



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVERSIDAD MORFOLÓGICA Y SEÑAL FILOGENÉTICA DE LA
FORMA ENTRE LINAJES DE LA SARDINITA MEXICANA *ASTYANAX
MEXICANUS* (ACTINOPTERYGII; CHARACIDAE) EN EL NOROESTE
DE MÉXICO.**

TESIS

Que para optar por el grado académico de:
Maestro en Ciencias

Presenta:

JORGE HERNÁNDEZ LOZANO

Tutora principal:

Dra. Claudia Patricia Ornelas García, Instituto de Biología de la UNAM

Comité tutor:

Dr. Píndaro Díaz Jaimes, Instituto de Ciencias del mar y Limnología
Dr. Roberto Munguía Steyer, Facultad de Estudios Superiores de Iztacala

Jurado:

Dra. Gabriela Parra Olea, Instituto de Biología de la UNAM
Dr. Norman Mercado Silva, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

MÉXICO, CD. MX. DICIEMBRE, 2021



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVERSIDAD MORFOLÓGICA Y SEÑAL FILOGENÉTICA DE LA
FORMA ENTRE LINAJES DE LA SARDINITA MEXICANA *ASTYANAX
MEXICANUS* (ACTINOPTERYGII; CHARACIDAE) EN EL NOROESTE
DE MÉXICO.**

TESIS

Que para obtener el grado académico de:
Maestro en Ciencias

Presenta:
JORGE HERNÁNDEZ LOZANO

Tutora principal:
Dra. Claudia Patricia Ornelas García, Instituto de Biología de la UNAM

Comité tutor:
Dr. Píndaro Díaz Jaimes, Instituto de Ciencias del mar y Limnología
Dr. Roberto Munguía Steyer, Facultad de Estudios Superiores de Iztacala

Jurado:
Dra. Gabriela Parra Olea, Instituto de Biología de la UNAM
Dr. Norman Mercado Silva, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

MÉXICO, CD. MX. DICIEMBRE, 2021

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología y al Instituto de Biología de la UNAM por brindarme la oportunidad de realizar esta maestría.

Agradezco el apoyo y financiamiento a esta investigación a través de los proyectos de PAPIIT IN212419 y al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Agradezco enormemente a mi tutora principal la Dra. Claudia Patricia Ornelas García (IBUNAM) por su dirección, consejo y apoyo durante la realización de esta tesis de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial, compuesto por el Dr. Díaz Jaimes Píndaro (ICML, U.N.A.M) y el Dr. Roberto Munguía Steyer (FES Iztacala), así como a los miembros de mi jurado de grado, la Dra. Gabriela Parra Olea (IBUNAM) y el Dr. Norman Mercado Silva (UAEM) por el constante apoyo y consejo.

Agradecimientos personales

Le dedico este trabajo de investigación a mi familia, que me ha apoyado en todo momento y en las etapas más difíciles de este ciclo. A mis padres, abuelos y tíos que me han soportado en todo momento. Pero sobre todo a mi hermana Montserrat Hernández Lozano, que tiene una voluntad inquebrantable y a mis pequeños sobrinos (Dominic, Nicole y Romina) que son el futuro de México.

Agradezco mucho a todas las amistades y compañeros nuevos que se forjaron durante el camino, empezando por la Dra. Patricia que me enseñó el maravilloso modelo de investigación que son los *Astyanax*. A Carlos, Marco, Jazmín, Alberto, Víctor, Sandra, Jessica, Vladimir y Angélica, gracias por todo el apoyo en las buenas y en las malas.

A esas amistades entrañables, que a pesar del tiempo y las responsabilidades laborales se mantienen firmes (*i.e.* los jinetes del caos, los de vallejo, los del CCH, etc.). Enfatizando en Ramón, Arely y Aketzali que estuvieron durante todo el proceso. Así como a las nuevas amistades que se generaron en el camino, durante las noches de relajación (Ruisseñor, Mike, Navi y Gustavo). Finalmente, a un par de personas del otro lado del charco que conocí en las etapas finales de este escrito (durante una salida al campo), a pesar de que ha sido poco el tiempo de conocerles les tomé mucha estima y cariño, así es, me refiero a la pequeña Lucia y a Silvia que cuidó de nosotros cual mamá responsable.

Dedicatoria especial a Francisco Martínez (Yoshi) e Isaac Miranda (mi tío), increíbles personas que la pandemia por COVID-19 no les permitió ver el final de este trabajo, en paz descansen.

Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción general.....	5
Objetivo.....	11
Objetivos específicos	11
Área de estudio.....	12
CAPÍTULO I: Variación fenotípica.....	16
Introducción.....	16
Métodos.....	19
Resultados.....	25
Discusión.....	37
Conclusión.....	44
Bibliografía.....	45
CAPÍTULO II: Ecología trófica.....	49
Introducción.....	49
Métodos.....	52
Resultados.....	58
Discusión.....	65
Conclusión.....	70
Bibliografía	71
CAPÍTULO III: Procesos que afectan la evolución morfológica.....	74
Introducción.....	74
Métodos.....	77
Resultados.....	81
Discusión.....	86
Conclusiones.....	90
Bibliografía.....	91
Discusión general	96
Conclusiones generales.....	104
Bibliografía.....	105

Resumen

La sardinita mexicana, *Astyanax mexicanus*, es un organismo modelo en biología evolutiva, debido a que dentro de la especie encontramos dos morfotipos asociados al ambiente donde viven: la forma de superficie y la forma troglobia. El morfotipo troglobio ha sido reportado en al menos 32 cuevas distintas entre los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas. Estudios genéticos recientes sugieren que podrían haberse originado en al menos dos episodios distintos, correspondientes con dos linajes genéticos, denominados como el “linaje viejo” y “linaje nuevo”.

A fin de entender los patrones de evolución morfológica en la especie, en este estudio se caracterizaron aquellos rasgos que han surgido de forma independiente entre linajes cercanamente relacionados, cuando son expuestos a presiones selectivas similares (e.g. cuevas), mediante diversos análisis morfométricos. Además, se evaluó la ecología trófica por medio del estudio de isótopos estables y su relación con la ecomorfología, junto con la construcción de un índice de entrada de nutrientes para conocer el impacto de las características físicas de la cueva en la dinámica ecológica. Y finalmente, se evaluaron los mecanismos relacionados con las fuentes de variación fenotípica (i.e. modularidad como promotor de la diversidad, y la señal filogenética como evidencia de limitación por la contingencia histórica).

Los resultados de esta tesis encontraron patrones de evolución morfológica en paralelo en la ecomorfología, la premaxila, el cuerpo y la cabeza en los dos linajes de los *Astyanax mexicanus* troglobios, generando una forma troglobia que los distingue de su homólogo de superficie, siendo la forma de la cabeza donde encontramos la mayor diferenciación morfológica, seguido de la premaxila y por último, la forma del cuerpo. Se encontraron diferencias en las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en los niveles de enriquecimiento entre poblaciones y regiones geográficas, los valores obtenidos sugieren que el nivel trófico y la base de carbono es similar en todas las cuevas. No hubo una correlación entre la señal isotópica y la ecomorfología, además, observamos una tendencia que indica que las características físicas de las cuevas podrían afectar la dinámica ecológica de cada una de ellas. Finalmente, encontramos evidencia de evolución modular para la forma del cuerpo y la forma de la cabeza, observando patrones diferentes entre los morfotipos. Para el morfotipo troglobio, las mejores hipótesis dividen al cuerpo en dos (cabeza y cuerpo) y tres módulos (cabeza,

parte media del cuerpo y cauda), siendo en ambos casos módulos que pueden tener una asociación en la obtención de recursos, así como locomoción y uso de hábitat. En el morfotipo de superficie, contrastó principalmente en la integración presente en la zona caudal y la región media del cuerpo, exhibiendo más una adaptación a las funciones locomotoras. Estas diferencias observadas entre morfotipos podrían ser evidencia de las diferentes presiones selectivas ejercidas en cada ambiente, alterando la evolución modular entre morfotipos. En el caso de la señal filogenética, se observó que no hay un efecto filogenético en la forma del cuerpo, lo que podría deberse a una evolución homoplásica de la forma en respuesta de las presiones selectivas contrastantes del ambiente. En la premaxila sí encontramos señal filogenética, por lo que esta estructura si tiene conservadurismo relacionado con su historia evolutiva y probablemente con su función ecológica.

Abstract

The Mexican sardine, *Astyanax mexicanus*, is a model organism in evolutionary biology, due to the fact that within the species we find two morphotypes associated with the environment where they live: the surface form and the troglobian form. The troglobian morphotype has been reported in at least 32 different caves between the states of San Luis Potosí and Tamaulipas. Recent genetic studies suggest that they could have originated in at least two different episodes, corresponding to two genetic lineages, named the “old lineage” and the “new lineage”.

In order to understand the patterns of morphological evolution in the species, in this study were characterized those traits that have arisen independently between closely related lineages, when exposed to similar selective pressures (e.g. caves), through morphometric analyzes. In addition, the trophic ecology was evaluated through the study of stable isotopes and their relationship with ecomorphology, together with the construction of a nutrient input index to know the impact of the physical characteristics of the cave on the ecological dynamics. Finally, the mechanisms related to the sources of phenotypic variation (i.e. modularity as a promoter of diversity, and the phylogenetic signal as evidence of limitation due to historical contingency) were evaluated.

The results of this thesis found patterns of parallel morphological evolution in the ecomorphology, the premaxilla, the body and the head in the two lineages of the *Astyanax mexicanus* cavefish, generating a troglobian form that distinguishes them from their surface counterpart, being the shape of the head where we find the greatest morphological differentiation, followed by the premaxilla and finally, the shape of the body. Differences were found in isotopic signals $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ enrichment levels between populations and geographic regions, but the values obtained suggest the trophic level and the base carbon is similar in all the caves. There was no correlation between the isotopic signal and the ecomorphology, in addition, we observed a trend that indicates that the physical characteristics of the caves could affect the ecological dynamics of each cave. Finally, we found evidence of modular evolution for body shape and head shape, observing different patterns between morphotypes. For the troglobian morphotype, the best hypotheses divide the body into two (head and body) and three modules (head, middle part of the body and caudal), being in both cases modules that may have an association in obtaining resources, as well as locomotion

and habitat use. In the surface morphotype, it mainly contrasted in the integration present in the caudal zone and the middle region of the body, exhibiting more an adaptation to locomotor functions. These differences observed between morphotypes could be evidence of the different pressures exerted in each environment, altering the modular evolution between morphotypes. In the case of the phylogenetic signal, it was observed that there is no phylogenetic effect on the body shape, which could be due to a homoplasy evolution of the shape in response to the selective pressures of the environment. In the premaxilla we find a phylogenetic signal, so this structure does have conservatism related to its evolutionary history and probably its ecological function.

Introducción general

*El complejo *Astyanax mexicanus**

El género *Astyanax* es conformado por peces pertenecientes a la clase Actinopterygii, Orden Characiformes y familia Characidae, presenta una gran diversidad con al menos 200 especies reconocidas (Eschmeyer, revisado en 2021). Posee la distribución más amplia en esta familia para el continente americano, y sus especies se localizan en diferentes cuerpos de agua desde la Patagonia en Argentina hasta el sur de Estados Unidos (Ornelas-García *et al.*, 2008; Eschmeyer, revisado en 2021). Se caracteriza por tener alta plasticidad fenotípica y una gran capacidad de adaptación a diversos hábitats, lo que puede promover su alta riqueza específica (Ornelas-García *et al.* 2008; Jeffery, 2009). En México, se puede encontrar al género *Astyanax* en una gran diversidad de cuerpos de agua de todo el país, siendo de particular interés la sardinita mexicana, *Astyanax mexicanus*, la cual presenta dos formas: una de superficie y una de cueva que son interfértiles entre sí (Jordan, 1946). La forma de superficie está ampliamente distribuida en la región norte del país, desde las cuencas de los ríos Tecolutla y Paso de Ovejas en la vertiente Atlántica, y la cuenca del Nazas-Aguanaval en la vertiente Pacífica (Ornelas-García y Pedraza, 2016). Mientras que la forma de cueva ha sido reportada en la región noroeste de México, en al menos 32 cuevas que se ubican en la Sierra de El Abra y la sierra de la Colmena en San Luis Potosí; y en la Sierra de Guatemala en Tamaulipas (Mitchell *et al.*, 1977; Elliot, 2018; Espinasa *et al.*, 2020), y una población al sur de la faja volcánica transmexicana en la cuenca del río Balsas, en la localidad de Granada (Elliott, 2018).

A las poblaciones que habitan dentro de estas cuevas se les conoce como cavernícolas o troglobias, y presentan una gran cantidad de adaptaciones a las condiciones extremas que enfrentan (Jeffery, 2009). Estas adaptaciones pueden ser regresivas: reducción o ausencia del ojo, albinismo; o constructivas: desarrollo de células sensoriales, un sistema gustativo más sensible (Wilkens, 1988; Jeffery, 2009; Tabin, 2016). Aunado a dichas características morfológicas se han propuesto una serie de adaptaciones conductuales, las cuales se conocen como “síndrome de

cueva”, entre los que se destacan modificaciones en los ciclos del sueño, falta de agresividad, entre otros (Dubuoé *et al.*, 2012; Elipot *et al.*, 2014).

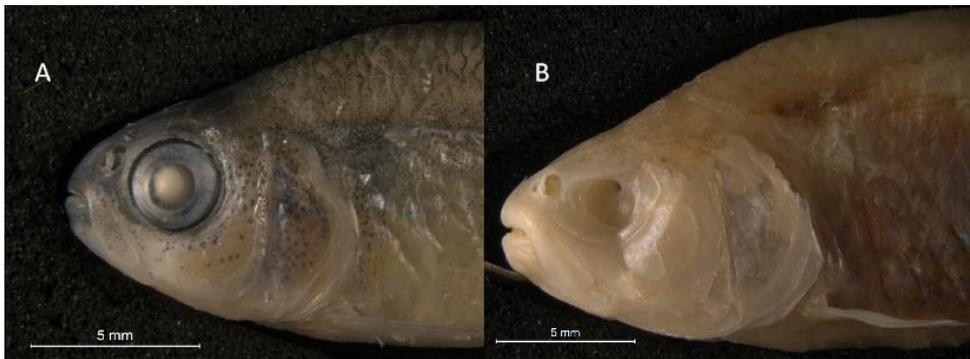


Fig. 1 Los dos morfotipos de *Astyanax mexicanus*. A) La forma de Superficie. B) La forma Troglobia

Historia evolutiva del grupo

La primera forma troglobia fue descubierta en la Cueva Chica en la región de la Sierra de El Abra en 1936 (Mitchell *et al.*, 1977) y debido a las marcadas diferencias con el grupo de superficie (principalmente la falta del ojo y de pigmentación) se le denominó como un género y especie distinta “*Anoptichthys jordani*” (Hubbs e Inés, 1937). Posteriormente, otras poblaciones de cuevas también fueron descritas como diferentes especies: *A. antrobius* (Álvarez, 1946) para la cueva El Pachón y *A. hubbsi* (Álvarez, 1947) para la Cueva de Los Sabinos, hasta que se demostró la interfertilidad con las poblaciones de superficie (Jordan, 1946), lo que tuvo como resultado el cambio al género *Astyanax*. La comunidad científica ha reportado la existencia de múltiples linajes genéticos para las poblaciones que habitan en las cuevas (Wilkens, 1988; Ornelas-García *et al.*, 2008; Strecker *et al.*, 2004; Coghill *et al.*, 2014; Herman *et al.*, 2018). Con el objetivo de esclarecer la historia evolutiva de estas poblaciones, se han utilizado diversos marcadores moleculares (mitocondriales -COI, ND2 Cytb-, los microsatélites y SNP’s del genoma completo), obteniendo como resultado diferentes reconstrucciones históricas y evidenciando el efecto tanto de los marcadores utilizados, como del muestreo (Bradic *et al.*, 2012; Bradic *et al.*, 2013; Wilkens *et al.*, 2003; Hausdorf, 2011).

Wilkens (1988) fue el primer autor en referirse a las poblaciones troglobias como dos linajes: el linaje filogenéticamente “viejo”, que hace referencia a las poblaciones más antiguas, y el filogenéticamente “joven”, para las poblaciones más recientes, con

base en marcadores moleculares y el grados de regresión evolutiva que observaron hasta el momento en las distintas poblaciones. De este modo, el “linaje viejo” eran peces con altos niveles de regresión evolutiva y lo componían las poblaciones de: Pachón, Sabinos, Tinaja, Yerbaniz, Piedras, mientras que el “linaje joven” estaba más relacionado con la forma de superficie, aunque en ese entonces sólo contaba con una población de Micos, en la Sierra de la Colmena. Varios autores sostienen la idea de que existían al menos dos grupos genéticos en las poblaciones troglobias, como es el caso de Dowling *et al.* (2002) que reportaron la separación de las poblaciones troglobias en dos linajes, denominados como el linaje A (Chica, Subterráneo y Pachón que se agrupaban con las poblaciones de superficie) y el linaje B (Curva, Tinaja y Sabinos). Strecker *et al.* (2003, 2004), también reportaron la separación de las poblaciones troglobias en dos grupos genéticos, siendo concordante con una clasificación artificial que asignaron con base en el grado de regresión evolutiva denominada SEP (ausencia fuerte del ojo y pigmentación) y VEP (ausencia variable del ojo y pigmentación) utilizando la misma clasificación que Wilkens de un linaje viejo y uno joven. Ornelas-García *et al.* (2008), encontraron que las poblaciones troglobias se repartían en dos linajes genéticos, además, cada linaje contaba con poblaciones de superficie, y los denominaron como “linaje viejo” (Grupo Sabinos Mezquital: Piedra, Tinaja, Sabinos + Rascón) y “linaje nuevo” (Grupo Pánuco-Tuxpan: Chica, Yerbaniz, Pachon, Molino, Micos + Superficie). Por otro lado, Coghil *et al.* (2014) reportaron la existencia de 4 linajes, formados por diferentes poblaciones troglobias, de las cuales, sólo la población de Sabinos era un grupo aislado del resto de las demás poblaciones. Fumey *et al.* (2018) negaron la existencia de dos linajes, argumentando que los marcadores no daban evidencia suficiente de que fueran grupos genéticos distintos. Sin embargo, Hermán *et al.* (2018), utilizando datos genómicos, recuperaron la existencia de dos grupos genéticos, soportando la existencia del linaje Viejo (formado por Pachón, Chica y la población de superficie Rascón) y linaje Nuevo (formado por Molino y la población de superficie Coy).

Aunque existe una gran controversia acerca del tiempo y modo de colonización de las poblaciones troglobias por parte de su ancestro de superficie, la comunidad científica está de acuerdo en que la adaptación a los ambientes de cueva ha ocurrido en múltiples eventos independientes, siendo una de las hipótesis más aceptadas que la evolución a las cuevas han sucedido en al menos dos eventos distintos a partir de

dos diferentes linajes, de este modo, las poblaciones del “linaje viejo” fueron las primeras en colonizar las cuevas y se asocia con el periodo de colonización más antiguo a las cuevas de la Sierra de El Abra, en San Luis Potosí (Wilkins, 1988; Strecker *et al.*, 2004.; Ornelas García *et al.*, 2008; Bradic *et al.*, 2012; Herman *et al.*, 2018). Por otro lado, el “linaje nuevo” se refiere a los eventos de colonización más recientes, asociado a los eventos invasivos en la Sierra de Guatemala y la Colmena (Ornelas García *et al.*, 2008; Bradic *et al.*, 2012; Herman *et al.*, 2018). Con base en lo anterior, se reconoce la existencia de dos linajes genéticos en las poblaciones de *Astyanax* al noroeste de México. Ambos linajes están conformados por la forma de Superficie y la Troglobia, además que tienen eventos de colonización independientes, y por lo tanto, orígenes distintos (Fig. 2).

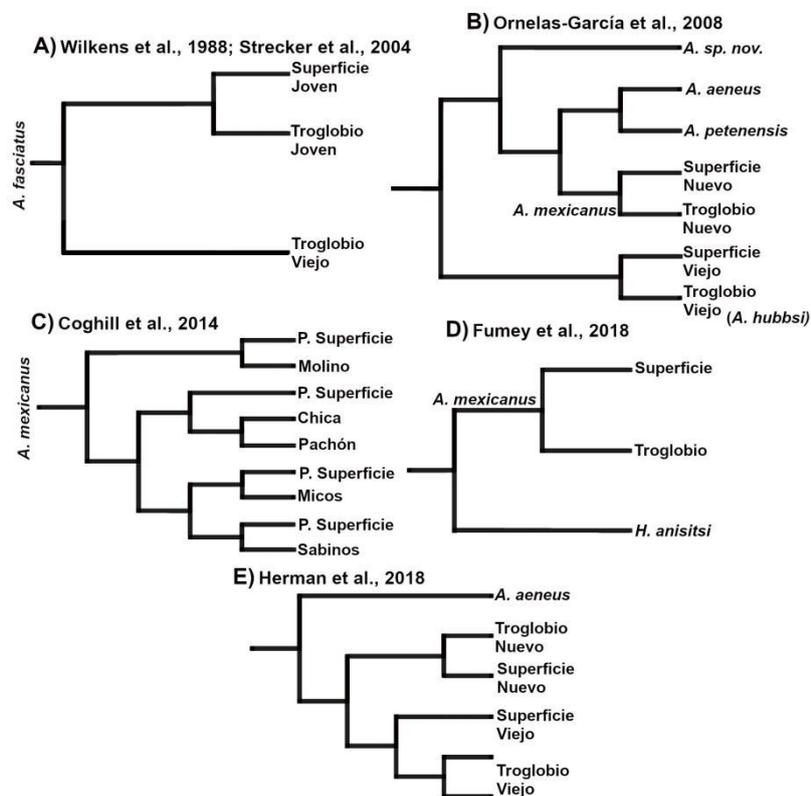


Fig. 2 Resumen de diferentes historias evolutivas reportadas por la comunidad científica

Astyanax como organismo modelo para la evolución en paralelo

Se puede considerar a los *Astyanax* troglobios como un excelente organismo modelo para el estudio de la evolución morfológica en paralelo, que es definida como la evolución independiente del mismo rasgo en linajes estrechamente relacionados (Futuyma, 1986), debido una serie de propiedades: 1) las diversas poblaciones

existentes en varias cuevas, las cuales presentan adaptaciones a estos ambientes extremos. 2) El reconocimiento de dos linajes genéticos, lo que implica que las poblaciones troglobias han evolucionado de forma independiente, desarrollando de manera aislada las características morfológicas que han garantizado su supervivencia. 3) Cada linaje presenta la forma troglobia y de superficie, lo cual brinda una comparación directa entre la forma troglobia y la forma grupo hermano de superficie que habitan en ambientes contrastantes (Tabin, 2016). En cuanto a los estudios de caracterización morfológica dentro de este grupo, podemos ver que los primeros trabajos se enfocaron en la descripción morfológica de los organismos, resaltando las diferencias apreciables en los peces al compararlos con los peces de superficie, como el albinismo, la falta de la estructura ocular, la forma del cráneo (Véase: Hubs & Ines, 1936; Álvarez, 1946; 1947; Mitchell *et al.*, 1977). Además se reportó una tendencia de disminución de ciertos rasgos merísticos para los peces troglobios, como el número de vértebras y el número de escamas (tanto en en la línea lateral como en el número de filas verticales), además, las escamas tienen un tamaño menor y ya no está tan profundamente incrustada en la piel como en la forma de superficie (Wilkins, 1988).

Sin duda, muchas de las modificaciones más conspicuas están relacionadas con la pérdida de la visión, la cual ha sido estudiada con un enfoque de biología del desarrollo, logrando caracterizar sus bases genéticas e identificando una gran cantidad de genes que se ven involucrados en el desarrollo y pérdida del ojo (eg. Sonic the Hedgehog -*SHH*- afecta directamente el tamaño de la copa ocular), proporcionando un excelente modelo de la evolución de rasgos complejos constructivos y regresivos (Wilkins & Strecker, 2017; Yamamoto & Jeffery, 2000). Aunado a lo anterior, y junto con otras condiciones selectivas de las cuevas, se ha sugerido que las estructuras óseas que rodean a la cuenca ocular, es decir los huesos supraorbitales y suborbitales, presentan diferencias en el tamaño y la forma entre la forma de cuevas vs. superficie (Yamamoto *et al.*, 2003; Dufton *et al.*, 2012). Además, se ha sugerido una serie de fragmentaciones (Alvarez, 1946; 1947; Mitchell *et al.*, 1977; Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2018) y fusiones de los huesos suborbitales (Mitchell *et al.*, 1977; Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2018), llegando a ocupar una posición diferente en el cráneo de

los peces troglobios, o incluso carecer de un hueso suborbital (Yamamoto *et al.*, 2003; Powers *et al.*, 2018; 2020).

También se han reportado modificaciones en la cabeza que no están relacionadas con la pérdida de la visión, como: el incremento en el número de células sensoriales, denominadas neuromastos (Protas *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2018; Yoffe *et al.*, 2020), un incremento en el tamaño de las fosas nasales (Yamamoto *et al.*, 2003), el incremento de la cavidad bucal (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005), y la presencia de una asimetría bilateral en el cráneo en las poblaciones troglobias (Gross *et al.*, 2014; 2016; Powers *et al.*, 2018; 2020). Y por supuesto, algunos rasgos morfológicos asociados a hábitos tróficos, como: un mayor número de dientes en la maxila y la mandíbula inferior de los peces troglobios (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005; Protas *et al.*, 2008), así como un mayor tamaño de la mandíbula inferior (Trapani *et al.*, 2005; Dufton *et al.*, 2012). Estas modificaciones morfológicas antes mencionadas pueden variar entre poblaciones troglobias (Yamamoto *et al.*, 2003; Powers *et al.*, 2020), llegando a la conclusión que han respondido a diferentes presiones selectivas ambientales, afectando las adaptaciones funcionales de los organismos troglobios, e.g. la poca concentración de oxígeno en las cuevas (Yamamoto *et al.*, 2003; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2020; Boggs & Gross, 2021).

En esta tesis se presenta una oportunidad única ya que nos permite explorar a grandes rasgos la variación morfológica asociada a ambientes extremos por parte de los dos linajes presentes en las poblaciones troglobias de *Astyanax* al noroeste de México, siendo el trabajo que más poblaciones troglobias ha analizado (ver tabla 1). Con el fin de encontrar patrones de evolución morfológica en paralelo asociada a aspectos ecológicos (e.g. locomoción y explotación de recursos), y su correlación con las señales de isótopos estables entre diferentes poblaciones de cuevas, así como explorar los mecanismos que pueden dar origen a dichos patrones de variación morfológica, tales como la modularidad y la inercia filogenética, tanto en la forma de las estructuras tróficas (premaxila), la forma del cuerpo y la forma de la cabeza.

Objetivo

Evaluar la existencia de evolución morfológica en paralelo entre los linajes troglobios de *Astyanax mexicanus*, mediante la caracterización de la ecomorfología y del morfoespacio en las formas de la premaxila, del cuerpo y la cabeza. Además, de determinar la ecología trófica y su relación con la ecomorfología entre poblaciones troglobias utilizando isótopos estables. Finalmente, estimar los mecanismos relacionados con las fuentes de variación fenotípica (*i.e.* modularidad y señal filogenética) en ambientes contrastantes (hábitats de cueva vs. de superficie).

Objetivos específicos

- 1) Evaluar patrones de variación morfológica en paralelo en los diferentes linajes de *Astyanax mexicanus* en ambientes de cuevas, a través de la evaluación merística y morfometría de la diversidad ecomorfológica (*e.g.* uso de hábitat y adquisición de recursos) de la forma de la premaxila, el cuerpo y la cabeza.
- 2) Evaluar la ecología trófica en siete poblaciones de cuevas mediante el estudio de las señales isotópicas $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de *A. mexicanus*, y su asociación con la ecomorfología de dichas poblaciones. Así como evaluar si las características físicas de las cuevas tienen un efecto en el enriquecimiento de las señales isotópicas.
- 3) Evaluar los mecanismos relacionados con las fuentes de variación fenotípica: 1) evaluar la presencia de modularidad como un mecanismo que promueve esta variación para la forma del cuerpo y la cabeza; y 2) estimar la señal filogenética en los patrones de diversidad morfológica de la forma de la premaxila y del cuerpo en los dos linajes de *A. mexicanus* bajo condiciones ambientales contrastantes.

Área de estudio

La Sierra de El Abra y la Sierra de la Colmena se ubican en San Luis Potosí, al norte de estas sierras se encuentra la Sierra de Guatemala en Tamaulipas, México. Estos sistemas geográficos son Kársticos (una forma de relieve originada por meteorización química de determinadas rocas, como la caliza), por lo tanto son altamente cavernosos (Mitchell *et al.*, 1977). Estas regiones se encuentran en dos grandes reservas de la biósfera: la Reserva de la de Sierra de El Abra-Tanchipa y la Reserva de El Cielo, respectivamente (Elliot, 2018), las cuales son muy importantes para la preservación de la vida silvestre, así como la conservación de las características Kársticas de la región (Mitchell *et al.*, 1977).

La Sierra de El Abra se encuentra aproximadamente a 150 kilómetros de la costa del Golfo de México y se extiende por unos 125 kilómetros en una dirección generalmente de norte a sur. Está en el límite de dos provincias fisiográficas, la Llanura Costera del Golfo al Este y la Sierra Madre Oriental al Oeste (Mitchell *et al.*, 1977). La Sierra de Guatemala se encuentra en el estado de Tamaulipas, abarcando las regiones de Chamal, Ocampo y Gómez-Farías (Elliot, 2018). El anticlinal más amplio que forma la Sierra de Guatemala se eleva en el extremo norte del Valle de Antigua Morelos y es físicamente continuo tanto con la Sierra de El Abra como con la Sierra de Nicolás Pérez. Alcanza alturas de unos 2,200 metros al norte de Chamal. Las expediciones en las cuevas dentro de esta cordillera han sido pocas, debido a la gran dificultad para moverse en la cordillera. Mitchell *et al.* (1977) denominó a la caliza de la Sierra de Guatemala (las rocas que componen la mayor parte de la Sierra de Guatemala) como "Caliza El Abra", porque son idénticas en origen a las que se encuentran en la Sierra de El Abra. Y, la Sierra de la Colmena se encuentra en San Luis Potosí, en la región de Micos. Es un afloramiento de piedra caliza que delimita un área estrecha y se extiende hacia el sur (Mitchell *et al.*, 1977).

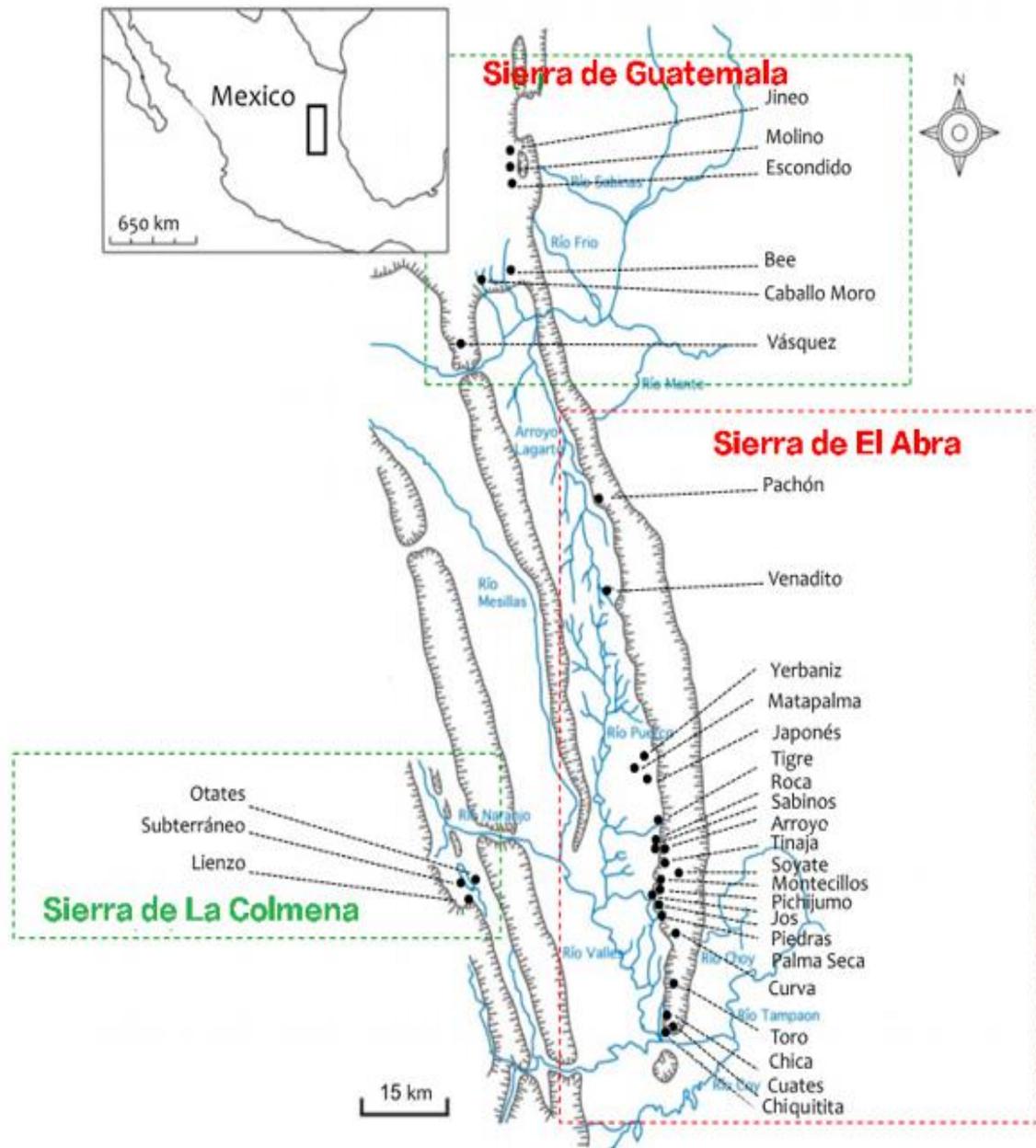


Fig. 3 Mapa de las poblaciones troglobias de *Astyanax*. Los nombres escritos en color negro representan a las poblaciones de cuevas. Nombres en azul, son las poblaciones de superficie. En la Sierra de El Abra, La Sierra de Guatemala y La Sierra de la Colmena, en los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas. Modificado de Gross (2012).

El presente trabajo incluye organismos de 31 localidades pertenecientes a los tres sistemas geográficos (tabla 1). Estos fueron obtenidos en diferentes salidas al campo, en un periodo de tiempo que comprende del año 2015 al año 2020. Todas las muestras fueron colectadas bajo las indicaciones del permiso de colecta SGPA/DGVS/02438/16, otorgado por SEMARNAT. Los especímenes fueron pescados usando redes de mano, se mantuvieron vivos y fueron transportados con

agua de su medio a un lugar con condiciones semi-estériles, donde fueron sacrificados según las condiciones del permiso de colecta. Eventualmente fueron transportados al Instituto de Biología para el procesamiento de los diferentes análisis.

Tabla 1. Lista de las localidades utilizadas para este trabajo. Adicionalmente, se agregó el tamaño de muestra que se utilizó de cada localidad para los diferentes análisis.

Población	Región	Hábitat	Linaje	Morfotipo	EM (n)	MGP (n)	MGC (n)	MCab (n)	ET (n)	SF (n)
Arroyo	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	10	11	6	0	0	5
Chica	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	8	8	7	15	0	5
Chiquitita	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	1	2	0	0	0	2
Toro	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	0	0	0	3	0	5
Sabinos	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	10	13	6	1	0	5
Jos	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	8	10	9	0	0	5
Montecillos	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	9	14	10	0	3	3
Tigre	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	5	5	7	0	0	5
Palma Seca	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	3	5	0	0	13	5
Tinaja	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	10	10	16	7	0	5
Japonés	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	10	9	5	2	0	4
Yerbaniz	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	2	3	9	5	5	7
Pachón	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	13	12	14	3	0	5
Rascón	El Abra	Río	Viejo	Superficie	11	11	10	8	0	6
Otates	El Abra	Río	Viejo	Superficie	10	10	0	0	0	0
Peroles	El Abra	Río	Viejo	Superficie	9	9	0	4	0	5
Tamasopo	El Abra	Río	Viejo	Superficie	1	1	0	0	0	6
Tampaon	El Abra	Río	Viejo	Superficie	6	6	0	0	0	0
Puente de Dios	El Abra	Río	Nuevo	Superficie	7	9	0	0	0	0
Rancho viejo	El Abra	Río	Nuevo	Superficie	9	9	0	14	0	0
Río Florido	El Abra	Río	Nuevo	Superficie	6	6	0	0	0	0
Escondido	Guatemala	Cueva	Nuevo	Troglobio	9	11	5	0	8	5
Jineo	Guatemala	Cueva	Nuevo	Troglobio	2	2	5	2	0	5
Molino	Guatemala	Cueva	Nuevo	Troglobio	11	12	7	7	8	5
Caballo Moro	Guatemala	Cueva	Nuevo	Híbrido	11	15	12	5	5	5
Vásquez	Guatemala	Cueva	Nuevo	Troglobio	10	10	10	0	5	5

Tabla 1. (Continuación) Lista de todas las localidades utilizadas para este trabajo. Adicionalmente, se agregó el tamaño de muestra que se utilizó de cada localidad para los diferentes análisis.

Nac. Mante	Guatemala	Río	Nuevo	Superficie	4	5	0	0	0	0
Río Sabinas	Guatemala	Río	Nuevo	Superficie	13	12	0	0	0	2
Subterráneo	La Colmena	Cueva	Nuevo	Híbrido	14	13	10	10	0	5
Santa Anita	La Colmena	Río	Nuevo	Superficie	13	12	0	3	0	2
Jalpan	Querétaro	Río	Nuevo	Superficie	5	5	11	1	0	0

n = Tamaño de la muestra, EM = Ecomorfología, MGP = Morfometría geométrica de la premaxila, MGC = Morfometría geométrica del cuerpo, MCab = Morfometría geométrica de la cabeza, ET = Ecología trófica y SF = Señal filogenética.

CAPÍTULO I: Variación fenotípica

Introducción

Las características fenotípicas varían ampliamente entre los diversos organismos que interactúan en su medio, mostrando la gran diversidad presente en todos los seres vivos (Núñez, 2003). Algunas de estas se ven afectadas por factores genéticos y ambientales, estos rasgos pueden ser discretos (e.g el color, conteo de estructuras) o continuos. A la variación observable en estas características cuantitativas (como el tamaño), se le conoce como variación morfológica, que es simplemente la varianza en las medidas de dicho rasgo en los individuos de una población (Futuyma & Kirkpatrick, 2017). La morfología es una disciplina que estudia esta variación y se encarga de describir la apariencia externa (estructura, forma, tamaño, etc.) así como aspectos de las estructuras internas (i.e. órganos y estructuras óseas). Algunas de las aproximaciones para estudiar la variación morfológica son: 1) la morfología descriptiva, que se orienta a describir y comparar las diferentes formas orgánicas bajo el contexto de la anatomía comparada, la disciplina que se centra en el análisis de las similitudes y las diferencias anatómicas de los seres vivos y que, se relaciona con la biología evolutiva (Lów *et al.*, 2016); 2) la morfología funcional, que se enfoca en describir y comparar la función de una forma orgánica o rasgo característico (Wake, 1972); 3) la morfología ecológica o ecomorfología, que estudia las interacciones entre la morfología y el ambiente (Wainwright, 1987; Wootton, 1992); y 4) la morfología evolutiva que busca estudiar la historia de la forma orgánica (adaptaciones, modificaciones, función; Riedl, 1978). En este último enfoque se estudia la disparidad morfológica de una especie o grupo, es decir, toda la variación morfológica observada en una especie o un conjunto de especies (taxa) que se vincula con los procesos evolutivos (Zelditch, 2004).

Por lo que el estudio del cambio morfológico es crucial para el entendimiento de cómo se produce la diversidad biológica en la naturaleza, sin embargo, investigaciones con enfoques evolutivos lidian con las consecuencias de la variación en las poblaciones, mientras que con menos frecuencia se ocupan de sus orígenes (Wagner & Altenberg, 1996). Un buen ejemplo para explorar la evolución morfológica son aquellos que proveen los organismos troglobios que se han adaptado a la vida cavernícola,

presentando adaptaciones muy específicas a sus condiciones ambientales (Culver, 2009; Jeffery, 2009). Las cuevas son consideradas como “ambientes extremos” debido a la oscuridad total y la ausencia de producción fotoautotrófica (Culver, 2009; Simon *et al.*, 2017). Asociados a estos ambientes los organismos troglobios proveen los mejores ejemplos conocidos de convergencia y regresión evolutiva, a pesar de la diversidad taxonómica (Culver, 2009; Jeffery, 2009; Bradic *et al.*, 2012). Algunas de las características convergentes entre estos organismos troglobios son: reducción o pérdida de la visión y pigmentación, la especialización e incremento de órganos sensoriales, alteraciones en ciclo circadiano, metabolismo, así como modificaciones importantes morfológicas del cráneo y cuerpo (Jeffery, 2009; Christiansen, 2012). México cuenta con una alta diversidad de peces troglobios, cuyas especies se incluyen en seis familias de peces: Heptapteridae (*Rhamdia*), Ictaluridae (*Priatella*), Poeciliidae (*Poecilia sulphuraria*), Characidae (*Astyanax*), Bythitidae (*Typhliasina pearsei*) y Synbranchidae (*Ophisternon infernale*). Todas estas especies, presentan diferentes grados de regresión evolutiva, tanto en pigmentación como en la pérdida de la visión y presentan en común diversas adaptaciones constructivas, cómo un incremento en los órganos sensoriales, que les han permitido adaptarse a la vida en las cuevas (Wilkins & Strecker, 2017). Entre todas estos grupos, resalta el género *Astyanax* que se ha convertido en un grupo modelo en ECO-EVO-DEVO y para el estudio de la evolución regresiva. Gracias a que presenta dos formas asociados a los diferentes ambientes: el morfotipo troglobio y el morfotipo de superficie, que han evolucionado de manera independiente en al menos dos linajes distintos, y los cuales son interfértiles, lo que ha permitido explorar las bases genéticas de las adaptaciones a cuevas (Tabin, 2016).

En el caso de los morfotipos troglobios de *Astyanax mexicanus*, se han reportado importantes modificaciones morfológicas que las distinguen del morfotipo de superficie como: La ausencia del ojo (Hubbs & Ines, 1936; Alvaréz, 1947), modificaciones de los huesos circundantes al ojo (Mitchell *et al.*, 1977; Yamamoto *et al.*, 2003; Protas, 2008; Gross *et al.* 2014; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2017; 2018), el albinismo (Hubbs e Ines, 1936; Alvaréz, 1947; Yoffe *et al.*, 2020), un mayor número de apéndices sensoriales (Powers *et al.*, 2020), número y tipo de escamas (Wilkins, 1988; Simon *et al.*, 2017). Los primeros estudios para este grupo se enfocaron en la descripción de rasgos tentativamente asociados con la pérdida de la

visión, como la forma de la estructura craneal, registrando fragmentaciones y fusiones en los huesos suborbitales que no se observan en sus grupos hermanos de superficie (Álvarez, 1946; 1947; Mitchell *et al.* 1977). Álvarez (1946), fue el primero en describir estos patrones muy inusuales en la forma del cráneo, su investigación es considerada como pionera en describir y abordar la evolución del complejo craneal de *Astyanax* (Gross & Powers, 2016). Rápidamente el organismo ganó gran popularidad como organismo modelo en investigaciones de biología del desarrollo y morfología funcional, logrando caracterizar las bases genéticas e identificando varios genes que se ven envueltos en la expresión y desarrollo del ojo (Yamamoto & Jeffery, 2000; Jeffery, 2009; Wilkens, 2017).

También se han reportado modificaciones en el cráneo que no se asocian con la pérdida de la visión, como: el incremento de los neuromastos (Protas *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2018; Yoffe *et al.*, 2020), el tamaño de las fosas nasales (Yamamoto *et al.*, 2003), el número de fragmentos que pueden llegar a tener los suborbitales (Yamamoto *et al.*, 2003, Gross *et al.*, 2016; Powers *et al.*, 2018; 2020), y su relación con la densidad de neuromastos (Powers *et al.*, 2020), el incremento de la cavidad bucal (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005), la presencia de una asimetría bilateral direccional en el cráneo en las poblaciones troglobias (Gross *et al.*, 2014; 2016; Powers *et al.*, 2018; 2020). Y aquellos rasgos morfológicos asociados con los hábitos tróficos, donde se ha descrito la presencia de un mayor número de dientes en la maxila y la mandíbula inferior en los peces troglobios (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005; Protas *et al.*, 2008), además, de que la mandíbula inferior presenta una talla mayor (Trapani *et al.*, 2005; Dufton *et al.*, 2012). En cuanto al desarrollo ontogénico de la dentición en poblaciones de *Astyanax mexicanus*, se ha descrito que las poblaciones troglobias presentan una transición en el número y tipo de dientes durante los primeros días de su vida (Trapani *et al.*, 2005), llegando a relacionar que esta transición permite a los peces troglobios presenten un mayor número de dientes y de cúspides, aunado también un dentario más largo (Trapani *et al.*, 2005; Dufton *et al.*, 2012; Atukorala *et al.*, 2013) y que la forma de la premaxila en *Astyanax* permite una dentición adaptada a sus hábitos alimenticios (Hamer *et al.*, 2016). Además se han reportado genes asociados a la expresión del número de dientes maxilares y el tamaño de la maxila mediante un análisis de QTL por sus siglas en inglés (quantitative trait loci) (Protas *et al.*, 2008; 2012).

En los últimos años, con los avances en la investigación obtenidos por la era genómica, se han podido hacer estudios que han permitido explorar las bases genéticas de las características troglobias (Gross, 2012) incrementando e innovando las líneas de investigación asociadas con la morfología de este grupo. A pesar de estos estudios, son pocos los que se han centrado en comparar la evolución de la forma del cuerpo y las características tróficas en contraste con su grupo hermano de superficie. Además, el número poblaciones troglobias utilizadas en la mayor parte de los estudios es pequeño, siendo sólo 4 las poblaciones (Pachón, Chica, Tinaja y Subterráneo) de las que se cuenta con información morfológica detallada que nos ayude a entender la variación presente en la forma troglobia. Por lo que el objetivo de este capítulo es buscar patrones de evolución morfológica en paralelo en los dos linajes de los *Astyanax* troglobios al noroeste de México, mediante la comparación de distintas poblaciones de ambos morfotipos (troglobio vs superficie) utilizando herramientas de morfometría en tres marcos morfológicos (premaxila, cuerpo y cabeza) que se asocian a diferentes aspectos ecológicos que nos permite una mejor comprensión de la evolución morfológica presenten en el grupo.

Métodos

Ecomorfología

Se analizaron 240 organismos correspondientes a 30 localidades tanto de cuevas como de superficie (tabla 1). De estos organismos se llevó a cabo una evaluación de 6 caracteres merísticos (i.e. conteos): número de escamas en la línea lateral, el número de radios en las aletas dorsal y anal, número de dientes y el número de cúspides de la premaxila y maxila, las cuales fueron extraídas del lado izquierdo del pez. Una vez extraídas la premaxila y maxila se llevó a cabo la limpieza de estas estructuras en una solución de KOH 1M durante 15 minutos.

Para la evaluación de estos caracteres merísticos (los conteos), se construyeron diagramas de cajas y bigotes, se comparó entre grupos a nivel de linajes (i.g. viejo vs. nuevo) y morfotipo (i.g. troglobio vs. superficie) con una prueba de Mann-Whitney.

Tabla 2. Descripción de los conteos merísticos, las medidas de ecomorfología e índices para los análisis ecomorfológicos.

#	Siglas	Medida	Función
1	LE	Longitud estándar	Locomoción
2	ACu	Alto del cuerpo	Locomoción
3	AnCu	Ancho del cuerpo	Locomoción
4	LCa	Longitud de la cabeza	Hábitos tróficos
5	ACa	Alto de la cabeza	Hábitos tróficos
6	AnCa	Ancho de la cabeza	Hábitos tróficos
7	LHc	Longitud del hocico cerrado	Hábitos tróficos
8	LHa	Longitud del hocico abierto	Hábitos tróficos
9	AnH	Ancho del hocico	Hábitos tróficos
10	AH	Alto del hocico	Hábitos tróficos
11	DO	Diámetro del ojo	Hábitos tróficos
12	IN	Intraorbital	Hábitos tróficos
13	LPeC	Longitud del pedúnculo caudal	Locomoción
14	APeC	Alto del pedúnculo caudal	Locomoción
15	AnPeC	Ancho del pedúnculo caudal	Locomoción
16	AAD	Longitud de la aleta dorsal	Locomoción
17	RAD	Radio de la aleta dorsal	Locomoción
18	AAA	Longitud de la aleta anal	Locomoción
19	RAA	Radio de la aleta anal	Locomoción
20	APe	Longitud de la aleta pectoral	Locomoción
21	APv	Longitud de la aleta pélvica	Locomoción
22	ELI	Escamas de la línea lateral	
23	AnPr	Ancho de la premaxila	Hábitos tróficos
24	PrAs	Proceso Ascendente	Hábitos tróficos
25	#DPr	Número de dientes en la premaxila	Hábitos tróficos
26	LM	Longitud de la maxila	Hábitos tróficos
27	#DM	Número de dientes en la maxila	Hábitos tróficos

Tabla 2. (continuación) Descripción de los conteos merísticos, las medidas de ecomorfología e índices para los análisis ecomorfológicos.

28	ACu/AnCu	Hidrodinamismo	Locomoción
29	APeC/AnPec	Compresión Caudal	Locomoción
30	DO/LCa	Tamaño relativo del ojo	Hábitos tróficos
31	LHc/LHa	Proyección del hocico	Hábitos tróficos
32	AH/ACa	Apertura del hocico	Hábitos tróficos
33	AnH/AcCa	Ancho relativo del hocico	Hábitos tróficos

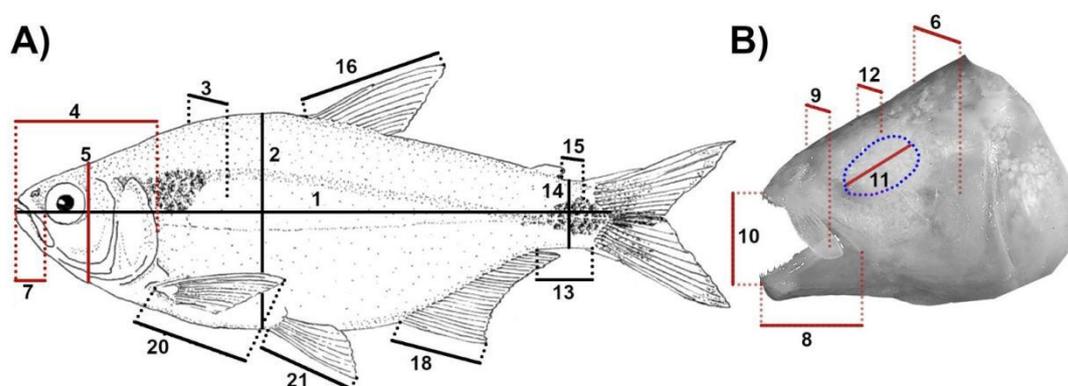


Fig. 4 Esquema con la representación gráfica de las medidas tomadas para los análisis ecomorfológicos: 1) LE: Longitud estándar, 2) ACu: Alto del cuerpo, 3) AnCu: Ancho del cuerpo, 4) LCa: Longitud de la cabeza, 5) ACa: Alto de la cabeza, 6) AnCa: Ancho de la cabeza, 7) LHc: Longitud del Hocico cerrado, 8) LHa: Longitud del Hocico abierto, 9) AnH: Ancho del Hocico, 10) AH: Alto del Hocico, 11) DO: Diámetro del ojo, 12) IN: Intraorbital, 13) LPeC: Longitud del pedúnculo caudal, 14) APeC: Alto del pedúnculo caudal, 15) AnPeC: Ancho del pedúnculo caudal, 16) AAD: Longitud de la aleta dorsal, 18) AAA: Longitud de la aleta anal, 20) APe: Longitud de la aleta pectoral, 21) APv: Longitud de la aleta pélvica. Las medidas, a detalle, se encuentran en la tabla 2. A) El cuerpo, B) la cabeza. En líneas blancas, las mediciones asociadas a locomoción; en líneas rojas, a hábitos tróficos.

Para los análisis morfométricos se obtuvieron fotografías de la premaxila utilizando un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi 305®, las imágenes fueron calibradas y se les asignó una escala con el programa Zen ver. 2.3 (Zeiss Microscopy, 2011). Se obtuvieron 22 medidas lineales relacionadas con los hábitos tróficos y la morfología funcional, con las cuales se estimaron seis índices ecomorfológicos, utilizando las estructuras tróficas (premaxila y maxila Fig. 5A y 5C) y el cuerpo de los peces (Fig. 4) (Mise *et al.*, 2013, Cordova-Tapia y Zambrano, 2016.; Fig. 4 y tabla 2).

A fin de evitar el efecto por alometría las medidas lineales obtenidas se estandarizaron mediante una regresión tipo II (Warton *et al.*, 2006; 2012), extrayendo los residuales de la regresión de las mediciones lineales y la longitud estándar (LE) con ayuda de la biblioteca *smatr* (Warton *et al.*, 2012). Con los datos estandarizados, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP o PCA por sus siglas en inglés) utilizando el software Past ver. 3 (Hammer *et al.*, 2001). Se realizó un MANCOVA para encontrar diferencias a nivel de morfotipo (i.e. Superficie, y Troglobio) y linaje (i.e. viejo=LV y nuevo=LN), usando la información obtenida del PCA como variable de respuesta y la LE como covariable. También, se evaluó una interacción entre las variables explicativas y se utilizó la longitud estándar como covariable (morfotipo x linaje, morfotipo x LE, linaje x LE). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa R, ver. 3.6.1 (R Core Team, 2019).

Morfometría geométrica

Se obtuvieron fotografías de tres marcos morfológicos distintos: la forma de la premaxila, la forma del cuerpo y la forma de la cabeza (Fig. 5B, 5D y 6). En el programa TPSUtil se transformaron en imágenes digitales con formato .tps para posteriormente digitalizar los *landmarks* para cada marco morfológico con el programa TPSDig

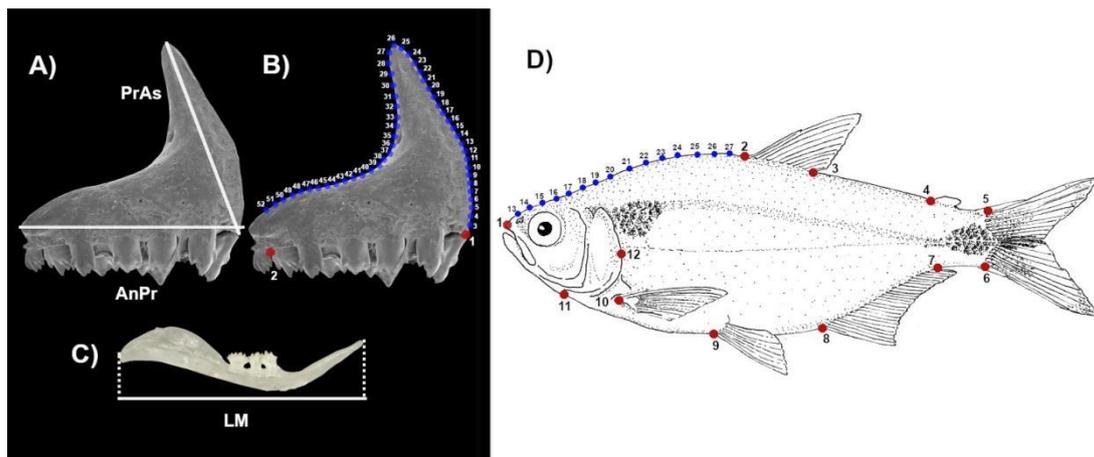


Fig. 5 Medidas tomadas para los análisis de ecomorfología para la premaxila, A) AnPr: ancho de la premaxila, PrAs: proceso ascendente de la premaxila. B) Posición de los 2 hitos homólogos y 50 *pseudolandmarks* usados para los análisis de MG que cubren la forma del proceso ascendente. C) LM: longitud de la maxila y D) Posición de los 12 *landmarks* y 15 *pseudolandmarks* para los análisis de MG de la forma del cuerpo.

Para la premaxila se analizaron un total de 260 organismos de 30 localidades correspondientes a los dos linajes (linaje viejo y linaje nuevo), de la vista lateral de la estructura, se colocaron 2 *landmarks* homólogos y una curva de 50 *pseudolandmarks* que abarcó la forma del proceso ascendente (Fig. 5B y tabla 3).

En la forma del cuerpo se evaluaron un total de 159 individuos pertenecientes a 18 localidades (tabla 1) a partir de fotografías de la vista lateral izquierda de peces vivos anestesiados, se digitalizaron 12 *landmarks* homólogos y una curva con 15 *pseudolandmarks* en el perfil dorsal del organismo siguiendo a Ornelas-García *et al.* (2014) (Fig. 5D y tabla 3).

En el caso de la forma de la cabeza, se tomaron fotografías del lado lateral izquierdo de la cabeza de peces silvestres, preservados en alcohol absoluto, con ayuda del Microscopio Leica Z16 ApoA, en el Laboratorio de microscopía y fotografía de la conservación LANABIO, IBUNAM. Para la definición del marco morfológico se colocaron 14 *landmarks* homólogos y dos curvas, una con 8 *pseudolandmarks* en el perfil dorsal y una con 9 *pseudolandmarks* en el perfil ventral de la cabeza para un total de 90 organismos (Ver Fig. 6 y tabla 3).

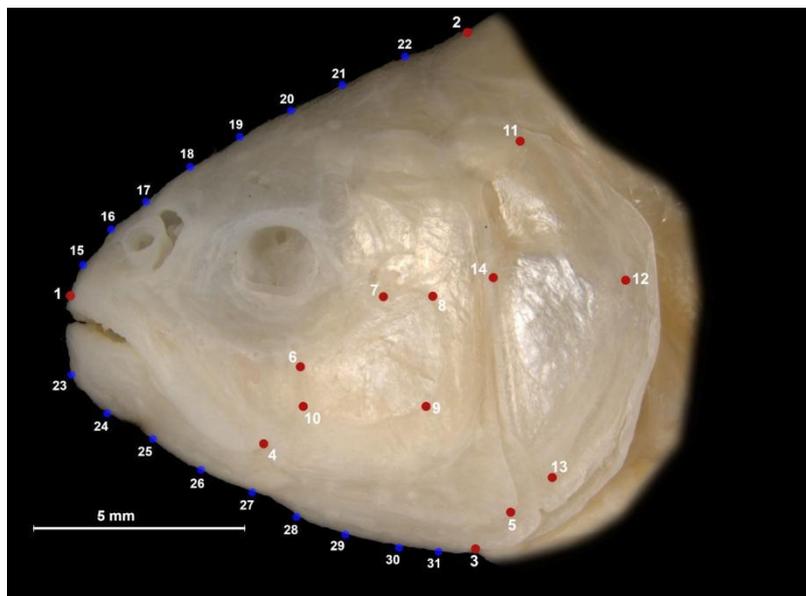


Fig. 6 Colocación de los landmarks para los análisis de la morfometría geométrica de la forma de la cabeza. En rojo, los landmarks homólogos. En azul, los *pseudolandmarks* que delimitan la curva.

Tabla 3. Descripción de los *landmarks* utilizados para los diferentes marcos morfológicos analizados en este trabajo.

No.	Descripción del <i>landmark</i>	Tipo
Premaxila		
1	Inserción anterior del último diente de la premaxila	LMK1
2	Inserción anterior primer diente de la premaxila	LMK1
3-52	Curva que abarca el proceso ascendente de la premaxila	LMK3
Cuerpo		
1	Punta anterior del maxilar	LMK2
2	Inserción anterior de la aleta Dorsal	LMK1
3	Inserción posterior de la aleta dorsal	LMK1
4	Inserción anterior de la aleta adiposa	LMK1
5	Inserción dorsal de la aleta caudal	LMK1
6	Inserción ventral de la aleta caudal,	LMK1
7	Inserción posterior de la aleta anal	LMK1
8	Inserción anterior de la aleta anal	LMK1
9	Inserción de la aleta pélvica	LMK1
10	Inserción de la aleta pectoral	LMK1
11	Yugal	LMK1
12	Extensión posterior del opérculo	LMK2
13-27	Curva que describe el perfil dorsal del organismo.	LMK3
Cabeza		
1	Punta anterior del maxilar	LMK2
2	Cresta del cráneo	LMK1
3	Yugal	LMK1
4	Extensión de la maxila	LMK1
5	Extensión del preopérculo	LMK2
6	Inserción dorsal del Suborbital 3 con el Suborbital 2	LMK1
7	Inserción anterior del Suborbital 3 con el Suborbital 4	LMK1
8	Inserción posterior del Suborbital 3 con el Suborbital 4	LMK1
9	Extensión del Suborbital 3	LMK2
10	Inserción ventral del Suborbital 3 con el Suborbital 2	LMK1
11	Extensión dorsal del opérculo	LMK2

Tabla 3 (continuación) Descripción de los landmarks utilizados para los diferentes marcos morfológicos analizados en este trabajo.

12	Extensión posterior del opérculo	LMK2
13	Extensión ventral del opérculo	LMK2
14	Extensión anterior del opérculo	LMK2
15-22	Curva que describe el perfil dorsal de la cabeza	LMK3
23-31	Curva que describe el perfil ventral de la cabeza	LMK3

LMK1 = *Landmark* tipo 1, LMK2 = *Landmark* tipo 2, LMK3 = *Landmark* tipo 3

A los tres marcos morfológicos se les realizó un análisis de ordenamiento de *Relative Warps* (RW) usando el programa TPSRelw para observar la diferencia en las formas relativas asociadas a los componentes que explican mayor porcentaje de varianza, que se calculan mediante el ajuste de una función de interpolación con las gradillas de deformación (thin-plate-spline de Bookstein, 1989; 1991) y las coordenadas x, y del punto de referencia para cada espécimen en la muestra de datos (Rohlf, 1993; 2001; Stone, 1998). Después se analizó la varianza de la forma por medio de un MANCOVA, utilizando los RWs como variables de respuesta, el morfotipo y el linaje como factores, y el tamaño del centroide (CZ) como covariable. También, se evaluó una interacción entre los factores y la covariable (morfotipo x linaje, morfotipo x CZ, linaje x CZ). Además, se realizó un análisis de variables canónicas (CVA por sus siglas en inglés) en la biblioteca *Morpho* en R ver. 3.6.1 (R Core Team, 2019), utilizando la función “CVA”. Finalmente, se realizó un análisis de disparidad morfológica con ayuda de la biblioteca *geomorph* en R ver. 3.6.1 (R Core Team, 2019), usando la función “*morphol.disparity*” para conocer el grado de disparidad dentro y entre los diferentes grupos.

Resultados

Ecomorfología

Entre las variables merísticas evaluadas únicamente se observaron diferencias para el número de escamas en la línea lateral y el número de dientes de la maxila (Fig. 7). Las poblaciones pertenecientes al morfotipo de superficie presentaron un mayor número de escamas en su línea lateral ($W = 12016$, $p < 0.01$), con una

moda de 35 escamas, en comparación con las poblaciones del morfotipo troglobio cuya moda fue de 33 escamas (Fig. 7A).

En el caso del número de dientes en la maxila, los peces troglobios presentaron un mayor número de dientes con respecto a los de superficie ($W = 1365.5$, Valor de $p < 0.001$; Fig. 7B). Además, se observó una diferencia a nivel de linaje para el morfotipo troglobio, presentando una moda de 3 dientes para el linaje nuevo y 4 para el linaje viejo, mientras que los peces de superficie presentan una moda de dos dientes en ambos linajes.

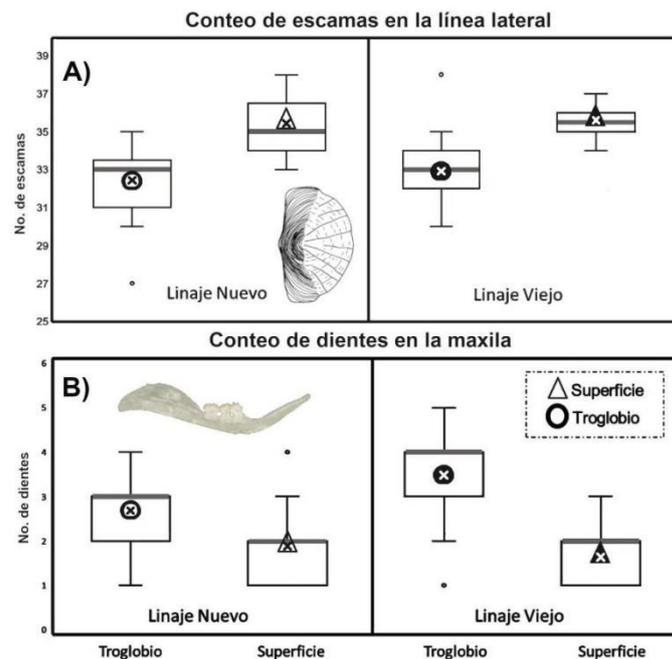


Fig. 7 Diagrama de cajas y bigotes de los conteos merísticos: A) Número de escamas de la línea lateral. B) Número de dientes en la maxila. La línea gris representa la moda y la x la media de cada grupo.

De las variables ecomorfológicas continuas, los primeros dos componentes del PCA explican una varianza acumulada de 35.05 %. El PC1 explica 20.80% de la varianza, y las variables que tienen más peso en el lado positivo son: LHc, PasPr y la LM; y en el extremo negativo son: LPec, AA, y la APv. El PC2 explica 13.2% de la varianza, y se ordena en el extremo positivo por las variables LHa, LCa y el índice Ancho relativo del hocico; y en el extremo negativo con LHc, los índices tamaño relativo del ojo y la proyección del hocico. Al graficar estos componentes (Fig. 8), se observa un traslape entre las dos formas de cueva y superficie, sobre todo los troglobios del linaje nuevo, sin embargo se aprecia una ligera segregación hacia el lado negativo del PC1 por

En los resultados del MANCOVA obtuvimos diferencias estadísticas significativas entre los morfotipos (*i.e.* troglobio y superficie), los linajes (nuevo y viejo), talla (LE) y la interacción entre morfotipo y linaje (tabla 4). De acuerdo con los resultados, las mediciones del morfotipo troglobio destacan en lo siguiente: son de menor tamaño, LE: promedio: 4.82 cm vs 5.48 cm de los de superficie, presentan una cabeza y un pedúnculo caudal de mayor tamaño en relación con su talla, tienen una boca más ancha, el tamaño del proceso ascendente de la premaxila y la longitud de la maxila es menor, y el diámetro de la cuenca ocular es mucho menor en comparación de sus homólogos de superficie.

Forma de la premaxila: morfoespacio y disparidad morfológica

En el análisis de “*relative warps*” de la MG muestra cierta diferenciación entre los morfotipos troglobio y superficie, con un poco de solapamiento entre ambos. El *RW1* explica el 55.56% de la varianza y nos muestra un cambio en la forma con respecto al ancho de la premaxila y su proceso ascendente, teniendo en el lado negativo una forma menos ancha y un proceso ascendente más fino, es en este lado donde se agrupan los peces de superficie (Fig. 9A). En el lado positivo, la forma de la premaxila es más ancha, el proceso ascendente es más robusto y menos alargado, siendo la forma que es más común en los peces troglobios. En el caso del *RW2* explica 21.45% y nos muestra la variación con respecto al ángulo y ancho del proceso ascendente. En el lado negativo, tenemos un proceso ascendente más fino, mientras que del lado positivo el proceso ascendente es más ancho. En los resultados obtenidos en el MANCOVA, se obtuvo que hay diferencias en la forma de la premaxila entre morfotipos, linajes, así como una interacción entre ambas variables (Fig. 9A, tabla 5).

En el CVA se obtuvieron tres variables canónicas que en conjunto explican el 100% de la varianza acumulada, la VC1 explica el 72.5 % de la varianza y recupera a los morfotipos como grupos diferentes, y la VC2 (18.5% de la varianza) divide a los linajes de la forma troglobia (Fig. 9B). En cuanto a las distancias de Mahalanobis entre grupos en la forma de premaxila (tabla 6), las mayores distancias fueron entre el morfotipo troglobio vs. superficie, siendo la mayor distancia entre superficie linaje viejo y troglobio de linaje viejo ($DMah=5.52$).

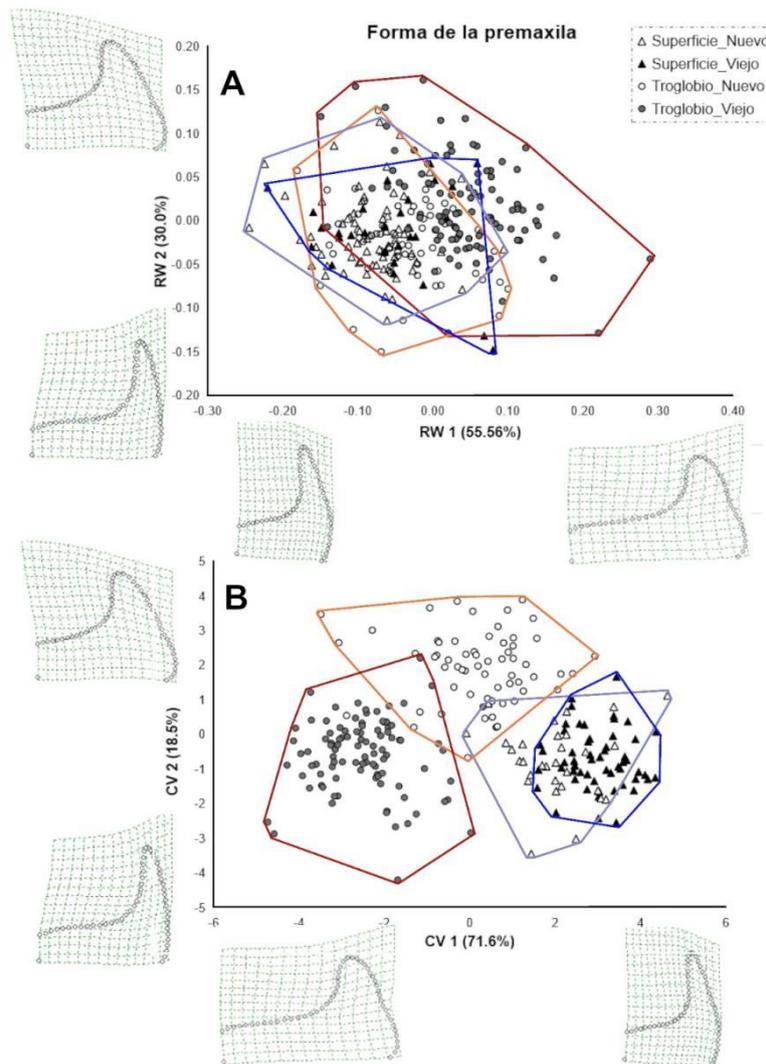


Fig. 9 Análisis de morfometría geométrica de la forma de la premaxila. En Triángulos: los peces asignados al morfotipo de superficie, los triángulos negros definen el polígono azul y representan el linaje viejo, los triángulos blancos definen el polígono azul cielo y representan al linaje nuevo. En Círculos: los peces asignados al morfotipo troglobio, los círculos negros definen el polígono rojo y representan el linaje viejo, los círculos blancos definen al polígono naranja y representan al linaje nuevo. A) *Relative Warps* para la forma de la Premaxila, donde los primeros dos ejes explican el 85% de la varianza acumulativa (RW1 - 55.56%, RW2 -30%). B) Análisis de variables canónicas para la forma de la Premaxila, los primeros dos ejes explican el 90.1% de la varianza acumulativa (VC1 - 71.6%, VC2 - 18.5%). En los extremos de cada eje se colocó la forma relativa de la premaxila correspondiente, lo que nos permite distinguir el cambio en la forma que sucede para el morfoespacio proyectado por cada eje, tanto de los RWs como de las VCs.

