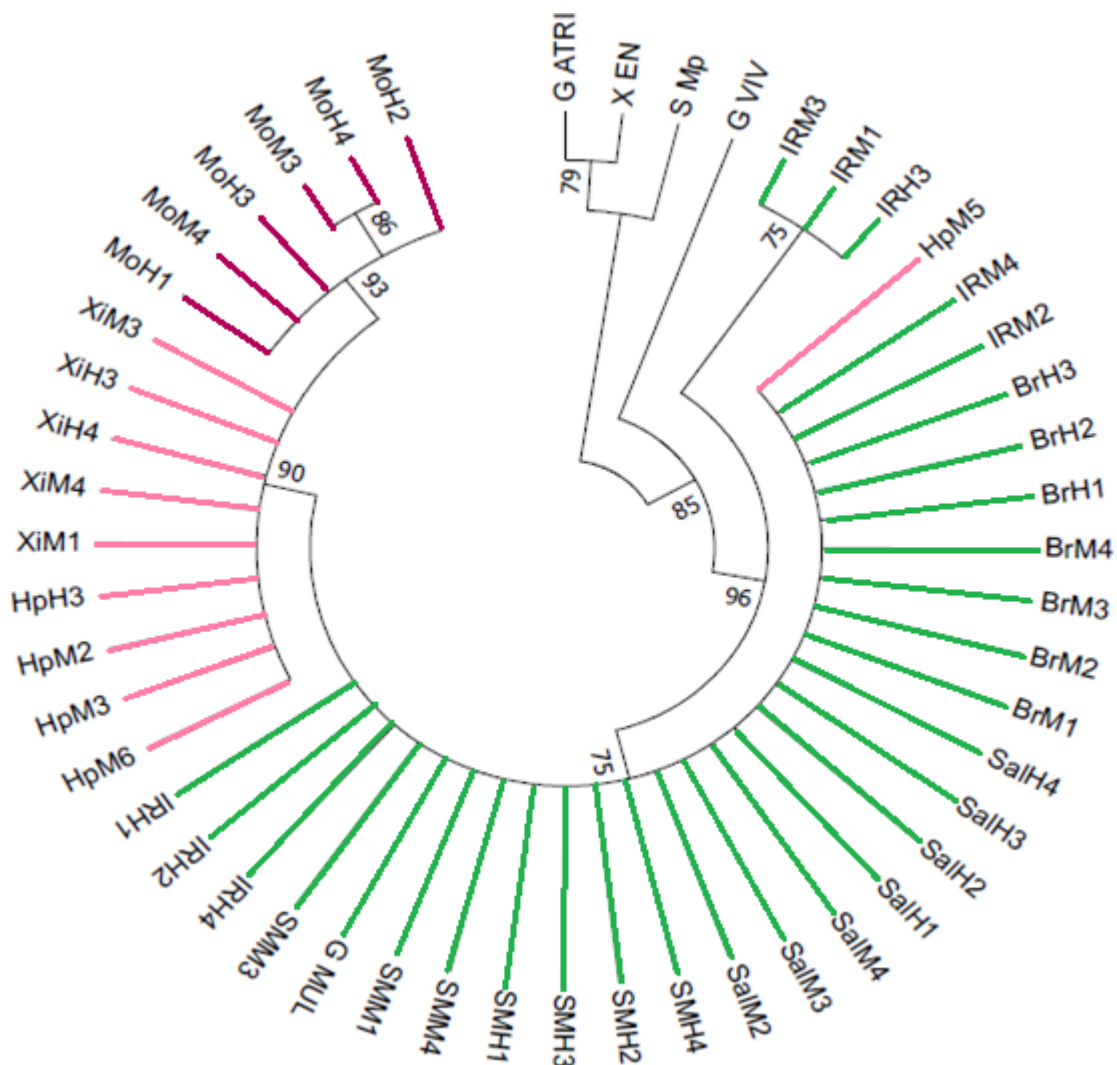
Dentro del clado formado por las secuencias del Pánuco se forma un tercer grupo, que corresponde a todas las muestras provenientes de la localidad de El Molino.

Como se ha descrito, las muestras se agrupan por cuencas (salvo una excepción ya señalada), formando un grupo para el Lerma y otro para el Pánuco. Lo cual sugiere que las poblaciones de *G. multiradiatus* se estructuran geográficamente por la división entre las cuencas.

El filograma muestra un tercer grupo monofilético, dentro del clado del Pánuco, que agrupa las secuencias de El Molino.

La estructuración que hemos descrito puede explicarse por barreras físicas propias de la corriente, dado que no existe una barrera geográfica como la que separa el Lerma del Pánuco, es decir la estructuración se debe a que los organismos de río abajo no pueden migrar río arriba. Sin embargo, esto sería solo parte del proceso de diferenciación.

De manera interesante, tres haplotipos correspondientes a Ignacio Ramírez forman un clado independiente al resto de secuencias. Estas muestras (IRM3, IRM1 e IRH3), corresponden al Haplotipo 7.

