



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

SISTEMÁTICA

Revisión del complejo de formas de la especie *Pseudothelphusa americana*  
De Saussure, 1857 (Decapoda: Pseudothelphusidae) a través de morfología  
y marcadores moleculares

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biól. Kevin Jaret Madrigal Ferrer**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. José Luis Villalobos Hiriart**

Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

**COMITÉ TUTOR: Dra. Ana Margarita Hermoso Salazar**

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México

**Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa**

Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

Junio, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

SISTEMÁTICA

Revisión del complejo de formas de la especie *Pseudothelphusa americana*  
De Saussure, 1857 (Decapoda: Pseudothelphusidae) a través de morfología  
y marcadores moleculares

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Biól. Kevin Jaret Madrigal Ferrer**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. José Luis Villalobos Hiriart**

Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

**COMITÉ TUTOR: Dra. Ana Margarita Hermoso Salazar**

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México

**Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa**

Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

Junio, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

OFICIO CPCB/359/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, el día **27 de marzo de 2023** aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **SISTEMÁTICA** del estudiante **MADRIGAL FERRER KEVIN JARET** con número de cuenta **521014326** con la tesis titulada **“Revisión del complejo de formas de la especie *Pseudothelphusa americana* De Saussure, 1857 (Decapoda: Pseudothelphusidae) a través de morfología y marcadores moleculares”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ LUIS VILLALOBOS HIRIART**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FERNANDO ÁLVAREZ NOGUERA  
Vocal: DR. MICHEL EDMOND HENDRICKX RENERS  
Vocal: DRA. ELIZABETH ORTEGA MAYAGOITIA  
Vocal: DR. ANDRÉS RAMÍREZ PONCE  
Secretaria: DRA. ANA MARGARITA HERMOSO SALAZAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 26 de abril de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Biología (IB), por haberme dado la oportunidad de continuar con mis estudios académicos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado bajo el número de CVU 1102876, durante el periodo que comprendió del 21 de febrero 2021 al 31 de enero 2023; sin la cual este trabajo no pudo haber sido posible.

A mi tutor principal, el Dr. José Luis Villalobos Hiriart y a mi comité tutorial, integrado por la Dra. Ana Margarita Hermoso Salazar y el Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa, tanto por su orientación y apoyo durante la elaboración de este proyecto, así como por sus comentarios y sugerencias para elevar la calidad del trabajo.

## Agradecimientos a título personal

Ni aunque tuviera mil manos con mil dedos cada una alcanzaría a contar a todas las personas que contribuyeron a la elaboración de este sencillo trabajo. Desde la enorme cantidad de naturalistas, investigadores e investigadoras que dedicaron su vida entera para generar las bases del conocimiento que sirvió de pilar para este trabajo; hasta las increíbles personas que me han acompañado desde que empecé en esta loca aventura llamada Biología, y a aquellas que tuve el grato privilegio de conocer en mi breve estancia en la Ciudad y cuya amistad, amor, comprensión, cariño y enseñanzas atesoraré el resto de mi existencia.

En primer lugar, a mi madre, Katia Yamaeth Alejandra Ferrer Bojórquez, por su apoyo incondicional, su amor infinito, y su cariño y comprensión que son tan grandes que a ratos pienso que son del tamaño del propio universo. Por aún recordarme el valor de la perseverancia, la disciplina, el orden, y la firmeza. Por recordarme que la vida va despacio y que hay tiempo para todo. Por los zapes telefónicos que me daba cuando comenzaba a dudar sobre mi lugar en el mundo. Por ser mi compañera de frustraciones de posgrado (aunque yo no entendiera nada de derecho fiscal) y mi pilar emocional, mi pequeño faro al que recurría cuando todo parecía desmoronarse. Por todo eso y lo que no alcanzo a escribir.

A mi padre, Salvador Madrigal Villalobos, y a mi hermana, Miroslava Yamaeth Madrigal Ferrer, por su enorme apoyo, palabras de aliento y por su inmensa confianza en mí y mis capacidades (de las que hasta yo dudo en ocasiones). Porque nunca paraban de motivarme y porque también fueron un hombro para llorar y compañía para reír. A mi padre por también ser mi compañero de frustraciones de posgrado (aunque yo no tuviera idea sobre las transformadas de Fourier). A mi hermana, por soportar mis locuras, ser la primera lectora de mis poemas y un alma increíblemente sensible, un amor de persona.

A mi abuela, Blanca Margarita Bojórquez González, que, aunque ya no está, me gusta pensar que vivo honrando los consejos, valores y principios (no religiosos xd) que me heredó. Espero que, sea donde sea que estés (si en el cielo o de vuelta a integrarte a las estrellas que nos formaron), estés orgullosa de mí. Te amo demasiado y te extraño aún más.

A mis primos los “sholos” Jonathan y Danna; a mis tíos Farah y Víctor; y al resto de mi familia (tanto los Ferrer como los Madrigal) que, aunque las distancias nos impiden vernos con frecuencia, siempre me apoyaron y estuvieron pendientes de mí.

También quiero agradecer a mis dos mentores; el Dr. José Luis Villalobos Hiriart y al *quasi* Dr. Eric Guillermo Moreno Juárez. Al primero, por haberme dado la increíble oportunidad de formar parte de la Colección Nacional de Crustáceos, aún sin conocerme; por haberme iniciado en el maravilloso mundo de los cangrejos dulceacuícolas; por orientarme cuando estaba enredado en las laberínticas y misteriosas vicisitudes de *Pseudothelphusa americana*; y por apoyarme en todas las ideas locas que tuve y los proyectos que aún tengo. Al segundo, por ser un fantástico maestro; por adiestrarme en técnicas de Biología Molecular; por ser un excelente compañero de discusiones científicas dentro y fuera del laboratorio; pero también por ser también un buen amigo, al que puedo recurrir para hablar sobre la vida y tener aventuras que no siempre terminan tan bien. A ambos por tener la paciencia suficiente para aguantar mi mente inquieta y preguntona; por ser

personas asombrosas, gentiles, sinceras y caritativas. Vivo honrando todas sus enseñanzas (académicas y de la vida diaria).

A mis compañeros de laboratorio Luz, Joss y Jasiel. A las primeras, por su valiosa compañía y por soportar mis obsesiones con la biología y ¡los Spandrels! Por las charlas mientras caminábamos hacia metro CU; por los consejos de vida y la grandiosa compañía que me brindaron. Y al último por esos buenos rounds sobre el concepto de especie que nos privaban del resto de las conversaciones de la mesa y provocaban miradas interesantes en el resto de los acompañantes. A Luz por ser mi gran amiga y mi confidente; a Joss por compartir este interés tan denso por los cangrejos dulceacuícolas y pasarnos horas viendo los meros de los terceros maxilípedos de chorrocientasmil especies para ver si cambiaban también; y por hacerme compañía en momentos difíciles.

A una personita que se hace llamar chiochu\_3000 (Chío), por ser una gran gran amiga, confidente, chismóloga de corazón y por mantenerme al tanto del chisme entre Taylor Swift y su expareja, así como de recomendaciones de fanfics adolescentes en Wattpad. Por ser un solecito en este mundo tan gris y lleno de injusticias; compañera de charlas profundas y mi consejera personal del amor. Nunca cambies, el mundo es un lugar mejor porque estás en él, pintando nubecitas y corazoncitos de colores en tus parpados, haciéndote chonguitos y peinados fabulosos (siempre aesthetic nunca inaesthetic).

A Carlos Vergara y Jared Jiménez por ser mis fieles compañeros de campo, y siempre estar dispuestos a apoyarme en la exploración de los ríos Tlaxcaltecas en busca de cangrejos; gran parte de mis colectas en el estado fueron gracias a ustedes dos. Por las risas y los buenos momentos que pasamos durante la universidad y también ahora que ya no nos frecuentamos tanto. También a Axl Hernández, Rogelio Rugerio y Gerzain Ugarte por su nula maestría en la construcción de puentes para atravesar ríos y por revelarme lugares ocultos donde todavía existen cangrejos dulceacuícolas.

A Laura Alexandra Rojas Arias (a.k.a. Momo) por ser una persona preciosa, de esas que no te encuentras seguido por la vida. Por cuidarme en la enfermedad más de una vez. Por todo el amor, cariño, besos y abrazos que nos dimos. Por la paciencia que me tuvo; y por abrirme la puerta al siguiente capítulo de mi vida. Perdón por mis fallas. Te amaré por siempre, y estoy eternamente agradecido con la providencia por haberme dado la chance de conocerte, ganaste un lugarcito en este corazón de pollito de colores que me cargo.

A Mario, Adriana, Yara, Daniela, Che, Natalia y el resto de las personas que me acompañaron y me apoyaron durante el posgrado. Por su ayuda académica, o sólo por las buenas charlas sobre la vida en la coyuntura actual, el amor, el desamor, los trabajos mal pagados y otros temas igual de interesantes.

A todos mis maestros del posgrado, en especial al Dr. Francisco Vergara Silva por promover mi obsesión con la Síntesis Evolutiva Extendida. Al Dr. Fernando Álvarez por haberme recibido en la CNCR. A la Mtra. Andrea Jiménez por las facilidades que nos brindó a todo el equipo cangrejo en su laboratorio. A las encargadas de los laboratorios de microscopía electrónica y de fotografía de la diversidad, Berenit y Susana, por su apoyo en la captura de las imágenes que conforman mis láminas compuestas. A las Matras. Laura Márquez y Nelly López, por su apoyo en la secuenciación de mis amplicones. A los miembros de mi comité tutorial Dr. Alejandro Ocegüera y la Dra. Margarita

Hermoso, a ella y a sus hermanos Chucho y Luis Hermoso por su generosa hospitalidad y apoyo durante la colecta de los ejemplares de San Marcos Necoxtla.

Seguramente olvido mucha más gente, pero esto se extendería mil páginas más. A todos los involucrados en este proyecto, directa o indirectamente, de corazón, gracias.

*A mi madre,  
Por absolutamente todo.*

## Índice general

Resumen.....	1
Abstract .....	2
Introducción general .....	3
Complejos de especie y aproximación molecular .....	6
Análisis de la forma y la aproximación morfogeométrica .....	8
<i>Pseudothelphusa</i> , <i>P. americana</i> y sus problemas taxonómicos .....	10
Morfología general en Pseudothelphusidae .....	11
Caparazón.....	11
Cavidad orbital .....	12
Anténulas .....	12
Antenas .....	12
Apéndices bucales.....	12
Pereiópodos .....	13
Pleópodos.....	13
Primer par de gonópodos del macho (G1).....	14
Justificación .....	19
Pregunta de investigación.....	20
Hipótesis.....	20
Objetivos .....	20
General .....	20
Específicos .....	20
Área de estudio .....	21
Antecedentes .....	23
Antecedentes moleculares.....	23
Antecedentes morfogeométricos .....	24
Historia taxonómica de <i>P. americana</i> .....	25
Metodología .....	40
Revisión del acervo de la CNCR.....	40
Obtención de ejemplares.....	40
Análisis molecular .....	40

Extracción e integridad del material genético .....	40
Amplificación de secuencias de DNA .....	46
Secuenciación.....	47
Alineamiento de las secuencias .....	47
Particiones y selección de modelos de evolución molecular.....	48
Análisis de distancias genéticas .....	49
Análisis de Inferencia Bayesiana (IB).....	49
Análisis de Máxima Verosimilitud (MV) .....	49
Árbol de Máxima Credibilidad de Clados (MCC) .....	49
Métodos de delimitación de especies.....	49
Red de haplotipos .....	50
Análisis morfogeométrico .....	50
Captura de fotografías .....	50
Disposición de landmarks.....	51
Análisis en R.....	51
Matriz para el deslizamiento de semilandmarks .....	51
La obtención de la forma pura (shape) .....	51
Análisis exploratorios, de similitud y estadísticos.....	51
Análisis morfológico .....	56
Medidas y proporciones somáticas.....	56
Captura de fotografías .....	56
Concepto de especie .....	56
Estructura de la ficha taxonómica.....	56
Resultados .....	58
Análisis molecular .....	58
Extracción de DNA y distancias genéticas.....	58
Análisis filogenético.....	59
Métodos de delimitación de especies.....	63
Red de haplotipos .....	66
Análisis morfogeométrico .....	69
Análisis de Componentes Principales (PCA).....	69
MANOVA y MANOVA por pares.....	71

Análisis de Variables Canónicas (CVA) .....	71
Análisis de similitud .....	74
Análisis morfológico .....	77
Tratamiento taxonómico.....	77
Discusión .....	99
Análisis molecular .....	99
<i>Pseudothelphusa americana sensu stricto</i> .....	99
<i>Pseudothelphusa</i> sp. de Necoxtla y Ajolotero y su relación con <i>P. americana s. str.</i> .....	101
<i>Pseudothelphusa</i> sp. de Zihuatanejo y Tzararacua .....	102
Modelos de delimitación de especies .....	103
Análisis morfogeométrico .....	103
Variación en la forma de la proyección caudo-marginal del complejo <i>P. americana</i> .....	103
¿Los análisis morfogeométricos son útiles para evaluar la variación genital en <i>Pseudothelphusoidea</i> ?.....	104
Errores de medición, coplanaridad y torsiones del gonópodo .....	104
Análisis morfológico .....	105
Estatus actual del complejo de formas de <i>P. americana</i> .....	105
<i>Pseudothelphusa</i> sp. 3 y 4, dos especies nuevas no relacionadas con el complejo <i>P. americana</i> .....	106
Situación nomenclatural de <i>P. americana s. str.</i> .....	107
<i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> y <i>P. dugesi</i> .....	108
Conclusiones generales.....	109
Referencias.....	144
Anexo I. Tabla de distancias euclidianas calculadas para los primeros 3 CP .....	162
Anexo II. Método de delimitación bPTP usando el árbol resultante del análisis de IB.....	168
Anexo III. Script de Theska <i>et al.</i> (2020), adaptado y modificado para este trabajo .....	169

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Arreglo supraespecífico dentro de <i>Pseudothelphuisoidea</i> sensu Álvarez et al., (2020).....	5
<b>Tabla 2.</b> Lista de homonimias observadas por Smith (1870). .....	26
<b>Tabla 3.</b> Posiciones históricas de <i>P. americana</i> dentro del infraorden Brachyura (1857 - 2005).....	30
<b>Tabla 4.</b> Caracteres usados históricamente en las descripciones de <i>P. americana</i> y algunas especies afines. ....	33
<b>Tabla 5.</b> Lotes obtenidos de la CNCR. ....	44
<b>Tabla 6.</b> Ejemplares recolectados en campo utilizados para la amplificación de genes. ....	45
<b>Tabla 7.</b> Primers utilizados en la amplificación.....	46
<b>Tabla 8.</b> Perfiles establecidos para la PCR.....	46
<b>Tabla 9.</b> Volumen total y constitución de 1 reacción PCR. ....	46
<b>Tabla 10.</b> Especies adicionales usadas para el análisis. ....	47
<b>Tabla 11</b> Modelos de evolución molecular sugeridos por PartitionFinder2 y JModelTest2.....	48
<b>Tabla 12.</b> Medidas de caparazón de los ejemplares seleccionados para el análisis morfogeométrico. ....	54
<b>Tabla 13.</b> Grupos establecidos a priori para el Análisis de Variables Canónicas. ....	55
<b>Tabla 14.</b> Número de ejemplares y genes amplificados para este estudio. ....	58
<b>Tabla 15.</b> P-distancias calculadas para COI .....	60
<b>Tabla 16.</b> P-distancias calculadas para 16S.....	60
<b>Tabla 17.</b> K2P distancias calculadas para COI .....	61
<b>Tabla 18.</b> K2P distancias calculadas para 16S .....	61
<b>Tabla 19.</b> Propuestas de delimitación de especies de acuerdo con los métodos GMYC y bPTP. En gris se encuentran las diferencias entre ambos métodos. ....	63
<b>Tabla 20.</b> Resultado de la clasificación de los 40 gonópodos en los 7 grupos establecidos a priori.	71
<b>Tabla 21.</b> Resultados MANOVA.....	72

<b>Tabla 22.</b> Valores de P arrojados por el MANOVA por pares. ....	72
---	----

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructuras somáticas un cangrejo de agua dulce, tomado de Villalobos-Hiriart (2005)..	15
<b>Figura 2.</b> Estructuras somáticas relativas a la frente, tomado de Villalobos-Hiriart (2005)..	16
<b>Figura 3.</b> Plano morfológico del primer par de gonópodos del macho adulto, tomado de Villalobos-Hiriart (2005).	17
<b>Figura 4.</b> Vista distal del primer gonópodo del macho, tomado de Villalobos-Hiriart (2005).	18
<b>Figura 5.</b> Localidades donde se han recolectado ejemplares identificados bajo el nombre de <i>P. americana</i> .	22
<b>Figura 6.</b> Localidades consideradas como pertenecientes al complejo <i>P. americana</i> estudiadas en el presente trabajo.	22
<b>Figura 7.</b> Plan corporal de algunos ejemplares de <i>P. americana</i> y especies afines.	37
<b>Figura 8.</b> Primer gonópodo de <i>P. americana</i> , subespecies y especies afines.	38
<b>Figura 9.</b> Fotografías y representaciones esquemáticas del primer gónopodo de <i>P. americana</i> y algunas formas descritas.	39
<b>Figura 10.</b> Localidades muestreadas I.	41
<b>Figura 11.</b> Localidades muestreadas II.	42
<b>Figura 12.</b> Localidades muestreadas III.	43
<b>Figura 13.</b> Imágenes capturadas con el microscopio multicapas Leica.	53
<b>Figura 14.</b> Árbol de IB de consenso de mayoría resultante de la concatenación de COI, 16S y H3 de las poblaciones del complejo <i>Pseudothelphusa americana</i> .	62
<b>Figura 15.</b> Árbol de mcc del complejo <i>P. americana</i> resultante cuando se analizan dos terminales por localidad.	64
<b>Figura 16.</b> Delimitación de especies.	65
<b>Figura 17.</b> Ubicación geográfica de los haplotipos de COI del complejo <i>P. americana</i> .	67
<b>Figura 18.</b> Ubicación geográfica de los haplotipos de 16S del complejo <i>P. americana</i> .	67

<b>Figura 19.</b> Redes de haplotipos del complejo <i>P. americana</i> . A. COI. B. 16S. ....	68
<b>Figura 20.</b> Análisis exploratorios. ....	70
<b>Figura 21.</b> (A). Análisis de Componentes Principales en 3 dimensiones usando los primeros 3 PC. (B) Análisis de Variables Canónicas. ....	73
<b>Figura 22.</b> (A) Gráfica de distancias euclidianas. (B) Número de clústers construidos en función de sus K-medioides. ....	75
<b>Figura 23.</b> Número de clúster establecidos. ....	76
<b>Figura 24.</b> Lugares visitados por De Saussure durante su expedición (1854-1856) contra los registros de <i>P. americana</i> que se cuentan en la CNCR del IBUNAM, para los estados de Hidalgo, Puebla (Norte) y Tlaxcala. ....	84

## Índice de láminas

<b>Lámina I.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar EM 355, proveniente de Chignahuapan, Puebla) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).....	110
<b>Lámina II.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 25527, proveniente de las cascadas de Quetzalapa, Zacatlán de las Manzanas, Puebla) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento). (F) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). ....	111
<b>Lámina III.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 35902, proveniente del manantial Palo Huérfano, Amaxac de Guerrero, Tlaxcala) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).....	112
<b>Lámina IV.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 35900, proveniente de Presa San Miguel, Ixtacuixtla, Tlaxcala) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento). ....	113
<b>Lámina V.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 340, proveniente de Ventoquipa, Hidalgo) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).....	114

<b>Lámina VI.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 1</i> (Ajolotero) (Ejemplar CNCR 29077, proveniente de Río Ajolotero cerca de Chilapa, Guerrero). (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo ( ). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento). .....	115
<b>Lámina VII.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 2</i> (Necoxtla) (Ejemplar CNCR 36592, proveniente de San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla). (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Borde frontal inferior, extremo derecho (con ensanchamiento). (F) Escotadura del ángulo orbital externo (presente). .....	116
<b>Lámina VIII.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 3</i> (Zihuatanejo) (Ejemplar CNCR 35903, proveniente de Zihuatanejo, Guerrero). (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento). .....	117
<b>Lámina IX.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 4</i> (Tzararacua) (Ejemplar CNCR 29104, proveniente de las Cascadas de Tzararacua, Uruapan, Michoacán). (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (presente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento). .....	118
<b>Lámina X.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 5</i> (Querétaro) (Ejemplar EM 342, proveniente de Querétaro-Estado de México) (A) Vista frontal. (B) Margen frontal anterior. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (presente). (F) Borde frontal inferior (con ensanchamiento). .....	119
<b>Lámina XI.</b> (A) <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 10460, proveniente de Apizaco, Tlaxcala). (B) <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 35902, proveniente del Manantial Palo Huérfano, Amaxac de Guerrero, Tlaxcala). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor. ....	120
<b>Lámina XII.</b> (A) <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 35900 (A1) y 35904 (A2), proveniente de San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala). (B) <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 12925, proveniente Mixquiahuala, Hidalgo). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor. ....	121
<b>Lámina XIII.</b> (A) <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 36154, proveniente de las Cascadas de Quetzalapa, Zacatlán de las Manzanas, Puebla). (B) <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> (Ejemplar CNCR 26108, proveniente de Tizcatlacoyan, Puebla). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor. ....	122
<b>Lámina XIV.</b> (A) <i>Pseudothelphusa sp. nov. 1</i> (Ajolotero) (Ejemplar CNCR 29077, proveniente de Río Ajolotero cerca de Chilapa, Guerrero). (B) <i>Pseudothelphusa sp. nov. 3</i> (Ejemplar CNCR 35903, proveniente de Zihuatanejo, Guerrero). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor. ....	123

<b>Lámina XV.</b> (A) <i>Pseudothelphusa sp. nov. 2</i> (Necoxtla) (Ejemplar CNCR 36592, proveniente de San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla). (B) <i>Pseudothelphusa sp. nov. 5</i> (Querétaro) (Ejemplar CNCR 342, proveniente de Querétaro-Estado de México). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor.....	124
<b>Lámina XVI.</b> (A) <i>Pseudothelphusa sp. nov. 4</i> (Tzararacua) (Ejemplar CNCR 29104, proveniente de las Cascadas de Tzararacua, Uruapan, Michoacán). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor.....	125
<b>Lámina XVII.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 10460, proveniente de Apizaco, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	126
<b>Lámina XVIII.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35390, proveniente del manantial El Ojito, Apizaco, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	127
<b>Lámina XIX.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35900 proveniente de San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	128
<b>Lámina XX.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35970, proveniente de San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	129
<b>Lámina XXI.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35902, proveniente del manantial Palo Huérfano, Amaxac de Guerrero, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	130
<b>Lámina XXII.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 33848, proveniente de La Ascensión Huitzcolotepec, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	131
<b>Lámina XXIII.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 25527, proveniente de las Cascadas de Quetzalapa, Zacatlán de las Manzanas, Puebla). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	132
<b>Lámina XXIV.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 26108, proveniente de Tizcatlacoyan, Puebla). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	133
<b>Lámina XXV.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 31700, proveniente de Cuauxixtla, Tecali de Herrera, Puebla). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C)	

Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal. Individuo juvenil con desarrollo sexual incompleto. .....	134
<b>Lámina XXVI.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 12925, proveniente de Mixquiahuala, Hidalgo). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	135
<b>Lámina XXVII.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 340, proveniente de Ventoquipa, Hidalgo). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal. ....	136
<b>Lámina XXVIII.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 1</i> (Ajolotero), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 29077, proveniente de Río Ajolotero cerca de Chilapa, Guerrero). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal. ....	137
<b>Lámina XXIX.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 2</i> (Necoxtla), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 22682, proveniente San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	138
<b>Lámina XXX.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 3</i> (Zihuatanejo), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35903, proveniente de Zihuatanejo, Guerrero). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	139
<b>Lámina XXXI.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 4</i> (Tzararacua), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 29104, proveniente de las Cascadas de Tzararacua, Uruapan, Michoacán). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal. ....	140
<b>Lámina XXXII.</b> <i>Pseudothelphusa sp. nov. 5</i> (Querétaro), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 342, proveniente de Querétaro-Estado de México). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	141
<b>Lámina XXXIII.</b> <i>Pseudothelphusa dugesi</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 24688, proveniente de Querétaro-Estado de México). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.....	142
<b>Lámina XXXIV.</b> <i>Pseudothelphusa americana s. str.</i> , primer gonópodo del macho (Ejemplar sin especificación del Museo Nacional de Historia Natural de Ginebra). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal. Fotografías proveías por los Dres. Hollier y Schwendinger. Las imágenes originales carecían de escala. ....	143

## Resumen

Varios son los problemas que contribuyen con la complejidad taxonómica del cangrejo dulceacuícola *Pseudothelphusa americana* De Saussure, 1857; empezando por una confusión de fondo sobre su lugar original de colecta, hasta esquematizaciones equivocadas usando representantes de otras especies y una larga lista de nombres y menciones. Esto ha provocado poca claridad en sus límites morfológicos, geográficos e identificaciones taxonómicas dudosas. Recientemente se reportó la existencia de variaciones morfológicas en el primer par de gonópodos del macho en ejemplares de poblaciones geográficamente disyuntas sugiriendo que *P. americana* posiblemente se trate de un complejo específico aún no explorado.

En el presente trabajo, se realizó un análisis taxonómico usando enfoques molecular, morfo-geométrico y morfológico, con el fin de detectar la posible identidad de más de una especie dentro de *P. americana*. Se revisaron ejemplares de la Colección Nacional de Crustáceos del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, determinados como *P. americana* y algunos ejemplares sin determinación del género *Pseudothelphusa*. Además, se recolectaron cinco ejemplares en cada localidad de tres Estados de la República Mexicana ubicados en la Faja Volcánica Transmexicana, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala. En cuanto a los análisis de biología molecular, se obtuvieron secuencias de dos marcadores mitocondriales (COI y 16S) y uno nuclear (H3), se realizó un análisis de distancias genéticas usando el modelo "P-distancias" y "K2P" y un análisis filogenético tanto Bayesiano como de Máxima Verosimilitud. A su vez, una serie de muestras de gonópodos fueron fotografiados en vista mesial para evaluar la variación morfo-geométrica de la proyección caudo-marginal. Por otra parte, se revisaron caracteres morfológicos de importancia taxonómica con particular énfasis en el primer par de gonópodos del macho, a fin de establecer sus límites morfológicos.

Los resultados del análisis filogenético indicaron que lo que se conoce como *P. americana*, es un grupo polifilético compuesto por tres linajes que representan especies diferentes - *Pseudothelphusa americana sensu stricto*, *Pseudothelphusa* sp. nov. 1 (Ajolotero) y *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 (Necoxtla)-. Adicionalmente, se reconocieron dos nuevos linajes que no forman parte del complejo *P. americana* -*Pseudothelphusa* sp. nov. 3 (Zihuatanejo) y *Pseudothelphusa* sp. nov. 4 (Tzararacua)-. Por otra parte, el análisis morfogeométrico de la proyección caudo-marginal en vista mesial reveló que *P. americana sensu stricto* cuenta con una amplia variación somática y sexual, reflejada, por ejemplo, en el amplio rango que ocupa en el morfo-espacio, y que dichos rasgos no son lo suficientemente constantes como para discriminar de manera adecuada grupos específicos. No obstante, las poblaciones pertenecientes a los estados de Michoacán -Cascadas de Tzararacua- y de Querétaro demostraron ser suficientemente diferentes como para identificarlas como grupos morfológicamente diferentes, corroborando la existencia de *Pseudothelphusa* sp. nov. 4 (Tzararacua) y permitiendo proponer a *Pseudothelphusa* sp. nov. 5 (Querétaro). El análisis morfológico resultó en el establecimiento de límites morfológicos entre los linajes previamente mencionados. Se ofrecen fichas taxonómicas con descripciones completas, resaltado observaciones, variación morfológica, distribución geográfica y comentarios taxonómicos. Adicionalmente, se discuten y proponen soluciones a los problemas nomenclaturales de *P. americana s. str.* -localidad tipo y la serie sin especificación del Museo de Historia Natural de Ginebra, Suiza- en virtud de los artículos 73.2.3, 73.3.1 y 76.3 del Código de Nomenclatura Zoológica.

## Abstract

Several factors contribute to the taxonomic complexity of the freshwater crab *Pseudothelphusa americana* De Saussure, 1857; e.g., uncertainty about its type locality, wrong schematic representations that used members of other species to recognize it, and a long list of synonyms. This has led to a lack of clarity regarding its morphological and geographical boundaries. Recently, it has been reported the existence of morphological variation in the distal elements of the male first gonopod (G1) in populations geographically separated, suggesting that what we know as *P. americana* might be a species complex. An integrative taxonomic study was carried out using morphological, morpho-geometrical, and molecular approaches, to identify possible cryptic lineages within *P. americana*. Taxonomic important structures, with emphasis in the male G1, were revised and compared. A series of photographs of G1 in mesial view were taken in order to evaluate the morpho-geometrical variation of the caudo-marginal projection. Further, 3 molecular markers (COI, 16S and H3) of individuals belonging to different populations were amplified, genetic distances were calculated, and a phylogenetic analysis was performed. Results showed that *P. americana* has a wide sexual and somatic variation. Morphological, morpho-geometrical and phylogenetic evidence do not support the hypothesis of specific segregation between Hidalgo, Puebla and Tlaxcala populations, although two components were identified, one belonging to Pánuco Basin and the other to Balsas Basin. Populations of Querétaro, Puebla (Necoxtla), and Guerrero (Ajolotero) were morpho-geometrically different, morphologically particular, and phylogenetically related to other species of genus *Pseudothelphusa*, allowing us to detect three undescribed new species.

# Revisión del complejo de formas de la especie *Pseudothelphusa americana* De Saussure, 1857 (Decapoda: Pseudothelphusidae) a través de morfología y marcadores moleculares

## Introducción general

Los decápodos dulceacuícolas mexicanos constituyen un grupo que destaca particularmente por su vasta heterogeneidad, producto de la confluencia de las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical; así como por su gran riqueza supraespecífica, que es evidencia de la antigüedad de las formas ancestrales que los originaron (Villalobos-Figueroa, 1982; Villalobos-Hiriart *et al.*, 1993; Villalobos *et al.* 1999; Villalobos-Hiriart, 2005).

Este grupo, ha desarrollado una serie de modificaciones anatómicas –como el pseudopulmón (Díaz y Rodríguez, 1977; Taylor y Greenaway, 1979; Cumberlidge, 1991)–, ontogenéticas –como un desarrollo abreviado (Rodríguez, 1982)– y fisiológicas que les han permitido superar obstáculos ambientales, como las fluctuaciones en la temperatura y la exposición a la desecación, y les han conferido la suficiente plasticidad para colonizar una amplia variedad de ambientes hipo y epicontinentales (Villalobos-Hiriart, 2005).

Las siete familias de decápodos dulceacuícolas que se tienen registradas para México son: Atyidae De Haan, 1849; Palaemonidae Rafinesque, 1815; Alpheidae Rafinesque, 1815; Cambaridae Hobbs, 1942; Pseudothelphusidae Ortmann, 1893; Trichodactylidae Milne Edwards, 1853; y Glyptograpsidae Schubart, Cuesta y Felder, 2002 (Villalobos *et al.*, 1993; Villalobos-Hiriart, 2005). De estas, únicamente Glyptograpsidae, Trichodactylidae y Pseudothelphusidae pertenecen al infraorden Brachyura Latreille, 1802, y sólo las últimas dos forman parte del grupo, aparentemente artificial (Wolfe *et al.*, 2022), de familias primarias de agua dulce –*primary freshwater families*– (Cumberlidge y Ng, 2009; Klaus *et al.*, 2011).

Por motivos que a este trabajo corresponden, la familia Pseudothelphusidae será considerada *sensu* Álvarez *et al.*, (2020) (Tabla 1). Brevemente: las subfamilias Pseudothelphusinae Ortmann, 1893 y Epilobocerinae Smalley, 1964 son ahora consideradas a nivel de familia y componen la superfamilia Pseudothelphusoidea; la familia Epiloboceridae permanece sin cambios generales; mientras que la familia Pseudothelphusidae se reestructura, elevando a nivel de subfamilia las entonces categorías tribales –Kingsleyini Bott, 1970; Strengerianini Rodríguez, 1982; Hypolobocerini Pretzmann, 1971; Potamocarcinini Ortmann, 1897, Pseudothelphusini Ortmann, 1893– y se erigen tres nuevas más –Raddausinae Álvarez *et al.*, 2020; Ptychophallinae Álvarez *et al.*, 2020; y Guinotiinae Álvarez *et al.*, 2020–.

En general, los miembros de esta superfamilia, suelen encontrarse cerca o sumergidos en los cuerpos de agua, bajo las rocas, hojarasca o demás vegetación ribereña presente (Álvarez *et al.* 2012). Su papel ecológico es fundamental pues, al ser depredadores, regulan las poblaciones de otros organismos –peces e invertebrados pequeños–. Asimismo, sirven de alimento para otras especies de vertebrados, incluyendo el hombre (Paniagua-Domínguez *et al.*, 2020; Cumberlidge *et al.*, 2009). Son buenos procesadores de materia orgánica (Álvarez y Villalobos, 1997) y segundos hospederos intermedios de platelmintos, entre los que destacan las especies del género

*Paragonimus* Braun, 1899 (Cumberlidge *et al.*, 2014), que se ha evidenciado, es causante de la paragonimiasis en el hombre y otros mamíferos carnívoros (Acha y Szyfres, 2001).

Pseudothelphusoidea, al igual otros decápodos, presenta la “*facies crabe*” o la forma típica de cangrejo (Guinot, 1979; Álvarez *et al.*, 2014), como consecuencia del proceso de carcinización y está caracterizada por presentar las siguientes modificaciones morfológicas: 1) reducción de la longitud relativa del cefalotórax y aumento de la relación largo/ancho en algunas estructuras; 2) cuerpo deprimido; 3) condensación cefálica; 4) pérdida parcial de la segmentación inicial; 5) Reducción del abdomen y su disposición contra el esternito torácico; 6) reducción del rostro; 7) refuerzo de la calcificación (Guinot, 1979).

A diferencia de otros grupos de braquiuros en los que los caracteres somáticos son indispensables para la determinación de especies (ver, Schmidt, 1996), en Pseudothelphusoidea, en general, el carácter específico distintivo se encuentra en la ornamentación del tercio distal del primer gonópodo del macho (G1). Y desde su observación (Pretzman, 1965) y la estandarización nomenclatural de las estructuras -proyecciones, procesos, lóbulos y espinas-, placas y vistas (Smalley, 1964), el primer gonópodo ha sido el eje central de su clasificación. Por lo tanto, nuestra capacidad para reconocer y discriminar especies estriba, fundamentalmente, en el correcto reconocimiento de estas estructuras.

La subfamilia Pseudothelphusinae cuenta con la segunda con la mayor riqueza específica – 43 taxones válidos arreglados en 7 géneros– después de Hypolobocerinae dentro de Pseudothelphusoidea (Álvarez *et al.*, 2020; Moreno-Juárez *et al.*, 2022a, 2022b), además de ser endémica de México. Su rango de distribución abarca desde la porción meridional del estado de Sonora, bajando por toda la vertiente del Pacífico hasta el estado de Chiapas, mientras que, en la porción central del territorio, se interna a través de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) hasta el estado de Veracruz (Álvarez *et al.*, 2012). De los 7 géneros pertenecientes a la subfamilia, 6 – *Alvarezius* Moreno, Villalobos y Álvarez, 2022a; *Disparithelphusa* Smalley y Adkison, 1984; *Ehecatusa* Ng y Low, 2010; *Mokayathelphusa* Moreno, Villalobos y Álvarez, 2022b; *Smalleyus* Álvarez, 1989; y *Tehuana* Rodríguez y Smalley, 1972– se restringen sólo a la región sur del país, siendo *Pseudothelphusa* el que define el límite boreal de la subfamilia en el sur del estado de Sonora (Ojeda-Escoto, 2017; Álvarez *et al.*, 2020; Moreno-Juárez *et al.*, 2022a, 2022b).

Debido a la escasez de información sobre las estructuras somáticas taxonómicamente relevante, es común encontrarse con complejos de especies que muy difícilmente pueden discriminarse a razón morfológica. En la revisión más reciente de la entonces tribu Pseudothelphusini (Villalobos-Hiriart, 2005), se distinguieron algunos complejos específicos en los que se incluía el que respecta a este trabajo. Algunos de ellos se han logrado resolver satisfactoriamente, tal es el caso del complejo *P. belliana* Rathbun 1898 en el que las formas identificadas como Agua Blanca e Ixtapan de la Panocha ahora corresponden a las especies *P. purhepecha* Ojeda-Escoto, Villalobos y Álvarez, 2017 y *P. ixtapan* Ojeda-Escoto, Villalobos y Álvarez, 2017 respectivamente (Ojeda-Escoto *et al.*, 2017); mientras que otros, como el de *P. americana*, aún permanecen sin el tratamiento adecuado.

En ese sentido, los trabajos de revisión taxonómica, a cualquier escala, no suponen una mera trivialidad. Pues 1) al reconocer unidades específicas y establecer un taxón nominal, se crea un enlace directo entre el organismo y el conocimiento que de él se genere (Schlick-Steiner *et al.*,

2010); 2) se facilita el manejo y la exactitud de la información, además de que permite hacer comparaciones precisas entre entidades equivalentes (Wagële *et al.*, 2011); 3) se infieren las relaciones de parentesco entre especies y se establecen grupos naturales que pueden ser resumidos en clasificaciones jerárquicas anidadas; y 4) bajo la máxima “no se puede cuidar lo que no se conoce”, son pilares para el establecimiento de propuestas de conservación.

A pesar del alto estatus que la taxonomía tenía entre los Naturalistas del siglo XVIII –e.g., Agassiz o Dana– (Gould, 1998) y la clara importancia que suponen los estudios de esta índole, hoy en día enfrentamos tanto una crisis (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005; Padial *et al.*, 2010) como un impedimento taxonómico (de Carvalho *et al.*, 2005; de Carvalho *et al.*, 2007) además de cierto desbalance (Tancoigne *et al.*, 2011) que sesgan el trabajo en el ámbito.

Sin embargo, intentos loables por “rescatar” la taxonomía han resultado en su transformación como una disciplina científica sólida con la implementación de datos, teorías y métodos de análisis para estudiar el origen, límites y evolución de las especies (Padial *et al.*, 2010). La propuesta integrativa combina diferentes estrategias –e.g., molecular y morfométrica– que solventan las limitaciones y vicisitudes de la taxonomía tradicional y ofrecen un panorama más amplio con mayor evidencia que soporten o no las hipótesis específicas propuestas. Por lo anterior, en este trabajo se concentraron los esfuerzos en realizar un análisis taxonómico integrativo de *P. americana*, usando los enfoques molecular, morfogeométrico y morfológico, con la finalidad de poner a prueba si las diferencias morfológicas encontradas por Villalobos-Hiriart (2005) corresponden a especies nuevas.

**Tabla 1.** Arreglo supraespecífico dentro de Pseudothelphusoidea *sensu* Álvarez *et al.*, (2020).

Superfamilia	Familia	Subfamilia
	Epiloboceridae	Epilobocerinae Smalley, 1964
		Guinotiinae Álvarez <i>et al.</i> , 2020
		Hypolobocerinae Pretzman, 1971
		Kingsleyinae Bott, 1970
Pseudothelphusoidea		Potamocarcininae Otmann, 1897
	Pseudothelphusidae	Pseudothelphusinae Ortman, 1893
		Pthycophallinae Álvarez <i>et al.</i> , 2020
		Raddausinae Álvarez <i>et al.</i> , 2020
		Strengiarianaes Rodríguez, 1982

## Complejos de especie y aproximación molecular

El término *sibling species* fue acuñado por Mayr (1942) basándose en las nociones previas de especies duales –dual species– o especies gemelas –espèces jumelles– (Pryer, 1886; Cuénot, 1936). Este concepto intentaba explicar, dentro del marco teórico del Concepto Biológico de Especie, a los grupos específicos que no presentaban ninguna diferencia morfológica aparente. Dicha similitud entre pares específicos, según el autor, era resultado de procesos simpátricos de especiación (Mayr, 1942), aunque posteriormente, Dobzhansky (1946), demostró que también pueden ocurrir en condiciones alopátricas. Actualmente, el término especies crípticas, complejos de especie o incluso ensamble –*assemblage* (*sensu* Harbach, 2012)– suele preferirse a aquel propuesto por Mayr debido a que, dentro de un marco sistemático filogenético, los términos *sister group* o *sister species* necesariamente implican un parentesco inmediato (Walker, 1964).

La existencia de complejos específicos es algo aparentemente trivial en la naturaleza, incluso en grupos notablemente estudiados como las aves (Mayr, 1948), y suelen ser un desafío taxonómico y nomenclatural que obstaculiza la propuesta de hipótesis de especies, el establecimiento de límites interespecíficos (Kowltón, 1993), y la implementación de propuestas de conservación (Raupach y Radulovici, 2015). Afortunadamente, el fácil acceso a datos moleculares provee de caracteres adicionales que sirven como línea de evidencia adicional que complementa las observaciones morfológicas, y hasta cierto punto, puede ayudar a solventar las vicisitudes de los estudios taxonómicos tradicionales (Cunningham *et al.*, 1992; Kowltón *et al.*, 1993).