Por último, en cuanto a la disparidad morfológica, el morfotipo troglobio es el que presenta una mayor disparidad morfológica (0.0124), y en este sentido el morfotipo de superficie presentó un valor considerablemente más bajo (0.0076). Profundizando a nivel de linaje, son los linajes del morfotipo troglobio los que tienen una mayor

disparidad morfológica, siendo el linaje viejo el que presenta los valores más altos (0.0115), en el caso del morfotipo de superficie, es el linaje nuevo el que presentó una mayor disparidad morfológica (0.0072). En las comparaciones pareadas de la disparidad morfológica a nivel de morfotipo y linaje, se observó una diferencia entre los morfotipos significativa, siendo que el linaje viejo de los troglobios el que presenta diferencias con ambos linajes de superficie (tabla 7). Para visualizar de forma gráfica se compararon las formas consenso de cada morfotipo, los resultados son consistentes con los obtenidos en los análisis de *RW's*, tomando el morfotipo de superficie como referencia, en su comparación con la forma de troglobia (Fig. 10A) se aprecia claramente que los vectores de desplazamiento en la curva que describe el proceso ascendente de la premaxila cambian hacia una forma más ancha y con un proceso ascendente mucho más corto y robusto, mientras que en la comparación de la forma de superficie entre linajes, no se presentan cambios (Fig. 10B). Finalmente, entre el linaje viejo y nuevo troglobios, sí hubo un ligero cambio (Fig. 10C), presentando el linaje nuevo una forma casi intermedia entre el linaje viejo troglobio y la forma de superficie.

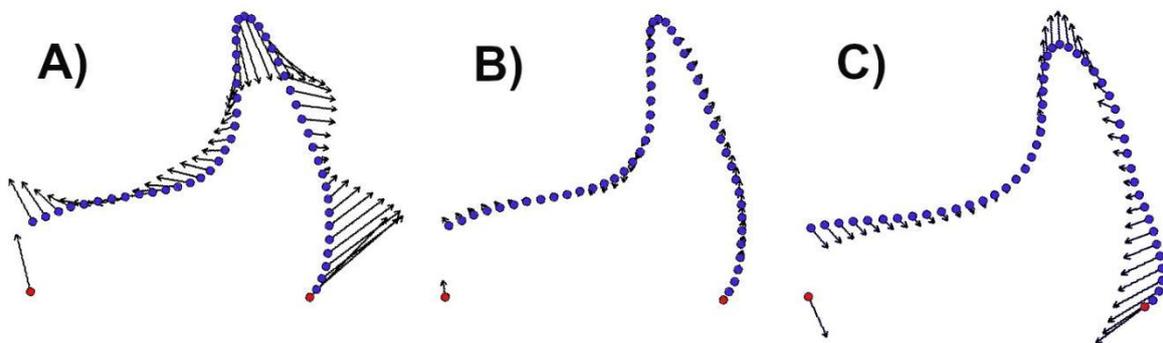


Fig. 10 Comparación de las formas consenso de los morfotipos para la premaxila: A) Superficie (referencia) vs Troglobio (vectores de desplazamiento). B) Superficie linaje viejo (referencia) vs Superficie linaje nuevo (vectores). Y, C) Troglobio linaje viejo (referencia) vs Troglobio linaje nuevo (vectores). En rojo los landmarks homólogos, y en azul los pseudolandmarks.

Tabla 5. Resultados de los análisis del MANCOVA de los tres marcos morfológicos. Los valores en negritas y con un * son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Premaxila	GL	Valor de p	Cuerpo	GL	Valor de p	Cabeza	GL	Valor de p
Morfotipo	2	<0.001*	Morfotipo	2	<0.001*	Morfotipo	2	<0.001*
Linaje	1	<0.001*	Linaje	1	<0.001*	Linaje	1	0.724
CZ	1	<0.001*	CZ	1	<0.05*	CZ	1	0.516
Morf*Lin	2	<0.001*	Morf*Lin	2	<0.001*	Morf*Lin	2	0.098
Morf*CZ	2	0.141	Morf*CZ	2	0.162	Morf*CZ	2	0.357
Lin*CZ	1	0.555	Lin*CZ	1	0.255	Lin*CZ	1	0.757

Forma del cuerpo: morfoespacio y disparidad morfológica

En el morfoespacio de la forma del cuerpo no se observó una separación clara entre los morfotipos, el *RW1* explica el 30.37% de la varianza acumulativa y nos muestra un cambio en el perfil dorsal de los peces, teniendo hacia el extremo del eje negativo una cuerpo más alargado y con una cabeza más alta proporcionalmente (Fig. 11A). El *RW2*, explica un 13.92% de la varianza, y permite discriminar mejor entre los morfotipos troglobio y de superficie, sobre todo los troglobios del linaje viejo que están cargados en el lado negativo de este eje. En este componente vemos de manera más fina el cambio en el perfil dorsal de los organismos, sobre todo en región cefálica, teniendo una forma cóncava de la cabeza en la forma troglobia, además de un cambio en la longitud del pedúnculo caudal, los peces de superficie se agrupan en el lado positivo de este eje los cuales además de no presentar una forma cóncava en la cabeza el pedúnculo caudal es menos alargado en comparación con los peces troglobios. En el MANCOVA se observaron diferencias entre los morfotipos, así como entre los linajes de los organismos y una interacción fuerte entre ambas variables (tabla 5).

En el CVA se obtuvieron tres variables canónicas que explican el 100% de la varianza, y aunque en el análisis es posible observar un ligero traslape entre las formas de superficie y troglobias, hay una mayor discriminación tanto entre formas como entre sus linajes (Fig. 11B). La VC 1 explica el 71.6% de la varianza y separa a las poblaciones por morfotipos, el morfotipo de superficie se agrupó hacia el lado positivo del eje y el morfotipo troglobio en el negativo. También se puede apreciar que a nivel

de linaje los grupos están ligeramente separados para el caso de superficie. Para el morfotipo, tenemos al linaje viejo la parte negativa de este eje (Fig. 9), mientras que el linaje nuevo están en medio de ambos morfotipos. En La distancia de Mahalanobis se obtuvo que las poblaciones troglobias y superficie tienen más distancia entre ellas, siendo el linaje viejo troglobio el que tiene una mayor distancia con ambos linajes de superficie ($D_{Mah} = 5.21$) (tabla 6)

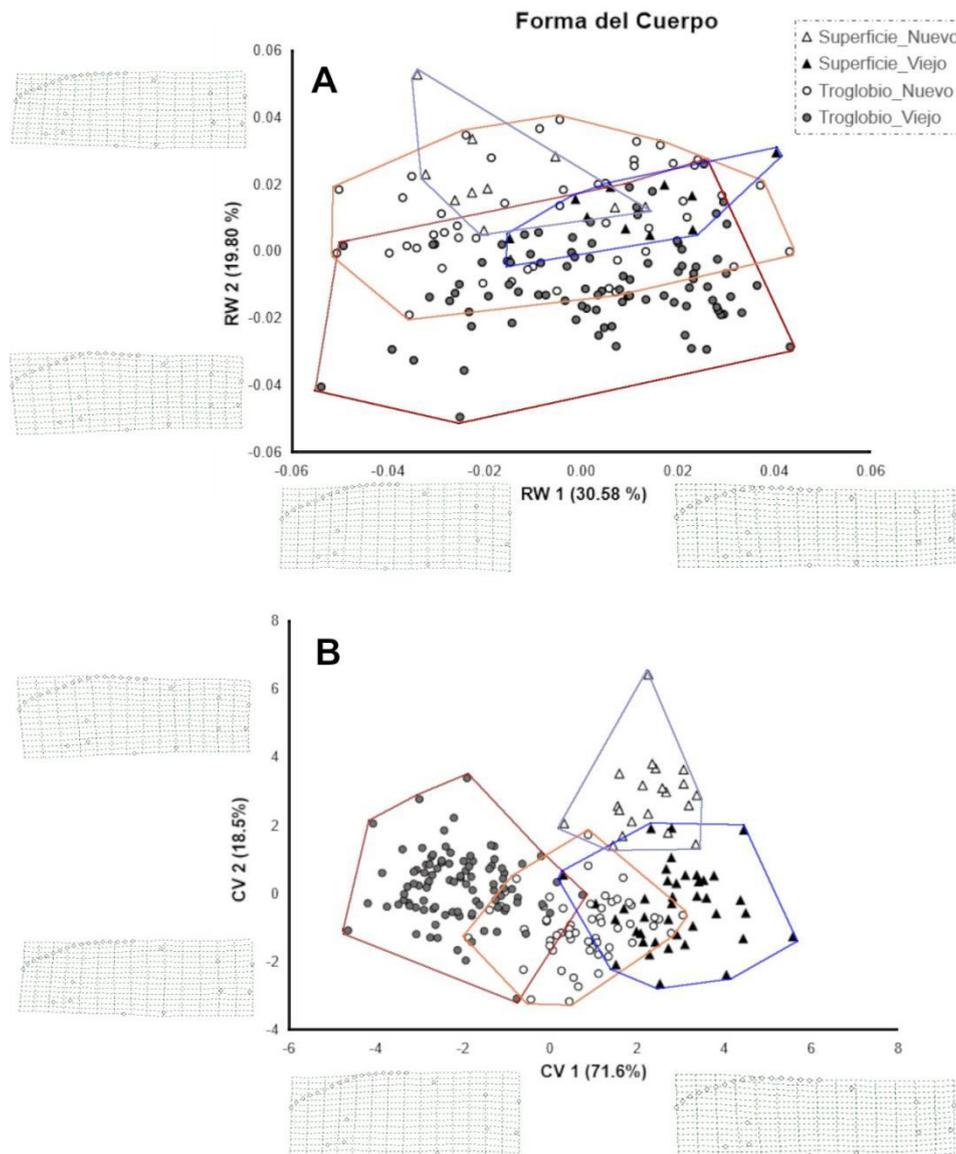


Fig. 11 Análisis de morfometría geométrica de la forma del cuerpo. En Triángulos: los peces asignados al morfotipo de superficie, los triángulos negros definen el polígono azul y representan el linaje viejo, los triángulos blancos definen el polígono azul cielo y representan al linaje nuevo. En Círculos: los peces asignados al morfotipo troglobio, los círculos negros definen el polígono rojo y representan el linaje viejo, los círculos blancos definen al polígono naranja y representan al linaje nuevo. A) *Relative Warps* para la forma del cuerpo, donde los primeros dos ejes explican el 50.3% de la varianza

acumulativa ($RW1 - 30.58\%$, $RW2 - 19.80\%$). B) Análisis de variables canónicas para la forma del cuerpo, los primeros dos ejes explican el 90.1% de la varianza acumulativa ($VC1 - 71.6\%$, $VC2 - 18.5\%$). En los extremos de cada eje se colocó la forma relativa del cuerpo correspondiente, lo que nos permite distinguir el cambio en la forma que sucede para el morfoespacio proyectado por cada eje, tanto de los RWs como de las VCs.

Tabla 6. Distancia de Mahalanobis entre los dos linajes (viejo vs. nuevo) de los dos morfotipos (troglobio vs. superficie) para la forma de la premaxila, cuerpo y cabeza

	Troglobio viejo	Troglobio Nuevo	Superficie viejo
Premaxila			
Troglobio Nuevo	3.68926		
Superficie viejo	4.98354	3.82049	
Superficie nuevo	5.5241	3.97164	3.0852
Cuerpo			
Troglobio Nuevo	3.32179		
Superficie viejo	5.21639	4.15201	
Superficie nuevo	5.10293	3.01807	3.7793
Cabeza			
Troglobio Nuevo	6.28822		
Superficie viejo	9.93495	8.67914	
Superficie nuevo	7.94021	8.39430	6.223907

En cuanto a la disparidad morfológica, el morfotipo troglobio presentó una mayor disparidad (0.00168), con respecto al morfotipo de superficie (0.00140). A nivel del linaje, es similar a los resultados obtenidos en la premaxila, los linajes del morfotipo troglobio tienen valores ligeramente más altos, siendo el linaje viejo el que presentó la mayor disparidad. Sin embargo, ninguna de las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas (tabla 7). Al visualizar de manera gráfica estas comparaciones, los cambios en la forma más apreciables se dan entre el morfotipo de superficie (usándolo como referencia) contra el troglobio, apreciando que los vectores de desplazamiento en la curva que describe el perfil dorsal de la cabeza, van hacia una zona más baja en la región de la cabeza, y una zona más alta cuando

la curva se acerca a la inserción de la aleta dorsal, mostrando que la forma troglobia presenta una cabeza más cóncava (deprimida en la región cefálica) y esto provoca una mayor diferencia en el perfil dorsal del pez (Fig. 12A). Por último, las comparaciones a nivel de linaje no presentan diferencias (Fig. 12B y 12C).

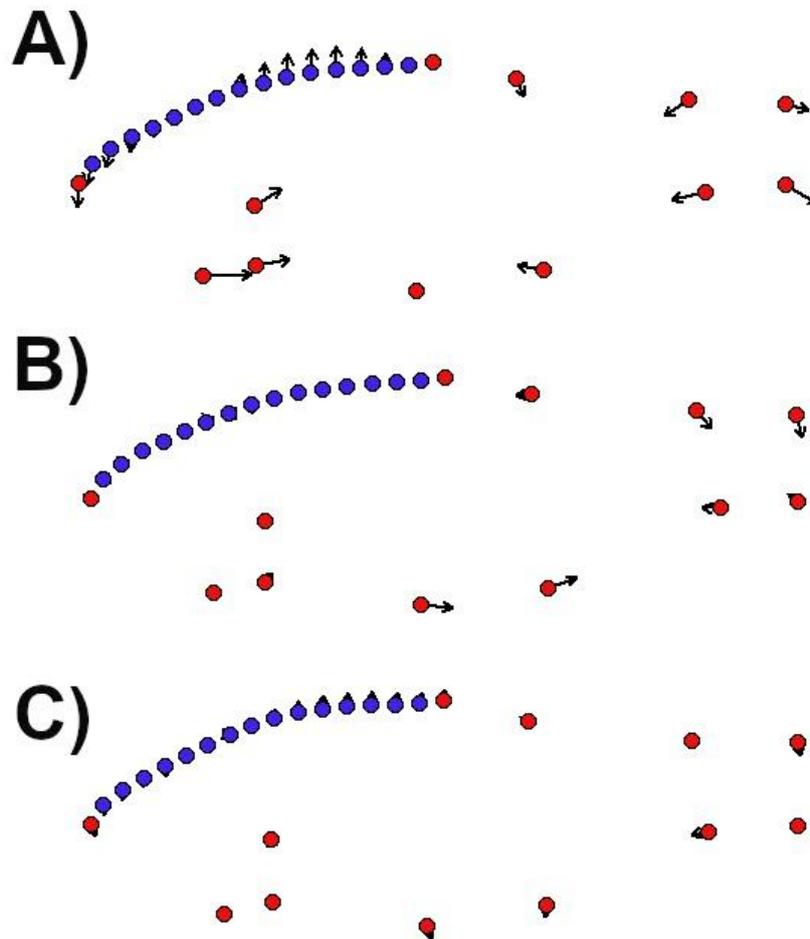


Fig. 12 Comparación de las formas consenso de los morfotipos para la premaxila: A) Superficie (referencia) vs Troglobia (vectores de desplazamiento). B) Superficie linaje viejo (ref.) vs Superficie linaje nuevo (vectores). Y, C) Troglobia linaje viejo (ref.) vs Troglobia linaje nuevo (vectores). En rojo, los *landmarks* homólogos, y en azul, los *pseudolandmarks*.

Forma de la cabeza: morfoespacio y disparidad morfológica

El morfoespacio de la forma de la cabeza nos muestra diferencias muy claras a nivel de morfotipo. En el análisis de *RW*, obtuvimos que los primeros dos componentes explican 44.5% de la varianza. El primer componente explica el 30.05% de la varianza acumulativa y separa a los morfotipos, siendo las diferencias principales el cambio en la forma de los huesos suborbitales, de manera más específica en el suborbital 3 (SO3), agrupando en el extremo negativo del primer

eje a la forma de superficie, con un SO3 mucho más amplio, en contraste con la forma troglobia, que muestra un SO3 mucho más compacto (Fig. 13A). El MANCOVA arrojó que hay diferencias significativas a nivel de morfotipo, pero no mostró diferencias entre los linajes o su interacción (tabla 5).

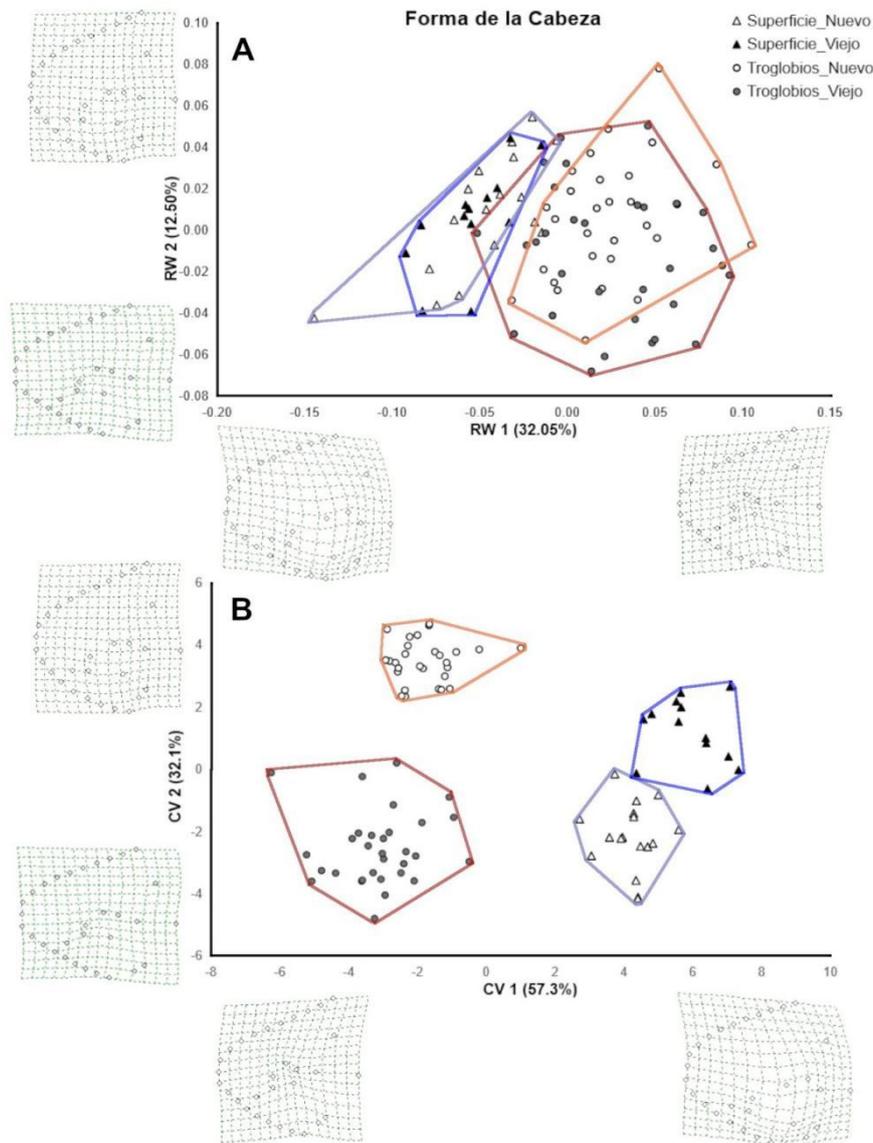


Fig. 13 Análisis de morfometría geométrica de la forma de la Cabeza. En Triángulos: los peces asignados al morfotipo de superficie, los triángulos negros definen el polígono azul y representan el linaje viejo, los triángulos blancos definen el polígono azul cielo y representan al linaje nuevo. En Círculos: los peces asignados al morfotipo troglobio, los círculos negros definen el polígono rojo y representan el linaje viejo, los círculos blancos definen al polígono naranja y representan al linaje nuevo. A) *Relative Warps* para la forma de la cabeza, donde los primeros dos ejes explican el 44.6% de la varianza acumulativa (RW1 - 32.06%, RW2 - 12.5%). B) Análisis de variables canónicas para la forma del cuerpo, los primeros dos ejes explican el 89.4% de la varianza acumulativa (VC1 - 57.3%, VC2 - 32.1%). En los extremos de cada eje se colocó la forma relativa de la cabeza

correspondiente, lo que nos permite distinguir el cambio en la forma que sucede para el morfoespacio proyectado por cada eje, tanto de los *RWs* como de las *VCs*.

En el CVA se obtuvieron tres variables canónicas (*VC*) que explican el 100% de la varianza acumulativa. De los tres marcos morfológicos analizados, el de la forma de la cabeza es el que muestra las separaciones más claras entre los morfotipos dada por la *VC1*, que explica el 57.3% de la varianza, teniendo a el grupo troglobio del lado negativo del eje. Mientras que la *VC2* explica el 32.1% de la varianza acumulativa y nos describe una separación a nivel de linaje para ambos morfotipos (Fig. 13B). En cuanto a la distancia de Mahalanobis, como en los análisis anteriores, la mayor distancia se da entre los morfotipos, siendo el morfotipo troglobio del linaje viejo el que presenta la mayor distancia en comparación con el morfotipo de superficie del linaje viejo ($D_{Mah} = 9.934$) (tabla 6).

En los análisis de disparidad se obtuvo que el morfotipo troglobio es el que tiene una mayor disparidad morfológica (0.0063), en comparación con el morfotipo de superficie (0.0043). A nivel de linaje, la forma troglobia del linaje viejo es la que presentó valores más altos de disparidad (0.0066), mientras que en el caso de superficie es el linaje nuevo el más alto (0.004). En las comparaciones pareadas, la disparidad entre los morfotipos superficie vs. troglobio son significativas (tabla 7). Al comparar las formas consenso, los cambios en la forma más drásticos se observan entre morfotipos teniendo la deformación más radical en la zona del SO3 siendo la forma de superficie como referencia (Fig. 14A), siendo congruentes con los análisis de *Relative Warps*. A nivel de linaje no hay cambios drásticos (Fig. 14B y 14C).

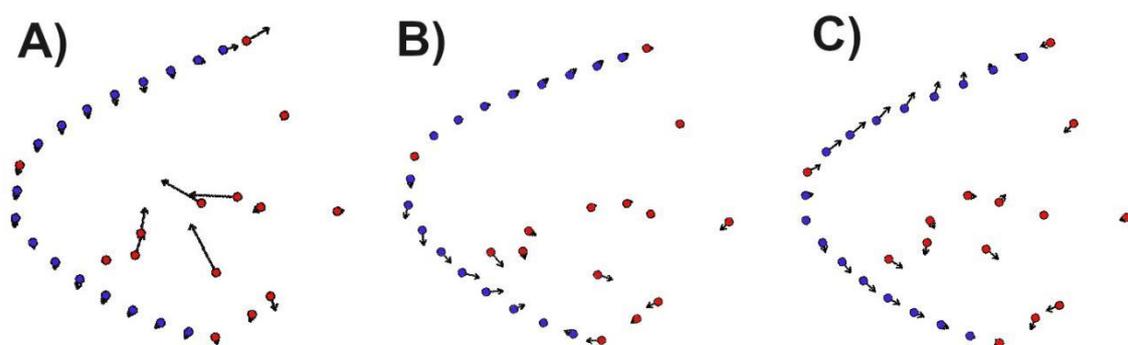


Fig. 14 Comparación de las formas consenso de los morfotipos para la premaxila: A) Superficie (referencia) vs. Troglobio (vectores de desplazamiento). B) Superficie linaje viejo (referencia) vs.

Superficie linaje nuevo (vectores). Y, C) Troglobio linaje viejo (referencia) vs. Troglobio linaje nuevo (vectores). En rojo, los *landmarks* homólogos, y en azul, los pseudolandmarks.

Tabla 7. Resultados de los análisis de disparidad morfológica de los tres marcos morfológicos. Los resultados resaltados en negritas y con un * son estadísticamente significativos ($p < 0.05$), con ** $p < 0.01$, *** es $p < 0.001$.

<i>Distancia de Foote</i>	Premaxila	Cuerpo	Cabeza
Troglobio	0.0124109	0.0016840	0.0063924
Superficie	0.0076461	0.0014075	0.0043304
Troglobio Viejo	0.0115062	0.0015663	0.0066598
Troglobio Nuevo	0.0091376	0.0015409	0.0053007
Superficie Viejo	0.0069446	0.0012641	0.0037203
Superficie Nuevo	0.0072782	0.0013449	0.0040094
<i>Comparaciones pareadas</i>			
S vs. T	0.0047648***	0.0002764	0.0020619**
SV vs. SN	0.0003335	0.0000807	0.0002890
SV vs. TV	0.0042280*	0.0003020	0.0029394**
SV vs. TN	0.0018594	0.0002767	0.0015803
SN vs. TN	0.0021929	0.0001960	0.0012912
TV vs. SN	0.0045615**	0.0002213	0.0026503**
TV vs. TN	0.0023685	0.0000253	0.0013590

Discusión

La forma troglobia de los Astyanax

Las condiciones ambientales de las cuevas son muy contrastantes a las del hábitat de superficie. Resaltando las condiciones de oscuridad perpetua, la limitación en la cantidad de recursos y parámetros ambientales que pueden cambiar de una zona a otra (*i.e.* temperatura, oxígeno, etc.), estas condiciones en conjunto, definen a las cuevas como ambientes extremos y presentan fuertes presiones de selección para los organismos (White & Culver, 2012). Bajo este contexto, nuestros resultados encontraron patrones de evolución morfológica en paralelo en los dos linajes

genéticos de los *Astyanax* que habitan en las cuevas, generando una forma troglobia que se diferencia claramente del grupo de superficie. En términos generales, la forma troglobia se distingue de la forma superficie por las siguientes características morfológicas: Son de menor tamaño (4.82 cm vs 5.48 cm), presentan un menor número de escamas en la línea lateral (moda = 33 vs 35), el pedúnculo caudal es más alargado, y la forma del cuerpo cambia en el perfil dorsal del organismo, sobre todo en la región cefálica. En la cabeza tenemos una forma más cóncava y diferencias más específicas, como las de las estructuras asociadas a los hábitos tróficos: un mayor número de dientes en la maxila (3-4), una longitud y ancho del hocico de mayor tamaño, una premaxila con un proceso ascendente más robusto y ancho; y las que están asociados a otras presiones selectivas, como: un menor tamaño de la cuenca ocular, un cambio prominente en el SO3 el cual tiene una forma más compacta y en una posición distinta en la cabeza, y el opérculo branquial tiene una forma romboidal más amplia. Estas diferencias en distintos rasgos morfológicos con su grupo hermano de superficie, nos muestran cómo los diferentes linajes de cuevas han evolucionado en respuesta a presiones selectivas similares.

Diversidad morfológica del cuerpo

La reducción en la talla y el número de escamas se ha asociado con las relaciones metabólicas y energéticas de los peces con el medio, planteando originalmente que poseían una alimentación “mala” debido a la escasez de recursos (Wilkens, 1988). Sin embargo, esta hipótesis se ha cuestionado, argumentando que estas reducciones se ven afectadas por muchos más factores, como la temperatura y la época del año (Simon *et al.*, 2017). En el caso del número de escamas se ha llegado a argumentar que esta reducción está asociada con pérdidas parciales de su función biológica, como la protección que brindan al cuerpo de los peces (Wilkens, 1988). Específicamente los *Astyanax* troglobios aún poseen escamas en comparación de otros peces troglobios que las han perdido (*Sinocyclocheilus anshuiensis*, Yang *et al.*, 2016; *Barbatula*, Behrmann-Godel *et al.*, 2017), por lo que se ha propuesto que la reducción en el número de escamas es una adaptación a la vida troglobia, asociada a diversas presiones que cambian en los hábitats troglobios, como la reducción en comportamiento agresivo (Wilkens, 1988; Simon *et al.*, 2017), pudiendo ser un evento que apenas va comenzando y es un proceso continuo de reducción en las escamas para los *A. mexicanus* troglobios (Simon *et al.*, 2017). En el

caso del pedúnculo caudal, el morfotipo troglobio presenta una talla mayor y una forma más comprimida en comparación del morfotipo de superficie, este es un rasgo que se asocia con la propulsión y locomoción que generan los peces para desplazarse en su medio (Cordova-Tapia & Zambrano, 2017; Ornerlas-García *et al.*, 2017; 2018). Por lo que podemos asumir que la propulsión y maniobrabilidad de los morfotipos es distinta, y que se puede dar como una respuesta específica a las condiciones físicas de su medio. Por otro lado, nuestros resultados en la diferencia en el perfil dorsal que nos presenta la región cefálica del morfotipo troglobio no sugieren que tenga una implicación hidrodinámica. Por último, la forma del cuerpo presentó los valores de disparidad más bajos, incluso al momento de comparar entre morfotipos, lo que nos indica que la variación morfológica en el cuerpo no es tan alta como se esperaba, lo que sugiere que la morfología de los *Astyanax troglobios* no parece evolucionar de manera integrada y pueden responder de manera diferencial a las presiones ambientales, lo que nos brinda una buena base para abordar el estudio de los procesos que afectan la evolución morfológica en el tercer capítulo.

Diversidad morfológica asociada a hábitos tróficos

Varios de los rasgos morfológicos que destacan a la forma troglobia están asociados a los hábitos tróficos del organismo. Se había reportado previamente para un par de poblaciones troglobias un incremento en el número de dientes en la maxila (Yamamoto *et al.*, 2003; Protas *et al.*, 2008; 2012), y al incrementar el número cuevas analizadas por linaje, pudimos observar diferentes modas entre los morfotipos y el linaje (i.e. 3 dientes para el linaje viejo y 4 dientes para el linaje nuevo), sin haber diferencias significativas, lo que apoya la observación previa de que estos rasgos presentan variación entre las diferentes cuevas (Yamamoto *et al.*, 2003). Aunado a lo anterior, también reportamos una longitud del hocico y ancho del hocico de mayor tamaño, pero que generan una menor proyección del hocico. Con anterioridad se había reportado que el grupo troglobio presentaba una mandíbula inferior de mayor tamaño, lo que propiciaba el desarrollo de una dentadura más compleja, refiriéndose a la transición ontogénica de los organismos, pasando de tener dientes monocúspidos a multicúspidos (Atukorala *et al.*, 2013; Hamer *et al.*, 2016). Nuestros resultados no encontraron diferencias en el tipo de dientes (número de cúspides por diente en la premaxila), por lo que no apoyaría la idea de que el grupo troglobio genere dentaciones más complejas para la premaxila de los organismos. En el caso de la

proyección del hocico, es un estimador que se utiliza para evaluar la habilidad del pez para capturar presas muy móviles o de gran tamaño, mientras más alto sea el valor obtenido es un indicador de que un pez se especializa en alimentarse de este tipo de presas (Hulsey *et al.*, 2005; Mise *et al.*, 2013), nuestros resultados mostraron que ambos morfotipos no tuvieron valores altos de la proyección del hocico, sin embargo el grupo troglobio tenía una proyección menor, lo que sugiere que los hábitos alimenticios diferentes en los dos morfotipos puede tener un impacto en esta diferencia (Mitchell *et al.*, 1977; Wilkens, 1988; Espinasa *et al.*, 2017). Por último, la premaxila del grupo troglobio presenta una forma más amplia, con un proceso ascendente más pequeño y más robusto, sobre todo la del linaje viejo. Esta estructura además presentó un gran disparidad morfológica dentro del grupo troglobio, evidenciando que los ancestros de superficie eran seguramente omnívoros, como se ha reportado para otros *Astyanax* de superficie actuales, que se alimentan de una gran cantidad de cosas como insectos, plantas y peces más pequeños (Bonato *et al.*, 2017; Ornelas-García *et al.*, 2018). Por lo tanto, esta estructura trófica no presenta un grado alto de especialización como el que se puede ver en otros characidos con hábitos depredadores piscívoros muy marcados, como el género *Oligosarchus* (Bonato *et al.*, 2017). Otros autores han demostrado que la anatomía de las estructuras tróficas y la dieta de los peces están correlacionadas (Albertson *et al.*, 2003; 2005; Parsons *et al.*, 2011; Garita-Alvarado *et al.*, 2018; Ornelas-García *et al.*, 2018b), por lo que nuestros resultados sugieren que estas modificaciones presentes en el grupo troglobio reflejan la adaptación a la presión ejercida por los nuevos recursos alimenticios en el hábitat de las cuevas. Es posible que tener más dientes maxilares y unas premaxilas más amplias sirvan para poder abarcar una mayor cantidad de materia orgánica al momento de buscar en alimento en el sustrato de las pozas.

Diversidad morfológica de la cabeza

Los patrones de diversidad morfológica en la cabeza de los *Astyanax* troglobios son de los rasgos morfológicos que mejor han sido descritos, teniendo claro aquellos que se dan como resultado de la pérdida de la visión, como la reducción de la cuenca ocular, fragmentaciones y modificaciones en los huesos suborbitales y supraorbitales (Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2017; 2018); y aquellos que

no están asociados a esta pérdida de la visión, como la diversidad de los rasgos tróficas, el tamaño de las narinas, el número de neuromastos, etc (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en la diversidad de la cabeza son los más marcados entre los dos morfotipos, nos muestran que el grupo troglobio tiene un menor tamaño relativo del ojo, rasgo que se asocia a un efecto de evolución regresiva en respuesta a las condiciones de oscuridad perpetua (Wilkens, 2017). Esto mismo también se puede relacionar con los resultados de la forma del perfil dorsal de la cabeza, la reducción de estructura ocular propicia esta forma más cóncava en comparación del grupo de superficie. A su vez, también afecta los resultados obtenidos en el SO3, que tiene una forma muy diferente a la del grupo de superficie y una posición diferente en la cabeza, similar a lo reportado con anterioridad. Otro rasgo distintivo que se aprecia en la forma de la cabeza es la forma del opérculo branquial. El grupo de superficie tiene una forma más final, similar a un triángulo, mientras que el grupo troglobio presenta una forma más amplia, similar a un rombo, este rasgo puede estar asociado a una adaptación a un medio hipóxico, ya que un opérculo mayor, resguarda filamentos branquiales de mayor tamaño en respuesta a condiciones con una menor cantidad de oxígeno (Boggs & Gross, 2021). Adicionalmente, el ancho y la apertura relativos del hocico también se asocian como adaptaciones a estas condiciones (Boggs & Gross, 2021). La disparidad morfológica de la cabeza también fue alta, sobre todo la del linaje viejo del morfotipo troglobio. Esto implica que la evolución del complejo craneal ha sido muy diversa dentro del grupo, a diferencia de la forma de la premaxila, la cabeza se ve afectada por más presiones selectivas como las condiciones de oscuridad y de oxigenación en el medio (Wilkens *et al.*, 2017; Boggs & Gross, 2021).

Diferencia a nivel de "Linaje" en los Astyanax troglobios

Nuestros resultados encontraron patrones de diversidad morfológica diferentes en los linajes genéticos reportados del morfotipo troglobio, denominados como linaje viejo y linaje nuevo (Wilkens, 1988; Ornelas-García *et al.*, 2008; Herman *et al.*, 2018). Anteriormente se propuso la hipótesis de que el linaje filogenéticamente viejo presenta un mayor grado de regresión evolutiva en comparación del linaje filogenéticamente nuevo (Wilkens, 1988; Strecker *et al.*; 2003; 2004). Nuestros resultados sugieren que esto es posible, en los tres marcos morfológicos analizados

el linaje viejo del morfotipo troglobio se separaba claramente del morfotipo de superficie, mientras que el linaje nuevo estaba en medio de los dos grupos, llegando a sobrelaparse con ambos en la forma del cuerpo y de la premaxila. La disparidad morfológica reportada en los tres marcos morfológicos también nos muestra un patrón, siendo el linaje viejo del grupo troglobio el que presenta los valores de disparidad más altos, teniendo a la premaxila la estructura con mayor disparidad, seguida de la forma de la cabeza y por último la forma del cuerpo. Lo que implica que el linaje viejo ha tenido mucha variación morfológica dentro del grupo, y que presenten valores de disparidad distintos nos brinda una aproximación de cómo evoluciona la morfología a las presiones ambientales (Collar *et al.*, 2005). Con base en lo anterior, podemos plantear que esta forma troglobia se ha generado al menos en dos ocasiones distintas, otorgando evidencia de evolución morfológica en paralelo como se ha reportado en *Astyanax* lacustres (Garita-Alvarado *et al.*, 2018), sin embargo, las características morfológicas del morfotipo troglobio parecen responder de manera diferente a las presiones selectivas de las cuevas, lo que se refleja en la variedad morfológica presente en los tres marcos morfológicos analizados, variando en el grado de modificación y regresión evolutiva a nivel de linaje y población (Wilkins, 1988; Yamamoto *et al.*, 2003; Powers *et al.*, 2017).

La selección natural incrementa o disminuye la variación en las características

La similitud de varias adaptaciones morfológicas (e.g. la degeneración de los ojos) a las presiones ambientales ejercidas por las cuevas en distintos grupos de animales (peces, salamandras, artrópodos), nos indican que la adaptación a la forma de vida troglobia puede ser un proceso general resultante de restricciones selectivas similares (Soares & Niemiller, 2020). Aunque, es necesario que pase el tiempo suficiente para que los organismos que han colonizado las cuevas se adapten al modo de vida cavernícola y logren evolucionar *in situ* (White & Culver, 2012). Este fenómeno consta de tres procesos adaptativos: 1) La generación de un nuevo nicho ecológico, 2) cambios en el comportamiento que les permitan explotar el nuevo nicho ecológico, y 3) la supervivencia de la especie al nuevo estrés ambiental, si los tres procesos tienen éxito, la población logrará reproducirse y la selección natural fomenta la adaptación, produciendo cambios morfológicos, fisiológicos y de comportamiento adicionales (Howarth & Honch, 2012; Futuyma & Kirkpatrick, 2017). Incluso si las

poblaciones permanecen en contacto con su homólogo de superficie, las presiones de selección impuestas por los diferentes entornos y aumentadas por el estrés ambiental pueden fomentar a las dos poblaciones a divergir (Howarth & Honch, 2012). Este es el caso de los *Astyanax troglobios*, que en al menos en dos ocasiones pasaron por estos tres procesos adaptativos, desarrollando de forma independiente las adaptaciones pertinentes para el modo de vida cavernícola y logrando evolucionar *in situ*. Otros grupos de peces, como es el caso de las poblaciones de peces troglobios pertenecientes a las familias de los amblyopsidos (Hart *et al.*, 2020) y los cyprinidos (*Sinocyclocheilus*. Yang *et al.*, 2016), también se han logrado adaptar y evolucionar las condiciones de vida cavernícolas. Sin embargo, estos factores ambientales impuestos por la selección se ven influenciados por la historia evolutiva de cada especie, lo que afecta su relación con el medio (Futuyma & Kirkpatrick, 2017).

Se ha establecido que hay una relación en el incremento de la disparidad morfológica cuando una población tiene la oportunidad ecológica de aprovechar un nuevo nicho ambiental (Mahler *et al.*, 2010; Yoder *et al.*, 2010). Como es el caso de las lagartijas del género *Anolis*, donde se ha reportado radiación adaptativa asociada a los cambios específicos en los regímenes selectivos que actúan sobre las poblaciones naturales, teniendo como consecuencia una relajación de la selección estabilizadora efectiva al enfrentarse a nuevas condiciones ambientales que eventualmente generan una selección diversificadora (Adams *et al.*, 2009; Mahler *et al.*, 2010; Yoder *et al.*, 2010). Este escenario es similar al que se enfrentan los organismos troglobios al colonizar estos ambientes extremos (Howarth & Honch, 2012; White & Culver, 2012), donde ciertos rasgos fenotípicos se ven afectados más fuertemente por las presiones selectivas ambientales, resaltando aquellas características regresivas (e.g. falta de pigmentación, reducción de las estructuras oculares) como se ha reportado en diversos artrópodos (Howarth, 1983; Klaus *et al.*, 2013) y vertebrados (Mitchell, 1977; Wilkens, 1988; Jefferey, 2009). Lo que ha sugerido que el incremento en esta disparidad morfológica puede promover que tanto los rasgos regresivos como constructivos (e.g. modificaciones cefálicas, órganos sensoriales) probablemente sean impulsados por una fuerte selección direccional (Jones *et al.*, 1992; Klaus *et al.*, 2013), sin descartar el posible efecto generado por la evolución neutral (Klaus *et al.*, 2013; Wilkens & Strecker, 2017). Bajo este contexto, las poblaciones troglobias de

ambos linajes (viejo y nuevo), presentan valores más altos de disparidad morfológica, reflejando el hecho de que han colonizado múltiples cuevas que presentan presiones selectivas similares (oscuridad perpetua, temperatura y salinidad constantes) que a su vez, pueden variar de cueva a cueva, viéndose afectadas por el tiempo que el linaje ha evolucionado en estas condiciones.

Conclusión

Encontramos un patrón de evolución morfológica en paralelo en la ecomorfología, forma de la premaxila, forma del cuerpo y forma de la cabeza para las diferentes poblaciones y linajes de los *Astyanax* troglobios. La forma de la cabeza es donde tenemos mayor grado de diferencia morfológica entre los morfotipos, la premaxila tiene un menor grado de diferencia morfológica y, por último, la forma del cuerpo es el que menos divergencia presenta a nivel de morfotipo. Estos patrones de evolución en paralelo nos indican que la variación morfológica se da como una respuesta a presiones selectivas similares, desarrollando en los dos linajes morfologías similares que los diferencia del morfotipo de superficie. Sin embargo, también encontramos que hay diferentes grados de divergencia morfológica a nivel de linaje para el morfotipo troglobio, la inclusión de más poblaciones de diferentes cuevas para los dos linaje genéticos nos permite comprender mejor cómo se da esta diversidad y evolución morfológica, pudiendo verse afectada por el tiempo que llevan los linaje en la cueva, apoyando la idea de que el linaje filogenéticamente viejo presente una forma troglobia con rasgos más especializados y un mayor grado de regresión evolutiva. Por lo siguiente podemos plantear dos cosas: 1) Al presentar diferentes grados de divergencia morfológica en los rasgos del organismos, podemos pensar que responden de manera independiente a las distintas presiones de selección. 2) Las diferencias a nivel de linaje nos sugiere que existe una contingencia histórica que podría estar afectando la evolución de la forma en los sistemas de cueva, además, proponen que a mayor tiempo pase una población en la cueva, esta puede presentar un mayor grado de divergencia morfológica.

Bibliografía

- Adams, D. C., Berns, C. M., Kozak, K. H., & Wiens, J. J. (2009). Are rates of species diversification correlated with rates of morphological evolution? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1668), 2729–2738. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0543>
- Albertson, R. C., Strelman, J. T., Kocher, T. D., & Yelick, P. C. (2005). Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16287–16292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506649102>
- Álvarez, J. (1946). Revisión del género *Anoptichthys* con descripción de una especie nueva (Pisces, Characidae). *Anuales Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 4, 263–282.
- Álvarez, J. (1947). Descripción de *Anoptichthys hubbsi* caracindo ciego de La Cueva de Los Sabinos, S. L. P. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 8, 215–219.
- Atukorala, A. D. S., Hammer, C., Dufton, M., & Franz-Odenaal, T. A. (2013). Adaptive evolution of the lower jaw dentition in Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*). *EvoDevo*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-28>
- Behrmann-Godel, J., Nolte, A. W., Kreiselmaier, J., Berka, R., & Freyhof, J. (2017). The first European cave fish. *Current Biology*, 27(7), R257–R258. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.048>
- Boggs, T., & Gross, J. (2021). Reduced oxygen as an environmental pressure in the evolution of the blind mexican cavefish. *Diversity*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/d13010026>
- Bookstein, F. L., 1989. Principal warps: Thin-plate splines and the decomposition of deformations. *I.E.E.E. Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 11: 567-585.
- Bookstein, F. L., 1991. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge University Press. 435 pp
- Collar, D. C., Near, T. J., & Wainwright, P. C. (2005). Comparative analysis of morphological diversity: does disparity accumulate at the same rate in two lineages of centrarchid fishes?. *Evolution*, 59(8), 1783-1794.
- Córdova-Tapia, F., & Zambrano, L. (2016). Fish functional groups in a tropical wetland of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Neotropical Ichthyology*, 14(2). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150162>
- Dufton, M., Hall, B. K., & Franz-Odenaal, T. A. (2012). Early Lens Ablation Causes Dramatic Long-Term Effects on the Shape of Bones in the Craniofacial Skeleton of *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050308>
- Futuyma, D. J., & Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution* (Cuarta). Sinauer Associates, Inc.
- Garita-Alvarado, C. A., Barluenga, M., & Ornelas-García, C. P. (2018). Parallel evolution of morphs of *Astyanax* species (Teleostei: Characidae) in México and Central America. *Biological Journal of the Linnean Society*, 124(4), 706–717. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly082>
- Hart, P. B., Niemiller, M. L., Burress, E. D., Armbruster, J. W., Ludt, W. B., & Chakrabarty, P. (2020). Cave-adapted evolution in the North American amblyopsid fishes inferred using phylogenomics and geometric morphometrics. *Evolution*, 74(5), 936–949. <https://doi.org/10.1111/evo.13958>

- Jones, R., Culver, D. C., & Kane, T. C. (1992). Are parallel morphologies of cave organisms the result of similar selection pressures? *Evolution*, 46(2), 353–365.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1992.tb02043.x>
- Klaus, S., Mendoza, J. C. E., Liew, J. H., Plath, M., Meier, R., & Yeo, D. C. J. (2013). Rapid evolution of troglomorphic characters suggests selection rather than neutral mutation as a driver of eye reduction in cave crabs. *Biology Letters*, 9(2). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.1098>
- Mise, F. T., Fuji, R., Pagotto, J. P. A., & Goulart, E. (2013). The coexistence of endemic species of *Astyanax*(Teleostei: Characidae) is propitiated by ecomorphological and trophic variations. *Biota Neotropica*, 13(3), 21–28. <https://doi.org/10.1590/s1676-06032013000300001>
- Howarth, F. G. (1983). Ecology of cave arthropods. *Annual Review of Entomology*, 28, 365–389.
- Howarth, F. G., & Hoch, H. (2012). Adaptive Shifts. In B. W. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (Primera edición, pp. 9–17). Elsevier Inc.
- Hulsey, C. D., & García de León, F. J. (2005). Cichlid jaw mechanics: linking morphology to feeding specialization. *Functional Ecology*, 19(3), 487–494.
- Mahler, D. L., Revell, L. J., Glor, R. E., & Losos, J. B. (2010). Ecological opportunity and the rate of morphological evolution in the diversification of greater Antillean anoles. *Evolution*, 64(9), 2731–2745. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01026.x>
- Mitchell, R. W., Russell, W. H., & Elliott, W. R. (1977). Mexican Eyeless Characin Fishes, Genus *Astyanax*: Environment, Distribution, and Evolution (L. Texas (ed.); First, Issue February 1977). TEXAS TECH UNIVERSITY.
- Ornelas-García, C. P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(340), 1–17.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-340>
- Ornelas-García, C. P., Bastir, M., & Doadrio, I. (2014). Morphometric variation between two morphotypes within the *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Actinopterygii: Characidae) genus, From a Mexican tropical lake. *Journal of Morphology*, 275(7), 721–731.
<https://doi.org/10.1002/jmor.20252>
- Ornelas-García, C. P., Bautista, A., Herder, F., & Doadrio, I. (2017). Functional modularity in lake-dwelling characin fishes of Mexico. *PeerJ*, 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.3851>
- Ornelas-García, C. P., Córdova-Tapia, F., Zambrano, L., Bermúdez-González, M. P., Mercado-Silva, N., Mendoza-Garfias, B., & Bautista, A. (2018). Trophic specialization and morphological divergence between two sympatric species in Lake Catemaco, Mexico. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4867–4875. <https://doi.org/10.1002/ece3.4042>
- Parsons, K. J., Cooper, W. J., & Albertson, R. C. (2011). Modularity of the Oral Jaws Is Linked to Repeated Changes in the Craniofacial Shape of African Cichlids. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.4061/2011/641501>
- Powers, A. K., Berning, D. J., & Gross, J. B. (2020). Parallel evolution of regressive and constructive craniofacial traits across distinct populations of *Astyanax mexicanus* cavefish. *Journal of*

- Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 334(7–8), 450–462.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.22932>
- Powers, A. K., Boggs, T. E., & Gross, J. B. (2018). Canal neuromast position prefigures developmental patterning of the suborbital bone series in *Astyanax* cave- and surface-dwelling fish. *Developmental Biology*, 441(2), 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.001>
- Powers, A. K., Davis, E. M., Kaplan, S. A., & Gross, J. B. (2017). Cranial asymmetry arises later in the life history of the blind Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177419>
- Powers, A. K., Rodiles-Hernández, R., Garita-Alvarado, C. A., Berning, D. J., Gross, J. B., & Ornelas-García, C. P. (2020). A geographical cline in craniofacial morphology across populations of Mesoamerican lake-dwelling fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 0(333), 171–180. <https://doi.org/10.1002/jez.2339>
- Protas, M., Tabansky, I., Conrad, M., Gross, J. B., Vidal, O., Tabin, C. J., & Borowsky, R. (2008). Multi-trait evolution in a cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Evolution and Development*, 10(2), 196–209. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2008.00227.x>
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Rohlf, F. J. (1993). Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. *Contributions to Morphometrics, January 1993*, 131–159.
- Rohlf, F. J. (2001). Comparative methods for the analysis of continuous variables: geometric interpretations. *Evolution*, 55(11), 2143–2160. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00731.x>
- Soares, D., & Niemiller, M. L. (2013). Extreme adaptation in caves. *The Anatomical Record*, 303:15–23. <https://doi.org/10.1002/ar.24044>
- Simon, V., Elleboode, R., Mahé, K., Legendre, L., Ornelas-García, P., Espinasa, L., & Rétaux, S. (2017). Comparing growth in surface and cave morphs of the species *Astyanax mexicanus*: Insights from scales. *EvoDevo*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13227-017-0086-6>
- Tabin, C. J. (2016). Introduction: The Emergence of the Mexican Cavefish as an Important Model System for Understanding Phenotypic Evolution. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.09999-0>
- Trapani, J., Yamamoto, Y., & Stock, D. W. (2005). Ontogenetic transition from unicuspid to multicuspid oral dentition in a teleost fish: *Astyanax mexicanus*, the Mexican tetra (Ostariophysi: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 145(4), 523–538. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2005.00193.x>
- Wagner, G. P., & Altenberg, L. (1996). Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50(3), 967–976. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02339.x>
- Wainwright, P. C. (1988). Morphology and ecology: functional basis of feeding constraints in Caribbean labrid fishes. *Ecology*, 69(3), 635–645. <https://doi.org/10.2307/1941012>

- Warton, D. I., Wright, I. J., Falster, D. S., & Westoby, M. (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 259–291. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007007>
- White, B. W., & Culver, D. C. (2012). Encyclopedia of Caves (B. W. White & D. C. Culver (eds.); Second). Academic Press of Elsevier. www.elsevier.com
- Wilkens, H. (1988). Evolution and Genetics of Epigeal and Cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Evolutionary Biology*, May, 271–367. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1043-3_8
- Wilkens, H., & Strecker, U. (2017). Evolution in the Dark: Introduction. In *Evolution in the Dark*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54512-6_1
- Yamamoto, Y., & Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science*, 289(5479), 631–633. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.631>
- Yamamoto, Y., Espinasa, L., Stock, D. W., & Jeffery, W. R. (2003). Development and evolution of craniofacial patterning is mediated by eye-dependent and -independent processes in the cavefish *Astyanax*. *Evolution and Development*, 5(5), 435–446. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142X.2003.03050.x>
- Yang, J., Chen, X., Bai, J., Fang, D., Qiu, Y., Jiang, W., Yuan, H., Bian, C., Lu, J., He, S., Pan, X., Zhang, Y., Wang, X., You, X., Wang, Y., Sun, Y., Mao, D., Liu, Y., Fan, G., Shi, Q. (2016). The Sinocyclocheilus cavefish genome provides insights into cave adaptation. *BMC Biology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0223-4>
- Yoder, J. B., Clancey, E., Des Roches, S., Eastman, J. M., Gentry, L., Godsoe, W., Hagey, T. J., Jochimsen, D., Oswald, B. P., Robertson, J., Sarver, B. A. J., Schenk, J. J., Spear, S. F., & Harmon, L. J. (2010). Ecological opportunity and the origin of adaptive radiations. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(8), 1581–1596. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02029.x>
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press San Diego, 95, 443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0>

CAPÍTULO II: Ecología trófica

Introducción

Las cuevas se forman en muchos tipos de rocas y mediante diversos procesos, aunque las cuevas más grandes y comunes son las formadas en piedra caliza, dolomita y lava solidificada (White & Culver, 2012; Moldovan *et al.*, 2018). Como hábitats, las cuevas tienen algunas propiedades particulares, entre las que destacan: 1) la oscuridad perpetua, 2) la cantidad limitada de recursos y 3) parámetros ambientales constantes (*e.g.* temperatura y humedad). Estas condiciones en conjunto, definen a las cuevas como ambientes extremos y presentan fuertes presiones de selección para los organismos que habitan en ellas (White & Culver, 2012).

Ecología de las cuevas

Las cuevas son un tipo de ecosistemas únicos en su estructura física y función biológica (Moldovan *et al.*, 2018). El entorno geológico, las condiciones del hábitat terrestre exterior (tipo de vegetación, fauna y suelo) y las características hidrológicas (erosión, flujo de agua, cantidad de material arrastrado, etc.) definen los límites del ecosistema, los diversos hábitats y cómo la energía y la materia se mueven a través del sistema (Roch, 1987; Simon, 2012). Dependiendo de la naturaleza de la conexión de los cuerpos de agua con la superficie, el agua dentro de las cuevas puede diferir en temperatura, flujo y química. Por otro lado, el entorno terrestre de las cuevas se puede definir en 5 zonas: 1) entrada, 2) crepúsculo, 3) transición, 4) zona profunda y 5) aire estancado (White & Culver, 2012), que describen un gradiente desde la superficie en la que la luz disminuye y la temperatura y humedad se vuelven más estables (Howarth, 1983). Por lo tanto, los hábitats terrestres y acuáticos que se forman dentro de las cuevas no deben verse como sistemas separados, sino como un continuo en el flujo de energía relativamente limitado (Poulson y Lavoie 2000).

Estos sistemas son considerados como oligotróficos, es decir, ambientes con baja cantidad de materia orgánica disponible y densidad energética (Moldovan *et al.* 2018). Por lo que se considera que la estructura trófica de estas cuevas es menos compleja,

tanto en energía y nutrientes en comparación con el exterior (Moldovan *et al.* 2018), siendo la conectividad e interacciones con el entorno de superficie lo que mantiene en gran medida a los sistemas subterráneos (Kovac, 2018), siendo particularmente alta en sistemas formados de piedra caliza, donde la percolación de agua es característico de estas zonas (Dunne *et al.*, 2002; Romero 2009; Kovac, 2018).

En los ecosistemas de cuevas se pueden encontrar dos tipos de redes tróficas, las basadas en detritos (materia vegetal o animal en descomposición) y las basadas en bacterias quimiolitotróficas (biomasa procariota y eucariota), diferenciándose en la vía por la cual el carbono inorgánico (dióxido de carbono o bicarbonato) se transforma en compuestos orgánicos (Venarsky & Hunstman, 2018). Los ecosistemas de cuevas basados en detritos se sustentan a través de vías fotosintéticas clásicas, ya que la materia orgánica es arrastrada por el flujo de agua desde la superficie (ver más en Simon *et al.*, 2003). Por el contrario, los ecosistemas de cuevas con base quimiolitotrófica están respaldados por bacterias que adquieren energía a través de la oxidación de compuestos inorgánicos, como el sulfuro (el más común) y el metano, para transformar dióxido de carbono o bicarbonato en la biomasa microbiana que respalda la productividad primaria en las zonas más profundas de cuevas gran tamaño (ver más en Sarbu 2001; Engel, 2007; Madigan *et al.*, 2010; Venarsky & Hunstman, 2018). De este modo, es posible estudiar las redes tróficas en las cuevas, así como el nicho ecológico en el que se devuelven los organismos cavernícolas.

El estudio de las redes tróficas

Todas las interacciones presentes en el ecosistema se les denomina como red trófica (Smith & Smith, 2009) y su estudio comprende en conocer cuántos niveles hay presentes en un ecosistema, de qué manera pasa la energía y la biomasa de un nivel a otro y, de ser posible, conocer la biodiversidad presente en cada nivel (Bearhop *et al.*, 2004). Actualmente, uno de los métodos más utilizados para estudiar las redes tróficas es el de los isótopos estables, que han demostrado ser una herramienta útil para caracterizar relaciones tróficas (Boecklen *et al.*, 2011). Su utilidad se debe a que los valores medidos en los tejidos de los consumidores están estrechamente relacionados con su dieta, siendo los más utilizados el carbono y el nitrógeno

(Layman *et al.*, 2007, Jakson *et al.*, 2011). Para el nitrógeno (la proporción entre ^{14}N - ^{15}N , expresadas como $\delta^{15}\text{N}$ o $\delta^{15}\text{N}$) exhiben un enriquecimiento escalonado con las transferencias tróficas de un nivel a otro, es decir, los niveles más altos en la red tendrán una mayor señal de este isótopo; por lo tanto, son herramientas que permiten estimar la posición trófica de los organismos. Mientras, que la señal isotópica del carbono (la proporción entre ^{13}C - ^{12}C , expresadas como $\delta^{13}\text{C}$ o $\delta^{13}\text{C}$) varía entre los productores primarios con diferentes vías fotosintéticas (por ejemplo, plantas C3 vs C4), pero, la señal de $\delta^{13}\text{C}$ puede cambiar poco o nada con las transferencias de un nivel a otro dentro de la red tróficas. Por lo tanto, se utiliza para determinar las diversas fuentes de productividad primaria en la red (DeNiro & Epstein, 1981; Peterson & Fry, 1987; Post, 2002b; Layman *et al.*, 2007).

Uno de los métodos más populares para estudiar estas señales isotópicas son las métricas de Layman, que consiste en una serie de seis medidas que describen la estructura, el tamaño del nicho ecológico y los diferentes niveles tróficos que se pueden presentar en las redes tróficas (Layman *et al.*, 2007). Trabajan con los valores obtenidos de la señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$. Como primera aproximación se grafican ambas señales ($\delta^{15}\text{N}$ en el eje de las Y y $\delta^{13}\text{C}$ en el de las X), de este modo vemos que $\delta^{15}\text{N}$ describe la estructura vertical (número de niveles) de la red trófica y $\delta^{13}\text{C}$ la estructura horizontal (los diferentes productores). Por lo tanto, se han propuesto seis métricas que proporcionan variables de respuesta cuantitativas que reflejan características específicas de la estructura trófica: 1) Amplitud del $\delta^{15}\text{N}$ (RN), es el intervalo entre el organismo con el valor más alto de $\delta^{15}\text{N}$ y el organismo con el valor más bajo de $\delta^{15}\text{N}$ y describe la estructura vertical (número de niveles) de la red trófica, generalmente, intervalos muy amplios sugieren un mayor grado de diversidad trófica. 2) Amplitud del $\delta^{13}\text{C}$ (RC), es el intervalo entre el organismo con el valor más alto de $\delta^{13}\text{C}$ y el organismo con el valor más bajo de $\delta^{13}\text{C}$ y describe la estructura horizontal (los diferentes productores) de la red trófica, un intervalo amplio sugiere una gran diversidad en la base de la red. 3) Área total de nicho (TA), representa una medida de la cantidad total de espacio de nicho ocupado y, por lo tanto, una aproximación de la extensión de la diversidad dentro de la red trófica. 4) Distancia media al centroide (CD), proporciona una medida del grado medio de diversidad dentro de la red trófica, en función del grado de espaciamiento entre los organismos. 5) Distancia media al vecino más cercano (NND), es una medida de la

densidad global de agrupamiento de los organismos, que sugieren una mayor redundancia trófica si los valores son bajos. 6) La desviación estándar de la distancia al vecino más cercano (SNND), medida que se ve menos afectada por el tamaño de la muestra en comparación al NND, sugiriendo una distribución más uniforme de los nichos tróficos (Ver más en Layman *et al.*, 2007; Jakson *et al.*, 2001).

Aunado a lo anterior, en este capítulo se pretende conocer, comparar y evaluar la ecología trófica de las poblaciones troglobias de *Astyanax mexicanus*, utilizando información de siete poblaciones pertenecientes a siete cuevas distintas, en dos regiones geográficas Kársticas: La Sierra de El Abra y la Sierra de Guatemala. Esto, mediante la evaluación de las señales isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$. Adicionalmente, se quiere saber si existe una asociación entre dichas señales y la ecomorfología de las poblaciones troglobias. Por último, evaluar si la geomorfología de las cuevas tiene un impacto en la cantidad de recursos disponibles en las cuevas, que puedan afectar en las señales reportadas para las distintas cuevas. Aportando por primera ocasión una aproximación de la estructura trófica para las poblaciones troglobias al noreste de México.

Métodos

Isótopos estables

Se evaluó la señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ a partir del tejido muscular de 47 individuos provenientes de 7 localidades de cueva de la Sierra de El Abra y la Sierra de Guatemala (tabla 8), capturados en el año 2017. Las muestras fueron deshidratadas colocándolas en sal (NaCl) para ser transportadas al laboratorio y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron rehidratadas en agua miliQ, en reiteradas ocasiones hasta retirar todos los restos de sal, posteriormente fueron colocadas en un horno sin convección a una temperatura de 60°C durante 48 horas para su desecación. Luego fueron maceradas con mortero y pistilo, se pesaron (1-1.5 mg) y se almacenaron en tubos estériles de 2 mL para ser enviadas al Center of Stable Isotopes en la Universidad de Nuevo México, USA, para obtener las tasas de isótopos estables del carbono ($\delta^{13}\text{C} = 13\text{C}/12\text{C}$) y nitrógeno

($\delta^{15}\text{N} = 15\text{N}/14\text{N}$). La desviación estándar de la media fue 0.04 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ y 0.07 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$.

Tabla 8. Las 7 localidades utilizadas para los análisis de isótopos estables

Cueva	Sierra	Estado	N
Sótano de Palma Seca	El Abra	San Luis Potosí	13
Sótano de Yerbaniz	El Abra	San Luis Potosí	5
Sótano de Pichijumo	El Abra	San Luis Potosí	8
Sótano de Escondido	Guatemala	Tamaulipas	8
Sótano de Molino	Guatemala	Tamaulipas	8
Sótano de Caballo moro	Guatemala	Tamaulipas	5
Sótano de Vázquez	Guatemala	Tamaulipas	5

Mediante un ANOVA se evaluó si había diferencias estadísticas a nivel de región geográfica (i.e. El Abra vs. Guatemala) en las señales de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$. Para observar diferencias a nivel de población se realizaron comparaciones pareadas por medio de la U de Mann-Whitney, el valor de significancia fue corregido con el método de Bonferroni, ambos análisis se llevaron a cabo en el programa R ver. 3.6.1. Se realizó un análisis de nicho trófico con el método de las métricas de Layman (Layman, 2007): calculando las seis medidas: amplitud de nitrógeno (NR), amplitud de carbono (CR), el área de nicho total (TA), la distancia media al centroide (CD), la distancia media del vecino más cercano (NND), y desviación estándar de la distancia del vecino más cercano (SDNND), utilizando la biblioteca de *SIBER* ver. 2.1.4, en el programa R ver. 3.6.1. Adicionalmente, se realizó un análisis de nicho trófico con un enfoque bayesiano, este análisis se diferencia del tradicional en que se trabaja esencialmente con elipses de área estándar o “standard ellipse area” (SEA por sus siglas en inglés), las cuales, cumplen un rol similar para los datos bivariados como el de la desviación estándar para los datos univariados (Jackson *et al.*, 2011). La elipse está respaldada por la matriz de covarianza generada por las dos variables, en este caso las señales de isótopos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$, lo que reduce el efecto por el tamaño de la muestra. El enfoque bayesiano devuelve una distribución de probabilidad (posterior) a partir de una función de verosimilitud y las distribuciones de

probabilidad previas de SEA. De esta manera, las elipses resultantes pueden compararse de una manera cuantitativa y las diferencias entre las muestras pueden establecerse con referencia a una probabilidad robusta. De manera similar a las métricas de Layman, SEA_B proporciona la estimación de las 6 métricas que evalúan el nicho trófico, pero no se ven afectadas por el tamaño de la muestra. Se corrieron dos cadenas de Markov-Montecarlos (MCMC), con 10 000 permutaciones cada una, posteriormente se depuraron los primeros 1000 valores obtenidos (*burning*) en la biblioteca *SIBER* ver. 2.1.4 en el programa R ver. 3.6.1 (R Core Team, 2019), con base en el trabajo de Jackson *et al.* (2011).

Correlación ecomorfológica

Para evaluar la correlación entre las señales isotópicas y la variación morfológica se construyó una base de datos con todos los organismos de los cuales se tenían datos de isótopos estables y ecomorfológicos, teniendo un tamaño de muestra de 28 individuos. Se redujo el número de variables ecomorfológicas para trabajar con aquellas que mejor se correlacionaron con los datos de isótopos estables. Esto mediante la estandarizaron los datos por medio de la transformación Z y un Análisis de Componentes Principales (PCA), quedando un total de 12 variables: Longitud estándar (LE), Longitud de la cabeza (LCa), longitud del hocico cerrado (LHc), Longitud del hocico abierto (LHa), Intraorbital (In), Longitud del pedúnculo caudal (LPeC) Radios de la aleta dorsal (RAD), número de escamas de la línea lateral (Escamas L), hidrodinamismo, proyección del hocico (Proyección H), apertura relativa del hocico (Apertura RH) Y ancho relativo del hocico (Ancho RH). Finalmente se realizó un análisis de correlaciones canónicas (CCA por sus siglas inglés) con la nueva matriz de datos ecomorfológicos y la señal isotópica, usando la biblioteca CCA ver. 1.2 en R ver. 3.6.1. (González *et al.*, 2008).

Índice de entrada de nutrientes

Para conocer si las características geomorfológicas de las cuevas afectan la señal isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, se desarrolló un índice de entrada de nutrientes utilizando tres mediciones en las cuevas: 1) la distancia de la primera poza con peces a la entrada de la cueva (DEP), 2) la profundidad de la cueva (BC) y 3) el nivel base del valle (BLV). Y de este modo, para que nos ayude a comprender, si la señal isotópica se relaciona con la entrada de material alóctono debido a la cercanía de la

poza con la superficie o con el manto freático del subsuelo. Para obtener la primer medición, se descargaron mapas estratigráficos de las distintas cuevas en <http://www.mexicancaves.org/maps/SLP.html>, con ayuda de la herramienta de medición de TPSDig se midió esta distancia, calibrando previamente con la escala asignada en cada mapa. Las otras dos mediciones fueron tomadas de diversas fuentes bibliográficas (Elliot, 2018; Mitchell; 1977). Después empleamos la siguiente ecuación:

$$IN = \frac{DEP}{BC - BLV}$$

Donde: *IN* son las siglas asignadas al Índice de entrada de nutrientes, *DEP* es la distancia de la primera poza con peces a la entrada de la cueva (tomando en cuenta la distancia vertical y horizontal dentro de la cueva, Fig. 15 y 16); este valor se va a dividir por el resultado de la sustracción de *BC*, que es la profundidad de la cueva; y *BLV* que es el nivel base del valle. Si el valor del índice es mayor a 1, se debe a la cercanía de la poza con la entrada de la cueva, por lo tanto, los valores del *DEP*, no serán muy altos y el resultado de la sustracción de *BC-BLV*, será aún menor y se esperarían que los valores de la señal isotópica se relacionen directamente con la entrada de material alóctono. Si se obtienen valores menores a 1, se debe que la poza está más cerca del fondo de la cueva y más alejada de la entrada, por lo tanto, incluso cuando el valor de *DEP* puede ser alto, el resultado de la sustracción de *BC-BLV*, será un valor muy cercano al *DEP* o incluso mayor, entonces, esperando que los valores de los isótopos estables se deban a la contribución de material por el manto freático. Además, se evaluó si existe una relación entre el *IN* y las señales isotópicas obtenidas, realizando una regresión lineal con los valores obtenidos del *IN* para las diferentes cuevas y los valores promedio de los datos de la señal isotópica de $\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$.

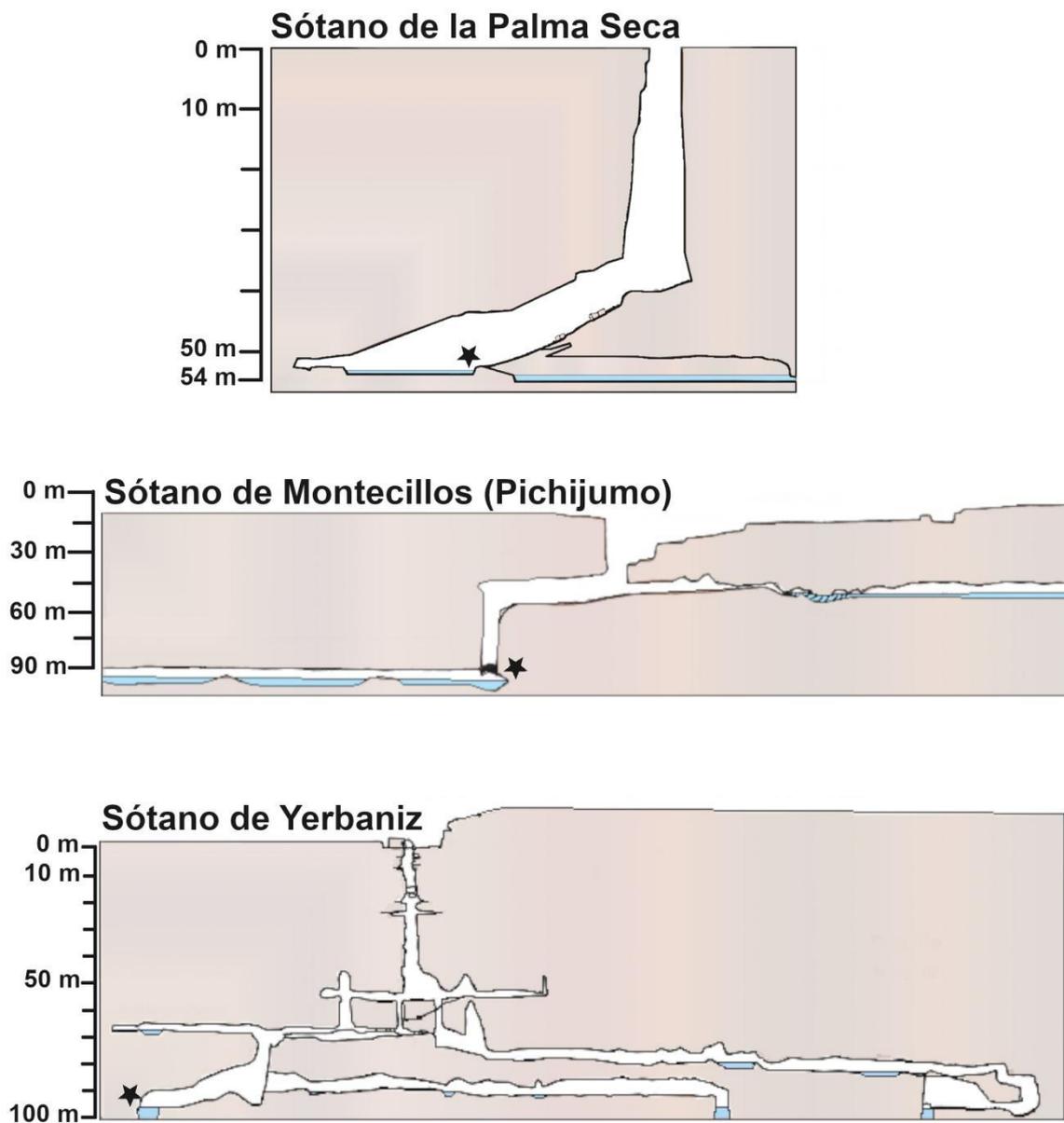


Fig. 15 Mapa vertical editado de las cuevas de la Sierra El Abra de las que se tienen datos para trabajar en el segundo capítulo. Las estrellas resaltan las pozas de las que se obtuvieron los peces, por lo tanto, son las que se tomaron en cuenta para calcular la DEP.