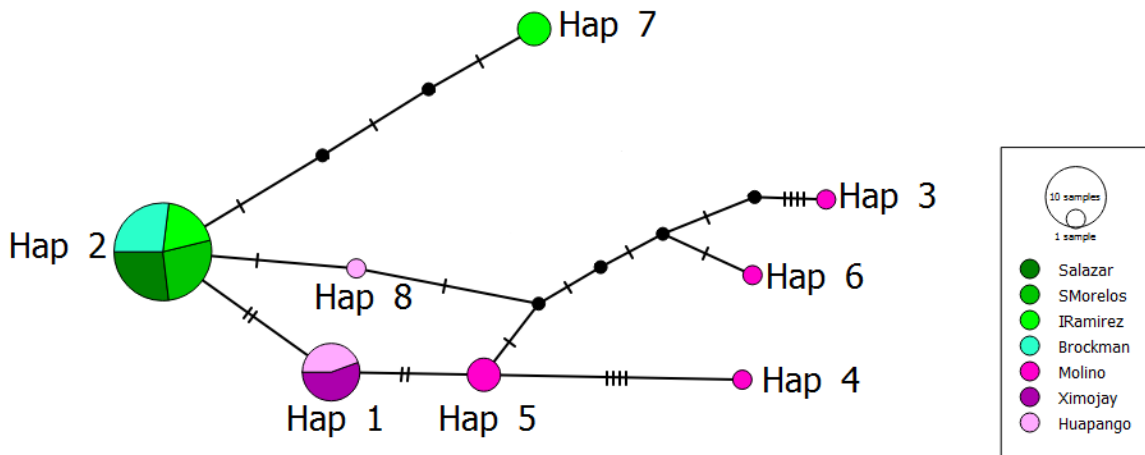


**Figura 4.** Filograma obtenido por método de Maximum Like hood, con el modelo de sustitución TN93 +G+I. Los números sobre líneas muestran los valores de soporte con el modelo aLRT SH-like. En verde, haplotipos de la cuenca del Lerma; en rosa, haplotipos de la cuenca del Pánuco; en morado, haplotipos de El Molino.

## Red de haplotipos

Se usó el modelo de TCS (Clement et al. 2002) para generar la red de haplotipos (Figura 5). El Haplotipo 2 se puede inferir como el haplotipo ancestral, debido a su alta frecuencia y cantidad de conexiones con otros haplotipos. Este haplotipo se encuentra exclusivamente en las poblaciones de la Cuenca del Lerma. La figura 5, sugiere que los haplotipos de El Molino son recientes dado que se encuentran en las terminaciones de la red (Figura 5).

Con base en la red de haplotipos se puede inferir que la Cuenca del Pánuco pudo ser colonizada por dos linajes diferentes, ambos divergentes del Haplotipo 2. El primero corresponde al Haplotipo 8, que se encuentra exclusivamente en Huapango y que según el filograma estaría relacionado con el grupo del Lerma. En el otro caso, se trata del linaje del Haplotipo 1 que por su frecuencia en dos tercios de las poblaciones se trata del haplotipo ancestral de la Cuenca del Pánuco. De éste haplotipo deriva el Haplotipo 5 y el resto de haplotipos de la población de El Molino.



**Figura 5.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de los haplotipos mitocondriales del gen COI en *G. multiradiatus*.

## Demografía histórica.

Las pruebas de neutralidad se realizaron de dos maneras, la primera utilizando los grupos geográficos definidos por las cuencas y la otra utilizando las poblaciones.

Referente a las cuencas, el análisis con las pruebas de neutralidad nos arroja un valor para la  $D$  de Tajima negativo (Lerma:-0.5834, Pánuco:-0.78858), mientras que el valor para el  $F_s$  de Fu fue positivo para ambos casos (Lerma: 1.91435, Pánuco: 0.51673).

Las poblaciones de Salazar, Brockman, Sierra Morelos y Ximojay, mostraron valores de 0 en ambos estadísticos. La población de Ignacio Ramírez mostró una  $D$  de Tajima positiva con valor de 1.60077 y una  $F_s$  de Fu también positiva con valor de 2.98835. La población de Huapango mostró una  $D$  de Tajima negativa con valor de -1.04849 y una  $F_s$  de Fu positiva con valor de 1.68758. La población de El Molino mostró un  $D$  de Tajima negativa con valor de -0.35676 y una  $F_s$  de Fu positiva con valor de 0.99364.

Dados los valores negativos para  $D$  de Tajima, los datos sugieren que ambas cuencas presentaron una expansión poblacional después de un cuello de botella reciente. Mientras que la  $F_s$  de Fu positiva nos indica igualmente un cuello de botella reciente, lo cual deriva en pocos alelos diferenciados.

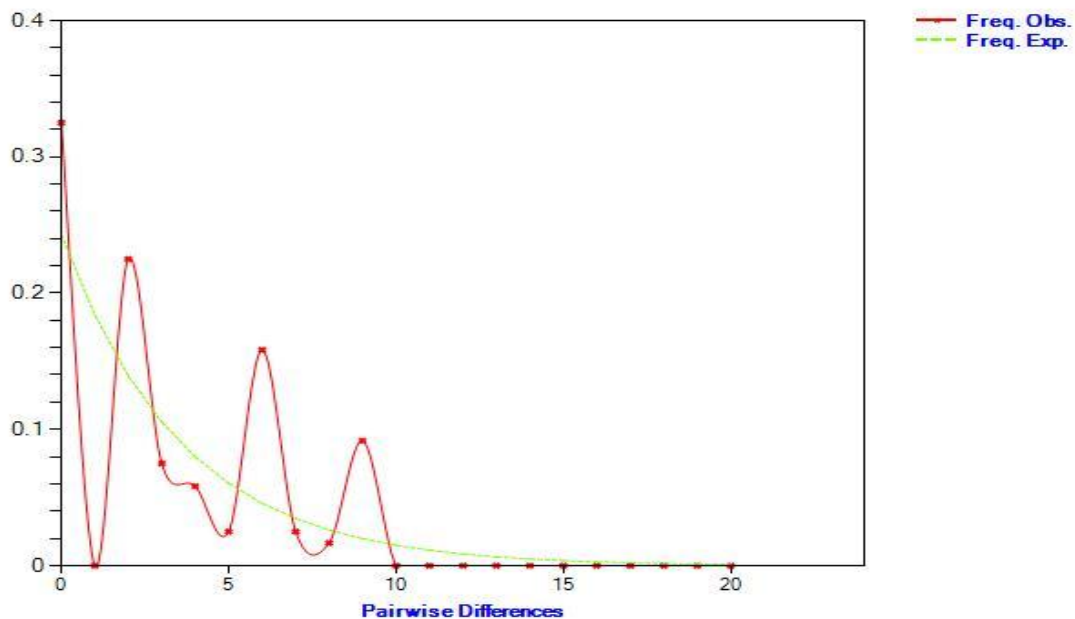
Al analizar más a fondo las poblaciones, podemos ver que en la mayoría del Lerma (excepto Ignacio Ramírez) y una del Pánuco (Ximojay), los valores de ambos estadísticos fueron de 0. En el caso de  $D$  de Tajima esto nos indica que la población ha evolucionado en un equilibrio entre mutación y deriva. Por el lado del  $F_s$  de Fu al ser positivo solo se infiere un cuello de botella reciente. Para la población de **Ignacio Ramírez** se puede observar que tanto la  $D$  de Tajima como la  $F_s$  de Fu son positivas, lo cual indica una contracción súbita de la población así como un cuello de botella reciente. En las poblaciones de **Huapango** y **El Molino** la  $D$  de Tajima resulta negativa, indicando una expansión poblacional después de un cuello de botella, mientras que la prueba de Fu nos indica un cuello de botella reciente.