Dentro de toda la gran gama de secuencias de DNA que han sido utilizados como marcadores moleculares para abordar problemas taxonómicos a distintos niveles, los marcadores mitocondriales se han reconocido como fuentes de información sumamente útiles para el estudio de las relaciones evolutivas inter-, intra-, y supraespecíficas (Avice, 1986; Wilson *et al.*, 1985). El extenso uso de secuencias de DNA mitocondrial o DNAm, en estudios filogenéticos o genético-poblacionales (e.g., Lansman *et al.*, 1983), se debe, principalmente, al abundante número de copias presentes en cada célula y su fácil aislamiento (Wilson *et al.*, 1985), a su alta especificidad (Avice, 1994; Silberman *et al.*, 1994), a que cuentan con una tasa de cambio notablemente rápida (Avice, 1986; Brown *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1982) y porque la mitocondria posee una capacidad deficiente de edición (Brown *et al.*, 1979; Bogenhagen, 1999).

El amplio uso de los marcadores moleculares condujo a que una gran cantidad de recursos se invirtieran en proyectos que permean el ámbito taxonómico, como el denominado Código de Barras de la Vida -BOL- (Hebert *et al.*, 2003a; Herbert *et al.*, 2003b; Hebert *et al.*, 2004). La idea en general de este proyecto consiste en explotar la mayor cantidad de información posible que ciertas secuencias de determinadas regiones del genoma mitocondrial proveen, para “facilitar” la identificación de taxones a nivel específico. Hebert *et al.* (2003a) proponen el uso de Citocromo Oxidasa Subunidad I –COI– como marcador universal, puesto que los primers universales (Folmer *et al.*, 1994), son capaces de amplificar una gran cantidad de secuencias pertenecientes a varios grupos de animales, y por la gran señal filogenética que proporciona -aunque existen todavía varios detractores (e.g., Will y Rubinoff, 2004; Will *et al.*, 2005)-.

Se ha reconocido que los crustáceos constituyen una oportunidad interesante para el BOL, pues su alta diversidad específica –67,000 especies (Ahyong *et al.*, 2011)–, de formas, roles

ecológicos y su distribución conspicua, vuelven a este grupo taxonómicamente complejo, no ya en estados larvarios e inmaduros, sino, incluso, en estadios adultos. Una década después de la propuesta de Hebert *et al.* (2003a), un total de 164 artículos abordaban situaciones taxonómicas dentro del grupo con el enfoque del BOL (Raupach y Radulovici, 2015), siendo el orden Decapoda el taxón más tratado, principalmente en ambientes marinos.

En palabras del propio Hebert “No hay evidencia más fuerte de la muerte de una disciplina que su fracaso para innovar” (ver. Will *et al.*, 2005 p.845). El BOL se ofreció a la ciencia como una “revolución”, sin embargo, varios de autores (e.g., Will y Rubinoff, 2004; Cameron *et al.*, 2006; DeSalle *et al.*, 2005; Will *et al.*, 2005; Goldstein y DeSalle, 2010; Ebach, 2011) se han cuestionado si en verdad se trata de una, y han discrepado en una serie de aspectos relacionados a su accesibilidad, operacionalidad y metodología. Por un lado, el término código de barras -barcode- ya había sido previamente propuesto por Arnot *et al.* (1993) para secuencias en alelos hipervariables que permitían identificar stocks y linajes de *Plasmodium falciparum* Welch, 1897; por el otro, es cierto que se han señalado los obstáculos e impactos que tendría la completa aceptación de este acercamiento para la taxonomía como ciencia y como profesión (Cameron *et al.*, 2006; Ebach, 2011). No obstante, el lado más interesante de la discusión es el que respecta a la metodología para inferir identidades específicas. Se ha argumentado 1) que los códigos de barras basados en un solo carácter y un solo ejemplar tienen, por implicación, una connotación tipológica, además de ofrecer un panorama informativo relativamente estéril (Will y Rubinoff, 2004; Will *et al.*, 2005); 2) que no hay un nivel de divergencia universal para poder delimitar a las especies (Will y Rubinoff, 2004); y 3) la predilección de árboles basados en distancias (e.g., Neighbor Joining) y no en métodos con base en caracteres (e.g., Máxima Verosimilitud), que construyen relaciones jerárquicas donde se infiere la ancestría común a partir de sinapomorfías (DeSalle *et al.*, 2005; Goldstein y DeSalle, 2010).

Por tal razón, y aun cuando BOL ha tenido un extenso reconocimiento, numerosos estudios han preferido usar una gran variedad de marcadores genéticos alternativos en conjunto, para resolver problemas concernientes a las relaciones inter- e intraespecíficas (e.g., Machado *et al.*, 1993; Palumbi y Benzie, 1991; Sarver *et al.*, 1998; Webb, 2003; Hunter *et al.*, 2007). Particularmente en el infraorden Brachyura, los análisis multigen han demostrado ser sumamente útiles al ofrecer información altamente confiable, permitiendo proponer rearrreglos supraespecíficos (e.g., Schubart y Reuschel, 2009; Álvarez *et al.*, 2020), establecer hipótesis específicas en complejos morfológicamente indistinguibles (Jesse *et al.*, 2010), así como evaluar su historia evolutiva (Tsang *et al.*, 2014) y la influencia paleogeográfica y climática en los eventos de especiación (Jesse *et al.*, 2011).

## **Análisis de la forma y la aproximación morfogeométrica**

“La morfología no es la ciencia de la forma fija, sino de la formación y transformación de la forma orgánica” solía apuntar Richard Owen (*vide* Richards, 1987 pp. 151). La línea de investigación en morfología se encuentra compuesta por 3 grandes aspectos: 1) el estudio de la forma del individuo; 2) el estudio comparativo; y 3) el estudio embriológico, donde los cuerpos adultos son la consecuencia del desarrollo ontogénico (Amudson, 2005).

No obstante, el programa de investigación construido por los primeros morfólogos evolutivos consideraba un cuarto punto correspondiente al estudio del origen de la forma, haciendo uso de herramientas tanto de la biología del desarrollo como filogenéticas (Amudson, 2005). Desgraciadamente, durante la concepción de la Síntesis Moderna, la exploración del fenómeno evolutivo a través del estudio de la forma pasó a segundo plano, debido principalmente a la categorización de la Biología por parte de Dobzhansky en dos escuelas fundamentales.

La primera y más importante era la fisiológica -donde se encajonaba a la genética-, “una ciencia nomotética” preocupada por “el estudio de los mecanismos responsables de la producción y mantenimiento de la variación” (Dobzhansky, 1951, pp. 7); mientras que la segunda, la escuela morfológica, se interesa más bien en cuestiones sin mayor propósito que la narrativa histórica (Amudson, 2005) como en “demostrar que la evolución ha ocurrido [...], entender las relaciones entre las ramas de un árbol filogenético, y no tanto en dilucidar la naturaleza de las discontinuidades mismas [en la forma] o los mecanismos a través los cuales se originan” (Dobzhansky, 1951, pp. 7).

Esta postura determinista biológica, heredada directamente del reduccionismo de la física Newtoniana, (Lewontin, 1983; Lewontin *et al.*, 2004) desprestigió e hizo de lado el estudio de otros fenómenos que forman parte del proceso evolutivo y que no necesariamente se relacionan con los genes y su dinámica poblacional. Pese a ello, no es posible ignorar que, en la naturaleza, la diversidad de formas está directamente relacionada con cuestiones de interés ecológico, genético y del desarrollo (Rohlf, 1990), y es sólo a través de su consideración que uno puede acercarse a una interpretación cabal del fenómeno evolutivo. Actualmente existen propuestas modernas (Laland *et al.*, 2015) que tratan de reivindicar el valor del estudio de la forma, su origen y su relación con la ontogenia y la filogenia (Zelditch *et al.*, 2004) en un contexto evolutivo extendido.

D’Acry Thompson (1947) comienza su libro -On growth and form- haciendo hincapié en el interés que tenían ciertos pensadores sobre la matematización de las ciencias naturales. Desde Kant hasta Du Bois Reymond, la necesidad de encontrar explicaciones de fenómenos naturales haciendo uso de métodos y lenguajes matemáticos se estaba haciendo cada vez más patente (Thompson, 1947).

A mediados del siglo XIX, existían dos escuelas que abordaban aspectos de la forma desde una perspectiva matemática. La primera, conocida como biométrica, se basaba en la geometría lineal de estructuras covariantes y usualmente ignoraba aspectos biomatemáticos de las medidas originales; y la segunda, que interpretaba los cambios en la forma biológica como distorsiones de coordenadas cartesianas, pero cuyo análisis no iba más allá de las distancias entre pares (Bookstein, 1996).

Algunas décadas después, en 1980, ocurrió lo que se conoce como la “Síntesis Morfométrica” en la que las matemáticas estadísticas, la biometría multivariada, la geometría no euclidiana y los gráficos computacionales se combinaron en un sistema de herramientas para el análisis cuantitativo de “landmarks” (Bookstein, 1996). A su vez, la consolidación -tanto semántica como matemática- de la teoría de la forma (shape), donde se define como la información geométrica resultante tras eliminar la posición, la orientación y la escala (Kendall, 1977; Humphries *et al.*, 1981; Zelditch *et al.*, 2004), permitieron la evaluación del desarrollo de la forma a través de un marco estadístico dentro de un contexto Biológico (Bookstein, 1996; Benítez y Püschel, 2014).

Actualmente, la aproximación más popular al estudio moderno de la forma corresponde al enfoque morfométrico geométrico, que aprovecha los datos multidimensionales que provee la geometría de los objetos, aplicando estadística multivariada, sobre la forma pura (shape) de los objetos, para evaluar cómo covaría la forma con sus factores causales (Toro *et al.*, 2010). La morfometría de hitos -o landmarks- resuelve gran parte de las complicaciones y ambigüedades respecto a la redundancia y solapamiento de las medidas de la morfometría lineal (Rohlf, 1990; Zelditch *et al.*, 2004) y complementa, con datos estadísticos, las descripciones que el trabajo tradicional aporta (Benítez y Püschel, 2014). Este enfoque ha sido ampliamente explorado en décadas recientes para responder una serie de preguntas relacionadas con, e.g., el origen del humano anatómicamente moderno (Detroit, 2000); el rol del desarrollo en la evolución (Lawing y Polly, 2009); la relación entre forma y función (Cooke y Terhune, 2015); y por supuesto, acercarse a complejos de especie (Baylac *et al.*, 2003; Maderbacher *et al.*, 2008; Evin *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2016).

La variedad de procesos biológicos deriva, a su vez, en una diversidad de formas que pueden estar relacionadas a una función en particular, a presiones selectivas específicas o a diferencias en los procesos ontogénicos (Zelditch *et al.*, 2004). La variación de la forma en el genital masculino de varios artrópodos tiene como explicación una serie de hipótesis tales como la de llave-cerradura, pleiotropía, selección sexual, e incluso coevolución de las estructuras genitales como sistema específico de reconocimiento sexual (Dufour, 1844; Mayr 1963; Eberhardt, 1985, 1996; Zunino, 2012). Independientemente de qué hipótesis favorezcamos, es innegable que dichas estructuras presentan una constante, considerable y rápida divergencia morfológica interespecífica (Arnqvist, 1997) por lo que es trivial encontrar clasificaciones taxonómicas enteras cuyo eje principal sean los genitales masculinos.

El caso de las especies de Pseudothelphusoidea no es la excepción, pues el G1 aporta una cantidad significativa de información taxonómica, principalmente porque en términos somáticos, no es muy común encontrar demasiada variación interespecífica (Pretzmann, 1965). Observaciones personales, me han permitido detectar que la proyección caudo-marginal es una estructura notablemente sensible a los cambios de forma y presenta patrones morfológicos bastante particulares.

## ***Pseudothelphusa*, *P. americana* y sus problemas taxonómicos**

El género *Pseudothelphusa* De Saussure, 1857, destaca dentro de la familia Pseudothelphusidae tanto por su riqueza específica como por su amplia de distribución. En un principio, este género se erigió como un taxón intermedio entre *Thelphusa* Latreille, 1819 y *Potamia* Latreille, 1831 (De Saussure, 1857) para incluir una sola especie que aparentemente provenía de Haití: *Pseudothelphusa americana* De Saussure, 1857. Durante la segunda mitad del siglo XX, este género sufrió una gran cantidad de cambios taxonómicos que sentaron las bases de su clasificación moderna. Pasó de ser un género con 60 especies, a ser dividido en 25 géneros que se distribuían en tres tribus (Villalobos y Álvarez, 2010). Actualmente, *Pseudothelphusa*, cuenta con 29 especies endémicas de México (Ojeda-Escoto *et al.*, 2017), distribuidas a lo largo de la vertiente del Pacífico desde la porción meridional de Sonora hasta Oaxaca y a través de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) hasta llegar al estado de Veracruz (Álvarez y Villalobos, 1996; Villalobos y Álvarez, 2010; Álvarez *et al.*, 2012a, 2012b) mostrando un claro patrón típico Neotropical de carácter profundo (Halffter y Morrone, 2017; Ojeda-Escoto *et al.*, 2017). Cabe destacar que su presencia en el estado de Veracruz está actualmente en discusión (Moreno-Juárez, 2019; Moreno-Juárez *et al.*, 2022b).

Al ser considerada como barrera entre las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical (Cantú *et al.* 1991), el influjo de la FVTM ha sido crítico para el desarrollo histórico-ecológico de este taxón -*P. americana*- y muchos más. Varios estudios han evaluado esta gran influencia tanto para taxones animales como para plantas (Escalante *et al.*, 2004; Suárez-Mota *et al.*, 2013), y debido a su compleja historia geológica, su gran heterogeneidad topográfica y ambiental, su condición biótica transicional y los procesos recientes de especiación (Gámez *et al.* 2012), han concluido que se trata de un área de diversificación activa y sumamente compleja (Escalante *et al.*, 2004; Morrone y Gutiérrez, 2005; Gámez *et al.* 2012)

La distribución restringida a la FVTM y el rango altitudinal que presentan las poblaciones de *P. americana* -que va de los 1 400 a los 2 450 msnm-, concuerdan con lo establecido por Halffter (2003) para el patrón mesoamericano de montaña que, además, es en parte equivalente al componente mesoamericano de montaña descrito por Morrone y Márquez (2003) y a la Zona de Transición Mexicana (ZTM) de acuerdo con Escalante *et al.* (2005). El gran influjo de esta región en los procesos de especiación de *P. americana* ha sido notado recientemente por Villalobos-Hiriart (2005), pues una serie de formas, hasta ese momento ignoradas, se encontraron entre sus poblaciones geográficamente disyuntas.

La situación taxonómica actual de *P. americana*, en resumidas cuentas, presenta dos incógnitas a resolver:

La primera, parcialmente resuelta, está relacionada con su historia taxonómica, que ha sido complicada desde la publicación de su descripción en 1857. Este problema ha generado dudas genuinas sobre la identidad de la especie que van desde si su descripción original en verdad corresponde a otra especie descrita en años posteriores -como apuntó Rodríguez (1982)-o si algunos miembros dentro del género son en verdad subespecies de *P. americana*. Y como consecuencia, se han propuesto varias sinonimias y cambios nomenclaturales en taxones relacionados. La limitación más grande que impide resolver enteramente esta cuestión es duda sobre la legitimidad de la serie tipo y la gran fragmentación que presentan los ejemplares que la conforman (Hollier, 2018), que

impide hacer comparaciones directas con ejemplares colectados en la actualidad. No obstante, esfuerzos loables se han hecho para esclarecer cuestiones clave como la distribución tan inusual que registró De Saussure (1857) o las relaciones de este taxón con los demás miembros del género.

La segunda, está relacionada directamente con las formas descritas por Villalobos-Hiriart (2005) y refiere a que si las poblaciones, geográficamente disyuntas, de *P. americana*, han generado suficientes diferencias fenotípicas y genotípicas como para poder hacer una segregación específica o aún no

### **Morfología general en Pseudothelphusidae**

El estudio sistemático de las estructuras morfológicas de los organismos fue, es y seguirá siendo fundamental para los trabajos de índole comparativa. Sin duda, es nuestra primera fuente de evidencia para evaluar similitud y, posteriormente, establecer homologías entre especies (De Pinna, 1991); además de jugar un papel fundamental dentro del sistema de clasificación Linneano, pues el descubrimiento y descripción de caracteres exclusivos que sean diagnósticos para determinado grupo es aún indispensable en el quehacer taxonómico.

Tanto Pretzmann (1965) como Rodríguez (1982) opinan que muy pocos caracteres morfológicos externos en los pseudotelfúsidos tienden a ser taxonómicamente informativos. El argumento que justifica esta aseveración es que a causa de los complicados procesos geológicos y migratorios que dieron origen a este grupo, existen casos en los que las variaciones interespecíficas son imperceptibles o muy débiles, mientras que, en otros casos, las variaciones intraespecíficas suelen cubrir un gran espectro. Por tal razón, desde 1965, se ha promovido el uso de caracteres sexuales -principalmente masculinos- como complemento a las descripciones y delimitaciones de las especies. Debido a que presentan una constante, considerable y rápida divergencia (Arnqvist, 1997) la inclusión de este tipo de caracteres ha sido fuertemente promovida también en otros grupos de artrópodos (Eberhard, 1985, 1996; Zunino, 2012).

A continuación, se propone explicar brevemente la configuración morfológica de la familia Pseudothelphusidae incluyendo tanto rasgos externos como sexuales, basándose en algunos aspectos en los criterios de Rodríguez (1982), pero, sobre todo, en aquellos encontrados en Villalobos-Hiriart (2005). Se motiva al lector revisar estas referencias para una visión más profunda sobre esta configuración.

### **Caparazón**

Es una estructura transversalmente oval y más ancha que larga (Fig. 1). Los lóbulos epigástricos, o postfrontales, ubicados en la porción antero-central son discernibles y frecuentemente están separados por el surco medio. Los demás surcos que delimitan las regiones corporales están sutilmente definidos, excepto el surco cervical que puede ser débil o bien marcado. La región gástrica está flanqueada postero-lateralmente por hendiduras o cicatrices discernibles, mientras que las regiones branquiales se encuentran ampliamente desarrolladas. Los márgenes anterolaterales marcan la unión entre la superficie dorsal del cefalotórax y la pared lateral de las cámaras branquiales. El margen posterior marca el extremo posterior del caparazón, no presenta ornamentaciones y puede ser recto o con una concavidad media dando la impresión de que tiene una forma arqueada. La parte frontal se encuentra delimitada por un borde inferior. En la porción

media, presenta una concavidad al unirse con el septo interantenuar. Este borde se observa grueso, sinuoso y continua lateralmente para formar el margen superior de las órbitas. En ocasiones, puede observarse un borde superior que marca el doblamiento de la porción frontal hacia abajo.

### **Cavidad orbital**

Las órbitas están formadas por dos cavidades grandes que alojan a los ojos (Fig. 2). Estas cavidades son ovales y están completamente cerradas y se encuentran delimitadas por el borde orbital. El ángulo interno puede estar marcado por el diente orbital interno. El ángulo externo, por lo general es bajo y puede presentar en la base una muesca poco profunda que marca el principio del margen anterolateral.

### **Anténulas**

Se encuentran alojadas en las fosas transversales que se ubican debajo de la frente (Fig. 2). El flagelo antenular es corto y está constituido por un solo segmento distal de forma ovoidal, así como por un segmento externo, que se ha reducido a una proyección pequeña y esbelta.

### **Antenas**

Son pequeñas estructuras localizadas en el espacio que se forma entre el margen frontal y el ángulo orbital interno (Fig. 2). Están conformadas por un artejo basal con forma de placa cuadrangular y por dos artejos libres y un flagelo corto.

### **Apéndices bucales**

Son un conjunto de seis apéndices -tres cefálicos y tres torácicos- cuya función está directamente relacionada con la alimentación. Dentro de los apéndices cefálicos encontramos las mandíbulas, las maxílulas y las maxilas.

Las primeras son apéndices calcificados que están constituidos por una estructura basal denominada protópodo. El resto de los artejos -carpo, propodio y dactilo- integran el palpo mandibular y tiene una función sensorial. Las maxílulas son, propiamente, apéndices pequeños y aplanados y se encuentran sobrepuestas a las mandíbulas. Los últimos apéndices -las maxilas- son similares a las maxílulas, sin embargo, cuentan con el exopodito muy desarrollado formando lo que se conoce como escafognatito, que es una lámina longitudinalmente oval con los bordes, anterior y posterior, ornamentados con un fleco de cerdas pulmosas.

### **Primer maxilípodo**

Con el endópodo esbelto en los dos tercios proximales y formando una lámina ensanchada en el tercio anterior, que forma el piso de los canales branquiales eferentes, justo antes de su abertura en la región epistomal; el borde anterior es redondeado y está ornamentado con un fleco de cerdas plumosas, con una muesca ligera y ampliamente redondeada antes de alcanzar el ángulo mesial, separando al borde en dos secciones. Los enditos laminares son moderadamente esbeltos y armados con cerdas y espinas córneas y agudas en su borde gnatal. El exopodito es esbelto y termina en un flagelo segmentado, ornamentado distalmente con cerdas largas y plumosas; el segmento basal casi tan largo como la suma de los restantes. El epipodito presenta una consistencia dura, es

esbelto y tres veces más largo que en endópodo, formando una especie de hoja ornamentada con cerdas largas.

### **Segundo maxilípodo**

Presentan el endópodo esbelto y formado por cinco artejos además del basipodito. El isquio y el mero son cilíndricos. El carpo, propodio y dácilo, son moderadamente comprimidos, el borde anterior del propodio presenta algunas cerdas, mientras que el dácilo cuenta con espinas córneas y agudas. El exópodo es esbelto y terminado en un flagelo segmentado similar al del primer maxilípodo. El epipodito es parecido al del apéndice anterior, pero un poco más corto y armado en su base con una podobranquia.

### **Tercer maxilípodo**

Con el endópodo aplanado y cerrando completamente la cavidad bucal debido a que el isquio y el mero forman dos placas anchas que se encuentran armadas en su borde gnatal con algunas cerdas y tubérculos córneos, cónicos, subagudos o redondeados (Fig. 2). El isquio puede ser trapezoidal o subrectangular; el mero es casi tan ancho como el isquio y cuenta con el margen anterior redondeado o recto y con una pequeña muesca bien definida antes de la articulación con el palpo, que forma el borde inferior de la abertura de los canales eferentes. El exópodo es esbelto y se adelgaza distalmente hasta terminar en un ápice subagudo, su longitud con respecto al borde lateral del isquio.

### **Pereiópodos**

Los apéndices del tórax se encuentran bien desarrollados, presentan la forma típica de los cangrejos verdaderos y todos se mantienen en un mismo plano de inserción en el pereión (Fig. 1). El primer par, correspondiente a los quelípedos, es el más fuerte y robusto, generalmente son asimétricos y sus dos últimos artejos están modificados para formar una quela. Predominan dos tipos dentro de esta familia. En el primer tipo, las pinzas son fuertemente desiguales, sus palmas están abultadas y los dígitos están separados por un hiato en los adultos. En el segundo tipo, las pinzas son menos desiguales, sus palmas son cilíndricas y los dígitos pueden estar o no separados por un hiato.

El resto de los pereiópodos tienen una función locomotora, son largos –generalmente disminuyendo gradualmente de tamaño del primero al último–, moderadamente comprimidos y están constituidos por siete artejos, en donde el último –llamado dactilopodito–, está armado con hileras longitudinales de espinas y termina en una punta aguda.

### **Pleópodos**

Los apéndices del abdomen son similares al resto de los braquiuros. En las hembras se presentan cinco pares birrámeos, esbeltos y aplanados, con los bordes ornamentados con un fleco denso de cerdas, en donde se adhieren a los huevecillos y se mantienen en racimos, cuando la hembra está ovígera.

En el macho sólo se presentan los dos primeros pares -los gonópodos- y ambos están modificados para la reproducción.

### **Primer par de gonópodos del macho (G1)**

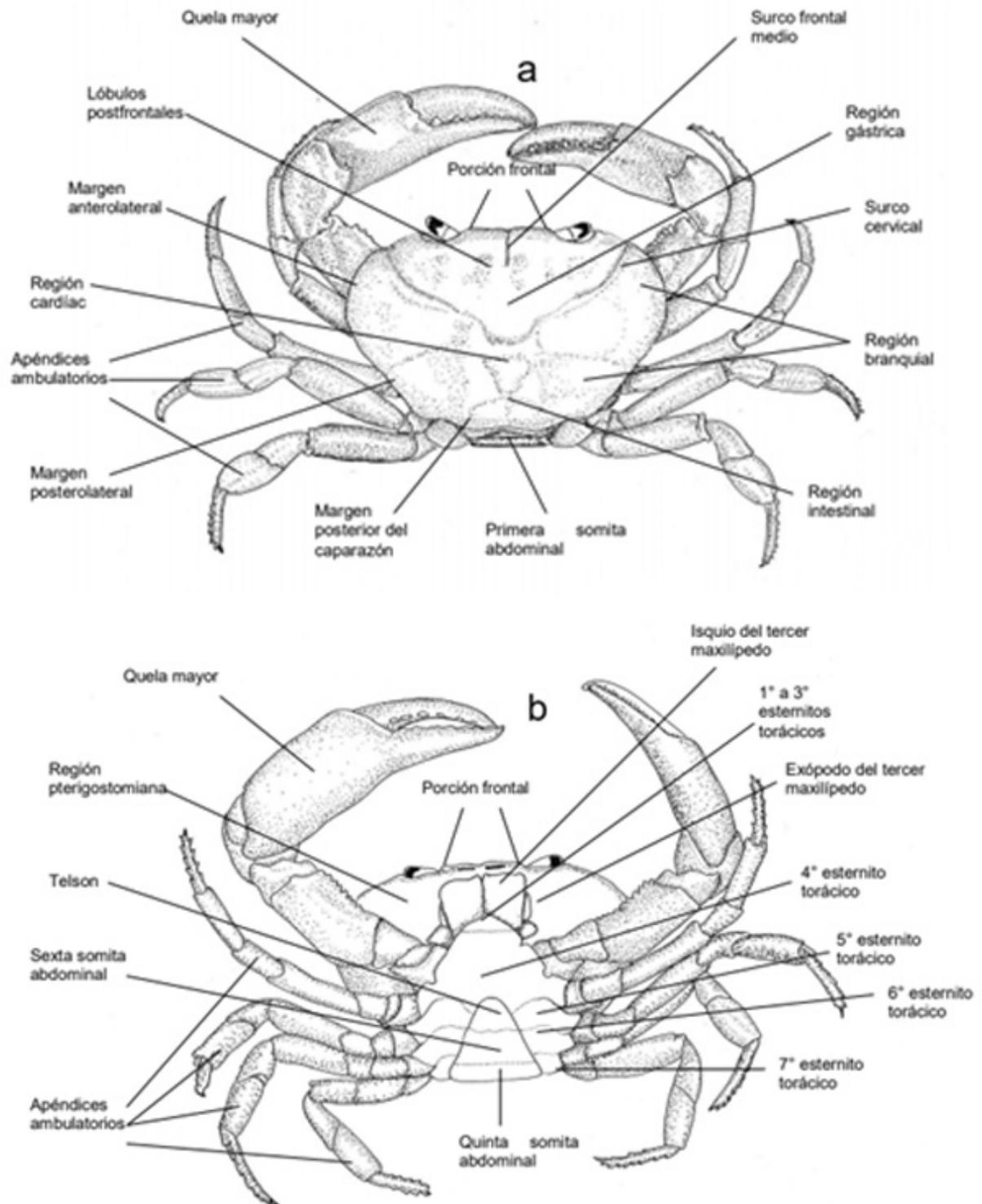
Tiene la forma común del gonópodo de los cangrejos braquiuros (Guinot, 1979). Consiste en un apéndice unirrámeo que se origina a partir del primer esternito abdominal y que está formado por dos artejos basales – el coxopodito y el basipodito- y uno distal -el endópodo- que está integrado por la fusión del resto de los artejos que constituyen la rama interna en otros apéndices -isquio, mero, carpo, propodio y dácilo- (Figs. 3 y 4).

El endópodo o eje principal del G1 es de forma cilíndrica o moderadamente comprimido en sentido meso-lateral, su porción externa está fuertemente quitinizada y la central es hueca para formar un canal espermático. Asimismo, presenta dos orificios proximales que permiten la inserción del pene y del segundo pleópodo al canal espermático. La porción apical se encuentra ornamentada con elementos laminares que pueden ser triangulares y terminar en una o varias puntas agudas o presentar la forma de amplias placas redondeadas.

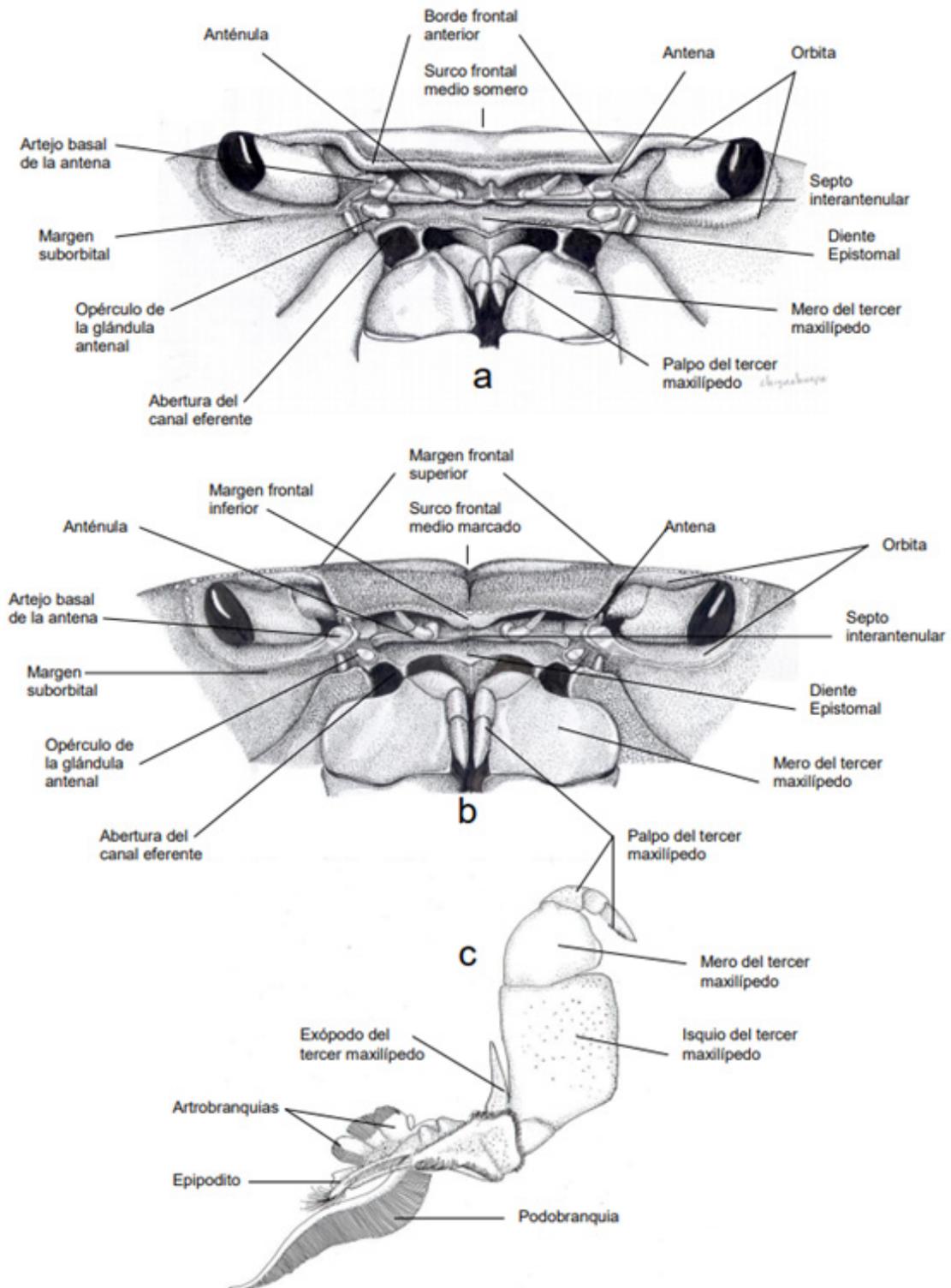
Adicional a esta estructura cilíndrica, se presenta una placa marginal que es de consistencia membranosa y se extiende desde la base hasta la punta del artejo distal del ápice. En los pseudotelfúsinos, esta placa longitudinal cierra el canal espermático y no alcanza la porción apical del gonópodo, sino que se fusiona en el tercio distal con la superficie caudo-caudal fuertemente quitinizada. En esta subfamilia, la sutura lateral que se encuentra unida al margen de la superficie meso-caudal y funciona como una bisagra que permite que la placa se abra y facilite la inserción del segundo pleópodo al canal espermático. Por su parte, la sutura marginal es longitudinalmente libre y se encuentra sobrepuesta al margen de la superficie meso-cefálica del cilindro quitinizado. En la porción proximal, el borde caudal de la sutura marginal se presenta una hilera de cerdas fuertes y largas.

Para el caso de la nomenclatura de los elementos apicales del G1 del macho, se siguió la terminología empleada por Villalobos-Hiriart (2005) y Villalobos y Álvarez (2010):

1. Según autores como Smalley (1964), Pretzmann (1972) y Rodríguez (1982, 1986), la porción del primer gonópodo dirigida hacia el abdomen se ha reconocido como superficie caudal. Así, las demás superficies son nombradas como cefálica, lateral y mesial, en función de su posición en referencia al cuerpo del cangrejo.
2. Para Hobbs (1940), un proceso indica cualquier expansión terminal sin importar su naturaleza (e.g., proceso mesial); mientras que proyección es una expansión terminal que se forma por la fusión de dos procesos terminales (e.g., proyección caudo-marginal).



**Figura 1.** Estructuras somáticas un cangrejo de agua dulce, tomado de Villalobos-Hiriart (2005). a) Vista dorsal; b) Vista ventral.



**Figura 2.** Estructuras somáticas relativas a la frente, tomado de Villalobos-Hiriart (2005). a) Frente con borde superior; b) Frente sin borde superior; c) Plan morfológico general del tercer maxilipedo.

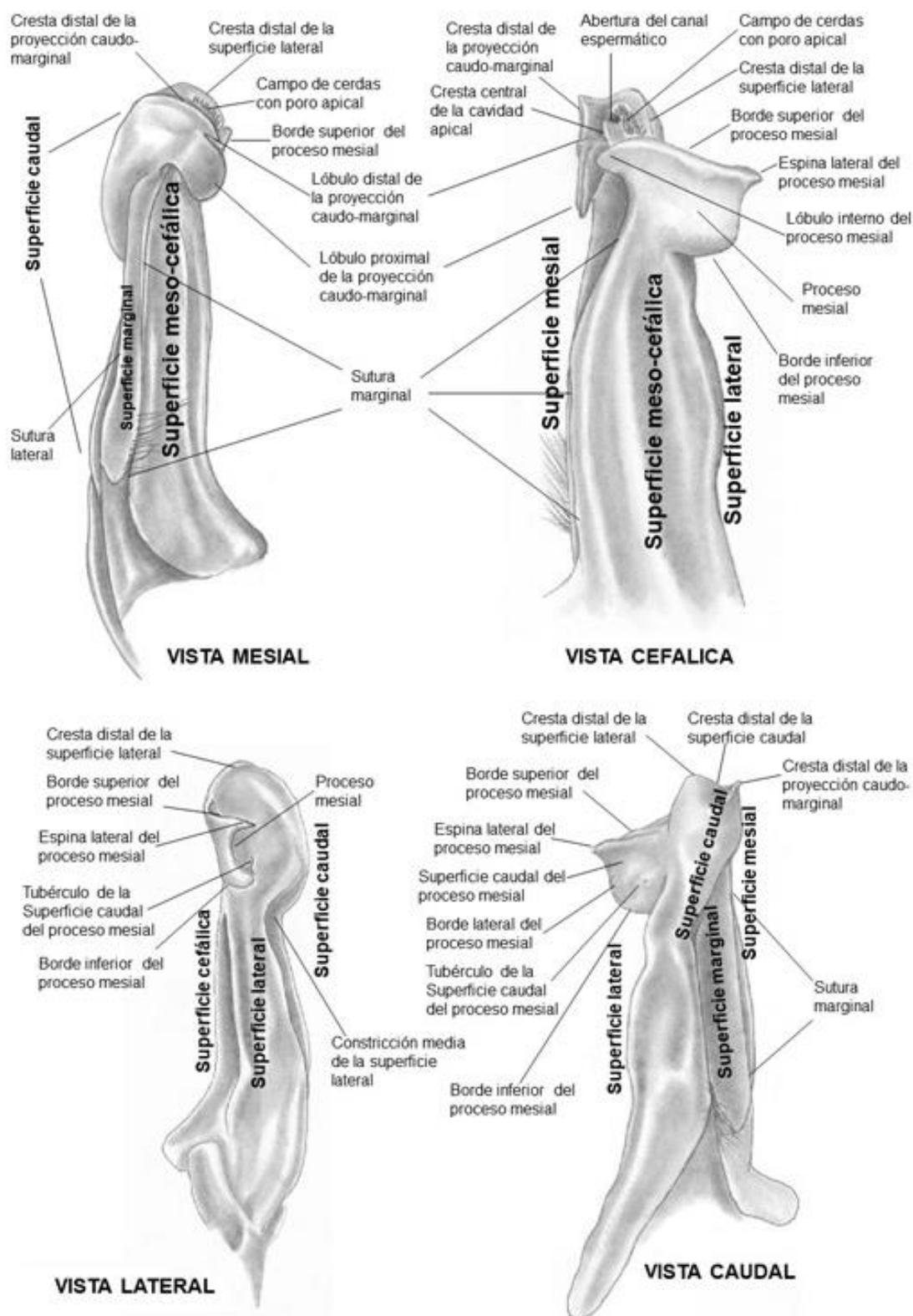
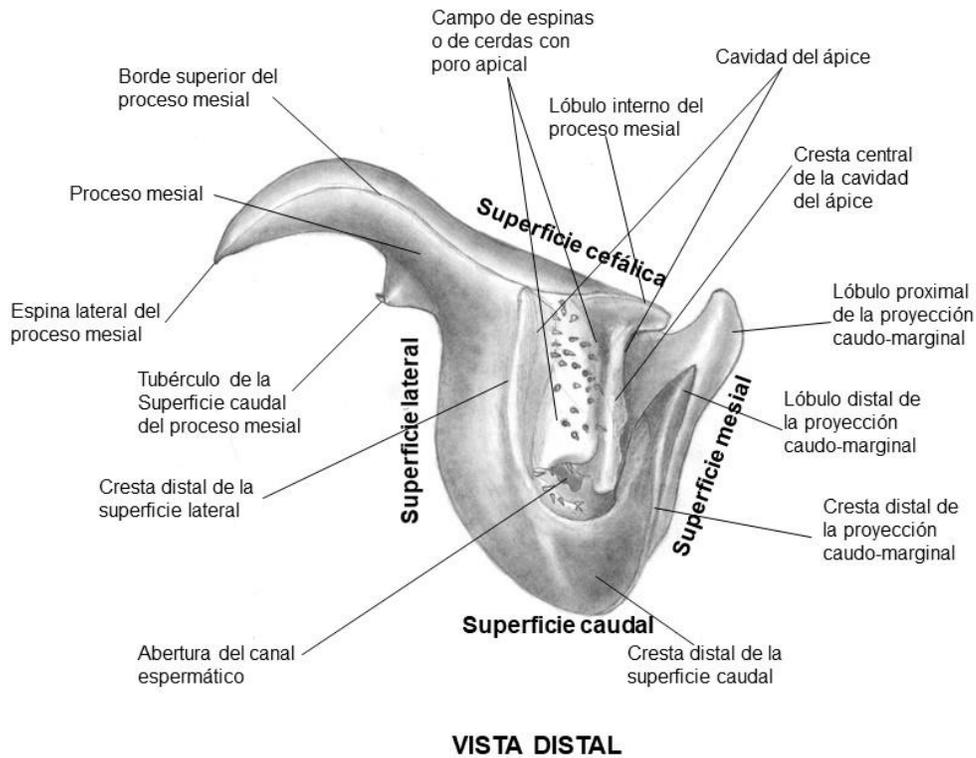


Figura 3. Plano morfológico del primer par de gonópodos del macho adulto, tomado de Villalobos-Hiriart (2005).



**Figura 4.** Vista distal del primer gonópodo del macho, tomado de Villalobos-Hiriart (2005).

- 3- La posición del proceso mesial se determinó usando como referencia la sutura marginal que, según Smalley (1964), marca el límite entre las dos superficies, interna -canal espermático- y externa -el resto de las superficies- que constituyen el G1. Esta sutura delimita el canal espermático y se extiende longitudinalmente desde la porción basal hasta la abertura del canal espermático en la posición distal. El tercio apical, sufre una torsión hacia el eje medio de la placa esternal, lo que provoca que el canal espermático emerja en las posiciones caudal o caudo-mesial. El proceso mesial se ubica en la porción distal de la superficie cefálica, se dispone en posición transversal al eje principal y cierra la cavidad del ápice, presenta una espina fuerte y aguda en su margen lateral y una proyección laminar en su margen interno que se extiende hasta quedar en contacto con la superficie interna de la proyección caudo-marginal.
- 4- Un rasgo que define a la subfamilia Pseudothelphusinae es la proyección caudo-marginal (Villalobos-Hiriart, 2005), la cual se forma en el tercio distal del G1 por la fusión de la superficie caudal y la placa marginal. Esta proyección se observa con el G1 en posición mesial, y en la porción distal se extiende cefálicamente para terminar en dos lóbulos, uno distal de forma triangular o subrectangular con el margen cefálico redondeado.
- 5- El proceso ubicado en la superficie cefálica es denominado proceso mesial. Esta placa se es transversal al eje principal del gonópodo y cierra la cavidad del ápice.

## Justificación

El Neotrópico es la segunda región con la mayor cantidad de especies cangrejos de agua dulce, superando con 31 géneros y 166 especies a la región Afrotropical y quedando detrás de la región Paleártica-Oriental-Australasiana para la que se citan 98 géneros y 539 especies y que representa el 20-22% de toda la carcinofauna de agua dulce del mundo (Cumberlidge *et al.*, 2009; Cumberlidge *et al.*, 2014). Sin embargo, la carcinofauna dulceacuícola mexicana, podría estar compuesta por géneros y especies aún no descritos, como sugieren estudios recientes dedicados a su exploración taxonómica (e.g. Ojeda-Escoto *et al.*, 2017; Moreno-Juárez *et al.*, 2022 a, b).