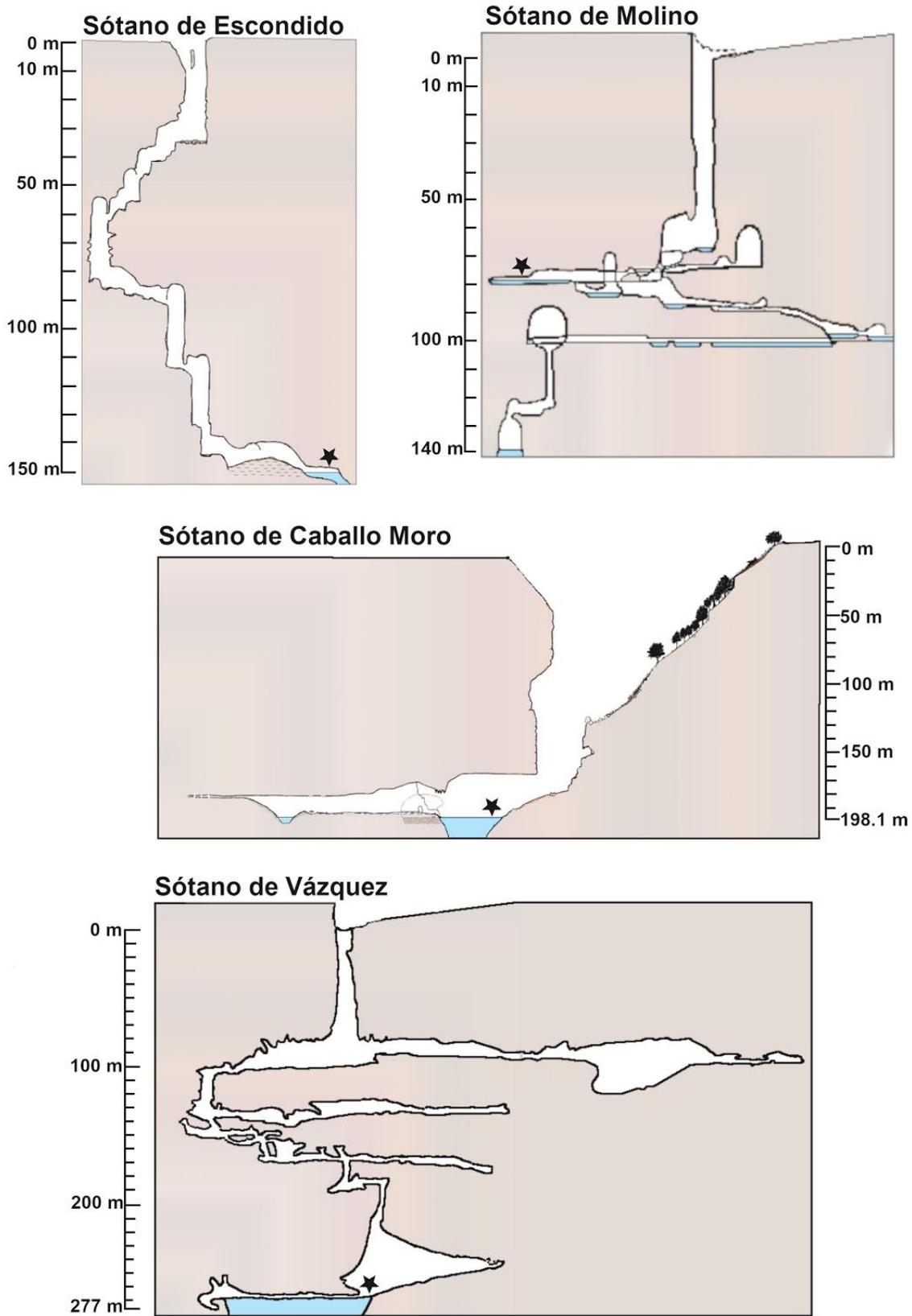


Fig. 16 Mapa vertical editado de las cuevas de la Sierra de Guatemala de las que se tienen datos para trabajar en el segundo capítulo. Las estrellas resaltan las pozas de las que se obtuvieron los peces, por lo tanto, son las que se tomaron en cuenta para calcular la DEP.

Resultados

Análisis de isótopos estables

Los resultados del ANOVA señalan que hay diferencias estadísticas significativas para ambas señales de isótopos estables a nivel de región geográfica ($\delta^{15}\text{N}$: $p = <0.05$, $\delta^{13}\text{C}$: $p < 0.05$) y a nivel de población ($\delta^{15}\text{N}$: $p < 0.05$, $\delta^{13}\text{C}$: $p < 0.05$). Lo que indica que la señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ es diferente en al menos una de las poblaciones asociadas a las siete cuevas analizadas (tabla 9).

Tabla 9. ANOVA de las señales de isótopos estables. Los valores resaltados en negritas y con un * son estadísticamente significativos: $p > 0.05$

$\delta^{15}\text{N}$	GL	Valor F	Valor P	$\delta^{13}\text{C}$	GL	Valor F	Valor P
Región	1	12.010	<0.05*	Región	1	10.802	<0.05*
Población	5	8.702	<0.05*	Población	5	11.182	<0.05*
Residuales	40			Residuales	40		

En las comparaciones a nivel poblacional, para la señal de $\delta^{15}\text{N}$, Yerbaniz fue la población con menor nivel para la Sierra de El Abra, mientras que Montecillos fue la población con el valor más alto ($\delta^{15}\text{N} = 9.19$ y 10.92 , respectivamente), siendo la población más enriquecida para ambas regiones geográficas, sin presentar diferencias estadísticas para las tres poblaciones de la Sierra de El Abra. La única población que mostró diferencia estadísticas significativas para $\delta^{15}\text{N}$ fue Molino, que a su vez, es la que tiene el valor más bajo en los dos sistemas ($\delta^{15}\text{N} = 8.55$), siendo la población menos enriquecida del estudio, esta se encuentra en la Sierra de Guatemala, y las diferencias fueron con las poblaciones más enriquecidas, es decir Montecillos y Palma seca de la región El Abra (tabla 10). Para el caso del Carbono, se encontraron valores más similares para las poblaciones dentro de las dos regiones geográficas. La sierra de El Abra tiene valores ligeramente más bajos, siendo Montecillos la población que tiene un valor más bajo ($\delta^{13}\text{C} = -29.80$) y es la población menos enriquecidas en ambas regiones geográficas (Fig. 16A), a su vez, siendo la única que presentó diferencias estadísticas significativas con la población más enriquecida, la cual es Escondido de la Sierra de Guatemala ($\delta^{13}\text{C} = -24.7$). No hubo diferencias significativas en las demás comparaciones pareadas (tabla 10).

Tabla 10. Comparaciones pareadas a nivel poblacional de la señal isotópica, mediante el método de Mann-Whitney. Los valores con * son estadísticamente significativos después de aplicar la corrección de Bonferroni $p < 0.0083$.

$\delta^{15}\text{N}$	Palma seca	Montecillos	Yerbaniz	Caballo Moro	Escondido	Molino
Montecillos	$p = 0.312$					
Yerbaniz	$p = 0.05$	$p = 0.15$				
Caballo moro	$p = 0.166$	$p = 0.071$	$p = 0.116$			
Escondido	$p = 0.309$	$p = 0.124$	$p = 0.105$	$p = 0.76$		
Molino	$p < 0.001^*$	$p < 0.001^*$	$p = 0.076$	$p = 0.055$	$p = 0.25$	
Vázquez	$p = 0.084$	$p = 0.045$	$p = 0.142$	$p = 1$	$p = 0.60$	$p = 0.051$
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
$\delta^{13}\text{C}$						
Montecillos	$p = 0.025^*$					
Yerbaniz	$p = 0.48$	$p = 0.142$				
Caballo moro	$p = 0.52$	$p = 0.04$	$p = 0.095$			
Escondido	$p = 0.05$	$p < 0.001^*$	$p = 0.041$	$p = 0.170$		
Molino	$p = 0.468$	$p = 0.13$	$p = 1$	$p = 0.22$	$p = 0.15$	
Vázquez	$p = 1$	$p = 0.035$	$p = 0.402$	$p = 0.115$	$p = 0.066$	$p = 0.65$

Análisis de isótopos estables: métricas de Layman

De acuerdo con los resultados en las seis métricas de Layman, se obtuvo que el nicho trófico de la región del Abra fue más amplio y con una menor redundancia trófica comparado con la región de Guatemala. Estas diferencias entre las regiones son visibles en los polígonos obtenidos para el CR (3.40 vs. 2.50), TA (2.27 vs. 1.47), NND (2.01 vs. 1.05) y SNND (0.95 vs. 0.45), donde para todas las métricas la Sierra de El Abra presentó los valores más altos (Fig. 17A, 18A y tabla 11). A nivel de población, Palma seca es la que tiene mayor amplitud de nicho en los dos sistemas geográficos (CN = 2.5, CR = 6.10, TA = 7.06; tabla 11), mientras que Vázquez la que presenta los valores más bajos, siendo la población que tiene mayor redundancia trófica (CN = 0.60, CR = 1.40, TA = 0.62; tabla 11).

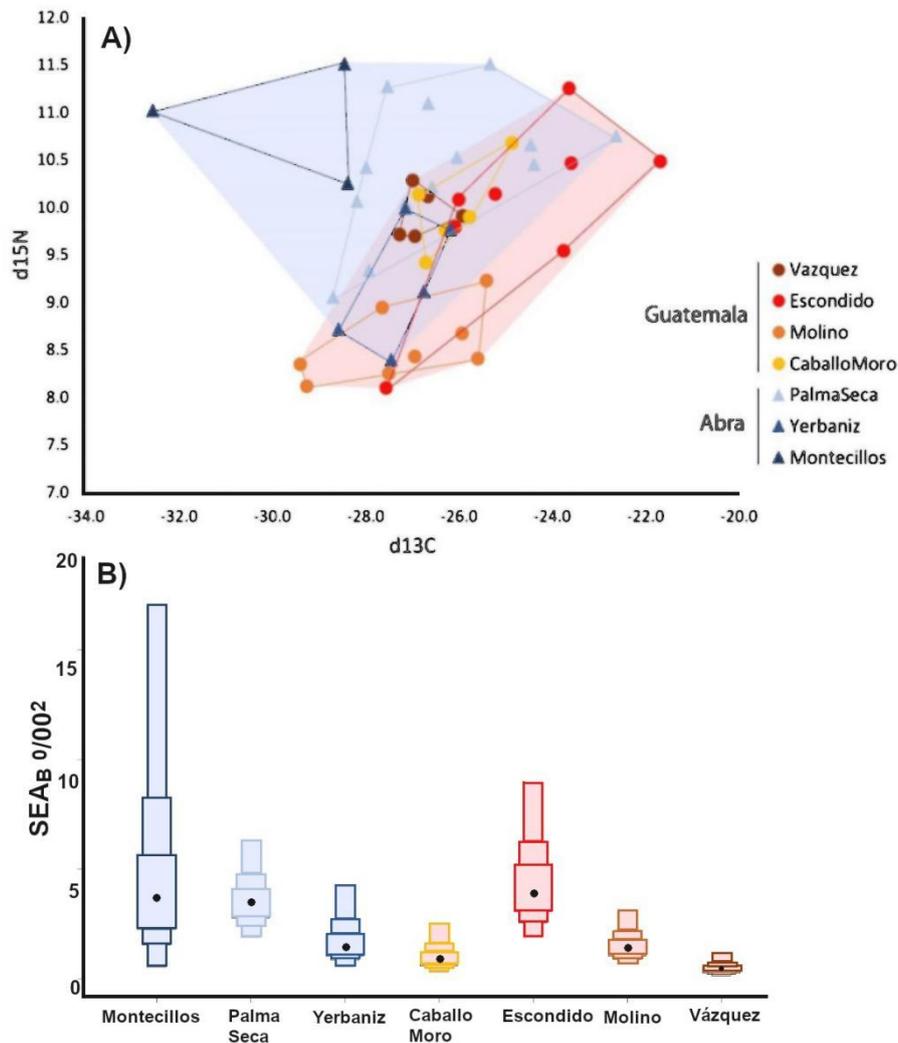


Fig. 17 Análisis de nicho trófico de las señales isotópicas. A) Bi-plot de las señales $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ analizadas con las métricas de Layman. En triángulos: las poblaciones de la Sierra de El Abra que delimitan el polígono azul. En círculos: las poblaciones de la Sierra de Guatemala que delimitan el polígono rojo. B) Análisis de SEAB de las métricas de Layman representado con un diagrama de cajas y bigotes. El punto negro representa la media. En tonos azulados: las poblaciones de la Sierra de El Abra, en tonos rojos: poblaciones de la Sierra de Guatemala.

Los resultados obtenidos por la área de elipse estándar con enfoque bayesiano (SEAB ; Fig. 17B y 18), fueron consistentes con los análisis tradicionales observando que hay diferencias entre las regiones geográficas, con SEAB más amplios para la Sierra de El Abra. La población de Montecillos es la que presenta los valores de SEAB más altos, siendo en este punto contrastante con los análisis tradicionales, donde Palma Seca es la población con las métricas más altas, mientras que Yerbaniz es la que presenta los valores de SEAB más bajos en la Sierra de El Abra. En el caso de Guatemala, Escondido es la población que presenta los valores de SEAB más altos y

Vázquez los más bajos, siendo consistentes con el análisis tradicional. Analizando las regiones geográficas en conjuntos, podemos apreciar que la métricas de Layman para la región de El Abra son mayores de acuerdo con los valores del SEA en comparación con la región de Guatemala (tabla 11 y Fig. 18). Estos resultados son consistentes con los resultados de las métricas tradicionales.

Tabla 11. Resultados de las seis métricas de Layman. Resaltados en Azul las poblaciones de la Sierra el Abra. Resaltados en naranja, poblaciones de la Sierra de Guatemala.

Población	NR	CR	TA	CD	NND	SDNND
El Abra	1.73	3.40	3.27	1.57	2.01	0.95
Palma Seca	2.5	6.10	7.06	1.62	0.74	0.42
Yerbaniz	1.60	2.40	1.79	0.95	0.99	0.09
Montecillos	1.20	4.20	2.49	1.93	2.18	1.69
Guatemala	1.45	2.50	1.41	1.01	1.05	0.45
Caballo Moro	1.30	2	0.90	0.72	0.69	0.29
Vázquez	0.60	1.40	0.42	0.48	0.43	0.22
Escondido	3.20	5.90	6.53	1.70	1.03	0.70
Molino	1.1	4	2.29	1.30	0.45	0.17

RN = Amplitud de nitrógeno, RC = Amplitud de Carbono, TA = Área total de nicho, CD = Tamaño medio del centroide, NND = Distancia al vecino más cercano, SDNND = Desviación estándar al vecino más cercano

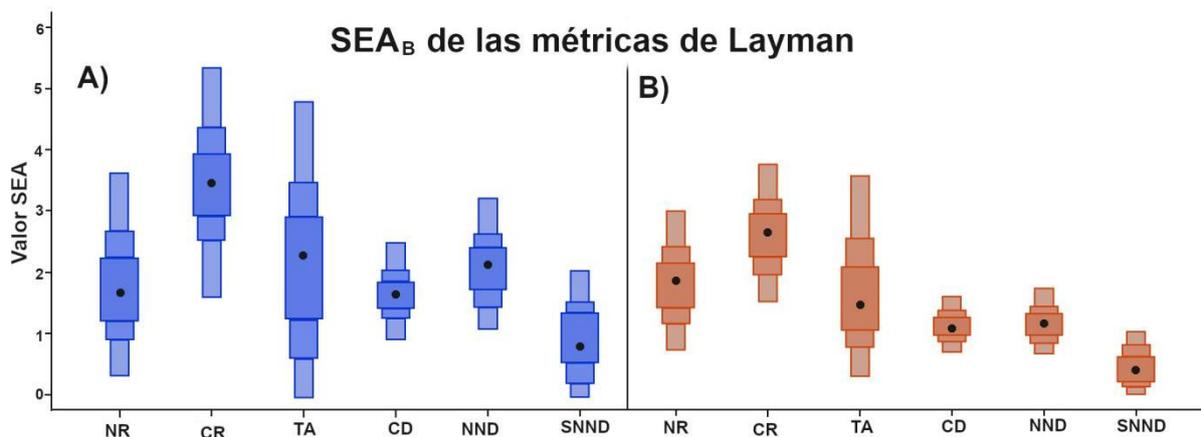


Fig. 18 Análisis de SEAB de las métricas para la dos regiones geográficas por separado, representado por un diagrama de cajas y bigotes donde el punto negro representa el valor medio de cada medida. B) Análisis de SEAB de las métricas de Layman para las poblaciones de la Sierra El Abra. C) Análisis de SEAB de las métricas de Layman para las poblaciones de la Sierra de Guatemala.

Correlación entre la ecomorfología y señal isotópicas

En la correlación de las matrices de la señal isotópica y la matriz de variables ecomorfológicas reducidas, se encontró que no hay una correlación fuerte entre la ecomorfología y la señal de isótopos estables. Sin embargo, algunas de las variables ecomorfológicas asociadas a hábitos tróficos mostraron los valores de correlación más alta, destacando la proyección del hocico (P. Hocico) y la longitud del hocico cerrado (LHc) para la señal de $\delta^{15}\text{N}$ (Corr = 0.326, Cor = 0.299, respectivamente, tabla 12), mientras que el ancho relativo del hocico fue la que presentó el valor más alto de correlación con $\delta^{13}\text{C}$ (Cor = 0.301, tabla 12).

Tabla 12. Valores de correlación entre las variables morfológicas y los datos de la señal isotópica. Se resaltan en negritas los valores de correlación más alta para cada señal isotópica.

Variable	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$
LE	-0.150	0.133
LCa	-0.042	0.096
LHc	0.299	0.215
LHa	-0.014	0.094
In	0.227	0.051
LPeC	-0.208	0.105
RAD	0.109	-0.133
Escamas	0.089	-0.029
Hidrodinamismo	-0.045	0.053
Proyección del Hocico	0.326	0.204
Altura relativa del Hocico	-0.293	0.133
Ancho relativo del Hocico	-0.131	0.301

El análisis de correlaciones canónicas arrojó dos dimensiones, creadas por la correlación de matrices, generando un gráfico donde se aprecia una separación a nivel de región geográfica. Por un lado, la matriz que más impacto tiene en las dos dimensiones es la señal isotópica. Teniendo la carga positiva en la dimensión 1 por parte del $\delta^{15}\text{N}$, es donde se encuentran distribuidas las poblaciones de la Sierra el Abra (Fig. 19). En el lado negativo se encuentra la señal de $\delta^{13}\text{C}$, donde se

encuentran las poblaciones de la Sierra de Guatemala. En la dimensión 2 la variable más importante es también $\delta^{13}\text{C}$. Las variables ecomorfológicas no tienen un efecto fuerte en la separación de las regiones geográficas, siendo congruentes con los resultados de que no hay una correlación entre las matrices de datos.

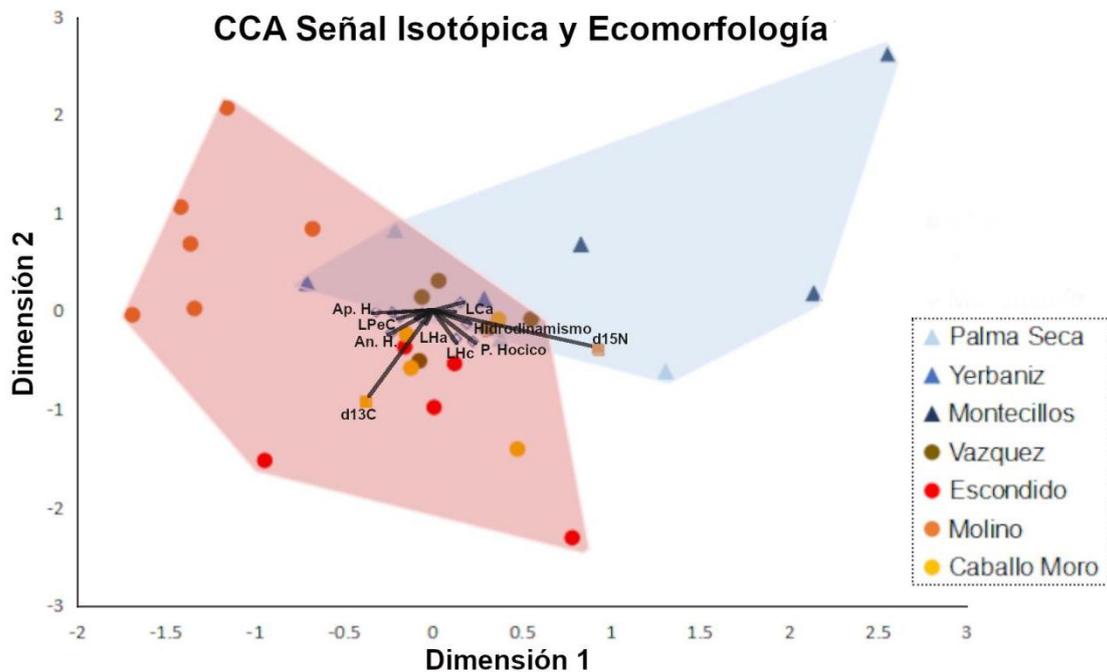


Fig. 19 Análisis de correlación canónica entre la señal de los isótopos estable y la variación ecomorfológica. En Triángulos, las poblaciones de la Sierra el Abra y delimitan el polígono azul. En círculos, las poblaciones de la Sierra de Guatemala que delimitan el polígono rojo.

Índice de entrada de nutrientes

En los resultados obtenidos del índice de entrada de nutrientes, se observó un patrón que nos indica que las poblaciones presentes en cuevas con una mayor profundidad exhibieron valores negativos del índice, siendo la cueva de Escondido (BC = 159 msnm, DEP = 180 m, IN = -6.2) la que presenta los valores más bajos, seguido de Yerbaniz (BC = 145 msnm, DEP = 200 m, IN = -4.4) y Vázquez (BC = 277 msnm, DEP = 480m, IN = -4.1), esta última cueva a pesar de ser la que presenta más profundidad (BC) y mayor distancia de la poza a la entrada (DEP), no es la que tiene el valor más bajo como se esperaba (tabla 13). Por otro lado, las poblaciones que habitan cuevas que tienen una menor profundidad (BC) y menor distancia de la poza a la entrada (DEP) obtuvieron valores del índice más altos, como Caballo Moro (BC = 109 msnm, DEP = 100 m, IN = 1.23), Molino (BC = 125 msnm, DEP = 100 m, IN = 20),

Palma seca (BC = 98 msnm, DEP = 134 m, IN = 2) y Montecillos (BC = 98 msnm, DEP = 100 m, IN = 60) que es la que obtuvo el valor más alto de todos (tabla 13).

Tabla 13. Valores de los parámetros de distintas cuevas que se utilizaron para construir el índice de entrada de nutrientes. Se incluyen el valor del índice y el promedio de la señal de isotópica por cueva.

Cueva	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	DEP (m)	BC (msnm)	BLV (msnm)	IN
Montecillos	10.9	-29.8	120	98	100	60
Yerbaniz	9.1	-27.23	200	145	100	-4.4
Palma Seca	10.4	-26.43	134	98	165	2
Caballo moro	9.97	-26.11	100	109	190	1.23
Molino	8.55	-27.22	100	125	130	20
Escondido	9.98	-24.7	180	159	130	-6.206
Vázquez	9.94	-26.76	485	277	160	-4.145

DEP = Distancia de la poza con peces a la entrada de la cueva, BC = Profundidad de la cueva, BLC = Nivel base del valle, IN = Índice de entrada de nutrientes.

Para visualizar si hay un efecto de que la geomorfología de cada cueva puede alterar la obtención y asimilación de los recursos tróficos, se realizó una regresión lineal entre la señal isotópica de ($\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$) y los valores del índice de entrada de nutrientes para el caso del nitrógeno, se aprecia una tendencia en la que el valor del nitrógeno sube, conforme incrementa el valor del índice, lo que nos indica que en las cuevas con menos profundidad (BC) y distancia de la poza a la entrada de la cueva (DEP) se pueden presentar redes tróficas más complejas, aunque de acuerdo al valor de R^2 obtenido ($R^2 = 0.13$), la relación no es significativa (Fig. 20A). Caso contrario al carbono, que mostró una relación inversa, donde el valor del carbono baja, conforme incrementa el valor del índice, indicando dos cosas, que pueda haber mayor diversidad en la base de la red trófica, o que la base de la productividad primaria puede ser distinta en las cuevas más profundas. A diferencia del nitrógeno la línea de tendencia es más marcada y tiene un valor de R^2 ($R^2 = 0.75$) más alto (Fig. 20B).

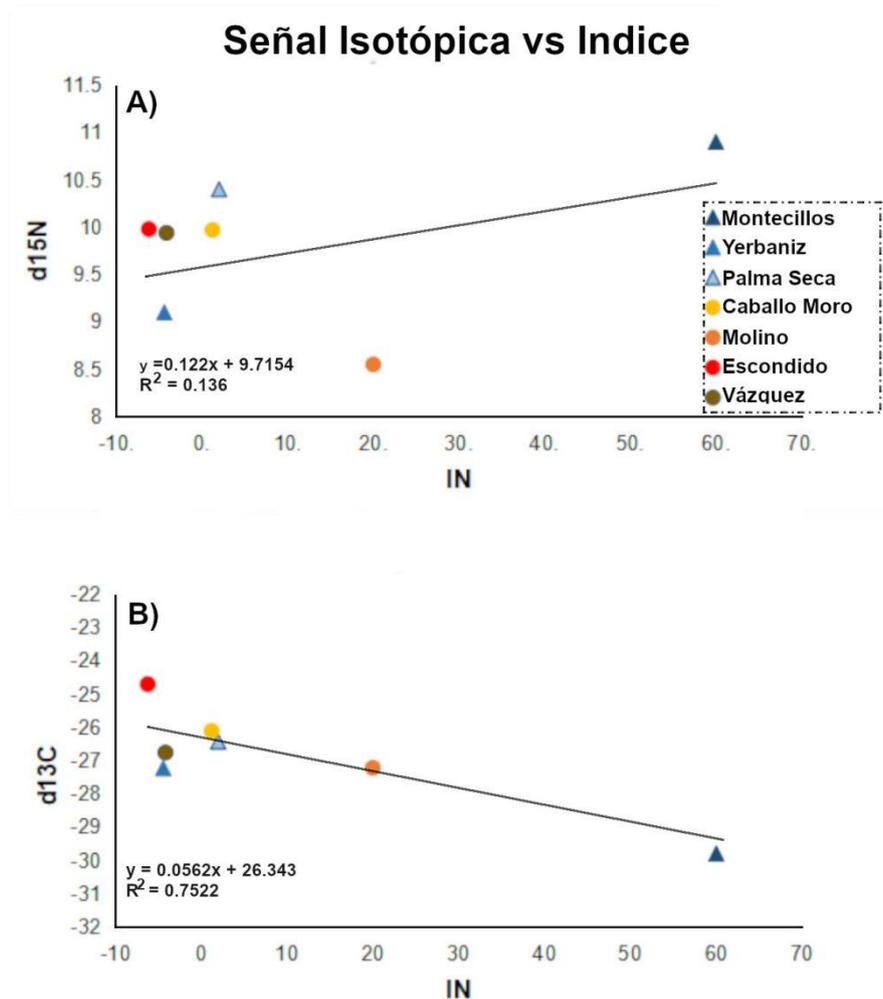


Fig. 20 Regresión lineal de las señales isotópicas y el índice de entrada de nutrientes. En triángulos: las poblaciones de la Sierra de El Abra. En círculos: las poblaciones de la Sierra de Guatemala. A) Señal del nitrógeno. B) Señal del Carbono.

Discusión

Los estudios de isótopos estables de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) y carbono ($\delta^{13}\text{C}$) proporcionan herramientas muy útiles para estimar la estructura de las redes tróficas, pudiendo determinar el nivel o posición trófica y el flujo de carbono y nitrógeno en los consumidores de la red (Post 2002). Los resultados obtenidos en este capítulo nos brindan la primera aproximación para conocer ciertos aspectos de la ecología trófica de las poblaciones de *Astyanax troglóbios* en las cuevas de la Sierra de El Abra y la Sierra de Guatemala.

Determinando la ecología trófica con $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$

A grandes rasgos las señales isotópicas son ligeramente diferentes a nivel de región geográfica y en donde es posible observar una variación entre las señales isotópicas para cada población, teniendo en las cuevas de la Sierra de El Abra las señales más altas de $\delta^{15}\text{N}$ y más bajas de $\delta^{13}\text{C}$. La señal de $\delta^{15}\text{N}$ nos explica la complejidad vertical de la red trófica, mediante la identificación de los niveles tróficos presentes formados por los productores y depredadores (Zanden & Rasmussen, 1999; Post *et al.*, 2002; Bearhop *et al.*, 2004, Layman *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011). En nuestro sistema, la población de Montecillos presentó los valores más altos ($\delta^{15}\text{N} = 10.9$), y Molino los valores más bajos ($\delta^{15}\text{N} = 8.55$). En este sentido se propone que entre niveles tróficos puede haber de 3 - 4 puntos de diferencia (Zanden & Rasmussen, 1999; Post *et al.*, 2002), lo que nos plantea que el nivel trófico de los peces troglobios es similar en las distintas cuevas, sin embargo, la señal isotópica de un consumidor por sí sola generalmente no es suficiente para inferir la posición trófica sin una línea base isotópica apropiada (Zanden & Rasmussen, 1999; Post 2002), que regularmente está conformada por los productores primarios y los consumidores primarios (presas potenciales, ver más en Zanden & Rasmussen, 1999). Se ha reportado con anterioridad que los *Astyanax* troglobios se alimentan principalmente del detritus en las pozas, pero que también son depredadores activos sobre todos en las primeras etapas de su vida, encontrando principalmente microcrustáceos en sus estómagos (Espinasa *et al.*, 2017), proponiendo que en la etapa juvenil ser depredadores activos les permite nutrirse de forma adecuada hasta llegar a ser adultos (Espinasa *et al.*, 2017). Sin embargo, en múltiples expediciones, también se les ha visto ser oportunistas consumiendo animales que caen en las pozas como artrópodos o murciélagos. Por otro lado, los estudios del microbioma de las poblaciones de cuevas (Ornelas-García *et al.* 2018), han sugerido que los peces de cuevas pueden corresponder con hábitos omnívoros. En contraste, otros vertebrados como la salamandra troglobia *Eurycea spelaea*, se alimenta de guano de murciélago y su señal isotópica es más enriquecida a la emitida por el guano, el cual aporta valores nutricionales comparables con presas potenciales de invertebrados (Fenolio *et al.*, 2006). Por lo tanto, aunque sería importante en futuros estudios contemplar la red trófica completa o incluso corroborar las señales isotópicas con contenidos estomacales, pudimos constatar que no hubo diferencias en el nivel trófico entre

cuevas de ambos sistemas, Sierra de El Abra y Sierra de Guatemala en $\delta^{15}\text{N}$. Por otro lado, la señal de $\delta^{13}\text{C}$ nos permite conocer la diversidad en fuentes de carbono en la red trófica (Zanden & Rasmussen, 1999; Post *et al.*, 2002; Bearhop *et al.*, 2004, Layman *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011). Nuestros resultados mostraron ligeras diferencias en la señal de $\delta^{13}\text{C}$ (desde -28.9 en Montecillos hasta -24.7 en Escondido), estos valores son similares a los reportados para material vegetal en otros sistemas kársticos anquihalinos ($\delta^{13}\text{C} = -35$ a -25 , Brakovits *et al.*, 2017), pero difieren de lo reportado para bacterias metanotróficas ($\delta^{13}\text{C} = -75$ a -45 , ver más en Brakovits *et al.*, 2017; Chavés-Solis *et al.*, 2020). Con base en lo anterior, podemos intuir que la fuente principal de carbono en estas cuevas es la materia vegetal que proviene del exterior de las mismas, incluso para las cuevas con mayor profundidad como Vázquez ($\delta^{13}\text{C} = -26.76$, profundidad = 277 mts), siendo esta materia vegetal en descomposición parte de la dieta que ingieren los peces.

Por último, las métricas de Layman nos mostraron que la Sierra de El Abra mostró un tamaño de área de nicho (TA) mayor y menor redundancia trófica (SDNND), en comparación con la Sierra de Guatemala. Estas medidas suelen usarse como una medida cuantitativa del nicho ecológico que ocupa una población (Bearhop *et al.*, 2004, Layman *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011). Para el caso de TA, corresponde con el ancho total del nicho que la población puede explotar, y con base en nuestros resultados, la población de Palmaseca de la región de la Sierra de El Abra (TA = 6.10) es la que presentó el valor más alto, con un fuerte contraste con la población de Vázquez de la Sierra de Guatemala (TA = 0.42). A su vez, Vázquez mostró los valores de similitud general de nicho trófico entre los individuos más bajos (SDNND = 0.22), lo que se puede traducir en que hay una mayor redundancia trófica, y por tanto, determina que la competencia por los recursos para la población podría ser más intensa (Bearhop *et al.*, 2004, Layman *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011).

Señal isotópica y ecomorfología

La asociación entre la divergencia morfológica y la segregación ecológica entre especies cercanamente emparentadas, puede ser considerada como una señal de selección divergente y finalmente especiación ecológica (Schluter, 2001), por lo tanto entender la relación entre la divergencia morfológica y trófica puede dar señales de divergencia adaptativa (Ornelas-García *et al.* 2018). En el presente estudio no se

observó una fuerte correlación entre las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ y la ecomorfología de las poblaciones troglobias. Sin embargo, las tres mediciones ecomorfológicas con el valor de correlación más alto están directamente relacionadas con la adquisición de recursos, estas son la Proyección del hocico (P. Hocico), la longitud del hocico (LHc) y el ancho relativo del hocico (An. Hocico), las cuales pueden mostrar las mayores modificaciones morfológicas en respuesta a la funcionalidad de los peces para adquirir diferentes recursos alimenticios (Villéger *et al.*, 2010; Cordova Tapia y Zambrano, 2016; Ornelas-García *et al.* 2018; Garita Alvarado *et al.* 2018). Estudios de diversidad morfológica trófica en cíclidos africanos, donde se han dado la mayores radiaciones adaptativas, diversas especies simpátricas coexisten los grandes lagos como Malawi y Tanganika y presentan exclusión competitiva por medio de la especialización trófica (Albertson *et al.*, 2005). Esto ha sido posible probarlo al correlacionar los análisis de isótopos estables y de diversidad morfológica, siendo los peces con morfologías similares los que presentan posiciones tróficas similares y viceversa mientras mayor sea la diferencia morfológica mayor será la diferencia en las señales isotópicas (Montaña *et al.*, 2013). En el género *Astyanax* también se ha probado una asociación entre la especiación trófica y los análisis de isótopos estables, entre dos especies simpátricas en el lago Catemaco, Veracruz. Estas son *A. aeneus* y *A. caballeroi*, donde se ha reportado que la divergencia morfológica de los rasgos relacionados con los hábitos tróficos está asociada con la partición de nichos ecológicos, permitiendo la coexistencia de dos especies estrechamente relacionadas y logrando reducir la competencia interespecífica (Ornelas-García *et al.*, 2018). Consideramos que aunque los niveles de correlación de nuestras variables morfológicas son bajos, nos brindan la primera aproximación para conocer la asociación entre la diversidad morfológica de los *Astyanax* troglobios y su posición en los niveles tróficos en las cuevas, aunque aún son necesarios más estudios para conocer más afondo la red trófica de estos ambientes.

Señal isotópica e Índice de entrada de nutrientes

Al no contar con la línea base isotópica adecuada, este índice de entrada de nutrientes (IN) fue propuesto para comprender si las características físicas de las cuevas pueden tener un efecto en las diferencias del enriquecimiento de la señal isotópica para las distintas cuevas. Ya que se ha demostrado con anterioridad que los

atributos físicos de una cueva se correlacionan con la estructura de las comunidades en diversas cuevas tropicales en Brasil (Simões *et al.*, 2015), donde la riqueza específica se correlaciona positivamente con cuevas con entradas amplias, de mayor tamaño y con la presencia de cuerpos o flujos de agua. Los resultados obtenidos encontraron una relación que apunta a que las poblaciones de las cuevas que presentan valores del IN positivos, tienden a tener valores de $\delta^{15}\text{N}$ más enriquecidos en comparación con las poblaciones que tuvieron valores del IN negativos. Esta correlación no fue significativa, pero corresponde con las diferentes características físicas de las cuevas que evaluamos en este estudio, destacando que para valores positivos de IN competen con cuevas cuya distancia de la entrada de la cueva a la poza (DEP) donde habitan los peces, no es muy amplia, por lo que materiales alóctonos que entran por las cuevas no recorren mucha distancia hasta llegar a las pozas. Mientras que para las cuevas que presentaron valores del IN negativos, la distancia desde la entrada (DEP) fue mayor, exponiendo la lejanía del material alóctono a las pozas donde habitan los peces. Además, son cuevas con mayor profundidad (BC), haciendo muy complicado que la entrada de material alóctono llegue hasta las pozas. Mientras que para la señal de $\delta^{13}\text{C}$, la relación fue inversa, esta era menos enriquecida conforme incrementa el valor del IN, lo que nos indica que es posible que una mayor entrada de material vegetal a las cuevas podría afectar este enriquecimiento, siendo las cuevas con mayor distancia desde la entrada (DEP) y profundidad (BC), a las que llegue menos material vegetal. Los hábitats que tienen acceso a recursos por la cercanía con la entrada llegan a tener niveles altos de biodiversidad (Simões *et al.*, 2015). Sin embargo, las cuevas con mayor tamaño también presentan niveles altos de diversidad con una mayor zonación, y para cada zona se pueden encontrar diferentes organismos que presenten altos grados de especialización al modo de vida troglobio (Ferreira, 2000; Culver *et al.*, 2004; Souza-Silva *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2015)

Con base en lo anterior proponemos que la entrada de material alóctono afecta a la dinámica de la ecología trófica de cada cueva, y la cual está dada por el arrastre de material vegetal por las corrientes de agua, la percolación de agua de lluvia y la facilidad de que la fauna pueda acceder a la cueva (White & Culver, 2012), viéndose reflejado en los valores de IN para cada cueva, con valores del IN positivos en Montecillos y Palma seca en la Sierra de El Abra; Molino y Caballo Moro en la

Sierra de Guatemala, mientras que para las cuevas con IN negativos Yerbaniz para la Sierra de El Abra; Escondido y Vázquez para la Sierra de Guatemala, las cuales difieren de manera importante en sus atributos como tamaño, distancia de la entrada a la poza (DEP), y profundidad. Además de las causas mencionadas, es posible que la entrada de nutrientes también pueda ser directamente del manto freático, después de todo, se ha presentado para ambas regiones geográficas patrones hidrológicos complejos que podrían permitir interconexión entre distintas cuevas (Eliot, 2018), estos patrones también se verían afectados en la época de lluvias, cuando suben los niveles de agua de los cuerpos acuáticos exteriores como se han reportado para otras cuevas tropicales (Souza Silva *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2015).

Conclusión

Las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ presentaron diferencias entre las cuevas analizadas, lo que implica que cada una puede presentar una dinámica propia en el ciclo de nutrientes. Las métricas de Layman nos indicaron que las poblaciones de la Sierra de El Abra tienen una mayor área de nicho ecológico y menor redundancia trófica en comparación con las poblaciones de la Sierra de Guatemala. A pesar de las diferencias en las señales isotópicas, nuestros resultados sugieren que el nivel trófico ($\delta^{15}\text{N}$ = de 8.55 a 10.9) y la base de carbono ($\delta^{13}\text{C}$ = de -24.7 a -28.9) entre las poblaciones de *Astyanax* troglobios es similar y por lo tanto no corresponden con diferentes niveles tróficos. No se encontró una correlación entre las señales isotópicas y la ecomorfología, sin embargo, los rasgos morfológicos asociados a la adquisición de recursos fueron los que tuvieron el valor de correlación más alta con la señal de $\delta^{15}\text{N}$. Por último, las señales isotópicas pueden verse afectadas por las características físicas de las cuevas, destacando aspectos como la profundidad y la distancia de la entrada a la poza de los organismos, lo que puede alterar directamente la entrada de nutrientes a cada cueva. Se considera que más estudios son necesarios para conocer las redes tróficas, así como su interacción con las características hidrogeológicas de cada cueva, así como una comparación con la ecología de sus homólogos de superficie y de este modo entender el impacto de los aspectos ecológicos en la evolución de estos peces.

Bibliografía

- Albertson, R. C., Streelman, J. T., Kocher, T. D., & Yelick, P. C. (2005). Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16287–16292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506649102>
- Bearhop, S., Adams, C. E., Waldron, S., Fuller, R. A., & Macleod, H. (2004). Determining trophic niche width: A novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73(5), 1007–1012. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00861.x>
- Boecklen, W. J., Yarnes, C. T., Cook, B. A., & James, A. C. (2011). On the use of Stable Isotopes in trophic ecology. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(4), 11–40.
- Brankovits, D., Pohlman, J. W., Niemann, H., Leigh, M. B., Leewis, M. C., Becker, K. W., Iliffe, T. M., Alvarez, F., Lehmann, M. F., & Phillips, B. (2017). Methane-and dissolved organic carbon-fueled microbial loop supports a tropical subterranean estuary ecosystem. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01776-x>
- Chávez-Solís, E. M., Solís, C., Simões, N., & Mascaró, M. (2020). Distribution patterns, carbon sources and niche partitioning in cave shrimps (Atyidae: Typhlatya). *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69562-2>
- Córdova-Tapia, F., & Zambrano, L. (2016). Fish functional groups in a tropical wetland of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Neotropical Ichthyology*, 14(2). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150162>
- De Niro, M. J., & Epstein, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45, 341–351.
- Dunne, J. A., Williams, R. J., & Martinez, N. D. (2002). Food-web structure and network theory: the role of connectance and size. *PNAS*, 99, 12917–12922.
- Engel, A. S. (2012). Microbes. In B. W. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (Second, pp. 490–499). Academic Press of Elsevier.
- Espinasa, L., Bonaroti, N., Wong, J., Pottin, K., Queinnec, E., & Rétaux, S. (2017). Contrasting feeding habits of post-larval and adult *Astyanax* cavefish. *Subterranean Biology*, 21(1), 1–17. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.21.11046>
- Fenolio, D. B., Graening, G. O., Collier, B. A., & Stout, J. F. (2006). Coprophagy in a cave-adapted salamander; the importance of bat guano examined through nutritional and stable isotope analyses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1585), 439–443. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3341>
- Ferreira, R. L., Martins, R. P., & Yanega, D. (2000). Ecology of bat guano arthropod communities in a Brazilian dry cave. In *Ecotropica* (Vol. 6, Issue 2, pp. 105–116).
- Garita-Alvarado, C. A., Barluenga, M., & Ornelas-García, C. P. (2018). Parallel evolution of morphs of *Astyanax* species (Teleostei: Characidae) in México and Central America. *Biological Journal of the Linnean Society*, 124(4), 706–717. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly082>

- González, I., Déjean, S., Martin, P. G. P., & Baccini, A. (2008). CCA: An R package to extend canonical correlation analysis. *Journal of Statistical Software*, 23(12), 1–14.
<https://doi.org/10.18637/jss.v023.i12>
- Howarth, F. G. (1983). Ecology of cave arthropods. *Annual Review of Entomology*, 28, 365–389.
- Jackson, A. L., Inger, R., Parnell, A. C., & Bearhop, S. (2011). Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*, 80(3), 595–602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01806.x>
- Kováč, Ľ. (2018). Caves as Oligotrophic Ecosystems. In O. T. Moldovan, Ľ. Kováč, & S. Halse (Eds.), *Cave Ecology* (pp. 297–308). Springer International Publishing.
- Layman, C. A., & Post, D. M. (2008). Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? reply. *Ecology*, 89(8), 2358–2359. <https://doi.org/10.1890/08-0167.1>
- Moldovan, O. T., Editors, S. H., & Caldwell, M. M. (2018). *Cave Ecology* (O. T. Moldovan, Ľ. Kováč, & S. Halse (eds.)). Springer International Publishing.
- Moldovan, O. T., Kováč, Ľ., & Halse, S. (2018). Preamble. In O. T. Moldovan, Ľ. Kováč, & S. Halse (Eds.), *Cave Ecology* (Vol. 235, pp. 1–5). Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-98852-8>
- Montaña, C. G., & Winemiller, K. O. (2013). Evolutionary convergence in Neotropical cichlids and Nearctic centrarchids: Evidence from morphology, diet, and stable isotope analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(1), 146–164. <https://doi.org/10.1111/bij.12021>
- Ornelas-García, C. P., Córdova-Tapia, F., Zambrano, L., Bermúdez-González, M. P., Mercado-Silva, N., Mendoza-Garfias, B., & Bautista, A. (2018). Trophic specialization and morphological divergence between two sympatric species in Lake Catemaco, Mexico. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4867–4875. <https://doi.org/10.1002/ece3.4042>
- Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 293–320.
- Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83, 703–718.
- Poulson, T. L., & Lavoie, K. H. (2000). The trophic basis of subsurface ecosystems. In H. Wilkens, D. C. Culver, & S. Halse (Eds.), *Subterranean ecosystems* (First, pp. 231–249). Academic Press of Elsevier.
- Romero, A. (2009). *Cave Biology: Live in Darkness* (A. Romero (ed.)). Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511596841>
- Rouch, R. (1987). Sur l'écologie des eaux souterraines dans la karst. *Stygologia*, 2(4).
- Sarbu, S. M., Kane, T. C., & Kinkel, B. F. (1996). A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 272(5270).
- Schneider, K., & Culver, D. C. (2004). Estimating subterranean species richness using intensive sampling and rarefaction curves in a high density cave region in West Virginia. *Journal of Cave and Karst Studies*, 66(2), 39–45.
- Silva, M. S., ins, R. P. M., & Ferreira, R. L. (2011). Trophic dynamics in a neotropical limestone cave. *Subterranean Biology*, 9(1), 127–138. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.9.2515>

- Simões, M. H., Souza-Silva, M., & Ferreira, R. L. (2015). Cave physical attributes influencing the structure of terrestrial invertebrate communities in Neotropics. *Subterranean Biology*, 16, 103–121. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.16.5470>
- Simon, K. S. (2012). Cave ecosystems. In B. W. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (Second, pp. 99–103). Academic Press of Elsevier.
- Simon, K. S., Benfield, E. F., & Macko, S. A. (2003). Food web structure and the role of epilithic films in cave streams. *Ecology*, 84(9).
- Vander Zanden, M. J., & Rasmussen, J. B. (1999). Primary consumer ($\delta^{13}\text{C}$) and ($\delta^{15}\text{N}$) and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology*, 80(4), 1395–1404.
- Venarsky, M. P., & Hunstman, B. M. (2018). Food webs in Caves. In O. T. Moldovan, L. Kováč, & S. Halse (Eds.), *Cave Ecology* (pp. 309–328). Springer International Publishing.
- Villéger, S., Miranda, J. R., Hernández, D. F., & Mouillot, D. (2010). Contrasting changes in taxonomie vs. functional diversity of tropical fish communities after habitat degradation. *Ecological Applications*, 20(6), 1512–1522. <https://doi.org/10.1890/09-1310.1>
- White, B. W. (1988). *Geomorphology and hydrology of karst terrains* (First). Oxford University Press.
- White, B. W., & Culver, D. C. (2012). Cave, Definition of. In B. W. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (Second, pp. 103–107). Academic Press of Elsevier. www.elsevier.com
- White, B. W., & Culver, D. C. (2012). *Encyclopedia of Caves* (B. W. White & D. C. Culver (eds.); Second). Academic Press of Elsevier. www.elsevier.com
- William R, E. (2018). *The Astyanax caves of México: cavefish of Tamaulipas, San Luis Potosí and Guerrero* (First). Association for Mexican cave studies.

CAPÍTULO III: Procesos que afectan la evolución morfológica

Introducción

Es posible examinar la evolución de un organismo a través del estudio de sus características, como sus secuencias de DNA, RNA y sus proteínas, sus vías bioquímicas, el desarrollo embriológico, las características anatómicas, comportamiento, historias de vida e interacciones inter e intra específicas (Futuyma & Kirkpatrick, 2017). Para el caso de la evolución morfológica, la interacción entre la forma y función de los organismos puede promover o limitar la evolución de nuevas características (Wake, 1982). Bajo este contexto, se han identificado diferentes procesos que pueden promover el cambio evolutivo, destacando los siguientes: 1) el uso y competencia por los recursos, que a menudo afectan o incluso determinan las fuentes de la selección natural en rasgos morfológicos (Myers, 1988; Scoville *et al* 2010; Wagner & Altenberg, 1996); 2) la distribución geográfica (Wainwright, 1988; Klingenberg y Ekau, 1995); 3) la inercia filogenética de los organismos; 4) la asimetría fluctuante (Valen, 1982), 5) y la modularidad (Wagner y Altenberg, 1996). En particular en nuestro estudio estamos interesados en identificar los diferentes procesos que pueden afectar la evolución morfológica en *Astyanax mexicanus*, un pez de la familia characidae que presenta dos morfotipos, uno asociado a la vida de superficie y otro adaptado a la vida cavernícola denominado troglobio. Estos peces han tenido al menos dos eventos de invasión a las cuevas, originando dos linajes genéticos (Wilkins, 1988; Ornelas García *et al.*, 2008; Herman *et al.*, 2018) que han tenido que evolucionar en condiciones ambientales extremas (oscuridad perpetua, diferencias en temperatura, corriente, oxigenación, etc.; Whiter & Culver, 2012). De este modo, la evolución modular, así como las restricciones impuestas por la historia evolutiva, podrían afectar la adaptación de los dos linajes del género *Astyanax* a la vida cavernícola.

Modularidad

La evolución modular o modularidad, se ha propuesto como un mecanismo que promueve la divergencia adaptativa ya que permite la variación independiente de

diferentes unidades anatómicas, denominadas módulos (Wagner & Altenberg, 1996). Los módulos son un conjunto de características que están fuertemente integradas entre sí y varían de otros conjuntos en el plano corporal de un organismo, siendo el concepto contrario la integración, que se refiere a una fuerte correlación uniforme de todas las características en el plano corporal (Wagner & Altenberg, 1996; Klingenberg, 2009; 2014). Por lo tanto, aunque los organismos responden de manera integrada a las presiones de selección, las señales ambientales pueden afectar de manera diferencial (modular) el cambio morfológico (Cardini & Elton, 2008). La evolución modular puede darse en diferentes niveles: estático, genético, funcional, ambiental, de biología del desarrollo y evolutivo, y en cualquiera de los niveles se estudia en conjunto con la integración (Klingenberg, 2009; 2014).

Las grandes radiaciones en los cíclidos africanos han sido un buen modelo para los estudios de evolución modular. En particular la fusión de los últimos arcos faríngeos, constituyendo las placas faríngeas, las cuales se han sugerido como un ejemplo de evolución modular (Hulseley *et al.*, 2019) así como módulos entre la región preorbital y postorbital del cráneo (Albertson *et al.*, 2003; 2005; Cooper *et al.*, 2010; Parsons *et al.*, 2011). En este sentido se ha sugerido que la modularidad puede ser una “innovación clave” para estos peces, donde las mandíbulas orales pueden modificarse en función a los distintos hábitos tróficos, teniendo una influencia en la tasa y dirección de la divergencia adaptativa (Parsons *et al.*, 2011). En los carácidos, se ha estudiado la presencia de evolución modular en dos especies lacustres hermanas, *Astyanax aeneus* y *A. caballeroi*, las cuales se diferencian por sus hábitos tróficos, en el Lago Catemaco, Veracruz, donde se probaron diferentes hipótesis de modularidad, siendo las mejores soportadas las que dividían el cráneo entre la región pre y post orbital, así como a la cabeza del resto del cuerpo (Ornelas-García *et al.*, 2017). Estas hipótesis modulares sugirieron que la presencia de estos módulos en el cráneo y el cuerpo podría tener un papel en la segregación trófica y de locomoción entre las dos especies (Ornelas-García *et al.*, 2017). En el presente estudio, consideramos que el morfotipo troglobio y de superficie de *Astyanax mexicanus* pueden mostrar patrones de evolución modular que podrían facilitar su adaptación a las cuevas, de forma similar a lo que se ha reportado en otros procesos de divergencia adaptativa entre especies lacustres del género *Astyanax*.

Señal filogenética

La señal filogenética describe una tendencia (patrón) de los organismos relacionados evolutivamente a parecerse entre sí, sin ninguna implicación en cuanto al mecanismo que podría causar tal semejanza (Blomberg *et al.*, 2003; Revell *et al.*, 2008; Adams, 2014), en otras palabras, describe la dependencia estadística entre los valores de las características de las especies debido a su covarianza filogenética (Revell *et al.*, 2008). Esta covarianza se define como el promedio de los valores de alguna característica de los diferentes organismos que conforman el grupo, cada uno es medido como una desviación de la “media filogenética” para dicha característica. Esta media filogenética equivale al estado ancestral en el nodo raíz de la filogenia y, por lo tanto, también el valor esperado para el fenotipo bajo un modelo evolutivo (Rohlf, 2001; Revell *et al.*, 2008). Es común equiparar una fuerte señal filogenética como una señal de conservadurismo evolutivo, lo que implica bajas tasas de cambios evolutivos entre los organismos que componen la filogenia (*e.g.*, Zanne *et al.*, 2005; Ossi & Kamilar, 2006; Swenson *et al.*, 2007). Por el contrario, una baja señal filogenética hace referencia a la labilidad evolutiva dentro del grupo, que se relaciona con cambios evolutivos rápidos, pero sin especificar en un proceso que esté implicado, como la deriva genética o la selección natural (*e.g.*, Gittleman *et al.*, 1996; Blomberg *et al.*, 2003; Rheindt *et al.*, 2004; Silvertown *et al.*, 2006).

El presente capítulo tiene como objetivo evaluar la presencia de dos procesos que afectan la evolución morfológica en el complejo *Astyanax*, a nivel de linaje y morfotipo asociado al ambiente. Por un lado, se evaluó la modularidad como el proceso que promueve esta evolución en la forma del cuerpo y de la cabeza, planteando una serie de hipótesis *a priori* que nos permitieron conocer los diferentes grados de modularidad e integración presentes. Y, a su vez, se evaluó la señal filogenética de la forma para estimar la limitación de la evolución morfológica para la forma del cuerpo y de la premaxila, utilizando la filogenia resuelta más reciente para la determinación de la covarianza filogenética con los rasgos morfológicos multivariados.

Métodos

Modularidad

Se buscó evidencia de evolución modular en *Astyanax mexicanus* entre morfotipos asociados al ambiente (i.e. troglobios vs. superficie) y la interacción linaje-morfotipo (i.e. viejo troglobio y superficie vs Nuevo troglobio y superficie). Utilizando dos marcos morfológicos: la forma del cuerpo (n = 216, 12 landmarks homólogos y una curva con 15 pseudolandmarks), ya la forma de la cabeza (n = 90, 14 landmarks homólogos y dos curvas, la dorsal con 8 *pseudolandmarks* y la ventral con 9 pseudolandmarks; ver Fig. 21).

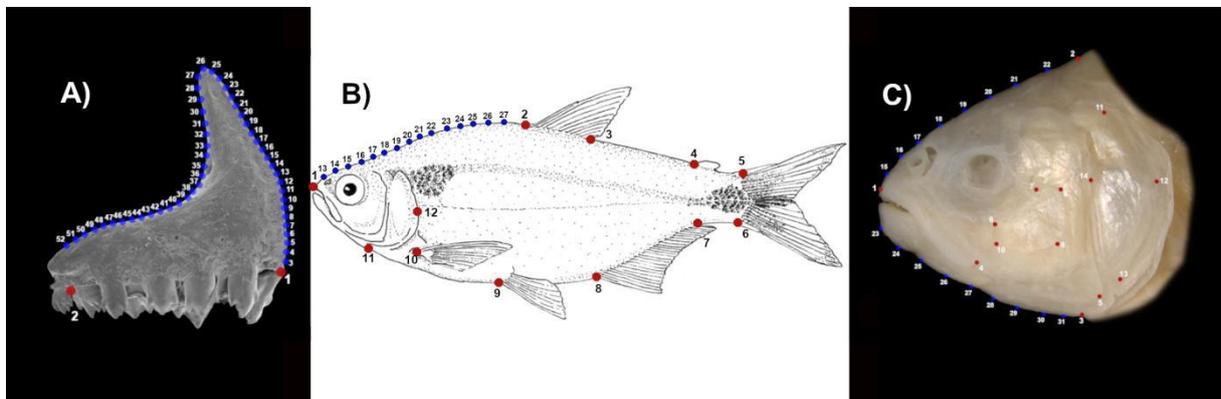


Fig. 21 Los diferentes marcos morfológicos utilizados para los análisis de modularidad y señal filogenética de la forma. A) forma de la premaxila, B) forma del cuerpo, C) forma de la cabeza

Con estos datos morfométricos se propusieron cuatro hipótesis *a priori* con base en criterios anatómicos y funcionales, tres para la forma del cuerpo y una para la forma de la cabeza (Fig. 22 y tabla 14), utilizando la covariación entre los rasgos que delimitan una estructura o módulo como criterio para evaluar la modularidad. Las hipótesis se analizaron con el coeficiente de la tasa de covarianza (CR) propuesto por Adams (2016), el cual, se calcula mediante las covarianzas pareadas entre variables, dentro y entre los diferentes módulos. Este método no es sensible al tamaño de la muestra, el número de variables que componen los marcos morfológicos o el número de hipótesis propuestas, lo cual provee una cuantificación robusta para la fuerza de asociación entre los módulos (Adams, 2016; Randau & Goswami, 2017; Felice *et al.*, 2019; Adams & Collyer, 2019). El valor de CR obtenido va de 0 a algún valor positivo, mientras más bajo sea el valor de CR hay una mayor fuerza de asociación modular, por lo que la correlación de las variables entre módulo es mayor y menor con

respecto a los módulos restantes. Si los valores son altos, o superiores a 1, generalmente nos indican que el nivel de integración es alto, por lo tanto no hay modularidad, siendo la hipótesis nula que hay integración, mientras que la alternativa es que hay modularidad (Adams, 2016; Adams & Collyer, 2019). Para comparar las hipótesis de modularidad propuestas, nos apoyamos en la biblioteca *geomorph* en el programa R ver. 3.6.1, con base en el método desarrollado por Adams (2016; Adams & Collyer, 2019). A fin de considerar el efecto por el tamaño de los organismos, se corrigieron los datos por alometría, calculando los residuales de la regresión de la forma sobre el tamaño del centroide (CS), con la función “*procD.lm*”. Una vez obtenidos los residuales se creó una forma libre de alometría, usando estos residuales y la forma consenso de los datos morfológicos. Sobre esta forma libre de alometría se hicieron los análisis. Primero, se definieron los módulos utilizando la función “*define.modules*” y la comparación de las hipótesis se llevó a cabo con la función “*modularity.test*”, con 1000 permutaciones.

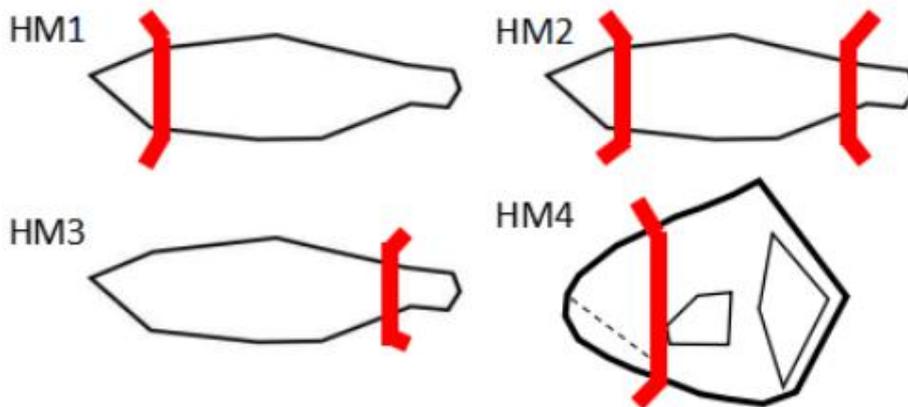


Fig. 22 Representación gráfica de las hipótesis de modularidad evaluadas. Los detalles de los módulos se pueden leer en la tabla 14.

Tabla 14. Descripción anatómica de las diferentes hipótesis de modularidad propuestas. Los corchetes definen a los landmarks que componen los distintos módulos. a) Ornelas-García *et al.* 2017, b) Franchini *et al.*, 2014, c) Yoffe *et al.*, 2020 y d) Parsons *et al.*, 2011.

Hipótesis	Descripción
HM1: Cabeza vs. Cuerpo [1,11,12,13,14,15,16,17,18] [2,3,4,5,6,7,8,9,10,19,20,21,22,23,24,25,26,27]	La cabeza como una unidad independiente del resto del cuerpo. La cabeza se asocia a la adquisición de los recursos alimenticios, y el cuerpo con la locomoción (a,b).

Tabla 14. (Continuación) Descripción anatómica de las diferentes hipótesis de modularidad propuestas. Los corchetes definen a los landmarks que componen los distintos módulos. a) Ornelas-García *et al.* 2017, b) Franchini *et al.*, 2014, c) Yoffe *et al.*, 2020 y d) Parsons *et al.*, 2011.

<p>HM2: Cabeza vs. Cuerpo vs. Caudal</p> <p>[1,11,12,13,14,15,16,17,18]</p> <p>[2,3,8,9,10,19,20,21,22,23,24,25,26,27]</p> <p>[4,5,6,7]</p>	<p>Los tres módulos propuestos se asocian con diferentes características funcionales: La cabeza con la adquisición de recursos tróficos; el cuerpo con nado y maniobrabilidad; y la caudal con nado y propulsión. Además, para las formas de cueva se ha reportado diferencias en la distribución y abundancia de neuromastos tanto la cabeza, como la región caudal (a, c).</p>
<p>HM3: Cuerpo vs. Caudal</p> <p>[1,2,3,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27]</p> <p>[4,5,6,7]</p>	<p>Se propone a la cabeza y el cuerpo como una unidad integrada, distintas de la región caudal asociada al nado y propulsión en respuesta a las diferentes características físicas de los ambientes contrastantes (a,c).</p>
<p>HM4: Preorbital vs. Postorbital</p> <p>[1,4,15,16,17,18,23,24,25,26,27,28]</p> <p>[2,3,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,19,20,21,22,29,30,31]</p>	<p>La zona preorbital es la que se relaciona directamente con la adquisición de alimento (e.g. longitud del hocico). Diversos trabajos proponen que esta región puede presentar modificaciones independientes durante radiaciones adaptativas (a,d).</p>

Señal filogenética

Para estimar la señal filogenética de la forma se utilizó el método de la K de Blomberg modificado por Adams para variables complejas (Adams, 2014). El valor de K obtenido es mayor a 0, siendo dichos valores proporcionales a la señal filogenética, por lo que los valores cercanos a 0 indican una señal filogenética baja o débil, mientras que los valores más altos indican señales fuertes (Blomberg *et al.*, 2003; Revell *et al.*, 2008; Adams, 2014). El valor de K se estima con la media de los errores cuadrados de la señal filogenética observados (MSEO) y la media de los errores cuadrados medios esperados bajo un modelo de evolución Browniana (MSE), dividiendo los valores observados por los esperados ($K = \text{MSEO}/\text{MSE}$; ver Blomberg *et al.*, 2003). Se espera que bajo un modelo de evolución Browniana, el valor de K sea de 1 ($K = 1$; Blomberg *et al.*, 2003; Adams, 2014). La K Blomberg provee una medida de señal filogenética robusta debido a que si las terminales del árbol utilizado

están estructuradas de manera jerárquica de forma consistente, los valores de MSEO serán relativamente grandes, mientras que los valores de MSE serán pequeños y el valor de K obtenido (la señal filogenética) será alto. Por otro lado, si la estructura de las terminales del árbol no es muy consistente, se obtiene que los valores de MSEO son relativamente pequeños, los valores de MSE son altos y el valor de K (señal filogenética) es baja (ver Blomberg *et al.*, 2003; Revell *et al.*, 2008).

Se evaluó la señal filogenética de la forma del cuerpo (12 landmarks homólogos y una curva con 15 pseudolandmarks, Fig. 21) y de la premaxila (2 landmarks homólogos y una curva con 50 pseudolandmarks, Fig. 21), utilizando la filogenia resuelta por medio de RADseq y genomas completos por Garduño-Sánchez (2021). Se trabajó con un subconjunto de datos de los organismos de los que se tenían datos morfológicos y genéticos. Primero se redujo el árbol filogenético, removiendo las terminales de las que no teníamos información morfológica utilizando el programa Mezquite ver. 3.61. El árbol resultante consiste de 13 terminales (Fig. 23), por lo que, con ayuda del programa TPSUtil, se generó una forma consenso para cada una de ellas, utilizando como criterio los resultados moleculares y las regiones hidrogeológicas propuestas por Elliott (2018), agrupando para algunas terminales más de una población (tabla 15). Para estimar la señal filogenética de la forma se trabajó con la biblioteca *geomorph* en el programa R ver. 3.6.1. usando la función “*physignal*” con 1000 permutaciones. Y, se utilizó la función “*gm.prcomp*” que realiza un análisis de componentes principales filogenéticos (PCAPhy por sus siglas en inglés) con la información genética y morfológica, permitiéndonos visualizar de forma gráfica estos resultados.

Tabla 15. Grupos obtenidos a partir de las terminales de la filogenia de RADseq y genomas completos. En la columna de derecha, las poblaciones que componen dichos grupos, de las cuales se tiene tanto la información morfológica como la molecular.

Grupo Genético	Poblaciones que los componen
Peroles	Peroles. Peces de superficie
Rascón	Rascón. Peces de superficie
Grupo Chica	Componen las poblaciones al sur de la sierra del Abra, San Luis Potosí: que habitan en las cuevas de Chiquitita, Chica y Toro.

Tabla 15. (Continuación) Grupos obtenidos a partir de las terminales de la filogenia de RADseq y genomas completos. En la columna de derecha, las poblaciones que componen dichos grupos, de las cuales se tiene tanto la información morfológica como la molecular.

Grupo Sabinos	Compone las poblaciones de la zona centro-sur de la sierra el Abra, San Luis Potosí: que habitan en las cuevas de Tinaja, Sabinos, Jos, Montecillos, Palma-Seca, Piedras y Tigre. Poblaciones troglobias del linaje viejo.
Grupo Yerbaniz	Compone las poblaciones de la zona centro-norte de la sierra el Abra, San Luis Potosí: que habitan en las cuevas de Japonés y Yerbaniz.
Pachón	Se compone de la población de Pachón al norte de la sierra el Abra, San Luis Potosí.
Santa Anita	Santa Anita. Peces de superficie
Vázquez	Compone de la población del Sótano de Vázquez, en la región de Chamal-ocampo en la Sierra de Guatemala, Tamaulipas.
Caballo Moro	Compone de la población del Sótano de Caballo Moro, en la región de Chamal-ocampo en la Sierra de Guatemala, Tamaulipas.
Grupo Escondido	Compone de la población del Sótano de Escondido, en la región de Gómez-Farías en la Sierra de Guatemala.
Grupo Molino	Se compone de las poblaciones Molino y Jineo, en la región de Gómez-Farías en la Sierra de Guatemala.
Subterráneo	Río Subterráneo, en la región de Micos, en la sierra de la Colmena, San Luis Potosí.
Grupo Superficie nuevo	Lo componen poblaciones de superficie del linaje nuevo: Río Sabinas, Nacimiento del río Mante y río Florido.

Resultados

Modularidad

Encontramos evidencia de evolución modular en 3 de las 4 hipótesis propuestas para el complejo *Astyanax mexicanus*, siendo la hipótesis modular 3 (HM3) la que no es significativa, esta es una hipótesis que divide al organismos en la región caudal vs. el resto del cuerpo, bajo criterios anatómicos y funcionales (ver tabla 16), lo que nos indica que el cuerpo de los *Astyanax* puede tener hasta 3 módulos independientes y la cabeza se divide en dos módulos. En los resultados a nivel de morfotipo, ambos morfotipos presentan modularidad en 3 de las 4 hipótesis, pero, difieren en las hipótesis que son significativas. Por un lado, para el morfotipo Troglobio la HM3 es la

que no es significativa. Con respecto al morfotipo de Superficie, es la HM1 (cabeza vs cuerpo) la que no presentó valores significativos (tabla 16). Al profundizar a nivel de linajes-morfotipo, para el grupo Troglobio los resultados son consistentes con los obtenidos anteriormente para el grupo, los dos linajes presentan evidencia de evolución modular en 3 de las 4 hipótesis (tabla 16) y es la HM3 la que no es significativa. Los linajes del morfotipo de superficie sí mostraron diferencias en la evolución modular, de acuerdo con las hipótesis que fueron significativas. Para el linaje viejo de superficie la HM1 es la que no es significativa, y para el linaje nuevo, es la HM3 la que no presenta evidencias de evolución modular (tabla 16).