Cabe aclarar que ninguno de los valores mostró significancia estadística, esto debido posiblemente a la baja  $n$  de los muestreos en las poblaciones.

#### Análisis de *Mismatch Distribution*.

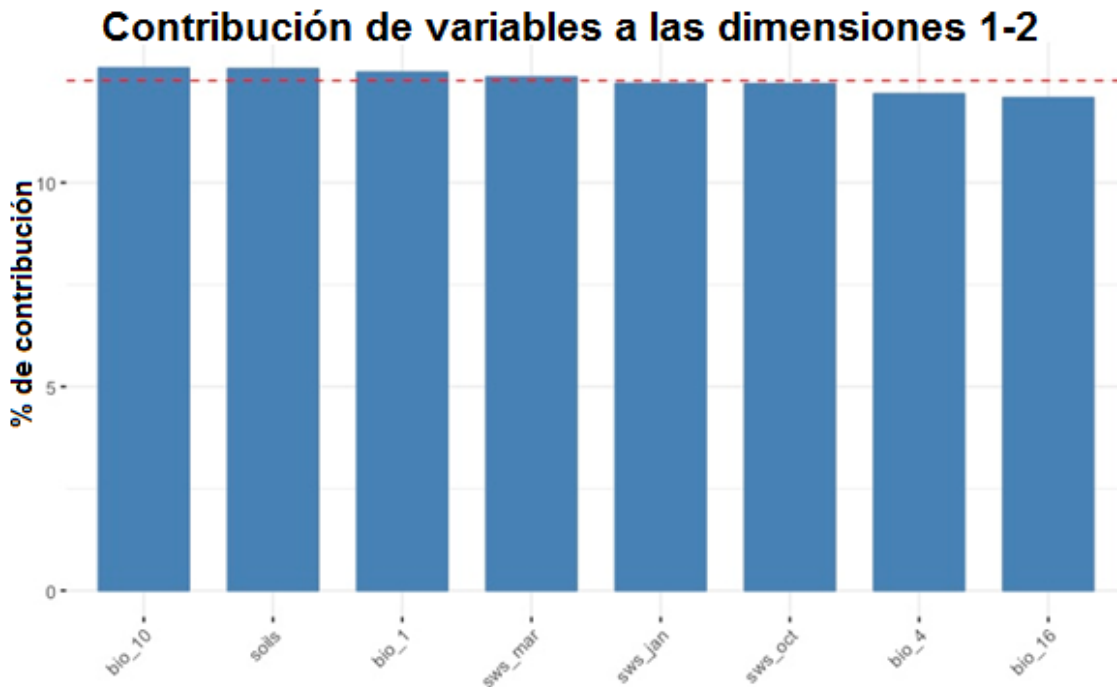
En el Lerma sólo se encontró un linaje haplotípico, mientras que en el Pánuco se encontraron dos en un área más pequeña, por lo que se decidió hacer el análisis de *Mismatch Distribution* en ésta última. De este análisis se obtuvo una gráfica multimodal. La interpretación de esta gráfica (Figura 6), es que no hay expansión demográfica en las poblaciones dentro de la cuenca del Pánuco, es decir se encuentran en equilibrio demográfico. Habrá que incluir a la interpretación, que posiblemente no exista contacto entre todos los demes de la cuenca, existiendo una subestructuración.



**Figura 6.** La gráfica se obtuvo bajo el supuesto de  $\Theta$  Final como infinita. La  $\Theta$  Inicial fue de: 2.407 y la  $\tau$  de: 0.710. El estadístico de Ramos-Onsins y Rozas ( $R_2$ ) fue de: 0.1154 y positivo.

## Nicho ecológico

El análisis de PCA para delimitar el nicho ecológico de las poblaciones dio como resultado las siguientes variables más importantes (Figura 7). De ellos, los que tienen mayor contribución a las variables son la Temperatura promedio de los tres meses más cálidos, Suelos, Temperatura promedio anual y Estrés al suelo por agua en marzo.



**Figura 7.** Contribución de variables a las dimensiones 1-2. Estrés al suelo por agua en Enero (sws jan); Estrés al suelo por agua en Marzo (sws mar); Suelos (Soils); Estrés al suelo por agua en Octubre (sws oct); Temperatura promedio de los tres meses más cálidos (Bio10); Precipitación de los tres meses más húmedos (Bio16); Temperatura promedio anual (Bio1); Temperatura Máxima del mes más cálido (Bio4).

Podemos decir entonces que lo que más afecta a los cuerpos de agua donde vive *G. multiradiatus* es en los meses más cálidos. Junto con esto también vemos que el suelo circundante a los cuerpos de agua cambia en esta época de estiaje, lo cual posiblemente se traduzca como diferencia en el polvo en el aire, diferente cantidad de sedimento llegando a los cuerpos de agua y diferente turbidez de estos. El cómo se diferencia un cuerpo de agua y otro está determinado por el estiaje.