Tal es el caso de *P. americana*, pues al distribuirse en una zona geológica evolutivamente activa (Escalante *et al.*, 2004), con ejemplares que cuentan con sutiles variaciones morfológicas en el G1 (Villalobos-Hiriart, 2005), podría tratarse de un complejo de especies.

La intención de implementar un enfoque integrativo que incluya análisis molecular, morfogeométrico y morfológico de diversas poblaciones de *P. americana* distribuidas a lo largo de la FVTM, fue con el fin de evidenciar la posible divergencia entre las mismas, y permitirnos plantear hipótesis de especies.

Se ha reconocido a *P. americana* como una especie taxonómicamente compleja que presenta algunos obstáculos que imposibilitan una adecuada resolución al trabajo que, por años, muchos investigadores han dedicado. Es probable que, aumentando la cantidad de evidencia con datos moleculares, estudios filogenéticos y morfogeométricos, a la par de una revisión morfológica exhaustiva, su situación taxonómica quede, por fin, resuelta.

## Pregunta de investigación

¿Todos los ejemplares registrados previamente como *P. americana* en diferentes partes de la República Mexicana pertenecen a la misma especie?

En el caso de que sí existan diferencias morfológicas que permitan segregarse ¿Estas diferencias estarán reflejadas en su estructura genética y geográfica?

## Hipótesis

Los ejemplares identificados como *P. americana* forman más de una especie reconocibles a través de análisis molecular, morfogeométrico y morfológico.

## Objetivos

### General

- Determinar el estado taxonómico actual de las formas que constituyen a *P. americana*, mediante el uso de marcadores moleculares, morfometría geométrica y observaciones morfológicas.

### Específicos

- Integrar un inventario de los ejemplares de *P. americana* que se encuentran depositados en la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR) del Instituto de Biología (IB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Reconocer morfológicamente las formas de *P. americana* que se han registrado a través de su distribución geográfica, que abarca los estados de Guerrero, Hidalgo, Puebla, Querétaro y Tlaxcala, México.
- Obtener secuencias de DNA de ejemplares representativos de las distintas formas de *P. americana* reconocidas por Villalobos-Hiriart (2005) para realizar un análisis de distancias genéticas.
- Realizar un análisis filogenético y una red de haplotipos usando las secuencias de DNA obtenidas para evaluar la relación existente entre este complejo y otros miembros dentro del género *Pseudothelphusa*.
- Analizar la variación morfogeométrica de la proyección caudo-marginal a lo largo del gradiente de distribución geográfica de ejemplares representantes de las formas de *P. americana* reconocidas por Villalobos-Hiriart (2005), mediante la obtención de imágenes del G1 en vista mesial.
- Realizar las descripciones morfológicas, así como una comparación de caracteres entre los diferentes linajes reconocidos dentro de *P. americana*.
- Elaborar un catálogo fotográfico que ilustre tanto estructuras somáticas como sexuales de los linajes reconocidos dentro de *P. americana*.

- Enriquecer el conocimiento de la historia biogeográfica de *P. americana* de acuerdo con su distribución actual.

## Área de estudio

De acuerdo con la literatura, los cangrejos dulceacuícolas que han sido reconocidos como *P. americana* fueron recolectados en diferentes localidades de los estados de Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca Puebla, Querétaro y Tlaxcala (Fig. 5). Sin embargo, se ha detectado que los individuos tanto de Oaxaca y Michoacán, que con anterioridad se asumían como dicho taxón nominal, presentan afinidades morfológicas diferentes a lo que se considera en este trabajo como *P. americana sensu stricto* (Villalobos-Hiriart, 2005).

Por la razón anterior, el área de estudio se delimitó a los estados de Guerrero, Hidalgo, Puebla, Querétaro y Tlaxcala (Fig. 6). Región que corresponde en su mayor parte a la FVTM.

La FVTM entendida como provincia biogeográfica (Morrone, 2019), está conformada por un arco de volcanes del Neógeno alineados transversalmente (Gámez *et al.*, 2012) y localizados en el centro de México, entre los paralelos 19° y 21° N y entre los 1,500–3,000 msnm (Ferrusquía-Villafranca, 2007). Presenta un área de 160,000 km<sup>2</sup> y una longitud cercana a los 1,000 km (Morrone, 2017) y comprende los estados de Aguascalientes, Guanajuato, México, Ciudad de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz (Morrone y Márquez, 2003; Morrone, 2017).

Los volcanes que conforman la FVTM –i.e., el Ceboruco; el Nevado de Colima, el Pico de Tancitaro, el Nevado de Toluca, la Malinche, el Iztaccíhuatl y el Popocatepetl– comenzaron a formarse en el Mioceno –hace 19 m.a. aproximadamente– durante 4 eventos de vulcanismo asincrónicos que comenzaron en el centro del país y posteriormente se expandieron hacia el Este y Oeste (ver. Espinosa y Ocegueda, 2007; Morrone, 2019).

Respecto a su regionalización, se han reconocido 2 subprovincias; cada una con una edad geológica estimada diferente, y con clima, elevación y vegetación contrastantes (Morrone, 2017; Morrone, 2019). La subprovincia del Este está conformada por los distritos Otomí y Tabasco, presenta una orogenia del Mioceno-Plioceno, un clima templado subhúmedo y semifrío subhúmedo y una vegetación caracterizada por bosques de pino-encino y matorral xerófilo; mientras que la del oeste agrupa los distritos Azteca y Orizaba-Zempoaltepec, se originó durante Pleistoceno-Cuaternario, presenta un clima semicálido subhúmedo y una vegetación que corresponde a bosques tropicales caducifolios (Morrone, 2019).

Las relaciones bióticas de esta provincia son múltiples. Estudios biogeográficos con aves, plantas, insectos, peces y reptiles (Morrone *et al.*, 1999; Corona *et al.*, 2007; Marshall y Liebherr, 2000) indican que la FVTM tiene afinidad con las provincias de las Tierras Bajas del Pacífico, la Cuenca del Balsas y las sierras Madre Occidental, Oriental y del Sur. Esta condición de núcleo (Morrone, 2019) explica su naturaleza transitiva. Al ser parte del Componente Mexicano de Montaña (Escalante *et al.*, 2005) y, por lo tanto, equivalente a la Zona de Transición Mexicana (ZTM) (Escalante *et al.*, 2005; Halffter y Morrone, 2017), la FVTM condensa una alta diversidad, resultado del traslape de las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical (Escalante *et al.*, 2005).

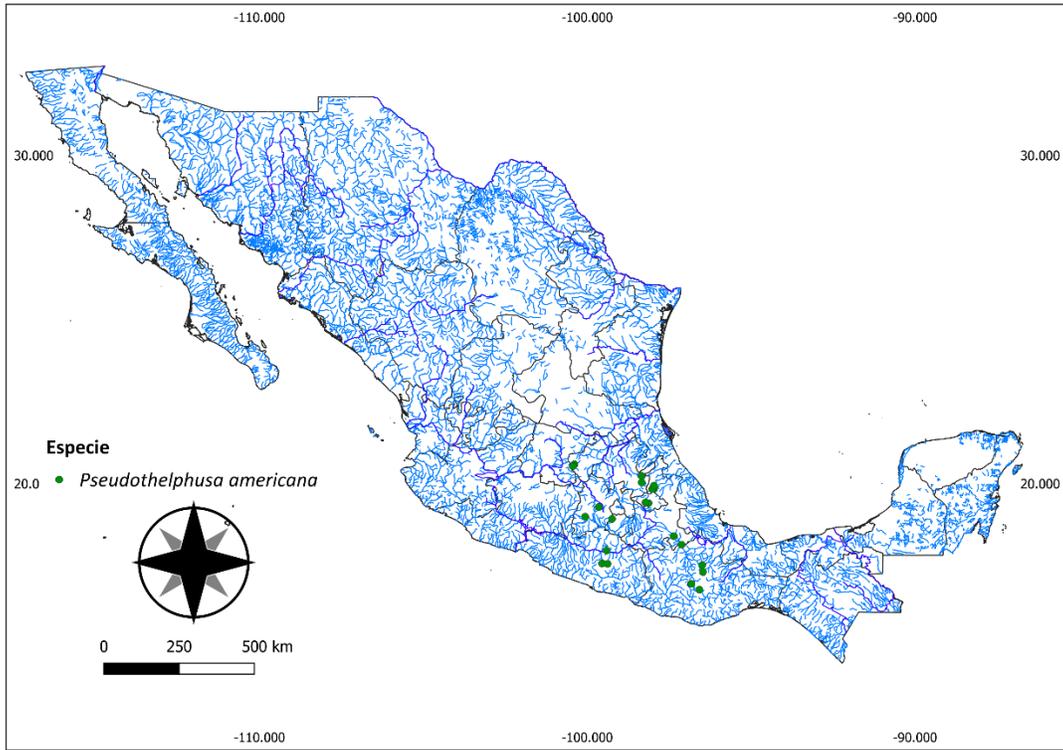


Figura 5. Localidades donde se han recolectado ejemplares identificados bajo el nombre de *P. americana*.

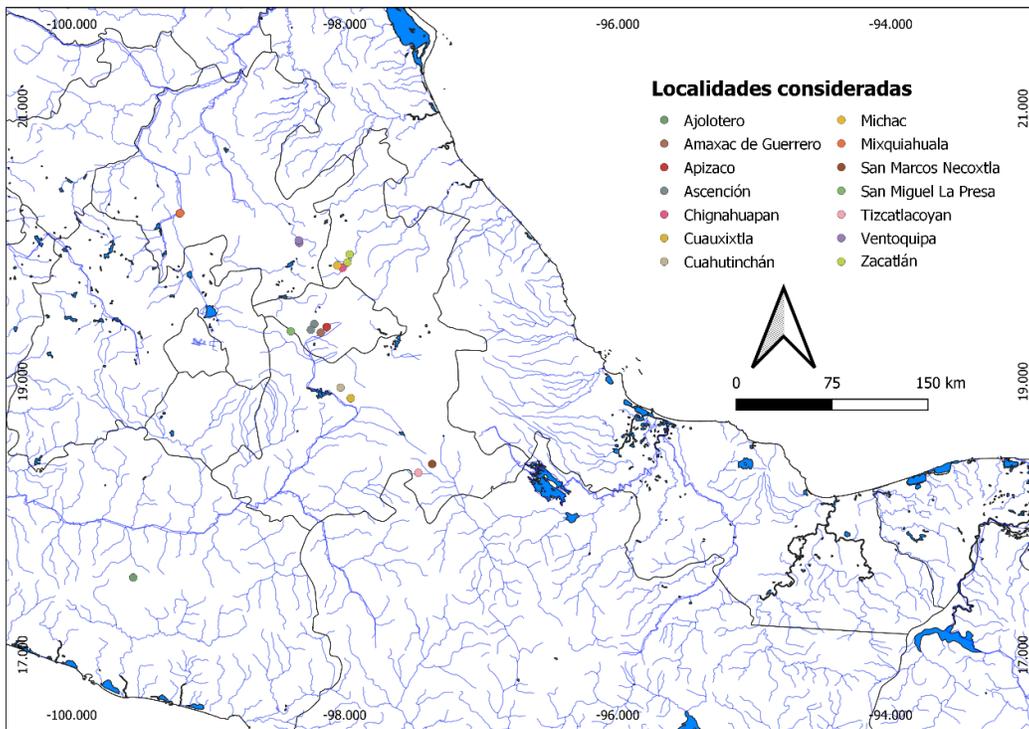


Figura 6. Localidades consideradas como pertenecientes al complejo *P. americana* estudiadas en el presente trabajo.

## Antecedentes

### Antecedentes moleculares

Durante la década del 2010 al 2020, una serie de trabajos han aprovechado el potencial de los análisis multigen para proponer y poner a prueba hipótesis filogenéticas concernientes a las familias primarias de cangrejos dulceacuícolas, por mencionar algunos:

Tsang *et al.* (2014) analizaron seis genes mitocondriales codificantes y dos ribosomales para evaluar la posición de las superfamilias Potamoidea, Pseudothelphusoidea y Trichodactyloidea dentro de todo el infraorden Brachyura. Dicho análisis no logró recuperar la monofilia del grupo primario de familias de agua dulce. Por un lado, las tres familias pertenecientes al viejo mundo -i.e., Potamonautidae, Gecarcinucidae y Potamidae- forman un solo clado con un soporte de ramas considerable -IB (PP  $\geq$  0.95) y MV (B  $\geq$  70)- separado del resto de las familias de cangrejos dulceacuícolas. Por el otro, en los cangrejos del nuevo mundo, la familia Pseudothelphusidae se encontraría más relacionada con la familia Retroplumidae, mientras que la Trichodactylidae con Orithyiidae, no obstante, los soportes de rama para ambos grupos no son óptimos por lo que sus relaciones con los grupos marinos siguen sin ser totalmente claras. Los datos parecen sugerir que Potamoidea y Pseudothelphusoidea *sensu lato* fueron los primeros en divergir dentro del gran grupo de los Heterotremata y su llegada a ambientes dulceacuícolas debió haberse presentado dos veces de manera independiente.

Poettinger *et al.* (2016) ofrecen la primera filogenia molecular de la entonces familia Pseudothelphusidae. Los autores analizaron marcadores mitocondriales como COI, 16S y Enolasa –Eno–, y pudieron reconocer la monofilia de las subfamilias Epilobocerinae, Pseudothelphusinae, así como la de sus respectivas tribus. Además, se planteó la existencia de un nuevo grupo a nivel tribal –Ptychophallini– que incluía a los géneros *Pthychophallus*, *Allocanthos* y *Achlidon*.

Álvarez *et al.* (2020) infieren la filogenia de la superfamilia Pseudothelphusoidea usando dos marcadores mitocondriales –COI y 16S– y uno nuclear –H3–. Sus resultados respaldaron un rearrreglo de las categorías supragenéricas y la denominación de ocho subfamilias, dentro de las cuales tres son nuevas.

Para el caso de estudios a nivel poblacional de cangrejos dulceacuícolas europeos y asiáticos, Jesse *et al.* (2010) realizaron un estudio taxonómico integrativo del complejo de especies *Potamon fluviatile* (Herbst, 1785). El análisis morfológico tanto del primer como del segundo gonópodo no mostró aparente diferencia entre las distintas poblaciones; no obstante, el análisis multigen reveló la formación de dos clados distintos, uno estructurado con individuos provenientes de Peloponeso y otro formado por ejemplares procedentes de Italia y Grecia. Las distancias genéticas entre clados calculadas para COI y NDH1 fueron de 6.8% a 7.4%, permitiéndoles reconocer a *Potamon pleops* Jesse, Schubart y Klaus, 2010, como una especie nueva para la ciencia.

En otro estudio, Fang *et al.* (2015) decidieron evaluar si las redes hídricas asociadas a las montañas Qiling-Daba servirían como barreras que moldearían estructura genético-poblacional de *Sinopotamon acutum* (Dai, 1999). Usaron dos tipos de marcadores, mitocondriales y microsátelites nucleares. Los análisis filogenéticos realizados con el primer set de datos mostraron una clara divergencia entre poblaciones del este y oeste; empero, el análisis elaborado con el segundo set de

datos no la recuperó, sugiriendo un sesgo masculino en la reproducción debido a una mayor migración por parte de los machos a través del sistema hidrológico de la montaña.

En general, los trabajos moleculares dentro de los pseudotelfusoideos han abarcado niveles jerárquicos superiores al genérico. Dentro de los pocos trabajos que lidian con variación genética poblacional y el poder de COI como fuente de información útil para discriminar grupos intraespecíficos, se encuentra el de Moreno-Juárez (2019) con las especies del género *Tehuana*. En este estudio las distancias genéticas interpoblacionales calculadas para COI evidenciaron una variabilidad notablemente baja. Las poblaciones dentro de cada uno de los clados principales revelaron distancias desde 0.1% hasta 2.7%, indicando la divergencia reciente –en términos geológicos– del género.

Como se puede apreciar en este breve recuento, aún queda bastante por explorar. Desde asuntos de gran envergadura, como quién es el grupo hermano marino de los cangrejos dulceacuícolas americanos; hasta otros más sutiles, como el que atañe al presente trabajo

### **Antecedentes morfogeométricos**

En general, el uso de herramientas morfogeométricas ha sido pobremente explotado en el estudio de cangrejos dulceacuícolas, a diferencia de otros grupos de braquiuros, e.g., los pertenecientes al género *Uca* Leach, 1814, en los que la clara alometría que presenta la quela mayor ha sido motivo de varios estudios (e.g., Rosenberg, 2002). Dentro de los pocos trabajos que abordan a los miembros de las familias primarias de agua dulce son:

Torres *et al.* (2014) analizaron la variación intraespecífica del caparazón de dos cangrejos tricodactílicos -*Zilchiopsis collastinensis* (Pretzmann, 1968) y *Trichodactylus borellianus* Nobili, 1896- pertenecientes a varios ríos tributarios en la cuenca del Paraná durante dos épocas bien definidas, cuando las llanuras aluviales presentan aguas ascendentes y descendentes. Los resultados no demostraron diferencia significativa en la forma del caparazón entre las poblaciones de cada una de las especies. Sin embargo, el Análisis de Variables Canónicas mostró que durante la fase de aguas ascendentes -para *Z. collastinensis*- y durante la fase de aguas descendentes -para *T. borellianus*- las poblaciones se estructuraban en un gradiente longitudinal y latitudinal, donde los cangrejos de localidades cercanas eran más parecidos en términos de forma (shape), sugiriendo que la migración de estas dos especies está determinada enteramente por las dinámicas de los sistemas de las llanuras aluviales y la interconectividad de los ríos.

Grinang *et al.* (2019) evaluaron la sensibilidad de las herramientas morfogeométricas para discriminar entre dos especies bien definidas del género *Isolapotamon* Bot, 1968 -*I. consobrinum* (De Man, 1899) e *I. nimboni* Ng, 1987- provenientes de Sarawak en la isla de Borneo. De las tres estructuras que estudiaron -caparazón, pleon y quela mayor-, el Análisis de Componentes Principales permitió segregar a las hembras de ambas especies a través de la variación en la forma (shape) del caparazón. Los autores concluyen que el caparazón podría ser una buena estructura para ser analizada a través de morfometría geométrica.

Únicamente un trabajo ha abordado la variación en estructuras genitales entre poblaciones de algún miembro de Pseudothelphusoidea. Pedraza y Campos (2007) analizaron la variación morfológica del ápice y del proceso mesial del primer gonópodo del macho de *Strengeriana*

*maniformis* Campos y Rodríguez, 1993 usando técnicas de morfometría geométrica. En este trabajo, los análisis indicaron que la variación morfológica que presentaban estas estructuras no estaba relacionada con las localidades de procedencia de los individuos y, por lo tanto, no fue posible segregar geográficamente a las poblaciones.

Este recuento sugiere que la morfometría geométrica podría ser una herramienta de utilidad para diferenciar poblaciones de cangrejos dulceacuícolas, en términos de forma pura (shape).

### **Historia taxonómica de *P. americana***

En esta sección se muestra el recorrido histórico del taxón. Rastreando menciones y sinonimias propuestas por una gran variedad de autores, y basándose en las reconstrucciones de Pretzman (1972), Chace y Hobbs (1969); Rodríguez (1982) y Villalobos-Hirrat (2005), es posible ser testigo de los cambios nomenclaturales que este taxón sufrió a lo largo del tiempo.

En cada caso, se consideró mencionar decisiones importantes que conciernen a su posición en la clasificación dentro de algunas familias de Brachyura Latreille, 1802 como Boscidae Milne-Edwards, 1837, Potamidae Ortmann, 1896 o Pseudothelphusidae Ortmann, 1893 (Tabla 3). Además, se provee una lista de los caracteres que fueron considerados por algunos autores (Tabla 4) e imágenes que representan a la especie (Figs. 7-9).

De Saussure (1857) describió por primera vez el género "*Pseudo-Thelphusa*" para asignar una única especie -*P. americana*- proveniente de Haití. La descripción genérica que el autor provee es muy vaga, pues describe brevemente la forma del caparazón -similar al género *Boscia* Milne-Edwards, 1837- y la forma de las patas -similares a *Thelphusa* Latreille, 1819-, y la región juglar -o región perigostomiana- lisa y tomentosa. Asimismo, la descripción de la especie cuenta nada más con tres puntos: 1) caparazón liso; 2) patas lisas, y 3) regiones branquiales muy dilatadas.

Un año después (1858), el mismo autor la cambió al género *Potamia* Latreille, 1831, argumentando que estaba contribuyendo al aumento desmedido de géneros. De Saussure opinaba que *P. americana* podría quedar fácilmente dentro de una nueva división en *Potamia*, que estaría bajo el epígrafe "*Testa marginibus acutis, haud dentatis*" (margen del caparazón agudo, no dentado) (De Saussure, 1858, p. 436).

Como dato adicional, Smith (1870), reconoció la validez del género *Pseudothelphusa* como miembro de la familia Boscidae, a través de un pequeño recorrido histórico de homonimias con otros grupos de animales (Tabla 2). Él consideró que el nombre *Pseudothelphusa* debería reemplazar al inválido *Boscia* puesto que, según él, eran esencialmente los mismos -ambos carecían de cresta frontal-, además, *Potamia* debería considerarse dentro de este género de acuerdo con la visión de De Saussure.

Pocock (1889) hizo una breve mención de la especie. Sin muchos detalles, da cuenta de los mismos caracteres que De Saussure ofreció en su descripción.

**Tabla 2.** Lista de homonimias observadas por Smith (1870).

Nombre	Autor del taxón/año	Autor de la invalidación	Homonimia con	Autor/año
<i>Potamia</i>	Latreille (1830)	Milne-Edwards (1837)	<i>Potamia</i> (Diptera)	Robineau-Desvoidy (1830)
<i>Boscia</i>	Milne-Edwards (1837)	Agassiz (1846)	<i>Boscia</i> (Crustacea: Cirripedia) <sup>1</sup>	Leach (1813)
		Agassiz (1846)	<i>Boscia</i> (Polipo) <sup>2</sup>	Schweigger (1820)
		Agassiz (1846)	<i>Boscia</i> (Coleoptera: Cebrionites) <sup>3</sup>	Leach (1824)

Datos con superíndice fueron obtenidos del Nomenclator zoologicus de Agassiz (1846).  
<sup>1</sup>Leach Edinb. Encycl. VII, 1813. Dic. Bosc.  
<sup>2</sup>Schweigg. Handb. Nat. Skel. 1820. Dic. Bosc.  
<sup>3</sup>Leach Zool. Journ. I. 1824. Dic. Bosc.

En 1893, Rathbun describió 8 especies nuevas de *Pseudothelphusa* americanos, de entre ellas *P. jouyi* y *P. dugesi* estaban consideradas como cercanamente relacionadas. La autora reconoció que *P. jouyi* y *P. americana* presentan un parecido morfológico, con la única diferencia de que esta última no presentaba una sutura cervical. Esta observación es particularmente interesante, porque no parece notar lo disyuntas que son las localidades de ambas especies -Jalisco y Guanajuato (México) para la primera y "Haití" para la segunda-, y aunque el asunto de las localidades parece estar relativamente resuelto -ver más adelante- la propuesta de Rathbun deja entre ver por primera vez que existían ligeras inconsistencias respecto a esta especie.

En 1897, Ortmann publicó un estudio carcinológico -que posteriormente fue recopilado en la Zoologische Jahrbücher Abtheilung für Systematik, Geographie und Biologie der Thiere de 1898-. En este estudio, destacan varios elementos. 1) La expansión del género *Potamocarcinus* Milne-Edwards, 1853 para incluir a especies de los géneros *Boscia*, *Potamia* y *Pseudothelphusa*, incluida *P. americana*; 2) simplemente por señalar, no reconoció a los miembros de *Pseudothelphusa* como especies sino como formas -"Formen" (Ortmann, 1897, p.317)- que, según él, compartían la ausencia de desarrollo del margen superior; 3) Ortmann decidió cambiar el epíteto específico de *P. americana* a "*americanus*", sin ninguna clase de argumento nomenclatural; y 4) se asumió, también, que *Potamocarcinus dugesi* es la misma que *P. americana* -por razones que se verán en el párrafo siguiente-, por lo que es frecuente citarla dentro de la lista de sinonimias que tuvo la especie (Pretzmann, 1972; Rodríguez, 1982; Villalobos-Hiriart, 2005).

Rathbun (1898) estaba muy consciente de los problemas concernientes a la clasificación y distribución de los pseudotelfúsidos, puesto que muchas conclusiones se habían generado después de la propuesta de Ortmann (1897). En su estudio hizo una comparación exhaustiva de 52 especies que compondrían la revalidada familia Pseudothelphusidae y que estaría formada por cuatro

géneros *-Pseudothelphusa; Potamocarcinus; Epilobocera* Stimpson, 1860 y *Rathbunia* Nobili, 1896-. Para el caso exclusivo de *P. americana*, la autora modificó la sugerencia que hizo en 1893 respecto a su parecido con *P. jouyi*, proponiendo, entonces, una sinonimia entre *P. americana* y *P. dugesi*. Como consecuencia de este cambio taxonómico, su distribución se vio incrementada a las localidades de Cuernavaca, Guanajuato, Amula, Chignahuapan y Oaxaca -con un caso de registro en Cuba-.

En la revisión de los cangrejos de la Guyana británica, las indias occidentales y Bermuda, Young (1900), enlistó 34 especies del género *Pseudothelphusa*. La primera en describirse es *P. americana*. Este autor retomó las características que propone Rathbun (1898) para elaborar su descripción. No hace ninguna otra observación.

Rathbun (1905) publicó una gran revisión sobre cangrejos de agua dulce de la familia Potamonidae. Este trabajo incluyó miembros que se distribuyen tanto en el viejo como en el nuevo mundo, agregando un estudio sistemático de algunas tribus que componían la familia. En la sección de cangrejos distribuidos en América septentrional, mencionó a *P. americana* para los estados de Guanajuato, Puebla, Morelos y Guerrero (México), además de Cuba y Haití -básicamente las mismas localidades propuestas por ella en 1898-. No hace más comentarios adicionales respecto a este taxón.

Coifmann (1939) integró un listado de las especies pertenecientes a la familia Potamonidae que se distribuían en la Guyana Inglesa. En el listado correspondiente al género *Pseudothelphusa*, se encuentra *P. americana*. No hace ningún comentario adicional.

Pretzmann (1965) en su informe preliminar de la familia Pseudothelphusidae (Vorläufiger Bericht über die Familie Pseudothelphusidae) hizo una anotación particularmente interesante. El autor mencionó que la gran variedad de formas que los cangrejos de agua dulce han desarrollado, las estrechas distribuciones que se presentan y la determinación de especies a través de los rasgos del caparazón, de alguna manera han dificultado su reconocimiento taxonómico -además que, según él, "muchas especies [descritas] se basaron en hembras y se desconocen los machos asociados" (Pretzmann, 1965, p. 1)-. Asimismo, indicó que el uso del G1 ha sido el rasgo morfológico más efectivo en cuanto a determinar especies se trata, por lo que procedió a describir, de una manera más bien sucinta, las particularidades de los gonópodos de algunos géneros dentro de la familia, incluyendo a *P. americana*. En este artículo, *P. americana* pasó a formar parte del subgénero *Pseudothelphusa* junto con *P. belliana*, *P. jouyi*, *P. dilatata* entre otras. Sin embargo, no hay un nombramiento claro del taxón subespecífico *Pseudothelphusa (Pseudothelphusa) americana americana*, a pesar de que el mismo autor, en 1972, en la lista de menciones y sinonimia sí indica que lo especificó, mientras que autores como Chace y Hobbs (1969) no lo reconocieron como tal.

Hay algunas cosas notables dentro del trabajo de Bott (1968): 1) el autor, sinonimizó a *Pseudothelphusa (P.) rechingeri* propuesta por Pretzmann (1965) con *P. (P.) americana americana*; 2) revisó a fondo la estructura morfológica de la *P. americana* colectada por De Saussure y otros recolectados en Chilapa, Guerrero, México y concluyó que había una incongruencia con la frecuencia de las colectas de la especie, por un lado, porque esta especie no fue encontrada nunca

más en las localidades reportadas por De Saussure -Haití y Cuba-; por el otro, porque los registros en México aumentaban de manera contrastante. El autor también observó que hay una enorme constancia en las formas del primer gonópodo del macho entre los ejemplares mexicanos y los de Haití, por lo que debería tratarse de la misma especie. Bott (1968) argumentó que la descripción original de *P. americana* se realizó al mismo tiempo que se describía material que provenía de las Antillas, por lo que su localidad tipo debió haberse confundido; y 3) propuso una nueva subespecie *P. (P.) americana doenitzi*, sumando un total de 5 subespecies.

Chace y Hobbs (1969) revisaron los decápodos de las Indias Occidentales con énfasis en República Dominicana. Los autores mantuvieron la idea de que *P. (P.) americana* se distribuía en las Antillas, y debido a que no tenían ejemplares disponibles que provinieran de Cuba, basaron su descripción y representaciones gráficas en un sintipo de *P. dugesi* -supuesto sinónimo de *P. americana*- por lo que recomiendan que su situación taxonómica se tome con precaución.

En sus consideraciones sobre la historia del desarrollo y distribución de los cangrejos de agua dulce que se encontraban en la colección del Museo de Historia Natural de Ginebra, Bott (1970), hizo un seguimiento sistemático de las familias y subfamilias que componían a la superfamilia Pseudothelphusoidea Ortmann, 1893. Para el caso específico de *P. americana*, el autor mantuvo la duda respecto a la verdadera localidad tipo del ejemplar.

Pretzman (1971, 1972) publicó un artículo corto seguido de una revisión mucho más profunda sobre la familia Pseudothelphusidae. Respecto al primero, no hay mucho que rescatar salvo el hecho de la mención de *P. americana americana* y otras tres subespecies y -como nota- algunos errores respecto a los autores originales de los nombres de algunos grupos como Pseudothelphusinae o Potamocarcinini. La segunda publicación es más interesante en cuanto a contenido, e.g.: 1) *Potamocarcinus armatus* Ortmann 1897 apareció como nueva sinonimia en el registro de *P. americana*; 2) declaró que el holotipo se encuentra perdido y 3) respecto a la localidad tipo, tomó en cuenta las consideraciones de Bott (1968, 1970) proponiéndola como una "confusión de fondo".

Rodríguez y Smalley (1972) invalidaron la sinonimia ente *P. americana* y *P. dugesi*. De acuerdo con ellos, hay una serie de situaciones que impedían determinar si la especie descrita por De Saussure (1857) se trata de una *Pseudothelphusa* o no: 1) las descripciones e imágenes que proveyó De Saussure (1857, 1858) eran insuficientes; 2) el ejemplar tipo de la especie estaba perdido; 3) las especies identificadas bajo el nombre de *P. dugesi* que provenían de Haití en verdad correspondían a *Epilbocera haytensis* Rathbun, 1893; y 4) la distribución de un pseudotelfúsido tanto en las Antillas como en México no era natural. Las subespecies *P. (P.) americana belliana* y *P. (P.) americana doenitzi* se consideraron como subespecies de *P. dugesi*.

Rodríguez (1982) realizó una profunda revisión de los cangrejos de agua dulce americanos, con énfasis en la familia Pseudothelphusidae. El autor examinó ejemplares de *P. americana* provenientes de Amula, Oaxaca y Chignahuapan encontrando ligeras diferencias en algunos rasgos morfológicos de estos últimos. Asimismo, discutió la situación concerniente a la localidad y el ejemplar tipo -algunas ya mencionadas en Rodríguez y Smalley (1972)-. 1) según el "Il n'ya pas de

doute que sa description, et spécialement sa figure de l'animal entier [aquellas propuestas por De Saussure (1857, 1858)], correspondent à la forme mexicaine appelé *Pseudothelphusa dugesi* par Rathbun" (Rodríguez, 1982, p. 138) sugiriendo que la especie que describió De Saussure (1857) realmente no era *P. americana* sino *P. dugesi*; y 2) la confusión del etiquetado en los ejemplares ya apuntado por Bott (1970).

En su trabajo nombrado "Aquatic Biota of Mexico, Central America and West Indies", Villalobos-Figueroa (1982), hizo un recorrido taxonómico de los decápodos que se distribuyen en Mesoamérica *sensu* Kirchof (1943). La tribu Pseudothelphusini fue mencionada y en ella, *P. americana*. Las anotaciones que ofreció el autor correspondían a su distribución geográfica, puntualmente a aquellas que ofrece Rathbun (1905) y que retoma Rodríguez (1982).

Villalobos-Hiriart *et al.* (1993) evaluaron la situación del conocimiento que se tenía sobre la carcinofauna cuyo ciclo de vida se desarrollaba total o parcialmente en cuerpos de agua dulce. *P. americana* es mencionada dentro de la tribu Pseudothelphusini. No hay ningún comentario adicional respecto a esta especie.

En el trabajo más reciente en el que se trata la identidad taxonómica del complejo de especies *P. americana*, Villalobos-Hiriart (2005), a través de un análisis histórico del taxón nominal y la revisión de la mayoría de los ejemplares que mencionan otros autores, propuso que la localidad tipo debería ser Chignahuapan, Puebla. Asimismo, la comparación de la ornamentación del primer gonópodo del macho y otras características somáticas, lo llevaron a la detección de 6 formas: 1) *P. aff. a P. americana* (proveniente de Valle de Chilpancingo); 2) *P. americana* fma. Chilapa; 3) *P. americana* fma. Tehuacán; 4) *P. americana* fma. Mixquiahuala; 5) *P. americana* fma. Querétaro; y 6) *P. americana s. str.* (proveniente de Chignahuapan). A pesar de esta rigurosa revisión, el autor sólo ofreció descripción formal de dos formas -Mixquiahuala y Tehuacán-.

Como se demuestra en esta reseña histórica, y como Villalobos-Hiriart (2005) apunta, hay varias razones por las que podemos considerar a *P. americana* como un taxón complicado de tratar: 1) pérdida del ejemplar tipo; 2) descripciones sucintas de caracteres morfológicos; 3) poca importancia otorgada a la estructura morfológica del primer gonópodo del macho antes de 1965; 4) posteriores análisis superfluos respecto al primer gonópodo; 5) incongruencia respecto a la localidad tipo; 6) transmisión sistemática de tales ambigüedades e inconsistencias; 7) falta de un análisis simultáneo de todas las formas distribuidas en el país; 8) toma de decisiones nomenclaturales inconsistentes; 9) el primer ejemplar descrito de *P. americana* probablemente corresponda a *P. dugesi* como apunta Rodríguez (1982)

Villalobos-Hiriart (2005) presentó una revisión exhaustiva de esta especie. Sin embargo, aun parece necesario evaluar la situación interna de *P. americana*, es decir, esclarecer la posición taxonómica de las formas descritas, y si es el caso, su identidad específica.

**Tabla 3.** Posiciones históricas de *P. americana* dentro del infraorden Brachyura (1857 - 2005).

<b>Autor/ Año</b>	<b>Familia</b>	<b>Autor</b>	<b>Género/Subgénero</b>	<b>Autor</b>	<b>Epíteto específico</b>
De Saussure (1857)	Thelphusidae	Dana	<i>Pseudo-Thelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>
De Saussure (1858)	Thelphusidae	Dana	<i>Potamia</i>	Latreille	<i>americana</i>
Smith (1870)	Boscidae	Milne-Edwards	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>
Pocock (1889)	N/E	N/E	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>
Ortmann (1893)	Pseudothelphusinae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	N/E
Rathbun (1893)	Pseudothelphusidae*	Rathbun	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>jouyi</i> <i>dugesi</i>
Ortmann (1897)	Potamonidae	Ortmann	<i>Potamocarcinus</i>	Milne-Edwards (extendido)	<i>americanus</i> <i>dugesi</i>
Rathbun (1898)	Potamonidae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i> <i>dugesi</i>
Young (1900)	Thelphusidae	Dana	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>
Rathbun (1905)	Potamonidae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>
Coifman (1939)	Potamonidae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>
Pretzmann (1965)	Pseudothelphusidae	Rathbun	<i>Pseudothelphusa</i> ( <i>Pseudothelphusa</i> )	De Saussure/De Saussure	<i>americana</i> <i>rechingeri</i>
Bott (1968)	Pseudothelphusidae	N/E	<i>Pseudothelphusa</i> ( <i>Pseudothelphusa</i> )	De Saussure/De Saussure	<i>americana</i> <i>rechingeri</i>
Chace y Hobbs (1999)	Pseudothelphusidae	N/E	<i>Pseudothelphusa</i> ( <i>Pseudothelphusa</i> )	De Saussure/De Saussure	<i>americana</i>

**Tabla 3 (continuación).** Posiciones históricas de *P. americana* dentro del infraorden Brachyura (1857 - 2005).

<b>Autor/ Año</b>	<b>Familia</b>	<b>Autor</b>	<b>Género/Subgénero</b>	<b>Autor</b>	<b>Epíteto específico</b>
Bott (1970)	Pseudothelphusidae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i> ( <i>Pseudothelphusa</i> )	De Saussure/De Saussure	<i>americana americana</i>  <i>americana</i> <i>lamellifrons</i> <i>americana jouyi</i>
Pretzmann (1971)	Pseudothelphusidae	Rathbun	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana americana</i> <i>americana jouyi</i> <i>americana</i> <i>septentrionalis</i> <i>americana belliana</i>
Pretzmann (1972)	Pseudothelphusidae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i> ( <i>Pseudothelphusa</i> )	De Saussure/De Saussure	<i>americana americana</i>  <i>americana joyi</i> <i>americana</i> <i>septentrionalis</i> <i>americana belliana</i>
Rodríguez y Smalley (1972)	Pseudothelphusidae	N/E	<i>Pseudothelphusa</i> ( <i>Pseudothelphusa</i> )	Milne- Edwards/Milne- Edwards**	<i>americana ≠ dugesi</i>
Rodríguez (1982)	Pseudothelphusidae	Rathbun	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>
Villalobos (1982)	Pseudothelphusidae	N/E	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>
Villalobos-Hiriart (1993)	Pseudothelphusidae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>

**Tabla 3 (continuación).** Posiciones históricas de *P. americana* dentro del infraorden Brachyura (1857 - 2005).

Autor/ Año	Familia	Autor	Género/Subgénero	Autor	Epíteto específico
Villalobos-Hiriart (2005)	Pseudothelphusidae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i> aff. a <i>P. americana</i> <i>americana</i> fma. Chilapa <i>americana</i> fma. Tehuacán <i>americana</i> fma. Querétaro <i>americana sensu stricto</i> (Chignahuapan)
Álvarez <i>et al.</i> (2020)	Pseudothelphusidae	Ortmann	<i>Pseudothelphusa</i>	De Saussure	<i>americana</i>

\*Nótese el autor del taxón nominal Pseudothelphusidae tradicionalmente se ha adjudicado a Ortmann (1893). Sin embargo, en aquella publicación, no se hace referencia esa categoría particular-pero sí al nivel de subfamilia-; mientras que Rathbun (1893) hace mención del taxón nominal y no asigna autoría a alguien más. Autores como Pretzmann (1965, 1971) y Rodríguez (1982) asignan autoría de la familia a Rathbun; otros como Bott (1968), Chace y Hobbs (1969), Rodríguez y Smalley (1972) y Villalobos-Figueroa (1982) no asignan autoría a nadie; pero los demás, se la asignan a Ortmann (ver. Bott, 1970; Pretzmann, 1972; Villalobos-Hirirat *et al.*, 1993; Villalobos-Hiriart, 2005). En virtud de los artículos 11.7 y 36.1 del CINZ (2000), la autoría debe reconocerse a Ortmann (1893).

\*\*Rodríguez y Smalley (1972) asignan incorrectamente la autoría del género y subgénero *Pseudothelphusa* (*P.*) a Milne-Edwards. Sin embargo, citan el año correcto (1857) correspondiente a la publicación de De Saussure (1857)

N/E = No especificado.

**Tabla 4.** Caracteres usados históricamente en las descripciones de *P. americana* y algunas especies afines.

<b>Autor</b>	<b>Caparazón</b>	<b>Patas</b>	<b>Artejos</b>
De Saussure (1857)	Liso	Lisas	Tercer artejo de la patas subtriangular.
De Saussure (1858)	Muy amplio. Sin dientes, plano, liso. Bordes laterales muy afilados, finamente granulados.	Lisas, sin crestas ni surcos. Quelas lisas, dedos arqueados, finamente punteados. Brazos (Mero) con borde interno finamente denticulado.	Primera espina de la 5ta fila bifurcada. Tercer artejo de las patas presenta un gránulo proximal.
Pocock (1889)	Sin cresta frontal. Márgenes sin dentículos	N/E	N/E
Rathbun (1893)	Convexo, punteado, más amplio en machos, sin rastro de cresta frontal. Márgenes anterolaterales finamente denticulados, dentículos incipientes en machos adultos. Surco cervical corto y curvado, a veces continua hasta el margen anterolateral.	Quela mayor del macho mucho más ancha, dactilos muy abiertos, quela menor con márgenes subparalelos, dactilos cercanos. Patas ambulatorias poco comprimidas, con espinas incipientes en adultos.	Quelípedos desiguales. Mero con espinas cortas en el margen interno. Carpo con un surco longitudinal amplio, una espina interna gruesa.
Rathbun (1893)	Frente sinuosa y ligeramente bilobulada, márgenes casi rectos.	N/E	Patas con el mero ligeramente dilatadas en porción media.
Ortmann (1897)	Sin desarrollo de un margen frontal superior.	N/E	N/E

**Tabla 4 (continuación).** Caracteres usados históricamente en las descripciones de *P. americana*.

Autor	Caparazón	Patas	Artejos
Rathbun (1898)	Frente sin margen superior o línea marginal. Margen inferior de la frente redondeado, convexo, punteado. Dientes laterales presentes, aunque indistintos.	Patas ambulatorias no son esbeltas	Margen externo del mero del maxilípodo convexo y gradualmente curvado hacia el margen anterior.
Young (1900)	Margen frontal fuertemente redondeado y convexo. Dientes laterales presentes, aunque Indistinguibles.	Patas ambulatorias no son esbeltas	N/E
Pretzmann (1965)	N/E	N/E	N/E
Chace y Hobbs (1969)	No muy convexo longitudinal ni transversalmente. Surco cervical distintivo cóncavo anteriormente. Margen anterolateral denticulado. Muesca poco profunda cerca del ángulo orbital externo. Frente no delimitada por cresta transversal.	N/E	Tercer maxilípodo con mero estrechándose distalmente. Exópodo largo. Pereiópodos esbeltos, pero no inusualmente largos. Quelas sin protuberancias en la superficie externa, cerca de los dedos. Primer pleópodo sin espinas distales.
Rodríguez (1982)	Margen anterolateral sin muesca cerca del ángulo orbital externo. Frente sin borde superior definido. Caparazón regularmente curvado hacia el borde frontal inferior.	N/E	Exognato del tercer maxilípodo igual a tres cuartos de la longitud del isquio. Quelípedos fuertemente desiguales. Huevo interdigital importante.