Tabla 16. Resultados de los análisis de modularidad con el coeficiente de covarianza. Los valores resaltados en negritas y con un * son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Complejo <i>Astyanax mexicanus</i>	CR	Intervalos de confianza 95%		Valor de p
		Mínimo	Maximo	
HM1	0.9016	0.8733	0.9382	0.024*
HM2	0.936	0.8623	0.9639	0.033*
HM3	1	0.8673	1.0387	0.264
HM4	0.8224	0.7841	0.9154	0.001*

Morfotipo Troglobio				
HM1	0.8971	0.8653	0.9471	0.017*
HM2	0.9139	0.8914	0.9546	0.014*
HM3	0.9612	0.9099	1.0187	0.109
HM4	0.8224	0.7841	0.9154	0.001*

Troglbio Viejo				
HM1	0.8876	0.847	0.9578	0.002*
HM2	0.9024	0.8735	0.9621	0.007*
HM3	0.9442	0.8883	1.017	0.07
HM4	0.8746	0.8195	0.9696	0.002*

Troglbio Nuevo				
HM1	0.9198	0.8685	1.0006	0.03*
HM2	0.9513	0.9091	1.0257	0.03*
HM3	1.0162	0.9588	1.0786	0.207

HM4	0.7254	0.6695	0.9592	0.001*
-----	--------	--------	--------	---------------

Tabla 16. Resultados de los análisis de modularidad con el coeficiente de covarianza. Los valores resaltados en negritas y con un * son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Morfortipo Superficie				
HM1	0.9221	0.8743	0.9805	0.088
HM2	0.81	0.7264	0.9596	0.005*
HM3	0.7583	0.5951	1.0151	0.015*
HM4	0.7464	0.7078	0.8894	0.001*
Superficie Viejo				
HM1	0.9598	0.9092	1.0771	0.521
HM2	0.7785	0.7348	1.1072	0.028*
HM3	0.6506	0.5771	1.1208	0.029*
HM4	0.8829	0.8037	1.0063	0.002*
Superficie Nuevo				
HM1	0.9146	0.8686	0.9961	0.014*
HM2	0.9051	0.8636	0.9933	0.013*
HM3	0.9357	0.8435	1.0618	0.07
HM4	0.8243	0.7803	0.9637	0.001*

De manera general, las hipótesis que muestran una mayor fuerza entre los módulos para la forma del cuerpo son distintas en los morfotipos. Para el morfotipo Troglobio, es la HM1, la que tiene los valores de CR más bajos ($CR = 0.8971$) y por lo tanto, mayor fuerza de asociación dentro de los módulos, esta hipótesis divide al organismo en la cabeza vs. resto del cuerpo, estos resultados son concordantes en ambos linajes del morfotipo troglobio. En contraste, el morfotipo de superficie tiene los valores de CR más bajos en la HM 3 ($CR = 0.7583$), que divide al cuerpo en La región Caudal vs. el resto del cuerpo, sin embargo, estos resultados cambian en el linaje nuevo de superficie, donde es la HM2 (que divide al cuerpo en tres módulos: cabeza vs. cuerpo vs. región caudal) la que tiene el CR más bajo ($CR = 0.9051$) y mayor fuerza de asociación. En todos los grupos evaluados, la HM4 (preorbital vs. el post-orbital) presenta valores de CR más bajos que los del cuerpo, con excepción

del linaje nuevo de superficie (tabla 16). Estos resultados nos muestran que la evolución morfológica en el complejo *Astyanax mexicanus* se puede suscitar de forma modular, siendo los módulo de la cabeza los más propensos a evolucionar o modificarse más rápidamente con respecto a otros módulos.

Señal filogenética

En la filogenia resultante podemos observar una separación clara en dos grupos, haciendo referencia a los dos linajes reportados dentro del complejo *Astyanax mexicanus* (ver Fig. 23). En la zona inferior del árbol encontramos a las poblaciones asociadas al linaje viejo, que habitan en la Sierra El Abra, teniendo un total de seis poblaciones, de las cuales, cuatro pertenecen a las cuevas (grupo Chica, grupo Sabino, grupo Yerbaniz y Pachón) y dos son de superficie (Rascón y Peroles). Mientras que en la zona superior tenemos a las poblaciones asociadas con el linaje nuevo, que habitan en la Sierra de Guatemala y la Colmena, siendo siete poblaciones, de las cuales, cinco son troglobias (Guatemala: Caballo Moro, Vázquez, Escondido y Molino, la Colmena: Subterráneo) cuevas y dos de superficie (Santa Anita y grupo de superficie linaje nuevo).

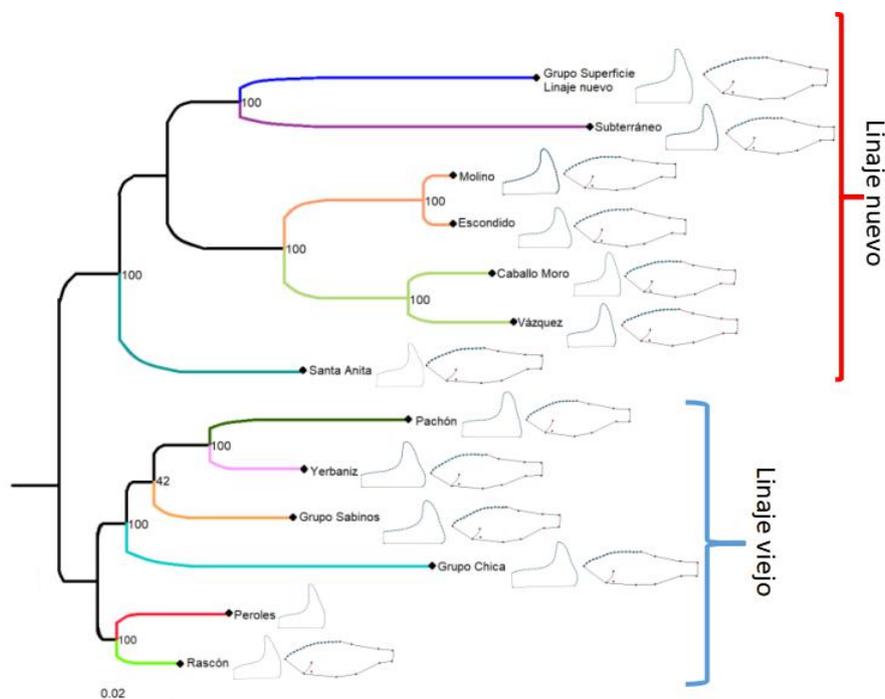


Fig. 23 Filogenia obtenida a través de datos genómicos (i.e. RadSeq y WGS, Garduño-Sánchez, 2021). En dicha filogenia se recuperan en dos linajes genéticos distintos. En la rama terminal de cada grupo se colocó la forma consenso correspondiente a ese grupo, tanto para la premaxilla como la forma del cuerpo.

De acuerdo con los resultados obtenidos no hay señal filogenética en la forma del cuerpo, obteniendo un valor de K bajo y un valor de p que no fue significativo ($K = 0.576$, $p = 0.338$; ver Fig. 24A). Pero, sí hay señal filogenética en la forma de la premaxila, teniendo un valor de K más alto y un valor de p que sí fue significativo ($K = 0.824$, $p = 0.042$; ver Fig. 24B). Ambos resultados están por debajo del valor de k esperado bajo un modelo de distribución browniana ($k = 1$). Esto nos indica que diferentes rasgos morfológicos dentro del complejo pueden tener un mayor conservadurismo evolutivo con respecto a otros, siendo congruentes con los resultados de modularidad.

PCA filogenético

Para la forma del cuerpo, en los dos primeros componentes principales se explica el 62.61% de varianza acumulada, siendo el primer componente el que explica un mayor porcentaje (PC1 = 39.25). Como se puede observar en el filomorfoespacio las poblaciones más cercanas filogenéticamente no son cercanas en el morfoespacio de la forma del cuerpo, sino que las poblaciones troglobias están más cercanas entre sí con respecto a las poblaciones de superficie de su mismo linaje (Fig. 23A). Respetando los resultados de que no existe una señal filogenética de acuerdo con el valor de $K_{mult} = 0.576$ y de $p = 0.338$ ($H_0 =$ no señal filogenética en la forma). Por tanto la forma del cuerpo ha evolucionado de manera plástica en ambos linajes en respuesta a las presiones ambientales ejercidas por las cuevas y el medio de superficie.

En el caso de la premaxila, los dos primeros componentes explican 86.39% de la varianza acumulada, siendo el PC1 el que más porcentaje explica (75.38%). En el filomorfoespacio se puede apreciar una separación por el linaje para las poblaciones troglobias. Mientras que para el caso de las poblaciones de superficie, se agrupan entre sí independientemente de su linaje, estando más cercanas con el linaje nuevo troglobio (Fig 23B). Aunado al resultado de que si hay una señal filogenética de acuerdo con el valor de $K_{mult} = 0.824$ y de $p = 0.042$ ($H_a =$ Si hay señal filogenética en la forma), esto nos indica que la forma de la premaxila del linaje nuevo troglobio es similar a la del grupo de superficie, lo que nos permite plantear que tiene un mayor

conservadurismo evolutivo con respecto a la forma del cuerpo, pudiendo verse afectado por su rol ecológico o por el tiempo que lleve el linaje nuevo en la cueva.

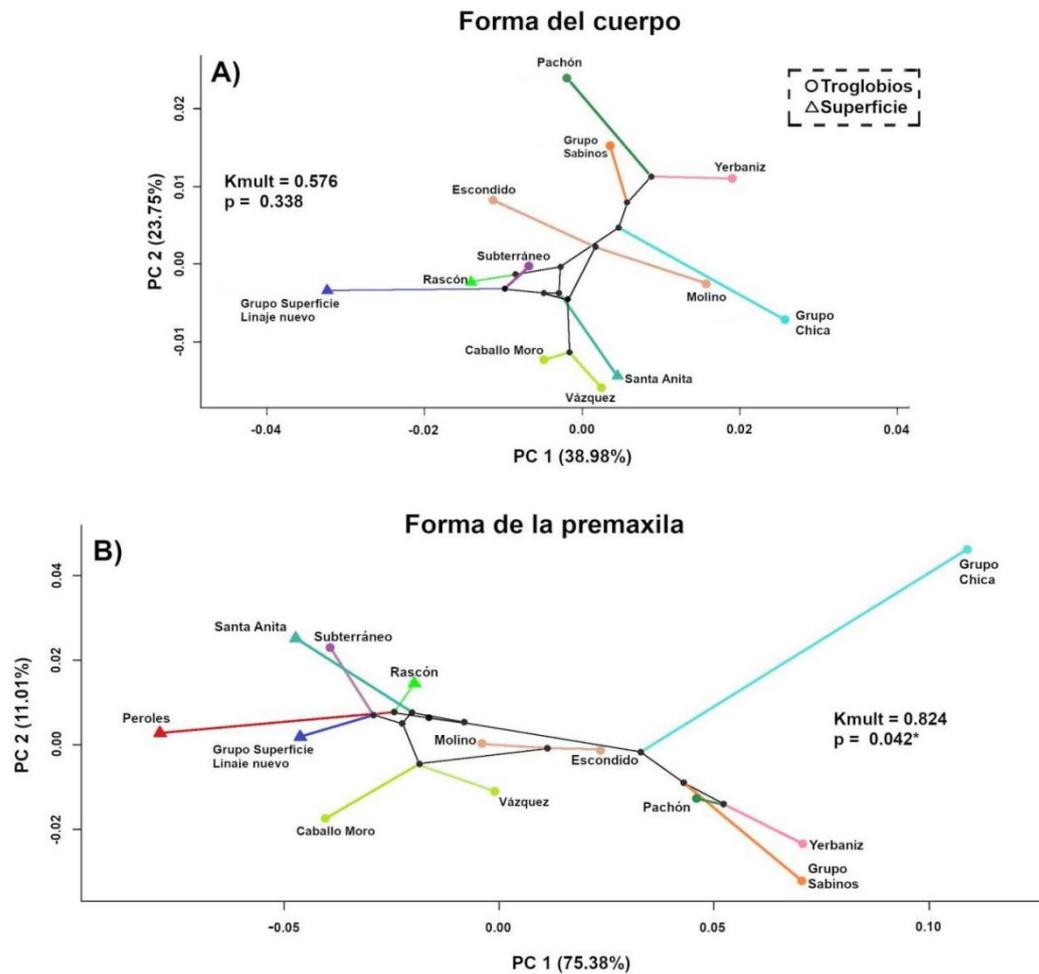


Fig. 24 Filomorfoespacio obtenidos de los análisis del PCA filogenético. En triángulos, las poblaciones troglóbias. En círculos, las poblaciones de superficie. A) PCA Filogenético de la forma del cuerpo. B) PCA filogenético de la forma de la premaxila

Discusión

Los organismos troglóbios son un excelente modelo para estudiar los mecanismos de evolución morfológica, siendo los *Astyanax* troglóbios uno de los mejores modelos (Jeffery, 2009; Tabin, 2016). Entre las características que los hace un modelo idóneo se incluye la posibilidad de la caracterización de la evolución en paralelo, ya que en al menos dos linajes han colonizado los ambientes de cuevas, además de ser organismos interfértiles con su grupo hermano de superficie,

permitiendo el estudio de las bases genéticas de los cambios morfológicos (Tabin, 2016). En este capítulo se obtuvieron resultados que nos muestran que hay evidencia de evolución morfológica modular en las formas troglobias y superficie de *Astyanax mexicanus*, de acuerdo con las diversas hipótesis *a priori* utilizadas, aportando información adicional a la hipótesis de que la modularidad puede tener un papel importante en la divergencia adaptativa como se había sugerido entre morfotipos lacustres del género (Ornelas-García, 2017). A su vez, no se encontró señal filogenética para la forma del cuerpo, sugiriendo que las formas de cueva han evolucionado de forma paralela en los diferentes linajes, en contraste con la forma de la premaxila, la cual mostró señal filogenética, implicando que ambos conjuntos de datos podrían estar sujetos a diferentes presiones selectivas, que les permiten desempeñar diferentes funciones en su medio, indicando que los rasgos pueden responder de manera diferente a las presiones de selección ambientales y verse afectados por la contingencia histórica.

Modularidad en la forma del cuerpo

Tres de las cuatro hipótesis propuestas fueron evaluadas en la forma del cuerpo, encontrando diferencias entre los dos morfotipos, indicando una diferencia en los patrones de evolución modular entre las formas troglobias y de superficie. Para el morfotipo troglobio, la HM1 tuvo los valores de CR más bajos, seguida de la hipótesis HM2. La HM1 divide al cuerpo en dos módulos, cada uno asociado con diferentes funciones ecológicas: la cabeza vs el cuerpo. La cabeza está asociada a los hábitos tróficos mientras que el cuerpo con la locomoción (Franchini *et al.*, 2014; Ornelas-García *et al.* 2017). Así, la HM2 sigue estos criterios anatómicos y funcionales, dividiendo al cuerpo en tres módulos, aunque los valores de CR son más altos (Adams, 2016; Adams & Collyer, 2019). En esta hipótesis se incluye la región del pedúnculo caudal como un módulo aparte, ya que dentro de la locomoción, es un rasgo asociado con la propulsión y maniobrabilidad de los organismos (Ornelas-García *et al.*, 2017). Ambas hipótesis nos indican que la modularidad favorece la evolución morfológica en el morfotipo troglobio en respuesta al ambiente. En el caso de la cabeza, la diversificación se puede deber a múltiples adaptaciones además de la explotación de los diferentes recursos tróficos en los ambientes de cuevas con respecto a la superficie (Yamamoto *et al.*, 2003, Albertson *et al.*, 2003;

2005; Protas *et al.*, 2008; Parsons *et al.*, 2011; Atukorola *et al.*, 2013). Estos resultados fueron congruentes en ambos linajes troglobios, lo que nos indica que la evolución modular se ha suscitado en los múltiples eventos de colonización a las cuevas promoviendo una segregación trófica y en la locomoción en paralelo. Similar a lo reportado en carácidos lacustres, donde la modularidad ha promovido la segregación trófica y locomotora en un par de especies simpátricas bajo procesos de divergencia adaptativa (Ornelas-García *et al.*, 2017).

En el caso de las poblaciones de superficie encontramos diferencias entre las hipótesis para cada linaje, lo cual podría estar en función con la historia evolutiva de los grupos como se ha sugerido entre linajes de formas lacustres (Ornelas-García *et al.* 2017). En el morfotipo de superficie de linaje nuevo la hipótesis de menor valor de CR fue la HM2 seguida de la HM1. Mientras que para el linaje viejo, la hipótesis con el valor de CR más bajo fue la HM3, la cual también divide al cuerpo en dos, sin embargo, en esta ocasión separa el pedúnculo caudal vs. el resto del cuerpo. En esta hipótesis el pedúnculo caudal está asociado con la propulsión y maniobrabilidad que pueden generar los peces (Ornelas-García *et al.*, 2017). Para este linaje contamos con dos poblaciones: la de río Rascón y la laguna de Peroles, las cuales corresponden a sistemas hidrológicos diferentes y aunado a la historia evolutiva distinta de los dos linajes (Ornelas-García *et al.*, 2008; 2017) podría explicar las diferencias encontradas entre las hipótesis de modularidad entre los linajes de superficie.

Modularidad en la forma de la cabeza

La HM4 fue significativa para los dos morfotipos, en la cual se divide la cabeza en dos módulos, el preorbital vs. el post-orbital. En la zona preorbital se encuentra el hocico, asociado los hábitos tróficos y en la postorbital tenemos otros rasgos que pueden tener una mayor relevancia para el contraste entre los morfotipos como lo es el ojo y el opérculo branquial, características claramente contrastantes entre los morfotipos (Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2018). Como observamos en el capítulo 1, la región preorbital presentó diferencias entre morfotipos siendo el morfotipo de superficie el que presentó un hocico, maxila, y la proyección del hocico mayor que el morfotipo troglobio. La

presencia de este módulo preorbital se ha sido sugerido antes para varios cíclidos africanos, promoviendo una evolución rápida y especializada asociada con la explotación de diferentes recursos (Cooper *et al.*, 2010; 2011; Parsons *et al.*, 2011). En particular en los *Astyanax* este módulo también fue reportado entre morfotipos lacustres simpátricos, siendo de forma similar a los cíclidos, un atributo asociado con la explotación diferencial de recursos tróficos (Ornelas-García *et al.* 2017). Por otro lado el segundo módulo, la región postorbital, se detectaron claras diferencias entre los dos morfotipos, siendo para el caso del morfotipo de superficie mayor el perímetro de la órbita ocular y un opérculo con una forma triangular, en contraste, el morfotipo troglobio, el cual tiene una órbita ocular menor y un opérculo con forma romboidal. Es este aspecto, las modificaciones del grupo troglobio se pueden deber a diversos factores como se mencionó previamente, resaltando las presiones ambientales ejercidas por las condiciones de oscuridad perpetua, que han reducido la estructura ocular afectando la morfología del complejo craneal (Mitchell *et al.*, 1977; Gross *et al.*, 2014; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2018); y en respuesta a niveles de oxigenación bajos en el ambiente (Boggs & Gross, 2021).

Señal filogenética: forma del cuerpo

Nuestros resultados de la forma del cuerpo no mostraron señal filogenética, lo que indica que este marco morfológico posee labilidad evolutiva (Revell *et al.*, 2008). Estos resultados son concordantes con uno de los escenarios propuestos por Sidlauskas (2008), teniendo dentro de cada linaje un grupo con alta diversidad morfológica (el morfotipo troglobio) y un grupo con con baja diversidad morfológica (morfotipo de superficie), observando en el filomorfoespacio una magnitud desigual de cambio entre los grupos. Lo que nos indica que el morfotipo troglobio ha experimentado más cambios morfológicos por rama filogenética en promedio que el grupo de superficie. Bajo este contexto, la forma del cuerpo presenta una alta plasticidad morfológica en respuesta al ambiente, posiblemente por las fuertes presiones selectivas (Klingenberg & Ekau, 1996; Sidlauskas, 2008).

Señal filogenética: forma de la premaxila.

Contrario a la forma del cuerpo, si se encontró señal filogenética para la forma de la premaxila. De manera similar, los rasgos asociados a hábitos tróficos, como

la longitud del tracto digestivo y tipo de diente han sido reportados con una fuerte señal filogenética para los peces tropicales (Guisande *et al.*, 2012; Roa-Fuentes *et al.*, 2015). Es posible que la reciente divergencia entre ambos morfotipos podría tener un efecto en la baja diferenciación en la premaxila entre los ambientes (Herman *et al.* 2018), así como que esta estructura tenga una fuerte restricción filogenética que también puede estar asociada con su función ecológica (Vitt & Pianka, 2005; Guisande *et al.*, 2012; Comte *et al.*, 2014; Roa-Fuentes *et al.*, 2015). En este caso podemos compararlo con un segundo escenario explorado por Sidlauskas (2008), el que denomina como “eficiencia desigual en innovación morfológica”, es decir, los dos morfotipos no han experimentado cambios morfológicos drásticos en la forma de la premaxila por rama filogenética, pero, el grupo con mayor diversidad morfológica (el morfotipo troglobio) ha explorado regiones más novedosas en el morfoespacio (Sidlauskas, 2008), posiblemente asociadas a las condiciones ambientales de las cuevas. Consideramos que una exploración más exhaustiva de la evolución de esta característica en el contexto evolutivo puede dar más luz con respecto a las restricciones que podrían estar asociadas con estos resultados.

Conclusiones

Encontramos evidencia de evolución modular en la forma del cuerpo y de la cabeza para el complejo *Astyanax mexicanus*. Los morfotipos mostraron diferentes patrones de modularidad. Para el caso del morfotipo troglobio, las hipótesis que fueron significativas son congruentes en ambos linajes, por lo que la evolución modular ha segregado al cuerpo en al menos dos módulos distintos, respondiendo a funciones ecológicas distintas (cabeza vs cuerpo). En el grupo de superficie se encontraron diferencias en la hipótesis de modularidad entre linajes. Las diferencias en los patrones de evolución modular entre linajes podrían estar asociados a su historia evolutiva así como a las condiciones ambientales específicas.

En el caso de la señal filogenética encontramos efecto filogenético contrastante en los marcos morfológicos analizados. La forma del cuerpo no presenta señal filogenética, sugiriendo una respuesta homoplásica de la forma del cuerpo en

respuesta a las condiciones ambientales. En el caso de la premaxila si encontramos señal filogenética, por lo que esta estructura tiene conservadurismo evolutivo.

Bibliografía

Adams, D. C. (2014). A generalized K statistic for estimating phylogenetic signal from shape and other high-dimensional multivariate data. *Systematic Biology*, 63(5), 685–697.

<https://doi.org/10.1093/sysbio/syu030>

Adams, D. C. (2016). Evaluating modularity in morphometric data: Challenges with the RV coefficient and a new test measure. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(5), 565–572.

<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12511>

Adams, D. C., & Collyer, M. L. (2019). Comparing the strength of modular signal, and evaluating alternative modular hypotheses, using covariance ratio effect sizes with morphometric data. *Evolution*, 73(12), 2352–2367. <https://doi.org/10.1111/evo.13867>

Albertson, R. C., Streelman, J. T., & Kocher, T. D. (2003). Directional selection has shaped the oral jaws of Lake Malawi cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5252–5257. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930235100>

Albertson, R. C., Streelman, J. T., Kocher, T. D., & Yelick, P. C. (2005). Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16287–16292.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0506649102>

Atukorala, A. D. S., Hammer, C., Dufton, M., & Franz-Odenaal, T. A. (2013). Adaptive evolution of the lower jaw dentition in Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*). *EvoDevo*, 4(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-28>

Bardua, C., Wilkinson, M., Gower, D. J., Sherratt, E., & Goswami, A. (2019). Morphological evolution and modularity of the caecilian skull. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1–23.

<https://doi.org/10.1186/s12862-018-1342-7>

Bermingham, E., & Moritz, C. (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7(4), 499–517. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00358.x>

Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4), 717–745.

<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x>

Boggs, T., & Gross, J. (2021). Reduced oxygen as an environmental pressure in the evolution of the blind mexican cavefish. *Diversity*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/d13010026>

Bonato, K. O., Burress, E. D., & Fialho, C. B. (2017). Dietary differentiation in relation to mouth and tooth morphology of a neotropical characid fish community. In *Zoologischer Anzeiger* (Vol. 267). Elsevier GmbH.

<https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.01.003>

Cardini, A., & Elton, S. (2008). Does the skull carry a phylogenetic signal? Evolution and modularity in the guenons. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(4), 813–834.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2008.01011.x>

Cheverud, J. M. (1982). Phenotypic, Genetic, and Environmental Morphological Integration in the Cranium. *Evolution*, 36(3), 499. <https://doi.org/10.2307/2408096>

Comte, L., Muriene, J., & Grenouillet, G. (2014). Species traits and phylogenetic conservatism of climate-induced range shifts in stream fishes. *Nature Communications*, 5, 1–10.

<https://doi.org/10.1038/ncomms6053>

Cooper, J. W., Wernle, J., Mann, K., & Albertson, R. C. (2011). Functional and Genetic Integration in the Skulls of Lake Malawi Cichlids Highly integrated anatomical structures constitute modules, and the linked concepts of modularity and integration figure prominently in discussions of evolvability. *Evolutionary Biology*, 38, 316–334. <https://doi.org/10.1007/s11692-011-9124-9>

Cooper, W. J., Wernle, J., Mann, K., & Albertson, R. C. (2011). Functional and Genetic Integration in the Skulls of Lake Malawi Cichlids. *Evolutionary Biology*, 38(3), 316–334.

<https://doi.org/10.1007/s11692-011-9124-9>

Elliott, W. R. (2018). The *Astyanax* caves of México: cavefish of Tamaulipas, San Luis Potosi and Guerrero (First). Association for Mexican cave studies.

Esteve-Altava, B. (2017). In search of morphological modules: a systematic review. *Biological Reviews*, 92(3), 1332–1347. <https://doi.org/10.1111/brv.12284>

Felice, R. N., Watanabe, A., Cuff, A. R., Noirault, E., Pol, D., Witmer, L. M., Norell, M. A., O'Connor, P. M., & Goswami, A. (2019). Evolutionary Integration and Modularity in the Archosaur Cranium. *Integrative and Comparative Biology*, 59(2), 371–382. <https://doi.org/10.1093/icb/icz052>

Franchini, P., Fruciano, C., Spreitzer, M. L., Jones, J. C., Elmer, K. R., Henning, F., & Meyer, A. (2014). Genomic architecture of ecologically divergent body shape in a pair of sympatric crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology*, 23(7), 1828–1845. <https://doi.org/10.1111/mec.12590>

Franz-Odenaal, T. A., & Hall, B. K. (2006). Modularity and sense organs in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Evolution and Development*, 8(1), 94–100.

<https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.05078.x>

Futuyma, D. J., & Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution* (Cuarta). Sinauer Associates, Inc.

Gittleman, J. L., Anderson, C. G., Kot, M., & Luh, H. K. (1996). Comparative tests of evolutionary lability and rates using molecular phylogenies. *New Uses for New Phylogenies*. Oxford University Press, Oxford, 289–307.

Goswami, A. (2006). Cranial modularity shifts during mammalian evolution. *The American Naturalist*, 168, 270–280. <https://doi.org/DOI10.1086/505758>.

Goswami, A. (2007). Cranial modularity and sequence heterochrony in mammals. *Evolution & Development*, 9, 290–298. <https://doi.org/DOI10.1371/journal.pone.0009517>

Gross, J. B., Krutzler, A. J., & Carlson, B. M. (2014). Complex craniofacial changes in blind cave-dwelling fish are mediated by genetically symmetric and asymmetric loci. *Genetics*, 196(4), 1303–1319. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.161661>

Gross, J. B., & Powers, A. K. (2016). The Evolution of the Cavefish Craniofacial Complex. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish* (Vol. 1, Issue C). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.00010-4>

Guisande, C., Pelayo-Villamil, P., Vera, M., Manjarrés-Hernández, A., Carvalho, M. R., Vari, R. P., Jiménez, L. F., Fernández, C., Martínez, P., Prieto-Piraquive, E., Granado-Lorencio, C., & Duque, S. R. (2012). Ecological factors and diversification among Neotropical characiforms. *International Journal of Ecology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/610419>

Herman, A., Brandvain, Y., Weagley, J., Jeffery, W. R., Keene, A. C., Kono, T. J. Y., Bilandžija, H., Borowsky, R., Espinasa, L., Quin, O., Ornelas-garcía, C. P., Yoshizawa, M., & Carlson, B. (2019). related traits in Mexican tetra , *Astyanax mexicanus*. 27(22), 4397–4416.

<https://doi.org/10.1111/mec.14877>.The

James Cooper, W., Parsons, K., McIntyre, A., Kern, B., Mcgee-Moore, A., & Albertson, R. C. (2010). Benthic-Pelagic Divergence of Cichlid Feeding Architecture Was Prodigious and Consistent during Multiple Adaptive Radiations within African Rift-Lakes. *PLOSone*, 5(3), 1–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009551>

Jeffery, W. R. (2009). Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish William. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 25–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134216>.Regressive

Klingenberg, C. P & Werner, E. (1996). A combined morphometric and phylogenetic analysis of an ecomorphological trend: pelagization in Antarctic fishes (Perciformes: Nototheniidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 59(2), 143–177. <https://doi.org/10.1006/bijl.1996.0059>

Klingenberg, C. P. (2009). Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: Tools for evaluating a priori hypotheses. *Evolution and Development*, 11(4), 405–421.

<https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00347.x>

Klingenberg, C. P. (2014). Studying morphological integration and modularity at multiple levels: Concepts and analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1649), 33–35. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0249>

Larouche, O., Cloutier, R., & Zelditch, M. L. (2015). Head, Body and Fins: Patterns of Morphological Integration and Modularity in Fishes. *Evolutionary Biology*, 42(3), 296–311.

<https://doi.org/10.1007/s11692-015-9324-9>

Larouche, O., Zelditch, M. L., & Cloutier, R. (2018). Modularity promotes morphological divergence in ray-finned fishes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–6.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25715-y>

Losos, J. B. (2008). Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*, 11(10), 995–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01229.x>

Mitchell, R. W., Russell, W. H., & Elliott, W. R. (1977). Mexican Eyeless Characin Fishes, Genus *Astyanax*: Environment, Distribution, and Evolution (L. Texas (ed.); First, Issue February 1977). TEXAS TECH UNIVERSITY.

Myers, A. A., & Giller, P. (1988). *Analytical Biogeography* (A. A. Myers & P. Giller (eds.); First). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-0435-4>

Ornelas-García, C. P., Bautista, A., Herder, F., & Doadrio, I. (2017). Functional modularity in lake-dwelling characin fishes of Mexico. *PeerJ*, 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.3851>

Ornelas-García, C. P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(340), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-340>

Ossi, K., & Kamilar, J. M. (2006). Environmental and phylogenetic correlates of Eulemur behavior and ecology (Primates: Lemuridae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61, 53–64. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0236-7>

Powers, A. K., Berning, D. J., & Gross, J. B. (2020). Parallel evolution of regressive and constructive craniofacial traits across distinct populations of *Astyanax mexicanus* cavefish. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(7–8), 450–462. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22932>

Powers, A. K., Boggs, T. E., & Gross, J. B. (2018). Canal neuromast position prefigures developmental patterning of the suborbital bone series in *Astyanax* cave- and surface-dwelling fish. *Developmental Biology*, 441(2), 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.001>

Powers, A. K., Rodiles-Hernández, R., Garita-Alvarado, C. A., Berning, D. J., Gross, J. B., & Ornelas-García, C. P. (2020). A geographical cline in craniofacial morphology across populations of Mesoamerican lake-dwelling fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 0(333), 171–180. <https://doi.org/10.1002/jez.2339>

Protas, M., Tabansky, I., Conrad, M., Gross, J. B., Vidal, O., Tabin, C. J., & Borowsky, R. (2008). Multi-trait evolution in a cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Evolution and Development*, 10(2), 196–209. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2008.00227.x>

Revell, L. J., Harmon, L. J., & Collar, D. C. (2008). Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Systematic Biology*, 57(4), 591–601. <https://doi.org/10.1080/10635150802302427>

Rheindt, F. E., Grafe, T. U., & Abouheif, E. (2004). Rapidly evolving traits and the comparative method: how important is testing for phylogenetic signal? *Evolutionary Ecology Research*, 6, 377–396.

Roa-Fuentes, C. A., Casatti, L., & Romero, R. de M. (2015). Phylogenetic signal and major ecological shifts in the ecomorphological structure of stream fish in two river basins in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 13(1), 165–178. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140045>

Rohlf, F. J. (2001). COMPARATIVE METHODS FOR THE ANALYSIS OF CONTINUOUS VARIABLES: GEOMETRIC INTERPRETATIONS. *Evolution*, 55(11), 2143–2160. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00731.x>

Scoville, A. G., & Pfrender, M. E. (2010). Phenotypic plasticity facilitates recurrent rapid adaptation to introduced predators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4260–4263. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912748107>

Silvertown, J., McConway, K., Gowing, D., Dodd, M., Fay, M. F., Joseph, J. A., & Dolphin, K. (2006). Absence of phylogenetic signal in the niche structure of meadow plant communities. *Proceedings of The Royal Society B*, 273, 39–44. <https://doi.org/http://dx.doi.10.1098/rspb.2005.3288>

Swenson, N. G., Enquist, B. J., Thompson, J., & Zimmerman, J. K. (2007). THE INFLUENCE OF SPATIAL AND SIZE SCALE ON PHYLOGENETIC RELATEDNESS IN TROPICAL FOREST COMMUNITIES. In *Ecology* (Vol. 88, Issue 7).

Tabin, C. J. (2016). Introduction: The Emergence of the Mexican Cavefish as an Important Model System for Understanding Phenotypic Evolution. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.09999-0>

Van Valen, L. M. (1982). Integration of species: stasis and biogeography. *Evolutionary Theory*, 6, 99–112.

Wagner, G. P., & Altenberg, L. (1996). Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50(3), 967–976. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02339.x>

Wainwright, P. C. (1988). Morphology and ecology: functional basis of feeding constraints in Caribbean labrid fishes. *Ecology*, 69(3), 635–645. <https://doi.org/10.2307/1941012>

Wake, D. B. (1982). Functional and developmental constraints and opportunities in the evolution of feeding systems in urodeles. *Environmental Adaptation and Evolution*, 51–66.

Yamamoto, Y., & Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science*, 289(5479), 631–633. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.631>

Yoffe, M., Patel, K., Palia, E., Kolawole, S., Streets, A., Haspel, G., & Soares, D. (2020). Morphological malleability of the lateral line allows for surface fish (*Astyanax mexicanus*) adaptation to cave environments. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(7–8), 511–517. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22953>

Zanne, A. E., Chapman, C. A., & Kitajima, K. (2005). Evolutionary and ecological correlates of early seedling morphology in East African trees and shrubs. In *American Journal of Botany* (Vol. 92, Issue 6). <https://doi.org/10.3732/ajb.92.6.972>

Discusión general

.Investigaciones con herramientas moleculares y enfoques ecológicos, han descubierto procesos de evolución en paralelo en diversos rasgos fenotípicos, que en asociación con las características de su medio ambiente, producen especiación ecológica producto de la divergencia adaptativa (Schluter *et al.*, 2000; 2004; Nosil, 2012; Hendry 2009; Garita-Alvarado, 2018). Bajo este contexto, los organismos troglobios ofrecen un excelente modelo para el estudio de la evolución en paralelo de los rasgos asociados a la vida cavernícola (Jeffery, 2009; White & Culver, 2012; Tabin, 2016). En esta tesis de investigación se evaluaron los patrones de evolución morfológica en paralelo entre los linajes troglobios de *Astyanax mexicanus*, la ecología trófica y su relación con la ecomorfología para algunas poblaciones troglobias de ambos linajes, y finalmente se evaluaron los mecanismos relacionados con las fuentes de variación fenotípica: la modularidad y la señal filogenética en la evolución de estos rasgos.

Evolución morfológica en paralelo: Patrones de divergencia en los linajes troglobios

En el capítulo I se describieron los patrones de divergencia morfológica para la premaxila, el cuerpo y la cabeza entre los morfotipos, troglobio y de superficie, en ambos linajes de *Astyanax mexicanus* (i.e. linaje nuevo vs. viejo). Los tres marcos morfológicos presentaron diferentes niveles de divergencia morfológico entre los morfotipos, siendo la cabeza la que presentó una mayor segregación entre morfotipos, seguida de la premaxila y por último la forma del cuerpo, donde, se apreció un solapamiento fuerte entre los morfotipos, siendo el morfotipo troglobio del linaje nuevo el que presentó mayor similitud con el morfotipo de superficie. Estos patrones de evolución en paralelo de las formas troglobias de ambos linajes para la forma de cabeza y en menor medida de la premaxila y la forma del cuerpo, nos hacen sugerir que existen fuertes presiones selectivas asociadas al ambiente que permiten la evolución de formas similares en los ambientes de cuevas. Sin embargo, las diferencias encontradas en los marcos morfológicos analizados pueden a su vez dar señales de contingencia histórica que podrían estar afectando la evolución de estas características como se observó más adelante en el caso de la premaxila. Estos patrones combinados de evolución en respuesta a presiones selectivas y

contingencia histórica en la evolución morfológica, han sido propuestos previamente en procesos de divergencia adaptativa para *Astyanax* lacustres (Garita-Alvarado, *et al.* 2018).

Los siguientes rasgos son distintivos de la forma troglobia: 1) Una talla corporal menor, siendo la media de la Longitud estándar para cuevas de 4.82cm vs. 5.48 cm para la superficie. 2) Un menor número de escamas en la línea lateral para los peces de cuevas, con una moda de 33 en cuevas vs 35 en superficie). Ambas reducciones se han relacionado en grupos a de cuevas con la limitación de recursos disponibles (Simon *et al.*, 2017). En la forma del cuerpo, entre las principales diferencias entre morfotipos están: un pedúnculo caudal es más largo y más estrecho, presentan una forma más comprimida del cuerpo que las formas de superficie sobre todo en la región cefálica. Estas diferencias podrían estar asociadas con aspectos de la locomoción como la propulsión y maniobrabilidad, y que podrían ser en respuesta a las condiciones físicas de su medio (Cordova-Tapia & Zambrano, 2017; Ornerlas-García *et al.*, 2017).

En la forma de la cabeza, el morfotipo de cuevas presentó una forma más cóncava (similar a una forma de espátula particularmente en el linaje viejo), con un hocico más largo, un incremento en el número de dientes en la maxila, y mostró diferencias en la forma de opérculo, en contraste con la forma de superficie. Estas diferencias en el opérculo (romboide en las cuevas vs triangular en superficie), se han sugerido que puede ser una adaptación a un medio hipóxico, así como el ancho y la apertura relativos del hocico (Boggs & Gross, 2021). En cuanto a las modificaciones de la cabeza y el hocico se han propuesto algunas en otros grupos de vertebrados (Barlow, 1961). De manera específica los rasgos de longitud y ancho del hocico, se asocian a los hábitos tróficos: una longitud y como un estimador para evaluar la habilidad del pez para capturar presas (Husley *et al.*, 2003), un mayor número de dientes en la maxila, siendo congruentes con reportes previos (Yamamoto *et al.*, 2003; Protas *et al.*, 2008), aunque, al aumentar en el número de cuevas analizadas por linajes se observaron diferentes modas entre los linajes (i.e. 3 dientes para el linaje viejo y 4 dientes para el linaje nuevo), sin haber diferencias significativas, y por último una premaxila con un proceso ascendente más pequeño y más robusto, con una forma más amplia, lo que posiblemente les confiere una cavidad bucal mayor, que puede

repercutir tanto en el volumen de agua que pueden filtrar para la oxigenación, como materia orgánica, siendo el detritus la principal fuente de alimento en los adultos (Espinosa *et al.*, 2017).

Finalmente, el tamaño en la cuenca ocular es uno de los rasgos más claros asociados con los ambientes de cuevas, particularmente debido a la pérdida de la visión que se da en los morfotipos troglobios, y que se ha sugerido como resultado de las fuertes presiones selectivas y costos que impone el mantenimiento de estos órganos en ambientes pobres en nutrientes (Moran *et al.*, 2015). Particularmente en este estudio observamos una asociación entre el tamaño de la cuenca ocular y modificaciones el hueso suborbital 3 (SO3), el cual tiene, una forma más compacta y en una posición distinta en la cabeza en contraste con la forma de superficie, previamente se habían sugerido estos cambios en los peces de cuevas y el número de fragmentaciones y modificaciones en los huesos suborbitales y supraorbitales (Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2017; 2018).

Ecología trófica de los Astyanax troglobios

En el capítulo II de la tesis obtuvimos que las señales isotópicas entre poblaciones y regiones geográficas son ligeramente diferentes, teniendo en las cuevas de la Sierra de El Abra señales más enriquecidas de $\delta^{15}\text{N}$ y menos enriquecidas de $\delta^{13}\text{C}$, exponiendo que la dinámica de la ecología trófica en cada cueva es ligeramente diferente. Aunado a esto, los resultados de las métricas de Layman indican que las poblaciones de la Sierra de El Abra tienen un mayor nicho ecológico y menor redundancia trófica. Sin embargo, de acuerdo con los valores obtenidos y el flujo de enriquecimiento de un nivel a otro (de 3-4 puntos más de $\delta^{15}\text{N}$ en comparación del nivel anterior, Zanden & Rasmussen, 1999; Post *et al.*, 2002), se sugiere que el nivel trófico de los peces troglobios es similar en las distintas cuevas. En este punto, son necesarias más investigaciones para conocer a fondo las interacciones tróficas que se susciten en el ambiente troglobio, donde se pueda limitar un nivel trófico base (Zanden & Rasmussen, 1999; Post 2002; Fenolio *et al.*, 2006) y comparar con los niveles tróficos de los peces de superficie. Por otro lado, no observamos una correlación entre las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ obtenidas y la ecomorfología de las poblaciones troglobias. Sin embargo, en los

análisis de ordenamiento así como en las correlaciones la proyección del hocico (P. Hocico), presentó el valor de correlación más alto con 0.323 para $\delta^{15}\text{N}$ y 0.303 para $\delta^{13}\text{C}$. Este rasgo ha sido previamente asociado directamente con la adquisición de recursos tróficos (Villéger *et al.*, 2010; Cordova Tapia y Zambrano, 2016), y entre las variables que suelen tener una modificación en respuesta a la funcionalidad de los peces para adquirir diferentes recursos alimenticios (Albertson *et al.*, 2003; 2005; Cooper *et al.*, 2010; 2011; Ornelas-García *et al.*, 2014; 2017; Garita-Alvarado *et al.*, 2018), como es el caso de los *Astyanax* lacustres en el lago de Catemaco, Veracruz, donde hay una segregación morfológica y ecológica en dos especies simpátricas (Ornelas-García *et al.*, 2014; 2017; Garita-Alvarado *et al.*, 2018)

Finalmente, en este capítulo se desarrolló un índice de entrada de nutrientes para comprender si las características físicas de las cuevas pueden tener un efecto en las diferencias del enriquecimiento de la señal isotópica para las distintas cuevas. Ya que se ha demostrado con anterioridad que los atributos físicos de una cueva se correlacionan con la estructura de las comunidades en diversas cuevas tropicales (Simões *et al.*, 2015). En nuestro estudio se encontró una relación que apunta a que las poblaciones de las cuevas que presentan valores del IN positivos, tienden a tener valores de $\delta^{15}\text{N}$ más enriquecidos en comparación con las poblaciones que tuvieron valores del IN negativos. En el caso de la señal de $\delta^{13}\text{C}$, la relación fue inversa, esta era menos enriquecida conforme incrementa el valor del IN. Estos resultados no fueron significativos, pero nos dieron una pauta para entender el efecto de la geomorfología de las cuevas, destacando que la distancia de la entrada de la cueva a la poza (DEP) y la profundidad resultan de gran relevancia, ya que los recursos alóctonos recorren menor o mayor distancia según sea el caso para llegar a las pozas, así como posibles fenómenos de arrastre de materia orgánica por las corrientes de agua, la percolación de agua de lluvia y la facilidad de que la fauna pueda acceder a la cueva, todos estos factores afectan a la dinámica de la ecología trófica de cada cueva (Ferreira, 2000; Culver *et al.*, 2004; Souza-Silva *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2015). Adicionalmente, la conectividad subterránea en estos sistemas podría también afectar la adquisición de recursos directamente del manto freático, hipotetizando que en ambas regiones geográficas existen patrones hidrogeológicos complejos que podrían permitir interconexión entre distintas cuevas posiblemente durante la época de lluvias posiblemente permitiendo el transporte de nutrientes e

incluso la migración de organismos entre algunas poblaciones (Eliot, 2018; Bradic *et al.* 2012; Herman *et al.* 2018).

Procesos que afectan la evolución morfológica

En el capítulo III exploramos dos procesos que afectan directamente la evolución morfológica. Por un lado, tenemos a la modularidad como uno de los promotores de la evolución, debido a que se puede modificar un rasgo morfológico, implicando una mejora funcional sin comprometer otras funciones en otros rasgos morfológicos en el organismo (Wagner y Altenberg, 1996). En contraste, la señal filogenética indica que las especies estrechamente relacionadas presentan una mayor similitud morfológica (Blomberg *et al.*, 2003; Losos, 2008; Revell *et al.*, 2008), lo que se interpreta como una evidencia de conservadurismo evolutivo o labilidad evolutiva es los rasgos (Revell *et al.*, 2008). Ambos procesos fueron evaluados en el contexto de la divergencia adaptativa entre los morfotipos de cueva y superficie, a fin de evaluar si algunos rasgos morfológicos son más propensos a evolucionar de manera integrativa o modular, y a su vez cuál es la señal filogenética de la forma bajo presiones selectivas similares en diferentes linajes de cuevas.

Patrones de evolución modular

La evaluación de diversas hipótesis de modularidad nos ayudaron a encontrar diversos patrones de evolución modular entre los dos morfotipos. Para el marco morfológico de la cabeza, la HM4 fue la que tuvo los valores de CR más bajos en ambos morfotipos, la cual divide a la cabeza en dos módulos, la región preorbital vs la región postorbital. En la región preorbital se abarca el hocico, las narinas y todas las estructuras asociadas a la morfológica trófica. La modularidad en esta región se ha sugerido como promotora de una evolución rápida y especializada asociada con la explotación de diferentes recursos tróficos, llegando a facilitar la divergencia adaptativa y potencialmente la especiación en el género *Astyanax* (Ornelas-García *et al.*, 2017; Garita-Alvarado *et al.*, 2018), como en otros grupos de peces (Cooper *et al.*, 2010; 2011; Parsons *et al.*, 2011; 2017). Mientras, que en la región postorbital se encuentra la estructura ocular, los huesos circundantes y el opérculo branquial, estructuras que responden a otras presiones de selección. Principalmente en el morfotipo troglobio, resaltan las presiones ambientales ejercidas por las condiciones de oscuridad perpetua, que han reducido la estructura ocular afectando la morfología

del complejo craneal, así como la modificación en el opérculo que podría estar en función con la baja la disponibilidad de oxígeno (Mitchell *et al.*, 1977; Gross *et al.*, 2014; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2018).

Para la forma del cuerpo, se encontraron diferentes patrones de modularidad entre los morfotipos. Para el morfotipo troglobio, la HM1 (cabeza vs. cuerpo) presentó los valores de CR más bajos y por lo tanto mayor soporte para una evolución modular (Adams, 2016; Adams & Collyer, 2019), seguido de la HM2 (tres módulos: cabeza, parte central del cuerpo y la cauda), estos resultados fueron consistentes en los dos linajes. En ambas hipótesis el módulo de la cabeza está asociado a los hábitos tróficos, aunque para el grupo troglobio sabemos que también responde a otras presiones selectivas como la pérdida de la visión y adaptación a condiciones de hipoxia (Boggs & Gross, 2021). Por otro lado, el módulo del cuerpo está asociado con la locomoción e hidrodinamismo (Ornelas-García *et al.* 2017). Finalmente, el módulo de la región caudal (i.e. pedúnculo caudal), se asocia también con locomoción, y de manera más particular con propulsión y maniobrabilidad de los organismos (Franchini *et al.*, 2014; Ornelas-García *et al.*, 2017). Por lo que proponemos que la modularidad es un proceso relevante que podría facilitar, de manera similar a los procesos de diversificación reportados en *Astyanax* lacustres (Ornelas-García *et al.* 2017), la divergencia adaptativa en ambos linajes de cueva, promoviendo la evolución morfológica con diferentes funciones ecológicas, como la explotación de recursos y el uso del hábitat, como se ha reportado en otros peces (Cooper *et al.*, 2010; Franchini *et al.*, 2014; Larouche *et al.*, 2015; Ornelas-García *et al.*, 2017; Larouche *et al.*, 2018).

Para el grupo de superficie encontramos diferentes patrones de modularidad en los dos linajes. Para el linaje viejo de superficie, la hipótesis que presentó un menor valor de CR fue HM3, seguida de la HM2. Para el linaje nuevo de superficie, la HM2 fue la que presentó el CR más bajo, seguida de HM1. Esto nos indicó que los dos linajes responden de manera diferente a presiones ambientales ejercidas en la superficie, esto se puede deber a las características físicas del ambiente, así como a la contingencia histórica que podría estar afectando de manera diferencial a ambos linajes de superficie, patrones que se recuperan en la evaluación de la señal filogenética de la forma (Herman *et al.*, 2018).

Patrones de la señal filogenética

La señal filogenética de la forma del cuerpo y de la premaxila, bajo el concepto de que las especies estrechamente relacionadas presentan una mayor similitud morfológica (Blomberg *et al.*, 2003; Losos, 2008; Revell *et al.*, 2008), nos indicaría que la similitud deberá ser mayor entre linajes que entre morfotipos (troglobio vs superficie). Sin embargo, encontramos patrones distintos de señal filogenética para la forma del cuerpo y de premaxila. Ambos marcos morfológicos estuvieron por debajo del valor esperado de K bajo un modelo de evolución Browniano (MB, $K = 1$, Blomberg *et al.*, 2003; Adams, 2014), el cual se considera como un buen modelo para estudiar la evolución fenotípica, como se reportó para las ranas de la familia Myobatrachidae, donde se le comparó con otros modelos evolutivos, como el Ornstein–Uhlenbeck (OU), y fue el mejor modelo para explicar la evolución morfológica en este grupo (Vidal-García *et al.*, 2017). Para la forma del cuerpo no se encontró señal filogenética ($K = 0.576$, $p = 0.338$), por lo tanto, se puede asumir que la forma ha evolucionado más en respuesta de las presiones selectivas del ambiente, habiendo una evolución en paralelo de la forma del cuerpo. Para la forma de la premaxila si se encontró señal filogenética ($K = 0.576$, $p = 0.042$), indicando que esta estructura presenta un mayor conservadurismo evolutivo, que en parte podría relacionarse a efectos pleiotrópicos, o posiblemente a procesos de divergencia reciente (Herman *et al.* 2018), y finalmente, a que han tenido fuertes presiones selectivas divergentes. Estos patrones diferentes son concordantes con los escenarios propuestos por Sidlauskas (2008), por un lado tenemos una magnitud desigual de cambio por rama filogenética para la forma del cuerpo (el grupo más diverso, experimento más cambios morfológicos -troglobio viejo-) y eficiencia desigual en innovación morfológica para la forma de la premaxila. Los linajes no experimentaron muchos cambios, pero el grupo más diverso -troglobio viejo- exploró regiones novedosas en el morfoespacio). Aunque, se han reportado que los diferentes niveles de conservadurismo evolutivo, entre rasgos morfológicos también dependen de la función que desempeñan, sugiriendo que los nichos ecológicos evolucionan poco en el momento de un evento de especiación, y por lo tanto, los rasgos específicos al uso de estos nichos también evolucionarán más lento, lo que podría explicar la similitud del morfotipo troglobio nuevo con el morfotipo de superficie

(Vitt & Pianka, 2005; Guisande *et al.*, 2012; Comte *et al.*, 2014; Roa-Fuentes *et al.*, 2015).

Conclusiones generales

- Se encontraron patrones de evolución morfológica en paralelo en la ecomorfología, la premaxila, el cuerpo y la cabeza en los dos linajes de los *Astyanax mexicanus* troglobios, que generan una forma troglobia que los distingue de su homólogo de superficie. Siendo la forma de la cabeza donde encontramos la mayor diferenciación morfológica, seguido de la premaxila y por último, la forma del cuerpo, la cual presentó un mayor traslape entre morfotipos.
- Hubo un ligero grado de diferenciación en la forma de la premaxila entre el morfotipo troglobio viejo, en contraste con el linaje nuevo, lo que refuerza la hipótesis de que el grado de regresión morfológica puede verse afectado por el tiempo que llevan bajo dichas presiones selectivas.
- Las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ tuvieron ligeras diferencias en los niveles de enriquecimiento entre poblaciones y regiones geográficas. Particularmente en las métricas de Layman, donde las poblaciones de la Sierra de El Abra presentaron una mayor área de nicho ecológico y menor redundancia trófica, en comparación con las poblaciones de la Sierra de Guatemala. Sin embargo, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ sugieren que el nivel trófico y la base de carbono es similar en todas las cuevas.
- No hubo una correlación clara entre las variables ecomorfológicas y la señal isotópica, sin embargo, los rasgos morfológicos asociados a la adquisición de recursos (i.e. P. hocico), fueron los que tuvieron el valor de correlación más alta con la señal de $\delta^{15}\text{N}$.
- Las señales isotópicas pueden verse afectadas por las características físicas de las cuevas, destacando aspectos como la profundidad y la distancia de la entrada a la poza donde habitan los organismos, lo que puede modificar la dinámica ecológica de cada cueva.
- Encontramos evidencia de evolución modular para la forma del cuerpo y la forma de cabeza, estos patrones son diferentes entre los morfotipos. Para el caso del morfotipo troglobio, las hipótesis que fueron significativas son congruentes en ambos linajes, soportando las hipótesis de dos (cabeza y cuerpo) y tres módulos (cabeza, parte media del cuerpo y cauda), siendo en ambos casos módulos que pueden tener una asociación en la obtención de recursos, así como locomoción y

uso de hábitat. En el morfotipo de superficie, contrastó principalmente en la integración presente en la zona caudal y la región media del cuerpo, exhibiendo más una adaptación a las funciones locomotoras. Las diferencias encontradas entre morfotipos, podría ser una evidencia de las diferentes presiones ejercidas en cada ambiente, que podrían estar alterando la evolución modular entre morfotipos.

- Se observó una falta de señal filogenética en la forma del cuerpo, lo que podría deberse a una evolución homoplásica de la forma en respuesta de las presiones selectivas del ambiente.
- En el caso de la premaxila si encontramos señal filogenética, por lo que esta estructura si tiene conservadurismo relacionado con su historia evolutiva y probablemente con su función ecológica.

Bibliografía

- Adams, D. C. (2014). A generalized K statistic for estimating phylogenetic signal from shape and other high-dimensional multivariate data. *Systematic Biology*, 63(5), 685–697.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syu030>
- Adams, D. C. (2016). Evaluating modularity in morphometric data: Challenges with the RV coefficient and a new test measure. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(5), 565–572.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12511>
- Adams, D. C., & Collyer, M. L. (2019). Comparing the strength of modular signal, and evaluating alternative modular hypotheses, using covariance ratio effect sizes with morphometric data. *Evolution*, 73(12), 2352–2367. <https://doi.org/10.1111/evo.13867>
- Albertson, R. C., Streelman, J. T., & Kocher, T. D. (2003). Directional selection has shaped the oral jaws of Lake Malawi cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5252–5257. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930235100>
- Albertson, R. C., Streelman, J. T., Kocher, T. D., & Yelick, P. C. (2005). Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16287–16292.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506649102>
- Álvarez, J. (1946). Revisión del género *Anoptichthys* con descripción de una especie nueva (Pisces, Characidae). *Anales Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 4, 263–282.
- Álvarez, J. (1947). Descripción de *Anoptichthys hubbsi* caracindo ciego de La Cueva de Los Sabinos, S. L. P. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 8, 215–219.
- Avise, J. C., & Selander, R. K. (1972). EVOLUTIONARY GENETICS OF CAVE-DWELLING FISHES OF THE GENUS *Astyanax*. *International Journal of Organic Evolution*, 26(1), 1–19.

- Bardua, C., Wilkinson, M., Gower, D. J., Sherratt, E., & Goswami, A. (2019). Morphological evolution and modularity of the caecilian skull. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1342-7>
- Bearhop, S., Adams, C. E., Waldron, S., Fuller, R. A., & Macleod, H. (2004). Determining trophic niche width: A novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73(5), 1007–1012. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00861.x>
- Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4), 717–745. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x>
- Bonato, K. O., Burrell, E. D., & Fialho, C. B. (2017). Dietary differentiation in relation to mouth and tooth morphology of a neotropical characid fish community. In *Zoologischer Anzeiger* (Vol. 267). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.01.003>
- Bradic, M., Beerli, P., García-De León, F. J., Esquivel-Bobadilla, S., & Borowsky, R. L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evolutionary Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-9>
- Bradic, M., Teotónio, H., & Borowsky, R. L. (2013). The population genomics of repeated evolution in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2383–2400. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst136>
- Cheverud, J. M. (1982). Phenotypic, Genetic, and Environmental Morphological Integration in the Cranium. *Evolution*, 36(3), 499. <https://doi.org/10.2307/2408096>
- Coghill, L. M., Darrin Hulseay, C., Chaves-Campos, J., García de León, F. J., & Johnson, S. G. (2014). Next generation phylogeography of cave and surface *Astyanax mexicanus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79(1), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.029>
- Cooper, J. W., Wernle, J., Mann, K., & Albertson, R. C. (2011). Functional and Genetic Integration in the Skulls of Lake Malawi Cichlids Highly integrated anatomical structures constitute modules, and the linked concepts of modularity and integration figure prominently in discussions of evolvability. *Evolutionary Biology*, 38, 316–334. <https://doi.org/10.1007/s11692-011-9124-9>
- Cooper, W. J., Wernle, J., Mann, K., & Albertson, R. C. (2011). Functional and Genetic Integration in the Skulls of Lake Malawi Cichlids. *Evolutionary Biology*, 38(3), 316–334. <https://doi.org/10.1007/s11692-011-9124-9>
- Córdova-Tapia, F., & Zambrano, L. (2016). Fish functional groups in a tropical wetland of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Neotropical Ichthyology*, 14(2). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150162>
- Dowling, T. E., Martasian, D. P., & Jeffery, W. R. (2002). Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(4), 446–455. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004100>
- Duboué, E. R., Borowsky, R. L., & Keene, A. C. (2012). B-Adrenergic Signaling Regulates Evolutionarily Derived Sleep Loss in the Mexican Cavefish. *Brain, Behavior and Evolution*, 80(4), 233–243. <https://doi.org/10.1159/000341403>

- Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J., Launay, J. M., Blin, M., & Rétaux, S. (2014). A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome. *Nature Communications*, 5, 3647. <https://doi.org/10.1038/ncomms4647>
- Elliott, W. R. (2018). The *Astyanax* caves of México: cavefish of Tamaulipas, San Luis Potosí and Guerrero (First). Association for Mexican cave studies.
- Eroukhmanoff, F., Hargeby, A., Arnberg, N. N., Hellgren, O., Bensch, S., & Svensson, E. I. (2009). Parallelism and historical contingency during rapid ecotype divergence in an isopod. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(5), 1098–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01723.x>
- Espinasa, L., Bonaroti, N., Wong, J., Pottin, K., Queinnec, E., & Rétaux, S. (2017). Contrasting feeding habits of post-larval and adult *Astyanax* cavefish. *Subterranean Biology*, 21(1), 1–17. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.21.11046>
- Espinasa, L., Ornelas-García, C. P., Legendre, L., Rétaux, S., Best, A., Gamboa-Miranda, R., Espinosa-Pérez, H., & Sprouse, P. (2020). Discovery of two new *Astyanax* cavefish localities leads to further understanding of the species biogeography. *Diversity*, 12(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/d12100368>
- Esteve-Altava, B. (2017). In search of morphological modules: a systematic review. *Biological Reviews*, 92(3), 1332–1347. <https://doi.org/10.1111/brv.12284>
- Felice, R. N., Watanabe, A., Cuff, A. R., Noirault, E., Pol, D., Witmer, L. M., Norell, M. A., O'Connor, P. M., & Goswami, A. (2019). Evolutionary Integration and Modularity in the Archosaur Cranium. *Integrative and Comparative Biology*, 59(2), 371–382. <https://doi.org/10.1093/icb/icz052>
- Fenolio, D. B., Graening, G. O., Collier, B. A., & Stout, J. F. (2006). Coprophagy in a cave-adapted salamander; the importance of bat guano examined through nutritional and stable isotope analyses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1585), 439–443. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3341>
- Ferreira, R. L., Martins, R. P., & Yanega, D. (2000). Ecology of bat guano arthropod communities in a Brazilian dry cave. In *Ecotropica* (Vol. 6, Issue 2, pp. 105–116).
- Franchini, P., Fruciano, C., Spreitzer, M. L., Jones, J. C., Elmer, K. R., Henning, F., & Meyer, A. (2014). Genomic architecture of ecologically divergent body shape in a pair of sympatric crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology*, 23(7), 1828–1845. <https://doi.org/10.1111/mec.12590>
- Freckleton, R. P. (2002). On the misuse of residuals in ecology: Regression of residuals vs. multiple regression. *Journal of Animal Ecology*, 71(3), 542–545. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2002.00618.x>
- Fumey, J., Hinaux, H., Noirot, C., Thermes, C., Rétaux, S., & Casane, D. (2018). Evidence for late Pleistocene origin of *Astyanax mexicanus* cavefish. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1156-7>
- Futuyma, D. J. (1986). *Evolutionary biology*. (Sinauer (ed.); segunda).
- Futuyma, D. J., & Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution* (Cuarta). Sinauer Associates, Inc.
- García-Berthou, E. (2001). On the misuse of residuals in ecology: Testing regression residuals vs. the analysis of covariance. *Journal of Animal Ecology*, 70(4), 708–711. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2001.00524.x>

- Garita-Alvarado, C. A., Barluenga, M., & Ornelas-García, C. P. (2018). Parallel evolution of morphs of *Astyanax* species (Teleostei: Characidae) in México and Central America. *Biological Journal of the Linnean Society*, 124(4), 706–717. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly082>
- Goswami, A. (2006). Cranial modularity shifts during mammalian evolution. *The American Naturalist*, 168, 270–280. [https://doi.org/DOI 10.1086/505758](https://doi.org/DOI%2010.1086/505758)
- Goswami, A. (2007). Cranial modularity and sequence heterochrony in mammals. *Evolution & Development*, 9, 290–298. [https://doi.org/DOI 10.1371/journal.pone.0009517](https://doi.org/DOI%2010.1371/journal.pone.0009517)
- Gross, J. B., Krutzler, A. J., & Carlson, B. M. (2014). Complex craniofacial changes in blind cave-dwelling fish are mediated by genetically symmetric and asymmetric loci. *Genetics*, 196(4), 1303–1319. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.161661>
- Gross, J. B., & Powers, A. K. (2016). The Evolution of the Cavefish Craniofacial Complex. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish* (Vol. 1, Issue C). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.00010-4>
- Guisande, C., Pelayo-Villamil, P., Vera, M., Manjarrés-Hernández, A., Carvalho, M. R., Vari, R. P., Jiménez, L. F., Fernández, C., Martínez, P., Prieto-Piraquive, E., Granado-Lorencio, C., & Duque, S. R. (2012). Ecological factors and diversification among Neotropical characiforms. *International Journal of Ecology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/610419>
- Hausdorf, B., Wilkens, H., & Strecker, U. (2011). Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.03.009>
- Hendry, A. P. (2009). Ecological speciation! Or the lack thereof? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66(8), 1383–1398. <https://doi.org/10.1139/F09-074>
- Herman, A., Brandvain, Y., Weagley, J., Jeffery, W. R., Keene, A. C., Kono, T. J. Y., Bilandžija, H., Borowsky, R., Espinasa, L., Quin, O., Ornelas-garcía, C. P., Yoshizawa, M., & Carlson, B. (2019). related traits in Mexican tetra , *Astyanax mexicanus*. 27(22), 4397–4416. <https://doi.org/10.1111/mec.14877.The>
- Hubbs, C. L., & Innes, W. T. (1936). The first known blind fish of the family Characidae: a new genus from Mexico. *Occasional Papers of the Museum of Zoology*, 1, 1–14.
- Hulsey, C. D., & Wainwright, P. C. (2002). Projecting mechanics into morphospace: Disparity in the feeding system of labrid fishes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1488), 317–326. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1874>
- Jeffery, W. R. (2009). Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish William. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 25–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134216.Regressive>
- Jordan, C. B. (1946). *Anoptichthys* x *Astyanax* hybrids. *Aquarium*, 15, 198.
- Langerhans, R. B., & DeWitt, T. J. (2004). Shared and unique features of evolutionary diversification. *American Naturalist*, 164(3), 335–349. <https://doi.org/10.1086/422857>
- Larouche, O., Cloutier, R., & Zelditch, M. L. (2015). Head, Body and Fins: Patterns of Morphological Integration and Modularity in Fishes. *Evolutionary Biology*, 42(3), 296–311. <https://doi.org/10.1007/s11692-015-9324-9>

- Larouche, O., Zelditch, M. L., & Cloutier, R. (2018). Modularity promotes morphological divergence in ray-finned fishes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25715-y>
- Losos, J. B. (2008). Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*, 11(10), 995–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01229.x>
- Mitchell, R. W., Russell, W. H., & Elliott, W. R. (1977). *Mexican Eyeless Characin Fishes, Genus Astyanax: Environment, Distribution, and Evolution* (L. Texas (ed.); First, Issue February 1977). TEXAS TECH UNIVERSITY.
- Moran, D., Softley, R., & Warrant, E. J. (2015). The energetic cost of vision and the evolution of eyeless Mexican cavefish. *Science Advances*, 1(8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500363>
- Nosil, P. (2012). *Ecological speciation*. Oxford University Press.
- Ornelas-García, C. P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(340), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-340>
- Ornelas-García, C. P., Bastir, M., & Doadrio, I. (2014). Morphometric variation between two morphotypes within the *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Actinopterygii: Characidae) genus, From a Mexican tropical lake. *Journal of Morphology*, 275(7), 721–731. <https://doi.org/10.1002/jmor.20252>
- Ornelas-García, C. P., & Pedraza-Lara, C. (2016). Phylogeny and Evolutionary History of *Astyanax mexicanus*. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.00004-9>
- Ornelas-García, C. P., Bautista, A., Herder, F., & Doadrio, I. (2017). Functional modularity in lake-dwelling characin fishes of Mexico. *PeerJ*, 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.3851>
- Ornelas-García, C. P., Córdova-Tapia, F., Zambrano, L., Bermúdez-González, M. P., Mercado-Silva, N., Mendoza-Garfias, B., & Bautista, A. (2018). Trophic specialization and morphological divergence between two sympatric species in Lake Catemaco, Mexico. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4867–4875. <https://doi.org/10.1002/ece3.4042>
- Parsons, K. J., Son, Y. H., Crespel, A., Thambithurai, D., Killen, S., Harris, M. P., & Albertson, R. C. (2018). Conserved but flexible modularity in the zebrafish skull: Implications for craniofacial evolvability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1877), 1–10. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2671>
- Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3), 703–718. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[0703:USITET\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[0703:USITET]2.0.CO;2)
- Powers, A. K., Davis, E. M., Kaplan, S. A., & Gross, J. B. (2017). Cranial asymmetry arises later in the life history of the blind Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177419>

- Powers, A. K., Boggs, T. E., & Gross, J. B. (2018). Canal neuromast position prefigures developmental patterning of the suborbital bone series in *Astyanax* cave- and surface-dwelling fish. *Developmental Biology*, 441(2), 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.001>
- Powers, A. K., Berning, D. J., & Gross, J. B. (2020). Parallel evolution of regressive and constructive craniofacial traits across distinct populations of *Astyanax mexicanus* cavefish. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(7–8), 450–462. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22932>
- Revell, L. J., Harmon, L. J., & Collar, D. C. (2008). Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Systematic Biology*, 57(4), 591–601. <https://doi.org/10.1080/10635150802302427>
- Roa-Fuentes, C. A., Casatti, L., & Romero, R. de M. (2015). Phylogenetic signal and major ecological shifts in the ecomorphological structure of stream fish in two river basins in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 13(1), 165–178. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140045>
- Schluter, D. (2000). *The ecology of adaptive radiation (primera)*. Oxford series of Ecology and Evolution.
- Schluter, D., Clifford, E. A., Nemethy, M., & McKinnon, J. S. (2004). Parallel evolution and inheritance of quantitative traits. *American Naturalist*, 163(6), 809–822. <https://doi.org/10.1086/383621>
- Silva, M. S., ins, R. P. M., & Ferreira, R. L. (2011). Trophic dynamics in a neotropical limestone cave. *Subterranean Biology*, 9(1), 127–138. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.9.2515>
- Simões, M. H., Souza-Silva, M., & Ferreira, R. L. (2015). Cave physical attributes influencing the structure of terrestrial invertebrate communities in Neotropics. *Subterranean Biology*, 16, 103–121. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.16.5470>
- Soares, D., & Niemiller, M. L. (2020). Extreme Adaptation in Caves. *Anatomical Record*, 303(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/ar.24044>
- Strecker, U., Bernatchez, L., & Wilkens, H. (2003). Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology*, 12(3), 699–710. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01753.x>
- Strecker, U., Faúndez, V. H., & Wilkens, H. (2004). Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(2), 469–481. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.001>
- Tabin, C. J. (2016). Introduction: The Emergence of the Mexican Cavefish as an Important Model System for Understanding Phenotypic Evolution. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.09999-0>
- Vander Zanden, M. J., & Rasmussen, J. B. (1999). Primary consumer ($\delta^{13}\text{C}$) and ($\delta^{15}\text{N}$) and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology*, 80(4), 1395–1404.
- Vidal-García, M., & Scott Keogh, J. (2017). Phylogenetic conservatism in skulls and evolutionary lability in limbs - Morphological evolution across an ancient frog radiation is shaped by diet, locomotion and burrowing. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0993-0>
- Villéger, S., Miranda, J. R., Hernández, D. F., & Mouillot, D. (2010). Contrasting changes in taxonomie vs. functional diversity of tropical fish communities after habitat degradation. *Ecological Applications*, 20(6), 1512–1522. <https://doi.org/10.1890/09-1310.1>

- Vitt, L. J., & Pianka, E. R. (2005). Deep history impacts present-day ecology and biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7877–7881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501104102>
- Wagner, G. P., & Altenberg, L. (1996). Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50(3), 967–976. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02339.x>
- Warton, D. I., Wright, I. J., Falster, D. S., & Westoby, M. (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 259–291. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007007>
- White, B. W., & Culver, D. C. (2012). *Encyclopedia of Caves* (B. W. White & D. C. Culver (eds.); Second). Academic Press of Elsevier. www.elsevier.com
- Wilkens, H. (1988). Evolution and Genetics of Epigeal and Cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Evolutionary Biology*, May, 271–367. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1043-3_8
- Wilkens, H., & Strecker, U. (2017). Evolution in the Dark: Introduction. In *Evolution in the Dark*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54512-6_1
- Yamamoto, Y., & Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science*, 289(5479), 631–633. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.631>
- Yoffe, M., Patel, K., Palia, E., Kolawole, S., Streets, A., Haspel, G., & Soares, D. (2020). Morphological malleability of the lateral line allows for surface fish (*Astyanax mexicanus*) adaptation to cave environments. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(7–8), 511–517. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22953>
- Zanne, A. E., Chapman, C. A., & Kitajima, K. (2005). Evolutionary and ecological correlates of early seedling morphology in East African trees and shrubs. In *American Journal of Botany* (Vol. 92, Issue 6). <https://doi.org/10.3732/ajb.92.6.972>
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press San Diego, 95, 443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVERSIDAD MORFOLÓGICA Y SEÑAL FILOGENÉTICA DE LA
FORMA ENTRE LINAJES DE LA SARDINITA MEXICANA *ASTYANAX
MEXICANUS* (ACTINOPTERYGII; CHARACIDAE) EN EL NOROESTE
DE MÉXICO.**

TESIS

Que para obtener el grado académico de:
Maestro en Ciencias

Presenta:
JORGE HERNÁNDEZ LOZANO

Tutora principal:
Dra. Claudia Patricia Ornelas García, Instituto de Biología de la UNAM

Comité tutor:
Dr. Píndaro Díaz Jaimes, Instituto de Ciencias del mar y Limnología
Dr. Roberto Munguía Steyer, Facultad de Estudios Superiores de Iztacala

Jurado:
Dra. Gabriela Parra Olea, Instituto de Biología de la UNAM
Dr. Norman Mercado Silva, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

MÉXICO, CD. MX. DICIEMBRE, 2021

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología y al Instituto de Biología de la UNAM por brindarme la oportunidad de realizar esta maestría.