Se obtuvo una gráfica bidimensional del PCA, representando los agrupamientos de las poblaciones según su semejanza en las variables (Figura 8). Los cuerpos de agua se agruparon de la siguiente forma:

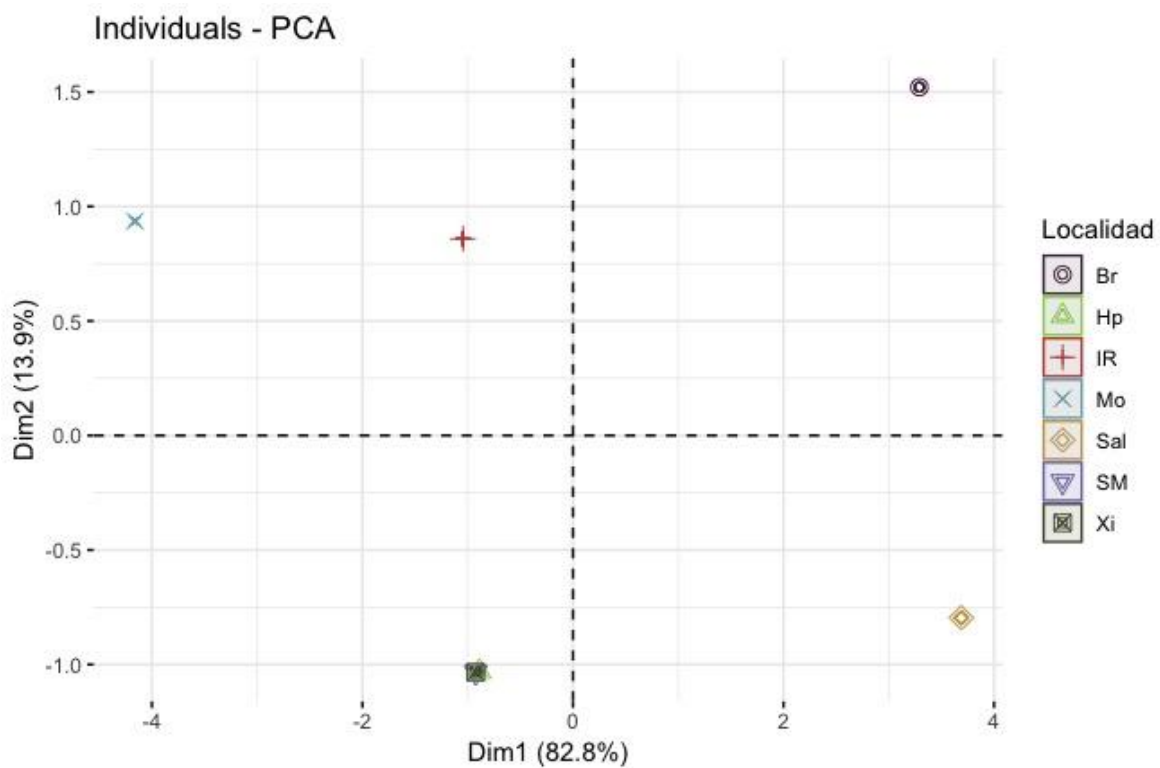
Grupo 1: Huapango, Sierra Morelos y Ximojay.

Grupo 2: Salazar.

Grupo 3: Brockman.

Grupo 4: Ignacio Ramírez.

Grupo 5: El Molino.



**Figura 8.** PCA de las variables ambientales que influyen en las poblaciones de *G. multiradiatus*.

El Grupo 1 está representado por poblaciones de distinta cuenca, pero con el mismo nicho ecológico. Ximojay y Huapango pertenecen a la cuenca de Pánuco y se encuentran cercanos, mientras que Sierra Morelos se encuentra en el Lerma. Los Grupos 2 y 3 están representado por Salazar y Brockman, respectivamente. Ambos tienen un vector en la misma dimensión, pero se separan hacia distintas variables. Esta similitud en una dirección puede deberse a que son las localidades con mayor altura, rodeadas de bosque y por ello con condiciones de precipitación y temperatura diferentes al resto. Los nichos de las poblaciones de los Grupos 3 y 4 fueron agrupados en vectores similares, siendo ecológicamente similares y cercanas. Lo única diferencia entre ambas es que El Molino se aleja demasiado en su vector. Ignacio Ramírez se encuentra en la cuenca del Lerma y El Molino en el Pánuco, posiblemente ahí radique la diferencia.

## Discusión

### La estructura poblacional en *G. multiradiatus*.

Los AMOVA realizados bajo las suposiciones de poblaciones estructuradas en dos cuencas y estructuradas en poblaciones, indican que existe una estructuración genética entre las cuencas hidrológicas del Lerma y del Pánuco. Esto se confirma con los valores de  $F_{ST}$  emparejados entre poblaciones de la cuenca del Lerma y del Pánuco, siendo estos los que tuvieron los valores más altos y significantes, a comparación de los emparejamientos entre poblaciones de la misma cuenca.

Nuestros resultados coinciden con los de Macias-Garcia et al. (2012), donde encontraron que las poblaciones dentro del Lerma tienen un bajo y poco significativo nivel de diferenciación genética. Sin embargo se encontró que los valores de  $F_{ST}$  obtenidos entre las poblaciones de distintas cuencas son significativos y muy altos. Los valores de divergencia genética, medidos en  $D_{est}$  en el estudio de Macias-Garcia van del 0.011 como mínimo hasta el 0.598 como máximo, mientras que nuestros valores van de 0.3437 como mínimo, a 1 como máximo. Coinciden también con lo reportado por Ritchie et al. (2007), quienes determinaron un mayor  $F_{ST}$  en especies de goodeidos con dimorfismo sexual de amplia distribución. Contrario a la cuenca del Lerma, el Pánuco presenta una subestructura que separa a la población de El Molino de los otros dos grupos (Lerma y Pánuco), puede observarse por los valores de  $F_{st}$ , la distancia genética y el filograma.

Meffe y Vrijenhoek, en 1988 han propuestos dos modelos para explicar la estructura genética en poblaciones de peces en ambientes desérticos: el modelo del Valle de la Muerte (*Death Valley model*) y el modelo de la jerarquía de la corriente (*Stream Hierarchy model*). El primero se caracteriza por considerar poco flujo genético entre los *demes* (o colonias). Así, la diversidad genética total de una especie se compone por la diversidad genética entre colonias, más la diferencia genética entre colonias, dentro del rango total de distribución. De esta forma se asume que las poblaciones antes formaban una sola población panmíctica, que fue separada en pequeños remanentes a causa de una desecación del cuerpo de agua, dejando pequeñas “islas” bien diferenciadas, por lo que hay poca diversidad

genética dentro de ellas y como consecuencia una gran distancia genética entre una y otra.