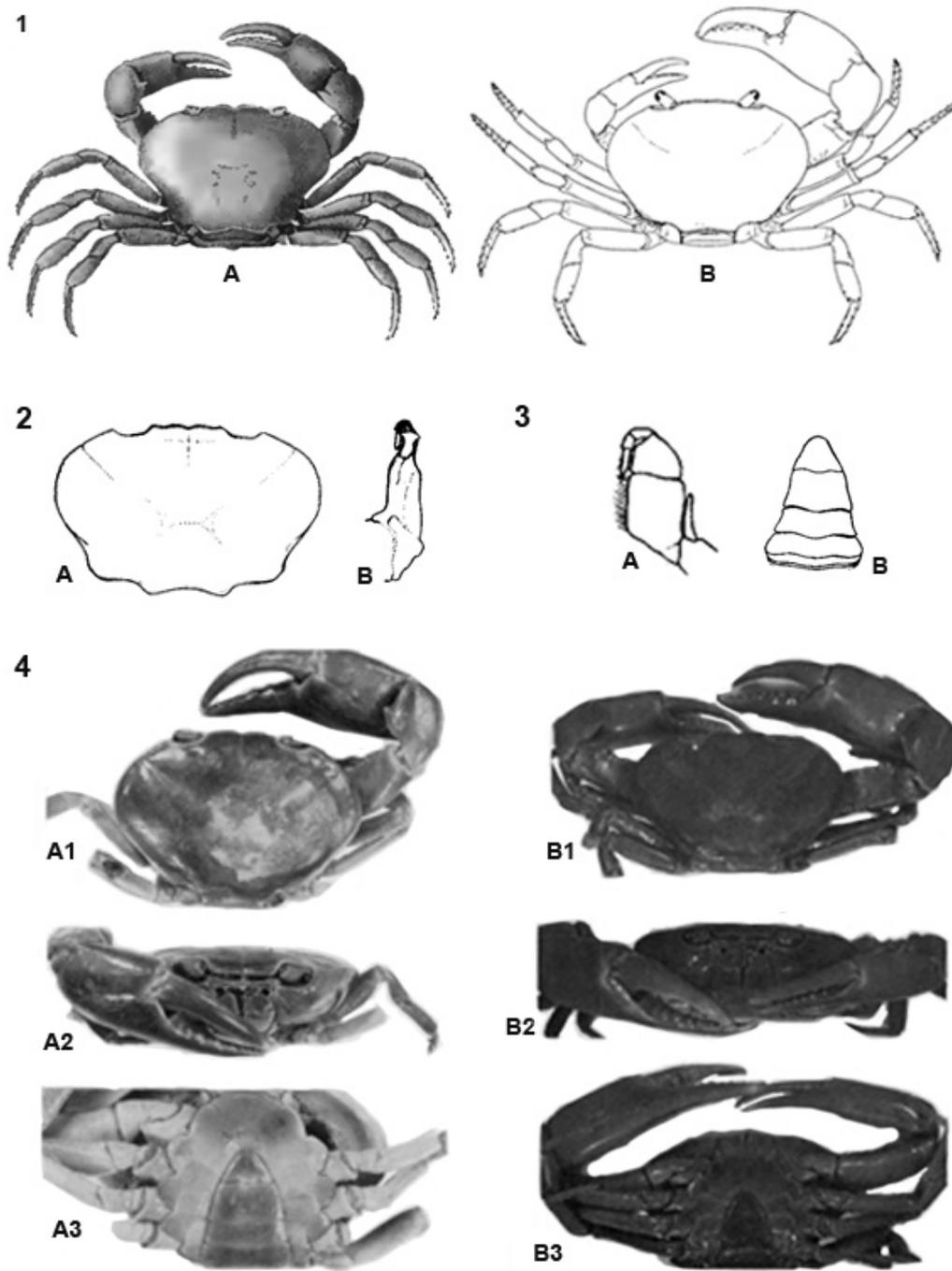
**Tabla 4 (continuación).** Caracteres usados históricamente en las descripciones de *P. americana*.

<b>Autor</b>	<b>Gonópodo</b>	<b>Medidas (Macho)</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Observaciones</b>
De Saussure (1857)	N/E	N/E	Haití	N/E
De Saussure (1858)	N/E	Long. cap. = 0.022 m Ancho cap. = 0.034 m Frente = 0.009 m Esp. Interorbital = 0.0195 m	Haití	Lo ancho de la frente equivale a un poco menos del espacio comprendido entre la parte media de la frente y el ángulo orbital externo y el doble de esta medida no equivale ni a dos tercios de la anchura del caparazón.
Pocock (1889)	N/E	N/E	N/E	N/E
Rathbun (1893)	N/E	Long. = 27 mm Ancho. = 43.5 mm Long. Quelip grand. = 86 mm	Lago Chapala (México) Janacatlán (México) Valle Santiago (México)	Descripción de <i>P. juyi</i> . Esta especie tiene un enorme parecido a <i>P. americana</i> , pero esta última no presenta una sutura cervical.
Rathbun (1893)	N/E	Long. 21 mm Ancho. 33 mm Long. Quelip grand. = 53 mm	Cuernavaca (México) Guanajuato (México)	Descripción de <i>P. dugesi</i> . Esta especie esta tan cercanamente relacionada con <i>P. juyi</i> que ambas podrían llegar a confundirse. Posterior sinónimo de <i>P. americana</i> .
Ortmann (1897)	N/E	N/E	N/E	N/E
Rathbun (1898)	N/E	N/E	N/E	<i>P. americana</i> = <i>P. dugesi</i>
Young (1900)	N/E	N/E	Haití, México, Cuba	N/E

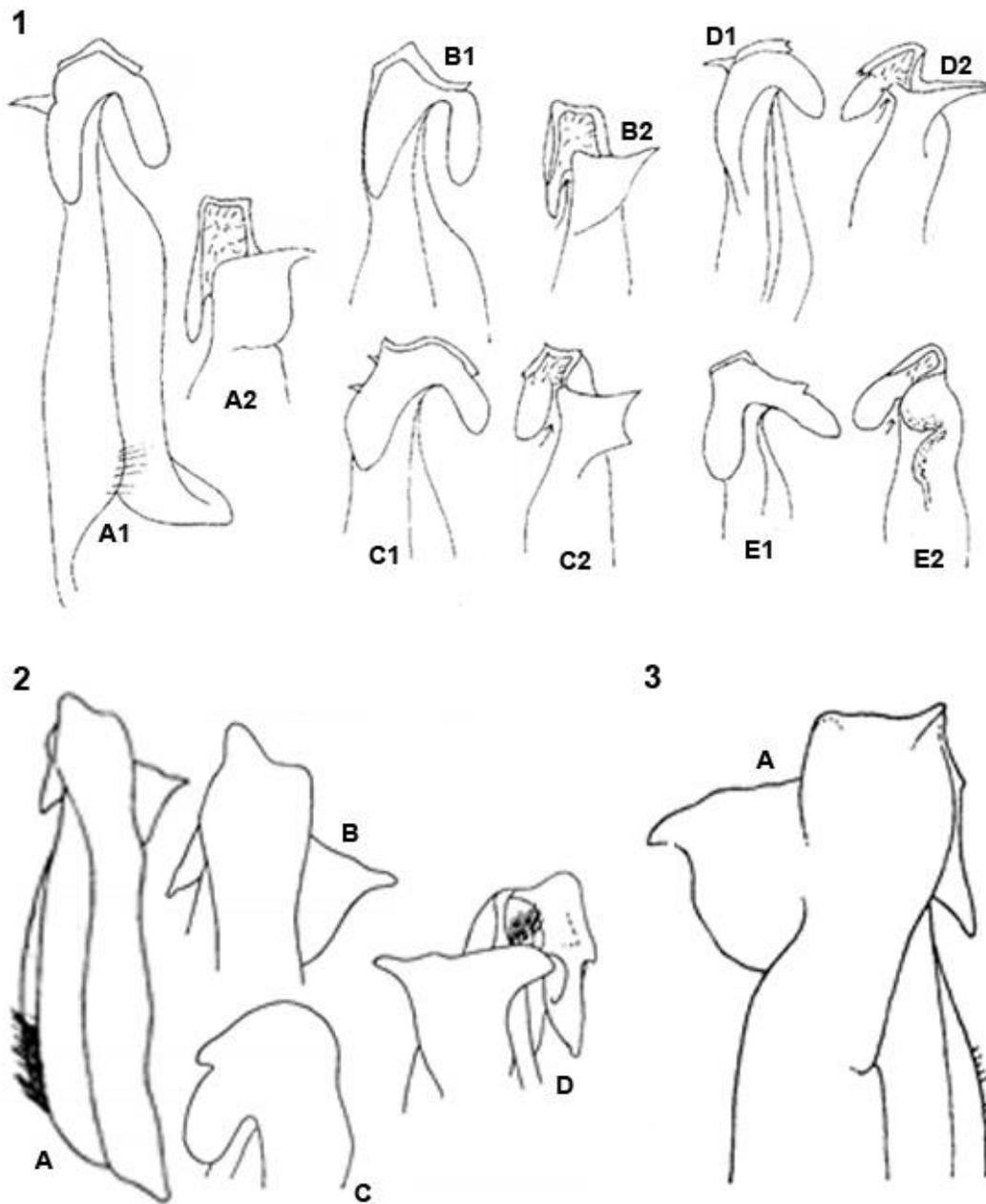
**Tabla 4 (continuación).** Caracteres usados históricamente en las descripciones de *P. americana*.

Autor	Gonópodo	Medidas (Macho)	Procedencia	Observaciones
Pretzmann (1965)	Rectos. Parte apical ligeramente torcida, su borde termina en dos lóbulos que se dirigen lateral y cefálicamente.	N/E	N/E	N/E
Chace y Hobbs (1969)	N/E	Long. Max. = 30 mm	Centro y Suroeste de México Cuba, Hispaniola	Descripción realizada con un sintipo de <i>P. dugesi</i> .
Rodríguez (1982)	N/E	Long. = 23.3-38.5 Ancho. = 16-29.03	Chignahuapan (México) Amula (México) Oaxaca (México)	Los especímenes revisados de Chignahuapan presentan un "gancho, cebo""amorcer" en la cresta superior. El borde frontal inferior es horizontal o ligeramente cóncavo, deprimido en medio, bilobulado en vista dorsal.

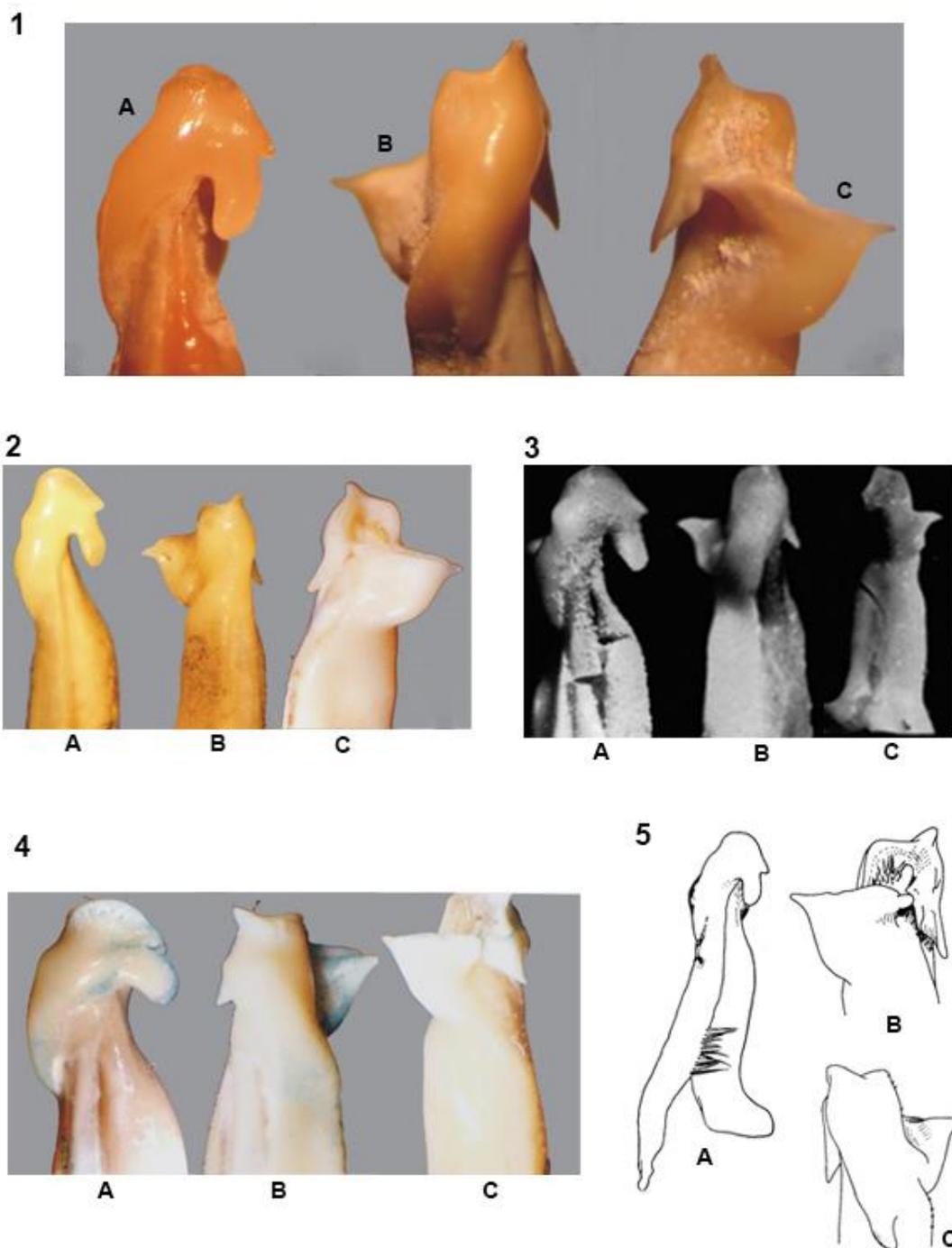
*N/E= No especificado*



**Figura 7.** Plan corporal de algunos ejemplares de *P. americana* y especies afines. 1. Dibujos representativos de *P. americana*: (A) *P. americana*, tomado de De Saussure (1858); (B) *P. (P.) americana* basado en un sintipo de *P. dugesi*, tomado de Chace y Hobbs (1972). 2. Dibujos representativos de *P. jouyi*, tomados de Rathbun (1893): (A) Caparazón. (B) Primer gonópodo del macho. 3. Dibujos representativos de *P. dugesi*, tomados de Rathbun (1893): (A) Tercer maxilípodo (B) Abdomen. 4. Fotografías de *P. (P.) americana americana* y *P. (P.) americana jouyi*, tomadas de Pretzmann (1972): (A) *P. (P.) americana americana*. (A1) Vista dorsal. (A2) Vista frontal (A3) Vista ventral. (B) *P. (P.) americana jouyi*. (B1) Vista dorsal; (B2) Vista frontal; (B3) vista ventral.



**Figura 8.** Primer gonópodo de *P. americana*, subespecies y especies afines. 1. Representaciones de la vista mesial y la cavidad del ápice de la vista cefálica de varias subespecies de *P. (P.) americana*, tomadas de Bott (1968): (A) *P. (P.) americana americana* de Xochitempa, Chilapa, Guerrero, (A1) Vista mesial; (A2) Cavidad del ápice de la vista cefálica. (B) *P. (P.) americana terrestris* del Cerro San Juan, Tepic, (B1) Vista mesial; (B2) Cavidad del ápice de la vista cefálica. (C) *P. (P.) americana dugueti* de Chapala, Jalisco, (C1) Vista mesial; (C2) Cavidad del ápice de la vista cefálica. (D) *P. (P.) americana doenitzi* de Jalpan, (D1) Vista mesial; (D2) Cavidad distal del ápice de la vista cefálica. (E) *P. (P.) americana jouyi*, (E1) Vista mesial; (E2) Cavidad del ápice de la vista cefálica. 2. Gonópodo izquierdo de un ejemplar de *P. (P.) dugesi dugesi* proveniente de Chignahuapan, Puebla, tomado de Rodríguez y Smalley (1972): (A) Vista caudal. (B) Ápice caudal. (C) Vista mesial. (D) Vista cefálica. 3. Porción terminal del gonópodo en vista posterior de *P. (P.) americana* de Cuernavaca, Morelos, tomado del sintipo de *Pseudothelphusa (P.) dugesi* por Chace y Hobbs (1969).



**Figura 9.** Fotografías y representaciones esquemáticas del primer gónopodo de *P. americana* y algunas formas descritas. 1. *P. americana*, de Chignahuapan, Puebla, tomada de Villalobos-Hiriart (2005): (A) Vista mesial; (B) Vista caudal; (C) Vista cefálica. 2. *P. americana* fma. Mixquiahuala, proveniente de Hidalgo, tomada de Villalobos-Hiriart (2005): (A) Vista mesial; (B) Vista caudal; (C) Vista cefálica. 3. *P. (P.) americana americana*, ejemplar original del Museo de Historia Natural de Ginebra, proveniente de Cuba, tomada de Bott (1970): (A) Vista mesial; (B) Vista caudal; (C) Vista cefálica. 4. *P. americana* fma. Tehuacán, proveniente de Puebla, tomada de Villalobos-Hiriart (2005): (A) Vista mesial; (B) Vista caudal; (C) Vista cefálica. 5. *P. americana*, de Chignahuapan, Puebla, tomada de Rodríguez (1982): (A) Vista mesial; (B) Vista cefálica; (C) Vista caudal.

## Metodología

### Revisión del acervo de la CNCR

Es bien sabido que los ejemplares conservados por largo tiempo en colecciones biológicas pueden presentar dificultades durante la obtención de datos moleculares (Van Houdt *et al.*, 2010; Zuccon *et al.*, 2012; Puillandre *et al.*, 2012), principalmente, debido a que los métodos de conservación tradicionales no suelen mantener la integridad de los tejidos y células. Por tal motivo, primero se procedió a realizar una búsqueda de lotes determinados como *P. americana* en el acervo de la Colección Nacional de Crustáceos -CNCR-. para examinar la antigüedad de los ejemplares almacenados y las localidades representadas (Tabla 5).

### Obtención de ejemplares

Una vez revisado el acervo de la CNCR, se procedió a la realizar muestreos en aquellos lugares donde se requería reforzar o renovar el material, con el fin de asegurar tejido fresco para la posterior extracción y amplificación de DNA.

En total se muestrearon 10 localidades (Figs. 11-12) pertenecientes a tres estados de la República Mexicana (Tabla 6). En cada una de ellas se recolectaron cinco ejemplares. Se priorizó la obtención de machos adultos, pues la identificación taxonómica gira en torno a la morfología del G1 (Villalobos-Hiriart, 2005). Posterior a la recolecta, se procedió a la disección *ipso facto* de uno de los apéndices locomotores de cada uno de los individuos, se cortó longitudinalmente a través del tegumento que lo recubre, con el fin de que el etanol penetrara a los tejidos y los mantuviera lo más conservados posible. Tanto el ejemplar como el apéndice se almacenaron en etanol al 70% en frascos independientes y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la llegada al laboratorio (Moreno-Juárez, 2019) donde el tejido se almacenó a una temperatura de 2 °C.

Las etiquetas asignadas a cada lote incluyen datos de importancia taxonómica tales como localidad, coordenadas, metros sobre nivel de mar y nombre de los colectores. Una vez en la CNCR, fueron ingresados a su catálogo y a su acervo.

### Análisis molecular

#### Extracción e integridad del material genético

El DNA se obtuvo siguiendo el protocolo del kit de extracción de DNA de Jena Bioscience® para tejidos de Animales y Hongos; debido a que es un sistema con base en soluciones, tiene la virtud de minimizar el problema de la fragmentación de los ácidos nucleicos. Se transfirieron aproximadamente de 5 -10 mg de tejido -músculo de la pata para el caso de ejemplares recientes o branquias para ejemplares de colección- previamente conservado en alcohol al 70% a un tubo de 1.5 ml; se agregaron 300 µl de buffer de lisis y 1.5 µl de Proteinasa K y se incubó a 56 °C toda la noche. Para el caso de las branquias, el tejido fue previamente homogeneizado (Alejos *et al.*, 2014) con ayuda de una pipeta de 1 ml; posteriormente se agregaron 100 µl de buffer de precipitación de proteínas, se realizó un vórtex por 20 segundos y se centrifugó por tres minutos. a 15,000 g; el sobrenadante se transfirió a otro tubo de 1.5 ml al que previamente se le agregó isopropanol

almacenado en frío para maximizar la floculación de los ácidos nucleicos, y se volvió a centrifugar por un minuto a 15,000 g; se decantó el isopropanol, se agregaron 500  $\mu$ l de buffer de lavado y se centrifugó por última vez durante un minuto a 15,000 g; se descartó el buffer y se agregaron 50  $\mu$ l de buffer de hidratación.

El rendimiento de la extracción fue certificado usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Fisher Scientific para obtener tanto la concentración en ng/ $\mu$ l, como la pureza (Alejos *et al.*, 2014). En caso de que la concentración de ácidos nucleicos fuese > 500 ng/ $\mu$ l, se realizaron diluciones 1:10. La integridad del DNA extraído se evaluó por medio de ensayos de electroforesis con gel de agarosa al 0.1% (Fierro *et al.*, 2014).



**Figura 10.** Localidades muestreadas I. A1-2) San Miguel la Presa, Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, Tlaxcala. B 1-3) Manantial Palo Huérfino, Amaxac de Guerrero, Tlaxcala.



**Figura 11.** Localidades muestreadas II. (A) Tlaxco, Tlaxcala, México. (B) Río hacia las cascadas de Quetzalapa, Zacatlán, Puebla, México. (C) Manantial "El Ojito", Apizaco, Tlaxcala, México.



**Figura 12.** Localidades muestreadas III. (A) Hacienda en Michac, Puebla, México. (B) Manantial en Ventoquipa, Hidalgo, México. (C) Balneario Baño Grande, Mixquiahuala, Hidalgo, México.

**Tabla 5.** Lotes obtenidos de la CNCR.

<b>Nombre científico ID de la CNCR</b>	<b>Estado Localidad</b>	<b>Fecha de colecta</b>	<b>Latitud (DMS)</b>	<b>Longitud (DMS)</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
<i>P. aff mexicana</i> . CNCR 12559	Edo. Méx. Río Sn Fco.	22/VII/1991	19°17'0.00"N	99°39'0.00"W	2,667
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 27392	Méx. Pque Río Chilero.	07/VIII/2012	18°59'21.48"N	100°03'50.58"W	1,724
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 29076	Gro. A. Tecuziapa.	26/I/2001	17°33'57.24"N	99°33'01.14"W	1,565
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 29077	Gro. R Ajolotero.	09/VI/2000	17°33'10.87"N	99°22'44.92"W	1,577
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 24097	Gro. Tecuxiapan.	N/E	17°57'38.00"N*	99°24'45.00"W*	509*
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 340	Hgo. Ventoquipa.	16/IV/1967	20°01'55.37"N*	98°20'22.73"W*	2,225*
<i>P. americana</i> CNCR 12925	Hgo. Mixquiahuala.	10/VII/1994	20°13'49.46"N*	98°20'22.73"W*	2,000
<i>Pseudothelphusa</i> sp. N/E	Hgo Mixquiahuala.	15/I/2001	20°13'49.46"N*	98°20'22.73"W*	2,000
<i>P. dugesi</i> CNCR 24688	Mor. Bca. Tlaltenango.	20/XI/1999	18°55'21.16"N*	99°14'38.94"W*	1,506
<i>Pseudothelphusa</i> sp CNCR 26108	Pue. Tizcatlacoyan	N/E	18°08'10.26"N*	97°07'16.18"W*	822
<i>P. americana</i> CNCR 25527	Pue. Casc. Quetzalapa	N/E	19°55'53.00"N	97°57'53.00"W	2,020
<i>P. americana</i> CNCR 355	Pue. Chignahuapan.	-/V/1944	19°50'01.87"N	98°00'58.88"W	2,290
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 13409	Pue. R. Sn Isidro.	18/VII/1991	19°56'06.29"N*	97°57'40.15"W*	2,050
<i>P. americana</i> CNCR 342	Qro. Qro.	N/E	20°35'19.66"N*	100°23'23.60"W*	1,846
<i>P. jouyi</i> CNCR 12919	Qro. R. Batán.	7/II/94	20°32'19.69"N*	100°26'21.69"W*	1,818
<i>P. jouyi</i> CNCR 27781	Qro. R. del Pueblito.	14/IV/2012	20°31'50.20"N*	100°26'17.57"W*	1,822

**Tabla 5 (continuación).** Lotes obtenidos de la CNCR.

<b>Nombre científico ID de la CNCR</b>	<b>Estado Localidad</b>	<b>Fecha de colecta</b>	<b>Latitud (DMS)</b>	<b>Longitud (DMS)</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
<i>P. americana</i> CNCR 10460	Tlx. Mtial. en Apizaco.	02/XII/1987	19°24'01.20"N	98°07'53.55"W	2,421
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 33848	Tlx. La Ascensión.	12/I/1997	19°25'18.52"N*	98°13'26.22"W*	2,515
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 8799	Fco. 2-O	N/E	N/E	N/E	N/E
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 33880	Mtial El Rincón (balneario).	N/E	N/E	N/E	N/E
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 22682	Pue. San Marcos Necoxtla.	6/V/1995	18°23'48.00"N*	97°21'36.00"W*	1,430

N/E = No especificado en la etiqueta del ejemplar.  
 \*= Datos no especificados pero corroborados basándose en la localidad mencionada en la etiqueta, puede no corresponder enteramente a las localidades verdaderas.

**Tabla 6.** Ejemplares recolectados en campo utilizados para la amplificación de genes.

<b>Nombre científico ID de la CNCR</b>	<b>Estado Localidad</b>	<b>Fecha de colecta</b>	<b>Latitud (DMS)</b>	<b>Longitud (DMS)</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 36158	Tlx. Mtial El Ojito	10/XI/2021	19°24'01.20"N	98°07'53.55"O	2,421
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 35901	Tlx. Sn Miguel la Presa	9/V/2021	19°22'06.87"N	98°23'42.16"O	2,347
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 35902	Tlx. Mtial. Palo Huerfano	25/V/2021	19°21'32.53"N	98°10'35.93"O	2,267
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 36508	Tlx. Ascensión	15/IV/2022	19°22'44"N	98°14'55.25"O	2,339
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 36154	Pue. Casc. Quetzalapa	11/XI/2021	19°52'18.70"N	97°58'53.89"O	
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 36157	Pue. Mtial en Michac	12/XI/2021	19°51'03"N	98°03'13"O	2,290
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 36550	Pue. Cuahutinchán	29/V/2022	18°57'23"N	98°01'53"O	2,210
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 36592	Pue. Sn Marcos Necoxtla	31/VII/2022	18°24'37.44"N	97°22'5.16"O	1,452
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 36156	Hgo. Mtial en Ventoquipa	12/XI/2021	20°02'04"N	98°20'16"O	2,200
<i>Pseudothelphusa</i> sp. CNCR 36155	Hgo. Mixquiahuala	13/XI/2021	20°14'04"N	99°12'19"O	1,900

## Amplificación de secuencias de DNA

Se seleccionaron dos genes mitocondriales –COI y 16S– y uno nuclear –H3–, pues se ha demostrado que los análisis multigen con dichos marcadores son sumamente confiables y sensibles para el grupo de cangrejos dulceacuícolas (Jesse *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2015; Ojeda-Escoto, 2017; Moreno-Juárez, 2019; Álvarez *et al.*, 2020). Los primers usados para la amplificación de genes mitocondriales y el gen nuclear fueron aquellos usados los trabajos previamente mencionados (Tabla 7). Los perfiles de temperatura y tiempo del termociclador se optimizaron para el grupo de estudio (Tabla 8). La reacción PCR se realizó usando el kit MyTaq siguiendo a Moreno-Juárez (2019) (Tabla 9).

**Tabla 7.** Primers utilizados en la amplificación.

Gen	Oligo	Secuencia nucleotídica	T <sub>m</sub>	Autor	Longitud (pb)
COI	dhLCO	5'-GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG-3'	49 °C	Meyer <i>et al.</i> , (2005)	~635
	dgHCO	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAARAAYCA-3'			
16S	16sar	5'-CGCCTGTTTACTAAAAACAT-3'	49 °C	Palumbi y Benzie, (1991)	~529
	16Sbr	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'			
H3	AF	5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3'	50 °C	Colgan <i>et al.</i> , (1998)	~350
	AR	5'-ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3'			

**Tabla 8.** Perfiles establecidos para la PCR.

Perfil COI		Perfil 16S		Perfil H3	
No. Ciclos	Temp./Tiempo	No. Ciclos	Temp./Tiempo	No. Ciclos	Temp./Tiempo
x1	95 °C – 10 min.	x1	95 °C – 10 min.	x1	95 °C – 10 min.
	95 °C -1 min.		95 °C -1 min.		95 °C -1 min.
x35	43.6/50 °C – 30 s	x35	49 °C – 30 s	x35	50 °C – 30 s
	72 °C – 30 s.		72 °C – 30 s.		72 °C – 30 s.
X1	72 °C – 10 min.	X1	72 °C – 10 min.	X1	72 °C – 10 min.

**Tabla 9.** Volumen total y constitución de 1 reacción PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen
ddH <sub>2</sub> O	-	9.9 µl
BSA	4%	0.6 µl
Buffer	5x	3 µl
	dNTPs 15 mM MgCl <sub>2</sub> 5mM	
Taq Polimerasa	-	0.1 µl
Primers	10x	0.2 µl (Forward/Reverse)
DNA		1 µl
<b>Volumen total</b>		<b>15 µl</b>

## Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del IBUNAM del Laboratorio Nacional de la Biodiversidad, por medio del método Sanger en un DNA 3500xL, “Genetic Analyzer de Applied Biosystems®”. Secuencias adicionales para en análisis se obtuvieron directamente del GeneBank (Tabla 10).

## Alineamiento de las secuencias

Para asegurarse de que las secuencias obtenidas correspondían a un cangrejo dulceacuícola y descartar contaminación con DNA, se sometieron a un Alineamiento Básico Local usando la herramienta BLAST versión 2.13.0. Posteriormente se visualizaron con el programa FinchTv versión 1.4.0 para confirmar la calidad de las lecturas. Las secuencias conceso se construyeron con ayuda del programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) versión 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016).

**Tabla 10.** Especies adicionales usadas para el análisis.

Especie	No. Catálogo	Localidad	No. de acceso GeneBank		
			COI	16S	H3
<i>Pseudothelphusa americana</i> De Saussure, 1857	CNCR 25527	Quetzalapa, Pue.	MT852944	MT871966	MT860376
<i>Pseudothelphusa belliana</i> Rathbun, 1898	CNCR 19228	Chautipan, Gro.	MT852945	MT871967	MT860377
<i>Disparithelphusa pecki</i> Smalley y Adkinson, 1984	CNCR 16776	Carretera Tuxtepec- Oaxaca, Oax.	MT852942	MT871965	MT860374
<i>Tehuana chontalpaensis</i> Villalobos y Álvarez, 2003	CNCT 25445	Arroyo Río Frío, Chis.	MT852948	MT871970	MT860380
<i>Tehuana diabolis</i> (Pretzmann, 1978)	CNCR 12956	Lago de Catemaco, Ver.	MT852949	MT871971	MT890381
<i>Raddaus mertensi</i> (Bott, 1956)	*INPA 1964	San Pedro Sula, Hnd.	MT852047	MT871954	MT860364
<i>Raddaus bocourti</i> (A. Milne-Edwards, 1866)	CNCR 25488	Camino a San Isidro, Chis.	MT852046	MT871953	MT860363

\*INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

El alineamiento se realizó usando el servicio en línea de Alineamiento de Múltiples Secuencias MAFFT (Kato *et al.*, 2019) siguiendo las opciones por default y usando el algoritmo de refinamiento iterativo L-INS-i (Kato *et al.*, 2005). La concatenación y corroboración del marco de lectura se realizaron en programa Mesquite versión 3.61 (Maddison y Maddison, 2019).

### Particiones y selección de modelos de evolución molecular

Para dar cuenta de la variación existente entre sitios (Yang, 1996), se optó, en primer lugar, por buscar el mejor esquema de partición (Lanfear *et al.*, 2012) usando el programa PartitionFinder2 (Lanfear *et al.*, 2017). Tanto el archivo .phy como el .cfg se exportaron directamente de Mesquite versión 3.61 (Maddison y Maddison, 2019). Se establecieron tres data blocks *a priori*: aquellos correspondientes a los genes codificantes de proteínas -i.e., COI y H3- se separaron por codones; mientras que el gen codificante para RNA ribosomal -i.e., 16S- se mantuvo íntegro. La selección del modelo fue a través del Criterio de Información de Akaike corregido (AIC<sub>c</sub>) (Hurvich y Tsai, 1989), con la opción de búsqueda usando el algoritmo greedy (Lanfear *et al.*, 2017). Una vez corroboradas las particiones, las secuencias de los genes codificantes de proteínas se importaron a PAUP versión 4 (Swofford, 2003) para separarlas por sitios e importarlas al programa JModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012; Guindon y Gascuel, 2003), donde se realizó la selección del modelo usando las opciones default. Una vez obtenidos los resultados, se compararon los modelos ofrecidos por PartitionFinder2 y JModelTes2 (Tabla 11).

El motivo de la selección de modelos es identificar aquellos lo suficientemente complejos para dar cuenta de los eventos mutacionales que las secuencias han sufrido, evitando a toda costa la sobreparametrización (Lanfear *et al.*, 2012; Sullivan y Joyce, 2005). Al contar con seis parámetros, el modelo GTR es uno de los más complejos actualmente (consultar el archivo “models.cvs” en la paquetería de PartitionFinder2 para más información sobre características particulares de los modelos) y dada la homogeneidad de las secuencias obtenidas, los modelos evolutivos seleccionados corresponden a los arrojados por JModelTest2.

**Tabla 11** Modelos de evolución molecular sugeridos por PartitionFinder2 y JModelTest2.

Partición	PartitionFinder2	JModelTest2
COI sitio 1	GTR + I	K80 + I
COI sitio 2	F81	F81
COI sitio 3	GTR + G	HKY
16S	GTR + I	HKY + G
H3 sitio 1	F81	JC
H3 sitio 2	JC	JC
H3 sitio 3	GTR + I	JC

## **Análisis de distancias genéticas**

Las distancias genéticas se calcularon usando el programa MEGA versión 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016), entre localidades para COI y 16S implementando el modelo p-distancias y el parámetro 2 de Kimura (K2P) (Kimura, 1980; Srivathsan y Meier, 2012).

## **Análisis de Inferencia Bayesiana (IB)**

Una vez obtenidas las particiones y seleccionado los modelos, se realizó un análisis de Inferencia Bayesiana en la plataforma en línea CIPRES (Miller *et al.*, 2010) usando la extensión “MrBayes on XSEDE” que implementa la versión 3.2.2 del software (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). El análisis se corrió usando las opciones default que provee Mesquite en el archivo .nex, i.e., 10 millones de generaciones, muestreos cada 1000 generaciones y un burn-in de 25%; por otra parte, en CIPRES se estableció el número de corridas simultáneas a dos. Así mismo, se especificó al programa que arrojará el árbol de consenso de mayoría en cada una de las corridas realizadas.

## **Análisis de Máxima Verosimilitud (MV)**

Este análisis se realizó en la plataforma en línea CIPRES (Miller *et al.*, 2010) usando la extensión “RAxML-HPC BlackBox” que implementa la versión 8 del software (Stamatakis, 2014). En CIPRES, las particiones propuestas por JModelTest se ingresaron en un archivo .txt, mientras que el número de Bootstrap y el modelo de sustitución fueron especificados por el mismo software.

## **Árbol de Máxima Credibilidad de Clados (MCC)**

El archivo .xlm se construyó en BEAUti versión 1.10.4, que forma parte de la paquetería de BEAST. Se especificó el modelo de sustitución HYK y las particiones por codones, el resto de los parámetros se mantuvieron como se encuentran por default. El análisis se realizó en la plataforma CIPRES (Miller *et al.*, 2010) usando la extensión “BEAST (current) on XSEDE” que implementa la versión 1.10.4 del software (Drummond y Rambaut, 2007; Suchard y Rambaut, 2009). El archivo .log resultante se visualizó en el programa Tracer versión 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018) con el fin de verificar que el valor del tamaño de muestra efectivo (ESS) fuera  $> 200$  pero  $< 1000$ . El árbol de mcc se construyó usando el programa TreeAnnotator versión 1.10.4 (Drummond y Rambaut, 2007), se estableció un burn-in del 10% tal y como apuntaba Tracer y se seleccionó la opción de “maximum clade credibility tree”.

Tanto el análisis de inferencia Bayesiana, como los de Máxima Verosimilitud y el árbol ultramétrico se corrieron 3 veces cambiando el número total de terminales, i.e., 5 individuos por población, 2 y 1. Todos los árboles fueron visualizados en Figtree versión 1.4.4. Las ediciones finales se realizaron con ayuda del programa Photoshop 6.

## **Métodos de delimitación de especies**

Dos métodos fueron seleccionados: la implementación Bayesiana del método “Poisson Tree Proceses” (bPTP) (Zhang *et al.*, 2013) y el “Generalized Mixed Yules Coalscent” (GMYC) (Fujisawa y Barraclough, 2013). El primero se corrió en el servidor bPTP (<https://species.h-its.org/ptp/>) ingresando el árbol con dos terminales obtenido en el análisis de MV y Bayesiano. Se especificó un

total de 500,000 generaciones (límite computacional del servidor) y *Raddaus bocourt* (A. Milne-Edwards, 1866) como grupo externo, el resto de las opciones no se modificaron. Para el método GMYC se usó el árbol ultramétrico con dos terminales generado en BEAST, el análisis se corrió en R usando la paquetería “splits” y especificando el método de iteraciones múltiples “multiple”.

### **Red de haplotipos**

La determinación de los haplotipos para COI y 16S se hizo con el programa DNASP (Rozas *et al.*, 2017), ahí mismo se calcularon la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), el número de haplotipos, la diversidad de haplotipos ( $H_d$ ) y el número de sitios variantes.

Las redes de haplotipos, así como los mapas, para ambos genes se construyeron usando el programa POPART (Leigh y Bryant, 2015) ingresando un archivo .nex modificado manualmente para satisfacer las necesidades del programa. El algoritmo usado para el cálculo y construcción de las redes fue el Integer Neighbor-Joining Networks (Leigh y Bryant, 2015).

### **Análisis morfogeométrico**

El análisis morfométrico es sumamente bondadoso en términos de costo/equipo que se requiere para llevarse a cabo. En general, todos los análisis de este tipo siguen el mismo flujo de trabajo: Captura de imágenes, obtención de la forma pura (shape) y análisis estadísticos (Zelditch *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2010).

### **Captura de fotografías**

Un total de 40 gonópodos, pertenecientes a los lotes revisados de la CNCR (Tabla 5), provenientes de 15 localidades (Tabla 12) fueron capturados con una cámara Leica DFC490 que se encuentra montada en un microscopio multifocal Leica Z16 APOA en el Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad del IBUNAM del Laboratorio Nacional de la Biodiversidad. Para evitar provocar variación artificial en el análisis debido al grado de desarrollo del gonópodo, a los ejemplares se les midió tanto la longitud -LC- como la anchura del caparazón- AC-. Se seleccionaron aquellos cangrejos que presentaban un LC de al menos 19 mm y un AC mínimo de 30 mm, pues se asumió que el grado de desarrollo era similar.

La estructura genital de los cangrejos de *Pseudotelfusoidea* es extremadamente compleja. El apéndice está compuesto por proyecciones, espinas, y procesos que se disponen en diferentes direcciones, por lo que encontrar un punto óptimo coplanar puede llegar a ser complicado. La proyección caudo-marginal de *P. americana* se encuentra ligeramente proyectada en sentido mesial, encontrándose la punta en un plano un poco más elevado que el resto de la proyección. Para disminuir la variación artificial provocada por este fenómeno, se usaron los mapas de profundidad (Fig. 12) que el software Leica Application Suite versión 4.3.0 provee como una guía para verificar si la inclinación del gonópodo era la adecuada (Fig. 13 A-C). Se trató de que los mapas presentaran una tonalidad homogénea, al menos, en cuanto a la proyección se refiere.