Agradezco el apoyo y financiamiento a esta investigación a través de los proyectos de PAPIIT IN212419 y al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Agradezco enormemente a mi tutora principal la Dra. Claudia Patricia Ornelas García (IBUNAM) por su dirección, consejo y apoyo durante la realización de esta tesis de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial, compuesto por el Dr. Díaz Jaimes Píndaro (ICML, U.N.A.M) y el Dr. Roberto Munguía Steyer (FES Iztacala), así como a los miembros de mi jurado de grado, la Dra. Gabriela Parra Olea (IBUNAM) y el Dr. Norman Mercado Silva (UAEM) por el constante apoyo y consejo.

Agradecimientos personales

Le dedico este trabajo de investigación a mi familia, que me ha apoyado en todo momento y en las etapas más difíciles de este ciclo. A mis padres, abuelos y tíos que me han soportado en todo momento. Pero sobre todo a mi hermana Montserrat Hernández Lozano, que tiene una voluntad inquebrantable y a mis pequeños sobrinos (Dominic, Nicole y Romina) que son el futuro de México.

Agradezco mucho a todas las amistades y compañeros nuevos que se forjaron durante el camino, empezando por la Dra. Patricia que me enseñó el maravilloso modelo de investigación que son los *Astyanax*. A Carlos, Marco, Jazmín, Alberto, Víctor, Sandra, Jessica, Vladimir y Angélica, gracias por todo el apoyo en las buenas y en las malas.

A esas amistades entrañables, que a pesar del tiempo y las responsabilidades laborales se mantienen firmes (*i.e.* los jinetes del caos, los de vallejo, los del CCH, etc.). Enfatizando en Ramón, Arely y Aketzali que estuvieron durante todo el proceso. Así como a las nuevas amistades que se generaron en el camino, durante las noches de relajación (Ruisseñor, Mike, Navi y Gustavo). Finalmente, a un par de personas del otro lado del charco que conocí en las etapas finales de este escrito (durante una salida al campo), a pesar de que ha sido poco el tiempo de conocerles les tomé mucha estima y cariño, así es, me refiero a la pequeña Lucia y a Silvia que cuidó de nosotros cual mamá responsable.

Dedicatoria especial a Francisco Martínez (Yoshi) e Isaac Miranda (mi tío), increíbles personas que la pandemia por COVID-19 no les permitió ver el final de este trabajo, en paz descansen.

Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción general.....	5
Objetivo.....	11
Objetivos específicos	11
Área de estudio.....	12
CAPÍTULO I: Variación fenotípica.....	16
Introducción.....	16
Métodos.....	19
Resultados.....	25
Discusión.....	37
Conclusión.....	44
Bibliografía.....	45
CAPÍTULO II: Ecología trófica.....	49
Introducción.....	49
Métodos.....	52
Resultados.....	58
Discusión.....	65
Conclusión.....	70
Bibliografía	71
CAPÍTULO III: Procesos que afectan la evolución morfológica.....	74
Introducción.....	74
Métodos.....	77
Resultados.....	81
Discusión.....	86
Conclusiones.....	90
Bibliografía.....	91
Discusión general	96
Conclusiones generales.....	104
Bibliografía.....	105

Resumen

La sardinita mexicana, *Astyanax mexicanus*, es un organismo modelo en biología evolutiva, debido a que dentro de la especie encontramos dos morfotipos asociados al ambiente donde viven: la forma de superficie y la forma troglobia. El morfotipo troglobio ha sido reportado en al menos 32 cuevas distintas entre los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas. Estudios genéticos recientes sugieren que podrían haberse originado en al menos dos episodios distintos, correspondientes con dos linajes genéticos, denominados como el “linaje viejo” y “linaje nuevo”.

A fin de entender los patrones de evolución morfológica en la especie, en este estudio se caracterizaron aquellos rasgos que han surgido de forma independiente entre linajes cercanamente relacionados, cuando son expuestos a presiones selectivas similares (e.g. cuevas), mediante diversos análisis morfométricos. Además, se evaluó la ecología trófica por medio del estudio de isótopos estables y su relación con la ecomorfología, junto con la construcción de un índice de entrada de nutrientes para conocer el impacto de las características físicas de la cueva en la dinámica ecológica. Y finalmente, se evaluaron los mecanismos relacionados con las fuentes de variación fenotípica (i.e. modularidad como promotor de la diversidad, y la señal filogenética como evidencia de limitación por la contingencia histórica).

Los resultados de esta tesis encontraron patrones de evolución morfológica en paralelo en la ecomorfología, la premaxila, el cuerpo y la cabeza en los dos linajes de los *Astyanax mexicanus* troglobios, generando una forma troglobia que los distingue de su homólogo de superficie, siendo la forma de la cabeza donde encontramos la mayor diferenciación morfológica, seguido de la premaxila y por último, la forma del cuerpo. Se encontraron diferencias en las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ en los niveles de enriquecimiento entre poblaciones y regiones geográficas, los valores obtenidos sugieren que el nivel trófico y la base de carbono es similar en todas las cuevas. No hubo una correlación entre la señal isotópica y la ecomorfología, además, observamos una tendencia que indica que las características físicas de las cuevas podrían afectar la dinámica ecológica de cada una de ellas. Finalmente, encontramos evidencia de evolución modular para la forma del cuerpo y la forma de la cabeza, observando patrones diferentes entre los morfotipos. Para el morfotipo troglobio, las mejores hipótesis dividen al cuerpo en dos (cabeza y cuerpo) y tres módulos (cabeza,

parte media del cuerpo y cauda), siendo en ambos casos módulos que pueden tener una asociación en la obtención de recursos, así como locomoción y uso de hábitat. En el morfotipo de superficie, contrastó principalmente en la integración presente en la zona caudal y la región media del cuerpo, exhibiendo más una adaptación a las funciones locomotoras. Estas diferencias observadas entre morfotipos podrían ser evidencia de las diferentes presiones selectivas ejercidas en cada ambiente, alterando la evolución modular entre morfotipos. En el caso de la señal filogenética, se observó que no hay un efecto filogenético en la forma del cuerpo, lo que podría deberse a una evolución homoplásica de la forma en respuesta de las presiones selectivas contrastantes del ambiente. En la premaxila sí encontramos señal filogenética, por lo que esta estructura si tiene conservadurismo relacionado con su historia evolutiva y probablemente con su función ecológica.

Abstract

The Mexican sardine, *Astyanax mexicanus*, is a model organism in evolutionary biology, due to the fact that within the species we find two morphotypes associated with the environment where they live: the surface form and the troglobian form. The troglobian morphotype has been reported in at least 32 different caves between the states of San Luis Potosí and Tamaulipas. Recent genetic studies suggest that they could have originated in at least two different episodes, corresponding to two genetic lineages, named the “old lineage” and the “new lineage”.

In order to understand the patterns of morphological evolution in the species, in this study were characterized those traits that have arisen independently between closely related lineages, when exposed to similar selective pressures (e.g. caves), through morphometric analyzes. In addition, the trophic ecology was evaluated through the study of stable isotopes and their relationship with ecomorphology, together with the construction of a nutrient input index to know the impact of the physical characteristics of the cave on the ecological dynamics. Finally, the mechanisms related to the sources of phenotypic variation (i.e. modularity as a promoter of diversity, and the phylogenetic signal as evidence of limitation due to historical contingency) were evaluated.

The results of this thesis found patterns of parallel morphological evolution in the ecomorphology, the premaxilla, the body and the head in the two lineages of the *Astyanax mexicanus* cavefish, generating a troglobian form that distinguishes them from their surface counterpart, being the shape of the head where we find the greatest morphological differentiation, followed by the premaxilla and finally, the shape of the body. Differences were found in isotopic signals $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ enrichment levels between populations and geographic regions, but the values obtained suggest the trophic level and the base carbon is similar in all the caves. There was no correlation between the isotopic signal and the ecomorphology, in addition, we observed a trend that indicates that the physical characteristics of the caves could affect the ecological dynamics of each cave. Finally, we found evidence of modular evolution for body shape and head shape, observing different patterns between morphotypes. For the troglobian morphotype, the best hypotheses divide the body into two (head and body) and three modules (head, middle part of the body and caudal), being in both cases modules that may have an association in obtaining resources, as well as locomotion

and habitat use. In the surface morphotype, it mainly contrasted in the integration present in the caudal zone and the middle region of the body, exhibiting more an adaptation to locomotor functions. These differences observed between morphotypes could be evidence of the different pressures exerted in each environment, altering the modular evolution between morphotypes. In the case of the phylogenetic signal, it was observed that there is no phylogenetic effect on the body shape, which could be due to a homoplasy evolution of the shape in response to the selective pressures of the environment. In the premaxilla we find a phylogenetic signal, so this structure does have conservatism related to its evolutionary history and probably its ecological function.

Introducción general

*El complejo *Astyanax mexicanus**

El género *Astyanax* es conformado por peces pertenecientes a la clase Actinopterygii, Orden Characiformes y familia Characidae, presenta una gran diversidad con al menos 200 especies reconocidas (Eschmeyer, revisado en 2021). Posee la distribución más amplia en esta familia para el continente americano, y sus especies se localizan en diferentes cuerpos de agua desde la Patagonia en Argentina hasta el sur de Estados Unidos (Ornelas-García *et al.*, 2008; Eschmeyer, revisado en 2021). Se caracteriza por tener alta plasticidad fenotípica y una gran capacidad de adaptación a diversos hábitats, lo que puede promover su alta riqueza específica (Ornelas-García *et al.* 2008; Jeffery, 2009). En México, se puede encontrar al género *Astyanax* en una gran diversidad de cuerpos de agua de todo el país, siendo de particular interés la sardinita mexicana, *Astyanax mexicanus*, la cual presenta dos formas: una de superficie y una de cueva que son interfértiles entre sí (Jordan, 1946). La forma de superficie está ampliamente distribuida en la región norte del país, desde las cuencas de los ríos Tecolutla y Paso de Ovejas en la vertiente Atlántica, y la cuenca del Nazas-Aguanaval en la vertiente Pacífica (Ornelas-García y Pedraza, 2016). Mientras que la forma de cueva ha sido reportada en la región noroeste de México, en al menos 32 cuevas que se ubican en la Sierra de El Abra y la sierra de la Colmena en San Luis Potosí; y en la Sierra de Guatemala en Tamaulipas (Mitchell *et al.*, 1977; Elliot, 2018; Espinasa *et al.*, 2020), y una población al sur de la faja volcánica transmexicana en la cuenca del río Balsas, en la localidad de Granada (Elliott, 2018).

A las poblaciones que habitan dentro de estas cuevas se les conoce como cavernícolas o troglobias, y presentan una gran cantidad de adaptaciones a las condiciones extremas que enfrentan (Jeffery, 2009). Estas adaptaciones pueden ser regresivas: reducción o ausencia del ojo, albinismo; o constructivas: desarrollo de células sensoriales, un sistema gustativo más sensible (Wilkens, 1988; Jeffery, 2009; Tabin, 2016). Aunado a dichas características morfológicas se han propuesto una serie de adaptaciones conductuales, las cuales se conocen como “síndrome de

cueva”, entre los que se destacan modificaciones en los ciclos del sueño, falta de agresividad, entre otros (Dubuoé *et al.*, 2012; Elipot *et al.*, 2014).

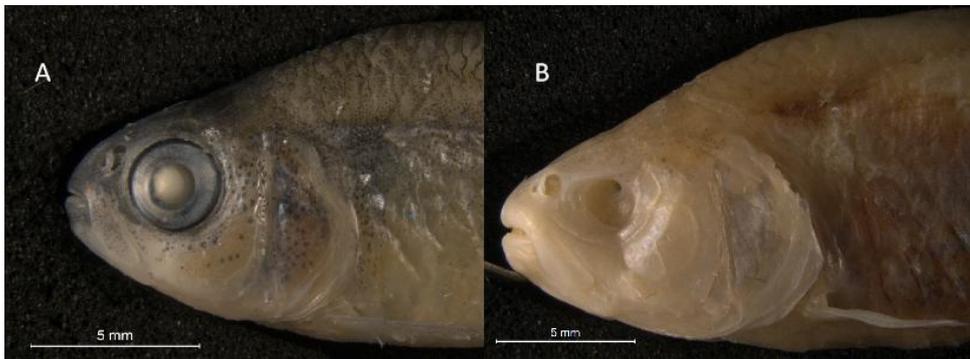


Fig. 1 Los dos morfotipos de *Astyanax mexicanus*. A) La forma de Superficie. B) La forma Troglobia

Historia evolutiva del grupo

La primera forma troglobia fue descubierta en la Cueva Chica en la región de la Sierra de El Abra en 1936 (Mitchell *et al.*, 1977) y debido a las marcadas diferencias con el grupo de superficie (principalmente la falta del ojo y de pigmentación) se le denominó como un género y especie distinta “*Anoptichthys jordani*” (Hubbs e Inés, 1937). Posteriormente, otras poblaciones de cuevas también fueron descritas como diferentes especies: *A. antrobius* (Álvarez, 1946) para la cueva El Pachón y *A. hubbsi* (Álvarez, 1947) para la Cueva de Los Sabinos, hasta que se demostró la interfertilidad con las poblaciones de superficie (Jordan, 1946), lo que tuvo como resultado el cambio al género *Astyanax*. La comunidad científica ha reportado la existencia de múltiples linajes genéticos para las poblaciones que habitan en las cuevas (Wilkens, 1988; Ornelas-García *et al.*, 2008; Strecker *et al.*, 2004; Coghill *et al.*, 2014; Herman *et al.*, 2018). Con el objetivo de esclarecer la historia evolutiva de estas poblaciones, se han utilizado diversos marcadores moleculares (mitocondriales -COI, ND2 Cytb-, los microsatélites y SNP’s del genoma completo), obteniendo como resultado diferentes reconstrucciones históricas y evidenciando el efecto tanto de los marcadores utilizados, como del muestreo (Bradic *et al.*, 2012; Bradic *et al.*, 2013; Wilkens *et al.*, 2003; Hausdorf, 2011).

Wilkens (1988) fue el primer autor en referirse a las poblaciones troglobias como dos linajes: el linaje filogenéticamente “viejo”, que hace referencia a las poblaciones más antiguas, y el filogenéticamente “joven”, para las poblaciones más recientes, con

base en marcadores moleculares y el grados de regresión evolutiva que observaron hasta el momento en las distintas poblaciones. De este modo, el “linaje viejo” eran peces con altos niveles de regresión evolutiva y lo componían las poblaciones de: Pachón, Sabinos, Tinaja, Yerbaniz, Piedras, mientras que el “linaje joven” estaba más relacionado con la forma de superficie, aunque en ese entonces sólo contaba con una población de Micos, en la Sierra de la Colmena. Varios autores sostienen la idea de que existían al menos dos grupos genéticos en las poblaciones troglobias, como es el caso de Dowling *et al.* (2002) que reportaron la separación de las poblaciones troglobias en dos linajes, denominados como el linaje A (Chica, Subterráneo y Pachón que se agrupaban con las poblaciones de superficie) y el linaje B (Curva, Tinaja y Sabinos). Strecker *et al.* (2003, 2004), también reportaron la separación de las poblaciones troglobias en dos grupos genéticos, siendo concordante con una clasificación artificial que asignaron con base en el grado de regresión evolutiva denominada SEP (ausencia fuerte del ojo y pigmentación) y VEP (ausencia variable del ojo y pigmentación) utilizando la misma clasificación que Wilkens de un linaje viejo y uno joven. Ornelas-García *et al.* (2008), encontraron que las poblaciones troglobias se repartían en dos linajes genéticos, además, cada linaje contaba con poblaciones de superficie, y los denominaron como “linaje viejo” (Grupo Sabinos Mezquital: Piedra, Tinaja, Sabinos + Rascón) y “linaje nuevo” (Grupo Pánuco-Tuxpan: Chica, Yerbaniz, Pachon, Molino, Micos + Superficie). Por otro lado, Coghil *et al.* (2014) reportaron la existencia de 4 linajes, formados por diferentes poblaciones troglobias, de las cuales, sólo la población de Sabinos era un grupo aislado del resto de las demás poblaciones. Fumey *et al.* (2018) negaron la existencia de dos linajes, argumentando que los marcadores no daban evidencia suficiente de que fueran grupos genéticos distintos. Sin embargo, Hermán *et al.* (2018), utilizando datos genómicos, recuperaron la existencia de dos grupos genéticos, soportando la existencia del linaje Viejo (formado por Pachón, Chica y la población de superficie Rascón) y linaje Nuevo (formado por Molino y la población de superficie Coy).

Aunque existe una gran controversia acerca del tiempo y modo de colonización de las poblaciones troglobias por parte de su ancestro de superficie, la comunidad científica está de acuerdo en que la adaptación a los ambientes de cueva ha ocurrido en múltiples eventos independientes, siendo una de las hipótesis más aceptadas que la evolución a las cuevas han sucedido en al menos dos eventos distintos a partir de

dos diferentes linajes, de este modo, las poblaciones del “linaje viejo” fueron las primeras en colonizar las cuevas y se asocia con el periodo de colonización más antiguo a las cuevas de la Sierra de El Abra, en San Luis Potosí (Wilkins, 1988; Strecker *et al.*, 2004.; Ornelas García *et al.*, 2008; Bradic *et al.*, 2012; Herman *et al.*, 2018). Por otro lado, el “linaje nuevo” se refiere a los eventos de colonización más recientes, asociado a los eventos invasivos en la Sierra de Guatemala y la Colmena (Ornelas García *et al.*, 2008; Bradic *et al.*, 2012; Herman *et al.*, 2018). Con base en lo anterior, se reconoce la existencia de dos linajes genéticos en las poblaciones de *Astyanax* al noroeste de México. Ambos linajes están conformados por la forma de Superficie y la Troglobia, además que tienen eventos de colonización independientes, y por lo tanto, orígenes distintos (Fig. 2).

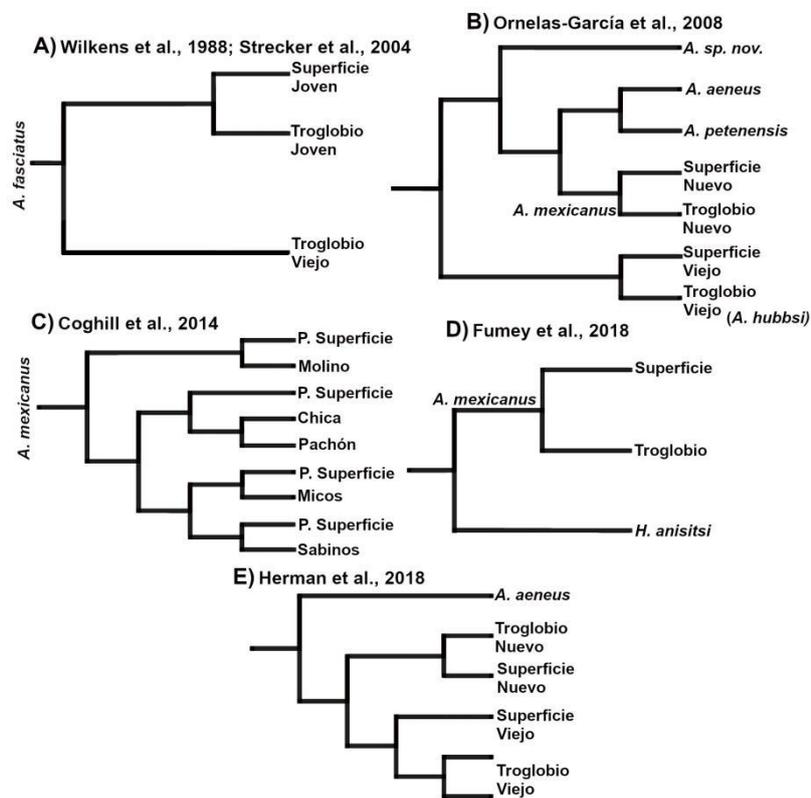


Fig. 2 Resumen de diferentes historias evolutivas reportadas por la comunidad científica

Astyanax como organismo modelo para la evolución en paralelo

Se puede considerar a los *Astyanax* troglobios como un excelente organismo modelo para el estudio de la evolución morfológica en paralelo, que es definida como la evolución independiente del mismo rasgo en linajes estrechamente relacionados (Futuyma, 1986), debido una serie de propiedades: 1) las diversas poblaciones

existentes en varias cuevas, las cuales presentan adaptaciones a estos ambientes extremos. 2) El reconocimiento de dos linajes genéticos, lo que implica que las poblaciones troglobias han evolucionado de forma independiente, desarrollando de manera aislada las características morfológicas que han garantizado su supervivencia. 3) Cada linaje presenta la forma troglobia y de superficie, lo cual brinda una comparación directa entre la forma troglobia y la forma grupo hermano de superficie que habitan en ambientes contrastantes (Tabin, 2016). En cuanto a los estudios de caracterización morfológica dentro de este grupo, podemos ver que los primeros trabajos se enfocaron en la descripción morfológica de los organismos, resaltando las diferencias apreciables en los peces al compararlos con los peces de superficie, como el albinismo, la falta de la estructura ocular, la forma del cráneo (Véase: Hubs & Ines, 1936; Álvarez, 1946; 1947; Mitchell *et al.*, 1977). Además se reportó una tendencia de disminución de ciertos rasgos merísticos para los peces troglobios, como el número de vértebras y el número de escamas (tanto en en la línea lateral como en el número de filas verticales), además, las escamas tienen un tamaño menor y ya no está tan profundamente incrustada en la piel como en la forma de superficie (Wilkins, 1988).

Sin duda, muchas de las modificaciones más conspicuas están relacionadas con la pérdida de la visión, la cual ha sido estudiada con un enfoque de biología del desarrollo, logrando caracterizar sus bases genéticas e identificando una gran cantidad de genes que se ven involucrados en el desarrollo y pérdida del ojo (eg. Sonic the Hedgehog -*SHH*- afecta directamente el tamaño de la copa ocular), proporcionando un excelente modelo de la evolución de rasgos complejos constructivos y regresivos (Wilkins & Strecker, 2017; Yamamoto & Jeffery, 2000). Aunado a lo anterior, y junto con otras condiciones selectivas de las cuevas, se ha sugerido que las estructuras óseas que rodean a la cuenca ocular, es decir los huesos supraorbitales y suborbitales, presentan diferencias en el tamaño y la forma entre la forma de cuevas vs. superficie (Yamamoto *et al.*, 2003; Dufton *et al.*, 2012). Además, se ha sugerido una serie de fragmentaciones (Alvarez, 1946; 1947; Mitchell *et al.*, 1977; Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2018) y fusiones de los huesos suborbitales (Mitchell *et al.*, 1977; Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2018), llegando a ocupar una posición diferente en el cráneo de

los peces troglobios, o incluso carecer de un hueso suborbital (Yamamoto *et al.*, 2003; Powers *et al.*, 2018; 2020).

También se han reportado modificaciones en la cabeza que no están relacionadas con la pérdida de la visión, como: el incremento en el número de células sensoriales, denominadas neuromastos (Protas *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2018; Yoffe *et al.*, 2020), un incremento en el tamaño de las fosas nasales (Yamamoto *et al.*, 2003), el incremento de la cavidad bucal (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005), y la presencia de una asimetría bilateral en el cráneo en las poblaciones troglobias (Gross *et al.*, 2014; 2016; Powers *et al.*, 2018; 2020). Y por supuesto, algunos rasgos morfológicos asociados a hábitos tróficos, como: un mayor número de dientes en la maxila y la mandíbula inferior de los peces troglobios (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005; Protas *et al.*, 2008), así como un mayor tamaño de la mandíbula inferior (Trapani *et al.*, 2005; Dufton *et al.*, 2012). Estas modificaciones morfológicas antes mencionadas pueden variar entre poblaciones troglobias (Yamamoto *et al.*, 2003; Powers *et al.*, 2020), llegando a la conclusión que han respondido a diferentes presiones selectivas ambientales, afectando las adaptaciones funcionales de los organismos troglobios, e.g. la poca concentración de oxígeno en las cuevas (Yamamoto *et al.*, 2003; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2020; Boggs & Gross, 2021).

En esta tesis se presenta una oportunidad única ya que nos permite explorar a grandes rasgos la variación morfológica asociada a ambientes extremos por parte de los dos linajes presentes en las poblaciones troglobias de *Astyanax* al noroeste de México, siendo el trabajo que más poblaciones troglobias ha analizado (ver tabla 1). Con el fin de encontrar patrones de evolución morfológica en paralelo asociada a aspectos ecológicos (e.g. locomoción y explotación de recursos), y su correlación con las señales de isótopos estables entre diferentes poblaciones de cuevas, así como explorar los mecanismos que pueden dar origen a dichos patrones de variación morfológica, tales como la modularidad y la inercia filogenética, tanto en la forma de las estructuras tróficas (premaxila), la forma del cuerpo y la forma de la cabeza.

Objetivo

Evaluar la existencia de evolución morfológica en paralelo entre los linajes troglobios de *Astyanax mexicanus*, mediante la caracterización de la ecomorfología y del morfoespacio en las formas de la premaxila, del cuerpo y la cabeza. Además, de determinar la ecología trófica y su relación con la ecomorfología entre poblaciones troglobias utilizando isótopos estables. Finalmente, estimar los mecanismos relacionados con las fuentes de variación fenotípica (*i.e.* modularidad y señal filogenética) en ambientes contrastantes (hábitats de cueva vs. de superficie).

Objetivos específicos

- 1) Evaluar patrones de variación morfológica en paralelo en los diferentes linajes de *Astyanax mexicanus* en ambientes de cuevas, a través de la evaluación merística y morfometría de la diversidad ecomorfológica (*e.g.* uso de hábitat y adquisición de recursos) de la forma de la premaxila, el cuerpo y la cabeza.
- 2) Evaluar la ecología trófica en siete poblaciones de cuevas mediante el estudio de las señales isotópicas $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de *A. mexicanus*, y su asociación con la ecomorfología de dichas poblaciones. Así como evaluar si las características físicas de las cuevas tienen un efecto en el enriquecimiento de las señales isotópicas.
- 3) Evaluar los mecanismos relacionados con las fuentes de variación fenotípica: 1) evaluar la presencia de modularidad como un mecanismo que promueve esta variación para la forma del cuerpo y la cabeza; y 2) estimar la señal filogenética en los patrones de diversidad morfológica de la forma de la premaxila y del cuerpo en los dos linajes de *A. mexicanus* bajo condiciones ambientales contrastantes.

Área de estudio

La Sierra de El Abra y la Sierra de la Colmena se ubican en San Luis Potosí, al norte de estas sierras se encuentra la Sierra de Guatemala en Tamaulipas, México. Estos sistemas geográficos son Kársticos (una forma de relieve originada por meteorización química de determinadas rocas, como la caliza), por lo tanto son altamente cavernosos (Mitchell *et al.*, 1977). Estas regiones se encuentran en dos grandes reservas de la biósfera: la Reserva de la de Sierra de El Abra-Tanchipa y la Reserva de El Cielo, respectivamente (Elliot, 2018), las cuales son muy importantes para la preservación de la vida silvestre, así como la conservación de las características Kársticas de la región (Mitchell *et al.*, 1977).

La Sierra de El Abra se encuentra aproximadamente a 150 kilómetros de la costa del Golfo de México y se extiende por unos 125 kilómetros en una dirección generalmente de norte a sur. Está en el límite de dos provincias fisiográficas, la Llanura Costera del Golfo al Este y la Sierra Madre Oriental al Oeste (Mitchell *et al.*, 1977). La Sierra de Guatemala se encuentra en el estado de Tamaulipas, abarcando las regiones de Chamal, Ocampo y Gómez-Farías (Elliot, 2018). El anticlinal más amplio que forma la Sierra de Guatemala se eleva en el extremo norte del Valle de Antiguo Morelos y es físicamente continuo tanto con la Sierra de El Abra como con la Sierra de Nicolás Pérez. Alcanza alturas de unos 2,200 metros al norte de Chamal. Las expediciones en las cuevas dentro de esta cordillera han sido pocas, debido a la gran dificultad para moverse en la cordillera. Mitchell *et al.* (1977) denominó a la caliza de la Sierra de Guatemala (las rocas que componen la mayor parte de la Sierra de Guatemala) como "Caliza El Abra", porque son idénticas en origen a las que se encuentran en la Sierra de El Abra. Y, la Sierra de la Colmena se encuentra en San Luis Potosí, en la región de Micos. Es un afloramiento de piedra caliza que delimita un área estrecha y se extiende hacia el sur (Mitchell *et al.*, 1977).

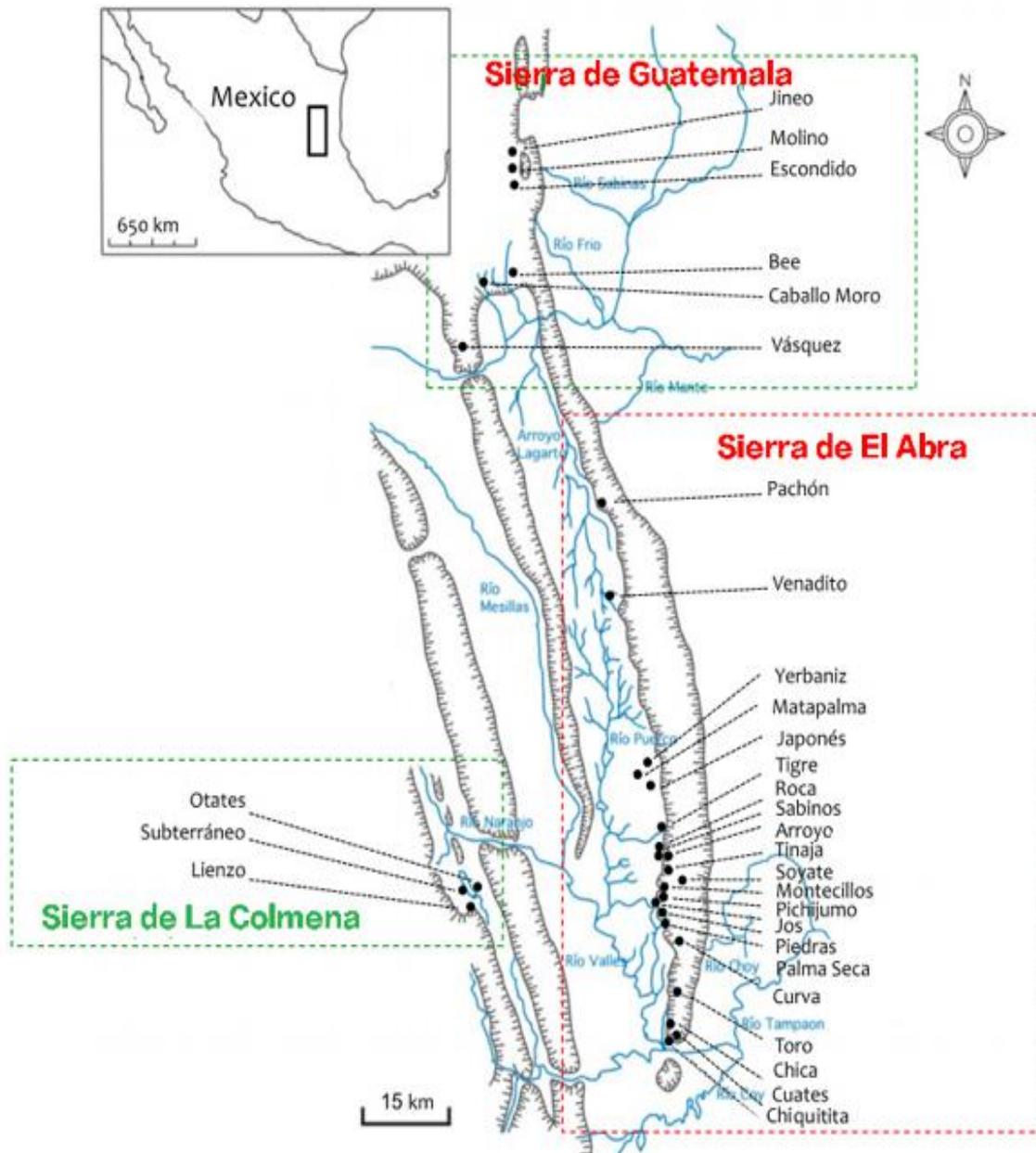


Fig. 3 Mapa de las poblaciones troglobias de *Astyanax*. Los nombres escritos en color negro representan al las poblaciones de cuevas. Nombres en azul, son las poblaciones de superficie. En la Sierra de El Abra, La Sierra de Guatemala y La Sierra de la Colmena, en los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas. Modificado de Gross (2012).

El presente trabajo incluye organismos de 31 localidades pertenecientes a los tres sistemas geográficos (tabla 1). Estos fueron obtenidos en diferentes salidas al campo, en un periodo de tiempo que comprende del año 2015 al año 2020. Todas las muestras fueron colectadas bajo las indicaciones del permiso de colecta SGPA/DGVS/02438/16, otorgado por SEMARNAT. Los especímenes fueron pescados usando redes de mano, se mantuvieron vivos y fueron transportados con

agua de su medio a un lugar con condiciones semi-estériles, donde fueron sacrificados según las condiciones del permiso de colecta. Eventualmente fueron transportados al Instituto de Biología para el procesamiento de los diferentes análisis.

Tabla 1. Lista de las localidades utilizadas para este trabajo. Adicionalmente, se agregó el tamaño de muestra que se utilizó de cada localidad para los diferentes análisis.

Población	Región	Hábitat	Linaje	Morfotipo	EM (n)	MGP (n)	MGC (n)	MCab (n)	ET (n)	SF (n)
Arroyo	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	10	11	6	0	0	5
Chica	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	8	8	7	15	0	5
Chiquitita	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	1	2	0	0	0	2
Toro	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	0	0	0	3	0	5
Sabinos	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	10	13	6	1	0	5
Jos	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	8	10	9	0	0	5
Montecillos	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	9	14	10	0	3	3
Tigre	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	5	5	7	0	0	5
Palma Seca	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	3	5	0	0	13	5
Tinaja	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	10	10	16	7	0	5
Japonés	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	10	9	5	2	0	4
Yerbaniz	El Abra	Cueva	Viejo	Híbrido	2	3	9	5	5	7
Pachón	El Abra	Cueva	Viejo	Troglobio	13	12	14	3	0	5
Rascón	El Abra	Río	Viejo	Superficie	11	11	10	8	0	6
Otates	El Abra	Río	Viejo	Superficie	10	10	0	0	0	0
Peroles	El Abra	Río	Viejo	Superficie	9	9	0	4	0	5
Tamasopo	El Abra	Río	Viejo	Superficie	1	1	0	0	0	6
Tampaon	El Abra	Río	Viejo	Superficie	6	6	0	0	0	0
Puente de Dios	El Abra	Río	Nuevo	Superficie	7	9	0	0	0	0
Rancho viejo	El Abra	Río	Nuevo	Superficie	9	9	0	14	0	0
Río Florido	El Abra	Río	Nuevo	Superficie	6	6	0	0	0	0
Escondido	Guatemala	Cueva	Nuevo	Troglobio	9	11	5	0	8	5
Jineo	Guatemala	Cueva	Nuevo	Troglobio	2	2	5	2	0	5
Molino	Guatemala	Cueva	Nuevo	Troglobio	11	12	7	7	8	5
Caballo Moro	Guatemala	Cueva	Nuevo	Híbrido	11	15	12	5	5	5
Vásquez	Guatemala	Cueva	Nuevo	Troglobio	10	10	10	0	5	5

Tabla 1. (Continuación) Lista de todas las localidades utilizadas para este trabajo. Adicionalmente, se agregó el tamaño de muestra que se utilizó de cada localidad para los diferentes análisis.

Nac. Mante	Guatemala	Río	Nuevo	Superficie	4	5	0	0	0	0
Río Sabinas	Guatemala	Río	Nuevo	Superficie	13	12	0	0	0	2
Subterráneo	La Colmena	Cueva	Nuevo	Híbrido	14	13	10	10	0	5
Santa Anita	La Colmena	Río	Nuevo	Superficie	13	12	0	3	0	2
Jalpan	Querétaro	Río	Nuevo	Superficie	5	5	11	1	0	0

n = Tamaño de la muestra, EM = Ecomorfología, MGP = Morfometría geométrica de la premaxila, MGC = Morfometría geométrica del cuerpo, MCab = Morfometría geométrica de la cabeza, ET = Ecología trófica y SF = Señal filogenética.

CAPÍTULO I: Variación fenotípica

Introducción

Las características fenotípicas varían ampliamente entre los diversos organismos que interactúan en su medio, mostrando la gran diversidad presente en todos los seres vivos (Núñez, 2003). Algunas de estas se ven afectadas por factores genéticos y ambientales, estos rasgos pueden ser discretos (e.g el color, conteo de estructuras) o continuos. A la variación observable en estas características cuantitativas (como el tamaño), se le conoce como variación morfológica, que es simplemente la varianza en las medidas de dicho rasgo en los individuos de una población (Futuyma & Kirkpatrick, 2017). La morfología es una disciplina que estudia esta variación y se encarga de describir la apariencia externa (estructura, forma, tamaño, etc.) así como aspectos de las estructuras internas (i.e. órganos y estructuras óseas). Algunas de las aproximaciones para estudiar la variación morfológica son: 1) la morfología descriptiva, que se orienta a describir y comparar las diferentes formas orgánicas bajo el contexto de la anatomía comparada, la disciplina que se centra en el análisis de las similitudes y las diferencias anatómicas de los seres vivos y que, se relaciona con la biología evolutiva (Lów *et al.*, 2016); 2) la morfología funcional, que se enfoca en describir y comparar la función de una forma orgánica o rasgo característico (Wake, 1972); 3) la morfología ecológica o ecomorfología, que estudia las interacciones entre la morfología y el ambiente (Wainwright, 1987; Wootton, 1992); y 4) la morfología evolutiva que busca estudiar la historia de la forma orgánica (adaptaciones, modificaciones, función; Riedl, 1978). En este último enfoque se estudia la disparidad morfológica de una especie o grupo, es decir, toda la variación morfológica observada en una especie o un conjunto de especies (taxa) que se vincula con los procesos evolutivos (Zelditch, 2004).

Por lo que el estudio del cambio morfológico es crucial para el entendimiento de cómo se produce la diversidad biológica en la naturaleza, sin embargo, investigaciones con enfoques evolutivos lidian con las consecuencias de la variación en las poblaciones, mientras que con menos frecuencia se ocupan de sus orígenes (Wagner & Altenberg, 1996). Un buen ejemplo para explorar la evolución morfológica son aquellos que proveen los organismos troglobios que se han adaptado a la vida cavernícola,

presentando adaptaciones muy específicas a sus condiciones ambientales (Culver, 2009; Jeffery, 2009). Las cuevas son consideradas como “ambientes extremos” debido a la oscuridad total y la ausencia de producción fotoautotrófica (Culver, 2009; Simon *et al.*, 2017). Asociados a estos ambientes los organismos troglobios proveen los mejores ejemplos conocidos de convergencia y regresión evolutiva, a pesar de la diversidad taxonómica (Culver, 2009; Jeffery, 2009; Bradic *et al.*, 2012). Algunas de las características convergentes entre estos organismos troglobios son: reducción o pérdida de la visión y pigmentación, la especialización e incremento de órganos sensoriales, alteraciones en ciclo circadiano, metabolismo, así como modificaciones importantes morfológicas del cráneo y cuerpo (Jeffery, 2009; Christiansen, 2012). México cuenta con una alta diversidad de peces troglobios, cuyas especies se incluyen en seis familias de peces: Heptapteridae (*Rhamdia*), Ictaluridae (*Priatella*), Poeciliidae (*Poecilia sulphuraria*), Characidae (*Astyanax*), Bythitidae (*Typhliasina pearsei*) y Synbranchidae (*Ophisternon infernale*). Todas estas especies, presentan diferentes grados de regresión evolutiva, tanto en pigmentación como en la pérdida de la visión y presentan en común diversas adaptaciones constructivas, cómo un incremento en los órganos sensoriales, que les han permitido adaptarse a la vida en las cuevas (Wilkins & Strecker, 2017). Entre todas estos grupos, resalta el género *Astyanax* que se ha convertido en un grupo modelo en ECO-EVO-DEVO y para el estudio de la evolución regresiva. Gracias a que presenta dos formas asociados a los diferentes ambientes: el morfotipo troglobio y el morfotipo de superficie, que han evolucionado de manera independiente en al menos dos linajes distintos, y los cuales son interfértiles, lo que ha permitido explorar las bases genéticas de las adaptaciones a cuevas (Tabin, 2016).

En el caso de los morfotipos troglobios de *Astyanax mexicanus*, se han reportado importantes modificaciones morfológicas que las distinguen del morfotipo de superficie como: La ausencia del ojo (Hubbs & Ines, 1936; Alvaréz, 1947), modificaciones de los huesos circundantes al ojo (Mitchell *et al.*, 1977; Yamamoto *et al.*, 2003; Protas, 2008; Gross *et al.* 2014; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2017; 2018), el albinismo (Hubbs e Ines, 1936; Alvaréz, 1947; Yoffe *et al.*, 2020), un mayor número de apéndices sensoriales (Powers *et al.*, 2020), número y tipo de escamas (Wilkins, 1988; Simon *et al.*, 2017). Los primeros estudios para este grupo se enfocaron en la descripción de rasgos tentativamente asociados con la pérdida de la

visión, como la forma de la estructura craneal, registrando fragmentaciones y fusiones en los huesos suborbitales que no se observan en sus grupos hermanos de superficie (Álvarez, 1946; 1947; Mitchell *et al.* 1977). Álvarez (1946), fue el primero en describir estos patrones muy inusuales en la forma del cráneo, su investigación es considerada como pionera en describir y abordar la evolución del complejo craneal de *Astyanax* (Gross & Powers, 2016). Rápidamente el organismo ganó gran popularidad como organismo modelo en investigaciones de biología del desarrollo y morfología funcional, logrando caracterizar las bases genéticas e identificando varios genes que se ven envueltos en la expresión y desarrollo del ojo (Yamamoto & Jeffery, 2000; Jeffery, 2009; Wilkens, 2017).

También se han reportado modificaciones en el cráneo que no se asocian con la pérdida de la visión, como: el incremento de los neuromastos (Protas *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2018; Yoffe *et al.*, 2020), el tamaño de las fosas nasales (Yamamoto *et al.*, 2003), el número de fragmentos que pueden llegar a tener los suborbitales (Yamamoto *et al.*, 2003, Gross *et al.*, 2016; Powers *et al.*, 2018; 2020), y su relación con la densidad de neuromastos (Powers *et al.*, 2020), el incremento de la cavidad bucal (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005), la presencia de una asimetría bilateral direccional en el cráneo en las poblaciones troglobias (Gross *et al.*, 2014; 2016; Powers *et al.*, 2018; 2020). Y aquellos rasgos morfológicos asociados con los hábitos tróficos, donde se ha descrito la presencia de un mayor número de dientes en la maxila y la mandíbula inferior en los peces troglobios (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005; Protas *et al.*, 2008), además, de que la mandíbula inferior presenta una talla mayor (Trapani *et al.*, 2005; Dufton *et al.*, 2012). En cuanto al desarrollo ontogénico de la dentición en poblaciones de *Astyanax mexicanus*, se ha descrito que las poblaciones troglobias presentan una transición en el número y tipo de dientes durante los primeros días de su vida (Trapani *et al.*, 2005), llegando a relacionar que esta transición permite a los peces troglobios presenten un mayor número de dientes y de cúspides, aunado también un dentario más largo (Trapani *et al.*, 2005; Dufton *et al.*, 2012; Atukorala *et al.*, 2013) y que la forma de la premaxila en *Astyanax* permite una dentición adaptada a sus hábitos alimenticios (Hamer *et al.*, 2016). Además se han reportado genes asociados a la expresión del número de dientes maxilares y el tamaño de la maxila mediante un análisis de QTL por sus siglas en inglés (quantitative trait loci) (Protas *et al.*, 2008; 2012).

En los últimos años, con los avances en la investigación obtenidos por la era genómica, se han podido hacer estudios que han permitido explorar las bases genéticas de las características troglobias (Gross, 2012) incrementando e innovando las líneas de investigación asociadas con la morfología de este grupo. A pesar de estos estudios, son pocos los que se han centrado en comparar la evolución de la forma del cuerpo y las características tróficas en contraste con su grupo hermano de superficie. Además, el número poblaciones troglobias utilizadas en la mayor parte de los estudios es pequeño, siendo sólo 4 las poblaciones (Pachón, Chica, Tinaja y Subterráneo) de las que se cuenta con información morfológica detallada que nos ayude a entender la variación presente en la forma troglobia. Por lo que el objetivo de este capítulo es buscar patrones de evolución morfológica en paralelo en los dos linajes de los *Astyanax* troglobios al noroeste de México, mediante la comparación de distintas poblaciones de ambos morfotipos (troglobio vs superficie) utilizando herramientas de morfometría en tres marcos morfológicos (premaxila, cuerpo y cabeza) que se asocian a diferentes aspectos ecológicos que nos permite una mejor comprensión de la evolución morfológica presenten en el grupo.

Métodos

Ecomorfología

Se analizaron 240 organismos correspondientes a 30 localidades tanto de cuevas como de superficie (tabla 1). De estos organismos se llevó a cabo una evaluación de 6 caracteres merísticos (i.e. conteos): número de escamas en la línea lateral, el número de radios en las aletas dorsal y anal, número de dientes y el número de cúspides de la premaxila y maxila, las cuales fueron extraídas del lado izquierdo del pez. Una vez extraídas la premaxila y maxila se llevó a cabo la limpieza de estas estructuras en una solución de KOH 1M durante 15 minutos.

Para la evaluación de estos caracteres merísticos (los conteos), se construyeron diagramas de cajas y bigotes, se comparó entre grupos a nivel de linajes (i.g. viejo vs. nuevo) y morfotipo (i.g. troglobio vs. superficie) con una prueba de Mann-Whitney.

Tabla 2. Descripción de los conteos merísticos, las medidas de ecomorfología e índices para los análisis ecomorfológicos.

#	Siglas	Medida	Función
1	LE	Longitud estándar	Locomoción
2	ACu	Alto del cuerpo	Locomoción
3	AnCu	Ancho del cuerpo	Locomoción
4	LCa	Longitud de la cabeza	Hábitos tróficos
5	ACa	Alto de la cabeza	Hábitos tróficos
6	AnCa	Ancho de la cabeza	Hábitos tróficos
7	LHc	Longitud del hocico cerrado	Hábitos tróficos
8	LHa	Longitud del hocico abierto	Hábitos tróficos
9	AnH	Ancho del hocico	Hábitos tróficos
10	AH	Alto del hocico	Hábitos tróficos
11	DO	Diámetro del ojo	Hábitos tróficos
12	IN	Intraorbital	Hábitos tróficos
13	LPeC	Longitud del pedúnculo caudal	Locomoción
14	APeC	Alto del pedúnculo caudal	Locomoción
15	AnPeC	Ancho del pedúnculo caudal	Locomoción
16	AAD	Longitud de la aleta dorsal	Locomoción
17	RAD	Radios de la aleta dorsal	Locomoción
18	AAA	Longitud de la aleta anal	Locomoción
19	RAA	Radios de la aleta anal	Locomoción
20	APe	Longitud de la aleta pectoral	Locomoción
21	APv	Longitud de la aleta pélvica	Locomoción
22	ELI	Escamas de la línea lateral	
23	AnPr	Ancho de la premaxila	Hábitos tróficos
24	PrAs	Proceso Ascendente	Hábitos tróficos
25	#DPr	Número de dientes en la premaxila	Hábitos tróficos
26	LM	Longitud de la maxila	Hábitos tróficos
27	#DM	Número de dientes en la maxila	Hábitos tróficos

Tabla 2. (continuación) Descripción de los conteos merísticos, las medidas de ecomorfología e índices para los análisis ecomorfológicos.

28	ACu/AnCu	Hidrodinamismo	Locomoción
29	APeC/AnPec	Compresión Caudal	Locomoción
30	DO/LCa	Tamaño relativo del ojo	Hábitos tróficos
31	LHc/LHa	Proyección del hocico	Hábitos tróficos
32	AH/ACa	Apertura del hocico	Hábitos tróficos
33	AnH/AcCa	Ancho relativo del hocico	Hábitos tróficos

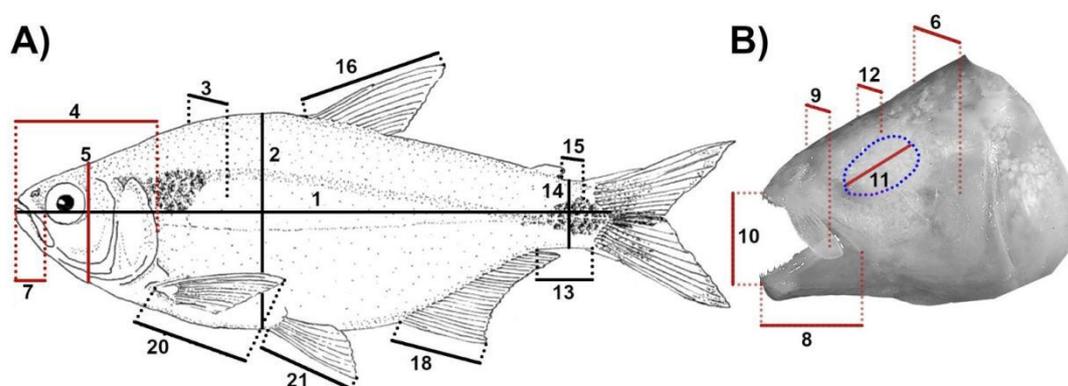


Fig. 4 Esquema con la representación gráfica de las medidas tomadas para los análisis ecomorfológicos: 1) LE: Longitud estándar, 2) ACu: Alto del cuerpo, 3) AnCu: Ancho del cuerpo, 4) LCa: Longitud de la cabeza, 5) ACa: Alto de la cabeza, 6) AnCa: Ancho de la cabeza, 7) LHc: Longitud del Hocico cerrado, 8) LHa: Longitud del Hocico abierto, 9) AnH: Ancho del Hocico, 10) AH: Alto del Hocico, 11) DO: Diámetro del ojo, 12) IN: Intraorbital, 13) LPeC: Longitud del pedúnculo caudal, 14) APeC: Alto del pedúnculo caudal, 15) AnPeC: Ancho del pedúnculo caudal, 16) AAD: Longitud de la aleta dorsal, 18) AAA: Longitud de la aleta anal, 20) APe: Longitud de la aleta pectoral, 21) APv: Longitud de la aleta pélvica. Las medidas, a detalle, se encuentran en la tabla 2. A) El cuerpo, B) la cabeza. En líneas blancas, las mediciones asociadas a locomoción; en líneas rojas, a hábitos tróficos.

Para los análisis morfométricos se obtuvieron fotografías de la premaxila utilizando un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi 305®, las imágenes fueron calibradas y se les asignó una escala con el programa Zen ver. 2.3 (Zeiss Microscopy, 2011). Se obtuvieron 22 medidas lineales relacionadas con los hábitos tróficos y la morfología funcional, con las cuales se estimaron seis índices ecomorfológicos, utilizando las estructuras tróficas (premaxila y maxila Fig. 5A y 5C) y el cuerpo de los peces (Fig. 4) (Mise *et al.*, 2013, Cordova-Tapia y Zambrano, 2016.; Fig. 4 y tabla 2).

A fin de evitar el efecto por alometría las medidas lineales obtenidas se estandarizaron mediante una regresión tipo II (Warton *et al.*, 2006; 2012), extrayendo los residuales de la regresión de las mediciones lineales y la longitud estándar (LE) con ayuda de la biblioteca *smatr* (Warton *et al.*, 2012). Con los datos estandarizados, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP o PCA por sus siglas en inglés) utilizando el software Past ver. 3 (Hammer *et al.*, 2001). Se realizó un MANCOVA para encontrar diferencias a nivel de morfotipo (i.e. Superficie, y Troglobio) y linaje (i.e. viejo=LV y nuevo=LN), usando la información obtenida del PCA como variable de respuesta y la LE como covariable. También, se evaluó una interacción entre las variables explicativas y se utilizó la longitud estándar como covariable (morfotipo x linaje, morfotipo x LE, linaje x LE). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa R, ver. 3.6.1 (R Core Team, 2019).

Morfometría geométrica

Se obtuvieron fotografías de tres marcos morfológicos distintos: la forma de la premaxila, la forma del cuerpo y la forma de la cabeza (Fig. 5B, 5D y 6). En el programa TPSUtil se transformaron en imágenes digitales con formato .tps para posteriormente digitalizar los *landmarks* para cada marco morfológico con el programa TPSDig

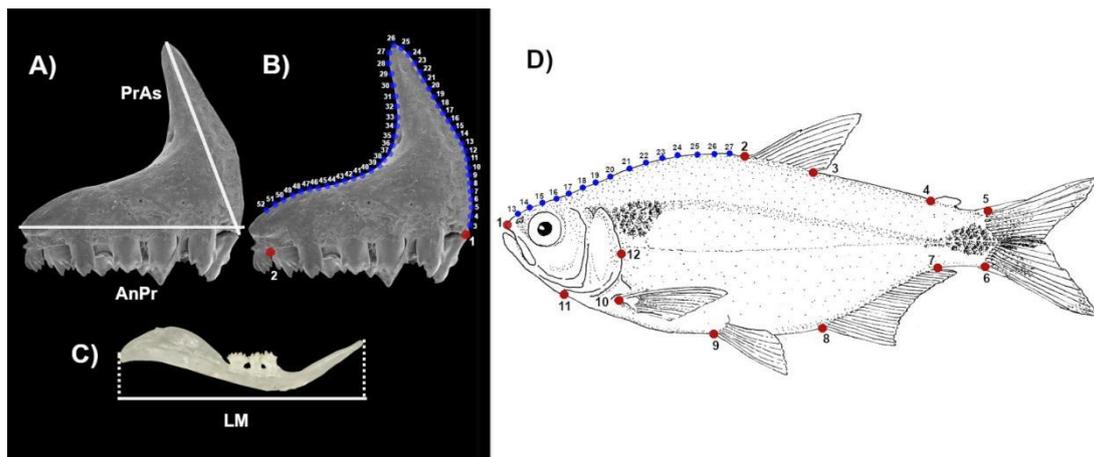


Fig. 5 Medidas tomadas para los análisis de ecomorfología para la premaxila, A) AnPr: ancho de la premaxila, PrAs: proceso ascendente de la premaxila. B) Posición de los 2 hitos homólogos y 50 *pseudolandmarks* usados para los análisis de MG que cubren la forma del proceso ascendente. C) LM: longitud de la maxila y D) Posición de los 12 *landmarks* y 15 *pseudolandmarks* para los análisis de MG de la forma del cuerpo.

Para la premaxila se analizaron un total de 260 organismos de 30 localidades correspondientes a los dos linajes (linaje viejo y linaje nuevo), de la vista lateral de la estructura, se colocaron 2 *landmarks* homólogos y una curva de 50 *pseudolandmarks* que abarcó la forma del proceso ascendente (Fig. 5B y tabla 3).

En la forma del cuerpo se evaluaron un total de 159 individuos pertenecientes a 18 localidades (tabla 1) a partir de fotografías de la vista lateral izquierda de peces vivos anestesiados, se digitalizaron 12 *landmarks* homólogos y una curva con 15 *pseudolandmarks* en el perfil dorsal del organismo siguiendo a Ornelas-García *et al.* (2014) (Fig. 5D y tabla 3).

En el caso de la forma de la cabeza, se tomaron fotografías del lado lateral izquierdo de la cabeza de peces silvestres, preservados en alcohol absoluto, con ayuda del Microscopio Leica Z16 ApoA, en el Laboratorio de microscopía y fotografía de la conservación LANABIO, IBUNAM. Para la definición del marco morfológico se colocaron 14 *landmarks* homólogos y dos curvas, una con 8 *pseudolandmarks* en el perfil dorsal y una con 9 *pseudolandmarks* en el perfil ventral de la cabeza para un total de 90 organismos (Ver Fig. 6 y tabla 3).

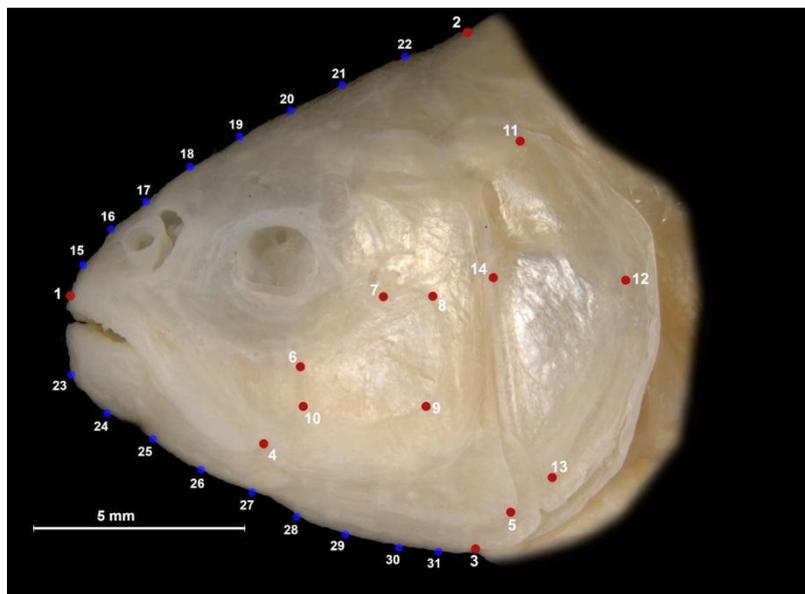


Fig. 6 Colocación de los landmarks para los análisis de la morfometría geométrica de la forma de la cabeza. En rojo, los landmarks homólogos. En azul, los *pseudolandmarks* que delimitan la curva.

Tabla 3. Descripción de los *landmarks* utilizados para los diferentes marcos morfológicos analizados en este trabajo.

No.	Descripción del <i>landmark</i>	Tipo
Premaxila		
1	Inserción anterior del último diente de la premaxila	LMK1
2	Inserción anterior primer diente de la premaxila	LMK1
3-52	Curva que abarca el proceso ascendente de la premaxila	LMK3
Cuerpo		
1	Punta anterior del maxilar	LMK2
2	Inserción anterior de la aleta Dorsal	LMK1
3	Inserción posterior de la aleta dorsal	LMK1
4	Inserción anterior de la aleta adiposa	LMK1
5	Inserción dorsal de la aleta caudal	LMK1
6	Inserción ventral de la aleta caudal,	LMK1
7	Inserción posterior de la aleta anal	LMK1
8	Inserción anterior de la aleta anal	LMK1
9	Inserción de la aleta pélvica	LMK1
10	Inserción de la aleta pectoral	LMK1
11	Yugal	LMK1
12	Extensión posterior del opérculo	LMK2
13-27	Curva que describe el perfil dorsal del organismo.	LMK3
Cabeza		
1	Punta anterior del maxilar	LMK2
2	Cresta del cráneo	LMK1
3	Yugal	LMK1
4	Extensión de la maxila	LMK1
5	Extensión del preopérculo	LMK2
6	Inserción dorsal del Suborbital 3 con el Suborbital 2	LMK1
7	Inserción anterior del Suborbital 3 con el Suborbital 4	LMK1
8	Inserción posterior del Suborbital 3 con el Suborbital 4	LMK1
9	Extensión del Suborbital 3	LMK2
10	Inserción ventral del Suborbital 3 con el Suborbital 2	LMK1
11	Extensión dorsal del opérculo	LMK2

Tabla 3 (continuación) Descripción de los landmarks utilizados para los diferentes marcos morfológicos analizados en este trabajo.

12	Extensión posterior del opérculo	LMK2
13	Extensión ventral del opérculo	LMK2
14	Extensión anterior del opérculo	LMK2
15-22	Curva que describe el perfil dorsal de la cabeza	LMK3
23-31	Curva que describe el perfil ventral de la cabeza	LMK3

LMK1 = *Landmark* tipo 1, LMK2 = *Landmark* tipo 2, LMK3 = *Landmark* tipo 3

A los tres marcos morfológicos se les realizó un análisis de ordenamiento de *Relative Warps* (RW) usando el programa TPSRelw para observar la diferencia en las formas relativas asociadas a los componentes que explican mayor porcentaje de varianza, que se calculan mediante el ajuste de una función de interpolación con las gradillas de deformación (thin-plate-spline de Bookstein, 1989; 1991) y las coordenadas x, y del punto de referencia para cada espécimen en la muestra de datos (Rohlf, 1993; 2001; Stone, 1998). Después se analizó la varianza de la forma por medio de un MANCOVA, utilizando los RWs como variables de respuesta, el morfotipo y el linaje como factores, y el tamaño del centroide (CZ) como covariable. También, se evaluó una interacción entre los factores y la covariable (morfotipo x linaje, morfotipo x CZ, linaje x CZ). Además, se realizó un análisis de variables canónicas (CVA por sus siglas en inglés) en la biblioteca *Morpho* en R ver. 3.6.1 (R Core Team, 2019), utilizando la función “CVA”. Finalmente, se realizó un análisis de disparidad morfológica con ayuda de la biblioteca *geomorph* en R ver. 3.6.1 (R Core Team, 2019), usando la función “*morphol.disparity*” para conocer el grado de disparidad dentro y entre los diferentes grupos.

Resultados

Ecomorfología

Entre las variables merísticas evaluadas únicamente se observaron diferencias para el número de escamas en la línea lateral y el número de dientes de la maxila (Fig. 7). Las poblaciones pertenecientes al morfotipo de superficie presentaron un mayor número de escamas en su línea lateral ($W = 12016$, $p < 0.01$), con una

moda de 35 escamas, en comparación con las poblaciones del morfotipo troglobio cuya moda fue de 33 escamas (Fig. 7A).

En el caso del número de dientes en la maxila, los peces troglobios presentaron un mayor número de dientes con respecto a los de superficie ($W = 1365.5$, Valor de $p < 0.001$; Fig. 7B). Además, se observó una diferencia a nivel de linaje para el morfotipo troglobio, presentando una moda de 3 dientes para el linaje nuevo y 4 para el linaje viejo, mientras que los peces de superficie presentan una moda de dos dientes en ambos linajes.

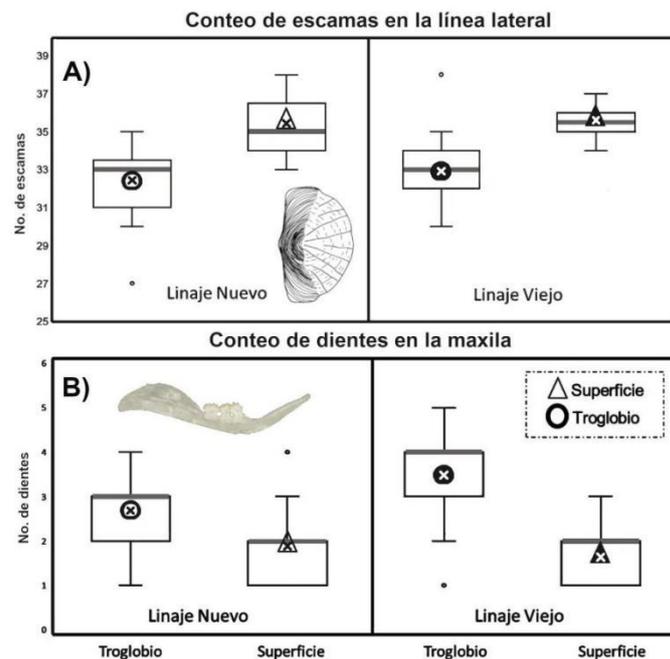


Fig. 7 Diagrama de cajas y bigotes de los conteos merísticos: A) Número de escamas de la línea lateral. B) Número de dientes en la maxila. La línea gris representa la moda y la x la media de cada grupo.

De las variables ecomorfológicas continuas, los primeros dos componentes del PCA explican una varianza acumulada de 35.05 %. El PC1 explica 20.80% de la varianza, y las variables que tienen más peso en el lado positivo son: LHc, PasPr y la LM; y en el extremo negativo son: LPec, AA, y la APv. El PC2 explica 13.2% de la varianza, y se ordena en el extremo positivo por las variables LHa, LCa y el índice Ancho relativo del hocico; y en el extremo negativo con LHc, los índices tamaño relativo del ojo y la proyección del hocico. Al graficar estos componentes (Fig. 8), se observa un traslape entre las dos formas de cueva y superficie, sobre todo los troglobios del linaje nuevo, sin embargo se aprecia una ligera segregación hacia el lado negativo del PC1 por

En los resultados del MANCOVA obtuvimos diferencias estadísticas significativas entre los morfotipos (*i.e.* troglobio y superficie), los linajes (nuevo y viejo), talla (LE) y la interacción entre morfotipo y linaje (tabla 4). De acuerdo con los resultados, las mediciones del morfotipo troglobio destacan en lo siguiente: son de menor tamaño, LE: promedio: 4.82 cm vs 5.48 cm de los de superficie, presentan una cabeza y un pedúnculo caudal de mayor tamaño en relación con su talla, tienen una boca más ancha, el tamaño del proceso ascendente de la premaxila y la longitud de la maxila es menor, y el diámetro de la cuenca ocular es mucho menor en comparación de sus homólogos de superficie.

Forma de la premaxila: morfoespacio y disparidad morfológica

En el análisis de “*relative warps*” de la MG muestra cierta diferenciación entre los morfotipos troglobio y superficie, con un poco de solapamiento entre ambos. El *RW1* explica el 55.56% de la varianza y nos muestra un cambio en la forma con respecto al ancho de la premaxila y su proceso ascendente, teniendo en el lado negativo una forma menos ancha y un proceso ascendente más fino, es en este lado donde se agrupan los peces de superficie (Fig. 9A). En el lado positivo, la forma de la premaxila es más ancha, el proceso ascendente es más robusto y menos alargado, siendo la forma que es más común en los peces troglobios. En el caso del *RW2* explica 21.45% y nos muestra la variación con respecto al ángulo y ancho del proceso ascendente. En el lado negativo, tenemos un proceso ascendente más fino, mientras que del lado positivo el proceso ascendente es más ancho. En los resultados obtenidos en el MANCOVA, se obtuvo que hay diferencias en la forma de la premaxila entre morfotipos, linajes, así como una interacción entre ambas variables (Fig. 9A, tabla 5).

En el CVA se obtuvieron tres variables canónicas que en conjunto explican el 100% de la varianza acumulada, la VC1 explica el 72.5 % de la varianza y recupera a los morfotipos como grupos diferentes, y la VC2 (18.5% de la varianza) divide a los linajes de la forma troglobia (Fig. 9B). En cuanto a las distancias de Mahalanobis entre grupos en la forma de premaxila (tabla 6), las mayores distancias fueron entre el morfotipo troglobio vs. superficie, siendo la mayor distancia entre superficie linaje viejo y troglobio de linaje viejo (DMah=5.52).

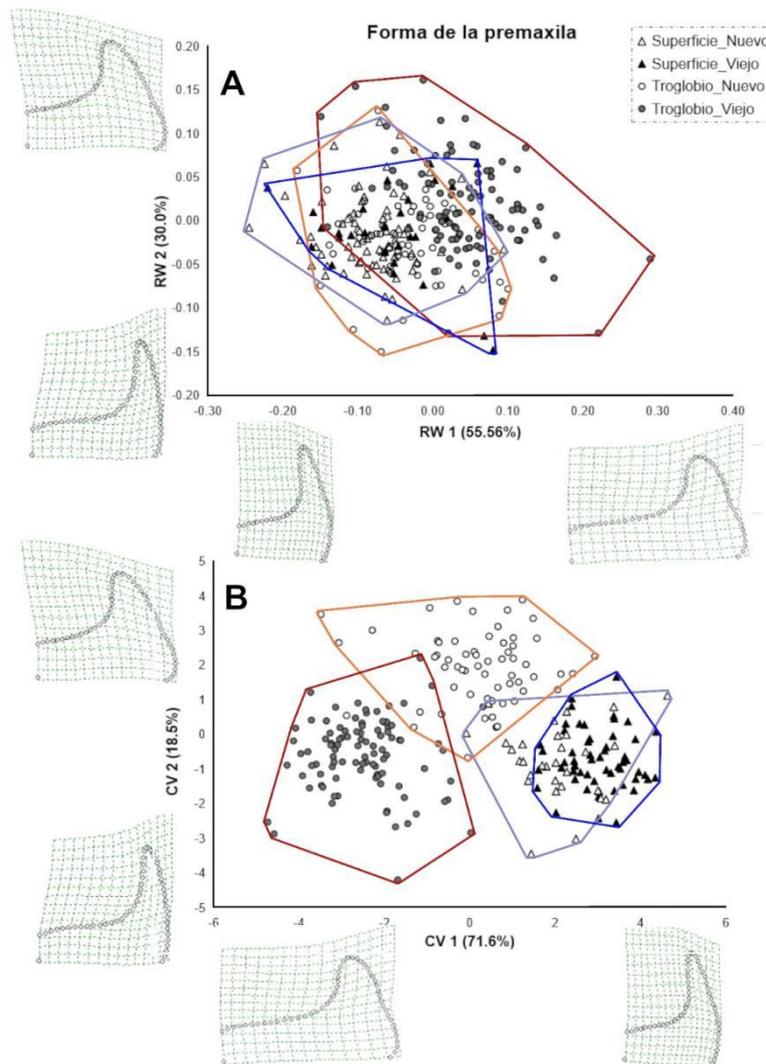


Fig. 9 Análisis de morfometría geométrica de la forma de la premaxila. En Triángulos: los peces asignados al morfotipo de superficie, los triángulos negros definen el polígono azul y representan el linaje viejo, los triángulos blancos definen el polígono azul cielo y representan al linaje nuevo. En Círculos: los peces asignados al morfotipo troglobio, los círculos negros definen el polígono rojo y representan el linaje viejo, los círculos blancos definen al polígono naranja y representan al linaje nuevo. A) *Relative Warps* para la forma de la Premaxila, donde los primeros dos ejes explican el 85% de la varianza acumulativa (RW1 - 55.56%, RW2 -30%). B) Análisis de variables canónicas para la forma de la Premaxila, los primeros dos ejes explican el 90.1% de la varianza acumulativa (VC1 - 71.6%, VC2 - 18.5%). En los extremos de cada eje se colocó la forma relativa de la premaxila correspondiente, lo que nos permite distinguir el cambio en la forma que sucede para el morfoespacio proyectado por cada eje, tanto de los RWs como de las VCs.