El modelo de Jerarquía de Corriente es más complejo. Suele darse en especies que habitan sistemas rivereños dendríticos, variando en grados de conexión y flujo genético. Las especies en este modelo presentan *demes* que solo están parcialmente aislados de otros pozos genéticos con alguna probabilidad de flujo genético, ya que hay una conexión periódica o permanente que permite la migración y el flujo genético entre hábitats. La divergencia poblacional local es menos extrema que en el modelo de Valle de la Muerte. La diversidad genética total se presenta de forma jerárquica: diversidad dentro de las colonias; diferencias entre colonias dentro de un río; diferencia entre ríos dentro de una cuenca y divergencia entre las cuencas ocupadas de una especie.

Con base en nuestros resultados, la estructura genética de las poblaciones de *G. multiradiatus* analizadas es explicada por el modelo de Jerarquía de corriente (*Stream Hierarchy Model*). Dado que el patrón en la distribución de los haplotipos, indica que no se comparten entre las cuencas, es decir: son privados. Este tipo de distribución de haplotipos se ha encontrado en otros peces cuya estructura ha explicado por el modelo de Jerarquía por la corriente. Mossop et al. (2015), estudiaron la estructura genética de dos especies del pez desértico *Chlamydogobius*. Observaron que la distribución de los haplotipos está determinada por la conexión de las colonias con el Lago Ery más que por las barreras entre los cuerpos de agua. Esta distribución es similar a la encontrada en las cuencas que hemos estudiado: un grupo exclusivo para el Lerma, otro para el Pánuco y uno más para El Molino.

La distribución de los haplotipos en el Lerma, es similar a la encontrada en el trabajo de Ferreira et al. (2015), en el pez neotropical *Geophagus brasiliensis*, donde un haplotipo se comparte entre todo el flujo del río Laranjinha, teniendo una alta frecuencia en cada población. Sin embargo, el hecho de que el Haplotipo 2 se encuentre también en localidades altas (corriente arriba), como lo son Presa

Brockman y Salazar, sugiere que estas localidades se separaron del grupo del Lerma recientemente.

Vrijenhoek et al. (1985), describieron una estructura similar en el pez desértico *Poeciliopsis occidentalis*. En ese trabajo describen la formación de tres grupos determinados por la conexión y atribuyen 52.8% de la variación a la aportada por los grupos geográficos. Es notable la similitud de esos resultados con los reportados en este trabajo en los que 57.29% de la variación genética proviene de la diferencia entre las cuencas. La variación restante se reparte entre la variación dentro de las poblaciones (26.39%) y entre poblaciones de la misma cuenca (16.32%). Estos datos respecto a la variación genética apoyan a la idea de que la estructura poblacional dentro del Pánuco corresponde al modelo de Jerarquía de corriente.

Por último, Hopken et al. (2013), también encontraron una configuración similar al estudiar al pez *Catostomus discobolus*, los clados corresponden a UES (Unidades Evolutivas Significativas), con estructura jerárquica de corriente similar a lo observado en el Lerma y el Pánuco. De esta forma se asume que las poblaciones del Lerma forman un solo clado debido a su cercanía y reciente separación o continua conexión, mientras que las poblaciones del Pánuco constituyen dos grupos, uno que comprende dos poblaciones corriente arriba (Ximojay y Huapango), y otra que lo forma una población corriente abajo (El Molino).

Con base en nuestros resultados, se infiere que hace relativamente poco tiempo, la cuenca del Lerma constituía una sola población panmíctica, la divergencia entre las poblaciones era poca, incluso entre las localizadas corriente arriba (Salazar y Brockman). La baja diversidad genética de las poblaciones del Lerma nos puede hacer pensar que se encuentran en un estado similar al del modelo Valle de la Muerte. Sin embargo, al ver que tampoco hay divergencia entre las poblaciones se rechaza esta propuesta, puesto que en el modelo las poblaciones divergen mucho una de otra.

La estructura genética de las poblaciones en la cuenca del Pánuco puede ser asociada con la propuesta en el modelo de jerarquía de corriente. Entre menos

conexión se tenga río arriba habrá menos contacto y más divergencia. Es importante mencionar que los cuerpos de agua de esta cuenca corresponden a presas, cuyas cortinas pueden representar un problema para el flujo genético corriente arriba, sin embargo, eso solo explicaría la estructuración en tiempo muy reciente (no más de 100 años). Las barreras geográficas existentes no explican del todo la divergencia genética de El Molino con respecto a otros cuerpos de agua de la cuenca, pudiendo existir otros eventos que fomenten esta divergencia.

Una posible explicación es que El Molino pasa la mayor parte del estiaje con poco volumen de agua. Cuando comienzan las temporadas de lluvias vuelve a su tamaño. Es posible que la corriente proveniente de la Presa Huapango no sea la única que lo abastece, pudiendo existir arroyos que alimentan la presa y con ellos aportando nuevos haplotipos. De ser así, estos nuevos haplotipos se reúnen en la presa en temporadas de lluvias y estarían muy emparentados unos con otros. El Molino podría ser una población recipiente de otras poblaciones, explicando su alta diversidad. La razón de la alta divergencia de El Molino con las otras poblaciones del Pánuco podría deberse al poco contacto que hay de éstas con El Molino. Basándonos en los conocimientos que se tienen respecto a la biología de la especie, las hembras prefieren aparearse con machos homocigóticos a ellas. En el Molino pudieran estar llegando más migrantes de los arroyos circundantes que de la Presa Huapango. Así, las hembras provenientes de Huapango se pudieran ver reacias a aparearse con machos de El Molino, haciendo nulo el flujo genético de las hembras a este cuerpo de agua.