## Disposición de landmarks

La posición que se le asigna a un “landmark” se hace siempre bajo un criterio de correspondencia entre partes (Bookstein, 1997), i.e., de homología. La disposición de los landmarks se realizó usando los programas de la serie TPS (Rohlf, 2006a, 2006b). Para este análisis, la proyección caudo-marginal se descompuso en 3 secciones: 1) la torsión hacia la vista mesial; 2) el lóbulo distal; y 3) el lóbulo proximal. En total se colocaron 61 landmarks siguiendo diferentes criterios. Para la torsión del proceso se usó un landmark tipo 2 en el punto de máxima curvatura; para el lóbulo distal se usó un landmark tipo 2 en el punto de máxima curvatura que da inicio al lóbulo, un landmark tipo 1 en el ángulo terminal del proceso y 27 semilandmarks equidistantes a lo largo de la curva del margen distal; similar al anterior, el lóbulo proximal fue definido con un landmark tipo 1 en el inicio del lóbulo, un landmark tipo 2 cerca del ángulo que da fin al lóbulo, y 27 semilandmarks equidistantes a lo largo de la curva (Bookstein, 1991; Bookstein 1997; Zelditch *et al.*, 2004) (Fig. 13 D). La cantidad de “landmarks” adecuada sigue una regla general: Tres o cuatro veces menos a la muestra con la que se trabaja (ver Toro *et al.*, 2010) con el fin contemplar la dimensionalidad del set de datos para regular el tamaño mínimo de muestra. No obstante, dada la estructura analizada y el criterio de selección de ejemplares, no fue posible cumplir con la regla.

## Análisis en R

Tanto la Superposición Procrustes como los análisis estadísticos y la representación gráfica se realizaron usando las siguientes paqueterías de R: Geomorph, Morfo, Mclust, Cluster, Factoextra, Plot3D, Vegan, Nbclust y Xlsx siguiendo una versión modificada del protocolo diseñado por Theska *et al.* (2020) (Anexo III).

## Matriz para el deslizamiento de semilandmarks

Antes de realizar la superposición fue necesario crear una matriz que especificara cuáles eran los puntos dentro de nuestro análisis que serían considerados como semilandmarks. Puesto que, a pesar de que los simlandmarks se encuentran dispuestos equidistantemente, es posible que existan artefactos que aumenten la implicación de cambio de forma debido al espacio “arbitrario” que hay entre puntos (Bookstein, 1997; Zelditch *et al.*, 2004).

## La obtención de la forma pura (shape)

La forma pura (shape) se obtuvo a través de un Análisis Procrustes Generalizado (GPA) que consiste en, trasladar a los ejemplares a un punto común, escalarlos al mismo tamaño centroide y rotarlos de manera óptima usando el método generalizado de mínimos cuadrados (Toro *et al.*, 2010). Durante este paso, se especificó la matriz generada anteriormente para que los semilandmarks se deslizaran tangencialmente con el fin de minimizar la energía de flexión de la deformación y la variación en la forma que ocurre por su interespaciado (Bookstein, 1997, Zelditch *et al.*, 2004)

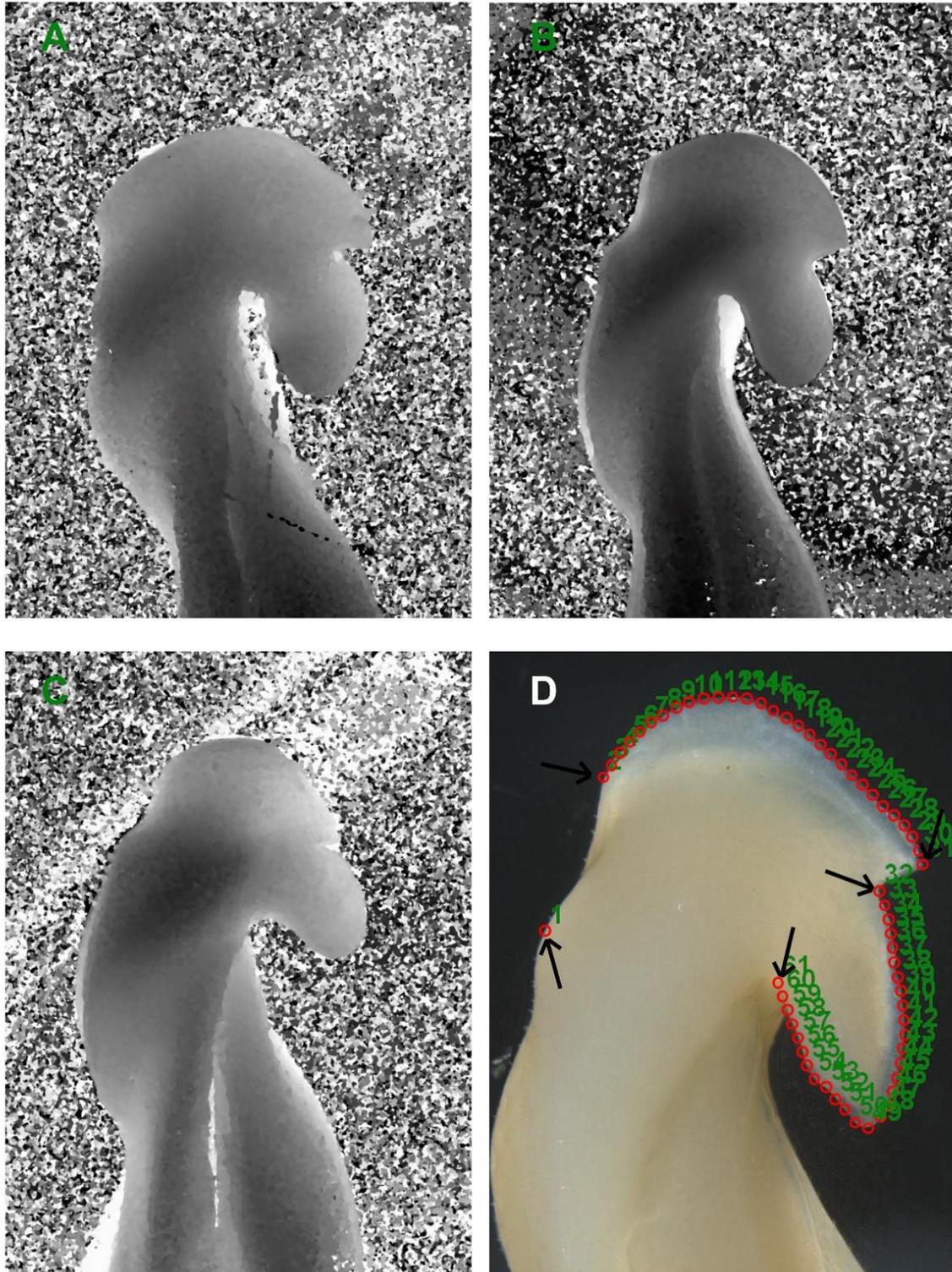
## Análisis exploratorios, de similitud y estadísticos

Una vez obtenidas las coordenadas que representan a la forma pura (shape), se procedió a realizar un Análisis de Componentes Principales (PCA) y un Análisis de Variables Canónicas (CVA).

Debido a la falta de muestras de ejemplares de algunas localidades, la formación de grupos se hizo en función de los estados muestreados (Tabla 13). Asimismo, el CVA se construyó eliminando los últimos 4 PC.

También se realizaron 2 pruebas estadísticas confirmatorias: MANOVA Procrustes y un MANOVA permutacional por pares sobre los datos de forma pura (shape) que nos arrojó el GPA.

Con el fin de estimar la similitud/disimilitud entre pares, se construyó una matriz de distancias euclidianas usando los componentes principales que más variación recuperaban. Posteriormente, se calculó la cantidad de clusters óptimos para nuestro set de datos comparando los resultados de un total de 30 índices disponibles en la paquetería NbClust (Charrad *et al.*, 2014). La formación de los clusters se hizo usando distancias euclidianas y, como criterio de clustering, el método k-medioides, debido a que es menos sensible los outliers y al ruido comparado con el método K-means (Jin y Han, 2011).



**Figura 13.** Imágenes capturadas con el microscopio multicapas Leica. (A-C) Mapas de profundidad de la proyección caudo-marginal en vista mesial. (D) Disposición de landmarks a lo largo de los lóbulos de la proyección caudo-marginal. Las flechas negras indican la posición de los landmarks tipo 1 y 2, el resto de los puntos corresponden a semilandmarks.

**Tabla 12.** Medidas de caparazón de los ejemplares seleccionados para el análisis morfogeométrico.

ID de la CNCR	Estado	Localidad	Ac (mm)	LC (mm)
CNCR 35390		Ojito, Apizaco	40.02	26.32
		Ojito*	29.66	19.63
			40.20	26.32
CNCR 35900	Tlaxcala	San Miguel la	42.52	27.71
CNCR 35904		Presa, Ixtacuixtla	35.90	21.62
CNCR 35970		SnMg*	33.83	21.92
CNCR 36508		Ascensión As*	36.66	23.85
CNCR 35902		Palo huérfano,	32.18	20.54
		Amaxac de	35.50	23.60
		Guerrero	32.84	21.57
		Palo*	32.19	20.63
CNCR 36155	Hidalgo		32.62	21.96
		Baño grande,	31.28	20.60
		Mixquiahuala	31.43	20.40
		Mix*	31.79	21.14
CNCR 36156			31.25	21.04
CNCR 340		Ventoquipa	32.09	21.01
CNCR 25527		Vento*	37.97	24.92
CNCR 36154			31.11	20.32
			30.15	20.73
		Cascadas de	39.08	25.68
		Quetzalapa,	37.21	24.38
CNCR 355		Zacatlán	41.37	27.19
		Quet*	35.92	23.55
			31.94	22.28
CNCR 36550	Puebla	Chignahuapan	38.00	24.91
CNCR 26108			41.43	26.56
		Chuahutinchán	38.11	24.42
		Cuahu*	36.85	23.48
CNCR 22682			37.27	23.43
CNCR 342	Querétaro	Tizcatlacoyan/ San Antonio Juárez	42.52	26.36
		Sn Marcos		
		Necoxtla	33.07	21.09
		Nec*		
		-	34.02	20.74
			38.77	24.6

**Tabla 12 (Continuación).** Medidas de caparazón de los ejemplares seleccionados para el análisis morfogeométrico.

ID de la CNCR	Estado	Localidad	Ac (mm)	LC (mm)
CNCR 29077	Guerrero	Río Ajolotero	34.03	20.16
		Ajolotero*	33.70	20.68
			34.19	21.23
CNCR 35903		Zuhuatanejo	29.95	18.19
		Zihuatanejo*		
CNCR 29104	Michoacán	Cascadas de		
		Tzararacua	30.86	18.70
		Tzararacua*		
			30.73	18.21

*\*Nombres asignados a las mismas poblaciones durante los análisis moleculares.*

**Tabla 13.** Grupos establecidos *a priori* para el Análisis de Variables Canónicas.

Grupo asignado	No. de ejemplares pertenecientes al grupo	Localidad de procedencia
	3	Ojito, Apizaco
	1	Ascensión
Tlaxcala	3	San Miguel la Presa, Ixtacuixtla
	3	Palo Huérfano, Amaxac de Guerrero
Hidalgo	6	Baño Grande, Mixquiahuala
	3	Ventoquipa
Puebla Norte	6	Cascadas de Quetzalapa, Zacatlán
	1	Chignahuapan
	4	Cuahutinchán
Puebla Sur	1	Tizcatlacoyan
	1	San Marcos Necoxtla, Tehuacán
Querétaro	2	Querétaro
	3	Río Ajolotero
Guerrero	1	Zihuatanejo
Michoacán	1	Tzararacua

## **Análisis morfológico**

### **Medidas y proporciones somáticas**

Se tomaron las siguientes medidas expresadas en mm: Ancho de caparazón (AC), largo de caparazón (LC), largo y ancho de la apertura del canal eferente, largo y ancho del isquio del tercer maxilípodo, largo y ancho del mero del tercer maxilípodo y largo del exópodo. De cada una de las medidas, se obtuvo la relación anchura/longitud.

### **Captura de fotografías**

Se capturaron fotografías tanto de estructuras somáticas como sexuales masculinas. Las estructuras somáticas se capturaron usando un microscopio LEICA modelo S6D y el programa ImageView; se fotografiaron el hábito general de los cangrejos en vista dorsal y ventral, la quela mayor, la frente, el margen anterolateral, la órbita, la apertura del canal eferente, el borde frontal inferior y la escotadura del ángulo orbital externo. Las estructuras sexuales masculinas se fotografiaron en un Hitachi VP-SEM SU1510 en el Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad I del IBUNAM del Laboratorio Nacional de Biodiversidad, se capturaron las 5 vistas pertinentes, i.e., caudal, mesial, cefálica, lateral y distal.

### **Concepto de especie**

El establecimiento de grupos se hizo tomando en cuenta los resultados obtenidos en los capítulos anteriores en conjunto con las observaciones morfológicas que presentaban los ejemplares. Las hipótesis específicas se construyeron en función del concepto unificado de especie propuesto por De Queiroz (2007), que iguala a las especies con segmentos de un linaje metapoblacional; entendiéndose linaje como una serie ancestría-descendencia y metapoblación como una población inclusiva formada por varias subpoblaciones.

### **Estructura de la ficha taxonómica**

La ficha taxonómica que se diseñó para cada especie reconocida en los resultados de los Capítulos I y II, se presenta de la siguiente forma:

En la parte superior se indica el nombre de la especie, seguido de las láminas que representan estructuras de importancia taxonómica. Posteriormente se incluye, si es el caso, una lista con las citas bibliográficas históricas, particularmente en listados, inventarios o trabajos de revisión taxonómica, especificando el nombre del taxón, el autor, año de la publicación, página, localización de la lámina o representación gráfica de la especie y localidad de procedencia de los ejemplares estudiados -separando a los países con punto (.), especificando los estados con dos puntos (:), las localidades con comas (,) y separando cada estado con punto y coma (;)-.

Después, se hace referencia al lote que se usó para la descripción o redesccripción de la especie en cuestión. Se comenzó con el estado de procedencia, seguido del número de catálogo de la CNCR y las especificaciones de la etiqueta escritas entre comillas (" ") -en caso de que el lote tuviera más de una, se optó por indicar la información de la etiqueta más reciente o que tuviera más información-, además, se provee el número de machos y de hembras, así como los rangos de AC y

LC de todos los individuos dentro del lote. Asimismo, se especificó el material adicional revisado siguiendo el mismo formato mencionado con anterioridad.

Se ofrece la descripción o redesccripción morfológica pertinente, en el caso del G1 del macho, se resalta con negritas las vistas a las que hace referencia. Además, se añadieron la secciones: a) "Observaciones" para hacer mención sobre la condición de las localidades de colecta, semejanza a especies afines o alguna otra particularidad observada en el campo o en el individuo, e.g., el tamaño de puesta y el diámetro del huevo; b) "Variación morfológica" para anotar las diferencias morfológicas observadas en el material adicional revisado; c) "Distribución" para indicar el rango distribucional de la especie; y d) "Comentarios taxonómicos" en donde se contrastan las consideraciones hechas por otros autores sobre la especie en cuestión con los hallazgos e hipótesis del presente trabajo.

## Resultados

### Análisis molecular

#### Extracción de DNA y distancias genéticas

En total se lograron extraer y amplificar DNA de 40 ejemplares representando las nueve localidades muestreadas. Asimismo, se lograron amplificar seis especímenes de colección correspondiente tanto a especies afines como a ejemplares sin determinar, importantes para este estudio (Tabla 14).

**Tabla 14.** Número de ejemplares y genes amplificados para este estudio.

Nombre científico ID de la CNCR	Estado Localidad	Abreviación	# individuos	Genes amplificados		
				COI	16S	H3
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 36158	Tlx. Mtial El Ojito	Ojito	5	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 35970	Tlx. Sn Miguel la Presa	SnMg	5	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 35901	Tlx. Mtial. Palo Huerfano	Palo	4	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 36508	Tlx. Ascensión	As	5	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 36154	Pue. Casc. Quetzalapa	Quet	5	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 36157	Pue. Mtial en Michac	Mich	1	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 36550	Pue. Cuahutinchán	Cuahu	5	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 36592	Pue. Sn Marcos Necoxtla	Nec	5	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 36156	Hgo. Mtial en Ventoquipa	Vento	5	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 36155	Hgo. Mixquiahuala	Mix	5	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 29077	Gro. R Ajolotero.	Ajo	1	X	X	X
<i>P. hoffmanae.</i> CNCR 29076	Gro. Amojileca.	-	1	X	X	X
<i>P. guerreroensis.</i> CNCR 33448	Gro. Quechultenango.	-	1	X	X	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 35903	Gro. Zihuatanejo	Zih	1	X	-	X
<i>P. aff mexicana.</i> CNCR 12559	Edo. Méx. Río Sn Fco.	-	1	X	-	X
<i>Pseudothelphusa sp.</i> CNCR 2094	Mich. Casc. de Tzararacua	Tza	1	-	X	X

Las distancias genéticas calculadas tanto para COI (Tabla 15, 17) como para 16S (Tabla 16, 18) con ambos modelos, mostraron ser notablemente bajas entre los ejemplares correspondientes a las localidades de Hidalgo -Ventoquipa y Mixquiahuala-, Puebla -Quetzalapa, Michac y Cuahutinchán-, y Tlaxcala -El Ojito, Ascensión, Palo Huérfano y San Miguel- rondando entre los 0%-0.3% para COI y 0%-0.2% para 16S.

Otras poblaciones mostraron distancias considerablemente más altas en ambos genes. Para COI, la población de San Marcos Necoxtla presentó un porcentaje de distancias del 2.3%-2.4% con respecto a las poblaciones de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala mencionadas en el párrafo anterior. El ejemplar de Río Ajolotero exhibió distancias que oscilan entre los 2.5% comparado con poblaciones de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala, y los 2.9%, comparado con San Marcos Necoxtla. El espécimen proveniente de Zihuatanejo evidenció las distancias más altas dentro del grupo analizado rondando los 5%-5.2% contra ejemplares de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala, 3.7% *versus* San Marcos Necoxtla y 4.5% con respecto a Río Ajolotero.

Las distancias de 16S demuestran un patrón similar a lo observado en COI. La población de San Marcos Necoxtla presenta distancias de 2.4%-2.5% contra los ejemplares de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala; el ejemplar de Río Ajolotero difiere en 2.3%-2.5% con respecto a estas últimas y 3.1% *versus* los ejemplares de San Marcos Necoxtla; el individuo que provenía de las cascadas de Tzararacua resultó ser el más distante presentando 6%-6.6% de diferencia contra Hidalgo, Puebla y Tlaxcala, 5.7% respecto a San Marcos Necoxtla y 6.2% comparado con Río Ajolotero.

### **Análisis filogenético**

El árbol de consenso de mayoría generado por IB y el árbol con el mejor puntaje generado por MV mostraron topologías similares (Fig. 14). En primer lugar, lo primero en notarse es la formación de una politomía en el clado A, que contempla las localidades muestreadas de Hidalgo -Ventoquipa y Mixquiahuala-, Puebla -Quetzalapa, Michac y Cuahutinchán-, y Tlaxcala -El Ojito, Ascensión, Palo Huérfano y San Miguel- y que corresponde a la verdadera identidad de *P. americana*. No obstante, se puede identificar dos componentes bien definidos que no se entremezclan. El primero solamente abarca los estados de Hidalgo y Puebla Norte, dicho clado se encuentra soportado por un valor de Probabilidad Posterior (PP) de .96 y 67% de Bootstrap (B). El segundo grupo corresponde únicamente a las poblaciones de la localidad de San Miguel, formando un clado muy bien soportado (PP=.98, B=84%), sin embargo, no es posible establecer relaciones filogenéticas claras entre el resto de las localidades de Tlaxcala y Puebla Sur.

El clado B se encuentra conformado por el ejemplar de Río Ajolotero y el clado *P. hoffmanae-P. belliana* que juntos son el grupo hermano de *P. americana*. El soporte de ramas es de PP=1 y B=99 y se recupera al ejemplar de Río Ajolotero como una especie independiente.

El clado C está conformado exclusivamente por ejemplares pertenecientes a la población de San Marcos Necoxtla con un soporte de PP=1 y de B=98. Este grupo es hermano de los clados A y B. Así como ocurre con el ejemplar de Río Ajolotero, los árboles resultantes sugieren la existencia de otra especie.

**Tabla 15.** P-distancias calculadas para COI

	Vento	Mix	Quet	Mich	Ojito	As	Palo	SnMg	Cuahu	Nec	<i>P. amer</i>	Ajo
Vento												
Mix	0.001											
Quet	0.001	0.000										
Mich	0.001	0.000	0.000									
Ojito	0.002	0.000	0.000	0.000								
As	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000							
Palo	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
SnMg	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002					
Cuahu	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002				
Nec	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.024	0.023			
<i>P. amer</i>	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.025		
Ajo	0.025	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.027	0.026	0.023	0.029	
Zih	0.050	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052	0.053	0.052	0.037	0.054	0.045

**Tabla 16.** P-distancias calculadas para 16S.

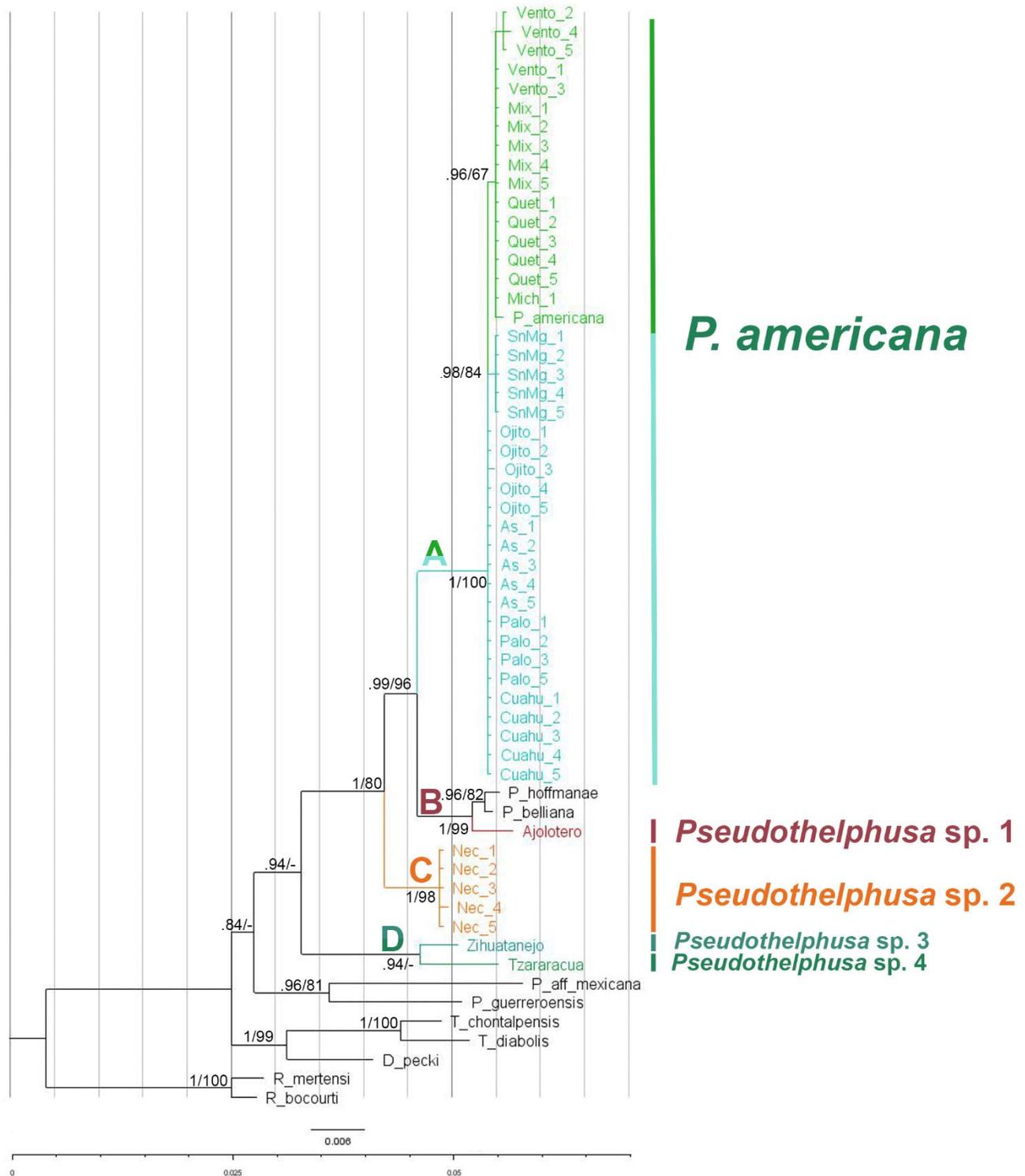
	Vento	Mix	Quet	Mich	Ojito	As	Palo	SnMg	Cuahu	Nec	<i>P. amer</i>	Ajo
Vento												
Mix	0.000											
Quet	0.000	0.000										
Mich	0.000	0.000	0.000									
Ojito	0.002	0.002	0.002	0.002								
As	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000							
Palo	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000						
SnMg	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000					
Cuahu	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000				
Nec	0.025	0.026	0.025	0.025	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024			
<i>P. amer</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.027		
Ajo	0.025	0.025	0.025	0.025	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.031	0.021	
Tza	0.062	0.063	0.062	0.062	0.060	0.060	0.060	0.060	0.060	0.057	0.066	0.062

**Tabla 17.** K2P distancias calculadas para COI

	Vento	Mix	Quet	Mich	Ojito	As	Palo	SnMg	Cuahu	Nec	<i>P. amer</i>	Ajo
Vento												
Mix	0.001											
Quet	0.001	0.000										
Mich	0.001	0.000	0.000									
Ojito	0.002	0.000	0.000	0.000								
As	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000							
Palo	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
SnMg	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002					
Cuahu	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002				
Nec	0.024	0.023	0.023	0.023	0.024	0.023	0.023	0.025	0.023			
<i>P. amer</i>	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.027		
Ajo	0.026	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.029	0.027	0.024	0.030	
Zih	0.055	0.056	0.056	0.056	0.057	0.056	0.056	0.058	0.056	0.040	0.060	0.049

**Tabla 18.** K2P distancias calculadas para 16S

	Vento	Mix	Quet	Mich	Ojito	As	Palo	SnMg	Cuahu	Nec	<i>P. amer</i>	Ajo
Vento												
Mix	0.000											
Quet	0.000	0.000										
Mich	0.000	0.000	0.000									
Ojito	0.002	0.002	0.002	0.002								
As	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000							
Palo	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000						
SnMg	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000					
Cuahu	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000				
Nec	0.026	0.027	0.026	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024			
<i>P. amer</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.029		
Ajo	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.032	0.022	
Tza	0.069	0.069	0.069	0.069	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.062	0.073	0.069



**Figura 14.** Árbol de IB de consenso de mayoría resultante de la concatenación de COI, 16S y H3 de las poblaciones del complejo *Pseudotherphusa americana*. En cada nodo se indican los valores de Probabilidad posterior (izquierda) del análisis Bayesiano y de Bootstrap (derecha) del análisis de Máxima Verosimilitud > .70 y 60 respectivamente. A. *P. americana*; B. *Pseudotherphusa* sp. 1; C. *Pseudotherphusa* sp. 2; D. *Pseudotherphusa* sp. 3 y 4. Tanto las abreviaciones de las terminales como la procedencia de los individuos se pueden visualizar en las Tablas 7 y 9.

Por último, el clado D está formado por los ejemplares tanto de Zihuatanejo como de Tzararacua. Este grupo esta soportado por un valor de PP=.94, empero, el valor de B resulta ser < 60. A pesar de esto, es posible separar ambas entidades en dos linajes.

El árbol de Máxima Credibilidad de Clados recupera una topología similar a la mostrada por los de IB y MV. En este análisis se recuperan los dos grupos que forman al clado *P. americana* (Fig. 15). Empero, es importante mencionar que los valores de PP dentro de cada grupo son < .70, excepto en las poblaciones de San Miguel que se recuperaron con un valor de PP=1.

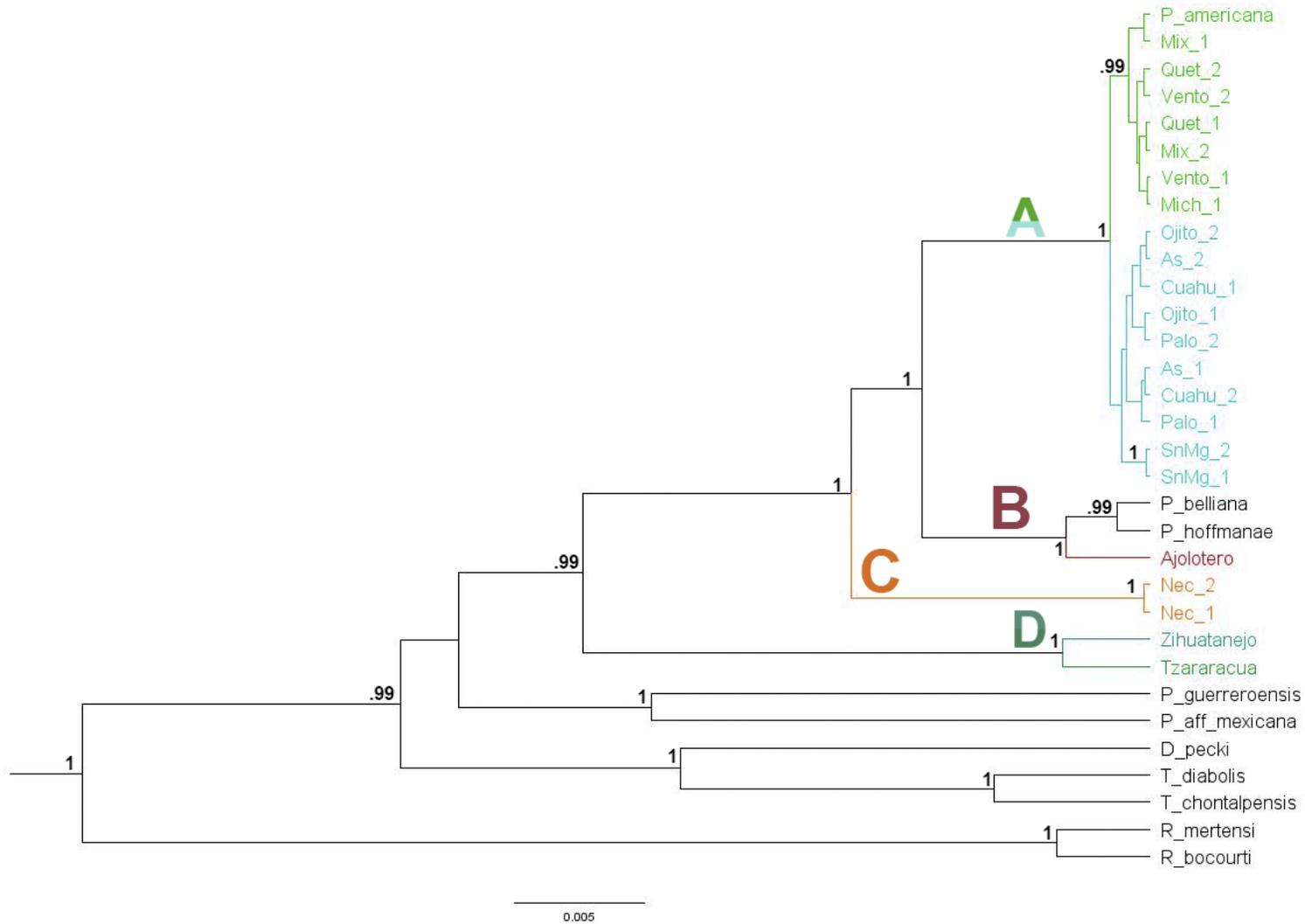
### Métodos de delimitación de especies

Los métodos seleccionados apuntaron en direcciones un tanto similares. El árbol de Máxima Verosimilitud usado para análisis bPTP sugiere una delimitación de 14 especies (Fig. 8A) (Tabla 19). Las poblaciones de Hidalgo Puebla y Tlaxcala son miembros de la misma especie y se encuentran aisladas de otras como Ajolotero e incluso Necoxtla. Curiosamente el análisis no fue capaz de reconocer a *P. hoffmanae* y *P. belliana* como especies diferentes -color rojo-, mientras que los ejemplares de Necoxtla no son reconocidos como parte del mismo grupo -color azul-. El árbol de IB usado en el mismo análisis (Anexo II) sólo difiere en la resolución de los especímenes de Necoxtla como miembros de la misma especie -color rojo-, pero no resuelve a *P. hoffmanae* y *P. belliana* como especies distintas -color rojo-

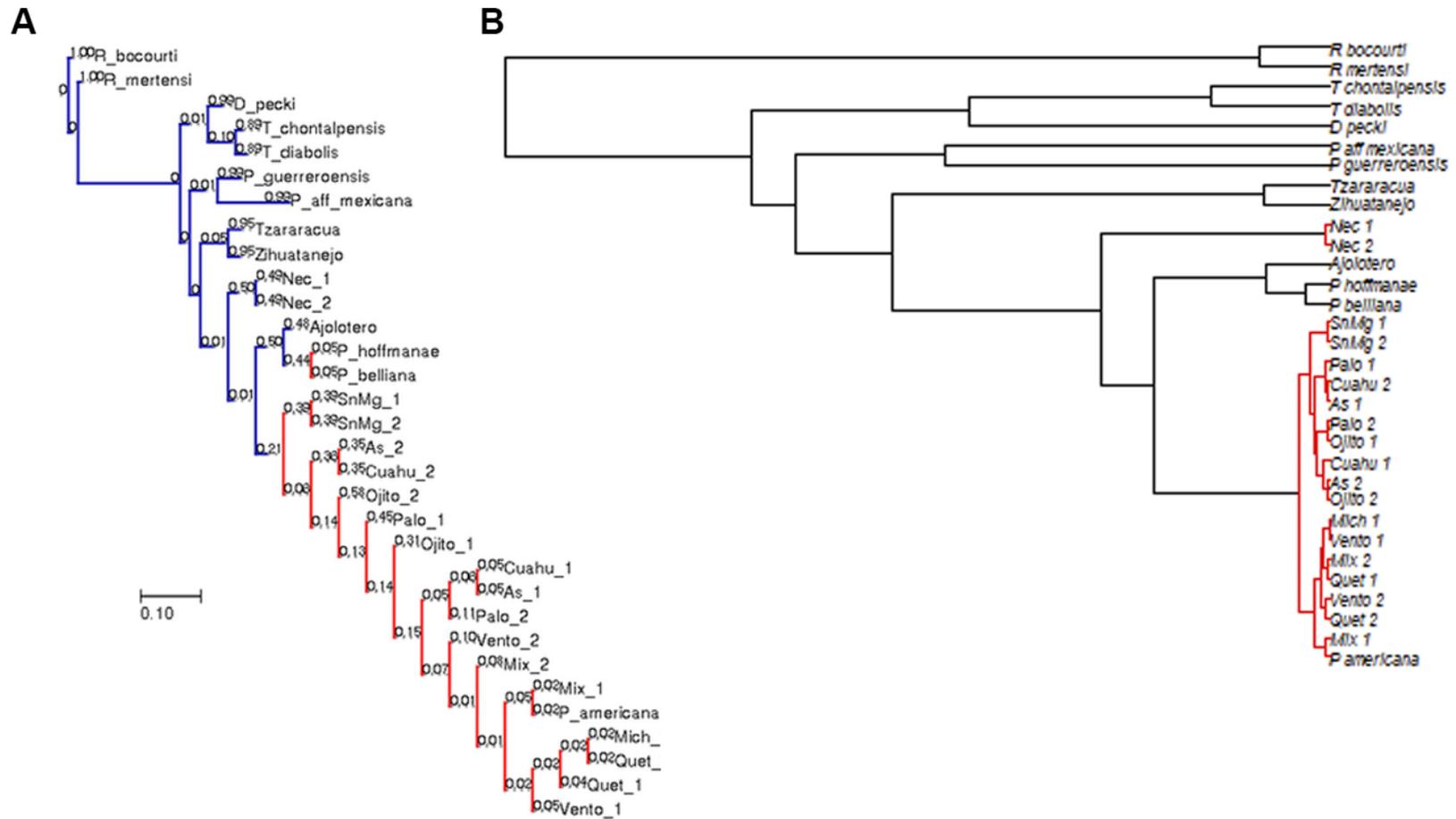
A pesar de que el análisis GMYC también reconoció la existencia de 14 linajes (Fig.16 B) (Tabla 19), los grupos formados no se estructuran de la misma manera. Las poblaciones de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala se reconocen como una sola entidad, *P. hoffmanae* y *P. belliana* también son identificadas como especies diferentes y Necoxtla se considera como unidad.

**Tabla 19.** Propuestas de delimitación de especies de acuerdo con los métodos GMYC y bPTP. En gris se encuentran las diferencias entre ambos métodos.

GMYC		bPTP	
No. especie	Miembros	No. especie	Miembros
1	<i>R. bocourti</i>	1	<i>R. bocourti</i>
2	<i>R. mertensi</i>	2	<i>R. mertensi</i>
3	<i>D. pecki</i>	3	<i>D. pecki</i>
4	<i>T. chontalpensis</i>	4	<i>T. chontalpensis</i>
5	<i>T. diabolis</i>	5	<i>T. diabolis</i>
6	<i>P. guerreroensis</i>	6	<i>P. guerreroensis</i>
7	<i>P. aff. mexicana</i>	7	<i>P. aff mexicana</i>
8	<i>P. belliana</i>	8	<i>P. belliana, P. hoffmanae</i>
9	<i>P. hoffmanae</i>	9	Nec 1
10	Nec 1, Nec 2	10	Nec 2
11	Vento 1-2, Mix 1-2, Mich 1, Quet 1,2 Palo 1-2, As 1-2, Ojito 1-2, SnMg 1-2 Cuahu 1-2, <i>P. americana</i> .	11	Vento 1-2, Mix 1-2, Mich 1, Quet 1,2 Palo 1-2, As 1-2, Ojito 1-2, SnMg 1-2 Cuahu 1-2, <i>P. americana</i> .
12	Ajo	12	Ajo
13	Zih	13	Zih
14	Tza	14	Tza



**Figura 15.** Árbol de mcc del complejo *P. americana* resultante cuando se analizan dos terminales por localidad. En los nodos se muestran las Probabilidades posteriores (PP) > .70. A. *P. americana*; B. *Pseudothelphusa* sp. 1; C. *Pseudothelphusa* sp. 2; D. *Pseudothelphusa* sp. 3 y 4



**Figura 16.** Delimitación de especies. A. Método bPTP construido con el árbol de MV con dos terminales. B. Método GMYC construido con un árbol ultramétrico generado en BEAST. El color rojo indica pertenencia al mismo grupo; el color azul/negro indica independencia del grupo.

## Red de haplotipos

El análisis de redes de haplotipos arrojó resultados congruentes con lo mencionado en los apartados anteriores. Para COI (Fig. 17, 16 A), se reconocieron cinco haplotipos diferentes con un  $Hd=0.463$ , un  $\pi=0.00832$  y un número de sitios variables igual a 41. El haplotipo 1, corresponde a las poblaciones de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala, con excepción de la localidad de San Miguel, a la que pertenece el haplotipo 2; el haplotipo 3 corresponde a la población de Necoxtla; el haplotipo 4 a la localidad de Ajolotero; y el haplotipo 5 a Zihuatanejo.