Por último, en cuanto a la disparidad morfológica, el morfotipo troglobio es el que presenta una mayor disparidad morfológica (0.0124), y en este sentido el morfotipo de superficie presentó un valor considerablemente más bajo (0.0076). Profundizando a nivel de linaje, son los linajes del morfotipo troglobio los que tienen una mayor

disparidad morfológica, siendo el linaje viejo el que presenta los valores más altos (0.0115), en el caso del morfotipo de superficie, es el linaje nuevo el que presentó una mayor disparidad morfológica (0.0072). En las comparaciones pareadas de la disparidad morfológica a nivel de morfotipo y linaje, se observó una diferencia entre los morfotipos significativa, siendo que el linaje viejo de los troglobios el que presenta diferencias con ambos linajes de superficie (tabla 7). Para visualizar de forma gráfica se compararon las formas consenso de cada morfotipo, los resultados son consistentes con los obtenidos en los análisis de *RW's*, tomando el morfotipo de superficie como referencia, en su comparación con la forma de troglobia (Fig. 10A) se aprecia claramente que los vectores de desplazamiento en la curva que describe el proceso ascendente de la premaxila cambian hacia una forma más ancha y con un proceso ascendente mucho más corto y robusto, mientras que en la comparación de la forma de superficie entre linajes, no se presentan cambios (Fig. 10B). Finalmente, entre el linaje viejo y nuevo troglobios, sí hubo un ligero cambio (Fig. 10C), presentando el linaje nuevo una forma casi intermedia entre el linaje viejo troglobio y la forma de superficie.

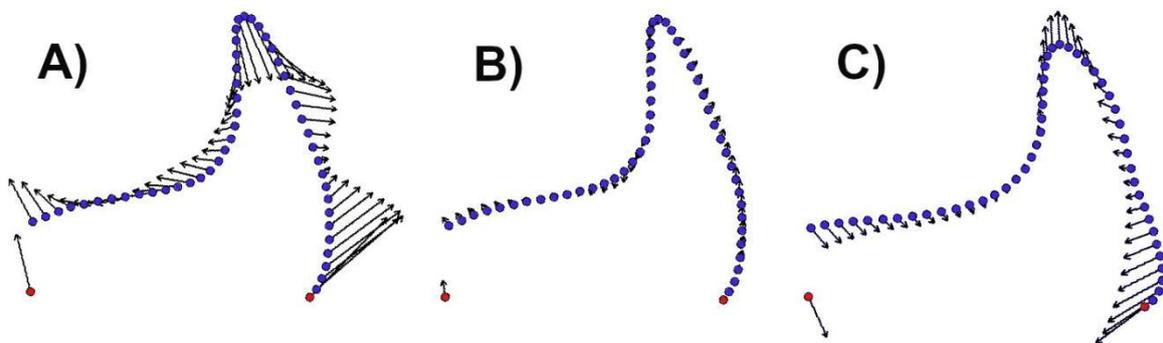


Fig. 10 Comparación de las formas consenso de los morfotipos para la premaxila: A) Superficie (referencia) vs Troglobio (vectores de desplazamiento). B) Superficie linaje viejo (referencia) vs Superficie linaje nuevo (vectores). Y, C) Troglobio linaje viejo (referencia) vs Troglobio linaje nuevo (vectores). En rojo los landmarks homólogos, y en azul los pseudolandmarks.

Tabla 5. Resultados de los análisis del MANCOVA de los tres marcos morfológicos. Los valores en negritas y con un * son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Premaxila	GL	Valor de p	Cuerpo	GL	Valor de p	Cabeza	GL	Valor de p
Morfotipo	2	<0.001*	Morfotipo	2	<0.001*	Morfotipo	2	<0.001*
Linaje	1	<0.001*	Linaje	1	<0.001*	Linaje	1	0.724
CZ	1	<0.001*	CZ	1	<0.05*	CZ	1	0.516
Morf*Lin	2	<0.001*	Morf*Lin	2	<0.001*	Morf*Lin	2	0.098
Morf*CZ	2	0.141	Morf*CZ	2	0.162	Morf*CZ	2	0.357
Lin*CZ	1	0.555	Lin*CZ	1	0.255	Lin*CZ	1	0.757

Forma del cuerpo: morfoespacio y disparidad morfológica

En el morfoespacio de la forma del cuerpo no se observó una separación clara entre los morfotipos, el *RW1* explica el 30.37% de la varianza acumulativa y nos muestra un cambio en el perfil dorsal de los peces, teniendo hacia el extremo del eje negativo una cuerpo más alargado y con una cabeza más alta proporcionalmente (Fig. 11A). El *RW2*, explica un 13.92% de la varianza, y permite discriminar mejor entre los morfotipos troglobio y de superficie, sobre todo los troglobios del linaje viejo que están cargados en el lado negativo de este eje. En este componente vemos de manera más fina el cambio en el perfil dorsal de los organismos, sobre todo en región cefálica, teniendo una forma cóncava de la cabeza en la forma troglobia, además de un cambio en la longitud del pedúnculo caudal, los peces de superficie se agrupan en el lado positivo de este eje los cuales además de no presentar una forma cóncava en la cabeza el pedúnculo caudal es menos alargado en comparación con los peces troglobios. En el MANCOVA se observaron diferencias entre los morfotipos, así como entre los linajes de los organismos y una interacción fuerte entre ambas variables (tabla 5).

En el CVA se obtuvieron tres variables canónicas que explican el 100% de la varianza, y aunque en el análisis es posible observar un ligero traslape entre las formas de superficie y troglobias, hay una mayor discriminación tanto entre formas como entre sus linajes (Fig. 11B). La VC 1 explica el 71.6% de la varianza y separa a las poblaciones por morfotipos, el morfotipo de superficie se agrupó hacia el lado positivo del eje y el morfotipo troglobio en el negativo. También se puede apreciar que a nivel

de linaje los grupos están ligeramente separados para el caso de superficie. Para el morfotipo, tenemos al linaje viejo la parte negativa de este eje (Fig. 9), mientras que el linaje nuevo están en medio de ambos morfotipos. En La distancia de Mahalanobis se obtuvo que las poblaciones troglobias y superficie tienen más distancia entre ellas, siendo el linaje viejo troglobio el que tiene una mayor distancia con ambos linajes de superficie ($D_{Mah} = 5.21$) (tabla 6)

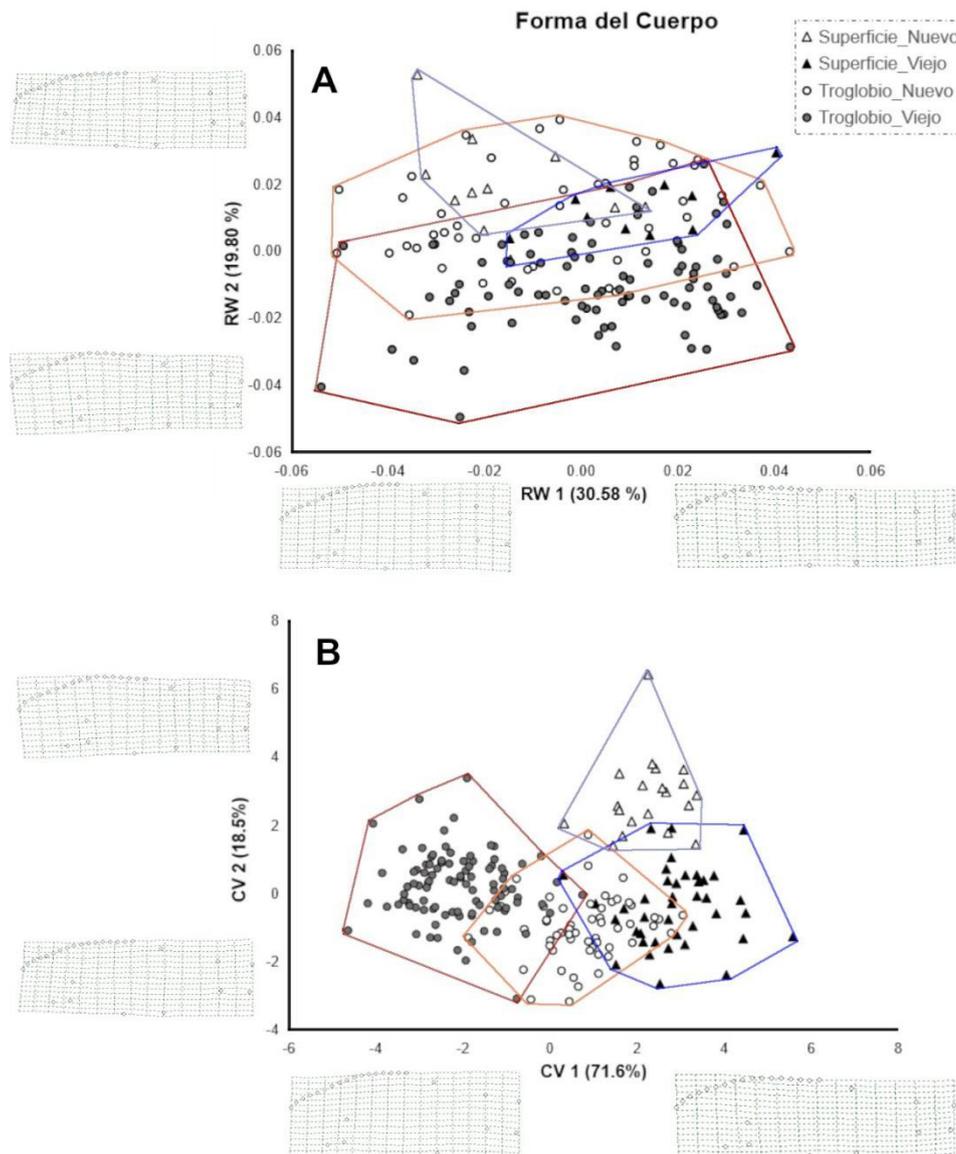


Fig. 11 Análisis de morfometría geométrica de la forma del cuerpo. En Triángulos: los peces asignados al morfotipo de superficie, los triángulos negros definen el polígono azul y representan el linaje viejo, los triángulos blancos definen el polígono azul cielo y representan al linaje nuevo. En Círculos: los peces asignados al morfotipo troglobio, los círculos negros definen el polígono rojo y representan el linaje viejo, los círculos blancos definen al polígono naranja y representan al linaje nuevo. A) *Relative Warps* para la forma del cuerpo, donde los primeros dos ejes explican el 50.3% de la varianza

acumulativa ($RW1$ - 30.58%, $RW2$ - 19.80%). B) Análisis de variables canónicas para la forma del cuerpo, los primeros dos ejes explican el 90.1% de la varianza acumulativa ($VC1$ - 71.6%, $VC2$ - 18.5%). En los extremos de cada eje se colocó la forma relativa del cuerpo correspondiente, lo que nos permite distinguir el cambio en la forma que sucede para el morfoespacio proyectado por cada eje, tanto de los RWs como de las VCs .

Tabla 6. Distancia de Mahalanobis entre los dos linajes (viejo vs. nuevo) de los dos morfotipos (troglobio vs. superficie) para la forma de la premaxila, cuerpo y cabeza

	Troglobio viejo	Troglobio Nuevo	Superficie viejo
Premaxila			
Troglobio Nuevo	3.68926		
Superficie viejo	4.98354	3.82049	
Superficie nuevo	5.5241	3.97164	3.0852
Cuerpo			
Troglobio Nuevo	3.32179		
Superficie viejo	5.21639	4.15201	
Superficie nuevo	5.10293	3.01807	3.7793
Cabeza			
Troglobio Nuevo	6.28822		
Superficie viejo	9.93495	8.67914	
Superficie nuevo	7.94021	8.39430	6.223907

En cuanto a la disparidad morfológica, el morfotipo troglobio presentó una mayor disparidad (0.00168), con respecto al morfotipo de superficie (0.00140). A nivel del linaje, es similar a los resultados obtenidos en la premaxila, los linajes del morfotipo troglobio tienen valores ligeramente más altos, siendo el linaje viejo el que presentó la mayor disparidad. Sin embargo, ninguna de las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas (tabla 7). Al visualizar de manera gráfica estas comparaciones, los cambios en la forma más apreciables se dan entre el morfotipo de superficie (usándolo como referencia) contra el troglobio, apreciando que los vectores de desplazamiento en la curva que describe el perfil dorsal de la cabeza, van hacia una zona más baja en la región de la cabeza, y una zona más alta cuando

la curva se acerca a la inserción de la aleta dorsal, mostrando que la forma troglobia presenta una cabeza más cóncava (deprimida en la región cefálica) y esto provoca una mayor diferencia en el perfil dorsal del pez (Fig. 12A). Por último, las comparaciones a nivel de linaje no presentan diferencias (Fig. 12B y 12C).

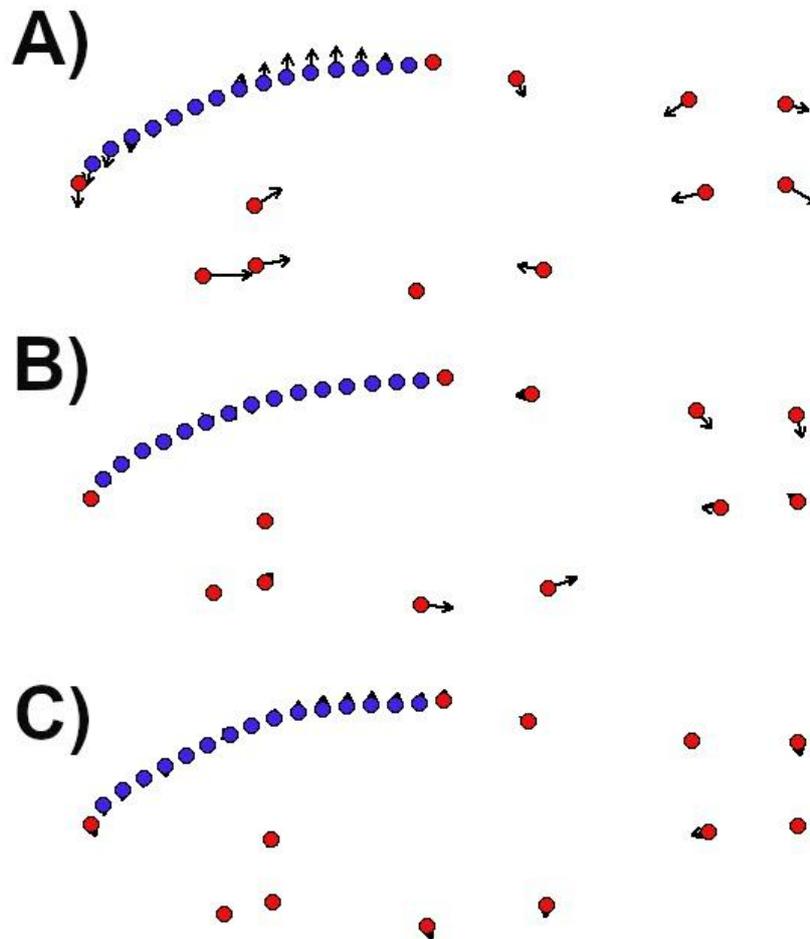


Fig. 12 Comparación de las formas consenso de los morfotipos para la premaxila: A) Superficie (referencia) vs Troglobia (vectores de desplazamiento). B) Superficie linaje viejo (ref.) vs Superficie linaje nuevo (vectores). Y, C) Troglobia linaje viejo (ref.) vs Troglobia linaje nuevo (vectores). En rojo, los *landmarks* homólogos, y en azul, los *pseudolandmarks*.

Forma de la cabeza: morfoespacio y disparidad morfológica

El morfoespacio de la forma de la cabeza nos muestra diferencias muy claras a nivel de morfotipo. En el análisis de *RW*, obtuvimos que los primeros dos componentes explican 44.5% de la varianza. El primer componente explica el 30.05% de la varianza acumulativa y separa a los morfotipos, siendo las diferencias principales el cambio en la forma de los huesos suborbitales, de manera más específica en el suborbital 3 (SO3), agrupando en el extremo negativo del primer

eje a la forma de superficie, con un SO3 mucho más amplio, en contraste con la forma troglobia, que muestra un SO3 mucho más compacto (Fig. 13A). El MANCOVA arrojó que hay diferencias significativas a nivel de morfotipo, pero no mostró diferencias entre los linajes o su interacción (tabla 5).

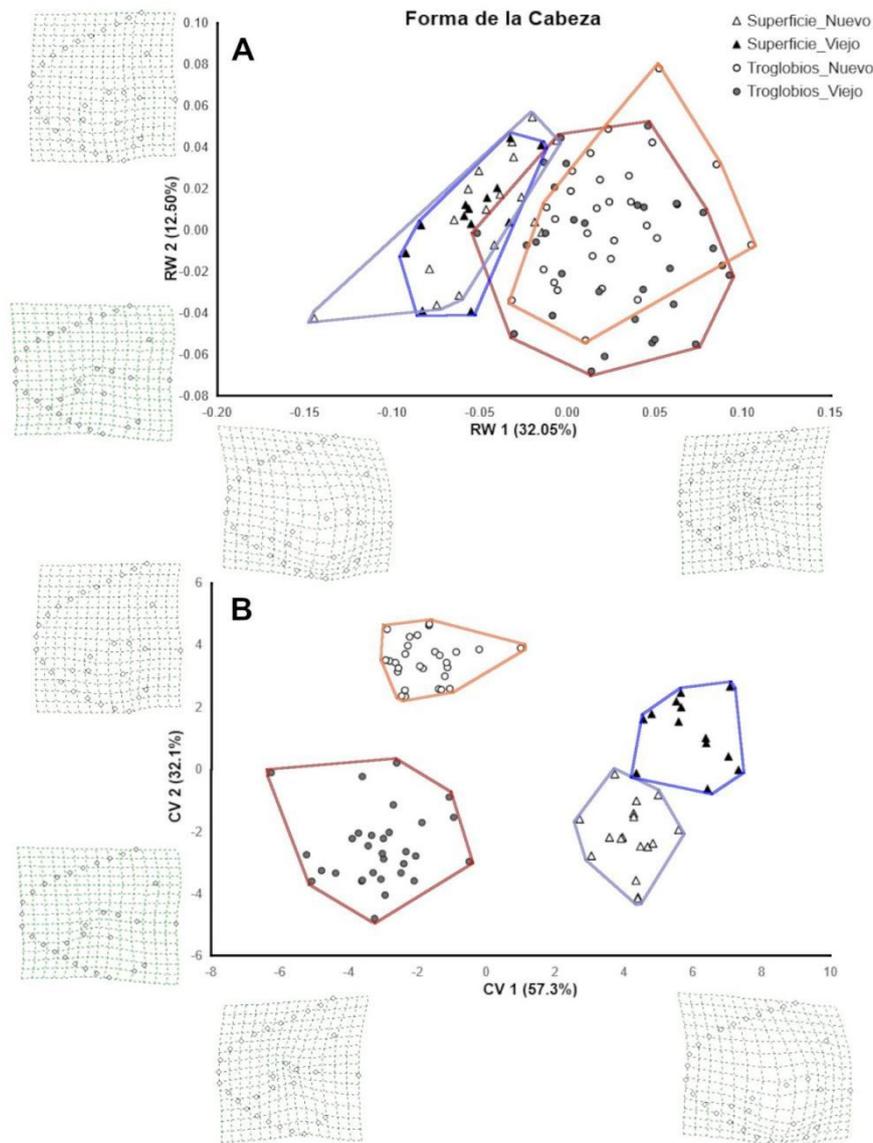


Fig. 13 Análisis de morfometría geométrica de la forma de la Cabeza. En Triángulos: los peces asignados al morfotipo de superficie, los triángulos negros definen el polígono azul y representan el linaje viejo, los triángulos blancos definen el polígono azul cielo y representan al linaje nuevo. En Círculos: los peces asignados al morfotipo troglobio, los círculos negros definen el polígono rojo y representan el linaje viejo, los círculos blancos definen al polígono naranja y representan al linaje nuevo. A) *Relative Warps* para la forma de la cabeza, donde los primeros dos ejes explican el 44.6% de la varianza acumulativa (RW1 - 32.06%, RW2 - 12.5%). B) Análisis de variables canónicas para la forma del cuerpo, los primeros dos ejes explican el 89.4% de la varianza acumulativa (VC1 - 57.3%, VC2 - 32.1%). En los extremos de cada eje se colocó la forma relativa de la cabeza

correspondiente, lo que nos permite distinguir el cambio en la forma que sucede para el morfoespacio proyectado por cada eje, tanto de los *RWs* como de las *VCs*.

En el CVA se obtuvieron tres variables canónicas (*VC*) que explican el 100% de la varianza acumulativa. De los tres marcos morfológicos analizados, el de la forma de la cabeza es el que muestra las separaciones más claras entre los morfotipos dada por la *VC1*, que explica el 57.3% de la varianza, teniendo a el grupo troglobio del lado negativo del eje. Mientras que la *VC2* explica el 32.1% de la varianza acumulativa y nos describe una separación a nivel de linaje para ambos morfotipos (Fig. 13B). En cuanto a la distancia de Mahalanobis, como en los análisis anteriores, la mayor distancia se da entre los morfotipos, siendo el morfotipo troglobio del linaje viejo el que presenta la mayor distancia en comparación con el morfotipo de superficie del linaje viejo ($D_{Mah} = 9.934$) (tabla 6).

En los análisis de disparidad se obtuvo que el morfotipo troglobio es el que tiene una mayor disparidad morfológica (0.0063), en comparación con el morfotipo de superficie (0.0043). A nivel de linaje, la forma troglobia del linaje viejo es la que presentó valores más altos de disparidad (0.0066), mientras que en el caso de superficie es el linaje nuevo el más alto (0.004). En las comparaciones pareadas, la disparidad entre los morfotipos superficie vs. troglobio son significativas (tabla 7). Al comparar las formas consenso, los cambios en la forma más drásticos se observan entre morfotipos teniendo la deformación más radical en la zona del SO3 siendo la forma de superficie como referencia (Fig. 14A), siendo congruentes con los análisis de *Relative Warps*. A nivel de linaje no hay cambios drásticos (Fig. 14B y 14C).

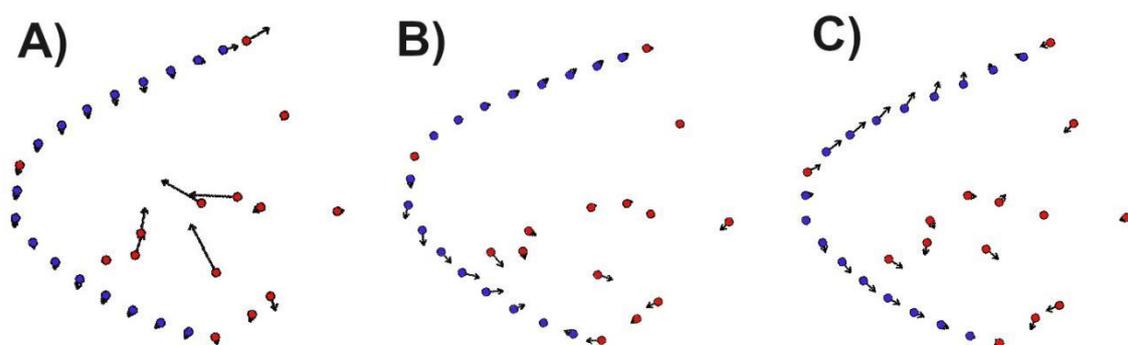


Fig. 14 Comparación de las formas consenso de los morfotipos para la premaxila: A) Superficie (referencia) vs. Troglobio (vectores de desplazamiento). B) Superficie linaje viejo (referencia) vs.

Superficie linaje nuevo (vectores). Y, C) Troglobio linaje viejo (referencia) vs. Troglobio linaje nuevo (vectores). En rojo, los *landmarks* homólogos, y en azul, los pseudolandmarks.

Tabla 7. Resultados de los análisis de disparidad morfológica de los tres marcos morfológicos. Los resultados resaltados en negritas y con un * son estadísticamente significativos ($p < 0.05$), con ** $p < 0.01$, *** es $p < 0.001$.

<i>Distancia de Foote</i>	Premaxila	Cuerpo	Cabeza
Troglobio	0.0124109	0.0016840	0.0063924
Superficie	0.0076461	0.0014075	0.0043304
Troglobio Viejo	0.0115062	0.0015663	0.0066598
Troglobio Nuevo	0.0091376	0.0015409	0.0053007
Superficie Viejo	0.0069446	0.0012641	0.0037203
Superficie Nuevo	0.0072782	0.0013449	0.0040094
<i>Comparaciones pareadas</i>			
S vs. T	0.0047648***	0.0002764	0.0020619**
SV vs. SN	0.0003335	0.0000807	0.0002890
SV vs. TV	0.0042280*	0.0003020	0.0029394**
SV vs. TN	0.0018594	0.0002767	0.0015803
SN vs. TN	0.0021929	0.0001960	0.0012912
TV vs. SN	0.0045615**	0.0002213	0.0026503**
TV vs. TN	0.0023685	0.0000253	0.0013590

Discusión

La forma troglobia de los Astyanax

Las condiciones ambientales de las cuevas son muy contrastantes a las del hábitat de superficie. Resaltando las condiciones de oscuridad perpetua, la limitación en la cantidad de recursos y parámetros ambientales que pueden cambiar de una zona a otra (*i.e.* temperatura, oxígeno, etc.), estas condiciones en conjunto, definen a las cuevas como ambientes extremos y presentan fuertes presiones de selección para los organismos (White & Culver, 2012). Bajo este contexto, nuestros resultados encontraron patrones de evolución morfológica en paralelo en los dos linajes

genéticos de los *Astyanax* que habitan en las cuevas, generando una forma troglobia que se diferencia claramente del grupo de superficie. En términos generales, la forma troglobia se distingue de la forma superficie por las siguientes características morfológicas: Son de menor tamaño (4.82 cm vs 5.48 cm), presentan un menor número de escamas en la línea lateral (moda = 33 vs 35), el pedúnculo caudal es más alargado, y la forma del cuerpo cambia en el perfil dorsal del organismo, sobre todo en la región cefálica. En la cabeza tenemos una forma más cóncava y diferencias más específicas, como las de las estructuras asociadas a los hábitos tróficos: un mayor número de dientes en la maxila (3-4), una longitud y ancho del hocico de mayor tamaño, una premaxila con un proceso ascendente más robusto y ancho; y las que están asociados a otras presiones selectivas, como: un menor tamaño de la cuenca ocular, un cambio prominente en el SO3 el cual tiene una forma más compacta y en una posición distinta en la cabeza, y el opérculo branquial tiene una forma romboidal más amplia. Estas diferencias en distintos rasgos morfológicos con su grupo hermano de superficie, nos muestran cómo los diferentes linajes de cuevas han evolucionado en respuesta a presiones selectivas similares.

Diversidad morfológica del cuerpo

La reducción en la talla y el número de escamas se ha asociado con las relaciones metabólicas y energéticas de los peces con el medio, planteando originalmente que poseían una alimentación “mala” debido a la escasez de recursos (Wilkins, 1988). Sin embargo, esta hipótesis se ha cuestionado, argumentando que estas reducciones se ven afectadas por muchos más factores, como la temperatura y la época del año (Simon *et al.*, 2017). En el caso del número de escamas se ha llegado a argumentar que esta reducción está asociada con pérdidas parciales de su función biológica, como la protección que brindan al cuerpo de los peces (Wilkins, 1988). Específicamente los *Astyanax* troglobios aún poseen escamas en comparación de otros peces troglobios que las han perdido (*Sinocyclocheilus anshuiensis*, Yang *et al.*, 2016; *Barbatula*, Behrmann-Godel *et al.*, 2017), por lo que se ha propuesto que la reducción en el número de escamas es una adaptación a la vida troglobia, asociada a diversas presiones que cambian en los hábitats troglobios, como la reducción en comportamiento agresivo (Wilkins, 1988; Simon *et al.*, 2017), pudiendo ser un evento que apenas va comenzando y es un proceso continuo de reducción en las escamas para los *A. mexicanus* troglobios (Simon *et al.*, 2017). En el

caso del pedúnculo caudal, el morfotipo troglobio presenta una talla mayor y una forma más comprimida en comparación del morfotipo de superficie, este es un rasgo que se asocia con la propulsión y locomoción que generan los peces para desplazarse en su medio (Cordova-Tapia & Zambrano, 2017; Ornerlas-García *et al.*, 2017; 2018). Por lo que podemos asumir que la propulsión y maniobrabilidad de los morfotipos es distinta, y que se puede dar como una respuesta específica a las condiciones físicas de su medio. Por otro lado, nuestros resultados en la diferencia en el perfil dorsal que nos presenta la región cefálica del morfotipo troglobio no sugieren que tenga una implicación hidrodinámica. Por último, la forma del cuerpo presentó los valores de disparidad más bajos, incluso al momento de comparar entre morfotipos, lo que nos indica que la variación morfológica en el cuerpo no es tan alta como se esperaba, lo que sugiere que la morfología de los *Astyanax troglobios* no parece evolucionar de manera integrada y pueden responder de manera diferencial a las presiones ambientales, lo que nos brinda una buena base para abordar el estudio de los procesos que afectan la evolución morfológica en el tercer capítulo.

Diversidad morfológica asociada a hábitos tróficos

Varios de los rasgos morfológicos que destacan a la forma troglobia están asociados a los hábitos tróficos del organismo. Se había reportado previamente para un par de poblaciones troglobias un incremento en el número de dientes en la maxila (Yamamoto *et al.*, 2003; Protas *et al.*, 2008; 2012), y al incrementar el número cuevas analizadas por linaje, pudimos observar diferentes modas entre los morfotipos y el linaje (i.e. 3 dientes para el linaje viejo y 4 dientes para el linaje nuevo), sin haber diferencias significativas, lo que apoya la observación previa de que estos rasgos presentan variación entre las diferentes cuevas (Yamamoto *et al.*, 2003). Aunado a lo anterior, también reportamos una longitud del hocico y ancho del hocico de mayor tamaño, pero que generan una menor proyección del hocico. Con anterioridad se había reportado que el grupo troglobio presentaba una mandíbula inferior de mayor tamaño, lo que propiciaba el desarrollo de una dentadura más compleja, refiriéndose a la transición ontogénica de los organismos, pasando de tener dientes monocúspidos a multicúspidos (Atukorala *et al.*, 2013; Hamer *et al.*, 2016). Nuestros resultados no encontraron diferencias en el tipo de dientes (número de cúspides por diente en la premaxila), por lo que no apoyaría la idea de que el grupo troglobio genere dentaciones más complejas para la premaxila de los organismos. En el caso de la

proyección del hocico, es un estimador que se utiliza para evaluar la habilidad del pez para capturar presas muy móviles o de gran tamaño, mientras más alto sea el valor obtenido es un indicador de que un pez se especializa en alimentarse de este tipo de presas (Hulsey *et al.*, 2005; Mise *et al.*, 2013), nuestros resultados mostraron que ambos morfotipos no tuvieron valores altos de la proyección del hocico, sin embargo el grupo troglobio tenía una proyección menor, lo que sugiere que los hábitos alimenticios diferentes en los dos morfotipos puede tener un impacto en esta diferencia (Mitchell *et al.*, 1977; Wilkens, 1988; Espinasa *et al.*, 2017). Por último, la premaxila del grupo troglobio presenta una forma más amplia, con un proceso ascendente más pequeño y más robusto, sobre todo la del linaje viejo. Esta estructura además presentó un gran disparidad morfológica dentro del grupo troglobio, evidenciando que los ancestros de superficie eran seguramente omnívoros, como se ha reportado para otros *Astyanax* de superficie actuales, que se alimentan de una gran cantidad de cosas como insectos, plantas y peces más pequeños (Bonato *et al.*, 2017; Ornelas-García *et al.*, 2018). Por lo tanto, esta estructura trófica no presenta un grado alto de especialización como el que se puede ver en otros characidos con hábitos depredadores piscívoros muy marcados, como el género *Oligosarchus* (Bonato *et al.*, 2017). Otros autores han demostrado que la anatomía de las estructuras tróficas y la dieta de los peces están correlacionadas (Albertson *et al.*, 2003; 2005; Parsons *et al.*, 2011; Garita-Alvarado *et al.*, 2018; Ornelas-García *et al.*, 2018b), por lo que nuestros resultados sugieren que estas modificaciones presentes en el grupo troglobio reflejan la adaptación a la presión ejercida por los nuevos recursos alimenticios en el hábitat de las cuevas. Es posible que tener más dientes maxilares y unas premaxilas más amplias sirvan para poder abarcar una mayor cantidad de materia orgánica al momento de buscar en alimento en el sustrato de las pozas.

Diversidad morfológica de la cabeza

Los patrones de diversidad morfológica en la cabeza de los *Astyanax* troglobios son de los rasgos morfológicos que mejor han sido descritos, teniendo claro aquellos que se dan como resultado de la pérdida de la visión, como la reducción de la cuenca ocular, fragmentaciones y modificaciones en los huesos suborbitales y supraorbitales (Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2017; 2018); y aquellos que

no están asociados a esta pérdida de la visión, como la diversidad de los rasgos tróficas, el tamaño de las narinas, el número de neuromastos, etc (Yamamoto *et al.*, 2003; Trapani *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en la diversidad de la cabeza son los más marcados entre los dos morfotipos, nos muestran que el grupo troglobio tiene un menor tamaño relativo del ojo, rasgo que se asocia a un efecto de evolución regresiva en respuesta a las condiciones de oscuridad perpetua (Wilkens, 2017). Esto mismo también se puede relacionar con los resultados de la forma del perfil dorsal de la cabeza, la reducción de estructura ocular propicia esta forma más cóncava en comparación del grupo de superficie. A su vez, también afecta los resultados obtenidos en el SO3, que tiene una forma muy diferente a la del grupo de superficie y una posición diferente en la cabeza, similar a lo reportado con anterioridad. Otro rasgo distintivo que se aprecia en la forma de la cabeza es la forma del opérculo branquial. El grupo de superficie tiene una forma más final, similar a un triángulo, mientras que el grupo troglobio presenta una forma más amplia, similar a un rombo, este rasgo puede estar asociado a una adaptación a un medio hipóxico, ya que un opérculo mayor, resguarda filamentos branquiales de mayor tamaño en respuesta a condiciones con una menor cantidad de oxígeno (Boggs & Gross, 2021). Adicionalmente, el ancho y la apertura relativos del hocico también se asocian como adaptaciones a estas condiciones (Boggs & Gross, 2021). La disparidad morfológica de la cabeza también fue alta, sobre todo la del linaje viejo del morfotipo troglobio. Esto implica que la evolución del complejo craneal ha sido muy diversa dentro del grupo, a diferencia de la forma de la premaxila, la cabeza se ve afectada por más presiones selectivas como las condiciones de oscuridad y de oxigenación en el medio (Wilkens *et al.*, 2017; Boggs & Gross, 2021).

Diferencia a nivel de "Linaje" en los Astyanax troglobios

Nuestros resultados encontraron patrones de diversidad morfológica diferentes en los linajes genéticos reportados del morfotipo troglobio, denominados como linaje viejo y linaje nuevo (Wilkens, 1988; Ornelas-García *et al.*, 2008; Herman *et al.*, 2018). Anteriormente se propuso la hipótesis de que el linaje filogenéticamente viejo presenta un mayor grado de regresión evolutiva en comparación del linaje filogenéticamente nuevo (Wilkens, 1988; Strecker *et al.*; 2003; 2004). Nuestros resultados sugieren que esto es posible, en los tres marcos morfológicos analizados

el linaje viejo del morfotipo troglobio se separaba claramente del morfotipo de superficie, mientras que el linaje nuevo estaba en medio de los dos grupos, llegando a sobrelaparse con ambos en la forma del cuerpo y de la premaxila. La disparidad morfológica reportada en los tres marcos morfológicos también nos muestra un patrón, siendo el linaje viejo del grupo troglobio el que presenta los valores de disparidad más altos, teniendo a la premaxila la estructura con mayor disparidad, seguida de la forma de la cabeza y por último la forma del cuerpo. Lo que implica que el linaje viejo ha tenido mucha variación morfológica dentro del grupo, y que presenten valores de disparidad distintos nos brinda una aproximación de cómo evoluciona la morfología a las presiones ambientales (Collar *et al.*, 2005). Con base en lo anterior, podemos plantear que esta forma troglobia se ha generado al menos en dos ocasiones distintas, otorgando evidencia de evolución morfológica en paralelo como se ha reportado en *Astyanax* lacustres (Garita-Alvarado *et al.*, 2018), sin embargo, las características morfológicas del morfotipo troglobio parecen responder de manera diferente a las presiones selectivas de las cuevas, lo que se refleja en la variedad morfológica presente en los tres marcos morfológicos analizados, variando en el grado de modificación y regresión evolutiva a nivel de linaje y población (Wilkins, 1988; Yamamoto *et al.*, 2003; Powers *et al.*, 2017).

La selección natural incrementa o disminuye la variación en las características

La similitud de varias adaptaciones morfológicas (e.g. la degeneración de los ojos) a las presiones ambientales ejercidas por las cuevas en distintos grupos de animales (peces, salamandras, artrópodos), nos indican que la adaptación a la forma de vida troglobia puede ser un proceso general resultante de restricciones selectivas similares (Soares & Niemiller, 2020). Aunque, es necesario que pase el tiempo suficiente para que los organismos que han colonizado las cuevas se adapten al modo de vida cavernícola y logren evolucionar *in situ* (White & Culver, 2012). Este fenómeno consta de tres procesos adaptativos: 1) La generación de un nuevo nicho ecológico, 2) cambios en el comportamiento que les permitan explotar el nuevo nicho ecológico, y 3) la supervivencia de la especie al nuevo estrés ambiental, si los tres procesos tienen éxito, la población logrará reproducirse y la selección natural fomenta la adaptación, produciendo cambios morfológicos, fisiológicos y de comportamiento adicionales (Howarth & Honch, 2012; Futuyma & Kirkpatrick, 2017). Incluso si las

poblaciones permanecen en contacto con su homólogo de superficie, las presiones de selección impuestas por los diferentes entornos y aumentadas por el estrés ambiental pueden fomentar a las dos poblaciones a divergir (Howarth & Honch, 2012). Este es el caso de los *Astyanax troglobios*, que en al menos en dos ocasiones pasaron por estos tres procesos adaptativos, desarrollando de forma independiente las adaptaciones pertinentes para el modo de vida cavernícola y logrando evolucionar *in situ*. Otros grupos de peces, como es el caso de las poblaciones de peces troglobios pertenecientes a las familias de los amblyopsidos (Hart *et al.*, 2020) y los cyprinidos (*Sinocyclocheilus*. Yang *et al.*, 2016), también se han logrado adaptar y evolucionar las condiciones de vida cavernícolas. Sin embargo, estos factores ambientales impuestos por la selección se ven influenciados por la historia evolutiva de cada especie, lo que afecta su relación con el medio (Futuyma & Kirkpatrick, 2017).

Se ha establecido que hay una relación en el incremento de la disparidad morfológica cuando una población tiene la oportunidad ecológica de aprovechar un nuevo nicho ambiental (Mahler *et al.*, 2010; Yoder *et al.*, 2010). Como es el caso de las lagartijas del género *Anolis*, donde se ha reportado radiación adaptativa asociada a los cambios específicos en los regímenes selectivos que actúan sobre las poblaciones naturales, teniendo como consecuencia una relajación de la selección estabilizadora efectiva al enfrentarse a nuevas condiciones ambientales que eventualmente generan una selección diversificadora (Adams *et al.*, 2009; Mahler *et al.*, 2010; Yoder *et al.*, 2010). Este escenario es similar al que se enfrentan los organismos troglobios al colonizar estos ambientes extremos (Howarth & Honch, 2012; White & Culver, 2012), donde ciertos rasgos fenotípicos se ven afectados más fuertemente por las presiones selectivas ambientales, resaltando aquellas características regresivas (e.g. falta de pigmentación, reducción de las estructuras oculares) como se ha reportado en diversos artrópodos (Howarth, 1983; Klaus *et al.*, 2013) y vertebrados (Mitchell, 1977; Wilkens, 1988; Jefferey, 2009). Lo que ha sugerido que el incremento en esta disparidad morfológica puede promover que tanto los rasgos regresivos como constructivos (e.g. modificaciones cefálicas, órganos sensoriales) probablemente sean impulsados por una fuerte selección direccional (Jones *et al.*, 1992; Klaus *et al.*, 2013), sin descartar el posible efecto generado por la evolución neutral (Klaus *et al.*, 2013; Wilkens & Strecker, 2017). Bajo este contexto, las poblaciones troglobias de

ambos linajes (viejo y nuevo), presentan valores más altos de disparidad morfológica, reflejando el hecho de que han colonizado múltiples cuevas que presentan presiones selectivas similares (oscuridad perpetua, temperatura y salinidad constantes) que a su vez, pueden variar de cueva a cueva, viéndose afectadas por el tiempo que el linaje ha evolucionado en estas condiciones.

Conclusión

Encontramos un patrón de evolución morfológica en paralelo en la ecomorfología, forma de la premaxila, forma del cuerpo y forma de la cabeza para las diferentes poblaciones y linajes de los *Astyanax* troglobios. La forma de la cabeza es donde tenemos mayor grado de diferencia morfológica entre los morfotipos, la premaxila tiene un menor grado de diferencia morfológica y, por último, la forma del cuerpo es el que menos divergencia presenta a nivel de morfotipo. Estos patrones de evolución en paralelo nos indican que la variación morfológica se da como una respuesta a presiones selectivas similares, desarrollando en los dos linajes morfologías similares que los diferencia del morfotipo de superficie. Sin embargo, también encontramos que hay diferentes grados de divergencia morfológica a nivel de linaje para el morfotipo troglobio, la inclusión de más poblaciones de diferentes cuevas para los dos linaje genéticos nos permite comprender mejor cómo se da esta diversidad y evolución morfológica, pudiendo verse afectada por el tiempo que llevan los linaje en la cueva, apoyando la idea de que el linaje filogenéticamente viejo presente una forma troglobia con rasgos más especializados y un mayor grado de regresión evolutiva. Por lo siguiente podemos plantear dos cosas: 1) Al presentar diferentes grados de divergencia morfológica en los rasgos del organismos, podemos pensar que responden de manera independiente a las distintas presiones de selección. 2) Las diferencias a nivel de linaje nos sugiere que existe una contingencia histórica que podría estar afectando la evolución de la forma en los sistemas de cueva, además, proponen que a mayor tiempo pase una población en la cueva, esta puede presentar un mayor grado de divergencia morfológica.

Bibliografía

- Adams, D. C., Berns, C. M., Kozak, K. H., & Wiens, J. J. (2009). Are rates of species diversification correlated with rates of morphological evolution? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1668), 2729–2738. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0543>
- Albertson, R. C., Strelman, J. T., Kocher, T. D., & Yelick, P. C. (2005). Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16287–16292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506649102>
- Álvarez, J. (1946). Revisión del género *Anoptichthys* con descripción de una especie nueva (Pisces, Characidae). *Anuales Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 4, 263–282.
- Álvarez, J. (1947). Descripción de *Anoptichthys hubbsi* caracindo ciego de La Cueva de Los Sabinos, S. L. P. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 8, 215–219.
- Atukorala, A. D. S., Hammer, C., Dufton, M., & Franz-Odenaal, T. A. (2013). Adaptive evolution of the lower jaw dentition in Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*). *EvoDevo*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-28>
- Behrmann-Godel, J., Nolte, A. W., Kreiselmaier, J., Berka, R., & Freyhof, J. (2017). The first European cave fish. *Current Biology*, 27(7), R257–R258. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.048>
- Boggs, T., & Gross, J. (2021). Reduced oxygen as an environmental pressure in the evolution of the blind mexican cavefish. *Diversity*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/d13010026>
- Bookstein, F. L., 1989. Principal warps: Thin-plate splines and the decomposition of deformations. *I.E.E.E. Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 11: 567-585.
- Bookstein, F. L., 1991. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge University Press. 435 pp
- Collar, D. C., Near, T. J., & Wainwright, P. C. (2005). Comparative analysis of morphological diversity: does disparity accumulate at the same rate in two lineages of centrarchid fishes?. *Evolution*, 59(8), 1783-1794.
- Córdova-Tapia, F., & Zambrano, L. (2016). Fish functional groups in a tropical wetland of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Neotropical Ichthyology*, 14(2). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150162>
- Dufton, M., Hall, B. K., & Franz-Odenaal, T. A. (2012). Early Lens Ablation Causes Dramatic Long-Term Effects on the Shape of Bones in the Craniofacial Skeleton of *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050308>
- Futuyma, D. J., & Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution* (Cuarta). Sinauer Associates, Inc.
- Garita-Alvarado, C. A., Barluenga, M., & Ornelas-García, C. P. (2018). Parallel evolution of morphs of *Astyanax* species (Teleostei: Characidae) in México and Central America. *Biological Journal of the Linnean Society*, 124(4), 706–717. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly082>
- Hart, P. B., Niemiller, M. L., Burress, E. D., Armbruster, J. W., Ludt, W. B., & Chakrabarty, P. (2020). Cave-adapted evolution in the North American amblyopsid fishes inferred using phylogenomics and geometric morphometrics. *Evolution*, 74(5), 936–949. <https://doi.org/10.1111/evo.13958>

- Jones, R., Culver, D. C., & Kane, T. C. (1992). Are parallel morphologies of cave organisms the result of similar selection pressures? *Evolution*, 46(2), 353–365.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1992.tb02043.x>
- Klaus, S., Mendoza, J. C. E., Liew, J. H., Plath, M., Meier, R., & Yeo, D. C. J. (2013). Rapid evolution of troglomorphic characters suggests selection rather than neutral mutation as a driver of eye reduction in cave crabs. *Biology Letters*, 9(2). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.1098>
- Mise, F. T., Fugii, R., Pagotto, J. P. A., & Goulart, E. (2013). The coexistence of endemic species of *Astyanax*(Teleostei: Characidae) is propitiated by ecomorphological and trophic variations. *Biota Neotropica*, 13(3), 21–28. <https://doi.org/10.1590/s1676-06032013000300001>
- Howarth, F. G. (1983). Ecology of cave arthropods. *Annual Review of Entomology*, 28, 365–389.
- Howarth, F. G., & Hoch, H. (2012). Adaptive Shifts. In B. W. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (Primera edición, pp. 9–17). Elsevier Inc.
- Hulsey, C. D., & García de León, F. J. (2005). Cichlid jaw mechanics: linking morphology to feeding specialization. *Functional Ecology*, 19(3), 487–494.
- Mahler, D. L., Revell, L. J., Glor, R. E., & Losos, J. B. (2010). Ecological opportunity and the rate of morphological evolution in the diversification of greater Antillean anoles. *Evolution*, 64(9), 2731–2745. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01026.x>
- Mitchell, R. W., Russell, W. H., & Elliott, W. R. (1977). Mexican Eyeless Characin Fishes, Genus *Astyanax*: Environment, Distribution, and Evolution (L. Texas (ed.); First, Issue February 1977). TEXAS TECH UNIVERSITY.
- Ornelas-García, C. P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(340), 1–17.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-340>
- Ornelas-García, C. P., Bastir, M., & Doadrio, I. (2014). Morphometric variation between two morphotypes within the *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Actinopterygii: Characidae) genus, From a Mexican tropical lake. *Journal of Morphology*, 275(7), 721–731.
<https://doi.org/10.1002/jmor.20252>
- Ornelas-García, C. P., Bautista, A., Herder, F., & Doadrio, I. (2017). Functional modularity in lake-dwelling characin fishes of Mexico. *PeerJ*, 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.3851>
- Ornelas-García, C. P., Córdova-Tapia, F., Zambrano, L., Bermúdez-González, M. P., Mercado-Silva, N., Mendoza-Garfias, B., & Bautista, A. (2018). Trophic specialization and morphological divergence between two sympatric species in Lake Catemaco, Mexico. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4867–4875. <https://doi.org/10.1002/ece3.4042>
- Parsons, K. J., Cooper, W. J., & Albertson, R. C. (2011). Modularity of the Oral Jaws Is Linked to Repeated Changes in the Craniofacial Shape of African Cichlids. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.4061/2011/641501>
- Powers, A. K., Berning, D. J., & Gross, J. B. (2020). Parallel evolution of regressive and constructive craniofacial traits across distinct populations of *Astyanax mexicanus* cavefish. *Journal of*

- Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 334(7–8), 450–462.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.22932>
- Powers, A. K., Boggs, T. E., & Gross, J. B. (2018). Canal neuromast position prefigures developmental patterning of the suborbital bone series in *Astyanax* cave- and surface-dwelling fish. *Developmental Biology*, 441(2), 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.001>
- Powers, A. K., Davis, E. M., Kaplan, S. A., & Gross, J. B. (2017). Cranial asymmetry arises later in the life history of the blind Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177419>
- Powers, A. K., Rodiles-Hernández, R., Garita-Alvarado, C. A., Berning, D. J., Gross, J. B., & Ornelas-García, C. P. (2020). A geographical cline in craniofacial morphology across populations of Mesoamerican lake-dwelling fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 0(333), 171–180. <https://doi.org/10.1002/jez.2339>
- Protas, M., Tabansky, I., Conrad, M., Gross, J. B., Vidal, O., Tabin, C. J., & Borowsky, R. (2008). Multi-trait evolution in a cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Evolution and Development*, 10(2), 196–209. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2008.00227.x>
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Rohlf, F. J. (1993). Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. *Contributions to Morphometrics, January 1993*, 131–159.
- Rohlf, F. J. (2001). Comparative methods for the analysis of continuous variables: geometric interpretations. *Evolution*, 55(11), 2143–2160. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00731.x>
- Soares, D., & Niemiller, M. L. (2013). Extreme adaptation in caves. *The Anatomical Record*, 303:15–23. <https://doi.org/10.1002/ar.24044>
- Simon, V., Elleboode, R., Mahé, K., Legendre, L., Ornelas-García, P., Espinasa, L., & Rétaux, S. (2017). Comparing growth in surface and cave morphs of the species *Astyanax mexicanus*: Insights from scales. *EvoDevo*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13227-017-0086-6>
- Tabin, C. J. (2016). Introduction: The Emergence of the Mexican Cavefish as an Important Model System for Understanding Phenotypic Evolution. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.09999-0>
- Trapani, J., Yamamoto, Y., & Stock, D. W. (2005). Ontogenetic transition from unicuspid to multicuspid oral dentition in a teleost fish: *Astyanax mexicanus*, the Mexican tetra (Ostariophysi: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 145(4), 523–538. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2005.00193.x>
- Wagner, G. P., & Altenberg, L. (1996). Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50(3), 967–976. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02339.x>
- Wainwright, P. C. (1988). Morphology and ecology: functional basis of feeding constraints in Caribbean labrid fishes. *Ecology*, 69(3), 635–645. <https://doi.org/10.2307/1941012>

- Warton, D. I., Wright, I. J., Falster, D. S., & Westoby, M. (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 259–291. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007007>
- White, B. W., & Culver, D. C. (2012). Encyclopedia of Caves (B. W. White & D. C. Culver (eds.); Second). Academic Press of Elsevier. www.elsevier.com
- Wilkens, H. (1988). Evolution and Genetics of Epigeal and Cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Evolutionary Biology*, May, 271–367. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1043-3_8
- Wilkens, H., & Strecker, U. (2017). Evolution in the Dark: Introduction. In *Evolution in the Dark*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54512-6_1
- Yamamoto, Y., & Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science*, 289(5479), 631–633. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.631>
- Yamamoto, Y., Espinasa, L., Stock, D. W., & Jeffery, W. R. (2003). Development and evolution of craniofacial patterning is mediated by eye-dependent and -independent processes in the cavefish *Astyanax*. *Evolution and Development*, 5(5), 435–446. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142X.2003.03050.x>
- Yang, J., Chen, X., Bai, J., Fang, D., Qiu, Y., Jiang, W., Yuan, H., Bian, C., Lu, J., He, S., Pan, X., Zhang, Y., Wang, X., You, X., Wang, Y., Sun, Y., Mao, D., Liu, Y., Fan, G., Shi, Q. (2016). The Sinocyclocheilus cavefish genome provides insights into cave adaptation. *BMC Biology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0223-4>
- Yoder, J. B., Clancey, E., Des Roches, S., Eastman, J. M., Gentry, L., Godsoe, W., Hagey, T. J., Jochimsen, D., Oswald, B. P., Robertson, J., Sarver, B. A. J., Schenk, J. J., Spear, S. F., & Harmon, L. J. (2010). Ecological opportunity and the origin of adaptive radiations. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(8), 1581–1596. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02029.x>
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press San Diego, 95, 443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0>

CAPÍTULO II: Ecología trófica

Introducción

Las cuevas se forman en muchos tipos de rocas y mediante diversos procesos, aunque las cuevas más grandes y comunes son las formadas en piedra caliza, dolomita y lava solidificada (White & Culver, 2012; Moldovan *et al.*, 2018). Como hábitats, las cuevas tienen algunas propiedades particulares, entre las que destacan: 1) la oscuridad perpetua, 2) la cantidad limitada de recursos y 3) parámetros ambientales constantes (*e.g.* temperatura y humedad). Estas condiciones en conjunto, definen a las cuevas como ambientes extremos y presentan fuertes presiones de selección para los organismos que habitan en ellas (White & Culver, 2012).

Ecología de las cuevas

Las cuevas son un tipo de ecosistemas únicos en su estructura física y función biológica (Moldovan *et al.*, 2018). El entorno geológico, las condiciones del hábitat terrestre exterior (tipo de vegetación, fauna y suelo) y las características hidrológicas (erosión, flujo de agua, cantidad de material arrastrado, etc.) definen los límites del ecosistema, los diversos hábitats y cómo la energía y la materia se mueven a través del sistema (Roch, 1987; Simon, 2012). Dependiendo de la naturaleza de la conexión de los cuerpos de agua con la superficie, el agua dentro de las cuevas puede diferir en temperatura, flujo y química. Por otro lado, el entorno terrestre de las cuevas se puede definir en 5 zonas: 1) entrada, 2) crepúsculo, 3) transición, 4) zona profunda y 5) aire estancado (White & Culver, 2012), que describen un gradiente desde la superficie en la que la luz disminuye y la temperatura y humedad se vuelven más estables (Howarth, 1983). Por lo tanto, los hábitats terrestres y acuáticos que se forman dentro de las cuevas no deben verse como sistemas separados, sino como un continuo en el flujo de energía relativamente limitado (Poulson y Lavoie 2000).

Estos sistemas son considerados como oligotróficos, es decir, ambientes con baja cantidad de materia orgánica disponible y densidad energética (Moldovan *et al.* 2018). Por lo que se considera que la estructura trófica de estas cuevas es menos compleja,

tanto en energía y nutrientes en comparación con el exterior (Moldovan *et al.* 2018), siendo la conectividad e interacciones con el entorno de superficie lo que mantiene en gran medida a los sistemas subterráneos (Kovac, 2018), siendo particularmente alta en sistemas formados de piedra caliza, donde la percolación de agua es característico de estas zonas (Dunne *et al.*, 2002; Romero 2009; Kovac, 2018).

En los ecosistemas de cuevas se pueden encontrar dos tipos de redes tróficas, las basadas en detritos (materia vegetal o animal en descomposición) y las basadas en bacterias quimiolitotróficas (biomasa procariota y eucariota), diferenciándose en la vía por la cual el carbono inorgánico (dióxido de carbono o bicarbonato) se transforma en compuestos orgánicos (Venarsky & Hunstman, 2018). Los ecosistemas de cuevas basados en detritos se sustentan a través de vías fotosintéticas clásicas, ya que la materia orgánica es arrastrada por el flujo de agua desde la superficie (ver más en Simon *et al.*, 2003). Por el contrario, los ecosistemas de cuevas con base quimiolitotrófica están respaldados por bacterias que adquieren energía a través de la oxidación de compuestos inorgánicos, como el sulfuro (el más común) y el metano, para transformar dióxido de carbono o bicarbonato en la biomasa microbiana que respalda la productividad primaria en las zonas más profundas de cuevas gran tamaño (ver más en Sarbu 2001; Engel, 2007; Madigan *et al.*, 2010; Venarsky & Hunstman, 2018). De este modo, es posible estudiar las redes tróficas en las cuevas, así como el nicho ecológico en el que se devuelven los organismos cavernícolas.

El estudio de las redes tróficas

Todas las interacciones presentes en el ecosistema se les denomina como red trófica (Smith & Smith, 2009) y su estudio comprende en conocer cuántos niveles hay presentes en un ecosistema, de qué manera pasa la energía y la biomasa de un nivel a otro y, de ser posible, conocer la biodiversidad presente en cada nivel (Bearhop *et al.*, 2004). Actualmente, uno de los métodos más utilizados para estudiar las redes tróficas es el de los isótopos estables, que han demostrado ser una herramienta útil para caracterizar relaciones tróficas (Boecklen *et al.*, 2011). Su utilidad se debe a que los valores medidos en los tejidos de los consumidores están estrechamente relacionados con su dieta, siendo los más utilizados el carbono y el nitrógeno

(Layman *et al.*, 2007, Jakson *et al.*, 2011). Para el nitrógeno (la proporción entre ^{14}N - ^{15}N , expresadas como $\delta^{15}\text{N}$ o $\delta^{15}\text{N}$) exhiben un enriquecimiento escalonado con las transferencias tróficas de un nivel a otro, es decir, los niveles más altos en la red tendrán una mayor señal de este isótopo; por lo tanto, son herramientas que permiten estimar la posición trófica de los organismos. Mientras, que la señal isotópica del carbono (la proporción entre ^{13}C - ^{12}C , expresadas como $\delta^{13}\text{C}$ o $\delta^{13}\text{C}$) varía entre los productores primarios con diferentes vías fotosintéticas (por ejemplo, plantas C3 vs C4), pero, la señal de $\delta^{13}\text{C}$ puede cambiar poco o nada con las transferencias de un nivel a otro dentro de la red tróficas. Por lo tanto, se utiliza para determinar las diversas fuentes de productividad primaria en la red (DeNiro & Epstein, 1981; Peterson & Fry, 1987; Post, 2002b; Layman *et al.*, 2007).

Uno de los métodos más populares para estudiar estas señales isotópicas son las métricas de Layman, que consiste en una serie de seis medidas que describen la estructura, el tamaño del nicho ecológico y los diferentes niveles tróficos que se pueden presentar en las redes tróficas (Layman *et al.*, 2007). Trabajan con los valores obtenidos de la señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$. Como primera aproximación se grafican ambas señales ($\delta^{15}\text{N}$ en el eje de las Y y $\delta^{13}\text{C}$ en el de las X), de este modo vemos que $\delta^{15}\text{N}$ describe la estructura vertical (número de niveles) de la red trófica y $\delta^{13}\text{C}$ la estructura horizontal (los diferentes productores). Por lo tanto, se han propuesto seis métricas que proporcionan variables de respuesta cuantitativas que reflejan características específicas de la estructura trófica: 1) Amplitud del $\delta^{15}\text{N}$ (RN), es el intervalo entre el organismo con el valor más alto de $\delta^{15}\text{N}$ y el organismo con el valor más bajo de $\delta^{15}\text{N}$ y describe la estructura vertical (número de niveles) de la red trófica, generalmente, intervalos muy amplios sugieren un mayor grado de diversidad trófica. 2) Amplitud del $\delta^{13}\text{C}$ (RC), es el intervalo entre el organismo con el valor más alto de $\delta^{13}\text{C}$ y el organismo con el valor más bajo de $\delta^{13}\text{C}$ y describe la estructura horizontal (los diferentes productores) de la red trófica, un intervalo amplio sugiere una gran diversidad en la base de la red. 3) Área total de nicho (TA), representa una medida de la cantidad total de espacio de nicho ocupado y, por lo tanto, una aproximación de la extensión de la diversidad dentro de la red trófica. 4) Distancia media al centroide (CD), proporciona una medida del grado medio de diversidad dentro de la red trófica, en función del grado de espaciamiento entre los organismos. 5) Distancia media al vecino más cercano (NND), es una medida de la

densidad global de agrupamiento de los organismos, que sugieren una mayor redundancia trófica si los valores son bajos. 6) La desviación estándar de la distancia al vecino más cercano (SNND), medida que se ve menos afectada por el tamaño de la muestra en comparación al NND, sugiriendo una distribución más uniforme de los nichos tróficos (Ver más en Layman *et al.*, 2007; Jakson *et al.*, 2001).

Aunado a lo anterior, en este capítulo se pretende conocer, comparar y evaluar la ecología trófica de las poblaciones troglobias de *Astyanax mexicanus*, utilizando información de siete poblaciones pertenecientes a siete cuevas distintas, en dos regiones geográficas Kársticas: La Sierra de El Abra y la Sierra de Guatemala. Esto, mediante la evaluación de las señales isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$. Adicionalmente, se quiere saber si existe una asociación entre dichas señales y la ecomorfología de las poblaciones troglobias. Por último, evaluar si la geomorfología de las cuevas tiene un impacto en la cantidad de recursos disponibles en las cuevas, que puedan afectar en las señales reportadas para las distintas cuevas. Aportando por primera ocasión una aproximación de la estructura trófica para las poblaciones troglobias al noreste de México.

Métodos

Isótopos estables

Se evaluó la señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ a partir del tejido muscular de 47 individuos provenientes de 7 localidades de cueva de la Sierra de El Abra y la Sierra de Guatemala (tabla 8), capturados en el año 2017. Las muestras fueron deshidratadas colocándolas en sal (NaCl) para ser transportadas al laboratorio y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron rehidratadas en agua miliQ, en reiteradas ocasiones hasta retirar todos los restos de sal, posteriormente fueron colocadas en un horno sin convección a una temperatura de 60°C durante 48 horas para su desecación. Luego fueron maceradas con mortero y pistilo, se pesaron (1-1.5 mg) y se almacenaron en tubos estériles de 2 mL para ser enviadas al Center of Stable Isotopes en la Universidad de Nuevo México, USA, para obtener las tasas de isótopos estables del carbono ($\delta^{13}\text{C} = 13\text{C}/12\text{C}$) y nitrógeno

($\delta^{15}\text{N} = 15\text{N}/14\text{N}$). La desviación estándar de la media fue 0.04 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ y 0.07 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$.

Tabla 8. Las 7 localidades utilizadas para los análisis de isótopos estables

Cueva	Sierra	Estado	N
Sótano de Palma Seca	El Abra	San Luis Potosí	13
Sótano de Yerbaniz	El Abra	San Luis Potosí	5
Sótano de Pichijumo	El Abra	San Luis Potosí	8
Sótano de Escondido	Guatemala	Tamaulipas	8
Sótano de Molino	Guatemala	Tamaulipas	8
Sótano de Caballo moro	Guatemala	Tamaulipas	5
Sótano de Vázquez	Guatemala	Tamaulipas	5

Mediante un ANOVA se evaluó si había diferencias estadísticas a nivel de región geográfica (i.e. El Abra vs. Guatemala) en las señales de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$. Para observar diferencias a nivel de población se realizaron comparaciones pareadas por medio de la U de Mann-Whitney, el valor de significancia fue corregido con el método de Bonferroni, ambos análisis se llevaron a cabo en el programa R ver. 3.6.1. Se realizó un análisis de nicho trófico con el método de las métricas de Layman (Layman, 2007): calculando las seis medidas: amplitud de nitrógeno (NR), amplitud de carbono (CR), el área de nicho total (TA), la distancia media al centroide (CD), la distancia media del vecino más cercano (NND), y desviación estándar de la distancia del vecino más cercano (SDNND), utilizando la biblioteca de *SIBER* ver. 2.1.4, en el programa R ver. 3.6.1. Adicionalmente, se realizó un análisis de nicho trófico con un enfoque bayesiano, este análisis se diferencia del tradicional en que se trabaja esencialmente con elipses de área estándar o “standard ellipse area” (SEA por sus siglas en inglés), las cuales, cumplen un rol similar para los datos bivariados como el de la desviación estándar para los datos univariados (Jackson *et al.*, 2011). La elipse está respaldada por la matriz de covarianza generada por las dos variables, en este caso las señales de isótopos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$, lo que reduce el efecto por el tamaño de la muestra. El enfoque bayesiano devuelve una distribución de probabilidad (posterior) a partir de una función de verosimilitud y las distribuciones de

probabilidad previas de SEA. De esta manera, las elipses resultantes pueden compararse de una manera cuantitativa y las diferencias entre las muestras pueden establecerse con referencia a una probabilidad robusta. De manera similar a las métricas de Layman, SEA_B proporciona la estimación de las 6 métricas que evalúan el nicho trófico, pero no se ven afectadas por el tamaño de la muestra. Se corrieron dos cadenas de Markov-Montecarlos (MCMC), con 10 000 permutaciones cada una, posteriormente se depuraron los primeros 1000 valores obtenidos (*burning*) en la biblioteca *SIBER* ver. 2.1.4 en el programa R ver. 3.6.1 (R Core Team, 2019), con base en el trabajo de Jackson *et al.* (2011).

Correlación ecomorfológica

Para evaluar la correlación entre las señales isotópicas y la variación morfológica se construyó una base de datos con todos los organismos de los cuales se tenían datos de isótopos estables y ecomorfológicos, teniendo un tamaño de muestra de 28 individuos. Se redujo el número de variables ecomorfológicas para trabajar con aquellas que mejor se correlacionaron con los datos de isótopos estables. Esto mediante la estandarizaron los datos por medio de la transformación Z y un Análisis de Componentes Principales (PCA), quedando un total de 12 variables: Longitud estándar (LE), Longitud de la cabeza (LCa), longitud del hocico cerrado (LHc), Longitud del hocico abierto (LHa), Intraorbital (In), Longitud del pedúnculo caudal (LPeC) Radios de la aleta dorsal (RAD), número de escamas de la línea lateral (Escamas L), hidrodinamismo, proyección del hocico (Proyección H), apertura relativa del hocico (Apertura RH) Y ancho relativo del hocico (Ancho RH). Finalmente se realizó un análisis de correlaciones canónicas (CCA por sus siglas inglés) con la nueva matriz de datos ecomorfológicos y la señal isotópica, usando la biblioteca CCA ver. 1.2 en R ver. 3.6.1. (González *et al.*, 2008).

Índice de entrada de nutrientes

Para conocer si las características geomorfológicas de las cuevas afectan la señal isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, se desarrolló un índice de entrada de nutrientes utilizando tres mediciones en las cuevas: 1) la distancia de la primera poza con peces a la entrada de la cueva (DEP), 2) la profundidad de la cueva (BC) y 3) el nivel base del valle (BLV). Y de este modo, para que nos ayude a comprender, si la señal isotópica se relaciona con la entrada de material alóctono debido a la cercanía de la

poza con la superficie o con el manto freático del subsuelo. Para obtener la primer medición, se descargaron mapas estratigráficos de las distintas cuevas en <http://www.mexicancaves.org/maps/SLP.html>, con ayuda de la herramienta de medición de TPSDig se midió esta distancia, calibrando previamente con la escala asignada en cada mapa. Las otras dos mediciones fueron tomadas de diversas fuentes bibliográficas (Elliot, 2018; Mitchell; 1977). Después empleamos la siguiente ecuación:

$$IN = \frac{DEP}{BC - BLV}$$

Donde: *IN* son las siglas asignadas al Índice de entrada de nutrientes, *DEP* es la distancia de la primera poza con peces a la entrada de la cueva (tomando en cuenta la distancia vertical y horizontal dentro de la cueva, Fig. 15 y 16); este valor se va a dividir por el resultado de la sustracción de *BC*, que es la profundidad de la cueva; y *BLV* que es el nivel base del valle. Si el valor del índice es mayor a 1, se debe a la cercanía de la poza con la entrada de la cueva, por lo tanto, los valores del *DEP*, no serán muy altos y el resultado de la sustracción de *BC-BLV*, será aún menor y se esperarían que los valores de la señal isotópica se relacionen directamente con la entrada de material alóctono. Si se obtienen valores menores a 1, se debe que la poza está más cerca del fondo de la cueva y más alejada de la entrada, por lo tanto, incluso cuando el valor de *DEP* puede ser alto, el resultado de la sustracción de *BC-BLV*, será un valor muy cercano al *DEP* o incluso mayor, entonces, esperando que los valores de los isótopos estables se deban a la contribución de material por el manto freático. Además, se evaluó si existe una relación entre el *IN* y las señales isotópicas obtenidas, realizando una regresión lineal con los valores obtenidos del *IN* para las diferentes cuevas y los valores promedio de los datos de la señal isotópica de $\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$.

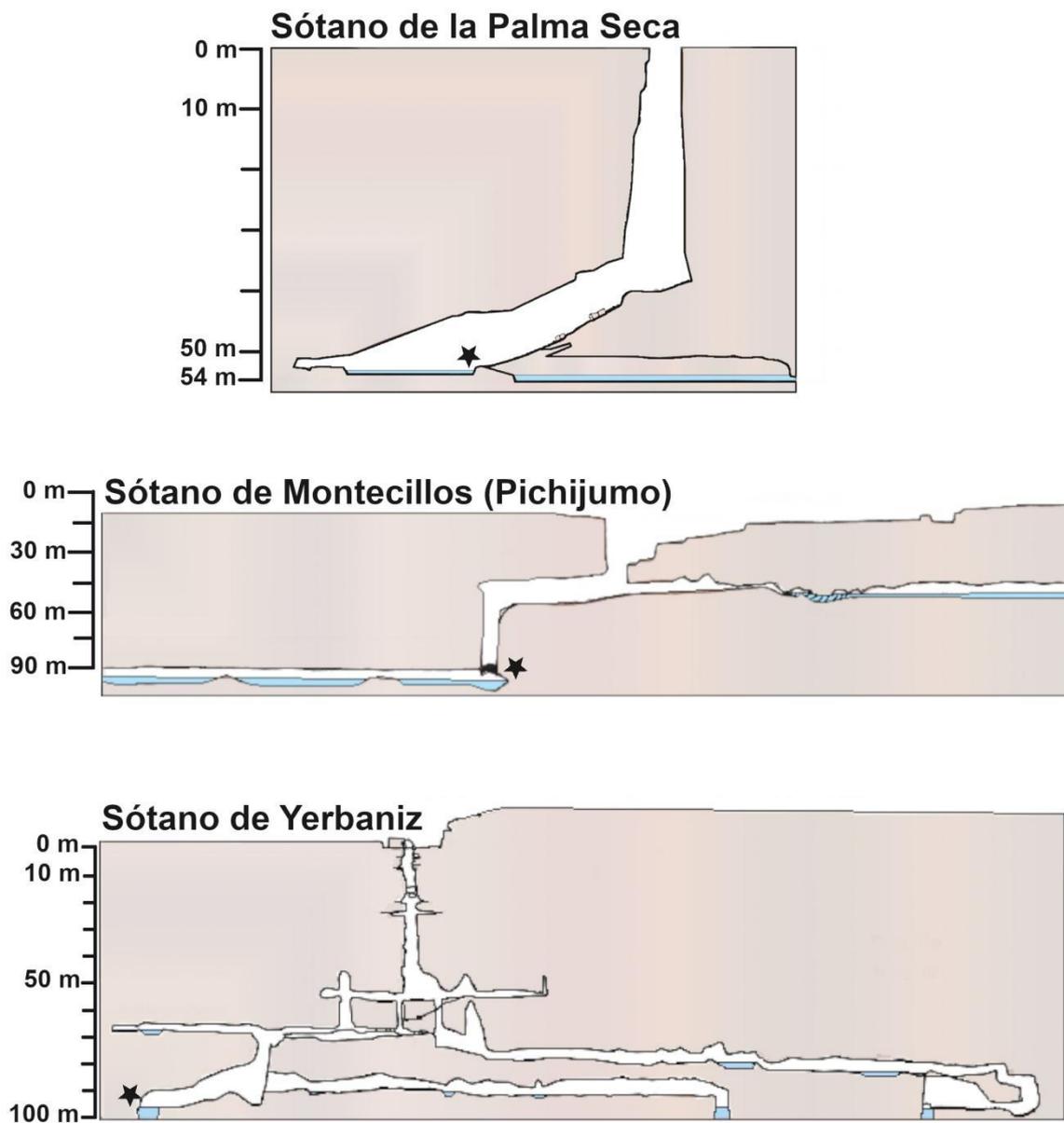


Fig. 15 Mapa vertical editado de las cuevas de la Sierra El Abra de las que se tienen datos para trabajar en el segundo capítulo. Las estrellas resaltan las pozas de las que se obtuvieron los peces, por lo tanto, son las que se tomaron en cuenta para calcular la DEP.