### **Inferencias filogeográficas de *G. multiradiatus***

Para reconstruir la historia de las poblaciones de *G. multiradiatus* es necesario abordar su historia demográfica. Los estadísticos de  $F_s$  de  $F_u$  y  $D$  de Tajima nos muestran que las cuencas han pasado por un cuello de botella reciente, seguido de una expansión poblacional. Para poder profundizar en el caso del Pánuco, donde se muestra una subestructuración dentro de la cuenca, tenemos que retomar los valores de los estadísticos observados en cada población. Siendo así



podemos inferir que las poblaciones de Huapango y El Molino se originaron de una pequeña población que se expandió en el Pánuco.

Guzmán et al. (2015), afirman que la cuenca del Lerma y el Pánuco estuvieron unidas durante el Plioceno-Mioceno (23Ma-2.59Ma), siendo que al menos para este periodo la población de *G. multiradiatus* posiblemente ocupaba la distribución de ambas cuencas. La subcuenca del Río San Juan perteneciente al Pánuco, comienza su cauce en las corrientes del Ñado y la Presa Huapango. Esta región del Río San Juan formaba anteriormente parte del Lerma, siendo capturado su cauce por el Pánuco durante el Pleistoceno (2.58 Ma-0.13 Ma). Se infiere que al ser capturado el Río San Juan fue que se separaron los linajes del Lerma y del Pánuco (Domínguez et al. 2010).

Otros datos importantes que nos arroja el trabajo de Domínguez et al. 2010, es una recopilación de distancias genéticas en especies de peces que tienen su distribución en ambas cuencas, para *Xenotoca variata* y *Godea atripinis*, es de  $D_{HKY}=0.014$  y  $D_{HKY}=0.008-0.011$ ; para *Poeciliopsis infans*, *Neotrópis sallei*, *Yuriria alta* y *Algansea tincela*, tuvieron una divergencia de 1%. En lo encontrado en este estudio las distancias entre poblaciones del Lerma y Pánuco son de 0.2886-0.9883, concordando con los datos mencionados en el estudio y apoyando la idea de la separación entre los linajes debido a esta captura hidrológica.

### **Unidades Evolutivas Significativas y conservación de *G. multiradiatus*.**

La primera definición de UES (ESU en inglés), fue dada por Ryder (1986), que la define como unidades poblacionales que presentan variación adaptativa significativa, basada en la concordancia entre grupos de datos derivados de diferentes técnicas (historia de vida, morfología, rango y distribución y datos genéticos. Según Casacci et al. (2013), las UES es tomada como unidad de conservación, que puede comprender desde una especie entera, hasta múltiples linajes dentro de una especie. Hacen hincapié en la necesidad de incluir en el concepto datos ecológicos, de comportamiento así como patrones biogeográficos y

morfológicos, debido al uso excesivo de los datos moleculares para definir estas unidades.

De ese modo logramos incluir en el trabajo información proveniente de dos fuentes: moleculares y ecológicas. Tenemos en primer lugar los datos provenientes del filograma y la red de haplotipos, que nos muestran tres clados definidos: Lerma, Pánuco y Molino. Las poblaciones se separan geográficamente por las cuencas, definiendo al menos dos de los grupos. En cuanto a lo ecológico, tenemos que tres poblaciones ocupan el mismo nicho ecológico, que son Huapango, Ximojay y Sierra Morelos. Con esto podemos ver que el grupo que comprende Pánuco (Hp y Xi) tiene el mismo nicho ecológico. El grupo que comprende Lerma, es el más diverso, ya que las variables que los determinan son distintas, teniendo diferentes nichos Brockman, Salazar e Ignacio Ramírez, por lo que se infiere que, pese a que genéticamente es un solo grupo, se pueden adaptar a distintos factores externos que puedan influenciar los cuerpos de agua directa o indirectamente. Para el grupo de El Molino se observa que ocupa su propio nicho ecológico, además de ser el más alejado de los demás grupos.

En el trabajo de Piller et al. (2015), lograron definir a *Xenotoca enseni*, como una UES a partir de dos marcadores: ITS y Cytb. Hacen referencia a que cada clado que encuentran es un linaje único con una historia evolutiva independiente. Con los datos obtenidos se llega a la conclusión que existen probablemente 3 UES dentro de las poblaciones muestreadas de *G. multiradiatus*, lo cual se respalda tanto por los datos moleculares y ecológicos.

Para *G. multiradiatus* no hay literatura que mencione si necesita o tiene un nivel de protección ni de conservación. Tampoco existe legislación en México que lo proteja como especie. La única referencia que se hace a UES en la especie es por el portal <http://www.goodeidworkinggroup.com/>, el cual se especializa en recolectar información y bibliografía acerca de los organismos de esta familia. En este portal la entrada dedicada a *G. multiradiatus* menciona que hay dos UES, llamadas Girmu1 y Girmu2. La Girmu1 comprende la población de Lagunas de Zempoala y la Girmu2 comprende a todas las demás poblaciones del Lerma,

Pánuco y Balsas. El grupo que denominamos “Lerma” corresponde a la UES Girmu2. Sin embargo los grupos “Pánuco” y “Molino” son posiblemente una UES diferente aún no definida.

A través de los análisis realizados se pudo conocer el estado actual de las colonias de *Girardinichthys multiradiatus* en dos cuencas del Estado de México. Si bien en muchas poblaciones aún es posible encontrar a la especie, cada vez es más difícil encontrarla. Factores como la contaminación y desecación pueden afectar a poblaciones con baja diversidad genética, como son todas las de la Cuenca del Lerma. Tenemos el caso de poblaciones como las de Villa Victoria y Chignahuapan que no pudieron ser encontradas para ser incluidas en el estudio. Algo que se ha observado es que en lugares donde solía encontrarse el mexclapique anteriormente, han aparecido peces de la familia *Poeciliidae*, lo cual podría indicar una relación con su desaparición, sin embargo, se requieren más estudios para corroborar esta hipótesis.