Similar a lo que ocurrió en el análisis filogenético, los individuos de San Miguel La Presa se distinguen del resto de las poblaciones de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala, en este caso por un paso mutacional en la posición 25 del alineamiento donde se intercambia una G por una A. Los ejemplares de San Marcos Necoxtla presentan 14 pasos mutacionales con respecto a las poblaciones antes mencionadas; Ajolotero se separa de ellas por 16 pasos mutacionales y el ejemplar de Zihuatanejo se encuentra a 32 pasos mutacionales de *P. americana*

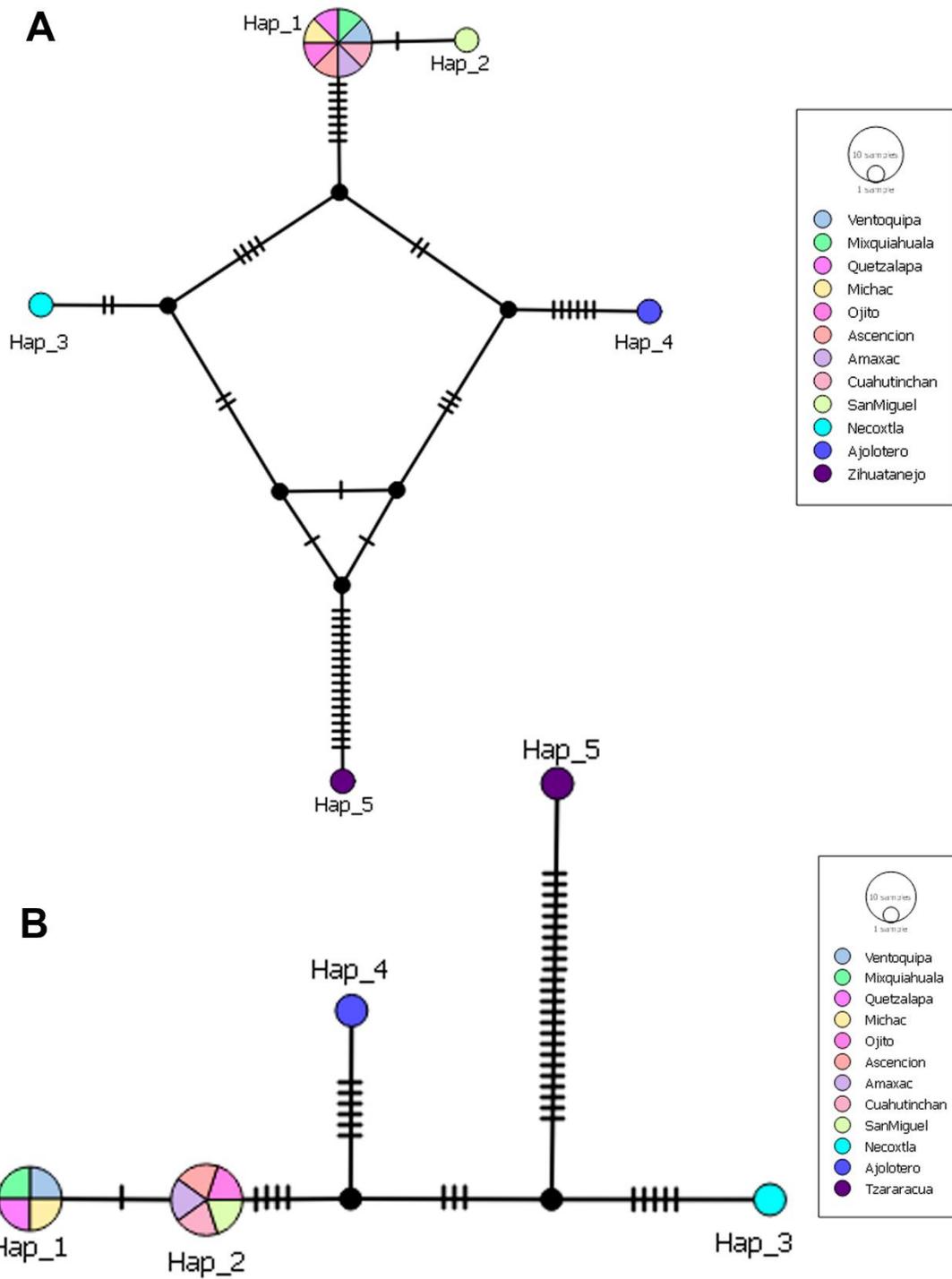
Por su parte, 16S (Fig. 18, 16 B) indica que *P. americana*, i.e, las poblaciones de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala, presenta dos componentes. El primero -haplotipo 1- corresponde a las poblaciones de Ventoquipa, Mixquiahuala, Quetzalapa y Michac; mientras que el segundo componente -haplotipo 2- está formado por todas las localidades de Tlaxcala y Cuahutinchán. Ambos componentes se encuentran separados por 1 paso mutacional en la posición 340 del alineamiento donde se cambia una A por una T. El haplotipo 3 es propio de San Marcos Necoxtla, y se encuentra a 13 pasos mutacionales de distancia del haplotipo 1 y a 12 del haplotipo 2, mientras que Ajolotero -haplotipo 4- se encuentra a 11 y 10 pasos mutacionales de los haplotipos 1 y 2 respectivamente. Por último, Tzararacua -haplotipo 5- está a 32 pasos mutacionales de los haplotipos antes mencionados. Respecto a los índices calculados, se reconoció una  $Hd=0.624$ , un  $\pi=0.00892$  y un número de sitios variables equivalente a 42.



**Figura 17.** Ubicación geográfica de los haplotipos de COI del complejo *P. americana*.



**Figura 18.** Ubicación geográfica de los haplotipos de 16S del complejo *P. americana*.



**Figura 19.** Redes de haplotipos del complejo *P. americana*. A. COI. B. 16S. Los nodos en color negro indican haplotipos hipotéticos, las barras entre líneas indican pasos mutacionales.

## Análisis morfogeométrico

### Análisis de Componentes Principales (PCA)

El PCA encontró un total de 40 componentes principales que recogen cerca del 100% de la variación total (Fig. 20 C). Los primeros 3 componentes explican el 76.01% de variación (PC1=41.71%, PC2=18.86%, PC3=15.43), mientras que los componentes 10-40 recuperan un porcentaje < 1%.

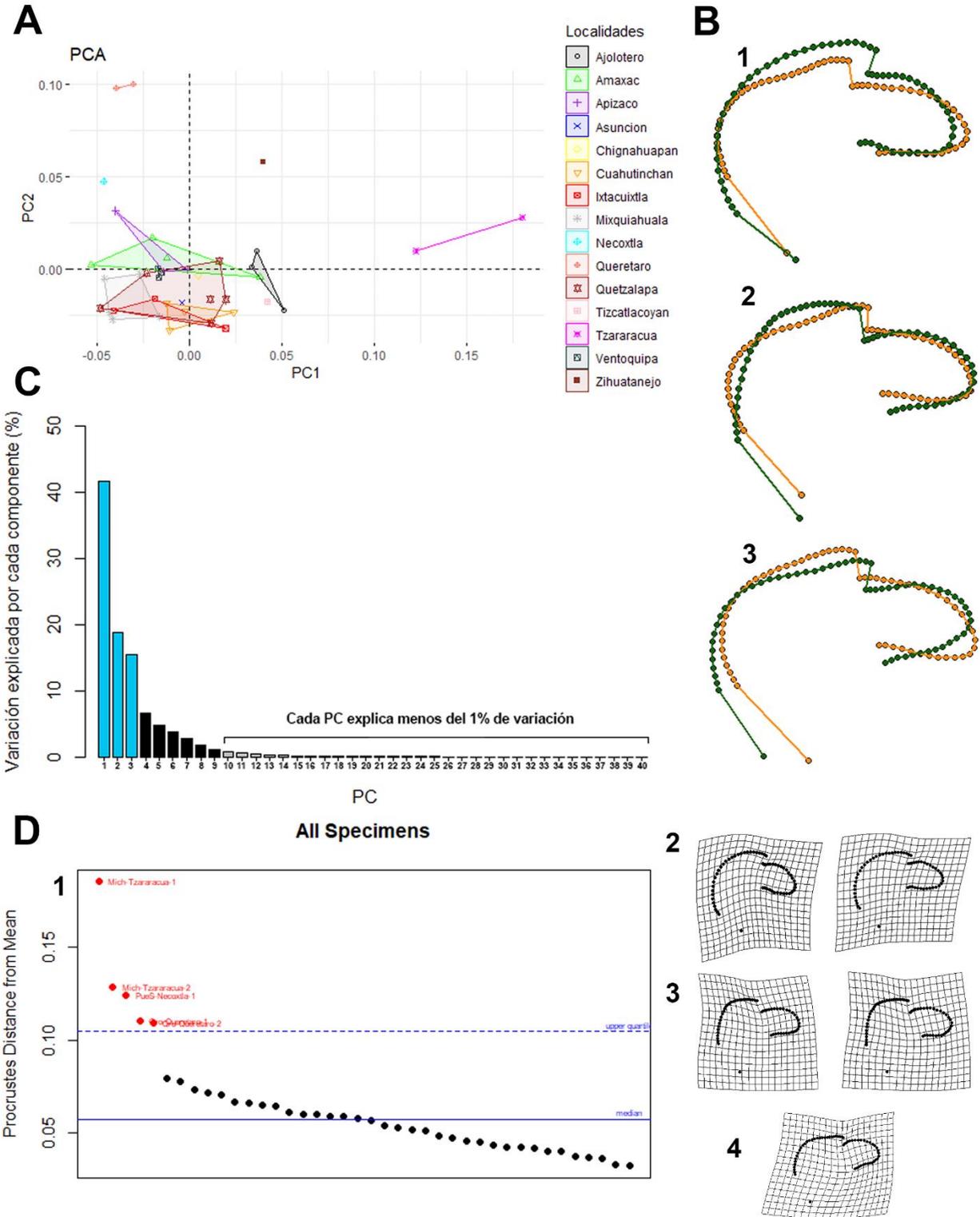
La grafica de valores atípicos -Outliers- (Fig. 20 D1) mostró 5 ejemplares que excedieron el cuantil establecido; indicando que las distancias Procustes se alejan atípicamente de la media. Debido a que, curiosamente, los 5 outliers corresponden a ejemplares que 1) el análisis filogenético reconoció como linajes independientes a *P. americana s. str.* -Tzararacua (Fig. 20 D2) y Necoxtla (Fig. 20 D3)-; y 2) que eran notablemente disímiles a la forma media que presenta *P. americana s. str.* -Querétaro (Fig. 20 D2)-, se optó por no eliminarlos del análisis.

La gráfica resultante (Fig. 20 A) muestra una dispersión de la nube de puntos coherente tanto con la distribución geográfica del complejo (Figs. 5-6), así como con los resultados obtenidos en nuestro análisis filogenético (Fig. 14). Por un lado, la nube de puntos formada en la porción inferior izquierda corresponde a la mayoría de las localidades que componen al clado A (Fig.14) y que corresponden a *P. americana s. str.*, i.e, Mixquiahuala y Ventoquipa -Hidalgo-; Chignahuapan, Quetzalapa, Cuahutinacán y Tizcatlacoyan -Puebla-; y Amaxac, Apizaco, Asención e Ixtacuixtla -Tlaxcala-. Sin embargo, el análisis no es capaz de reconocer a los grupos provenientes de la cuenca del Pánuco y del Balsas.

Por otra parte, la población de Ajolotero, que forma parte del clado B (Fig. 14) y que corresponde a *Pseudothelphusa* sp. 1, se encuentra ligeramente embebida en la nube de puntos de *P. americana s. str.*. Aunque parece presentar una pequeña tendencia hacia la forma extrema del PC1 (Fig. 20 B1) que consiste en un aumento de tamaño del lóbulo distal, una ligera reducción del lóbulo proximal y un leve ensanchamiento de la porción caudal de la proyección caudo-marginal.

El ejemplar proveniente de Necoxtla -*Pseudothelphusa* sp.2 (Fig. 14 Clado C)- se ubica en una porción del morfoespacio por encima de la nube de puntos de *P. americana s. str.* Siguiendo el movimiento sugerido por la gradilla de deformación (Fig. 20 D4) podemos observar que la forma característica de este gonópodo -comparada con la forma consenso- indica una notable reducción del lóbulo proximal de la proyección caudomarginal, acompañada de un desplazamiento en dirección distal hasta disponerse casi perpendicularmente al eje principal del apéndice.

Tanto los ejemplares de Zihuatanejo como de Tzararacua (Fig. 20 A), que forman el clado D (Fig. 14), se encuentran en un punto específico del gráfico. Zihuatanejo cuenta con una proyección caudo-marginal con una tendencia parecida a Ajolotero, i.e., un aumento tanto del tamaño como de la curvatura del lóbulo distal, seguida de una ligera reducción y de un ensanchamiento del lóbulo proximal. Por otro lado, Tzararacua presenta el límite de deformación máximo en el eje X (Fig. 20 B1). Este cambio de forma consiste en un aumento significativo en el tamaño y anchura de la porción caudal del lóbulo distal, además de una leve reducción y ensanchamiento del lóbulo distal de la proyección caudo-marginal.



**Figura 20.** Análisis exploratorios. (A). Análisis de Componentes Principales de la variación morfológica de la proyección caudo-marginal en vista mesial. (B). Formas mínimas (amarillo) y máximas (verde) que explican los tres primeros componentes principales. (1) PC1. (2) PC2. (3). PC3. (C). Variación explicada en porcentaje por cada uno de los componentes principales. (D). Valores atípicos y gradillas de deformación. (1) Valores atípicos respecto al valor medio de las distancias. (2). Deformación de los ejemplares de Tzararacua respecto a la forma promedio. (3). Deformación de los ejemplares de Querétaro respecto a la forma promedio. (4). Deformación del ejemplar de Necoxtla respecto a la forma promedio.

Por último, los ejemplares provenientes de Querétaro representan el límite de deformación máximo dentro del eje Y (Fig. 20 B2). Estos individuos presentan un patrón que consiste en un aumento de altura del extremo cefálico del lóbulo distal, mientras que la porción caudal desciende y se ensancha ligeramente.

Se realizó también una gráfica en tres dimensiones del PCA que incluyen los tres primeros y más significativos CP (Fig. 21 A). Esta gráfica muestra de manera más precisa cómo se distribuyen cada uno de los puntos.

### MANOVA y MANOVA por pares

El ANOVA Procrustes conducido a partir de los datos de la forma pura (shape) arrojadas por el Análisis Generalizado de Procrustes, resultó en una  $P < 0.05$  (Tabla 21), indicando diferencias significativas entre algunas de las localidades estudiadas. La prueba entre pares (Tabla 22) indica que los individuos provenientes de Tzararacua presentan diferencias estadísticamente significativas con la mayoría de las localidades ( $P < 0.05$ ), a excepción de los de Tizcatlayocan. Los ejemplares de Querétaro son notablemente diferentes a siete de las localidades estudiadas ( $P < 0.05$ ); por otra parte, Necoxtla sólo mostró diferencias con respecto a los individuos de San Miguel La Presa, Ixtacuixtla ( $P < 0.05$ ). Es interesante observar que la mayoría de las localidades no presentaron diferencias significativas entre ellas, o sólo entre algunas que componen la porción más densa de la nube de puntos

### Análisis de Variables Canónicas (CVA)

El CVA (Fig. 21 B) clasificó a los 40 gonópodos analizados en los siete grupos establecidos sin cometer errores (Tabla 13). La gráfica de las dos primeras CV, concuerda ligeramente con lo observado en el PCA, pues la densidad de la nube de puntos corresponde a las poblaciones de Hidalgo, Puebla Norte y Tlaxcala. Sin embargo, ligeras inconsistencias aparecen en dos grupos. Puebla Sur que se encuentra formado por las poblaciones de Necoxtla y Cuahutinchán; mientras que Guerrero está compuesto por Ajolotero y Zihuatanejo. Estos resultados hacen eco con la prueba por pares realizada con los datos ofrecidos por el PCA, i.e., no son estadísticamente diferenciables.

**Tabla 20.** Resultado de la clasificación de los 40 gonópodos en los 7 grupos establecidos *a priori*.

	Gro.	Hgo.	Mich.	Pue. N	Pue. S	Qro.	Tlx.
Guerrero	4	0	0	0	0	0	0
Hidalgo	0	9	0	0	0	0	0
Michoacan	0	0	2	0	0	0	0
PueblaNorte	0	0	0	7	0	0	0
PueblaSur	0	0	0	0	6	0	0
Querétaro	0	0	0	0	0	2	0
Tlaxcala	0	0	0	0	0	0	10

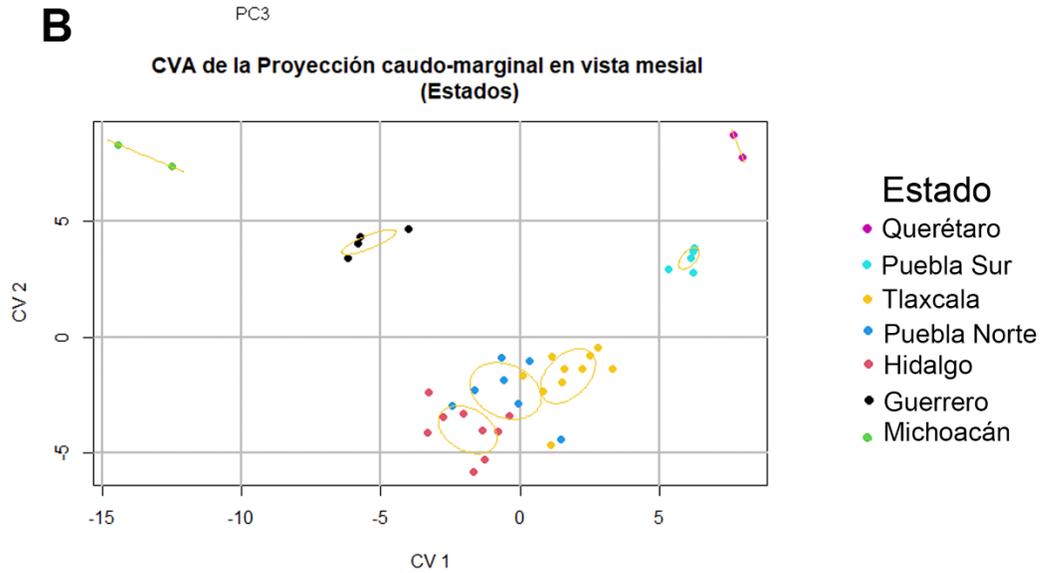
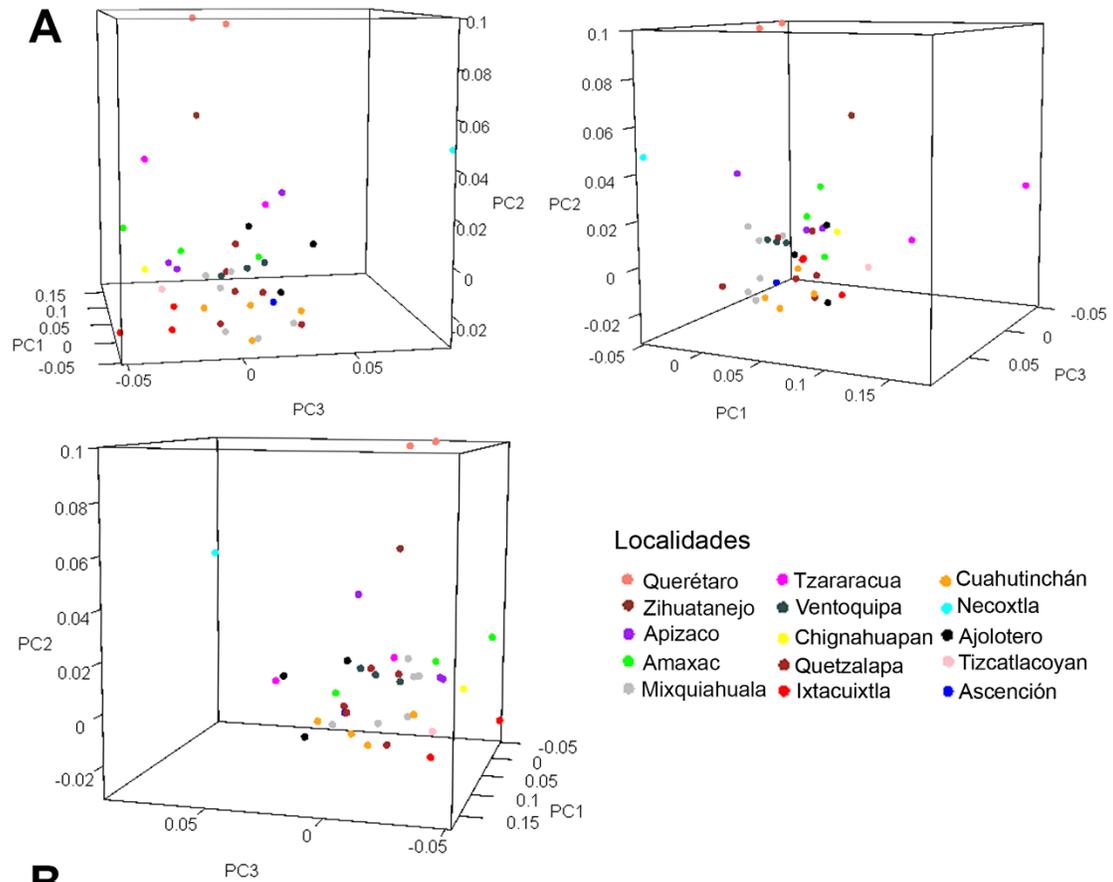
**Tabla 21.** Resultados MANOVA

	Df	SS	MS	Rsq	F	Z	Pr(>F)
Localidades	14	0.14778	0.0105557	0.75494	5.5011	4.3533	1.00E-05***
Residuals	25	0.047971	0.0019188	0.24506			
Total	39	0.195751					

**Tabla 22.** Valores de P arrojados por el MANOVA por pares.

	Ajo	Amax	Apiz	Asc	Chig	Cuahu	Ixt	Mix	Nec	Qro	Quet	Tiz	Tza	Vento	Zih
Ajo	1														
Amax	0.0524	1													
Apiz	0.0743	0.7294	1												
Asc	0.4281	0.5374	0.5832	1											
Chig	0.2284	0.5549	0.4115	0.4256	1										
Cuahu	0.1174	0.2408	0.2940	0.9709	0.2810	1									
Ixt	0.0481	0.4229	0.3808	0.5738	0.8093	0.3042	1								
Mix	0.0279	0.2765	0.4598	0.7656	0.3260	0.3329	0.5066	1							
Nec	0.0508	0.0537	0.0646	0.2242	0.0627	0.0632	0.0286	0.0772	1						
Qro	0.0035	0.0283	0.0636	0.0870	0.1062	0.0047	0.0093	0.0113	0.0885	1					
Quet	0.1031	0.2369	0.6400	0.9361	0.2850	0.8685	0.2284	0.3561	0.0626	0.0081	1				
Tiz	0.3966	0.3119	0.3104	0.5682	0.7761	0.4725	0.5928	0.1805	0.0579	0.0533	0.4068	1			
Tza	0.0160	0.0005	0.0004	0.0277	0.0330	0.0008	0.0003	0.0000	0.0019	0.0000	0.0009	0.1123	1		
Vento	0.2046	0.7085	0.8654	0.6842	0.5076	0.4990	0.4037	0.7346	0.0845	0.0316	0.6927	0.3220	0.0006	1	
Zih	0.2695	0.2119	0.2608	0.2616	0.3450	0.1287	0.1322	0.1072	0.0706	0.2328	0.1442	0.4050	0.0924	0.2280	1

P < 0.05\*\*\*



**Figura 21.** (A). Análisis de Componentes Principales en 3 dimensiones usando los primeros 3 PC. (B) Análisis de Variables Canónicas.

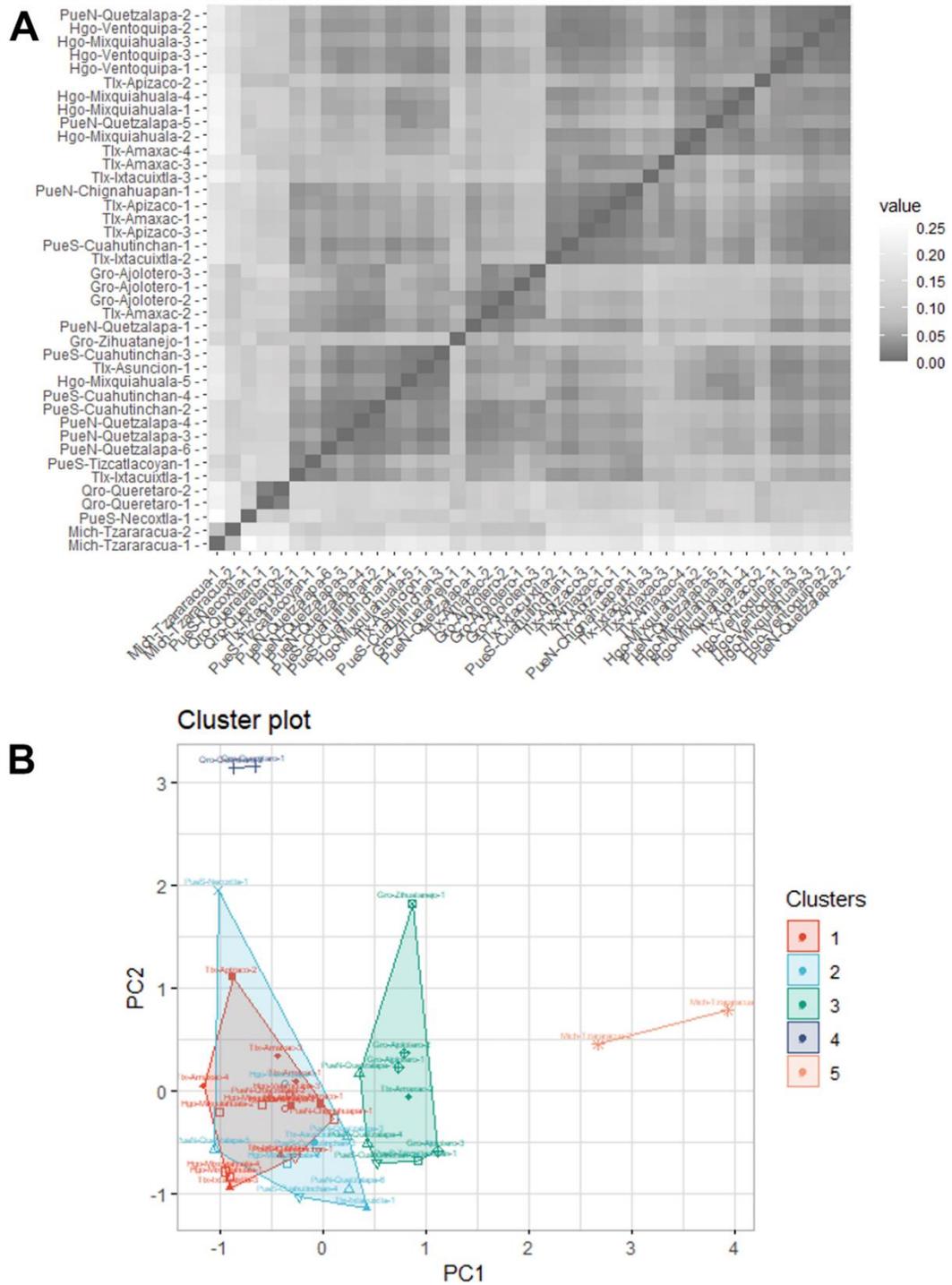
## Análisis de similitud

Las distancias euclidianas (Fig. 22 A; Anexo I) son ligeramente más consistentes tanto con los análisis moleculares como con el PCA. Las distancias que presentan las poblaciones que componen el clado A, i.e., *P. americana s. str.* (Fig.14) son bajas y oscilan entre los 0.07-0.107. Asimismo, la población de Ajolotero (Fig. 14 Clado B) presenta también un rango de distancias bajo con respecto a *P. americana s. str.* oscilando entre los 0.015-0.124.

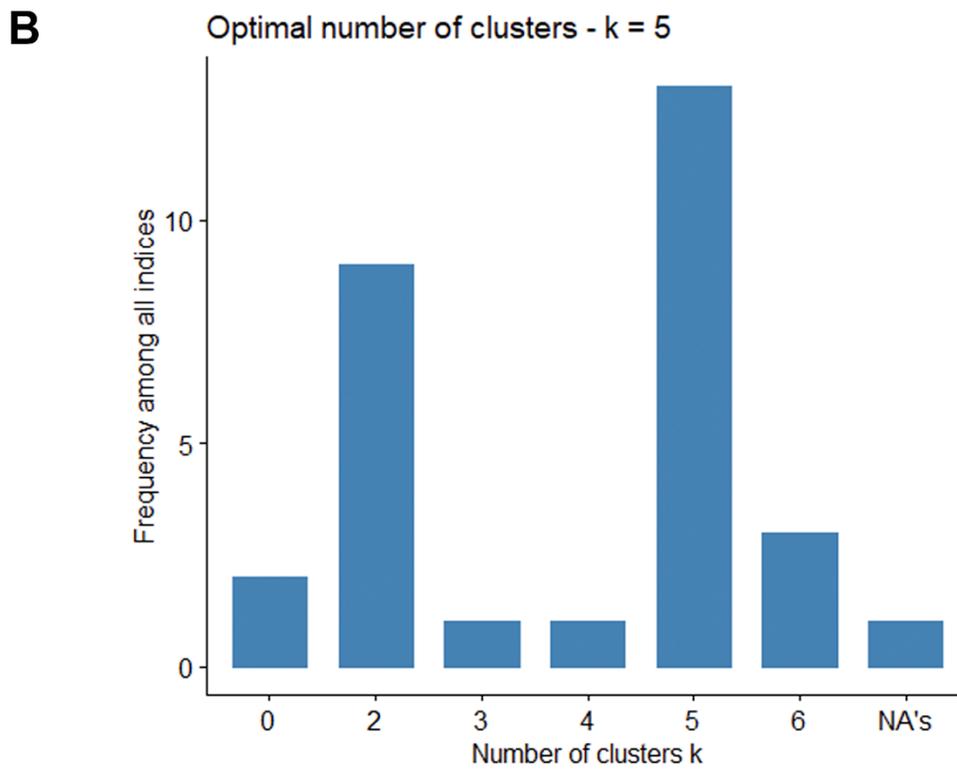
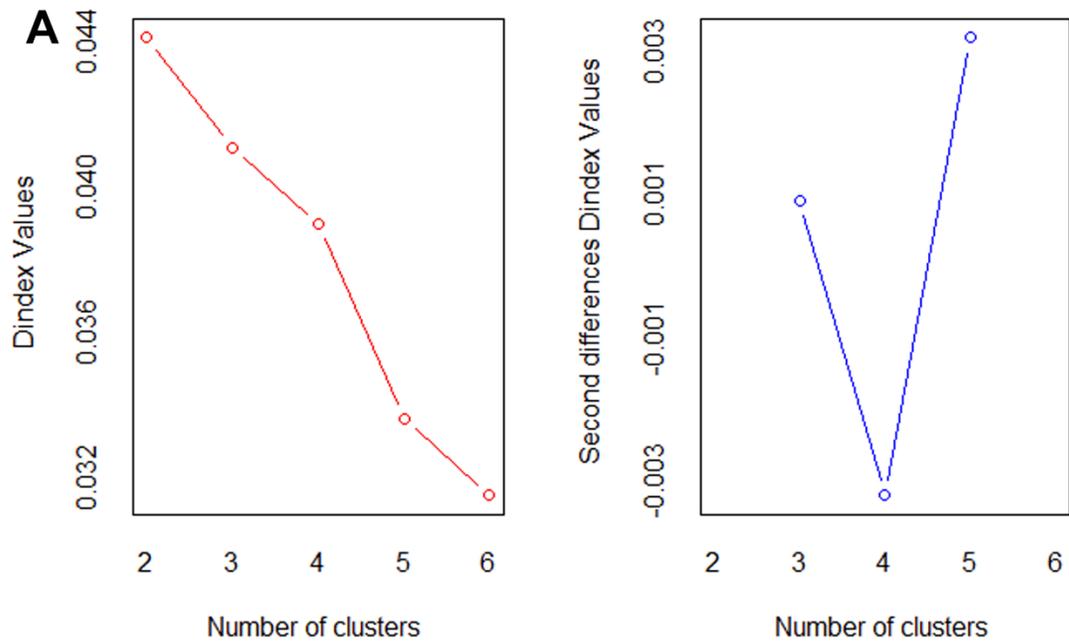
Es interesante observar que mientras más nos alejamos filogenéticamente de *P. americana s. str.*, el grado de similitud disminuye también. Los ejemplares de Necoxtla (Fig. 14 Clado C) presentan un rango de distancias de entre 0.078-0.165 con respecto a las poblaciones del clado A; mientras que contra Ajolotero van de 0.106-0.136. Querétaro se encuentra muy bien diferenciada de los linajes mencionados con anterioridad en un rango que va de 0.071-0.143 contra *P. americana s. str.*; 0.117-0.155 *versus* Ajolotero; y 0.113-0.127 respecto a Necoxtla.

Por último, de los dos miembros del Clado D (Fig. 14), sólo Tzararacua destaca por presentar las distancias euclidianas mayores con respecto a todos los linajes evaluados oscilando los 0.086-0.259; mientras que Zihuatanejo se encuentra más bien moderadamente distante de las poblaciones anteriores yendo del 0.054-0.138.

El total de clústers óptimo sugerido para nuestro set de datos fue de cinco (Fig. 23). De los grupos establecidos en función de sus K-medioides, únicamente Querétaro -cluster 4- y Tzararacua -clúster 5- se recuperaron como grupos independientes. Por otro lado, las poblaciones de Guerrero, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala quedan mezcladas en los clústers restantes. Los grupos 1 y 2, se encuentran formados tanto por individuos provenientes de Tlaxcala como de Puebla e Hidalgo. El cluster 3, se encuentra diferenciado de los dos grupos anteriores y está formado por la totalidad de ejemplares provenientes de Guerrero, no obstante, algunos individuos provenientes de Amaxac -Tlaxcala- y Quetzalapa -Puebla Norte- se encuentran también embebidos en él.



**Figura 22.** (A) Gráfica de distancias euclidianas. (B) Número de clústers construidos en función de sus K-medioides.



**Figura 23.** Número de clúster establecidos. (A) Índice-D sugiriendo un total de 5 clústers (B) Número de clústers encontrados por los diferentes índices de Nbclust.

## Análisis morfológico

### Tratamiento taxonómico

Superfamilia Pseudothelphusoidea Ortmann, 1893

Familia Pseudothelphusidae Ortmann, 1893

Subfamilia Pseudothelphusinae Ortmann, 1893

Género *Pseudothelphusa* De Saussure, 1857

### *Pseudothelphusa americana* sensu stricto (Láminas I-V; XI-XIII; XVII-XXVII; XXXIV)

***Pseudo-Thelphusa americana***: De Saussure, 1857: 305 (localidad: Haití).

***Potamia americana***: De Saussure, 1858: 436, Pl. II, figs. 12 y 12a (localidad: Haití).

***Pseudothelphusa Americana***: Smith, 1870: 146 (localidad: Haití).

***Potamocarcinus americanus***: Ortmann, 1897: 317 (localidad: Haití).

***Potamocarcinus dugesi***: Ortmann, 1897: 317 (localidad: México).

***Pseudothelphusa (Pseudothelphusa) americana americana***: Bott, 1968: 40, Abb. 1 a, b (localidades: Haití. Cuba. México: Guerrero, Chilapa); Bott 1970: 334 (localidad: Cuba); Pretzmann 1972: 101, Abbs. 593-598, 643-646 (localidades: Haití. México: Guanajuato; Morelos; Puebla; Guerrero; Oaxaca).

***Pseudothelphusa (Pseudothelphusa) americana***: Chace y Hobbs, 1969: 149. Figs. 42, 43e (localidades: Cuba. La Española (i.e., Haití y República Dominicana). Centro y suroeste de México); Rodríguez y Smalley 1972 (por implicación).

***Pseudothelphusa americana americana***: Pretzman, 1971: 22 (no indica localidad).

***Pseudothelphusa americana fma. Mixquiahuala***: Villalobos-Hiriart, 2005: 227, Lám. XII (localidad: México: Hidalgo, Mixquiahuala).

***Pseudothelphusa americana***: Pocock, 1889: 10 (no especifica procedencia); Rathbun, 1898: 533 (localidades: Haití. Cuba. México: Guanajuato, Guanajuato; Puebla, Chignahuapan; Guerrero, Amula; Oaxaca, Oaxaca); Young, 1900: 207 (localidades: Haití. Cuba. México); Rathbun, 1905: 259 (localidades: Haití. Cuba. México: Guanajuato; Puebla; Morelos; Guerrero y Oaxaca); Coiffman, 1939: 106 (no indica localidad); Pretzmann, 1965: 4 (no indica localidad); Rodríguez, 1982: 137 (localidades: México: Puebla, Chignahuapan; Guerrero, Amula); Villalobos-Figueroa, 1982: 221 (localidades: México: Puebla, Chignahuapan; Oaxaca; Morelos; Guanajuato; Guerrero); Villalobos-Hiriart *et al*, 1993 (no indica localidad); Villalobos-Hiriart, 2005: 223, Lám. XII (localidad: México: Puebla, Chignahuapan).

### Lote usado para la redescipción:

#### Puebla

**CNCR 355 (Lám. I)** "*Pseudothelphusa americana*; Chignahuapan, Puebla; -/V/1944; Col. A Villalobos-Figueroa; Det. F Álvarez" (2 machos AC=28.74-38.41 mm, LC=19.41-25.73 mm; 2 hembras AC=24.80 mm, LC=16.92 mm).

### Material adicional examinado:

#### Puebla

**CNCR 13409** "*Pseudothelphusa americana*; Río San Isidro, Zacatlán de las Manzanas, Puebla; 18/VII/91; Cols. H Brailovsky y E Barrera, Det. KJ Madrigal" (5 hembras AC=33.63-40.59 mm, LC=22.02-26.10 mm).

**CNCR 25527 (Lám II; Lám. XXIII)** "*Pseudothelphusa americana*; Río Ajajalpa en las cascadas de Quetzalapa, Zacatlán de las Manzanas, Puebla; 15/X/00; Cols. JL Villalobos y J Segura. Det. JL Villalobos" (7 machos AC=17.84-30.75 mm, LC=12.35-20.69 mm; 3 hembras AC=24.27-40.68 mm, LC=16.28-26.40 mm).

**CNCR 26108 (Lám. XIII B; Lám. XXIV)** "*Pseudothelphusa americana*; Arroyo entre los poblados de Tizcatlacoyan y San Antonio Juárez; 20/VI/2010; Cols. M Olson y A Páez-García; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC=36.45 mm, LC=22.36 mm; 1 hembra AC=29.06 mm, LC=16.82 mm).

**CNCR 31700 (Lám. XXV)** "*Pseudothelphusa americana*; La Magdalena Cuauixtla, Tecali de Herrera; 15/XI/2019; Col. R Hernández Austria; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC= 20.26 mm, LC = 13.56 mm).

**CNCR 36154 (Lám. XIII A)** "*Pseudothelphusa americana*; Río Salto Quetzalapa, Zacatlán de las Manzanas, Puebla; 11/XI/21, Cols. KJ Madrigal, E Moreno, JL Villalobos; Det. KJ Madrigal" (5 machos AC=32.63-41.16 mm, LC=22.43-27.29 mm; 2 hembras AC=31.68-40.96 mm, LC=21.67-26.45 mm).

**CNCR 36157** "*Pseudothelphusa americana*. Manantial en poblado de Michac, Chignahuapan, Puebla, 12/XI/2021; Cols. E Moreno, KJ Madrigal, JL Villalobos; Det. KJ Madrigal" (1 hembra AC=25.36 mm; LC=17.02 mm).

**CNCR 36550** "*Pseudothelphusa americana*; Arroyo en el poblado de Cuahutinchán, Cuahutinchán, Puebla; 29/V/2022, Cols. KJ Madrigal, JL Villalobos, J Santillán; Det. KJ Madrigal" (4 machos AC=31.92-37.07 mm, LC=18.92-22.32 mm; 2 hembras AC=25.60-32.40 mm, LC=15.05-18.31 mm).

#### **Tlaxcala**

**CNCR 10460 (Lám. XI A; Lám. XVII)** "*Pseudothelphusa americana*; Manantial en Apizaco, Tlaxcala; 2/XII/1987; Col. E Bonilla; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC=24.78 mm, LC=15.03 mm).

**CNCR 33848 (Lám. XXII)** "*Pseudothelphusa americana*; La Ascensión Huitzcolotepec, Tlaxcala; 12/I/97, Col. R Robles. Det. KJ Madrigal" (2 machos AC=7.48-19.06 mm, LC=3.95-11.11 mm).

**CNCR 35390 (Lám XVIII)** "*Pseudothelphusa americana*; Arroyo bajo el puente en el Balneario "El Ojito", Apizaco, Tlaxcala; 17/VIII/2019; Cols. E Moreno y Y Montiel; Det. JL Villalobos y E Moreno" (2 machos AC=25-35.61 mm, LC=14.96-22.04 mm; 2 hembras AC=32.12-32.80 mm, LC=18.12-19.91 mm).

**CNCR 35900 (Lám. IV; Lám. XIII A; Lám. XIX)** "*Pseudothelphusa americana*; San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala; 16/V/2021; Cols. KJ. Madrigal, CF Vergara, J Jiménez, A Vergara, G Ugarte, R Rugerio; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC= 37.37 mm, LC=23.31 mm).

**CNCR 35901** "*Pseudothelphusa americana*; San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala; 16/V/2021; Cols. KJ. Madrigal, CF Vergara, J Jiménez, A Vergara, G Ugarte, R Rugerio; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC=19.19 mm, LC=11.29 mm; 2 hembras AC=31.45-35.44 mm, LC=18.74-21.06 mm).

**CNCR 35902 (Lám. III; Lám. XI B; Lám. XX)** "*Pseudothelphusa americana*; Manantial Palo Huérfano, Barrio de Atotonilco, sección 3ª, Amaxac de Guerrero, Tlaxcala; 25/V/2021; Cols. KJ Madrigal y R Rugerio; Det. KJ Madrigal" (4 machos AC=27.07-30.44 mm, LC=15.40-17.77 mm; 1 hembra AC=26.29 mm, LC=15.55 mm).

**CNCR 35904** "*Pseudothelphusa americana*, San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala, 16/V/2021; Cols. KJ. Madrigal, CF Vergara, J Jiménez, A Vergara, G Ugarte, R Rugerio; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC=30.59 mm, LC=17.44 mm).

**CNCR 35970 (Lám. XX)** "*Pseudothelphusa americana*; San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala; 2/IX/2021, Cols. KJ Madrigal, C Vergara y J Jiménez; Det. KJ Madrigal" (3 machos AC=22.94-28.35 mm, LC=13.90-17.22 mm; 1 hembra AC=27.45 mm, LC=16.12 mm).

**CNCR 36158** "*Pseudothelphusa americana*, Manantial "El Ojito", Apizaquito, Tlaxcala; 10/XI/2021; Cols. E Moreno, KJ Madrigal, JL Villalobos; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC=15.56 mm, LC=8.89 mm).

**CNCR 36508** "*Pseudothelphusa americana*; La Ascensión Huitzcolotepec, Tlaxcala; 15/IV/2022, Cols. KJ Madrigal, CF Vergara; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC=32.09 mm, LC=19.45 mm; 4 hembras AC=29.37-39.28 mm, LC=16.89-23.21 mm).

#### **Hidalgo**

**CNCR 340 (Lám. V; Lám. XXVII)** "*Pseudothelphusa americana*; Ventoquipa, Hidalgo; 16/IV/1967; Cols. AE Rabling; Det. JL Villalobos" (4 machos AC=16.96-32.88 mm, LC=9.92-19.27 mm; 4 hembras AC=13.90-29.85 mm, LC=8.16-18.14 mm).

**CNCR 12925 (Lám. XII B; Lám. XXVI)** "*Pseudothelphusa americana*; Mixquiahuala, Hidalgo; 10/7/94; Col. Baltazar Barrera; Det. F Álvarez" (1 macho AC=24.51 mm, LC=14.51 mm).