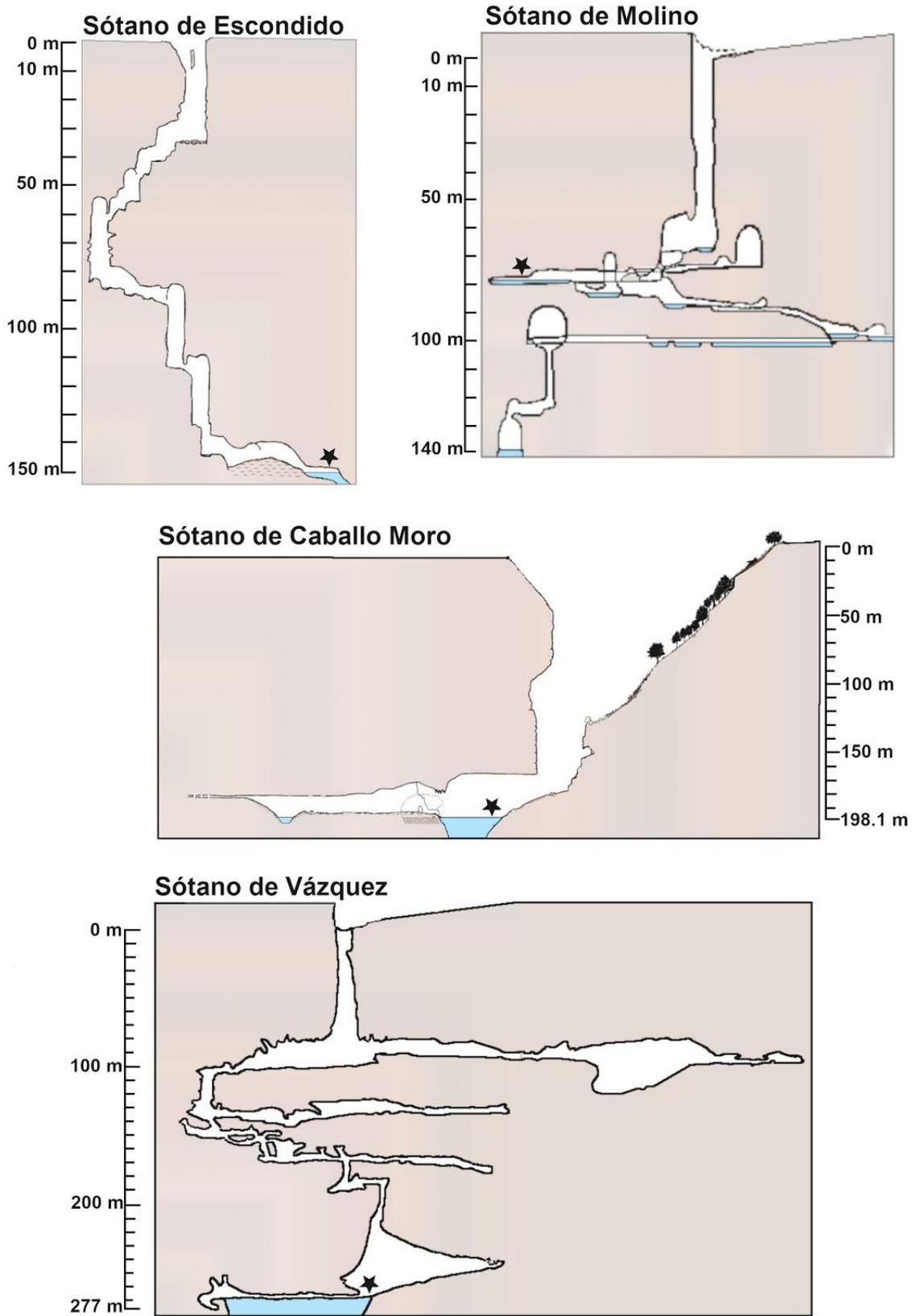


Fig. 16 Mapa vertical editado de las cuevas de la Sierra de Guatemala de las que se tienen datos para trabajar en el segundo capítulo. Las estrellas resaltan las pozas de las que se obtuvieron los peces, por lo tanto, son las que se tomaron en cuenta para calcular la DEP.

Resultados

Análisis de isótopos estables

Los resultados del ANOVA señalan que hay diferencias estadísticas significativas para ambas señales de isótopos estables a nivel de región geográfica ($\delta^{15}\text{N}$: $p = <0.05$, $\delta^{13}\text{C}$: $p < 0.05$) y a nivel de población ($\delta^{15}\text{N}$: $p < 0.05$, $\delta^{13}\text{C}$: $p < 0.05$). Lo que indica que la señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ es diferente en al menos una de las poblaciones asociadas a las siete cuevas analizadas (tabla 9).

Tabla 9. ANOVA de las señales de isótopos estables. Los valores resaltados en negritas y con un * son estadísticamente significativos: $p > 0.05$

$\delta^{15}\text{N}$	GL	Valor F	Valor P	$\delta^{13}\text{C}$	GL	Valor F	Valor P
Región	1	12.010	<0.05*	Región	1	10.802	<0.05*
Población	5	8.702	<0.05*	Población	5	11.182	<0.05*
Residuales	40			Residuales	40		

En las comparaciones a nivel poblacional, para la señal de $\delta^{15}\text{N}$, Yerbaniz fue la población con menor nivel para la Sierra de El Abra, mientras que Montecillos fue la población con el valor más alto ($\delta^{15}\text{N} = 9.19$ y 10.92 , respectivamente), siendo la población más enriquecida para ambas regiones geográficas, sin presentar diferencias estadísticas para las tres poblaciones de la Sierra de El Abra. La única población que mostró diferencia estadísticas significativas para $\delta^{15}\text{N}$ fue Molino, que a su vez, es la que tiene el valor más bajo en los dos sistemas ($\delta^{15}\text{N} = 8.55$), siendo la población menos enriquecida del estudio, esta se encuentra en la Sierra de Guatemala, y las diferencias fueron con las poblaciones más enriquecidas, es decir Montecillos y Palma seca de la región El Abra (tabla 10). Para el caso del Carbono, se encontraron valores más similares para las poblaciones dentro de las dos regiones geográficas. La sierra de El Abra tiene valores ligeramente más bajos, siendo Montecillos la población que tiene un valor más bajo ($\delta^{13}\text{C} = -29.80$) y es la población menos enriquecidas en ambas regiones geográficas (Fig. 16A), a su vez, siendo la única que presentó diferencias estadísticas significativas con la población más enriquecida, la cual es Escondido de la Sierra de Guatemala ($\delta^{13}\text{C} = -24.7$). No hubo diferencias significativas en las demás comparaciones pareadas (tabla 10).

Tabla 10. Comparaciones pareadas a nivel poblacional de la señal isotópica, mediante el método de Mann-Whitney. Los valores con * son estadísticamente significativos después de aplicar la corrección de Bonferroni $p < 0.0083$.

$\delta^{15}\text{N}$	Palma seca	Montecillos	Yerbaniz	Caballo Moro	Escondido	Molino
Montecillos	$p = 0.312$					
Yerbaniz	$p = 0.05$	$p = 0.15$				
Caballo moro	$p = 0.166$	$p = 0.071$	$p = 0.116$			
Escondido	$p = 0.309$	$p = 0.124$	$p = 0.105$	$p = 0.76$		
Molino	$p < 0.001^*$	$p < 0.001^*$	$p = 0.076$	$p = 0.055$	$p = 0.25$	
Vázquez	$p = 0.084$	$p = 0.045$	$p = 0.142$	$p = 1$	$p = 0.60$	$p = 0.051$
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
$\delta^{13}\text{C}$						
Montecillos	$p = 0.025^*$					
Yerbaniz	$p = 0.48$	$p = 0.142$				
Caballo moro	$p = 0.52$	$p = 0.04$	$p = 0.095$			
Escondido	$p = 0.05$	$p < 0.001^*$	$p = 0.041$	$p = 0.170$		
Molino	$p = 0.468$	$p = 0.13$	$p = 1$	$p = 0.22$	$p = 0.15$	
Vázquez	$p = 1$	$p = 0.035$	$p = 0.402$	$p = 0.115$	$p = 0.066$	$p = 0.65$

Análisis de isótopos estables: métricas de Layman

De acuerdo con los resultados en las seis métricas de Layman, se obtuvo que el nicho trófico de la región del Abra fue más amplio y con una menor redundancia trófica comparado con la región de Guatemala. Estas diferencias entre las regiones son visibles en los polígonos obtenidos para el CR (3.40 vs. 2.50), TA (2.27 vs. 1.47), NND (2.01 vs. 1.05) y SNND (0.95 vs. 0.45), donde para todas las métricas la Sierra de El Abra presentó los valores más altos (Fig. 17A, 18A y tabla 11). A nivel de población, Palma seca es la que tiene mayor amplitud de nicho en los dos sistemas geográficos (CN = 2.5, CR = 6.10, TA = 7.06; tabla 11), mientras que Vázquez la que presenta los valores más bajos, siendo la población que tiene mayor redundancia trófica (CN = 0.60, CR = 1.40, TA = 0.62; tabla 11).

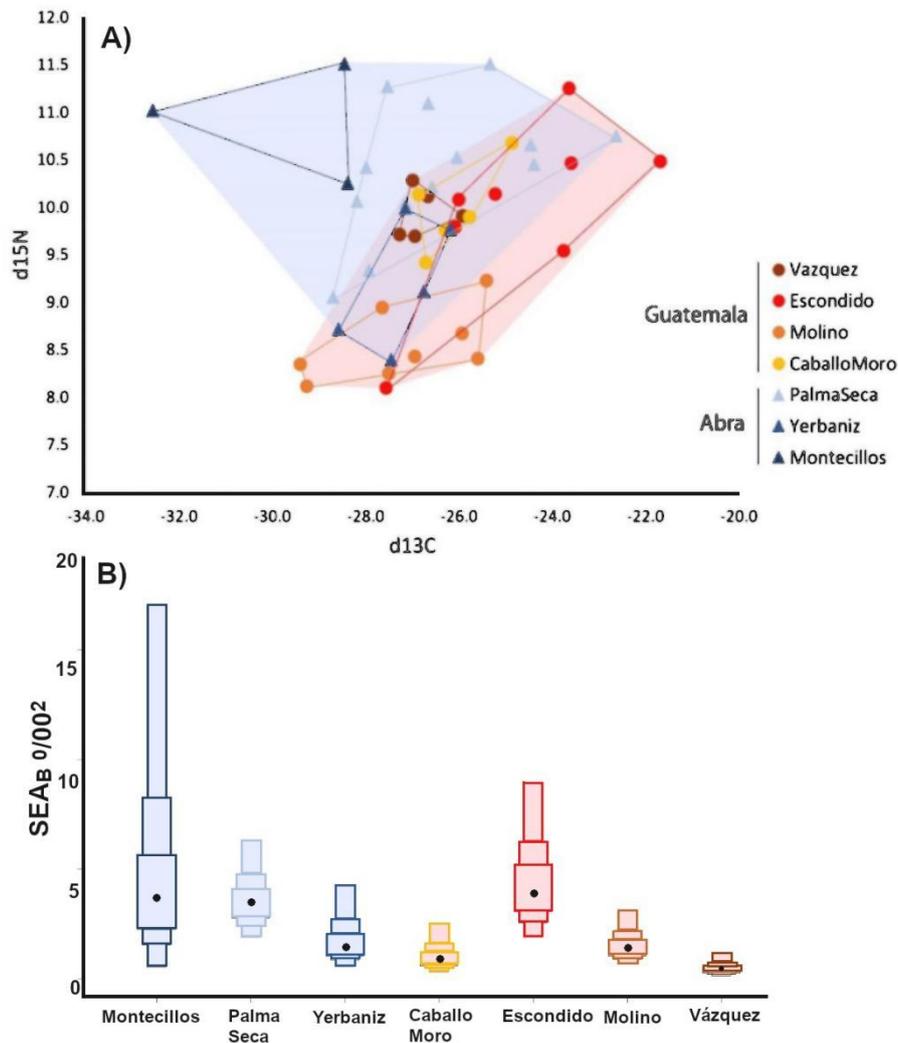


Fig. 17 Análisis de nicho trófico de las señales isotópicas. A) Bi-plot de las señales $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ analizadas con las métricas de Layman. En triángulos: las poblaciones de la Sierra de El Abra que delimitan el polígono azul. En círculos: las poblaciones de la Sierra de Guatemala que delimitan el polígono rojo. B) Análisis de SEAB de las métricas de Layman representado con un diagrama de cajas y bigotes. El punto negro representa la media. En tonos azulados: las poblaciones de la Sierra de El Abra, en tonos rojos: poblaciones de la Sierra de Guatemala.

Los resultados obtenidos por la área de elipse estándar con enfoque bayesiano (SEAB ; Fig. 17B y 18), fueron consistentes con los análisis tradicionales observando que hay diferencias entre las regiones geográficas, con SEAB más amplios para la Sierra de El Abra. La población de Montecillos es la que presenta los valores de SEAB más altos, siendo en este punto contrastante con los análisis tradicionales, donde Palma Seca es la población con las métricas más altas, mientras que Yerbaniz es la que presenta los valores de SEAB más bajos en la Sierra de El Abra. En el caso de Guatemala, Escondido es la población que presenta los valores de SEAB más altos y

Vázquez los más bajos, siendo consistentes con el análisis tradicional. Analizando las regiones geográficas en conjuntos, podemos apreciar que la métricas de Layman para la región de El Abra son mayores de acuerdo con los valores del SEA en comparación con la región de Guatemala (tabla 11 y Fig. 18). Estos resultados son consistentes con los resultados de las métricas tradicionales.

Tabla 11. Resultados de las seis métricas de Layman. Resaltados en Azul las poblaciones de la Sierra el Abra. Resaltados en naranja, poblaciones de la Sierra de Guatemala.

Población	NR	CR	TA	CD	NND	SDNND
El Abra	1.73	3.40	3.27	1.57	2.01	0.95
Palma Seca	2.5	6.10	7.06	1.62	0.74	0.42
Yerbaniz	1.60	2.40	1.79	0.95	0.99	0.09
Montecillos	1.20	4.20	2.49	1.93	2.18	1.69
Guatemala	1.45	2.50	1.41	1.01	1.05	0.45
Caballo Moro	1.30	2	0.90	0.72	0.69	0.29
Vázquez	0.60	1.40	0.42	0.48	0.43	0.22
Escondido	3.20	5.90	6.53	1.70	1.03	0.70
Molino	1.1	4	2.29	1.30	0.45	0.17

RN = Amplitud de nitrógeno, RC = Amplitud de Carbono, TA = Área total de nicho, CD = Tamaño medio del centroide, NND = Distancia al vecino más cercano, SDNND = Desviación estándar al vecino más cercano

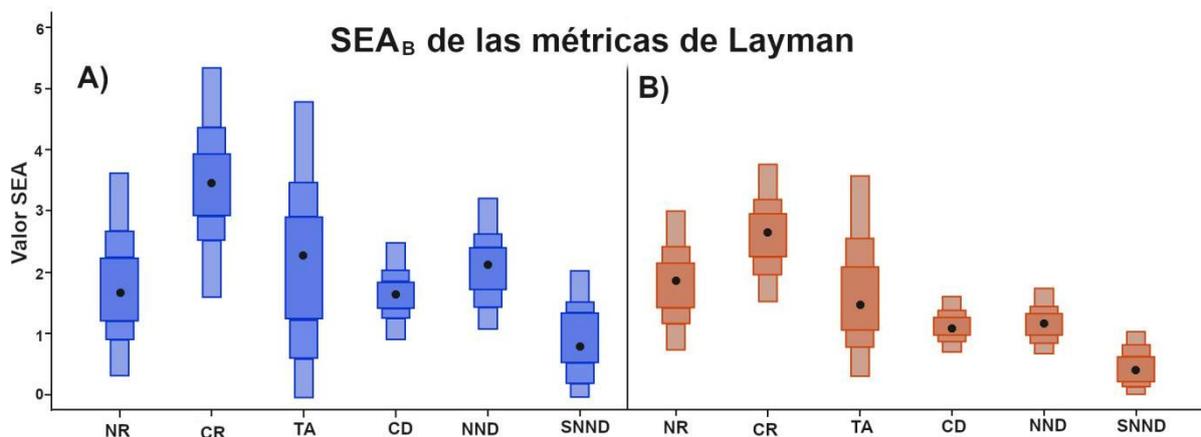


Fig. 18 Análisis de SEAB de las métricas para la dos regiones geográficas por separado, representado por un diagrama de cajas y bigotes donde el punto negro representa el valor medio de cada medida. B) Análisis de SEAB de las métricas de Layman para las poblaciones de la Sierra El Abra. C) Análisis de SEAB de las métricas de Layman para las poblaciones de la Sierra de Guatemala.

Correlación entre la ecomorfología y señal isotópicas

En la correlación de las matrices de la señal isotópica y la matriz de variables ecomorfológicas reducidas, se encontró que no hay una correlación fuerte entre la ecomorfología y la señal de isótopos estables. Sin embargo, algunas de las variables ecomorfológicas asociadas a hábitos tróficos mostraron los valores de correlación más alta, destacando la proyección del hocico (P. Hocico) y la longitud del hocico cerrado (LHc) para la señal de $\delta^{15}\text{N}$ (Corr = 0.326, Cor = 0.299, respectivamente, tabla 12), mientras que el ancho relativo del hocico fue la que presentó el valor más alto de correlación con $\delta^{13}\text{C}$ (Cor = 0.301, tabla 12).

Tabla 12. Valores de correlación entre las variables morfológicas y los datos de la señal isotópica. Se resaltan en negritas los valores de correlación más alta para cada señal isotópica.

Variable	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$
LE	-0.150	0.133
LCa	-0.042	0.096
LHc	0.299	0.215
LHa	-0.014	0.094
In	0.227	0.051
LPeC	-0.208	0.105
RAD	0.109	-0.133
Escamas	0.089	-0.029
Hidrodinamismo	-0.045	0.053
Proyección del Hocico	0.326	0.204
Altura relativa del Hocico	-0.293	0.133
Ancho relativo del Hocico	-0.131	0.301

El análisis de correlaciones canónicas arrojó dos dimensiones, creadas por la correlación de matrices, generando un gráfico donde se aprecia una separación a nivel de región geográfica. Por un lado, la matriz que más impacto tiene en las dos dimensiones es la señal isotópica. Teniendo la carga positiva en la dimensión 1 por parte del $\delta^{15}\text{N}$, es donde se encuentran distribuidas las poblaciones de la Sierra el Abra (Fig. 19). En el lado negativo se encuentra la señal de $\delta^{13}\text{C}$, donde se

encuentran las poblaciones de la Sierra de Guatemala. En la dimensión 2 la variable más importante es también $\delta^{13}\text{C}$. Las variables ecomorfológicas no tienen un efecto fuerte en la separación de las regiones geográficas, siendo congruentes con los resultados de que no hay una correlación entre las matrices de datos.

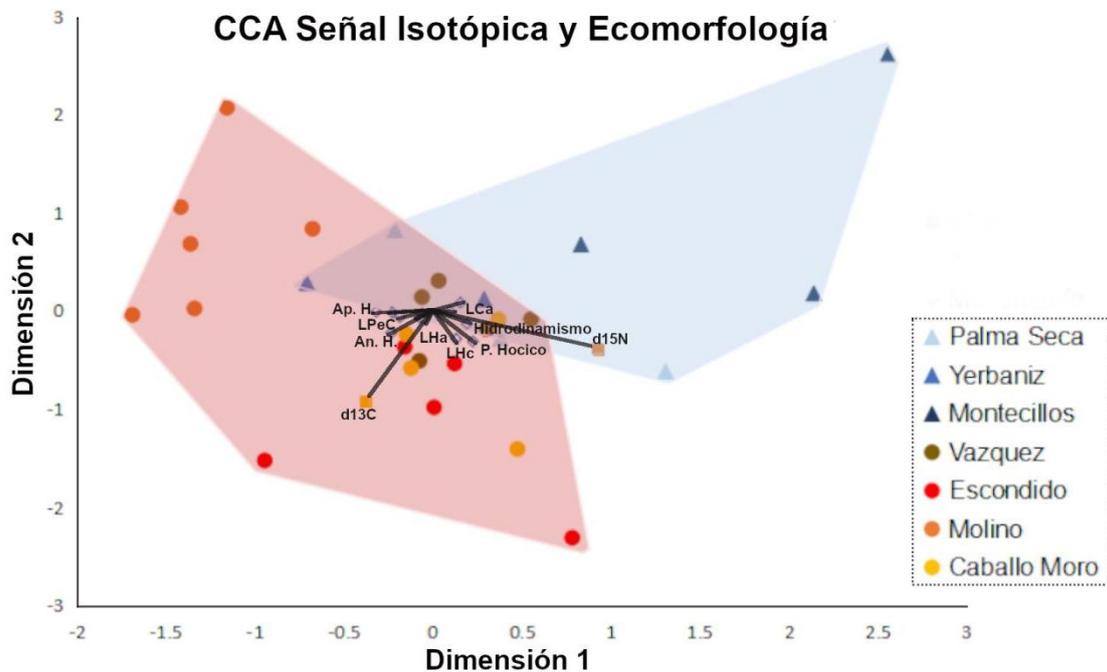


Fig. 19 Análisis de correlación canónica entre la señal de los isótopos estables y la variación ecomorfológica. En Triángulos, las poblaciones de la Sierra el Abra y delimitan el polígono azul. En círculos, las poblaciones de la Sierra de Guatemala que delimitan el polígono rojo.

Índice de entrada de nutrientes

En los resultados obtenidos del índice de entrada de nutrientes, se observó un patrón que nos indica que las poblaciones presentes en cuevas con una mayor profundidad exhibieron valores negativos del índice, siendo la cueva de Escondido (BC = 159 msnm, DEP = 180 m, IN = -6.2) la que presenta los valores más bajos, seguido de Yerbaniz (BC = 145 msnm, DEP = 200 m, IN = -4.4) y Vázquez (BC = 277 msnm, DEP = 480m, IN = -4.1), esta última cueva a pesar de ser la que presenta más profundidad (BC) y mayor distancia de la poza a la entrada (DEP), no es la que tiene el valor más bajo como se esperaba (tabla 13). Por otro lado, las poblaciones que habitan cuevas que tienen una menor profundidad (BC) y menor distancia de la poza a la entrada (DEP) obtuvieron valores del índice más altos, como Caballo Moro (BC = 109 msnm, DEP = 100 m, IN = 1.23), Molino (BC = 125 msnm, DEP = 100 m, IN = 20),

Palma seca (BC = 98 msnm, DEP = 134 m, IN = 2) y Montecillos (BC = 98 msnm, DEP = 100 m, IN = 60) que es la que obtuvo el valor más alto de todos (tabla 13).

Tabla 13. Valores de los parámetros de distintas cuevas que se utilizaron para construir el índice de entrada de nutrientes. Se incluyen el valor del índice y el promedio de la señal de isotópica por cueva.

Cueva	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	DEP (m)	BC (msnm)	BLV (msnm)	IN
Montecillos	10.9	-29.8	120	98	100	60
Yerbaniz	9.1	-27.23	200	145	100	-4.4
Palma Seca	10.4	-26.43	134	98	165	2
Caballo moro	9.97	-26.11	100	109	190	1.23
Molino	8.55	-27.22	100	125	130	20
Escondido	9.98	-24.7	180	159	130	-6.206
Vázquez	9.94	-26.76	485	277	160	-4.145

DEP = Distancia de la poza con peces a la entrada de la cueva, BC = Profundidad de la cueva, BLC = Nivel base del valle, IN = Índice de entrada de nutrientes.

Para visualizar si hay un efecto de que la geomorfología de cada cueva puede alterar la obtención y asimilación de los recursos tróficos, se realizó una regresión lineal entre la señal isotópica de ($\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$) y los valores del índice de entrada de nutrientes para el caso del nitrógeno, se aprecia una tendencia en la que el valor del nitrógeno sube, conforme incrementa el valor del índice, lo que nos indica que en las cuevas con menos profundidad (BC) y distancia de la poza a la entrada de la cueva (DEP) se pueden presentar redes tróficas más complejas, aunque de acuerdo al valor de R^2 obtenido ($R^2 = 0.13$), la relación no es significativa (Fig. 20A). Caso contrario al carbono, que mostró una relación inversa, donde el valor del carbono baja, conforme incrementa el valor del índice, indicando dos cosas, que pueda haber mayor diversidad en la base de la red trófica, o que la base de la productividad primaria puede ser distinta en las cuevas más profundas. A diferencia del nitrógeno la línea de tendencia es más marcada y tiene un valor de R^2 ($R^2 = 0.75$) más alto (Fig. 20B).

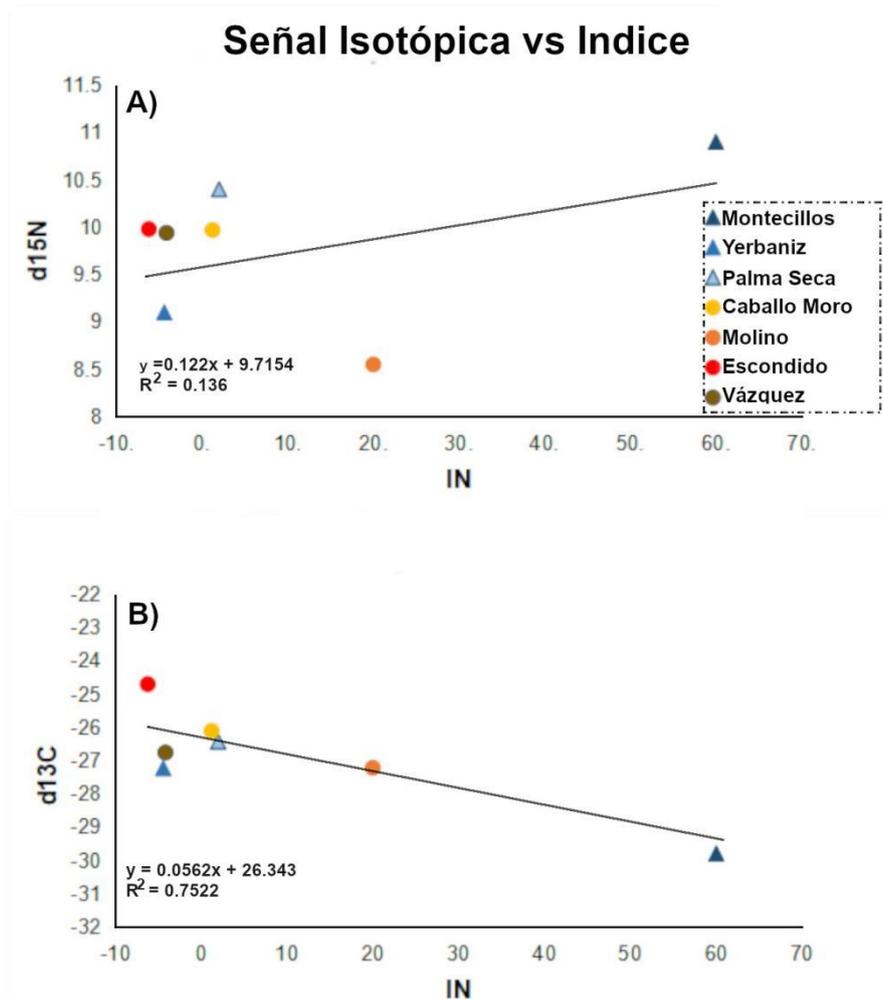


Fig. 20 Regresión lineal de las señales isotópicas y el índice de entrada de nutrientes. En triángulos: las poblaciones de la Sierra de El Abra. En círculos: las poblaciones de la Sierra de Guatemala. A) Señal del nitrógeno. B) Señal del Carbono.

Discusión

Los estudios de isótopos estables de nitrógeno ($\delta^{15}N$) y carbono ($\delta^{13}C$) proporcionan herramientas muy útiles para estimar la estructura de las redes tróficas, pudiendo determinar el nivel o posición trófica y el flujo de carbono y nitrógeno en los consumidores de la red (Post 2002). Los resultados obtenidos en este capítulo nos brindan la primera aproximación para conocer ciertos aspectos de la ecología trófica de las poblaciones de *Astyanax troglobios* en las cuevas de la Sierra de El Abra y la Sierra de Guatemala.

Determinando la ecología trófica con $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$

A grandes rasgos las señales isotópicas son ligeramente diferentes a nivel de región geográfica y en donde es posible observar una variación entre las señales isotópicas para cada población, teniendo en las cuevas de la Sierra de El Abra las señales más altas de $\delta^{15}\text{N}$ y más bajas de $\delta^{13}\text{C}$. La señal de $\delta^{15}\text{N}$ nos explica la complejidad vertical de la red trófica, mediante la identificación de los niveles tróficos presentes formados por los productores y depredadores (Zanden & Rasmussen, 1999; Post *et al.*, 2002; Bearhop *et al.*, 2004, Layman *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011). En nuestro sistema, la población de Montecillos presentó los valores más altos ($\delta^{15}\text{N} = 10.9$), y Molino los valores más bajos ($\delta^{15}\text{N} = 8.55$). En este sentido se propone que entre niveles tróficos puede haber de 3 - 4 puntos de diferencia (Zanden & Rasmussen, 1999; Post *et al.*, 2002), lo que nos plantea que el nivel trófico de los peces troglobios es similar en las distintas cuevas, sin embargo, la señal isotópica de un consumidor por sí sola generalmente no es suficiente para inferir la posición trófica sin una línea base isotópica apropiada (Zanden & Rasmussen, 1999; Post 2002), que regularmente está conformada por los productores primarios y los consumidores primarios (presas potenciales, ver más en Zanden & Rasmussen, 1999). Se ha reportado con anterioridad que los *Astyanax* troglobios se alimentan principalmente del detritus en las pozas, pero que también son depredadores activos sobre todos en las primeras etapas de su vida, encontrando principalmente microcrustáceos en sus estómagos (Espinasa *et al.*, 2017), proponiendo que en la etapa juvenil ser depredadores activos les permite nutrirse de forma adecuada hasta llegar a ser adultos (Espinasa *et al.*, 2017). Sin embargo, en múltiples expediciones, también se les ha visto ser oportunistas consumiendo animales que caen en las pozas como artrópodos o murciélagos. Por otro lado, los estudios del microbioma de las poblaciones de cuevas (Ornelas-García *et al.* 2018), han sugerido que los peces de cuevas pueden corresponder con hábitos omnívoros. En contraste, otros vertebrados como la salamandra troglobia *Eurycea spelaea*, se alimenta de guano de murciélago y su señal isotópica es más enriquecida a la emitida por el guano, el cual aporta valores nutricionales comparables con presas potenciales de invertebrados (Fenolio *et al.*, 2006). Por lo tanto, aunque sería importante en futuros estudios contemplar la red trófica completa o incluso corroborar las señales isotópicas con contenidos estomacales, pudimos constatar que no hubo diferencias en el nivel trófico entre

cuevas de ambos sistemas, Sierra de El Abra y Sierra de Guatemala en $\delta^{15}\text{N}$. Por otro lado, la señal de $\delta^{13}\text{C}$ nos permite conocer la diversidad en fuentes de carbono en la red trófica (Zanden & Rasmussen, 1999; Post *et al.*, 2002; Bearhop *et al.*, 2004, Layman *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011). Nuestros resultados mostraron ligeras diferencias en la señal de $\delta^{13}\text{C}$ (desde -28.9 en Montecillos hasta -24.7 en Escondido), estos valores son similares a los reportados para material vegetal en otros sistemas kársticos anquihalinos ($\delta^{13}\text{C} = -35$ a -25 , Brakovits *et al.*, 2017), pero difieren de lo reportado para bacterias metanotróficas ($\delta^{13}\text{C} = -75$ a -45 , ver más en Brakovits *et al.*, 2017; Chavés-Solis *et al.*, 2020). Con base en lo anterior, podemos intuir que la fuente principal de carbono en estas cuevas es la materia vegetal que proviene del exterior de las mismas, incluso para las cuevas con mayor profundidad como Vázquez ($\delta^{13}\text{C} = -26.76$, profundidad = 277 mts), siendo esta materia vegetal en descomposición parte de la dieta que ingieren los peces.

Por último, las métricas de Layman nos mostraron que la Sierra de El Abra mostró un tamaño de área de nicho (TA) mayor y menor redundancia trófica (SDNND), en comparación con la Sierra de Guatemala. Estas medidas suelen usarse como una medida cuantitativa del nicho ecológico que ocupa una población (Bearhop *et al.*, 2004, Layman *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011). Para el caso de TA, corresponde con el ancho total del nicho que la población puede explotar, y con base en nuestros resultados, la población de Palmaseca de la región de la Sierra de El Abra (TA = 6.10) es la que presentó el valor más alto, con un fuerte contraste con la población de Vázquez de la Sierra de Guatemala (TA = 0.42). A su vez, Vázquez mostró los valores de similitud general de nicho trófico entre los individuos más bajos (SDNND = 0.22), lo que se puede traducir en que hay una mayor redundancia trófica, y por tanto, determina que la competencia por los recursos para la población podría ser más intensa (Bearhop *et al.*, 2004, Layman *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011).

Señal isotópica y ecomorfología

La asociación entre la divergencia morfológica y la segregación ecológica entre especies cercanamente emparentadas, puede ser considerada como una señal de selección divergente y finalmente especiación ecológica (Schluter, 2001), por lo tanto entender la relación entre la divergencia morfológica y trófica puede dar señales de divergencia adaptativa (Ornelas-García *et al.* 2018). En el presente estudio no se

observó una fuerte correlación entre las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ y la ecomorfología de las poblaciones troglobias. Sin embargo, las tres mediciones ecomorfológicas con el valor de correlación más alto están directamente relacionadas con la adquisición de recursos, estas son la Proyección del hocico (P. Hocico), la longitud del hocico (LHc) y el ancho relativo del hocico (An. Hocico), las cuales pueden mostrar las mayores modificaciones morfológicas en respuesta a la funcionalidad de los peces para adquirir diferentes recursos alimenticios (Villéger *et al.*, 2010; Cordova Tapia y Zambrano, 2016; Ornelas-García *et al.* 2018; Garita Alvarado *et al.* 2018). Estudios de diversidad morfológica trófica en cíclidos africanos, donde se han dado la mayores radiaciones adaptativas, diversas especies simpátricas coexisten los grandes lagos como Malawi y Tanganika y presentan exclusión competitiva por medio de la especialización trófica (Albertson *et al.*, 2005). Esto ha sido posible probarlo al correlacionar los análisis de isótopos estables y de diversidad morfológica, siendo los peces con morfologías similares los que presentan posiciones tróficas similares y viceversa mientras mayor sea la diferencia morfológica mayor será la diferencia en las señales isotópicas (Montaña *et al.*, 2013). En el género *Astyanax* también se ha probado una asociación entre la especiación trófica y los análisis de isótopos estables, entre dos especies simpátricas en el lago Catemaco, Veracruz. Estas son *A. aeneus* y *A. caballeroi*, donde se ha reportado que la divergencia morfológica de los rasgos relacionados con los hábitos tróficos está asociada con la partición de nichos ecológicos, permitiendo la coexistencia de dos especies estrechamente relacionadas y logrando reducir la competencia interespecífica (Ornelas-García *et al.*, 2018). Consideramos que aunque los niveles de correlación de nuestras variables morfológicas son bajos, nos brindan la primera aproximación para conocer la asociación entre la diversidad morfológica de los *Astyanax* troglobios y su posición en los niveles tróficos en las cuevas, aunque aún son necesarios más estudios para conocer más afondo la red trófica de estos ambientes.

Señal isotópica e Índice de entrada de nutrientes

Al no contar con la línea base isotópica adecuada, este índice de entrada de nutrientes (IN) fue propuesto para comprender si las características físicas de las cuevas pueden tener un efecto en las diferencias del enriquecimiento de la señal isotópica para las distintas cuevas. Ya que se ha demostrado con anterioridad que los

atributos físicos de una cueva se correlacionan con la estructura de las comunidades en diversas cuevas tropicales en Brasil (Simões *et al.*, 2015), donde la riqueza específica se correlaciona positivamente con cuevas con entradas amplias, de mayor tamaño y con la presencia de cuerpos o flujos de agua. Los resultados obtenidos encontraron una relación que apunta a que las poblaciones de las cuevas que presentan valores del IN positivos, tienden a tener valores de $\delta^{15}\text{N}$ más enriquecidos en comparación con las poblaciones que tuvieron valores del IN negativos. Esta correlación no fue significativa, pero corresponde con las diferentes características físicas de las cuevas que evaluamos en este estudio, destacando que para valores positivos de IN competen con cuevas cuya distancia de la entrada de la cueva a la poza (DEP) donde habitan los peces, no es muy amplia, por lo que materiales alóctonos que entran por las cuevas no recorren mucha distancia hasta llegar a las pozas. Mientras que para las cuevas que presentaron valores del IN negativos, la distancia desde la entrada (DEP) fue mayor, exponiendo la lejanía del material alóctono a las pozas donde habitan los peces. Además, son cuevas con mayor profundidad (BC), haciendo muy complicado que la entrada de material alóctono llegue hasta las pozas. Mientras que para la señal de $\delta^{13}\text{C}$, la relación fue inversa, esta era menos enriquecida conforme incrementa el valor del IN, lo que nos indica que es posible que una mayor entrada de material vegetal a las cuevas podría afectar este enriquecimiento, siendo las cuevas con mayor distancia desde la entrada (DEP) y profundidad (BC), a las que llegue menos material vegetal. Los hábitats que tienen acceso a recursos por la cercanía con la entrada llegan a tener niveles altos de biodiversidad (Simões *et al.*, 2015). Sin embargo, las cuevas con mayor tamaño también presentan niveles altos de diversidad con una mayor zonación, y para cada zona se pueden encontrar diferentes organismos que presenten altos grados de especialización al modo de vida troglobio (Ferreira, 2000; Culver *et al.*, 2004; Souza-Silva *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2015)

Con base en lo anterior proponemos que la entrada de material alóctono afecta a la dinámica de la ecología trófica de cada cueva, y la cual está dada por el arrastre de material vegetal por las corrientes de agua, la percolación de agua de lluvia y la facilidad de que la fauna pueda acceder a la cueva (White & Culver, 2012), viéndose reflejado en los valores de IN para cada cueva, con valores del IN positivos en Montecillos y Palma seca en la Sierra de El Abra; Molino y Caballo Moro en la

Sierra de Guatemala, mientras que para las cuevas con IN negativos Yerbaniz para la Sierra de El Abra; Escondido y Vázquez para la Sierra de Guatemala, las cuales difieren de manera importante en sus atributos como tamaño, distancia de la entrada a la poza (DEP), y profundidad. Además de las causas mencionadas, es posible que la entrada de nutrientes también pueda ser directamente del manto freático, después de todo, se ha presentado para ambas regiones geográficas patrones hidrológicos complejos que podrían permitir interconexión entre distintas cuevas (Eliot, 2018), estos patrones también se verían afectados en la época de lluvias, cuando suben los niveles de agua de los cuerpos acuáticos exteriores como se han reportado para otras cuevas tropicales (Souza Silva *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2015).

Conclusión

Las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ presentaron diferencias entre las cuevas analizadas, lo que implica que cada una puede presentar una dinámica propia en el ciclo de nutrientes. Las métricas de Layman nos indicaron que las poblaciones de la Sierra de El Abra tienen una mayor área de nicho ecológico y menor redundancia trófica en comparación con las poblaciones de la Sierra de Guatemala. A pesar de las diferencias en las señales isotópicas, nuestros resultados sugieren que el nivel trófico ($\delta^{15}\text{N}$ = de 8.55 a 10.9) y la base de carbono ($\delta^{13}\text{C}$ = de -24.7 a -28.9) entre las poblaciones de *Astyanax* troglobios es similar y por lo tanto no corresponden con diferentes niveles tróficos. No se encontró una correlación entre las señales isotópicas y la ecomorfología, sin embargo, los rasgos morfológicos asociados a la adquisición de recursos fueron los que tuvieron el valor de correlación más alta con la señal de $\delta^{15}\text{N}$. Por último, las señales isotópicas pueden verse afectadas por las características físicas de las cuevas, destacando aspectos como la profundidad y la distancia de la entrada a la poza de los organismos, lo que puede alterar directamente la entrada de nutrientes a cada cueva. Se considera que más estudios son necesarios para conocer las redes tróficas, así como su interacción con las características hidrogeológicas de cada cueva, así como una comparación con la ecología de sus homólogos de superficie y de este modo entender el impacto de los aspectos ecológicos en la evolución de estos peces.

Bibliografía

- Albertson, R. C., Streelman, J. T., Kocher, T. D., & Yelick, P. C. (2005). Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16287–16292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506649102>
- Bearhop, S., Adams, C. E., Waldron, S., Fuller, R. A., & Macleod, H. (2004). Determining trophic niche width: A novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73(5), 1007–1012. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00861.x>
- Boecklen, W. J., Yarnes, C. T., Cook, B. A., & James, A. C. (2011). On the use of Stable Isotopes in trophic ecology. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(4), 11–40.
- Brankovits, D., Pohlman, J. W., Niemann, H., Leigh, M. B., Leewis, M. C., Becker, K. W., Iliffe, T. M., Alvarez, F., Lehmann, M. F., & Phillips, B. (2017). Methane-and dissolved organic carbon-fueled microbial loop supports a tropical subterranean estuary ecosystem. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01776-x>
- Chávez-Solís, E. M., Solís, C., Simões, N., & Mascaró, M. (2020). Distribution patterns, carbon sources and niche partitioning in cave shrimps (Atyidae: Typhlatya). *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69562-2>
- Córdova-Tapia, F., & Zambrano, L. (2016). Fish functional groups in a tropical wetland of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Neotropical Ichthyology*, 14(2). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150162>
- De Niro, M. J., & Epstein, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45, 341–351.
- Dunne, J. A., Williams, R. J., & Martinez, N. D. (2002). Food-web structure and network theory: the role of connectance and size. *PNAS*, 99, 12917–12922.
- Engel, A. S. (2012). Microbes. In B. W. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (Second, pp. 490–499). Academic Press of Elsevier.
- Espinasa, L., Bonaroti, N., Wong, J., Pottin, K., Queinnec, E., & Rétaux, S. (2017). Contrasting feeding habits of post-larval and adult *Astyanax* cavefish. *Subterranean Biology*, 21(1), 1–17. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.21.11046>
- Fenolio, D. B., Graening, G. O., Collier, B. A., & Stout, J. F. (2006). Coprophagy in a cave-adapted salamander; the importance of bat guano examined through nutritional and stable isotope analyses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1585), 439–443. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3341>
- Ferreira, R. L., Martins, R. P., & Yanega, D. (2000). Ecology of bat guano arthropod communities in a Brazilian dry cave. In *Ecotropica* (Vol. 6, Issue 2, pp. 105–116).
- Garita-Alvarado, C. A., Barluenga, M., & Ornelas-García, C. P. (2018). Parallel evolution of morphs of *Astyanax* species (Teleostei: Characidae) in México and Central America. *Biological Journal of the Linnean Society*, 124(4), 706–717. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly082>

- González, I., Déjean, S., Martin, P. G. P., & Baccini, A. (2008). CCA: An R package to extend canonical correlation analysis. *Journal of Statistical Software*, 23(12), 1–14.
<https://doi.org/10.18637/jss.v023.i12>
- Howarth, F. G. (1983). Ecology of cave arthropods. *Annual Review of Entomology*, 28, 365–389.
- Jackson, A. L., Inger, R., Parnell, A. C., & Bearhop, S. (2011). Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*, 80(3), 595–602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01806.x>
- Kováč, L. (2018). Caves as Oligotrophic Ecosystems. In O. T. Moldovan, L. Kováč, & S. Halse (Eds.), *Cave Ecology* (pp. 297–308). Springer International Publishing.
- Layman, C. A., & Post, D. M. (2008). Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? reply. *Ecology*, 89(8), 2358–2359. <https://doi.org/10.1890/08-0167.1>
- Moldovan, O. T., Editors, S. H., & Caldwell, M. M. (2018). *Cave Ecology* (O. T. Moldovan, L. Kováč, & S. Halse (eds.)). Springer International Publishing.
- Moldovan, O. T., Kováč, L., & Halse, S. (2018). Preamble. In O. T. Moldovan, L. Kováč, & S. Halse (Eds.), *Cave Ecology* (Vol. 235, pp. 1–5). Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-98852-8>
- Montaña, C. G., & Winemiller, K. O. (2013). Evolutionary convergence in Neotropical cichlids and Nearctic centrarchids: Evidence from morphology, diet, and stable isotope analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(1), 146–164. <https://doi.org/10.1111/bij.12021>
- Ornelas-García, C. P., Córdova-Tapia, F., Zambrano, L., Bermúdez-González, M. P., Mercado-Silva, N., Mendoza-Garfias, B., & Bautista, A. (2018). Trophic specialization and morphological divergence between two sympatric species in Lake Catemaco, Mexico. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4867–4875. <https://doi.org/10.1002/ece3.4042>
- Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 293–320.
- Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83, 703–718.
- Poulson, T. L., & Lavoie, K. H. (2000). The trophic basis of subsurface ecosystems. In H. Wilkens, D. C. Culver, & S. Halse (Eds.), *Subterranean ecosystems* (First, pp. 231–249). Academic Press of Elsevier.
- Romero, A. (2009). *Cave Biology: Live in Darkness* (A. Romero (ed.)). Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511596841>
- Rouch, R. (1987). Sur l'écologie des eaux souterraines dans la karst. *Stygologia*, 2(4).
- Sarbu, S. M., Kane, T. C., & Kinkel, B. F. (1996). A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 272(5270).
- Schneider, K., & Culver, D. C. (2004). Estimating subterranean species richness using intensive sampling and rarefaction curves in a high density cave region in West Virginia. *Journal of Cave and Karst Studies*, 66(2), 39–45.
- Silva, M. S., ins, R. P. M., & Ferreira, R. L. (2011). Trophic dynamics in a neotropical limestone cave. *Subterranean Biology*, 9(1), 127–138. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.9.2515>

- Simões, M. H., Souza-Silva, M., & Ferreira, R. L. (2015). Cave physical attributes influencing the structure of terrestrial invertebrate communities in Neotropics. *Subterranean Biology*, 16, 103–121. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.16.5470>
- Simon, K. S. (2012). Cave ecosystems. In B. W. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (Second, pp. 99–103). Academic Press of Elsevier.
- Simon, K. S., Benfield, E. F., & Macko, S. A. (2003). Food web structure and the role of epilithic films in cave streams. *Ecology*, 84(9).
- Vander Zanden, M. J., & Rasmussen, J. B. (1999). Primary consumer ($\delta^{13}\text{C}$) and ($\delta^{15}\text{N}$) and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology*, 80(4), 1395–1404.
- Venarsky, M. P., & Hunstman, B. M. (2018). Food webs in Caves. In O. T. Moldovan, L. Kováč, & S. Halse (Eds.), *Cave Ecology* (pp. 309–328). Springer International Publishing.
- Villéger, S., Miranda, J. R., Hernández, D. F., & Mouillot, D. (2010). Contrasting changes in taxonomie vs. functional diversity of tropical fish communities after habitat degradation. *Ecological Applications*, 20(6), 1512–1522. <https://doi.org/10.1890/09-1310.1>
- White, B. W. (1988). *Geomorphology and hydrology of karst terrains* (First). Oxford University Press.
- White, B. W., & Culver, D. C. (2012). Cave, Definition of. In B. W. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (Second, pp. 103–107). Academic Press of Elsevier. www.elsevier.com
- White, B. W., & Culver, D. C. (2012). *Encyclopedia of Caves* (B. W. White & D. C. Culver (eds.); Second). Academic Press of Elsevier. www.elsevier.com
- William R, E. (2018). *The Astyanax caves of México: cavefish of Tamaulipas, San Luis Potosí and Guerrero* (First). Association for Mexican cave studies.

CAPÍTULO III: Procesos que afectan la evolución morfológica

Introducción

Es posible examinar la evolución de un organismo a través del estudio de sus características, como sus secuencias de DNA, RNA y sus proteínas, sus vías bioquímicas, el desarrollo embriológico, las características anatómicas, comportamiento, historias de vida e interacciones inter e intra específicas (Futuyma & Kirkpatrick, 2017). Para el caso de la evolución morfológica, la interacción entre la forma y función de los organismos puede promover o limitar la evolución de nuevas características (Wake, 1982). Bajo este contexto, se han identificado diferentes procesos que pueden promover el cambio evolutivo, destacando los siguientes: 1) el uso y competencia por los recursos, que a menudo afectan o incluso determinan las fuentes de la selección natural en rasgos morfológicos (Myers, 1988; Scoville *et al* 2010; Wagner & Altenberg, 1996); 2) la distribución geográfica (Wainwright, 1988; Klingenberg y Ekau, 1995); 3) la inercia filogenética de los organismos; 4) la asimetría fluctuante (Valen, 1982), 5) y la modularidad (Wagner y Altenberg, 1996). En particular en nuestro estudio estamos interesados en identificar los diferentes procesos que pueden afectar la evolución morfológica en *Astyanax mexicanus*, un pez de la familia characidae que presenta dos morfotipos, uno asociado a la vida de superficie y otro adaptado a la vida cavernícola denominado troglobio. Estos peces han tenido al menos dos eventos de invasión a las cuevas, originando dos linajes genéticos (Wilkins, 1988; Ornelas García *et al.*, 2008; Herman *et al.*, 2018) que han tenido que evolucionar en condiciones ambientales extremas (oscuridad perpetua, diferencias en temperatura, corriente, oxigenación, etc.; Whiter & Culver, 2012). De este modo, la evolución modular, así como las restricciones impuestas por la historia evolutiva, podrían afectar la adaptación de los dos linajes del género *Astyanax* a la vida cavernícola.

Modularidad

La evolución modular o modularidad, se ha propuesto como un mecanismo que promueve la divergencia adaptativa ya que permite la variación independiente de

diferentes unidades anatómicas, denominadas módulos (Wagner & Altenberg, 1996). Los módulos son un conjunto de características que están fuertemente integradas entre sí y varían de otros conjuntos en el plano corporal de un organismo, siendo el concepto contrario la integración, que se refiere a una fuerte correlación uniforme de todas las características en el plano corporal (Wagner & Altenberg, 1996; Klingenberg, 2009; 2014). Por lo tanto, aunque los organismos responden de manera integrada a las presiones de selección, las señales ambientales pueden afectar de manera diferencial (modular) el cambio morfológico (Cardini & Elton, 2008). La evolución modular puede darse en diferentes niveles: estático, genético, funcional, ambiental, de biología del desarrollo y evolutivo, y en cualquiera de los niveles se estudia en conjunto con la integración (Klingenberg, 2009; 2014).

Las grandes radiaciones en los cíclidos africanos han sido un buen modelo para los estudios de evolución modular. En particular la fusión de los últimos arcos faríngeos, constituyendo las placas faríngeas, las cuales se han sugerido como un ejemplo de evolución modular (Hulseley *et al.*, 2019) así como módulos entre la región preorbital y postorbital del cráneo (Albertson *et al.*, 2003; 2005; Cooper *et al.*, 2010; Parsons *et al.*, 2011). En este sentido se ha sugerido que la modularidad puede ser una “innovación clave” para estos peces, donde las mandíbulas orales pueden modificarse en función a los distintos hábitos tróficos, teniendo una influencia en la tasa y dirección de la divergencia adaptativa (Parsons *et al.*, 2011). En los carácidos, se ha estudiado la presencia de evolución modular en dos especies lacustres hermanas, *Astyanax aeneus* y *A. caballeroi*, las cuales se diferencian por sus hábitos tróficos, en el Lago Catemaco, Veracruz, donde se probaron diferentes hipótesis de modularidad, siendo las mejores soportadas las que dividían el cráneo entre la región pre y post orbital, así como a la cabeza del resto del cuerpo (Ornelas-García *et al.*, 2017). Estas hipótesis modulares sugirieron que la presencia de estos módulos en el cráneo y el cuerpo podría tener un papel en la segregación trófica y de locomoción entre las dos especies (Ornelas-García *et al.*, 2017). En el presente estudio, consideramos que el morfotipo troglobio y de superficie de *Astyanax mexicanus* pueden mostrar patrones de evolución modular que podrían facilitar su adaptación a las cuevas, de forma similar a lo que se ha reportado en otros procesos de divergencia adaptativa entre especies lacustres del género *Astyanax*.

Señal filogenética

La señal filogenética describe una tendencia (patrón) de los organismos relacionados evolutivamente a parecerse entre sí, sin ninguna implicación en cuanto al mecanismo que podría causar tal semejanza (Blomberg *et al.*, 2003; Revell *et al.*, 2008; Adams, 2014), en otras palabras, describe la dependencia estadística entre los valores de las características de las especies debido a su covarianza filogenética (Revell *et al.*, 2008). Esta covarianza se define como el promedio de los valores de alguna característica de los diferentes organismos que conforman el grupo, cada uno es medido como una desviación de la “media filogenética” para dicha característica. Esta media filogenética equivale al estado ancestral en el nodo raíz de la filogenia y, por lo tanto, también el valor esperado para el fenotipo bajo un modelo evolutivo (Rohlf, 2001; Revell *et al.*, 2008). Es común equiparar una fuerte señal filogenética como una señal de conservadurismo evolutivo, lo que implica bajas tasas de cambios evolutivos entre los organismos que componen la filogenia (*e.g.*, Zanne *et al.*, 2005; Ossi & Kamilar, 2006; Swenson *et al.*, 2007). Por el contrario, una baja señal filogenética hace referencia a la labilidad evolutiva dentro del grupo, que se relaciona con cambios evolutivos rápidos, pero sin especificar en un proceso que esté implicado, como la deriva genética o la selección natural (*e.g.*, Gittleman *et al.*, 1996; Blomberg *et al.*, 2003; Rheindt *et al.*, 2004; Silvertown *et al.*, 2006).

El presente capítulo tiene como objetivo evaluar la presencia de dos procesos que afectan la evolución morfológica en el complejo *Astyanax*, a nivel de linaje y morfotipo asociado al ambiente. Por un lado, se evaluó la modularidad como el proceso que promueve esta evolución en la forma del cuerpo y de la cabeza, planteando una serie de hipótesis *a priori* que nos permitieron conocer los diferentes grados de modularidad e integración presentes. Y, a su vez, se evaluó la señal filogenética de la forma para estimar la limitación de la evolución morfológica para la forma del cuerpo y de la premaxila, utilizando la filogenia resuelta más reciente para la determinación de la covarianza filogenética con los rasgos morfológicos multivariados.

Métodos

Modularidad

Se buscó evidencia de evolución modular en *Astyanax mexicanus* entre morfotipos asociados al ambiente (i.e. troglobios vs. superficie) y la interacción linaje-morfotipo (i.e. viejo troglobio y superficie vs Nuevo troglobio y superficie). Utilizando dos marcos morfológicos: la forma del cuerpo (n = 216, 12 landmarks homólogos y una curva con 15 pseudolandmarks), ya la forma de la cabeza (n = 90, 14 landmarks homólogos y dos curvas, la dorsal con 8 *pseudolandmarks* y la ventral con 9 pseudolandmarks; ver Fig. 21).

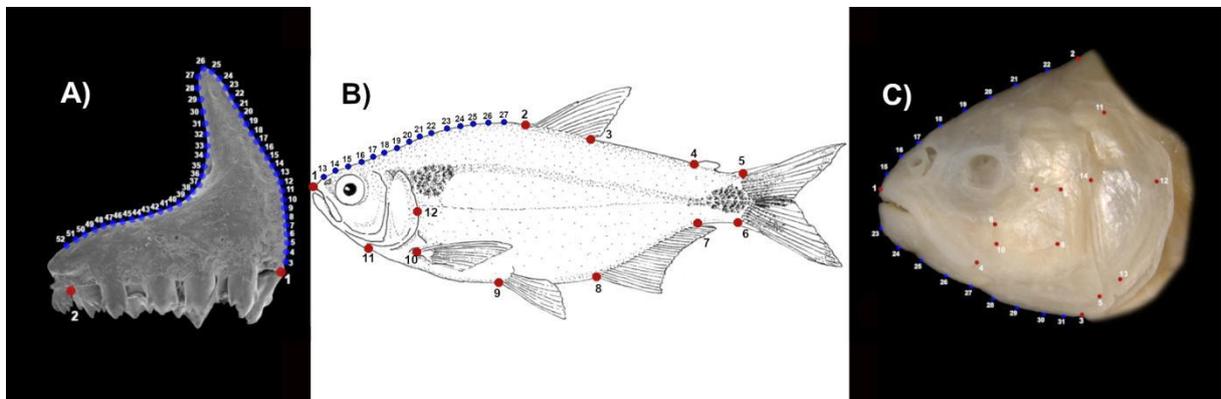


Fig. 21 Los diferentes marcos morfológicos utilizados para los análisis de modularidad y señal filogenética de la forma. A) forma de la premaxila, B) forma del cuerpo, C) forma de la cabeza

Con estos datos morfométricos se propusieron cuatro hipótesis *a priori* con base en criterios anatómicos y funcionales, tres para la forma del cuerpo y una para la forma de la cabeza (Fig. 22 y tabla 14), utilizando la covariación entre los rasgos que delimitan una estructura o módulo como criterio para evaluar la modularidad. Las hipótesis se analizaron con el coeficiente de la tasa de covarianza (CR) propuesto por Adams (2016), el cual, se calcula mediante las covarianzas pareadas entre variables, dentro y entre los diferentes módulos. Este método no es sensible al tamaño de la muestra, el número de variables que componen los marcos morfológicos o el número de hipótesis propuestas, lo cual provee una cuantificación robusta para la fuerza de asociación entre los módulos (Adams, 2016; Randau & Goswami, 2017; Felice *et al.*, 2019; Adams & Collyer, 2019). El valor de CR obtenido va de 0 a algún valor positivo, mientras más bajo sea el valor de CR hay una mayor fuerza de asociación modular, por lo que la correlación de las variables entre módulo es mayor y menor con

respecto a los módulos restantes. Si los valores son altos, o superiores a 1, generalmente nos indican que el nivel de integración es alto, por lo tanto no hay modularidad, siendo la hipótesis nula que hay integración, mientras que la alternativa es que hay modularidad (Adams, 2016; Adams & Collyer, 2019). Para comparar las hipótesis de modularidad propuestas, nos apoyamos en la biblioteca *geomorph* en el programa R ver. 3.6.1, con base en el método desarrollado por Adams (2016; Adams & Collyer, 2019). A fin de considerar el efecto por el tamaño de los organismos, se corrigieron los datos por alometría, calculando los residuales de la regresión de la forma sobre el tamaño del centroide (CS), con la función “*procD.lm*”. Una vez obtenidos los residuales se creó una forma libre de alometría, usando estos residuales y la forma consenso de los datos morfológicos. Sobre esta forma libre de alometría se hicieron los análisis. Primero, se definieron los módulos utilizando la función “*define.modules*” y la comparación de las hipótesis se llevó a cabo con la función “*modularity.test*”, con 1000 permutaciones.

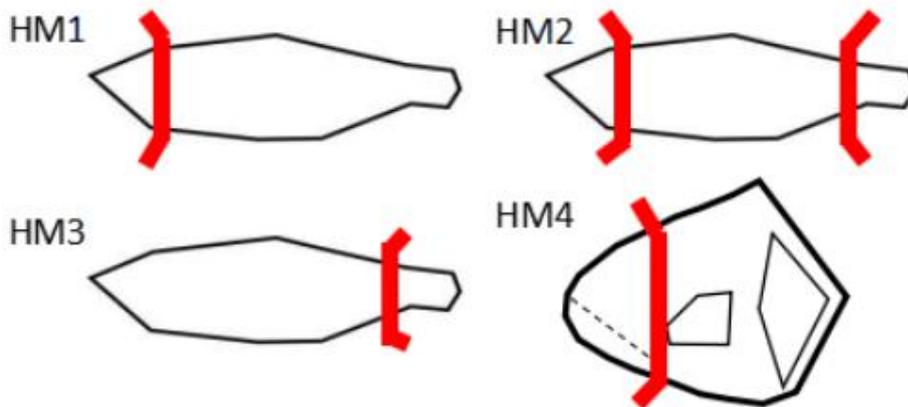


Fig. 22 Representación gráfica de las hipótesis de modularidad evaluadas. Los detalles de los módulos se pueden leer en la tabla 14.

Tabla 14. Descripción anatómica de las diferentes hipótesis de modularidad propuestas. Los corchetes definen a los landmarks que componen los distintos módulos. a) Ornelas-García *et al.* 2017, b) Franchini *et al.*, 2014, c) Yoffe *et al.*, 2020 y d) Parsons *et al.*, 2011.

Hipótesis	Descripción
HM1: Cabeza vs. Cuerpo [1,11,12,13,14,15,16,17,18] [2,3,4,5,6,7,8,9,10,19,20,21,22,23,24,25,26,27]	La cabeza como una unidad independiente del resto del cuerpo. La cabeza se asocia a la adquisición de los recursos alimenticios, y el cuerpo con la locomoción (a,b).

Tabla 14. (Continuación) Descripción anatómica de las diferentes hipótesis de modularidad propuestas. Los corchetes definen a los landmarks que componen los distintos módulos. a) Ornelas-García *et al.* 2017, b) Franchini *et al.*, 2014, c) Yoffe *et al.*, 2020 y d) Parsons *et al.*, 2011.

HM2: Cabeza vs. Cuerpo vs. Caudal [1,11,12,13,14,15,16,17,18] [2,3,8,9,10,19,20,21,22,23,24,25,26,27] [4,5,6,7]	Los tres módulos propuestos se asocian con diferentes características funcionales: La cabeza con la adquisición de recursos tróficos; el cuerpo con nado y maniobrabilidad; y la caudal con nado y propulsión. Además, para las formas de cueva se ha reportado diferencias en la distribución y abundancia de neuromastos tanto la cabeza, como la región caudal (a, c).
HM3: Cuerpo vs. Caudal [1,2,3,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27] [4,5,6,7]	Se propone a la cabeza y el cuerpo como una unidad integrada, distintas de la región caudal asociada al nado y propulsión en respuesta a las diferentes características físicas de los ambientes contrastantes (a,c).
HM4: Preorbital vs. Postorbital [1,4,15,16,17,18,23,24,25,26,27,28] [2,3,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,19,20,21,22,29,30,31]	La zona preorbital es la que se relaciona directamente con la adquisición de alimento (e.g. longitud del hocico). Diversos trabajos proponen que esta región puede presentar modificaciones independientes durante radiaciones adaptativas (a,d).

Señal filogenética

Para estimar la señal filogenética de la forma se utilizó el método de la K de Blomberg modificado por Adams para variables complejas (Adams, 2014). El valor de K obtenido es mayor a 0, siendo dichos valores proporcionales a la señal filogenética, por lo que los valores cercanos a 0 indican una señal filogenética baja o débil, mientras que los valores más altos indican señales fuertes (Blomberg *et al.*, 2003; Revell *et al.*, 2008; Adams, 2014). El valor de K se estima con la media de los errores cuadrados de la señal filogenética observados (MSEO) y la media de los errores cuadrados medios esperados bajo un modelo de evolución Browniana (MSE), dividiendo los valores observados por los esperados ($K = \text{MSEO}/\text{MSE}$; ver Blomberg *et al.*, 2003). Se espera que bajo un modelo de evolución Browniana, el valor de K sea de 1 ($K = 1$; Blomberg *et al.*, 2003; Adams, 2014). La K Blomberg provee una medida de señal filogenética robusta debido a que si las terminales del árbol utilizado

están estructuradas de manera jerárquica de forma consistente, los valores de MSEO serán relativamente grandes, mientras que los valores de MSE serán pequeños y el valor de K obtenido (la señal filogenética) será alto. Por otro lado, si la estructura de las terminales del árbol no es muy consistente, se obtiene que los valores de MSEO son relativamente pequeños, los valores de MSE son altos y el valor de K (señal filogenética) es baja (ver Blomberg *et al.*, 2003; Revell *et al.*, 2008).

Se evaluó la señal filogenética de la forma del cuerpo (12 landmarks homólogos y una curva con 15 pseudolandmarks, Fig. 21) y de la premaxila (2 landmarks homólogos y una curva con 50 pseudolandmarks, Fig. 21), utilizando la filogenia resuelta por medio de RADseq y genomas completos por Garduño-Sánchez (2021). Se trabajó con un subconjunto de datos de los organismos de los que se tenían datos morfológicos y genéticos. Primero se redujo el árbol filogenético, removiendo las terminales de las que no teníamos información morfológica utilizando el programa Mezquite ver. 3.61. El árbol resultante consiste de 13 terminales (Fig. 23), por lo que, con ayuda del programa TPSUtil, se generó una forma consenso para cada una de ellas, utilizando como criterio los resultados moleculares y las regiones hidrogeológicas propuestas por Elliott (2018), agrupando para algunas terminales más de una población (tabla 15). Para estimar la señal filogenética de la forma se trabajó con la biblioteca *geomorph* en el programa R ver. 3.6.1. usando la función “*physignal*” con 1000 permutaciones. Y, se utilizó la función “*gm.prcomp*” que realiza un análisis de componentes principales filogenéticos (PCAPhy por sus siglas en inglés) con la información genética y morfológica, permitiéndonos visualizar de forma gráfica estos resultados.

Tabla 15. Grupos obtenidos a partir de las terminales de la filogenia de RADseq y genomas completos. En la columna de derecha, las poblaciones que componen dichos grupos, de las cuales se tiene tanto la información morfológica como la molecular.

Grupo Genético	Poblaciones que los componen
Peroles	Peroles. Peces de superficie
Rascón	Rascón. Peces de superficie
Grupo Chica	Componen las poblaciones al sur de la sierra del Abra, San Luis Potosí: que habitan en las cuevas de Chiquitita, Chica y Toro.

Tabla 15. (Continuación) Grupos obtenidos a partir de las terminales de la filogenia de RADseq y genomas completos. En la columna de derecha, las poblaciones que componen dichos grupos, de las cuales se tiene tanto la información morfológica como la molecular.

Grupo Sabinos	Compone las poblaciones de la zona centro-sur de la sierra el Abra, San Luis Potosí: que habitan en las cuevas de Tinaja, Sabinos, Jos, Montecillos, Palma-Seca, Piedras y Tigre. Poblaciones troglobias del linaje viejo.
Grupo Yerbaniz	Compone las poblaciones de la zona centro-norte de la sierra el Abra, San Luis Potosí: que habitan en las cuevas de Japonés y Yerbaniz.
Pachón	Se compone de la población de Pachón al norte de la sierra el Abra, San Luis Potosí.
Santa Anita	Santa Anita. Peces de superficie
Vázquez	Compone de la población del Sótano de Vázquez, en la región de Chamal-ocampo en la Sierra de Guatemala, Tamaulipas.
Caballo Moro	Compone de la población del Sótano de Caballo Moro, en la región de Chamal-ocampo en la Sierra de Guatemala, Tamaulipas.
Grupo Escondido	Compone de la población del Sótano de Escondido, en la región de Gómez-Farías en la Sierra de Guatemala.
Grupo Molino	Se compone de las poblaciones Molino y Jineo, en la región de Gómez-Farías en la Sierra de Guatemala.
Subterráneo	Río Subterráneo, en la región de Micos, en la sierra de la Colmena, San Luis Potosí.
Grupo Superficie nuevo	Lo componen poblaciones de superficie del linaje nuevo: Río Sabinas, Nacimiento del río Mante y río Florido.

Resultados

Modularidad

Encontramos evidencia de evolución modular en 3 de las 4 hipótesis propuestas para el complejo *Astyanax mexicanus*, siendo la hipótesis modular 3 (HM3) la que no es significativa, esta es una hipótesis que divide al organismos en la región caudal vs. el resto del cuerpo, bajo criterios anatómicos y funcionales (ver tabla 16), lo que nos indica que el cuerpo de los *Astyanax* puede tener hasta 3 módulos independientes y la cabeza se divide en dos módulos. En los resultados a nivel de morfotipo, ambos morfotipos presentan modularidad en 3 de las 4 hipótesis, pero, difieren en las hipótesis que son significativas. Por un lado, para el morfotipo Troglobio la HM3 es la

que no es significativa. Con respecto al morfotipo de Superficie, es la HM1 (cabeza vs cuerpo) la que no presentó valores significativos (tabla 16). Al profundizar a nivel de linajes-morfotipo, para el grupo Troglobio los resultados son consistentes con los obtenidos anteriormente para el grupo, los dos linajes presentan evidencia de evolución modular en 3 de las 4 hipótesis (tabla 16) y es la HM3 la que no es significativa. Los linajes del morfotipo de superficie sí mostraron diferencias en la evolución modular, de acuerdo con las hipótesis que fueron significativas. Para el linaje viejo de superficie la HM1 es la que no es significativa, y para el linaje nuevo, es la HM3 la que no presenta evidencias de evolución modular (tabla 16).