## **Conclusiones**

Las poblaciones del mexclapique están estructuradas genéticamente en, al menos, tres grupos. Éstos se conforman por las cuencas del Lerma, Pánuco y la población de El Molino. El modelo de estructura poblacional que mejor explica el patrón de las poblaciones es el de Jerarquía de Corriente. Sin embargo, la alta variación en haplotipos y diversidad encontrada en El Molino, hace pensar que otros procesos están interviniendo en la divergencia entre el grupo Pánuco y éste, posiblemente debido a otras poblaciones no descritas y/o al factor sexual de la especie, lo cual podría investigarse en un futuro.

Se proponen dos nuevas UES, que comprenden los grupos de Panuco y El Molino, más la ya reportada del Lerma. Es necesario un análisis con un mayor número de marcadores genéticos con diferentes tasas evolutivas, así como análisis morfológicos, etológicos y de nicho ecológico dentro de los cuerpos de agua para apoyar esta propuesta en futuro y poder realizar un plan de manejo y conservación efectivo para la especie.

## Bibliografía

- Arellano-Aguilar, O. y Macías García C. (2008). Exposure to pesticides impairs the expression of fish ornaments reducing the availability of attractive males. *Proceedings. Biological Sciences.* 275(1640):1343-50. DOI:10.1098/rspb.2008.0163.
- Arellano-Aguilar, O. y Macías García, C. (2009). Effects of methyl parathion exposure on development and reproduction in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Environmental Toxicology.* 24(2):178-86. DOI: 10.1002/tox.20414.
- Arif, I. A. y Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation.* 32 (1): 9–17.
- Avise, J. C. (2001). Phylogeography. En Brenner S. y Miller J. H. (2001) *Encyclopedia of Genetics.* pp: 1466-1467. Academic Press. ISBN: 978-0-12-227080-2.
- Avise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography.* (36) Pp: 3-15.
- Barton, N. H; Briggs, D; Eisen, J, A; Goldstein, D, B. y Patel H. (2007). *Evolution.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Casacci, L. P; Barbero, F. y Balletto, E. (2013). The “Evolutionarily Significant Unit” concept and its applicability in biological conservation. *Italian Journal of Zoology.* Pp: 1-12. DOI: 10.1080/11250003.2013.870240.
- Chakraborty, R. (1993). Analysis of genetic structure of populations: meaning, methods, and implications. En Majumder P.P. (1993) *Human Population Genetics.* Pp: 189-206. Springer, Boston, MA.
- Clement, M; Snell, Q; Walker, P; Posada, D. y Crandall, K. (2002). TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium. International Proceedings.* (2) Pp: 184.
- De La Vega-Salazar, M, Y; Tabche, L. M. y Macías-García, C. (1997). Bioaccumulation of Methyl Parathion and Its Toxicology in Several Species of the Freshwater Community in Ignacio Ramirez Dam in Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* (38) Pp: 53-62. DOI:10.1006/eesa.1997.1551.
- Domingues, R, R; Bruels, C, C; Gadig, O, B, F; Chapman, D, D; Hilsdorf, A, W, S y Shivji, M, S. (2018). Genetic connectivity and phylogeography of the night shark (*Carcharhinus signatus*) in the western Atlantic Ocean: Implications for conservation management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystem.* (29) Pp: 102-114. DOI: 10.1002/aqc.2961.

- Domínguez-Domínguez, O; Pedraza-Lara, C; Gurrola-Sánchez, N; Perea, S; Pérez-Rodríguez, R; Israde-Alcántara, I; Garduño-Monroy, V, H; Doadrio, I; Pérez-Ponce de León, G y Brooks, D, R. (2010). Historical Biogeography of the *Goodeinae* (Cyprinodontiformes). *Viviparous Fishes II* Pp: 13-30.
- Domínguez-Domínguez, O. y Pérez-Ponce de León, G. 2007. Los goodeidos, peces endémicos del centro de México. *CONABIO. Biodiversitas* (75) Pp: 12-15.
- Emerson, B, C y Hewitt, G, M. Phylogeography. 2005. *Current Biology*. 15 (10) Pp: 367-371.
- Excoffier, L. Y. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. (10) Pp: 564-567.
- Ferreira, D. G; Galindo, B, A; Frantine-Silva, W; Almeida, F, S y Sofía, S, H. 2015. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. *Conservation Genetics*. (16) Pp: 151-166. DOI: 10.1007/s10592-014-0648-2
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994). Cebadores de ADN para la amplificación de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial de diversos invertebrados metazoarios. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294-299.
- Gesundheit, P., y Macías García, C. (2005). Biogeografía cladística de la familia *Goodeidae*. En: Bousquets, J. y Morrone, J. Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines: Primeras Jornadas Biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática. Pp: 319-338. Ciudad de México: UNAM.
- González, Z. C., y Macías, G. C. (2006). Phenotypic differentiation and pre-mating isolation between allopatric populations of *Girardinichthys multiradiatus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. (273) Pp: 301-307.
- Goodeid Working Group. (2019). *Girardinichthys multiradiatus*. Consultado 26 de Julio del 2019, de Goodeid Working Group Sitio web: <http://www.goodeidworkinggroup.com/girardinichthys-multiradiatus>.
- Guo, X-Z; Zhang, G-R; Wei, K-J; Ji, V; Yan, R-J; Wei, Q-W y Gardner J. P. A. (2019). Phylogeography of the threatened tetraploid fish, *Schizothorax waltoni*, in the Yarlung Tsangpo River on the southern Qinghai-Tibet Plateau: implications for conservation. *Scientific Reports* (9) Pp: 2704-2719.
- Guzmán A. F. (2015). El registro fósil de los peces mexicanos de agua dulce. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. (86) Pp: 661-673.