**CNCR 36155 (Lám. XII B)** "*Pseudothelphusa americana*; Manantiales en el Balneario "Baño Grande", Mixquiahuala, Hidalgo; 13/XI/2021, Cols. KJ Madrigal, JL Villalobos y E Moreno; Det. KJ Madrigal" (9 machos AC=15.13-27.75 mm, LC=8.50-16.73 mm; 8 hembras AC=20.51-31.66 mm, LC=12.23-19.20 mm)

**CNCR 36155** "*Pseudothelphusa americana*; Manantial en Ventoquipa, Santiago Tulantepec de Lugo, Hidalgo; 12/XI/2021; Cols. E Moreno, KJ Madrigal, JL Villalobos; Det. KJ Madrigal" (2 machos AC=21.36-26.69 mm, LC=12.81-15.78 mm; 4 hembras AC=18.04-23.27 mm, LC=10.68-14.04 mm).

**Redescripción. Vista dorsal.** Caparazón ligeramente convexo; superficie finamente punteada y ligeramente reticulada, puntuación más densa entre lóbulos postfrontales y borde frontal inferior. Borde frontal superior ausente; frente suavemente dirigida hacia abajo; borde frontal inferior bilobulado, continuo, grueso y ligeramente punteado en extremos laterales, dándole una apariencia crenada, parte central con depresión somera y estrecha. Lóbulos postfrontales distinguibles, poco elevados. Surco medio frontal poco definido, amplio; surcos cervicales suavemente marcados, rectos y poco profundos, no llegan al margen anterolateral. Región gástrica bien definida, convexa y ligeramente más alta que la región branquial; región cardiaca marcada por tres depresiones bien definidas, dos superiores, colindantes con región urogástrica, y una inferior, colindante con región intestinal. Suturas urogástricas en forma de "y" dispuestas horizontalmente, poco curvadas en porción media, alargadas. Escotadura del ángulo orbital externo ausente. Margen

anterolateral granuloso, gránulos poco prominentes, más evidentes en sección meso-branquial, disminuyen en tamaño progresivamente en dirección anterior; margen posterior recto.

**Vista frontal (Lám. I).** Borde frontal inferior ligeramente inclinado hacia el centro, convexo a nivel de fosas antenulares, sin ensanchamientos en extremos laterales. Órbitas subcuadrangulares; margen inferior suavemente crenado, dispuesto horizontalmente; ángulo orbital externo subagudo y con escotadura lateral; diente orbital subtriangular, acanalado. Antenas no separadas de la frente; artejo basal antenal no cubierto por los bordes laterales del margen frontal inferior; anténulas biflageladas, flagelo interno bien desarrollado, flagelo externo muy reducido. Septo internantennular pequeño, afilado, insertado por debajo del borde frontal inferior. Opérculo de la glándula antenal ovoide, con mechón de cerdas en la porción externa. Abertura del canal eferente subrectangular, la relación anchura/longitud es de 1.92 veces. Diente epistomal a nivel de septo, triangular, dirigido hacia abajo, punta ligeramente proyectada anteriormente. Región pterigostomiana y epistoma pubescentes. Terceros maxilípedos cubren completamente la cavidad bucal; isquio del tercer maxilípedo subtrapezoidal, la relación anchura/longitud es de 0.89 veces, ornamentado en el margen gnatal con dientes pequeños, triangulares, que decrecen progresivamente, mechones de cerdas dispuestos entre cada diente; mero con el borde lateral redondeado, no se extiende más allá de la cavidad bucal, la relación anchura/longitud es de 1.25 veces; muesca anterior presente, bien definida; borde gnatal suavemente excavado para permitir la inserción del palpo, ornamentado en la porción inferior con dientes pequeños y cerdas largas; palpo pubescente cefalo-mesialmente, más densa en dirección al dactilo; superficie del tercer maxilípedo punteada, puntuación en el borde gnatal setífera, distribuida a lo largo del eje longitudinal; exópodo más ancho en la base, termina en punta aguda, la relación largo exópodo/largo isquio es de 0.83 veces.

Quelípedos asimétricos. Mero ornamentado en borde interno con tubérculos pequeños; carpo con borde interno granuloso, gránulos pequeños, redondeados y amplios, armado con una espina triangular, ancha y de punta redondeada. Quela mayor con la superficie de la palma punteada; dactilo y dedo fijo separados por un hueco amplio; dactilo esbelto y curvado; bordes cortantes dentados, dientes romos, notablemente desgastados.

Primer par de gonópodos del macho robustos. **Vista caudal.** Tercio distal recto; cresta del lóbulo distal de la proyección caudo-marginal más alta que la cresta lateral; extremo distal de la superficie caudal con concavidad amplia y moderadamente profunda. Superficie caudal del proceso mesial con lóbulo basal ubicado proximalmente, poco desarrollado y redondeado. **Vista mesial.** Proyección caudo-marginal con la superficie subapical del margen caudal ligeramente excavada; cresta del lóbulo distal lisa, redondeada en la mitad caudal, recta en la mitad cefálica; lóbulo distal pequeño, ligeramente inclinado hacia abajo, con punta subaguda, ornamentado en la punta con una espina fina, poco prominente y aguda, separado del lóbulo proximal por una muesca en forma de "V"; lóbulo proximal en forma de "U" alargada, la relación longitud/anchura es de 1.85 veces, dirigido proximalmente, con el margen cefálico liso y curvándose agudamente en la porción final hasta alcanzar el margen caudal. **Vista cefálica.** Tercio distal recto, lóbulos distal y proximal dispuestos en el mismo plano, carena larga en cara interna del lóbulo proximal, alcanza la porción media y llega al borde interno del lóbulo, moderadamente ensanchada. Proceso mesial subtriangular, perpendicular al eje principal del gonópodo, termina lateralmente en una espina aguda; borde superior del proceso mesial con cresta sinusoidal y corta, comienza en porción media

y se extiende hasta el lóbulo interno; borde inferior del proceso mesial curvado hasta la espina lateral; lóbulo interno del proceso mesial subtriangular, subagudo y entra en contacto con la superficie interna de lóbulo proximal. **Vista lateral.** Proceso mesial levemente proyectado latero-caudalmente. **Vista distal.** Cavidad apical en forma de “U”; cresta central de la cavidad apical subtriangular, amplia; cavidad apical poco profunda; campo apical de espinas dispuesto en una franja central con aproximadamente 20 espinas medianas, las más cefálicas están cubiertas parcialmente por borde superior del proceso mesial Orificio espermático en posición caudal. Proceso mesial corto, espina lateral poco ensanchada proximalmente, recta y dirigida lateralmente.

**Observaciones.** Los ejemplares que se encontraban en el lote usado para la descripción se encontraban parcialmente fragmentados.

Las poblaciones pertenecientes a esta especie habitan en espacios bastante particulares. En Mixquiahuala, Hidalgo, se encontraron cangrejos cerca de un nacimiento de agua que abastece a un parque recreativo pequeño con albercas y que finalmente vierte hacia el contaminado río Tula. Por otra parte, en Ventoquipa, las poblaciones se encontraban recluidas manantial en medio de un poblado que es continuamente explotado para abastecer de agua a la comunidad y que sirve, a su vez, como parque recreativo cuyas instalaciones sanitarias no son adecuadas. En el estado de Puebla, se exploraron las localidades cercanas a Chignahuapan y Zacatlán de las Manzanas. Ahí, locales comentaban que usualmente niños suelen capturar inocentemente algunos individuos para jugar con ellos y manipularlos de alguna manera; en Michac la explotación de un pequeño manantial ha perturbado la dinámica de las poblaciones de esta especie; mientras que Cuahutinchán adolece de los mismos problemas que Mixquiahuala, es decir, se trata de un área recreativa usada para bañarse, nadar o pasar una tarde en familia. En Tlaxcala, las poblaciones del Ojito en Apizaco se encuentran en una encrucijada entre una bomba que provee de agua de manantial para abastecer a una refresquera y un balneario; por otra parte, las poblaciones de Amaxac de Guerrero se encontraban restringidas a habitar un pequeño canal de aproximadamente 30 cm de ancho y que a pesar de que recorre casi todo el pueblo, solamente se encontraban cerca del nacimiento de agua debajo de un Ahuehuete.

Las observaciones en campo permitieron ver que las poblaciones que componen esta especie se encuentran constantemente amenazadas, principalmente por factores antropogénicos. Además, algunos locatarios comentaron que anteriormente la gente solía salir a capturar *P. americana* con fines alimenticios, para comérselos crudos debido a una creencia que indicaba que eran “beneficiosos para la próstata” o simplemente como aperitivo, hervidos y con tortilla. Ciertamente es que la mayoría de los locales con los que se platicó concordaron en que la cantidad de cangrejos dulceacuícolas ha ido disminuyendo con el pasar de los años hasta el punto donde, según la gente, se han acabado.

**Variación morfológica.** El plano morfológico general de *P. americana* s. str. se mantiene constante a lo largo de las diferentes localidades donde se ha recolectado (i.e. Chignahuapan, Zacatlán, Cuahutinchán, Ixtacuixtla, Ascensión Huitzcolotepec, Apizaco y Amaxac de Guerrero). Sin embargo, algunas diferencias se hicieron patentes durante la revisión del material adicional. Por un lado, las diferencias somáticas comprenden la abertura del canal eferente que puede encontrarse subcuadrangular o subrectangular; la elevación de la región gástrica al mismo nivel que la región branquial; el grado de desarrollo del diente orbital interno; el grado de expresión de la espina en el

margen interno del carpo que va de ancha y redondeada hasta ancha y aguda -aunque se deba probablemente a un desgaste natural-. Por otro lado, las diferencias en el G1 del macho que incluyen, el grado de inclinación del tercio distal del gonópodo en vista cefálica; la extensión del lóbulo interno del proceso mesial que alcanza o no la cara interna del lóbulo proximal de la proyección caudo-marginal; el grado de ornamentación presente en el lóbulo distal de la proyección caudo-marginal que es evidente en mayor o menor medida en algunas poblaciones - particularmente en las pertenecientes a Tlaxcala, o estar ausente en otras; la amplitud de la escotadura que separa los dos lóbulos de la proyección caudo-marginal; la profundidad variable de la concavidad de la porción suapical de la cresta distal de la superficie caudal; y el nivel de desarrollo del lóbulo basal de la superficie caudal del proceso mesial. No obstante, toda la variación mencionada no presenta constancia ni entre poblaciones cercanas, ni entre individuos de la misma población, por lo que podrían estar reflejando la variación natural de la especie.

**Distribución.** *Pseudothelphusa americana* s. str. se distribuye en la zona centro de la FVTM, que abarca los estados de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala. Esta especie ha sido colectada en las localidades de Mixquiahuala, Ventoquipa, Zacatlán de las Manzanas, Chignahuapan, Michac, Cuahutinchán, San Miguel La Presa, Amaxac de Guerrero, Apizaco y la Ascensión Huitzcolotepec, siendo del quinto al octavo nuevos registros para los estados de Puebla y Tlaxcala.

**Comentarios taxonómicos.** En el presente trabajo se revisaron las propuestas de Villalobos-Hiriart (2005) en donde *P. americana* de Chignahuapan y *P. americana* fma. Mixquiahuala son potencialmente dos especies distintas. La filogenia molecular que incluyó a las poblaciones de Hidalgo -i.e., Mixquiahuala y Ventoquipa- sugiere que se trata de la misma especie. La evidencia morfo-geométrica indica que no existen diferencias significativas en forma (shape) de la proyección caudo-marginal en vista mesial entre las poblaciones de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala. Además, las observaciones morfológicas tampoco aportan evidencia suficiente como para considerarlas grupos independientes. Por lo tanto, se asume que todas las poblaciones estudiadas y que componen el Clado A (Fig. 6) comprenden a *Pseudothelphusa americana* s. str.

Villalobos-Hiriart (2005) propone que la especie que describió De Saussure en 1857 bajo el nombre *Pseudothelphusa americana* debió haber sido recolectada en la localidad de Chignahuapan, Puebla, debido a que las fotografías del G1 tomadas por Bott (1970) del ejemplar "Tipo" depositado por De Saussure en el Museo de Historia Natural de Ginebra -MHNG- y la morfología de dicho apéndice (Figs. 19; 3a, b, c) eran similares a la de los cangrejos citados por Rathbun (1898). Estos últimos, se encuentran depositados en el Museo Smithsoniano bajo el código USMN-27857 y cuyo G1 fue revisado y fotografiado por Villalobos-Hiriart durante su visita a la Colección de Crustáceos del USMN. Dichas fotografías también coinciden con las presentadas en esta tesis.

Sin embargo, en el libro de De Rouguin y Claude (1993), *Voayage aux Antilles et au Mexique*, donde publican una serie de cartas referentes a la expedición realizada por De Saussure en nuestro país, se muestra su itinerario de viaje (Fig. 24), y se revela que nunca realizó una visita a la localidad de Chignahuapan. De hecho, las únicas localidades que visitó en Puebla estaban restringidas a la parte sur del estado, i.e., al centro de la ciudad y a Cholula. Durante su expedición recorrió varios sitios donde potencialmente pudo haber recolectado a este taxón -Edo. Méx., Hidalgo, Morelos, Querétaro, Tlaxcala, y cada uno de los caminos que conducían a dichos estados-. Una revisión de las cartas escritas por el propio De Saussure, no parecen indicar claramente un lugar de un recolecta

preciso de cangrejos de agua dulce durante su estancia en los estados mencionados con anterioridad. Lo que sí es claro es que la hipótesis de Chignahuapan como localidad Tipo no queda aclarada con la información que provee el diario de su viaje.

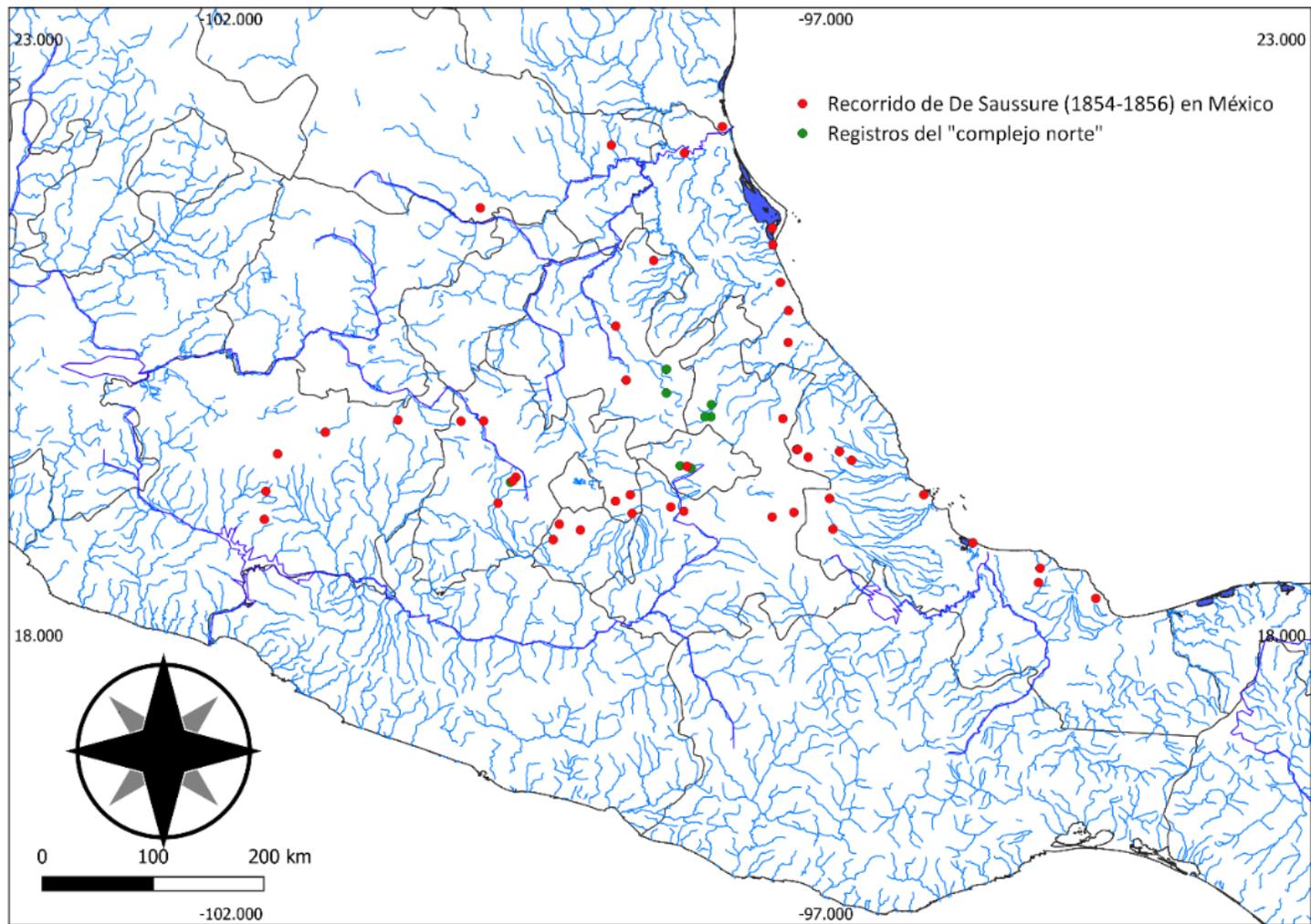
Información adicional, que incluyen una serie de fotografías (Lám. XXXIV), se obtuvo directamente de la mano del curador de la colección del MHNG, el Dr. Peter Hollier, junto con los datos revisados en Hollier (2018). Según el Dr. Hollier (com. pers.) De Saussure no solía tener mucho cuidado en el asunto de las localidades, y es muy difícil descifrar cuáles son errores y cuáles no. Hollier (2018), indica que el MNHG cuenta con tres ejemplares bajo el nombre de *P. americana* - MHNG-ARTO-16401, MHNG-ARTO-16402 y MHNG-ARTO-16403-. Según apunta, la serie no cuenta con ninguna especificación particular. Los tres ejemplares están fuertemente fragmentados, y la etiqueta de identificación reza “Cuba M. H. De Saussure”.

El asunto de la procedencia de *P. americana* es una verdadera incógnita. En varios de los trabajos revisados (Bott, 1968, 1970; Chace y Hobbs, 1999; Rathbun, 1898, 1905; Young, 1900) se menciona Cuba como localidad colecta de esta especie. Bott (1968) asegura que hubo una confusión de fondo, puesto que al describir tanto ejemplares de las Antillas como de México, De Saussure pudo haberse confundido al escribir Haití. Lo interesante es que pareciera ser que no sólo ocurrió una, sino dos confusiones de fondo, pues el artículo publicado en 1857 por De Saussure indica que la localidad tipo es Haití, mientras que los únicos ejemplares cuya etiqueta tiene el nombre de “H De Saussure” menciona Cuba. Hollier (2018) indica que tampoco está claro si los ejemplares depositados en el MHNG corresponden o no a los colectados por De Saussure, lo que nos deja con dos hipótesis:

1) Los ejemplares depositados en el MHNG sí corresponden a los ejemplares recolectados por De Saussure, dichos ejemplares altamente fragmentados corresponden a la serie sintipo y, por lo tanto, es necesario establecer un Lectotipo o, en caso de considerar la fuerte fragmentación de los ejemplares, un Neotipo.

2) Los ejemplares depositados en el MNHG no corresponden a los recolectados por De Saussure, ergo, la serie tipo se encuentra desaparecida por lo que es imperante erigir un Neotipo porta nombre.

Adicionalmente, es necesario consultar a la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica para aclarar el asunto de la localidad tipo, por la inconsistencia de localidades entre el artículo publicado y la etiqueta del ejemplar, así como por la incongruencia geográfica que supone a la distribución del género *Pseudothelphusa*.



**Figura 24.** Lugares visitados por De Saussure durante su expedición (1854-1856) contra los registros de *P. americana* que se cuentan en la CNCR del IBUNAM, para los estados de Hidalgo, Puebla (Norte) y Tlaxcala.

***Pseudothelphusa* sp. nov. 1 (Ajolorero)**  
(Láminas VI; XIV A; XXVIII)

***Pseudothelphusa (Pseudothelphusa) americana americana***: Bott, 1968: 40, Abb 1, figs. 1a, 1b (localidad: México: Guerrero, Chilapa, Xochitempa).

***Pseudothelphusa americana* fma. Chilapa**: Villalobos-Hiriart, 2005:127 (localidad: México, Guerrero, Chilapa, Río Ajolotero).

**Lote usado para la descripción:**

**Guerrero**

**CNCR 29077 (Lám. VI)** “*Pseudothelphusa* sp. nov. 1; Río Ajolotero, cerca de Chilapa, Gro; 9/VI/2000. Cols. JL Villalobos, A Celis, Olga y G García; Det. KJ Madrigal” (10 machos AC= 24.39-34.01 mm, LC=15.50-21.10 mm; 5 hembras AC=16.69-29.03 mm, LC=10.85-17.87 mm).

**Descripción. Vista dorsal (Lám. XIV, A1).** Caparazón ligeramente convexo; superficie finamente punteada y ligeramente reticulada, puntuación más densa cerca de margen anterolateral y entre lóbulos postfrontales y borde frontal inferior. Borde frontal superior ausente; frente curvada suavemente hacia abajo; borde frontal inferior bilobulado, continuo, grueso y liso, porción central del borde con depresión somera y amplia. Lóbulos postfrontales bien definidos, poco elevados. Surco frontal medio bien definido, amplio, poco profundo; surcos cervicales notablemente marcados, más anchos y profundos en porción proximal, no llegan al margen anterolateral. Región gástrica bien delimitada, convexa y ligeramente más alta que la región branquial, región cardiaca marcada por dos depresiones laterales someras que colindan con la región urogástrica. Suturas urogástricas en forma de “y” dispuestas horizontalmente, ligeramente inclinadas, curvadas en la porción media. Escotadura en ángulo orbital externo ausente. Margen anterolateral denticulado, denticulos poco prominentes, más notables en sección meso-branquial, disminuyen en tamaño progresivamente en dirección anterior; margen posterior recto.

**Vista frontal (Lám. VI).** Borde frontal inferior recto, convexo a nivel de fosas antenulares, sin ensanchamientos en extremos laterales. Órbitas subrectangulares; margen orbital ligeramente crenado en bordes inferior y lateral; borde inferior ligeramente inclinado, borde mesial ligeramente ensanchado, ángulo orbital externo subagudo y con escotadura; diente orbital interno subtriangular, acanalado, bien desarrollado. Antenas no separadas de la frente; artejo basal antenal no cubierto por extremos laterales del borde frontal inferior; anténulas biflageladas, flagelo interno bien desarrollado, flagelo externo muy reducido. Septo interantenal pequeño, afilado, insertado por debajo del borde frontal inferior. Opérculo de la glándula antenal ovoide, con mechón en porción externa. Abertura del canal eferente subcuadrangular, la relación anchura/longitud es de 1.2 veces. Diente epistomal a nivel de septo, triangular, dirigido hacia abajo. Región pterigostomiana y epistoma pubescentes. Terceros maxilípedos cubren completamente la cavidad bucal; isquio del tercer maxilípedo subtrapezoidal, la relación anchura/longitud es 0.90 veces; ornamentado en el margen gnatal con dientes pequeños, subtriangulares que decrecen en tamaño progresivamente, mechones de cerdas dispuestos entre cada diente, cerdas largas; mero del tercer maxilípedo con borde lateral redondeado, no se extiende más allá de la cavidad bucal, la relación anchura/longitud es de 1.21 veces; muesca anterior presente, somera; borde gnatal suavemente excavado para permitir la inserción del palpo, ornamentado en porción inferior con dientes pequeños y cerdas

largas; palpo pubescente cefalo-mesialmente, más densa en dirección al dácilo; superficie del tercer maxilípedo punteada, puntuación en el borde gnatal setífera, distribuida de manera longitudinal en una línea delgada y continua; exópodo ancho en base, termina en punta aguda, la relación largo exópodo/largo isquio es de 0.65 veces.

Quelípedos asimétricos (**Lám. XIV A1**). Mero ornamentado en borde interno con tubérculos pequeños; carpo con borde interno granuloso, gránulos pequeños, agudos y muy juntos, armado con una espina triangular, ensanchada y aguda. Quela mayor con la superficie de la palma punteada; dácilo y dedo fijo separados por un hueco moderado; dactilo ligeramente ensanchado y poco curvado; bordes cortantes dentados, dientes subagudos grandes y pequeños, intercalados sin orden aparente.

Primer par de gonópodos del macho robustos (**Lám. XXVIII**). **Vista caudal.** Tercio distal recto; cresta del lóbulo distal de la proyección caudo-marginal ligeramente más alta que la cresta lateral; extremo distal de la superficie caudal con concavidad somera y amplia. Superficie caudal del proceso mesial con lóbulo basal ubicado proximalmente, notablemente desarrollado, cónico y basalmente amplio. **Vista mesial.** Proyección caudo-marginal con la superficie subapical del margen caudal ligeramente excavada; cresta del lóbulo distal lisa, redondeada en la mitad caudal, recta en la cefálica; lóbulo distal pequeño, con ápice agudo y dirigido hacia abajo, se proyecta levemente en sentido mesial, ornamentación ausente, separado del lóbulo proximal por una muesca en forma de "V" amplia; lóbulo proximal en forma de "U", la relación longitud/anchura es de 1.66 veces, ligeramente oblicuo al eje principal del gonópodo, esbelto y con ápice subagudo. **Vista cefálica.** Tercio distal moderadamente inclinado lateralmente, lóbulos distal y proximal no dispuestos en el mismo plano, carena ancha y larga en cara interna del lóbulo proximal, alcanza poco más de la mitad del lóbulo. Proceso mesial subtrapezoidal, perpendicular al eje principal del gonópodo, terminado lateralmente en una espina triangular de ápice subagudo; borde superior del proceso mesial recto, con cresta larga y sinusoidal, abarcando dos terceras partes del proceso hasta el lóbulo interno; borde inferior con la mitad proximal convexa y la distal suavemente cóncava que continua hasta la espina lateral dándole una apariencia trapezoidal; lóbulo interno del proceso mesial subcuadrangular, laminar y en contacto con la superficie interna del lóbulo proximal de la proyección caudo-marginal. **Vista lateral.** Proceso mesial curvado latero-caudalmente. **Vista distal.** Cavidad apical en forma de "U" estrecha; cresta central de la cavidad apical subtriangular, profunda; campo apical de espinas dispuesto en una franja central con aproximadamente 14 espinas medianas, las más cefálicas están cubiertas parcialmente por el borde superior del proceso mesial. Orificio espermático dispuesto en posición caudal. Proceso mesial con la espina lateral moderadamente esbelta en la porción basal, curvada y dirigida latero-caudalmente.

**Observaciones.** Esta especie presenta una extrema similitud, en términos del G1 del macho, con *P. americana s. str.*, particularmente en vista mesial. A pesar de ello, es posible reconocer ciertas diferencias en otras estructuras y vistas que nos permiten reconocerla con facilidad. En primer lugar, *Pseudothelphusa* sp. nov. 1 de Ajolotero cuenta con un desarrollo más evidente del lóbulo basal del proceso mesial, perceptible lateral y distalmente, contrario a *P. americana s. str.* en donde no es tan prominente; la proyección caudo-marginal en vista cefálica se aprecia ligeramente inclinada lateralmente, mientras que en *P. americana s. str.* es recta; a su vez, el proceso mesial en vista distal es moderadamente alargado y esbelto, en *P. americana s. str.* se presenta ligeramente más corto y ensanchado proximalmente. Adicionalmente, algunas estructuras presentan diferencias

morfométricas notables, en primer lugar, en *Pseudothelphusa* sp. nov. 1, la relación largo exópodo/largo isquio es de 0.65 veces, mientras que en *P. americana* s. str. es de 0.83 veces; por otra parte, la relación longitud/anchura del lóbulo proximal de la proyección caudo-marginal es de 1.66 veces en *Pseudothelphusa* sp. nov. 1 en contraste con las 1.85 veces que presenta *P. americana* s. str.

**Variación morfológica.** Dentro del mismo lote usado para la descripción, se encontraron ejemplares con cierto nivel de variación, e.g., el diente orbital interno que presenta diferentes tamaños, en algunos individuos se encuentra muy poco definido, mientras que otros de la misma talla (i.e., 33.84 mm) presentan un grado de desarrollo mayor; incluso el borde frontal inferior, aunque generalmente recto, puede presentarse ligeramente inclinado hacia el centro.

**Distribución.** Esta especie se distribuye únicamente en el estado de Guerrero. Se ha colectado tanto en Xochitempa y en el Río Ajolotero. Ambas localidades cerca del municipio de Chilapa.

**Comentarios taxonómicos.** Bott (1968) revisó ejemplares provenientes de la localidad de Xochitempa cerca de Chilapa, Guerrero. Al parecer, el autor consideró dichos ejemplares como pertenecientes a la entonces *Pseudothelphusa (Pseudothelphusa) americana americana*; sin embargo, no hace más comentarios respecto a ella. Villalobos-Hiriart (2005) la reconoce como una forma independiente de *P. americana*, no obstante, tampoco hace ninguna aclaración al respecto, ni ofrece descripción alguna. Como se demostró en el presente trabajo, las poblaciones pertenecientes a Ajolotero, se encuentran emparentadas directamente con el clado *P. belliana-P. hoffmanae*, completamente separadas del clado *P. americana* s. str. (Fig. 6). Por lo tanto, se cuenta con evidencia molecular, morfológica y geográfica suficiente para poder establecerla como hipótesis específica.

***Pseudothelphusa* sp. nov. 2 (Necoxtla)**  
**(Láminas VII; XV A; XXIX)**

***Pseudothelphusa americana* fma. Tehuacán:** Villalobos-Hiriart, 2005: 230, Lám. XIV (localidad: México: Puebla, San Marcos Necoxtla).

**Lote usado para la descripción:**

**Puebla**

**CNCR 36592 (Lám. VIII; Lám XV A)** "*Pseudothelphusa* sp. nov. 2; Canal subterráneo artificial para el abastecimiento de agua en San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla; 31/VII/2022; Cols. KJ Madrigal, EF Huerta, M Hermoso y A Estradas; Det. KJ Madrigal" (2 machos AC= 27.1-37.45 mm, LC=17.92-24.49 mm; 3 hembras AC=31.67-36.08 mm; LC=21.02-22.71 mm)

**Material adicional examinado:**

**Puebla**

**CNCR 22682 (Lám. XXIX)** "*Pseudothelphusa* sp. nov. 2; Sn. Marcos Necoxtla, Mpio. Tehuacán, Puebla; 6/V/95; Cols. L Hermoso y M Hermoso; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC=33.3; LC=21.1).

**CNCR 36591** "*Pseudothelphusa* sp. nov. 2; Canal subterráneo artificial para el abastecimiento de agua en San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla; 24/VII/2022; Cols. EF Huerta, M Hermoso y L Hermoso, Det. KJ Madrigal" (3 machos AC=29.82-32.33, LC=19.85-21.47; 2 hembras AC=23.8-29.72, LC=16.38-19.54)

**Descripción. Vista dorsal (Lám. XV A1).** Caparazón ligeramente convexo; superficie finamente punteada y ligeramente reticulada, puntuación más evidente cerca del borde frontal inferior. Borde frontal superior ausente; frente suavemente curvada hacia abajo; borde frontal inferior bilobulado, continuo, grueso y ligeramente punteado, dándole una apariencia crenada, parte central con depresión somera y amplia. Lóbulos postfrontales distinguibles, apenas insinuados. Surco medio frontal poco definido, amplio; surcos cervicales bien definidos, rectos, más profundos en porción proximal, no alcanzan el margen anterolateral. Región gástrica bien delimitada, convexa y ligeramente más alta que la región branquial; región cardiaca marcada por cuatro depresiones profundas, dos superiores, colindantes con región urogástrica y dos inferiores, colindantes con región intestinal. Suturas urogástricas en forma de "y" esbeltas dispuestas horizontalmente, rectas en porción media. Escotadura del ángulo orbital externo presente como resultado de la ornamentación del margen anterolateral, somera. Margen anterolateral suavemente granuloso, gránulos muy poco prominentes, amplios, aumentan su amplitud en dirección anterior; margen posterior recto.

**Vista frontal (Lám. VIII).** Borde frontal inferior recto, convexo a nivel de fosas antenulares, con ensanchamiento notable en extremos laterales. Órbitas subcuadrangulares; margen orbital completamente crenado; borde inferior ligeramente inclinado; ángulo orbital externo redondeado y sin escotadura lateral; diente orbital interno subtriangular, corto, acanalado y con ápice redondeado. Antenas no separadas de la frente por hueco pequeño; artejo basal antenal cubierto parcialmente por ensanchamientos del ángulo lateral del borde frontal inferior; anténulas biflageladas, flagelo interno bien desarrollado, flagelo externo extremadamente reducido. Septo

interantennular pequeño, redondeado y no visible, insertado por debajo del borde frontal anterior. Opérculo de la glándula antenal ovoide, con mechón en extremo lateral. Abertura del canal eferente subcuadrangular, la relación anchura/longitud es de 1.13 veces. Diente epistomal a nivel de septo, triangular, dirigido hacia abajo. Región pterigostomiana y epistoma pubescentes. Terceros maxilípedos cubren completamente la cavidad bucal; isquio del tercer maxilípodo subtrapezoidal, la relación anchura/longitud es de 0.84 veces, ornamentado en el margen gnatal con dientes pequeños, subcuadrangulares, que decrecen en tamaño progresivamente, mechones de cerdas largas dispuestos entre cada diente; mero del tercer maxilípodo con borde lateral redondeado, la relación anchura/longitud es de 1.21 veces, muesca anterior presente, bien definida; borde gnatal suavemente excavado para permitir la inserción del palpo, ornamentado en porción inferior con dientes pequeños y cerdas largas; palpo pubescente cefalo-mesialmente, decreciendo en robustez en dirección al dactilo; superficie del tercer maxilípodo punteada, puntos setíferos distribuidos en una línea a lo largo del margen gnatal; exópodo ensanchado y pequeño, termina en punta aguda, la relación largo exópodo/largo isquio es de 0.56 veces.

Quelípedos asimétricos (**Lám. XV**). Mero ornamentado en borde interno con tubérculos pequeños; carpo con borde interno granulado, gránulos pequeños, amplios, armado con una espina triangular, ancha y de punta aguda, después de la espina, la ornamentación desaparece dejando al borde interno liso. Quela mayor con la superficie de la palma punteada, dactilo y dedo fijo separados por un hueco amplio; dactilo esbelto y curvado; bordes cortantes dentados, dientes subtriangulares, grandes y pequeños, intercalados uno a uno.

Primer par de gonópodos del macho robustos (**Lám. XXIX**). **Vista caudal**. Tercio distal recto; cresta del lóbulo distal de la proyección caudo-marginal más alta que la cresta lateral; extremo distal de la superficie caudal con concavidad estrecha y poco profunda. Superficie caudal del proceso mesial con lóbulo basal pobremente desarrollado, casi imperceptible. **Vista mesial**. Proyección caudo-marginal con la superficie subapical del margen caudal ligeramente excavado; cresta del lóbulo distal lisa, redondeada en la mitad caudal y recta en la mitad cefálica; lóbulo distal pequeño, con ápice agudo, ornamentado en la punta con una espina fina, poco prominente y aguda, separado del lóbulo proximal por una muesca en forma de "V" estrecha; lóbulo proximal en forma de "U", la relación longitud/anchura es de 1.11 veces, oblicuo al eje principal del gonópodo, ensanchado y con ápice redondeado. **Vista cefálica**. Tercio distal ligeramente inclinado lateralmente; lóbulos distal y proximal dispuestos en el mismo plano; carena corta en cara interna del lóbulo proximal, se extiende hasta una tercera parte de la superficie, notablemente ensanchada. Proceso mesial subtriangular, perpendicular al eje principal del gonópodo, terminado lateralmente en una espina triangular de ápice subagudo; borde superior con cresta recta, larga, alcanza el lóbulo interno, porción media de la cresta elevada; borde inferior suavemente curvado; lóbulo interno del proceso mesial subcuadrado, con bordes redondeados, amplio, no entra en contacto con la superficie interna del lóbulo proximal. **Vista lateral**. Proceso mesial proyectado lateralmente. **Vista distal**. Cavidad apical en forma de "U" amplia; cresta central de la cavidad apical subtriangular, pequeña; cavidad apical profunda; campo apical de espinas dispuesto en una franja central con aproximadamente 17 espinas largas, las más cefálicas están cubiertas parcialmente por borde superior del proceso mesial. Orificio espermático amplio, en posición caudal. Proceso mesial corto, espina lateral poco ensanchada proximalmente, recta y dirigida lateralmente.

**Observaciones.** Esta especie presenta diferencias evidentes con respecto a *P. americana s. str.* En términos somáticos, *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 de Necoxtla presenta ensanchamientos en los ángulos laterales del borde frontal inferior; mientras que en *P. americana s. str.* el borde frontal inferior es más bien esbelto. La relación largo exópodo/largo isquio en *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 es de 0.56 veces; en contraste con la de *P. americana s. str.* que es de 0.83 veces. En términos del G1, la proyección caudo-marginal en vista mesial es notablemente diferente, e.g., el lóbulo proximal en *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 oblicuo y corto, con una relación largo/ancho de 1.11 veces; versus un lóbulo proximal alargado, paralelo al eje principal del gonópodo y una relación largo/ancho de 1.85 veces en *P. americana s. str.* Incluso, *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 cuenta con un número menor de espinas en la cavidad apical -17- contra las 21 espinas reportadas para *P. americana s. str.*

Por otra parte, los ejemplares fueron recolectados en un canal subterráneo hecho a mano por los pobladores de San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla, para abastecer de agua a la comunidad y a sus tierras de cultivo. En un principio, el sistema de canales se usaba principalmente para la generación de electricidad a través de una serie de turbinas que usaba el agua proveniente del manantial San Lorenzo (Luis Hermoso com. pers.). No obstante, el sistema de turbinas no se usa más, y la red de galerías se amplió paulatinamente con esfuerzos de los locales. Ahora, el propósito de estos es el de proveer agua para riego de cultivos. La galería donde se obtuvieron los ejemplares estudiados cuenta con agua proveniente de la turbina en desuso que se mezcla con el agua de la red subterránea expandida. Esto es importante pues los locatarios solamente han encontrado cangrejos en la galería con agua mezclada; probablemente las poblaciones de *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 de Necoxtla provengan del manantial San Lorenzo y usen el sistema de redes de riego como medio para su dispersión. Es importante recalcar que el agua que recorre las galerías cuenta con una enorme cantidad de sales, razón por la cual el suelo y las paredes de las construcciones se encuentran llenas de sarro. Asimismo, es común encontrar a los individuos de esta especie cubiertos parcialmente por el sarro acumulado en las galerías.

Durante la colecta, se obtuvo accidentalmente a una hembra ovígera. Esta contaba con 79 huevos de 2.12-2.35 mm y sus respectivas medidas eran AC=31.30 mm y LC=20.69 mm.

**Variación morfológica.** La depresión central del borde frontal inferior presenta diferentes grados de definición entre los individuos observados, la variación observada va desde una concavidad bien definida y poco estrecha, hasta una somera y más bien amplia. El surco medio frontal puede extenderse hasta casi alcanzar el borde frontal anterior; en algunos individuos dicho surco se desvanece poco después de pasar anteriormente los lóbulos postfrontales. El diente orbital interno generalmente se presenta pequeño y subtriangular, no obstante, ciertos individuos lo presentan muy desarrollado y con el ápice agudo. En ocasiones el hueco que se forma entre el primer artejo antenal y los extremos laterales del borde frontal es menos evidente debido al notable ensanchamiento de esta estructura.

**Distribución.** Esta especie sólo se conoce para la localidad de San Marcos Necoxtla en el municipio de Tehuacán, Puebla.

**Comentarios taxonómicos.** Villalobos-Hiriart (2005) la consideró como la forma Tehuacán de *P. americana*, siendo una de las dos formas que presentan una descripción formal. En el presente trabajo, se cuenta con evidencia molecular, morfo-geométrica y morfológica suficiente para plantearla como hipótesis específica

***Pseudothelphusa* sp. nov. 3 (Zihuatanejo)**  
**(Láminas VIII; XIV B; XXX)**

**Lote usado para la descripción:**

**Guerrero**

**CNCR 35903 (Lám. VIII; XIV B; XXX)** "*Pseudothelphusa* sp. nov. 3; Zihuatanejo, Guerrero; 23/VI/2015; Cols. D Ortiz y J Baldazo; Det. KJ Madrigal" (1 macho AC=29.95 mm; LC=18.19 mm).

**Descripción. Vista dorsal (Lám XIV B).** Caparazón ligeramente convexo; superficie finamente punteada y ligeramente reticulada, puntos distribuidos homogéneamente; porción anterior ornamentada con gránulos, más densos y de mayor tamaño sobre los lóbulos postfrontales y detrás de margen orbital superior. Borde frontal superior presente; frente bruscamente dirigida hacia abajo, completamente vertical; borde frontal inferior bilobulado, continuo, delgado, punteado a lo largo, dándole una apariencia crenada, parte central del borde con depresión apenas perceptible. Lóbulos postfrontales bien delimitados, poco elevados, muy juntos uno de otro. Surco frontal medio bien definido, profundo, estrecho, se extiende desde borde frontal superior hasta pasar los lóbulos postfrontales; surcos cervicales claramente distinguibles, rectos, estrechos, no alcanzan el margen anterolateral. Región gástrica poco definida, ligeramente más alta que la región branquial; región cardíaca marcada por dos depresiones someras ubicadas en la parte central de la región. Suturas urogástricas en forma de "y" dispuestas de manera horizontal, ligeramente inclinadas hacia el centro y notablemente cortas. Escotadura del ángulo orbital externo ausente. Margen anterolateral granuloso, gránulos, bajos y redondeados, poco prominentes, ornamentación evidente desde el ángulo orbital externo a la sección meso-branquial; margen posterior cóncavo.