Tabla 16. Resultados de los análisis de modularidad con el coeficiente de covarianza. Los valores resaltados en negritas y con un * son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Complejo <i>Astyanax mexicanus</i>	CR	Intervalos de confianza 95%		Valor de p
		Mínimo	Maximo	
HM1	0.9016	0.8733	0.9382	0.024*
HM2	0.936	0.8623	0.9639	0.033*
HM3	1	0.8673	1.0387	0.264
HM4	0.8224	0.7841	0.9154	0.001*

Morfotipo Troglobio				
HM1	0.8971	0.8653	0.9471	0.017*
HM2	0.9139	0.8914	0.9546	0.014*
HM3	0.9612	0.9099	1.0187	0.109
HM4	0.8224	0.7841	0.9154	0.001*

Troglbio Viejo				
HM1	0.8876	0.847	0.9578	0.002*
HM2	0.9024	0.8735	0.9621	0.007*
HM3	0.9442	0.8883	1.017	0.07
HM4	0.8746	0.8195	0.9696	0.002*

Troglbio Nuevo				
HM1	0.9198	0.8685	1.0006	0.03*
HM2	0.9513	0.9091	1.0257	0.03*
HM3	1.0162	0.9588	1.0786	0.207

HM4	0.7254	0.6695	0.9592	0.001*
-----	--------	--------	--------	---------------

Tabla 16. Resultados de los análisis de modularidad con el coeficiente de covarianza. Los valores resaltados en negritas y con un * son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Morfortipo Superficie				
HM1	0.9221	0.8743	0.9805	0.088
HM2	0.81	0.7264	0.9596	0.005*
HM3	0.7583	0.5951	1.0151	0.015*
HM4	0.7464	0.7078	0.8894	0.001*
Superficie Viejo				
HM1	0.9598	0.9092	1.0771	0.521
HM2	0.7785	0.7348	1.1072	0.028*
HM3	0.6506	0.5771	1.1208	0.029*
HM4	0.8829	0.8037	1.0063	0.002*
Superficie Nuevo				
HM1	0.9146	0.8686	0.9961	0.014*
HM2	0.9051	0.8636	0.9933	0.013*
HM3	0.9357	0.8435	1.0618	0.07
HM4	0.8243	0.7803	0.9637	0.001*

De manera general, las hipótesis que muestran una mayor fuerza entre los módulos para la forma del cuerpo son distintas en los morfotipos. Para el morfotipo Troglobio, es la HM1, la que tiene los valores de CR más bajos ($CR = 0.8971$) y por lo tanto, mayor fuerza de asociación dentro de los módulos, esta hipótesis divide al organismo en la cabeza vs. resto del cuerpo, estos resultados son concordantes en ambos linajes del morfotipo troglobio. En contraste, el morfotipo de superficie tiene los valores de CR más bajos en la HM 3 ($CR = 0.7583$), que divide al cuerpo en La región Caudal vs. el resto del cuerpo, sin embargo, estos resultados cambian en el linaje nuevo de superficie, donde es la HM2 (que divide al cuerpo en tres módulos: cabeza vs. cuerpo vs. región caudal) la que tiene el CR más bajo ($CR = 0.9051$) y mayor fuerza de asociación. En todos los grupos evaluados, la HM4 (preorbital vs. el post-orbital) presenta valores de CR más bajos que los del cuerpo, con excepción

del linaje nuevo de superficie (tabla 16). Estos resultados nos muestran que la evolución morfológica en el complejo *Astyanax mexicanus* se puede suscitar de forma modular, siendo los módulo de la cabeza los más propensos a evolucionar o modificarse más rápidamente con respecto a otros módulos.

Señal filogenética

En la filogenia resultante podemos observar una separación clara en dos grupos, haciendo referencia a los dos linajes reportados dentro del complejo *Astyanax mexicanus* (ver Fig. 23). En la zona inferior del árbol encontramos a las poblaciones asociadas al linaje viejo, que habitan en la Sierra El Abra, teniendo un total de seis poblaciones, de las cuales, cuatro pertenecen a las cuevas (grupo Chica, grupo Sabino, grupo Yerbaniz y Pachón) y dos son de superficie (Rascón y Peroles). Mientras que en la zona superior tenemos a las poblaciones asociadas con el linaje nuevo, que habitan en la Sierra de Guatemala y la Colmena, siendo siete poblaciones, de las cuales, cinco son troglobias (Guatemala: Caballo Moro, Vázquez, Escondido y Molino, la Colmena: Subterráneo) cuevas y dos de superficie (Santa Anita y grupo de superficie linaje nuevo).

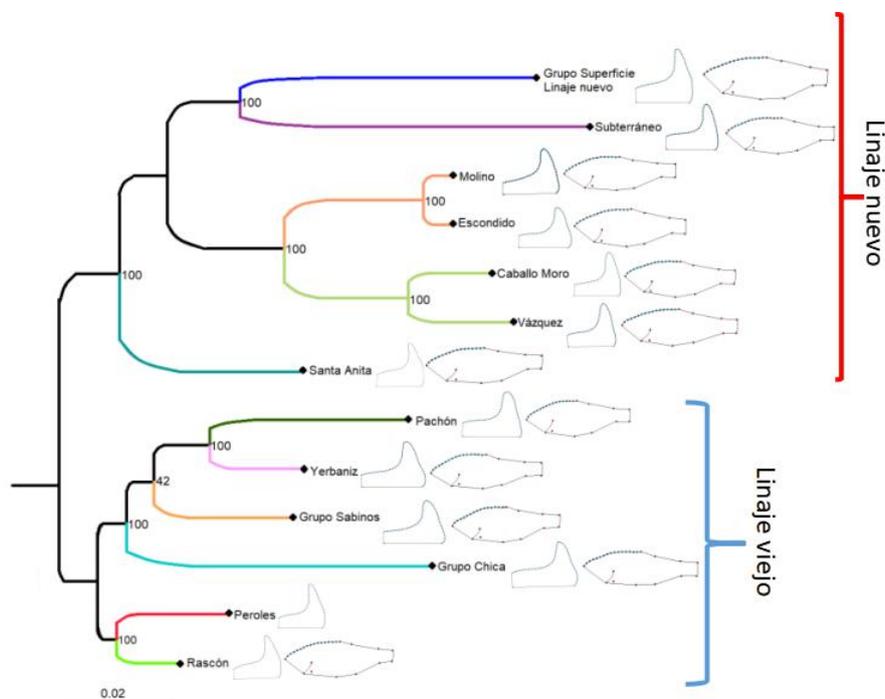


Fig. 23 Filogenia obtenida a través de datos genómicos (i.e. RadSeq y WGS, Garduño-Sánchez, 2021). En dicha filogenia se recuperan en dos linajes genéticos distintos. En la rama terminal de cada grupo se colocó la forma consenso correspondiente a ese grupo, tanto para la premaxilla como la forma del cuerpo.

De acuerdo con los resultados obtenidos no hay señal filogenética en la forma del cuerpo, obteniendo un valor de K bajo y un valor de p que no fue significativo ($K = 0.576$, $p = 0.338$; ver Fig. 24A). Pero, sí hay señal filogenética en la forma de la premaxila, teniendo un valor de K más alto y un valor de p que sí fue significativo ($K = 0.824$, $p = 0.042$; ver Fig. 24B). Ambos resultados están por debajo del valor de k esperado bajo un modelo de distribución browniana ($k = 1$). Esto nos indica que diferentes rasgos morfológicos dentro del complejo pueden tener un mayor conservadurismo evolutivo con respecto a otros, siendo congruentes con los resultados de modularidad.

PCA filogenético

Para la forma del cuerpo, en los dos primeros componentes principales se explica el 62.61% de varianza acumulada, siendo el primer componente el que explica un mayor porcentaje (PC1 = 39.25). Como se puede observar en el filomorfoespacio las poblaciones más cercanas filogenéticamente no son cercanas en el morfoespacio de la forma del cuerpo, sino que las poblaciones troglobias están más cercanas entre sí con respecto a las poblaciones de superficie de su mismo linaje (Fig. 23A). Respetando los resultados de que no existe una señal filogenética de acuerdo con el valor de $K_{mult} = 0.576$ y de $p = 0.338$ (H_0 = no señal filogenética en la forma). Por tanto la forma del cuerpo ha evolucionado de manera plástica en ambos linajes en respuesta a las presiones ambientales ejercidas por las cuevas y el medio de superficie.

En el caso de la premaxila, los dos primeros componentes explican 86.39% de la varianza acumulada, siendo el PC1 el que más porcentaje explica (75.38%). En el filomorfoespacio se puede apreciar una separación por el linaje para las poblaciones troglobias. Mientras que para el caso de las poblaciones de superficie, se agrupan entre sí independientemente de su linaje, estando más cercanas con el linaje nuevo troglobio (Fig 23B). Aunado al resultado de que si hay una señal filogenética de acuerdo con el valor de $K_{mult} = 0.824$ y de $p = 0.042$ (H_a = Si hay señal filogenética en la forma), esto nos indica que la forma de la premaxila del linaje nuevo troglobio es similar a la del grupo de superficie, lo que nos permite plantear que tiene un mayor

conservadurismo evolutivo con respecto a la forma del cuerpo, pudiendo verse afectado por su rol ecológico o por el tiempo que lleve el linaje nuevo en la cueva.

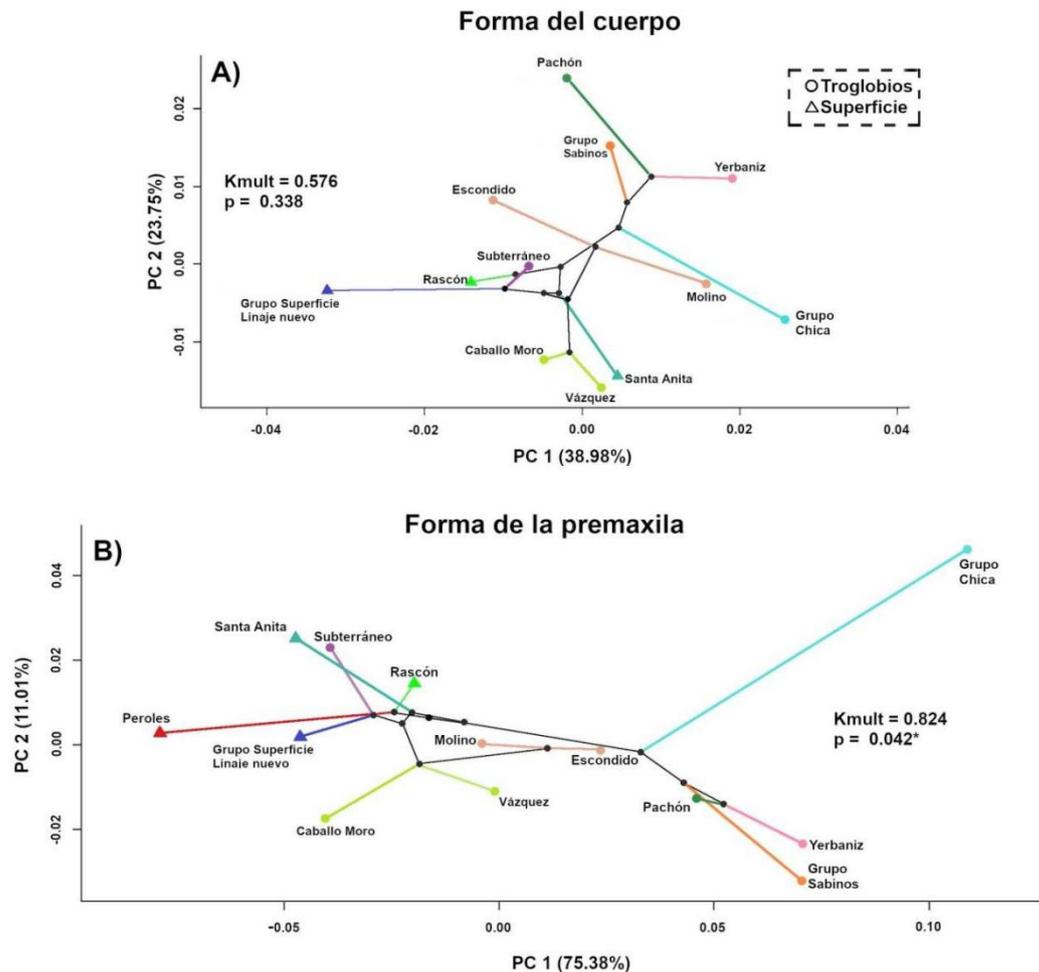


Fig. 24 Filomorfoespacio obtenidos de los análisis del PCA filogenético. En triángulos, las poblaciones troglóbias. En círculos, las poblaciones de superficie. A) PCA Filogenético de la forma del cuerpo. B) PCA filogenético de la forma de la premaxila

Discusión

Los organismos troglóbios son un excelente modelo para estudiar los mecanismos de evolución morfológica, siendo los *Astyanax* troglóbios uno de los mejores modelos (Jeffery, 2009; Tabin, 2016). Entre las características que los hace un modelo idóneo se incluye la posibilidad de la caracterización de la evolución en paralelo, ya que en al menos dos linajes han colonizado los ambientes de cuevas, además de ser organismos interfértiles con su grupo hermano de superficie,

permitiendo el estudio de las bases genéticas de los cambios morfológicos (Tabin, 2016). En este capítulo se obtuvieron resultados que nos muestran que hay evidencia de evolución morfológica modular en las formas troglobias y superficie de *Astyanax mexicanus*, de acuerdo con las diversas hipótesis *a priori* utilizadas, aportando información adicional a la hipótesis de que la modularidad puede tener un papel importante en la divergencia adaptativa como se había sugerido entre morfotipos lacustres del género (Ornelas-García, 2017). A su vez, no se encontró señal filogenética para la forma del cuerpo, sugiriendo que las formas de cueva han evolucionado de forma paralela en los diferentes linajes, en contraste con la forma de la premaxila, la cual mostró señal filogenética, implicando que ambos conjuntos de datos podrían estar sujetos a diferentes presiones selectivas, que les permiten desempeñar diferentes funciones en su medio, indicando que los rasgos pueden responder de manera diferente a las presiones de selección ambientales y verse afectados por la contingencia histórica.

Modularidad en la forma del cuerpo

Tres de las cuatro hipótesis propuestas fueron evaluadas en la forma del cuerpo, encontrando diferencias entre los dos morfotipos, indicando una diferencia en los patrones de evolución modular entre las formas troglobias y de superficie. Para el morfotipo troglobio, la HM1 tuvo los valores de CR más bajos, seguida de la hipótesis HM2. La HM1 divide al cuerpo en dos módulos, cada uno asociado con diferentes funciones ecológicas: la cabeza vs el cuerpo. La cabeza está asociada a los hábitos tróficos mientras que el cuerpo con la locomoción (Franchini *et al.*, 2014; Ornelas-García *et al.* 2017). Así, la HM2 sigue estos criterios anatómicos y funcionales, dividiendo al cuerpo en tres módulos, aunque los valores de CR son más altos (Adams, 2016; Adams & Collyer, 2019). En esta hipótesis se incluye la región del pedúnculo caudal como un módulo aparte, ya que dentro de la locomoción, es un rasgo asociado con la propulsión y maniobrabilidad de los organismos (Ornelas-García *et al.*, 2017). Ambas hipótesis nos indican que la modularidad favorece la evolución morfológica en el morfotipo troglobio en respuesta al ambiente. En el caso de la cabeza, la diversificación se puede deber a múltiples adaptaciones además de la explotación de los diferentes recursos tróficos en los ambientes de cuevas con respecto a la superficie (Yamamoto *et al.*, 2003, Albertson *et al.*, 2003;

2005; Protas *et al.*, 2008; Parsons *et al.*, 2011; Atukorola *et al.*, 2013). Estos resultados fueron congruentes en ambos linajes troglobios, lo que nos indica que la evolución modular se ha suscitado en los múltiples eventos de colonización a las cuevas promoviendo una segregación trófica y en la locomoción en paralelo. Similar a lo reportado en carácidos lacustres, donde la modularidad ha promovido la segregación trófica y locomotora en un par de especies simpátricas bajo procesos de divergencia adaptativa (Ornelas-García *et al.*, 2017).

En el caso de las poblaciones de superficie encontramos diferencias entre las hipótesis para cada linaje, lo cual podría estar en función con la historia evolutiva de los grupos como se ha sugerido entre linajes de formas lacustres (Ornelas-García *et al.* 2017). En el morfotipo de superficie de linaje nuevo la hipótesis de menor valor de CR fue la HM2 seguida de la HM1. Mientras que para el linaje viejo, la hipótesis con el valor de CR más bajo fue la HM3, la cual también divide al cuerpo en dos, sin embargo, en esta ocasión separa el pedúnculo caudal vs. el resto del cuerpo. En esta hipótesis el pedúnculo caudal está asociado con la propulsión y maniobrabilidad que pueden generar los peces (Ornelas-García *et al.*, 2017). Para este linaje contamos con dos poblaciones: la de río Rascón y la laguna de Peroles, las cuales corresponden a sistemas hidrológicos diferentes y aunado a la historia evolutiva distinta de los dos linajes (Ornelas-García *et al.*, 2008; 2017) podría explicar las diferencias encontradas entre las hipótesis de modularidad entre los linajes de superficie.

Modularidad en la forma de la cabeza

La HM4 fue significativa para los dos morfotipos, en la cual se divide la cabeza en dos módulos, el preorbital vs. el post-orbital. En la zona preorbital se encuentra el hocico, asociado los hábitos tróficos y en la postorbital tenemos otros rasgos que pueden tener una mayor relevancia para el contraste entre los morfotipos como lo es el ojo y el opérculo branquial, características claramente contrastantes entre los morfotipos (Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2018). Como observamos en el capítulo 1, la región preorbital presentó diferencias entre morfotipos siendo el morfotipo de superficie el que presentó un hocico, maxila, y la proyección del hocico mayor que el morfotipo troglobio. La

presencia de este módulo preorbital se ha sido sugerido antes para varios cíclidos africanos, promoviendo una evolución rápida y especializada asociada con la explotación de diferentes recursos (Cooper *et al.*, 2010; 2011; Parsons *et al.*, 2011). En particular en los *Astyanax* este módulo también fue reportado entre morfotipos lacustres simpátricos, siendo de forma similar a los cíclidos, un atributo asociado con la explotación diferencial de recursos tróficos (Ornelas-García *et al.* 2017). Por otro lado el segundo módulo, la región postorbital, se detectaron claras diferencias entre los dos morfotipos, siendo para el caso del morfotipo de superficie mayor el perímetro de la órbita ocular y un opérculo con una forma triangular, en contraste, el morfotipo troglobio, el cual tiene una órbita ocular menor y un opérculo con forma romboidal. Es este aspecto, las modificaciones del grupo troglobio se pueden deber a diversos factores como se mencionó previamente, resaltando las presiones ambientales ejercidas por las condiciones de oscuridad perpetua, que han reducido la estructura ocular afectando la morfología del complejo craneal (Mitchell *et al.*, 1977; Gross *et al.*, 2014; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2018); y en respuesta a niveles de oxigenación bajos en el ambiente (Boggs & Gross, 2021).

Señal filogenética: forma del cuerpo

Nuestros resultados de la forma del cuerpo no mostraron señal filogenética, lo que indica que este marco morfológico posee labilidad evolutiva (Revell *et al.*, 2008). Estos resultados son concordantes con uno de los escenarios propuestos por Sidlauskas (2008), teniendo dentro de cada linaje un grupo con alta diversidad morfológica (el morfotipo troglobio) y un grupo con con baja diversidad morfológica (morfotipo de superficie), observando en el filomorfoespacio una magnitud desigual de cambio entre los grupos. Lo que nos indica que el morfotipo troglobio ha experimentado más cambios morfológicos por rama filogenética en promedio que el grupo de superficie. Bajo este contexto, la forma del cuerpo presenta una alta plasticidad morfológica en respuesta al ambiente, posiblemente por las fuertes presiones selectivas (Klingenberg & Ekau, 1996; Sidlauskas, 2008).

Señal filogenética: forma de la premaxila.

Contrario a la forma del cuerpo, si se encontró señal filogenética para la forma de la premaxila. De manera similar, los rasgos asociados a hábitos tróficos, como

la longitud del tracto digestivo y tipo de diente han sido reportados con una fuerte señal filogenética para los peces tropicales (Guisande *et al.*, 2012; Roa-Fuentes *et al.*, 2015). Es posible que la reciente divergencia entre ambos morfotipos podría tener un efecto en la baja diferenciación en la premaxila entre los ambientes (Herman *et al.* 2018), así como que esta estructura tenga una fuerte restricción filogenética que también puede estar asociada con su función ecológica (Vitt & Pianka, 2005; Guisande *et al.*, 2012; Comte *et al.*, 2014; Roa-Fuentes *et al.*, 2015). En este caso podemos compararlo con un segundo escenario explorado por Sidlauskas (2008), el que denomina como “eficiencia desigual en innovación morfológica”, es decir, los dos morfotipos no han experimentado cambios morfológicos drásticos en la forma de la premaxila por rama filogenética, pero, el grupo con mayor diversidad morfológica (el morfotipo troglobio) ha explorado regiones más novedosas en el morfoespacio (Sidlauskas, 2008), posiblemente asociadas a las condiciones ambientales de las cuevas. Consideramos que una exploración más exhaustiva de la evolución de esta característica en el contexto evolutivo puede dar más luz con respecto a las restricciones que podrían estar asociadas con estos resultados.

Conclusiones

Encontramos evidencia de evolución modular en la forma del cuerpo y de la cabeza para el complejo *Astyanax mexicanus*. Los morfotipos mostraron diferentes patrones de modularidad. Para el caso del morfotipo troglobio, las hipótesis que fueron significativas son congruentes en ambos linajes, por lo que la evolución modular ha segregado al cuerpo en al menos dos módulos distintos, respondiendo a funciones ecológicas distintas (cabeza vs cuerpo). En el grupo de superficie se encontraron diferencias en la hipótesis de modularidad entre linajes. Las diferencias en los patrones de evolución modular entre linajes podrían estar asociados a su historia evolutiva así como a las condiciones ambientales específicas.

En el caso de la señal filogenética encontramos efecto filogenético contrastante en los marcos morfológicos analizados. La forma del cuerpo no presenta señal filogenética, sugiriendo una respuesta homoplásica de la forma del cuerpo en

respuesta a las condiciones ambientales. En el caso de la premaxila si encontramos señal filogenética, por lo que esta estructura tiene conservadurismo evolutivo.

Bibliografía

Adams, D. C. (2014). A generalized K statistic for estimating phylogenetic signal from shape and other high-dimensional multivariate data. *Systematic Biology*, 63(5), 685–697.

<https://doi.org/10.1093/sysbio/syu030>

Adams, D. C. (2016). Evaluating modularity in morphometric data: Challenges with the RV coefficient and a new test measure. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(5), 565–572.

<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12511>

Adams, D. C., & Collyer, M. L. (2019). Comparing the strength of modular signal, and evaluating alternative modular hypotheses, using covariance ratio effect sizes with morphometric data. *Evolution*, 73(12), 2352–2367. <https://doi.org/10.1111/evo.13867>

Albertson, R. C., Streelman, J. T., & Kocher, T. D. (2003). Directional selection has shaped the oral jaws of Lake Malawi cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5252–5257. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930235100>

Albertson, R. C., Streelman, J. T., Kocher, T. D., & Yelick, P. C. (2005). Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16287–16292.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0506649102>

Atukorala, A. D. S., Hammer, C., Dufton, M., & Franz-Odenaal, T. A. (2013). Adaptive evolution of the lower jaw dentition in Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*). *EvoDevo*, 4(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-28>

Bardua, C., Wilkinson, M., Gower, D. J., Sherratt, E., & Goswami, A. (2019). Morphological evolution and modularity of the caecilian skull. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1–23.

<https://doi.org/10.1186/s12862-018-1342-7>

Bermingham, E., & Moritz, C. (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: Testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7(4), 499–517. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00358.x>

Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4), 717–745.

<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x>

Boggs, T., & Gross, J. (2021). Reduced oxygen as an environmental pressure in the evolution of the blind mexican cavefish. *Diversity*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/d13010026>

Bonato, K. O., Burress, E. D., & Fialho, C. B. (2017). Dietary differentiation in relation to mouth and tooth morphology of a neotropical characid fish community. In *Zoologischer Anzeiger* (Vol. 267). Elsevier GmbH.

<https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.01.003>

Cardini, A., & Elton, S. (2008). Does the skull carry a phylogenetic signal? Evolution and modularity in the guenons. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(4), 813–834.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2008.01011.x>

Cheverud, J. M. (1982). Phenotypic, Genetic, and Environmental Morphological Integration in the Cranium. *Evolution*, 36(3), 499. <https://doi.org/10.2307/2408096>

Comte, L., Muriene, J., & Grenouillet, G. (2014). Species traits and phylogenetic conservatism of climate-induced range shifts in stream fishes. *Nature Communications*, 5, 1–10.

<https://doi.org/10.1038/ncomms6053>

Cooper, J. W., Wernle, J., Mann, K., & Albertson, R. C. (2011). Functional and Genetic Integration in the Skulls of Lake Malawi Cichlids Highly integrated anatomical structures constitute modules, and the linked concepts of modularity and integration figure prominently in discussions of evolvability. *Evolutionary Biology*, 38, 316–334. <https://doi.org/10.1007/s11692-011-9124-9>

Cooper, W. J., Wernle, J., Mann, K., & Albertson, R. C. (2011). Functional and Genetic Integration in the Skulls of Lake Malawi Cichlids. *Evolutionary Biology*, 38(3), 316–334.

<https://doi.org/10.1007/s11692-011-9124-9>

Elliott, W. R. (2018). The *Astyanax* caves of México: cavefish of Tamaulipas, San Luis Potosi and Guerrero (First). Association for Mexican cave studies.

Esteve-Altava, B. (2017). In search of morphological modules: a systematic review. *Biological Reviews*, 92(3), 1332–1347. <https://doi.org/10.1111/brv.12284>

Felice, R. N., Watanabe, A., Cuff, A. R., Noirault, E., Pol, D., Witmer, L. M., Norell, M. A., O'Connor, P. M., & Goswami, A. (2019). Evolutionary Integration and Modularity in the Archosaur Cranium. *Integrative and Comparative Biology*, 59(2), 371–382. <https://doi.org/10.1093/icb/icz052>

Franchini, P., Fruciano, C., Spreitzer, M. L., Jones, J. C., Elmer, K. R., Henning, F., & Meyer, A. (2014). Genomic architecture of ecologically divergent body shape in a pair of sympatric crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology*, 23(7), 1828–1845. <https://doi.org/10.1111/mec.12590>

Franz-Odenaal, T. A., & Hall, B. K. (2006). Modularity and sense organs in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Evolution and Development*, 8(1), 94–100.

<https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.05078.x>

Futuyma, D. J., & Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution* (Cuarta). Sinauer Associates, Inc.

Gittleman, J. L., Anderson, C. G., Kot, M., & Luh, H. K. (1996). Comparative tests of evolutionary lability and rates using molecular phylogenies. *New Uses for New Phylogenies*. Oxford University Press, Oxford, 289–307.

Goswami, A. (2006). Cranial modularity shifts during mammalian evolution. *The American Naturalist*, 168, 270–280. <https://doi.org/DOI10.1086/505758>.

Goswami, A. (2007). Cranial modularity and sequence heterochrony in mammals. *Evolution & Development*, 9, 290–298. <https://doi.org/DOI10.1371/journal.pone.0009517>

Gross, J. B., Krutzler, A. J., & Carlson, B. M. (2014). Complex craniofacial changes in blind cave-dwelling fish are mediated by genetically symmetric and asymmetric loci. *Genetics*, 196(4), 1303–1319. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.161661>

Gross, J. B., & Powers, A. K. (2016). The Evolution of the Cavefish Craniofacial Complex. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish* (Vol. 1, Issue C). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.00010-4>

Guisande, C., Pelayo-Villamil, P., Vera, M., Manjarrés-Hernández, A., Carvalho, M. R., Vari, R. P., Jiménez, L. F., Fernández, C., Martínez, P., Prieto-Piraquive, E., Granado-Lorencio, C., & Duque, S. R. (2012). Ecological factors and diversification among Neotropical characiforms. *International Journal of Ecology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/610419>

Herman, A., Brandvain, Y., Weagley, J., Jeffery, W. R., Keene, A. C., Kono, T. J. Y., Bilandžija, H., Borowsky, R., Espinasa, L., Quin, O., Ornelas-garcía, C. P., Yoshizawa, M., & Carlson, B. (2019). related traits in Mexican tetra , *Astyanax mexicanus*. 27(22), 4397–4416.

<https://doi.org/10.1111/mec.14877>.The

James Cooper, W., Parsons, K., McIntyre, A., Kern, B., Mcgee-Moore, A., & Albertson, R. C. (2010). Benthic-Pelagic Divergence of Cichlid Feeding Architecture Was Prodigious and Consistent during Multiple Adaptive Radiations within African Rift-Lakes. *PLOSone*, 5(3), 1–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009551>

Jeffery, W. R. (2009). Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish William. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 25–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134216>.Regressive

Klingenberg, C. P & Werner, E. (1996). A combined morphometric and phylogenetic analysis of an ecomorphological trend: pelagization in Antarctic fishes (Perciformes: Nototheniidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 59(2), 143–177. <https://doi.org/10.1006/bijl.1996.0059>

Klingenberg, C. P. (2009). Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: Tools for evaluating a priori hypotheses. *Evolution and Development*, 11(4), 405–421.

<https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00347.x>

Klingenberg, C. P. (2014). Studying morphological integration and modularity at multiple levels: Concepts and analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1649), 33–35. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0249>

Larouche, O., Cloutier, R., & Zelditch, M. L. (2015). Head, Body and Fins: Patterns of Morphological Integration and Modularity in Fishes. *Evolutionary Biology*, 42(3), 296–311.

<https://doi.org/10.1007/s11692-015-9324-9>

Larouche, O., Zelditch, M. L., & Cloutier, R. (2018). Modularity promotes morphological divergence in ray-finned fishes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–6.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25715-y>

Losos, J. B. (2008). Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*, 11(10), 995–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01229.x>

Mitchell, R. W., Russell, W. H., & Elliott, W. R. (1977). Mexican Eyeless Characin Fishes, Genus *Astyanax*: Environment, Distribution, and Evolution (L. Texas (ed.); First, Issue February 1977). TEXAS TECH UNIVERSITY.

Myers, A. A., & Giller, P. (1988). *Analytical Biogeography* (A. A. Myers & P. Giller (eds.); First). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-0435-4>

Ornelas-García, C. P., Bautista, A., Herder, F., & Doadrio, I. (2017). Functional modularity in lake-dwelling characin fishes of Mexico. *PeerJ*, 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.3851>

Ornelas-García, C. P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(340), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-340>

Ossi, K., & Kamilar, J. M. (2006). Environmental and phylogenetic correlates of Eulemur behavior and ecology (Primates: Lemuridae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61, 53–64. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0236-7>

Powers, A. K., Berning, D. J., & Gross, J. B. (2020). Parallel evolution of regressive and constructive craniofacial traits across distinct populations of *Astyanax mexicanus* cavefish. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(7–8), 450–462. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22932>

Powers, A. K., Boggs, T. E., & Gross, J. B. (2018). Canal neuromast position prefigures developmental patterning of the suborbital bone series in *Astyanax* cave- and surface-dwelling fish. *Developmental Biology*, 441(2), 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.001>

Powers, A. K., Rodiles-Hernández, R., Garita-Alvarado, C. A., Berning, D. J., Gross, J. B., & Ornelas-García, C. P. (2020). A geographical cline in craniofacial morphology across populations of Mesoamerican lake-dwelling fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 0(333), 171–180. <https://doi.org/10.1002/jez.2339>

Protas, M., Tabansky, I., Conrad, M., Gross, J. B., Vidal, O., Tabin, C. J., & Borowsky, R. (2008). Multi-trait evolution in a cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Evolution and Development*, 10(2), 196–209. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2008.00227.x>

Revell, L. J., Harmon, L. J., & Collar, D. C. (2008). Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Systematic Biology*, 57(4), 591–601. <https://doi.org/10.1080/10635150802302427>

Rheindt, F. E., Grafe, T. U., & Abouheif, E. (2004). Rapidly evolving traits and the comparative method: how important is testing for phylogenetic signal? *Evolutionary Ecology Research*, 6, 377–396.

Roa-Fuentes, C. A., Casatti, L., & Romero, R. de M. (2015). Phylogenetic signal and major ecological shifts in the ecomorphological structure of stream fish in two river basins in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 13(1), 165–178. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140045>

Rohlf, F. J. (2001). COMPARATIVE METHODS FOR THE ANALYSIS OF CONTINUOUS VARIABLES: GEOMETRIC INTERPRETATIONS. *Evolution*, 55(11), 2143–2160. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00731.x>

Scoville, A. G., & Pfrender, M. E. (2010). Phenotypic plasticity facilitates recurrent rapid adaptation to introduced predators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4260–4263. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912748107>

Silvertown, J., McConway, K., Gowing, D., Dodd, M., Fay, M. F., Joseph, J. A., & Dolphin, K. (2006). Absence of phylogenetic signal in the niche structure of meadow plant communities. *Proceedings of The Royal Society B*, 273, 39–44. <https://doi.org/http://dx.doi.10.1098/rspb.2005.3288>

Swenson, N. G., Enquist, B. J., Thompson, J., & Zimmerman, J. K. (2007). THE INFLUENCE OF SPATIAL AND SIZE SCALE ON PHYLOGENETIC RELATEDNESS IN TROPICAL FOREST COMMUNITIES. In *Ecology* (Vol. 88, Issue 7).

Tabin, C. J. (2016). Introduction: The Emergence of the Mexican Cavefish as an Important Model System for Understanding Phenotypic Evolution. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.09999-0>

Van Valen, L. M. (1982). Integration of species: stasis and biogeography. *Evolutionary Theory*, 6, 99–112.

Wagner, G. P., & Altenberg, L. (1996). Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50(3), 967–976. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02339.x>

Wainwright, P. C. (1988). Morphology and ecology: functional basis of feeding constraints in Caribbean labrid fishes. *Ecology*, 69(3), 635–645. <https://doi.org/10.2307/1941012>

Wake, D. B. (1982). Functional and developmental constraints and opportunities in the evolution of feeding systems in urodeles. *Environmental Adaptation and Evolution*, 51–66.

Yamamoto, Y., & Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science*, 289(5479), 631–633. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.631>

Yoffe, M., Patel, K., Palia, E., Kolawole, S., Streets, A., Haspel, G., & Soares, D. (2020). Morphological malleability of the lateral line allows for surface fish (*Astyanax mexicanus*) adaptation to cave environments. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(7–8), 511–517. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22953>

Zanne, A. E., Chapman, C. A., & Kitajima, K. (2005). Evolutionary and ecological correlates of early seedling morphology in East African trees and shrubs. In *American Journal of Botany* (Vol. 92, Issue 6). <https://doi.org/10.3732/ajb.92.6.972>

Discusión general

.Investigaciones con herramientas moleculares y enfoques ecológicos, han descubierto procesos de evolución en paralelo en diversos rasgos fenotípicos, que en asociación con las características de su medio ambiente, producen especiación ecológica producto de la divergencia adaptativa (Schluter *et al.*, 2000; 2004; Nosil, 2012; Hendry 2009; Garita-Alvarado, 2018). Bajo este contexto, los organismos troglobios ofrecen un excelente modelo para el estudio de la evolución en paralelo de los rasgos asociados a la vida cavernícola (Jeffery, 2009; White & Culver, 2012; Tabin, 2016). En esta tesis de investigación se evaluaron los patrones de evolución morfológica en paralelo entre los linajes troglobios de *Astyanax mexicanus*, la ecología trófica y su relación con la ecomorfología para algunas poblaciones troglobias de ambos linajes, y finalmente se evaluaron los mecanismos relacionados con las fuentes de variación fenotípica: la modularidad y la señal filogenética en la evolución de estos rasgos.

Evolución morfológica en paralelo: Patrones de divergencia en los linajes troglobios

En el capítulo I se describieron los patrones de divergencia morfológica para la premaxila, el cuerpo y la cabeza entre los morfotipos, troglobio y de superficie, en ambos linajes de *Astyanax mexicanus* (i.e. linaje nuevo vs. viejo). Los tres marcos morfológicos presentaron diferentes niveles de divergencia morfológico entre los morfotipos, siendo la cabeza la que presentó una mayor segregación entre morfotipos, seguida de la premaxila y por último la forma del cuerpo, donde, se apreció un solapamiento fuerte entre los morfotipos, siendo el morfotipo troglobio del linaje nuevo el que presentó mayor similitud con el morfotipo de superficie. Estos patrones de evolución en paralelo de las formas troglobias de ambos linajes para la forma de cabeza y en menor medida de la premaxila y la forma del cuerpo, nos hacen sugerir que existen fuertes presiones selectivas asociadas al ambiente que permiten la evolución de formas similares en los ambientes de cuevas. Sin embargo, las diferencias encontradas en los marcos morfológicos analizados pueden a su vez dar señales de contingencia histórica que podrían estar afectando la evolución de estas características como se observó más adelante en el caso de la premaxila. Estos patrones combinados de evolución en respuesta a presiones selectivas y

contingencia histórica en la evolución morfológica, han sido propuestos previamente en procesos de divergencia adaptativa para *Astyanax* lacustres (Garita-Alvarado, *et al.* 2018).

Los siguientes rasgos son distintivos de la forma troglobia: 1) Una talla corporal menor, siendo la media de la Longitud estándar para cuevas de 4.82cm vs. 5.48 cm para la superficie. 2) Un menor número de escamas en la línea lateral para los peces de cuevas, con una moda de 33 en cuevas vs 35 en superficie). Ambas reducciones se han relacionado en grupos a de cuevas con la limitación de recursos disponibles (Simon *et al.*, 2017). En la forma del cuerpo, entre las principales diferencias entre morfotipos están: un pedúnculo caudal es más largo y más estrecho, presentan una forma más comprimida del cuerpo que las formas de superficie sobre todo en la región cefálica. Estas diferencias podrían estar asociadas con aspectos de la locomoción como la propulsión y maniobrabilidad, y que podrían ser en respuesta a las condiciones físicas de su medio (Cordova-Tapia & Zambrano, 2017; Ornerlas-García *et al.*, 2017).

En la forma de la cabeza, el morfotipo de cuevas presentó una forma más cóncava (similar a una forma de espátula particularmente en el linaje viejo), con un hocico más largo, un incremento en el número de dientes en la maxila, y mostró diferencias en la forma de opérculo, en contraste con la forma de superficie. Estas diferencias en el opérculo (romboide en las cuevas vs triangular en superficie), se han sugerido que puede ser una adaptación a un medio hipóxico, así como el ancho y la apertura relativos del hocico (Boggs & Gross, 2021). En cuanto a las modificaciones de la cabeza y el hocico se han propuesto algunas en otros grupos de vertebrados (Barlow, 1961). De manera específica los rasgos de longitud y ancho del hocico, se asocian a los hábitos tróficos: una longitud y como un estimador para evaluar la habilidad del pez para capturar presas (Husley *et al.*, 2003), un mayor número de dientes en la maxila, siendo congruentes con reportes previos (Yamamoto *et al.*, 2003; Protas *et al.*, 2008), aunque, al aumentar en el número de cuevas analizadas por linajes se observaron diferentes modas entre los linajes (i.e. 3 dientes para el linaje viejo y 4 dientes para el linaje nuevo), sin haber diferencias significativas, y por último una premaxila con un proceso ascendente más pequeño y más robusto, con una forma más amplia, lo que posiblemente les confiere una cavidad bucal mayor, que puede

repercutir tanto en el volumen de agua que pueden filtrar para la oxigenación, como materia orgánica, siendo el detritus la principal fuente de alimento en los adultos (Espinosa *et al.*, 2017).

Finalmente, el tamaño en la cuenca ocular es uno de los rasgos más claros asociados con los ambientes de cuevas, particularmente debido a la pérdida de la visión que se da en los morfotipos troglobios, y que se ha sugerido como resultado de las fuertes presiones selectivas y costos que impone el mantenimiento de estos órganos en ambientes pobres en nutrientes (Moran *et al.*, 2015). Particularmente en este estudio observamos una asociación entre el tamaño de la cuenca ocular y modificaciones el hueso suborbital 3 (SO3), el cual tiene, una forma más compacta y en una posición distinta en la cabeza en contraste con la forma de superficie, previamente se habían sugerido estos cambios en los peces de cuevas y el número de fragmentaciones y modificaciones en los huesos suborbitales y supraorbitales (Yamamoto *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2014; Powers *et al.*, 2017; 2018).

Ecología trófica de los Astyanax troglobios

En el capítulo II de la tesis obtuvimos que las señales isotópicas entre poblaciones y regiones geográficas son ligeramente diferentes, teniendo en las cuevas de la Sierra de El Abra señales más enriquecidas de $\delta^{15}\text{N}$ y menos enriquecidas de $\delta^{13}\text{C}$, exponiendo que la dinámica de la ecología trófica en cada cueva es ligeramente diferente. Aunado a esto, los resultados de las métricas de Layman indican que las poblaciones de la Sierra de El Abra tienen un mayor nicho ecológico y menor redundancia trófica. Sin embargo, de acuerdo con los valores obtenidos y el flujo de enriquecimiento de un nivel a otro (de 3-4 puntos más de $\delta^{15}\text{N}$ en comparación del nivel anterior, Zanden & Rasmussen, 1999; Post *et al.*, 2002), se sugiere que el nivel trófico de los peces troglobios es similar en las distintas cuevas. En este punto, son necesarias más investigaciones para conocer a fondo las interacciones tróficas que se susciten en el ambiente troglobio, donde se pueda limitar un nivel trófico base (Zanden & Rasmussen, 1999; Post 2002; Fenolio *et al.*, 2006) y comparar con los niveles tróficos de los peces de superficie. Por otro lado, no observamos una correlación entre las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ obtenidas y la ecomorfología de las poblaciones troglobias. Sin embargo, en los

análisis de ordenamiento así como en las correlaciones la proyección del hocico (P. Hocico), presentó el valor de correlación más alto con 0.323 para $\delta^{15}\text{N}$ y 0.303 para $\delta^{13}\text{C}$. Este rasgo ha sido previamente asociado directamente con la adquisición de recursos tróficos (Villéger *et al.*, 2010; Cordova Tapia y Zambrano, 2016), y entre las variables que suelen tener una modificación en respuesta a la funcionalidad de los peces para adquirir diferentes recursos alimenticios (Albertson *et al.*, 2003; 2005; Cooper *et al.*, 2010; 2011; Ornelas-García *et al.*, 2014; 2017; Garita-Alvarado *et al.*, 2018), como es el caso de los *Astyanax* lacustres en el lago de Catemaco, Veracruz, donde hay una segregación morfológica y ecológica en dos especies simpátricas (Ornelas-García *et al.*, 2014; 2017; Garita-Alvarado *et al.*, 2018)

Finalmente, en este capítulo se desarrolló un índice de entrada de nutrientes para comprender si las características físicas de las cuevas pueden tener un efecto en las diferencias del enriquecimiento de la señal isotópica para las distintas cuevas. Ya que se ha demostrado con anterioridad que los atributos físicos de una cueva se correlacionan con la estructura de las comunidades en diversas cuevas tropicales (Simões *et al.*, 2015). En nuestro estudio se encontró una relación que apunta a que las poblaciones de las cuevas que presentan valores del IN positivos, tienden a tener valores de $\delta^{15}\text{N}$ más enriquecidos en comparación con las poblaciones que tuvieron valores del IN negativos. En el caso de la señal de $\delta^{13}\text{C}$, la relación fue inversa, esta era menos enriquecida conforme incrementa el valor del IN. Estos resultados no fueron significativos, pero nos dieron una pauta para entender el efecto de la geomorfología de las cuevas, destacando que la distancia de la entrada de la cueva a la poza (DEP) y la profundidad resultan de gran relevancia, ya que los recursos alóctonos recorren menor o mayor distancia según sea el caso para llegar a las pozas, así como posibles fenómenos de arrastre de materia orgánica por las corrientes de agua, la percolación de agua de lluvia y la facilidad de que la fauna pueda acceder a la cueva, todos estos factores afectan a la dinámica de la ecología trófica de cada cueva (Ferreira, 2000; Culver *et al.*, 2004; Souza-Silva *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2015). Adicionalmente, la conectividad subterránea en estos sistemas podría también afectar la adquisición de recursos directamente del manto freático, hipotetizando que en ambas regiones geográficas existen patrones hidrogeológicos complejos que podrían permitir interconexión entre distintas cuevas posiblemente durante la época de lluvias posiblemente permitiendo el transporte de nutrientes e

incluso la migración de organismos entre algunas poblaciones (Eliot, 2018; Bradic *et al.* 2012; Herman *et al.* 2018).

Procesos que afectan la evolución morfológica

En el capítulo III exploramos dos procesos que afectan directamente la evolución morfológica. Por un lado, tenemos a la modularidad como uno de los promotores de la evolución, debido a que se puede modificar un rasgo morfológico, implicando una mejora funcional sin comprometer otras funciones en otros rasgos morfológicos en el organismo (Wagner y Altenberg, 1996). En contraste, la señal filogenética indica que las especies estrechamente relacionadas presentan una mayor similitud morfológica (Blomberg *et al.*, 2003; Losos, 2008; Revell *et al.*, 2008), lo que se interpreta como una evidencia de conservadurismo evolutivo o labilidad evolutiva es los rasgos (Revell *et al.*, 2008). Ambos procesos fueron evaluados en el contexto de la divergencia adaptativa entre los morfotipos de cueva y superficie, a fin de evaluar si algunos rasgos morfológicos son más propensos a evolucionar de manera integrativa o modular, y a su vez cuál es la señal filogenética de la forma bajo presiones selectivas similares en diferentes linajes de cuevas.

Patrones de evolución modular

La evaluación de diversas hipótesis de modularidad nos ayudaron a encontrar diversos patrones de evolución modular entre los dos morfotipos. Para el marco morfológico de la cabeza, la HM4 fue la que tuvo los valores de CR más bajos en ambos morfotipos, la cual divide a la cabeza en dos módulos, la región preorbital vs la región postorbital. En la región preorbital se abarca el hocico, las narinas y todas las estructuras asociadas a la morfológica trófica. La modularidad en esta región se ha sugerido como promotora de una evolución rápida y especializada asociada con la explotación de diferentes recursos tróficos, llegando a facilitar la divergencia adaptativa y potencialmente la especiación en el género *Astyanax* (Ornelas-García *et al.*, 2017; Garita-Alvarado *et al.*, 2018), como en otros grupos de peces (Cooper *et al.*, 2010; 2011; Parsons *et al.*, 2011; 2017). Mientras, que en la región postorbital se encuentra la estructura ocular, los huesos circundantes y el opérculo branquial, estructuras que responden a otras presiones de selección. Principalmente en el morfotipo troglobio, resaltan las presiones ambientales ejercidas por las condiciones de oscuridad perpetua, que han reducido la estructura ocular afectando la morfología

del complejo craneal, así como la modificación en el opérculo que podría estar en función con la baja la disponibilidad de oxígeno (Mitchell *et al.*, 1977; Gross *et al.*, 2014; Gross & Powers, 2016; Powers *et al.*, 2018).

Para la forma del cuerpo, se encontraron diferentes patrones de modularidad entre los morfotipos. Para el morfotipo troglobio, la HM1 (cabeza vs. cuerpo) presentó los valores de CR más bajos y por lo tanto mayor soporte para una evolución modular (Adams, 2016; Adams & Collyer, 2019), seguido de la HM2 (tres módulos: cabeza, parte central del cuerpo y la cauda), estos resultados fueron consistentes en los dos linajes. En ambas hipótesis el módulo de la cabeza está asociado a los hábitos tróficos, aunque para el grupo troglobio sabemos que también responde a otras presiones selectivas como la pérdida de la visión y adaptación a condiciones de hipoxia (Boggs & Gross, 2021). Por otro lado, el módulo del cuerpo está asociado con la locomoción e hidrodinamismo (Ornelas-García *et al.* 2017). Finalmente, el módulo de la región caudal (i.e. pedúnculo caudal), se asocia también con locomoción, y de manera más particular con propulsión y maniobrabilidad de los organismos (Franchini *et al.*, 2014; Ornelas-García *et al.*, 2017). Por lo que proponemos que la modularidad es un proceso relevante que podría facilitar, de manera similar a los procesos de diversificación reportados en *Astyanax* lacustres (Ornelas-García *et al.* 2017), la divergencia adaptativa en ambos linajes de cueva, promoviendo la evolución morfológica con diferentes funciones ecológicas, como la explotación de recursos y el uso del hábitat, como se ha reportado en otros peces (Cooper *et al.*, 2010; Franchini *et al.*, 2014; Larouche *et al.*, 2015; Ornelas-García *et al.*, 2017; Larouche *et al.*, 2018).

Para el grupo de superficie encontramos diferentes patrones de modularidad en los dos linajes. Para el linaje viejo de superficie, la hipótesis que presentó un menor valor de CR fue HM3, seguida de la HM2. Para el linaje nuevo de superficie, la HM2 fue la que presentó el CR más bajo, seguida de HM1. Esto nos indicó que los dos linajes responden de manera diferente a presiones ambientales ejercidas en la superficie, esto se puede deber a las características físicas del ambiente, así como a la contingencia histórica que podría estar afectando de manera diferencial a ambos linajes de superficie, patrones que se recuperan en la evaluación de la señal filogenética de la forma (Herman *et al.*, 2018).

Patrones de la señal filogenética

La señal filogenética de la forma del cuerpo y de la premaxila, bajo el concepto de que las especies estrechamente relacionadas presentan una mayor similitud morfológica (Blomberg *et al.*, 2003; Losos, 2008; Revell *et al.*, 2008), nos indicaría que la similitud deberá ser mayor entre linajes que entre morfotipos (troglobio vs superficie). Sin embargo, encontramos patrones distintos de señal filogenética para la forma del cuerpo y de premaxila. Ambos marcos morfológicos estuvieron por debajo del valor esperado de K bajo un modelo de evolución Browniano (MB, $K = 1$, Blomberg *et al.*, 2003; Adams, 2014), el cual se considera como un buen modelo para estudiar la evolución fenotípica, como se reportó para las ranas de la familia Myobatrachidae, donde se le comparó con otros modelos evolutivos, como el Ornstein–Uhlenbeck (OU), y fue el mejor modelo para explicar la evolución morfológica en este grupo (Vidal-García *et al.*, 2017). Para la forma del cuerpo no se encontró señal filogenética ($K = 0.576$, $p = 0.338$), por lo tanto, se puede asumir que la forma ha evolucionado más en respuesta de las presiones selectivas del ambiente, habiendo una evolución en paralelo de la forma del cuerpo. Para la forma de la premaxila si se encontró señal filogenética ($K = 0.576$, $p = 0.042$), indicando que esta estructura presenta un mayor conservadurismo evolutivo, que en parte podría relacionarse a efectos pleiotrópicos, o posiblemente a procesos de divergencia reciente (Herman *et al.* 2018), y finalmente, a que han tenido fuertes presiones selectivas divergentes. Estos patrones diferentes son concordantes con los escenarios propuestos por Sidlauskas (2008), por un lado tenemos una magnitud desigual de cambio por rama filogenética para la forma del cuerpo (el grupo más diverso, experimento más cambios morfológicos -troglobio viejo-) y eficiencia desigual en innovación morfológica para la forma de la premaxila. Los linajes no experimentaron muchos cambios, pero el grupo más diverso -troglobio viejo- exploró regiones novedosas en el morfoespacio). Aunque, se han reportado que los diferentes niveles de conservadurismo evolutivo, entre rasgos morfológicos también dependen de la función que desempeñan, sugiriendo que los nichos ecológicos evolucionan poco en el momento de un evento de especiación, y por lo tanto, los rasgos específicos al uso de estos nichos también evolucionarán más lento, lo que podría explicar la similitud del morfotipo troglobio nuevo con el morfotipo de superficie

(Vitt & Pianka, 2005; Guisande *et al.*, 2012; Comte *et al.*, 2014; Roa-Fuentes *et al.*, 2015).

Conclusiones generales

- Se encontraron patrones de evolución morfológica en paralelo en la ecomorfología, la premaxila, el cuerpo y la cabeza en los dos linajes de los *Astyanax mexicanus* troglobios, que generan una forma troglobia que los distingue de su homólogo de superficie. Siendo la forma de la cabeza donde encontramos la mayor diferenciación morfológica, seguido de la premaxila y por último, la forma del cuerpo, la cual presentó un mayor traslape entre morfotipos.
- Hubo un ligero grado de diferenciación en la forma de la premaxila entre el morfotipo troglobio viejo, en contraste con el linaje nuevo, lo que refuerza la hipótesis de que el grado de regresión morfológica puede verse afectado por el tiempo que llevan bajo dichas presiones selectivas.
- Las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ tuvieron ligeras diferencias en los niveles de enriquecimiento entre poblaciones y regiones geográficas. Particularmente en las métricas de Layman, donde las poblaciones de la Sierra de El Abra presentaron una mayor área de nicho ecológico y menor redundancia trófica, en comparación con las poblaciones de la Sierra de Guatemala. Sin embargo, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ sugieren que el nivel trófico y la base de carbono es similar en todas las cuevas.
- No hubo una correlación clara entre las variables ecomorfológicas y la señal isotópica, sin embargo, los rasgos morfológicos asociados a la adquisición de recursos (i.e. P. hocico), fueron los que tuvieron el valor de correlación más alta con la señal de $\delta^{15}\text{N}$.
- Las señales isotópicas pueden verse afectadas por las características físicas de las cuevas, destacando aspectos como la profundidad y la distancia de la entrada a la poza donde habitan los organismos, lo que puede modificar la dinámica ecológica de cada cueva.
- Encontramos evidencia de evolución modular para la forma del cuerpo y la forma de cabeza, estos patrones son diferentes entre los morfotipos. Para el caso del morfotipo troglobio, las hipótesis que fueron significativas son congruentes en ambos linajes, soportando las hipótesis de dos (cabeza y cuerpo) y tres módulos (cabeza, parte media del cuerpo y cauda), siendo en ambos casos módulos que pueden tener una asociación en la obtención de recursos, así como locomoción y

uso de hábitat. En el morfotipo de superficie, contrastó principalmente en la integración presente en la zona caudal y la región media del cuerpo, exhibiendo más una adaptación a las funciones locomotoras. Las diferencias encontradas entre morfotipos, podría ser una evidencia de las diferentes presiones ejercidas en cada ambiente, que podrían estar alterando la evolución modular entre morfotipos.

- Se observó una falta de señal filogenética en la forma del cuerpo, lo que podría deberse a una evolución homoplásica de la forma en respuesta de las presiones selectivas del ambiente.
- En el caso de la premaxila si encontramos señal filogenética, por lo que esta estructura si tiene conservadurismo relacionado con su historia evolutiva y probablemente con su función ecológica.

Bibliografía

- Adams, D. C. (2014). A generalized K statistic for estimating phylogenetic signal from shape and other high-dimensional multivariate data. *Systematic Biology*, 63(5), 685–697.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syu030>
- Adams, D. C. (2016). Evaluating modularity in morphometric data: Challenges with the RV coefficient and a new test measure. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(5), 565–572.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12511>
- Adams, D. C., & Collyer, M. L. (2019). Comparing the strength of modular signal, and evaluating alternative modular hypotheses, using covariance ratio effect sizes with morphometric data. *Evolution*, 73(12), 2352–2367. <https://doi.org/10.1111/evo.13867>
- Albertson, R. C., Streelman, J. T., & Kocher, T. D. (2003). Directional selection has shaped the oral jaws of Lake Malawi cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5252–5257. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930235100>
- Albertson, R. C., Streelman, J. T., Kocher, T. D., & Yelick, P. C. (2005). Integration and evolution of the cichlid mandible: The molecular basis of alternate feeding strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16287–16292.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506649102>
- Álvarez, J. (1946). Revisión del género *Anoptichthys* con descripción de una especie nueva (Pisces, Characidae). *Anales Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 4, 263–282.
- Álvarez, J. (1947). Descripción de *Anoptichthys hubbsi* caracindo ciego de La Cueva de Los Sabinos, S. L. P. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 8, 215–219.
- Avise, J. C., & Selander, R. K. (1972). EVOLUTIONARY GENETICS OF CAVE-DWELLING FISHES OF THE GENUS *Astyanax*. *International Journal of Organic Evolution*, 26(1), 1–19.

- Bardua, C., Wilkinson, M., Gower, D. J., Sherratt, E., & Goswami, A. (2019). Morphological evolution and modularity of the caecilian skull. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1342-7>
- Bearhop, S., Adams, C. E., Waldron, S., Fuller, R. A., & Macleod, H. (2004). Determining trophic niche width: A novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73(5), 1007–1012. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00861.x>
- Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4), 717–745. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x>
- Bonato, K. O., Burress, E. D., & Fialho, C. B. (2017). Dietary differentiation in relation to mouth and tooth morphology of a neotropical characid fish community. In *Zoologischer Anzeiger* (Vol. 267). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.01.003>
- Bradic, M., Beerli, P., García-De León, F. J., Esquivel-Bobadilla, S., & Borowsky, R. L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evolutionary Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-9>
- Bradic, M., Teotónio, H., & Borowsky, R. L. (2013). The population genomics of repeated evolution in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2383–2400. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst136>
- Cheverud, J. M. (1982). Phenotypic, Genetic, and Environmental Morphological Integration in the Cranium. *Evolution*, 36(3), 499. <https://doi.org/10.2307/2408096>
- Coghill, L. M., Darrin Hulseay, C., Chaves-Campos, J., García de León, F. J., & Johnson, S. G. (2014). Next generation phylogeography of cave and surface *Astyanax mexicanus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79(1), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.029>
- Cooper, J. W., Wernle, J., Mann, K., & Albertson, R. C. (2011). Functional and Genetic Integration in the Skulls of Lake Malawi Cichlids Highly integrated anatomical structures constitute modules, and the linked concepts of modularity and integration figure prominently in discussions of evolvability. *Evolutionary Biology*, 38, 316–334. <https://doi.org/10.1007/s11692-011-9124-9>
- Cooper, W. J., Wernle, J., Mann, K., & Albertson, R. C. (2011). Functional and Genetic Integration in the Skulls of Lake Malawi Cichlids. *Evolutionary Biology*, 38(3), 316–334. <https://doi.org/10.1007/s11692-011-9124-9>
- Córdova-Tapia, F., & Zambrano, L. (2016). Fish functional groups in a tropical wetland of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Neotropical Ichthyology*, 14(2). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150162>
- Dowling, T. E., Martasian, D. P., & Jeffery, W. R. (2002). Evidence for multiple genetic forms with similar eyeless phenotypes in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(4), 446–455. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004100>
- Duboué, E. R., Borowsky, R. L., & Keene, A. C. (2012). B-Adrenergic Signaling Regulates Evolutionarily Derived Sleep Loss in the Mexican Cavefish. *Brain, Behavior and Evolution*, 80(4), 233–243. <https://doi.org/10.1159/000341403>

- Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J., Launay, J. M., Blin, M., & Rétaux, S. (2014). A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome. *Nature Communications*, 5, 3647. <https://doi.org/10.1038/ncomms4647>
- Elliott, W. R. (2018). The *Astyanax* caves of México: cavefish of Tamaulipas, San Luis Potosí and Guerrero (First). Association for Mexican cave studies.
- Eroukhmanoff, F., Hargeby, A., Arnberg, N. N., Hellgren, O., Bensch, S., & Svensson, E. I. (2009). Parallelism and historical contingency during rapid ecotype divergence in an isopod. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(5), 1098–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01723.x>
- Espinasa, L., Bonaroti, N., Wong, J., Pottin, K., Queinnec, E., & Rétaux, S. (2017). Contrasting feeding habits of post-larval and adult *Astyanax* cavefish. *Subterranean Biology*, 21(1), 1–17. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.21.11046>
- Espinasa, L., Ornelas-García, C. P., Legendre, L., Rétaux, S., Best, A., Gamboa-Miranda, R., Espinosa-Pérez, H., & Sprouse, P. (2020). Discovery of two new *Astyanax* cavefish localities leads to further understanding of the species biogeography. *Diversity*, 12(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/d12100368>
- Esteve-Altava, B. (2017). In search of morphological modules: a systematic review. *Biological Reviews*, 92(3), 1332–1347. <https://doi.org/10.1111/brv.12284>
- Felice, R. N., Watanabe, A., Cuff, A. R., Noirault, E., Pol, D., Witmer, L. M., Norell, M. A., O'Connor, P. M., & Goswami, A. (2019). Evolutionary Integration and Modularity in the Archosaur Cranium. *Integrative and Comparative Biology*, 59(2), 371–382. <https://doi.org/10.1093/icb/icz052>
- Fenolio, D. B., Graening, G. O., Collier, B. A., & Stout, J. F. (2006). Coprophagy in a cave-adapted salamander; the importance of bat guano examined through nutritional and stable isotope analyses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1585), 439–443. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3341>
- Ferreira, R. L., Martins, R. P., & Yanega, D. (2000). Ecology of bat guano arthropod communities in a Brazilian dry cave. In *Ecotropica* (Vol. 6, Issue 2, pp. 105–116).
- Franchini, P., Fruciano, C., Spreitzer, M. L., Jones, J. C., Elmer, K. R., Henning, F., & Meyer, A. (2014). Genomic architecture of ecologically divergent body shape in a pair of sympatric crater lake cichlid fishes. *Molecular Ecology*, 23(7), 1828–1845. <https://doi.org/10.1111/mec.12590>
- Freckleton, R. P. (2002). On the misuse of residuals in ecology: Regression of residuals vs. multiple regression. *Journal of Animal Ecology*, 71(3), 542–545. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2002.00618.x>
- Fumey, J., Hinaux, H., Noirot, C., Thermes, C., Rétaux, S., & Casane, D. (2018). Evidence for late Pleistocene origin of *Astyanax mexicanus* cavefish. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1156-7>
- Futuyma, D. J. (1986). *Evolutionary biology*. (Sinauer (ed.); segunda).
- Futuyma, D. J., & Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution* (Cuarta). Sinauer Associates, Inc.
- García-Berthou, E. (2001). On the misuse of residuals in ecology: Testing regression residuals vs. the analysis of covariance. *Journal of Animal Ecology*, 70(4), 708–711. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2001.00524.x>

- Garita-Alvarado, C. A., Barluenga, M., & Ornelas-García, C. P. (2018). Parallel evolution of morphs of *Astyanax* species (Teleostei: Characidae) in México and Central America. *Biological Journal of the Linnean Society*, 124(4), 706–717. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly082>
- Goswami, A. (2006). Cranial modularity shifts during mammalian evolution. *The American Naturalist*, 168, 270–280. [https://doi.org/DOI 10.1086/505758](https://doi.org/DOI%2010.1086/505758)
- Goswami, A. (2007). Cranial modularity and sequence heterochrony in mammals. *Evolution & Development*, 9, 290–298. [https://doi.org/DOI 10.1371/journal.pone.0009517](https://doi.org/DOI%2010.1371/journal.pone.0009517)
- Gross, J. B., Krutzler, A. J., & Carlson, B. M. (2014). Complex craniofacial changes in blind cave-dwelling fish are mediated by genetically symmetric and asymmetric loci. *Genetics*, 196(4), 1303–1319. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.161661>
- Gross, J. B., & Powers, A. K. (2016). The Evolution of the Cavefish Craniofacial Complex. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish* (Vol. 1, Issue C). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.00010-4>
- Guisande, C., Pelayo-Villamil, P., Vera, M., Manjarrés-Hernández, A., Carvalho, M. R., Vari, R. P., Jiménez, L. F., Fernández, C., Martínez, P., Prieto-Piraquive, E., Granado-Lorencio, C., & Duque, S. R. (2012). Ecological factors and diversification among Neotropical characiforms. *International Journal of Ecology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/610419>
- Hausdorf, B., Wilkens, H., & Strecker, U. (2011). Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.03.009>
- Hendry, A. P. (2009). Ecological speciation! Or the lack thereof? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66(8), 1383–1398. <https://doi.org/10.1139/F09-074>
- Herman, A., Brandvain, Y., Weagley, J., Jeffery, W. R., Keene, A. C., Kono, T. J. Y., Bilandžija, H., Borowsky, R., Espinasa, L., Quin, O., Ornelas-garcía, C. P., Yoshizawa, M., & Carlson, B. (2019). related traits in Mexican tetra , *Astyanax mexicanus*. 27(22), 4397–4416. <https://doi.org/10.1111/mec.14877.The>
- Hubbs, C. L., & Innes, W. T. (1936). The first known blind fish of the family Characidae: a new genus from Mexico. *Occasional Papers of the Museum of Zoology*, 1, 1–14.
- Hulsey, C. D., & Wainwright, P. C. (2002). Projecting mechanics into morphospace: Disparity in the feeding system of labrid fishes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1488), 317–326. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1874>
- Jeffery, W. R. (2009). Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish William. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 25–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134216.Regressive>
- Jordan, C. B. (1946). *Anoptichthys* x *Astyanax* hybrids. *Aquarium*, 15, 198.
- Langerhans, R. B., & DeWitt, T. J. (2004). Shared and unique features of evolutionary diversification. *American Naturalist*, 164(3), 335–349. <https://doi.org/10.1086/422857>
- Larouche, O., Cloutier, R., & Zelditch, M. L. (2015). Head, Body and Fins: Patterns of Morphological Integration and Modularity in Fishes. *Evolutionary Biology*, 42(3), 296–311. <https://doi.org/10.1007/s11692-015-9324-9>

- Larouche, O., Zelditch, M. L., & Cloutier, R. (2018). Modularity promotes morphological divergence in ray-finned fishes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25715-y>
- Losos, J. B. (2008). Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*, 11(10), 995–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01229.x>
- Mitchell, R. W., Russell, W. H., & Elliott, W. R. (1977). *Mexican Eyeless Characin Fishes, Genus Astyanax: Environment, Distribution, and Evolution* (L. Texas (ed.); First, Issue February 1977). TEXAS TECH UNIVERSITY.
- Moran, D., Softley, R., & Warrant, E. J. (2015). The energetic cost of vision and the evolution of eyeless Mexican cavefish. *Science Advances*, 1(8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500363>
- Nosil, P. (2012). *Ecological speciation*. Oxford University Press.
- Ornelas-García, C. P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8(340), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-340>
- Ornelas-García, C. P., Bastir, M., & Doadrio, I. (2014). Morphometric variation between two morphotypes within the *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Actinopterygii: Characidae) genus, From a Mexican tropical lake. *Journal of Morphology*, 275(7), 721–731. <https://doi.org/10.1002/jmor.20252>
- Ornelas-García, C. P., & Pedraza-Lara, C. (2016). Phylogeny and Evolutionary History of *Astyanax mexicanus*. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.00004-9>
- Ornelas-García, C. P., Bautista, A., Herder, F., & Doadrio, I. (2017). Functional modularity in lake-dwelling characin fishes of Mexico. *PeerJ*, 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.3851>
- Ornelas-García, C. P., Córdova-Tapia, F., Zambrano, L., Bermúdez-González, M. P., Mercado-Silva, N., Mendoza-Garfias, B., & Bautista, A. (2018). Trophic specialization and morphological divergence between two sympatric species in Lake Catemaco, Mexico. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4867–4875. <https://doi.org/10.1002/ece3.4042>
- Parsons, K. J., Son, Y. H., Crespel, A., Thambithurai, D., Killen, S., Harris, M. P., & Albertson, R. C. (2018). Conserved but flexible modularity in the zebrafish skull: Implications for craniofacial evolvability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1877), 1–10. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2671>
- Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3), 703–718. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[0703:USITET\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[0703:USITET]2.0.CO;2)
- Powers, A. K., Davis, E. M., Kaplan, S. A., & Gross, J. B. (2017). Cranial asymmetry arises later in the life history of the blind Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177419>

- Powers, A. K., Boggs, T. E., & Gross, J. B. (2018). Canal neuromast position prefigures developmental patterning of the suborbital bone series in *Astyanax* cave- and surface-dwelling fish. *Developmental Biology*, 441(2), 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.001>
- Powers, A. K., Berning, D. J., & Gross, J. B. (2020). Parallel evolution of regressive and constructive craniofacial traits across distinct populations of *Astyanax mexicanus* cavefish. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(7–8), 450–462. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22932>
- Revell, L. J., Harmon, L. J., & Collar, D. C. (2008). Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Systematic Biology*, 57(4), 591–601. <https://doi.org/10.1080/10635150802302427>
- Roa-Fuentes, C. A., Casatti, L., & Romero, R. de M. (2015). Phylogenetic signal and major ecological shifts in the ecomorphological structure of stream fish in two river basins in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 13(1), 165–178. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140045>
- Schluter, D. (2000). *The ecology of adaptive radiation (primera)*. Oxford series of Ecology and Evolution.
- Schluter, D., Clifford, E. A., Nemethy, M., & McKinnon, J. S. (2004). Parallel evolution and inheritance of quantitative traits. *American Naturalist*, 163(6), 809–822. <https://doi.org/10.1086/383621>
- Silva, M. S., ins, R. P. M., & Ferreira, R. L. (2011). Trophic dynamics in a neotropical limestone cave. *Subterranean Biology*, 9(1), 127–138. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.9.2515>
- Simões, M. H., Souza-Silva, M., & Ferreira, R. L. (2015). Cave physical attributes influencing the structure of terrestrial invertebrate communities in Neotropics. *Subterranean Biology*, 16, 103–121. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.16.5470>
- Soares, D., & Niemiller, M. L. (2020). Extreme Adaptation in Caves. *Anatomical Record*, 303(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/ar.24044>
- Strecker, U., Bernatchez, L., & Wilkens, H. (2003). Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology*, 12(3), 699–710. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01753.x>
- Strecker, U., Faúndez, V. H., & Wilkens, H. (2004). Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(2), 469–481. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.001>
- Tabin, C. J. (2016). Introduction: The Emergence of the Mexican Cavefish as an Important Model System for Understanding Phenotypic Evolution. In *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802148-4.09999-0>
- Vander Zanden, M. J., & Rasmussen, J. B. (1999). Primary consumer ($\delta^{13}\text{C}$) and ($\delta^{15}\text{N}$) and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology*, 80(4), 1395–1404.
- Vidal-García, M., & Scott Keogh, J. (2017). Phylogenetic conservatism in skulls and evolutionary lability in limbs - Morphological evolution across an ancient frog radiation is shaped by diet, locomotion and burrowing. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0993-0>
- Villéger, S., Miranda, J. R., Hernández, D. F., & Mouillot, D. (2010). Contrasting changes in taxonomie vs. functional diversity of tropical fish communities after habitat degradation. *Ecological Applications*, 20(6), 1512–1522. <https://doi.org/10.1890/09-1310.1>

- Vitt, L. J., & Pianka, E. R. (2005). Deep history impacts present-day ecology and biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7877–7881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501104102>
- Wagner, G. P., & Altenberg, L. (1996). Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50(3), 967–976. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02339.x>
- Warton, D. I., Wright, I. J., Falster, D. S., & Westoby, M. (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 259–291. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007007>
- White, B. W., & Culver, D. C. (2012). *Encyclopedia of Caves* (B. W. White & D. C. Culver (eds.); Second). Academic Press of Elsevier. www.elsevier.com
- Wilkens, H. (1988). Evolution and Genetics of Epigeal and Cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Evolutionary Biology*, May, 271–367. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1043-3_8
- Wilkens, H., & Strecker, U. (2017). Evolution in the Dark: Introduction. In *Evolution in the Dark*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54512-6_1
- Yamamoto, Y., & Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science*, 289(5479), 631–633. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.631>
- Yoffe, M., Patel, K., Palia, E., Kolawole, S., Streets, A., Haspel, G., & Soares, D. (2020). Morphological malleability of the lateral line allows for surface fish (*Astyanax mexicanus*) adaptation to cave environments. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(7–8), 511–517. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22953>
- Zanne, A. E., Chapman, C. A., & Kitajima, K. (2005). Evolutionary and ecological correlates of early seedling morphology in East African trees and shrubs. In *American Journal of Botany* (Vol. 92, Issue 6). <https://doi.org/10.3732/ajb.92.6.972>
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press San Diego, 95, 443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0>