- Hopken, M. W; Douglas, M. R. y Douglas, M. E. (2013). Stream hierarchy defines riverscape genetics of a North American desert fish. *Molecular Ecology*. (22) Pp: 956-971.
- Janes, J. K y Batista, P. D. (2016). The Role of Population Genetic Structure in Understanding and Managing Pine Beetles. *Advances in Insect Physiology*. (50). Pp: 75-100.
- Kearse, M. M-H. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28 (12) Pp: 1647-1649.
- Kumar, S; Stecher, G. y Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- Kreiser, B. R; Mitton, J. B. y Woodling, J. D. (2001). Phylogeography of the plains killifish, *Fundulus zebrinus*. *Evolution*. 2 (55) Pp: 339-350.
- Koeck, M., Daniels, A. y Maiz-Tome, L. 2019. *Girardinichthys multiradiatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T9195A3150207. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T9195A3150207.en>. Downloaded on 15 August 2019.
- Lakra, W. S; Goswami, M. y Gopalakrishnan, A. (2009). Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian *Sciaenids* (*Pisces: Perciformes, Sciaenidae*) based on 16SrRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Molecular Biology Report*. (36) Pp: 831-839.
- Leigh, J. W. y Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6 (9) Pp: 1110–1116.
- Li, G; Peng, Z; Zhang, R; Tang, Y; Tong, C; Feng, C; Zhang, C. y Zhao K. (2016). Mitonuclear phylogeography of the cyprinid fish *Gymnodiptychus dybowskii* in the arid Tien Shan region of Central Asia. *Biological Journal of the Linnean Society*. (118) Pp: 301-314.
- Macías-García C. y Valero A. (2001). Context-dependent sexual mimicry in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Ethology Ecology & Evolution*. 4 (13) Pp: 31-339.
- Macías-García C. y Burt de Perera T. (2002). Ultraviolet-base female preference in a viviparous fish. *Behavior, Ecology and Sociobiology*. (52) Pp: 1-6.
- Macías-García C. y Saborío E. (2004). Sperm competition in a viviparous fish. *Environmental Biology of Fishes*. (70) Pp: 211-217.
- Macías-García, C; Smith, C; González-Zuarth, C; Graves, J. A. y Ritchie, M. G. (2012). Variation in sexual dimorphism and assortative mating do not predict genetic

- divergence in the sexually dimorphic Goodeid fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Current Zoology*. 3 (58) Pp: 440-452.
- Meek, S. E. (1904). *The Fresh-Water Fishes of Mexico North of the Isthmus of Tehuantepec*. Zoological Series. Vol 5. Field Columbian Museum. Chicago.
- Meffe G. K. y Vrijenhoek R. C. (1988). *Conservation Genetics on the Management of Desert Fishes*. *Conservation Biology*. 2 Pp: 157-169.
- Miller, R; Minckley, W. L; Norris, S. M. y Hall, M. G. (2009). Capítulo 6. Los Peces. Familia *Goodeidae*. *Girardinichthys multiradiatus*. En R. M. Miller. (2009) *Peces Dulceacuícolas de México*. (págs. 308-309). Ciudad de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Mossop K. D; Admas M; Unmack P. J; Smith D; Wong B. B. M. y Chapple D. G. (2015). Dispersal in the desert: ephemeral water drives connectivity and phylogeography of an arid-adapted fish. *Journal of Biogeography*. (42) Pp: 2374-2388.
- Navarrete-Salgado, N. A; Cedillo-Díaz, B. E; Contreras-Rivero, G. y Elías-Fernández, G. (2007). Crecimiento, reproducción y supervivencia de *Girardinichthys multiradiatus* (*Pisces, Goodeidae*) *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 13 (1) Pp: 15-21. (a)
- Navarrete-Salgado, N; Rojas-Bustamante; Contreras-Rivero y Elías-Fernández, G. (2007). Alimentación de *Girardinichthys multiradiatus* (*Pisces: Goodeidae*) en el embalse La Goleta, Estado de México. *Ciencia Ergo Sum*. 14 (1) Pp: 63-68.(b)
- Pfleiderer, S. J; Geiger, M. F. y Herder, F. (2014). *Aphanius marassantensis*, a new toothcarp from the Kizilirmak drainage in northern Anatolia (*Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae*). *Zootaxa*. 5 (3887) Pp: 569-582.
- Piller, K. R; Kenway-Lynch, C. S; Camak, D. T. y Domínguez-Domínguez, O. (2015). Phylogeography and Population Structure of the Imperiled Redtail Splitfin (*Goodeidae: Xenotoca eiseni*): Implications for Conservation. *Copeia*. 2 (103) Pp: 440-454.
- Ritchie, M. G; Hamill, R. M; Graves, J. A; Magurran, A. E; Webb, S. A. y Macías García, C. (2007). Sex and differentiation: population genetic divergence and sexual dimorphism in Mexican goodeid fish. *Journal of Evolutionary Biology*. (20) Pp: 2048-2055.
- Roderick, G. K. (1996). Geographic Structure of Insect Populations: Gene Flow, Phylogeography, and Their Uses. *Annual Reviews of Entomology*. (41) Pp: 325-52.
- Rodríguez-Varela, A. C; Cruz-Gomez, A; Vázquez-López, H., K. y Palacios-Navarro, L. R. (2015). Ichthyofauna in the Xhimojay Dam, State of Mexico. *American Journal of Life Sciences*. 3 Pp: 184-189.



- Rozas, J; Ferrer-Mata, A; Sánchez-Del Barrio, A; Guirao-Rico, S; Librado, P; Ramos-Onsins, S. y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*. 34 (12) Pp: 3299-3302.
- RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Ryder, O.A. (1986). Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Tree* 1 (1) Pp: 9-10
- Valentini, A; Pompanon, F. y Taberlet P. (2008). DNA barcoding for ecologist. *Trends in Ecology and Evolution*. 24 (2) Pp: 110-117.
- Vrijenhoek, R; Douglas, M. E. y Meffe G. K. (1985). Conservation Genetics of Endangered Fish Populations in Arizona. *Science*. 229 Pp: 400-402.
- Ward, R. D; Zemlak, T. S; Innes, B. H; Last, P. R. y Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*. 360 Pp: 1847-1857.
- Webb, S., A; Graves, J. A; Macias-Garcia, C; Magurran, A.; E; Foighil, D. Ó. y Ritchie, M., G. (2004). Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, pp: 527-544.