**Vista frontal (Lám. VIII).** Borde frontal superior bien marcado por una serie de gránulos grandes dispuestos en una línea ligeramente oblicua, se interrumpe en el centro por el surco frontal medio; borde frontal inferior recto, convexo a nivel de fosas antenulares. Órbitas subrectangulares; margen orbital completamente crenado; borde inferior ligeramente inclinado; ángulo orbital externo subagudo y sin escotadura; diente orbital interno subtriangular, bien desarrollado. Antenas no separadas de la frente; artejo basal antenal no cubierto por extremos laterales del borde frontal inferior; anténulas biflageladas, flagelo interno bien desarrollado, flagelo externo muy reducido. Septo interantenal pequeño, afilado, insertado por debajo del borde frontal inferior. Opérculo de la glándula antenal ovoide, con mechón en porción externa. Abertura del canal eferente subcuadrangular, la relación anchura/longitud es de 1.26 veces. Diente epistomal a nivel de septo, triangular, dirigido hacia abajo. Región pterigostomiana y epistoma pubescentes. Terceros maxilípedos cubren completamente la cavidad bucal; isquio del tercer maxilípedo subtrapezoidal, la relación anchura/longitud 0.86 veces, ornamentado en el margen gnatal con dientes pequeños, triangulares, que decrecen en tamaño progresivamente, mechones dispuestos entre cada diente, cerdas largas; mero del tercer maxilípedo con borde lateral redondeado y proyectado un poco más allá de los límites de la cavidad bucal, la relación anchura/longitud es de 1.25 veces; muesca anterior presente, bien definida; borde gnatal suavemente excavado para permitir la inserción del palpo y ornamentado con dientes triangulares pequeños y cerdas largas; palpo pubescente cefalomesialmente, más densa en dirección al dactilo; superficie del tercer maxilípedo punteada, puntuación en el borde gnatal setífera, distribuida de manera longitudinal en una línea delgada y

continua; exópodo ancho en base, termina en punta aguda, la relación largo exópodo/largo isquios es de 0.67 veces.

Quelípedos asimétricos (**Lám. XV B**). Mero ornamentado en borde interno con tubérculos pequeños; carpo con borde interno granulado, gránulos pequeños, agudos y separados, armado con una espina triangular, después de la espina, la ornamentación continúa con dentículos pequeños, agudos y amplios. Quela mayor con la superficie de la palma punteada; dactilo y dedo fijo no separados por un hueco; dactilo ensanchado y poco curvado; bordes cortantes dentados, dientes agudos grandes y pequeños intercalados uno a uno.

Primer par de gonópodo del macho robustos (**Lám. XXX**). **Vista caudal.** Tercio distal ligeramente inclinado en sentido mesial; cresta del lóbulo distal de la proyección caudo-marginal ligeramente más alta que la cresta lateral; extremo distal de la superficie caudal con concavidad somera y amplia. Superficie caudal del proceso mesial con lóbulo basal ausente. **Vista mesial.** Proyección caudo-marginal con la porción subapical del margen caudal ligeramente excavada; cresta del lóbulo distal redondeada y lisa en toda su extensión; lóbulo distal grande, con ápice agudo, proyectado cefalo-mesialmente, ornamentación ausente, separado del lóbulo proximal por una muesca en forma de "V" redondeada y amplia; lóbulo proximal en forma de "U", la relación largo/ancho es de 1.32 veces, dirigido suavemente próximo-cefálicamente al eje principal del gonópodo, ensanchado y ápice redondeado. **Vista cefálica.** Tercio distal recto, lóbulos distal y proximal no dispuestos en el mismo plano, carena de la superficie interna del lóbulo proximal reducida. Proceso mesial subtriangular, perpendicular al eje principal del gonópodo, terminado lateralmente en una espina ancha apenas perceptible en esta vista debido a su curvatura en sentido caudal; borde superior del proceso mesial recto, con cresta redondeada y corta, alcanza menos de una tercera parte del proceso; borde inferior suavemente curvado hasta la espina lateral; lóbulo interno del proceso mesial redondeado, laminar y en contacto con la cara interna del lóbulo proximal. **Vista lateral.** Proceso mesial con la espina lateral curvada caudalmente. **Vista distal.** Cavidad del ápice en forma de "U" estrecha; cresta central de la cavidad apical subtriangular; cavidad apical poco profunda; campo apical de espinas dispuesto en una franja central con aproximadamente 20 espinas largas, las más cefálicas cubiertas parcialmente por el borde superior del proceso mesial. Orificio espermático dispuesto en posición caudal. Proceso mesial con la espina lateral curvada en dirección caudal, larga, esbelta y aguda.

**Observaciones.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 3 de Zihuatanejo, cuenta con la cresta del lóbulo distal de la proyección caudo-marginal redondeada en toda su extensión, un tanto similar al que presenta *Pseudothelphusa* sp. nov. 4 de Tzazaracua; no obstante, este carácter la diferencia tanto de *P. americana* s. str. como de *Pseudothelphusa* sp. nov. 1 y 2. Adicionalmente, el proceso mesial es esbelto y se encuentra completamente curvado en sentido caudal, carácter únicamente observado en esta especie y que la distingue del resto de las especies aquí descritas. En términos somáticos, *Pseudothelphusa* sp. nov. 3 cuenta con gránulos que ornamentan la superficie dorsal a lo largo de los lóbulos postfrontales y detrás de los márgenes orbitales superiores, a diferencia de las demás especies aquí tratadas en donde no se aprecia ninguna ornamentación adicional a los puntos y retículos en vista dorsal.

**Variación morfológica.** Sólo se cuenta con un sólo ejemplar en el acervo de la CNCR.

**Distribución.** Esta especie sólo se conoce para el municipio de Zihuatanejo, Guerrero.

***Pseudothelphusa* sp. nov. 4 (Tzararacua)**  
**Láminas (IX; XVI; XXXI)**

**Lote usado para la descripción:**

**Michoacán**

**CNCR 29104 (Lám. IX; XVI A; XXXI)** "*Pseudothelphusa* sp. nov. 3; Cascadas de Tzararacua, Uruapan, Michoacán; 21/XII/02; Cols. JL Villalobos, J Segura, MC Villalobos, E Villalobos; Det. KJ Madrigal" (24 machos AC=6.55-31.26 mm, LC=4.58-19.92 mm; 2 hembras AC=24.34-29.46 mm, LC=14.76-18.42 mm).

**Descripción. Vista dorsal (Lám. XVI).** Caparazón ligeramente convexo; superficie finamente punteada y ligeramente reticulada, puntuación más evidente cerca de bordes anterolaterales y entre lóbulos postfrontales y borde frontal anterior. Borde frontal superior como un amago o línea obsoleta; frente curvada de manera brusca hacia abajo, casi vertical; borde frontal inferior bilobulado, continuo, grueso y liso, parte central con depresión amplia y somera. Lóbulos postfrontales distinguibles, poco elevados. Surco medio frontal poco definido, estrecho; surcos cervicales notablemente marcados, ligeramente curvados, más anchos y profundos proximalmente, se extienden hasta el margen anterolateral. Región gástrica bien definida, convexa y ligeramente más alta que la región branquial; región cardiaca marcada por dos depresiones bien definidas en los laterales que colindan con la región urogástrica. Suturas urogástricas en forma de "y" dispuestas de manera horizontal y ligeramente inclinadas, curvadas en porción media. Escotadura del ángulo orbital externo presente como una concavidad somera que interrumpe la continuidad de la curva del margen anterolateral. Margen anterolateral suavemente granuloso, gránulos bajos, más notables en sección meso-branquial, decrecen en tamaño hasta alcanzar el surco cervical; margen posterior convexo.

**Vista frontal (Lám. IX).** Borde frontal inferior recto, convexo a nivel de fosas antenulares, sin ensanchamientos en extremos laterales. Órbitas subrectangulares; margen orbital ligeramente crenado en borde superior, inferior y lateral; borde inferior dispuesto horizontalmente; ángulo orbital externo subagudo y sin escotadura; diente orbital interno subtriangular con punta redondeada, bien desarrollado, acanalado. Antenas separadas de la frente por hueco pequeño; artejo basal antenal no cubierto por extremos laterales del borde frontal inferior; anténulas biflageladas, flagelo interno bien desarrollado, flagelo externo muy reducido. Septo internantenular generalmente pequeño, afilado, insertado por debajo del borde frontal inferior. Opérculo de la glándula antenal ovoide, con mechón en extremo lateral. Abertura del canal eferente subcuadrangular, la relación anchura/longitud es de 1.5 veces. Diente espistomal a nivel de septo, triangular, dirigido hacia abajo. Región pterigostomiana y espistoma pubescentes. Terceros maxilípedos cubren completamente la cavidad bucal; isquio del tercer maxilípedo subtrapezoidal, la relación anchura/longitud es 0.71 veces, ornamentado en el margen gnatal con dientes muy pequeños, triangulares, que decrecen en tamaño progresivamente, mechones de cerdas dispuestos entre cada diente, cerdas largas; mero con borde lateral redondeado, la relación anchura/longitud es de 1.23 veces; muesca anterior presente, somera; borde gnatal suavemente excavado para permitir la inserción del palpo, ornamentado en porción inferior con dientes pequeños y cerdas largas; palpo pubescente cefalo-mesialmente, más densa en dirección al dactilo; superficie del tercer maxilípedo punteada, puntuación en el borde gnatal setífera, distribuida de manera

longitudinal en una línea delgada y continua; exópodo ancho en la base, termina en punta aguda, la relación largo exópodo/largo isquio es de 0.51 veces.

Quelípedos asimétricos (**Lám. XVI A**). Mero ornamentado en borde interno con tubérculos pequeños; carpo con borde interno granulado, gránulos pequeños, agudos y separados, armado con una espina triangular, ancha y de punta redoneada, después de la espina, la ornamentación desaparece dejando al borde interno liso. Quela mayor con la superficie de la palma punteada, adicionalmente presenta pequeños puntos marrones que aumentan su densidad hacia las puntas del dactilo y dedo fijo; dactilo y dedo fijo separados por un hueco moderado; dactilo moderadamente ensanchado y ligeramente curvado; bordes cortantes dentados, dietes bajos, subagudos, grandes y pequeños, intercalados sin orden aparente.

Primer par de gonópodos del macho robustos (**Lám. XXXI**). **Vista caudal.** Tercio distal recto; cresta del lóbulo distal de la proyección caudo-marginal más alta que la cresta lateral; extremo distal de la superficie caudal con una concavidad moderada y estrecha. Superficie caudal del proceso mesial con lóbulo basal casi imperceptible. Mitad final del lóbulo proximal de la proyección caudo-marginal un poco recta, pegada o paralela al eje principal del gonópodo. **Vista mesial.** Proyección caudo-marginal con la porción subapical del margen caudal ligeramente excavada; cresta del lóbulo distal ampliamente redondeada y lisa en toda su extensión; lóbulo distal amplio, con ápice agudo y dirigido proximalmente, ornamentación ausente, separado del lóbulo proximal por muesca en forma de "U" amplia; lóbulo proximal en forma de "U", la relación longitud/anchura es de 1.8 veces, ligeramente constreñido en la base, se adelgaza hacia la punta y está dirigido proximalmente, paralelo al eje principal del gonópodo. **Vista cefálica.** Tercio distal recto; lóbulos distal y proximal de la proyección caudo-marginal no dispuestos en el mismo plano, el distal se proyecta un poco en sentido mesial; carena de la superficie interna del lóbulo proximal evidente, corta y alcanza menos de una tercera parte de la superficie. Proceso mesial como un triángulo irregular, perpendicular al eje principal del gonópodo, terminado lateralmente en punta aguda y esbelta; borde superior del proceso mesial cóncavo en porción proximal, cresta superior corta e irregular, comienza en porción media y alcanza el lóbulo interno; borde inferior sigmoidal, convexo en la pita proximal y cóncavo hacia la espina lateral; lóbulo interno subcuadrangular, laminar y en contacto con cara interna del lóbulo proximal. **Vista lateral.** Proceso mesial con la espina lateral proyectada latero-caudalmente. **Vista distal.** Cavidad apical en forma de "U" estrecha; cresta central de la cavidad apical circular; cavidad apical poco profunda; campo apical de espinas dispuesto en una franja central con aproximadamente 17 espinas cortas, las más cefálicas cubiertas parcialmente por borde superior del proceso mesial. Orificio espermático amplio, dispuesto en posición caudal. Proceso mesial con la espina lateral curvada en dirección latero-caudal, larga, esbelta y aguda.

**Observaciones.** *Pseudothelphusa* sp. nov. de Tzararacua, tiene un ligero parecido en algunas características del G1, como en el lóbulo distal de la proyección caudo-marginal, a especies recientemente descritas como *P. acahuizotla*, *P. ixtapan* y *P. purhepecha* (Ojeda-Escoto *et al.*, 2017). Particularmente con la última, comparte su distribución en el mismo estado y en la cuenca del Balsas. No obstante, existen claras diferencias tanto a nivel somático como sexual que la separan y la distinguen de las especies ya mencionadas. *Pseudothelphusa* sp. nov. de Tzararacua, presenta una escotadura somera en el ángulo orbital externo que alcanza el surco cervical, mientras que *P. acahuizotla*, *P. ixtapan* y *P. purhepecha* presentan una escotadura pobremente desarrollada. En cuanto a características del G1, las diferencias en tanto a la forma del proceso mesial y su

ornamentación son cruciales para distinguir estas cuatro especies: *P. acahuizotla*, presenta el proceso mesial trapezoidal, terminando en una espina lateral ancha y el borde inferior fuertemente convexo y liso; *P. ixtapan*, exhibe el proceso mesial de forma rectangular, con el borde lateral que forma un ángulo recto con el borde superior, y presenta una espina media triangular y aguda, y en la porción inferior del borde se encuentra ornamentado con una serie de cinco espínulas agudas; en *P. purhepecha*, el proceso mesial es triangular y su margen lateral termina en dos espinas dirigidas latero-caudalmente, el borde inferior es suavemente convexo y liso; *Pseudothelphusa* sp. nov. de Tzararacua, posee el proceso mesial con forma subtriangular, terminando en una espina aguda y esbelta dirigida latero-caudalmente, asimismo, el borde inferior es convexo

**Variación morfológica.** En algunos individuos, los lóbulos postfrontales se encuentran más elevados y el surco frontal medio ligeramente más profundo. A pesar de que en la mayoría el surco cervical ocurre hasta el margen anterolateral, en ciertos ejemplares del lote el mismo surco queda ligeramente más corto, sin alcanzar el borde o se hace menos evidente distalmente. El diente orbital interno en un ejemplar se encontraba más desarrollado que en el resto, aparentemente el tamaño de esta estructura no se encuentra relacionada con la talla del individuo; ejemplares con tallas parecidas (Ac = 29.50 mm – 31.18 mm) no compartían el mismo desarrollo del diente.

**Distribución.** Esta especie sólo se conoce para el municipio de Uruapan, Michoacán.

***Pseudothelphusa* sp. nov. 5 (Querétaro)  
(Láminas X; XV B; XXXII)**

***Pseudothelphusa americana* fma. Querétaro:** Villalobos-Hiriart, 2005: 127 (localidad: Querétaro-Estado de México).

**Lote usado para la descripción:**

**Querétaro-Estado de México**

**CNCR 342 (Lám. X; XV B; XXXII)** "*Pseudothelphusa* sp. nov 5; Querétaro-Estado de México; Det. KJ Madrigal" (2 machos AC=34.02-38.77 mm; LC=21.16-23.33 mm).

**Descripción. Vista dorsal (Lám. XV B).** Caparazón ligeramente convexo; superficie finamente punteada y ligeramente reticulada, puntuación más densa en regiones branquial y gástrica, así como entre borde frontal inferior y lóbulos postfrontales. Borde frontal superior presente; frente bruscamente dirigida hacia abajo, casi vertical; borde frontal inferior bilobulado, continuo, grueso, punteado a lo largo, dándole una apariencia crenada, parte central del borde con depresión, somera y amplia. Lóbulos postfrontales notables, moderadamente elevados. Surco medio frontal definido, moderadamente profundo, estrecho, se extiende desde la línea obsoleta del borde frontal superior hasta la porción posterior de los lóbulos postfrontales; surcos cervicales bien definidos, ligeramente curvos proximalmente, profundos, no llegan al margen anterolateral. Región gástrica poco delimitada, convexa, a la misma altura que la región branquial; región cardíaca marcada por tres depresiones someras, dos superiores, colindantes con región urogástrica y una inferior, colindante con región intestinal. Suturas urogástricas en forma de "y" dispuestas horizontalmente, ligeramente inclinadas hacia el centro, notablemente cortas. Escotadura del ángulo orbital externo presente, similar a una muesca pequeña. Margen anterolateral granuloso, gránulos bajos y redondeados, más evidentes en región meso-branquial, disminuyen en tamaño progresivamente en dirección anterior; margen suavemente cóncavo.

**Vista frontal (Lám. X).** Borde frontal superior como un amago o línea obsoleta, ligeramente oblicuo, se interrumpe en el centro por el surco frontal medio; borde frontal inferior recto, convexo a nivel de fosas antenulares, con ensanchamientos notables en extremos laterales. Órbitas subcuadrangulares; margen orbital inferior suavemente crenado, dispuesto horizontalmente; ángulo orbital externo subagudo y con escotadura lateral; diente orbital interno subtriangular, acanalado, moderadamente desarrollado. Antenas no separadas de la frente; artejo basal antenal cubierto parcialmente por el ensanchamiento de los extremos laterales del borde frontal inferior; anténulas biflageladas, flagelo interno bien desarrollado, flagelo externo apenas perceptible. Septo interantennular visible, afilado e insertado por debajo del borde frontal inferior. Opérculo de la glándula antenal ovoide con mechón porción externa. Abertura del canal eferente subcuadrangular, la relación anchura/longitud es de 1.07 veces. Diente epistomal a nivel de septo, triangular, dirigido hacia abajo. Región pterigostomiana y epistoma pubescentes. Terceros maxilípedos cubren completamente la cavidad bucal; isquio del tercer maxilípedo subtrapezoidal, la relación anchura/longitud es de 0.91 veces, ornamentado en el margen gnatal con dientes pequeños, triangulares, que decrecen progresivamente, mechones de cerdas dispuestos entre cada diente, cerdas largas; mero del tercer maxilípedo con el borde lateral redondeado, se extiende un poco más allá de la cavidad bucal, la relación anchura/longitud es de 1.27 veces; muesca anterior presente,

bien definida; borde gnatal suavemente excavado para permitir la inserción del palpo, porción inferior ornamentada con dientes moderadamente grandes y cerdas largas; palpo pubescente cefalo-mesialmente, más densa en dirección al dactilo; superficie del tercer maxilipedo punteada, puntuación en el borde gnatal setífera, distribuidos a lo largo del eje; exópodo ancho en base, termina en punta aguda, la relación largo exópodo/largo isquio es de 0.68 veces.

Quelípedos asimétricos (**Lám. XV B**). Mero ornamentado en borde interno con tubérculos pequeños; carpo con borde interno granulado, gránulos muy pequeños, redondeados y muy juntos, armado con una espina triangular, esbelta y aguda, después de la espina, la ornamentación desaparece dejando al borde interno liso. Quela mayor con la superficie de la palma punteada; dactilo y dedo fijo separados por un hueco moderado; dactilo esbelto y poco curvado; bordes cortantes dentados, dientes triangulares, grandes y pequeños intercalados sin orden aparente.

Primer par de gonópodos del macho robustos (**Lám. XXXII**). **Vista caudal**. Tercio distal ligeramente inclinado en sentido mesial; cresta del lóbulo distal de la proyección caudo-marginal casi al mismo nivel que la cresta lateral; extremo distal de la superficie caudal con concavidad levemente marcada, somera y amplia. Superficie caudal del proceso mesial con lóbulo basal ubicado proximalmente, apenas insinuado, redondeado. **Vista mesial**. Proyección caudo-marginal con la porción subapical del margen caudal ligeramente excavada; cresta del lóbulo distal ampliamente redondeada y lisa en toda su extensión; lóbulo distal amplio, con ápice agudo y dirigido cefalicamente, sin ornamentación en punta, separado del lóbulo proximal por una muesca en forma de "V" amplia, con el vértice redondeado; lóbulo proximal de la proyección caudo-marginal en forma "U", la relación largo/ancho es de 1.4 veces, oblicuo al eje principal del gonópodo, ligeramente constreñido en la base, ancho en la porción media, ápice redondeado. **Vista cefálica**. Tercio distal sutilmente inclinado en sentido lateral, lóbulos distal y proximal dispuestos en el mismo plano, carena larga en cara interna de lóbulo proximal, se extiende hasta casi alcanzar la porción final del lóbulo, notablemente ensanchada. Proceso mesial subtriangular, perpendicular al eje principal del gonópodo, terminado lateralmente en una espina aguda; borde superior con cresta larga y casi recta, se proyecta hasta el lóbulo interno; borde inferior suavemente convexo en la mitad proximal y cóncavo hacia la espina lateral; lóbulo interno subtriangular, subagudo y en contacto con la cara interna del lóbulo proximal de la proyección caudo-marginal. **Vista lateral**. Proceso mesial con la espina lateral triangular, aguda y proyectada latero-caudalmente. **Vista distal**. Cavidad apical en forma de "U" amplia; cresta central de la cavidad apical recta y baja; cavidad apical poco profunda; campo apical de espinas dispuesto en una franja central con aproximadamente 30 espinas largas, las más cefálicas están cubiertas parcialmente por borde superior del proceso mesial. Orificio espermático en posición caudal. Proceso mesial ligeramente ensanchado proximalmente, con la espina lateral suavemente curvada en dirección latero-caudal, larga, esbelta y aguda.

**Observaciones.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 5 de Querétaro presenta afinidades con *P. purhepecha* (Villalobos-Hiriart com.pers.), en términos del plan morfológico general. Sin embargo, tanto las distribuciones disyuntas -Michoacán vs. Querétaro- y la particular morfología del gonópodo -e.g. el proceso mesial con dos espinas apicales laterales en *P. purhepecha* vs. proceso mesial con una espina apical en *Pseudothelphusa* sp. nov. 5 de Querétaro- son evidencia suficiente para diferenciarlas. Además, datos morfo-geométricos de la proyección caudo-marginal en vista mesial, sugiere que existe diferencia suficiente entre esta especie y *P. americana* s. str., para plantearla como hipótesis específica.

Como dato adicional, los ejemplares estudiados fueron recolectados por el Dr. Alejandro Villalobos, lamentablemente la etiqueta proveía de información ambigua sobre el sitio de colecta, pues rezaba “Querétaro-Estado de México”. Durante el desarrollo del trabajo se procuró explorar la mayor parte de localidades entre el Estado de México y Querétaro, sin embargo, no se lograron encontrar ejemplares, ni la localidad exacta.

**Variación morfológica.** La ornamentación del margen anterolateral puede ausentarse, dejando el margen completamente liso.

**Distribución.** Su distribución es desconocida. En la etiqueta del ejemplar se puede leer Querétaro-Estado de México; por lo que se asume que se encuentra en alguna parte entre estos dos estados.

**Comentarios taxonómicos.** Villalobos-Hiriart (2005) la reconoce como una forma independiente de *P. americana*, no obstante, no hace ninguna aclaración al respecto, ni ofrece descripción alguna.

## Discusión

### Análisis molecular

Wallace (1854) reconoció por primera vez que los sistemas fluviales determinaban los rangos distribucionales de algunos mamíferos -particularmente monos de los géneros *Mycetes*, *Ateles*, *Cebus*, entre otros-. A lo largo del tiempo, este fenómeno pasó a conocerse bajo el nombre de Barreras fluviales -o *riverine barriers*-, y ha sido ampliamente estudiado en una gran cantidad de grupos (Gascon *et al.*, 1996; Gascon *et al.*, 2000; Torres-Pérez *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2022) demostrando que los ríos pueden actuar como barreras extrínsecas entre poblaciones promoviendo eventos intensos de vicarianza. Algunas otras contribuciones (e.g., Darlington, 1957) llevan la idea a escalas más grandes, sugiriendo que existe una relación entre las cuencas hidrológicas y la dispersión de los organismos. Ambos patrones son patentes en la distribución de la fauna dulceacuícola (Huidobro *et al.*, 2006; Barbour, 1973). El caso del complejo *P. americana* resulta bastante particular, pues se trata de poblaciones con poca vagilidad distribuidas a lo largo de una zona evolutivamente activa -FVTM-, en tres cuencas hidrológicas diferentes -Pánuco, Balsas, Papaloapan- y en sistemas fluviales aislados, por lo que cabría esperar eventos de divergencia dentro de las poblaciones que lo componen. Sin embargo, los resultados mostrados sugieren algo un tanto diferente.

### ***Pseudothelphusa americana sensu stricto***

El clado A (Fig. 6) que corresponde a *P. americana sensu stricto*, se encuentra integrado por el grupo de las localidades de Hidalgo y dos de las de Puebla -Quetzalapa y Michac-, además de una politomía perteneciente a las poblaciones de Tlaxcala y una de Puebla -Cuahutinchán-. Incluso, existe un clado formado por la población de San Miguel, cuyas relaciones con el resto de *P. americana s. str.* no están claras

Las distancias genéticas entre los miembros del clado A, calculadas para COI con ambos modelos (Tablas 10 y 12), son bajas -0%-0.3%-, encontrándose muy por debajo del umbral típicamente usado para delimitar grupos específicos en el enfoque del BOL (Pereira *et al.*, 2013). Estos resultados son congruentes con los datos reportados para otras poblaciones de cangrejos dulceacuícolas, e.g., 0.1%-0.5% entre miembros dentro de *Potamon fluviatile*, 0.1%-0.9% dentro de *P. pleops* (Jesse *et al.*, 2010); y 0%-0.2% entre integrantes de *Tehuana poglayenorum* Pretzmann, 1978 (Moreno-Juárez, 2019).

La red de haplotipos para COI de *P. americana s. str.* (Fig. 11A) demuestra que este fragmento es notablemente homogéneo dentro de la especie, aun comparando ejemplares provenientes de cuencas diferentes (Fig. 9). Las poblaciones de San Miguel cuentan con un haplotipo diferente, distinguido únicamente por un paso mutacional. Y a pesar de que la red de haplotipos para 16S muestra que existe un haplotipo particular para las poblaciones del Pánuco -clado verde (Fig. 6)- y otro para las del Balsas -politomía celeste (Fig. 6)- los datos obtenidos, en general (Ver Capítulo II y III) no alcanzan para argumentar por dos especies diferentes, sino para considerarlas como una sola entidad.

Debido a que no se realizó ninguna datación molecular, los tiempos de divergencia entre las poblaciones estudiadas se desconocen. Datos acerca de la diversificación del género *Pseudothelphusa* se ofrecen en Ojeda-Escoto (2017) y Álvarez *et al.* (2020). Ambos autores concuerdan que *Pseudothelphusa* comenzó a diversificarse hace unos 12-11 M.a. Debido a la falta de información, aventurarse en el cómo *P. americana* logró su distribución actual es entrar en terreno especulativo.

Ciertamente, se cuenta con evidencia filogenética y biogeográfica de otros grupos de organismos dulceacuícolas -peces pertenecientes a la familia Goodeidae Jordan y Gilbert, 1883, los géneros *Poeciliopsis* Regan, 1913, *Chirostoma* Swaison, 1839 y el parásito de goodeidos *Rhabdochona lichtenfelsi* Sánchez, García y Pérez-Ponce de León, 1998- (Barbour, 1973; Mateos *et al.*, 2002; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2006, 2010; Mejía-Madrid *et al.*, 2007) que esbozan las condiciones geológicas del país durante el Neógeno, principalmente en la Mesa Central y el Valle de México. Por otra parte, datos ofrecidos por Ordoñez (1906), Barbour (1973), Rico *et al.* (1997), Vilaclara *et al.* (2010), Webb (2004) y Mejía-Madrid (2007) indican que una gran cantidad de paleolagos y sistemas fluviales interconectados existían en el centro del país a lo largo de la cuenca del Lerma, el Valle de México y las porciones orientales y occidentales de la Mesa Central. Dichos sistemas, habrían facilitado corredores los que algunos linajes de peces se dispersarían hasta alcanzar su distribución actual. Incluso se tiene registro de paleolagos presentes en zonas cercanas a una localidad donde ejemplares de *P. americana* se recolectaron en Tlaxcala (Rico *et al.*, 1997, Vilaclara *et al.*, 2010).

Según apunta Ojeda-Escoto (2017), el ancestro de *Pseudothelphusa* se encontraba ya en una gran cuenca en el centro de México hace unos 12-11 M.a. aproximadamente, i.e., durante el Mioceno medio. Durante esta época, los paleolagos del centro del país aún conservaban su relativa integridad y no fue hasta el Plioceno-Pleistoceno cuando muchos de estos sistemas se compartimentalizaron debido a eventos volcánicos que presumiblemente coinciden con aquellos que terminaron de formar la FVTM y el levantamiento orogénico de la Mesa Central (Webb *et al.*, 2004; Vilaclara *et al.*, 2010).

Se tiene registro de linajes de peces que migraron antes del evento del Plioceno-Pleistoceno hacia el norte de la FVTM (Barbour, 1973; Mateos *et al.*, 2002; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2010) a través de las conexiones que existían entre el Valle de México, la cuenca del Lerma, los llanos de Puebla y los llanos de Apan (Barbour, 1973). Posiblemente, algunas poblaciones pertenecientes al ancestro de *P. americana* fueron capaces de dispersarse hacia el noreste durante el Mioceno medio haciendo uso de dichos corredores. La conexión entre los llanos de Puebla y de Apan pudieron haber facilitado su llegada hasta el Norte de Puebla e Hidalgo quedando aislados del resto de la cuenca del Balsas, mientras que la presencia de paleolagos en Tlaxcala y la conexión de los llanos de Puebla con el Valle de México podría explicar su colonización en el estado de Tlaxcala y el Sur de Puebla antes de que las vías de acceso se cerraran durante el Pleistoceno tardío. Una historia similar se ofrece en Villalobos-Hiriart (2005) y concuerda en gran parte con lo expuesto en este apartado. No obstante, el análisis filogenético de las formas reconocidas para *P. americana* arrojó datos interesantes respecto a los ejemplares de Necoxtla y Ajolotero, y con ello nuevas implicaciones acerca su distribución geográfica actual.

### ***Pseudothelphusa* sp. de Necoxtla y Ajolotero y su relación con *P. americana* s. str.**

Las distancias genéticas calculadas para COI y 16S con ambos modelos de sustitución son similares (Tablas 10-13). Por un lado, los ejemplares de Necoxtla se presentan un intervalo de 2.3%-2.4% en COI y 2.4%-2.7% de distanciamiento en 16S con respecto a las poblaciones de *P. americana* s. str.; por el otro, las distancias entre el ejemplar de Ajolotero respecto a esta última especie son 2.5%-3% en COI y 2.1%-2.6% en 16S. Las distancias genéticas entre Necoxtla y Ajolotero son también similares en ambos modelos, 2.3%-2.4% para COI y 3.1%-3.2% para 16S.

Como se mencionó anteriormente, para establecer linajes específicos según el enfoque del BOL, el umbral de divergencia acordado suele ser 2% (Pereira *et al.*, 2011; 2013; Ward *et al.*, 2009). Dicho umbral está establecido en virtud de la distribución de los valores inter e intraespecíficos calculados con K2P de todas las secuencias que se encuentran en la base de datos del BOL (Pereira *et al.*, 2011). Tomando en cuenta lo anterior, hay fundamentos en términos de distancias genéticas, que nos permiten establecer a Necoxtla y Ajolotero como dos especies distintas.

Fuera de satisfacer las necesidades del BOL que poco nos dicen sobre el reconocimiento de estas dos especies (De Salle *et al.*, 2005), en este trabajo ofrecemos evidencia adicional a las distancias genéticas que apoyan la decisión de plantear a Necoxtla y a Ajolotero como especies diferentes y que nos muestran un panorama mucho más amplio de sus relaciones de parentesco y sus particularidades morfológicas (ver. Capítulos II y III). La evidencia que compete a este capítulo es análisis filogenético multigen (Fig. 6) que recupera a ambas poblaciones como linajes distintos.

Tanto las poblaciones de Ajolotero como las de Necoxtla fueron consideradas en trabajos previos como miembros de *P. americana*. Bott (1968) realizó esquematizaciones del primer par de gonópodos de las formas y subespecies que entonces componían al taxón de estudio. El ejemplar denominado *P. (P.) americana americana* proveniente de Xochitempa, Chilapa, Guerrero resulta ser morfológica y geográficamente similar al ejemplar recolectado en el Río Ajolotero, Chilapa, Guerrero cerca de la misma localidad (ver. Capítulo III). Por otro lado, los ejemplares de provenientes de Necoxtla fueron reconocidos por Villalobos-Hiriart (2005) como la forma Tehuacán de *P. americana*, mientras que los ejemplares de Ajolotero se encontraban bajo el nombre de *P. americana* var. Chilapa. Al ser incluidas como formas de *P. americana*, se asume que deberían conformar un grupo natural y, aunado a esto, son somática y sexualmente similares. Sin embargo, el análisis filogenético, que incluye un muestreo más amplio de especies del género, propone que los ejemplares de Necoxtla y Ajolotero representan especies distintas, no incluidas en *P. americana* s. str.

Los especímenes de Necoxtla forma el clado independiente C (Fig. 6) siendo el grupo hermano de los clados B y A que incluyen a *P. americana* s. str. y a Ajolotero. Esta última población, tiene un mayor parentesco con el clado *P. hoffmanae*-*P. belliana*.

La sección anterior terminó mostrando una ligera objeción a lo comentado por Villalobos-Hiriart (2005), respecto al posible trayecto que llevó a cabo de *P. americana* para lograr su distribución actual. Dicha historia parte del trazo generalizado de *P. dugesi*, *P. doenitzi*, *P. americana*, *P. americana* var. Mixquiahuala, *P. americana* var. Chilapa y *P. americana* var. Tehuacán - las últimas dos ubicadas en este trabajo bajo el nombre de Ajolotero y Necoxtla respectivamente. En lo que respecta a *P. americana* s. str. el trayecto propuesto coincide con lo expuesto en el

apartado anterior, empero, las relaciones entre esta especie, Ajolotero y Necoxtla son más distantes de lo que se esperaba.

En Villalobos-Hiriart (2005) los trazos generalizados se formaron con el fin de relacionar la ancestría-descendencia de las especies con su distribución actual. En la filogenia que ofrece, *P. hoffmanae* forma un clado con *P. belliana* y entre las dos componen un trazo generalizado que responde al trazo individual del “ancestro”. Como se mencionó anteriormente, el ejemplar aquí nombrado Ajolotero, es hermano del clado *P. hoffmanae*-*P. belliana*, mientras que en la filogenia ofrecida por Villalobos-Hiriart (2005) no se encuentra contemplado y forma parte del trazo de *P. americana s. str.*, seguramente debido a la similitud del primer par de gonópodos. Por lo que lo más plausible, dada la hipótesis filogenética expuesta, sería pensar que estos tres taxones (Ajolotero, *P. hoffmanae* y *P. belliana*) comparten el mismo trazo generalizado.

Por su parte, Necoxtla es tomada como afín morfológica y filogenéticamente a *P. americana s. str.*, aunque esta forma tampoco se encuentra dentro de la filogenia de Villalobos-Hiriart (2005). La hipótesis filogenética aquí presentada, indica que las poblaciones de *P. americana* de Necoxtla, en realidad se tratan de un linaje independiente y que no forman parte de *P. americana s. str.* En este caso, no es posible comparar directamente nuestros resultados con los de Villalobos-Hiriart (2005), ya que en este estudio no incluimos a *P. dugesi* ni a *P. doenitzi*. Sin embargo, es interesante notar que Necoxtla se distribuye en una zona muy particular en la región de Tehuacán, aparentemente, siendo el único representante del género dentro de la cuenca del Papaloapan en la que también se distribuyen especies del género *Tehuana* y *Disparithelphusa*.

### ***Pseudothelphusa* sp. de Zihuatanejo y Tzararacua**

Durante la revisión morfológica *P. americana*, encontramos un par de lotes con ejemplares cuya identificación no estaba del todo clara y que no correspondían al taxón en cuestión. A pesar de tener una similitud general con las especies del género *Pseudothelphusa*, las observaciones del primer par de gonópodos del macho no satisfacían las exigencias de la clave taxonómica utilizada, pues presentaban particularidades no compartidas con otros miembros del género. Por tal razón se decidió incluirlas en el análisis filogenético.

Dado que estos ejemplares no forman parte del complejo estudiado en este trabajo, no se priorizaron las localidades para recolección de material fresco. Se trabajó con los lotes que se encontraban en la CNCR, y por tal motivo no fue posible amplificar los 3 marcadores en ambas muestras, pues las condiciones de conservación de los tejidos no eran las óptimas (Tabla 9), sin embargo se . Ambas poblaciones presentaron distancias genéticas elevadas con respecto a otras especies del género. Tzararacua presentó 5.7%-7.3% de divergencia en 16S respecto al resto de los ejemplares analizados pertenecientes a los estados de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala; mientras que Zihuatanejo presentó distancias que van de 4.0%-6.0% contra las demás localidades. Más allá de las distancias genéticas encontradas, en la filogenia (Fig.6) ambas especies forman un clado bien soportado por valores de PP, además, existen caracteres diagnósticos (ver Capítulo III) que apoyan su propuesta como especies diferentes.

## Modelos de delimitación de especies

El modelo GMYC tuvo un mejor desempeño que bPTP, probablemente debido a las limitaciones computacionales que presenta su servidor en línea. En general, ambos métodos agruparon de manera similar a los taxones. No obstante, la segregación específica del GMYC concuerda más con la información obtenida tanto por el cálculo de distancias como por la filogenia del complejo y especies afines, dando robustez las hipótesis de especie propuestas.

## Análisis morfogeométrico

### Variación en la forma de la proyección caudo-marginal del complejo *P. americana*

Se ha explorado muy poco el potencial que tiene esta herramienta para evaluar los cambios en la forma (shape) en el grupo de cangrejos dulceacuícolas (Torres *et al.* 2014; Grinang *et al.*, 2019), sobre todo en cuanto a la variación del gonópodo se refiere (Pedraza y Campos 2007). Estos últimos autores no pudieron determinar si las diferencias en el proceso mesial de *S. maniformis* tenían una razón geográfica. Algo similar ocurrió en el análisis de la proyección caudo-marginal de *P. americana* y algunos linajes afines, pues a pesar de que el PCA muestra una clara diferenciación entre, al menos, Necoxtla y el resto de las poblaciones del Pánuco y del Balsas, los análisis estadísticos no ofrecen soporte para esta segregación; aún más, los ejemplares de Ajolotero, se encuentran inmersos dentro de la nube de puntos correspondiente a *P. americana s. str.* Estos dos fenómenos pueden deberse a que la representación de gonópodos para ambas localidades -Necoxtla y Ajolotero- no fue suficiente, o a la verdadera condición críptica de estos linajes, lo cual explicaría su confusión histórica y su integración en *P. americana sensu lato*.

A pesar de que el análisis contempló algunas formas muy divergentes -Querétaro y Tzararacua-, el MANOVA permutacional entre pares tampoco fue muy consistente. Por ejemplo, los individuos de Querétaro presentan diferencias significativas respecto a los ejemplares provenientes de 6 de las 10 localidades evaluadas para *P. americana s. str.* -Amaxac, Ixtacuixtla, Mixquiahuala, Ventoquipa, Quetzalapa y Cuahutinchan-, no obstante, es estadísticamente similar a las 4 localidades restantes -Chignahuapan, Tizcatlacoyan, Ascensión y Apizaco-.

Algo importante a destacar, es la información que proveen las distancias euclidianas en comparación con los análisis de contraste de medias. Algunos autores han rescatado el valor que tienen las distancias euclidianas en los análisis morfogeométricos, sobre todo durante la etapa de superposición de los landmarks (Lele, 1991; Lele y Richtsmeier, 1995). Para el caso del complejo *P. americana*, los valores estimados de similitud/disimilitud en función de las distancias euclidianas parecieran ser ligeramente más consistentes. Es posible observar que el gradiente de similitud disminuye en virtud de qué tan lejos se encuentran los ejemplares en la filogenia (Fig. 6, A) respecto a *P. americana*- salvo el ejemplar de Zihuatanejo, cuyas distancias son similares a las de Ajolotero, a pesar de encontrarse más lejos en el árbol-.

Trabajos realizados sobre la variación de la genitalia masculina en otros artrópodos -insectos particularmente- demuestran el poder de la morfometría geométrica para validar (Mutanen y Pretorius, 2007; Dapporto, 2008) o invalidar hipótesis específicas (Barao *et al.*, 2014). De hecho, Mutanen y Pretorius (2007) argumentan la capacidad de las pruebas confirmatorias para la

delimitación específica, sobre todo cuando los análisis exploratorios no ofrecen información tan clara. Sin embargo, y tomando en cuenta las limitantes referentes al muestreo de gonópodos en este trabajo, ¿Qué pasa cuando la estadística sugiere una historia diferente a los análisis filogenéticos? Por un lado, las poblaciones de Tlaxcala, Puebla, Hidalgo y Guerrero presentan formas estadísticamente similares; por el otro, el análisis filogenético molecular indica la existencia de tres linajes distintos -*P. americana* s.str., Ajolotero y Necoxtla-. La similitud de la forma en clados tan distantes, podría ser el resultado de un proceso de convergencia y su desarrollo podría estar determinada por eventos de selección sexual. No obstante, me gustaría aventurar una hipótesis dentro de una perspectiva extendida: por un proceso de retroalimentación recíproca entre eventos ontogenéticos, genéticos, epigenéticos y ambientales (Laland *et al.*, 2015), que involucraría el posible desarrollo modular de la proyección caudo-marginal del primer gonópodo del macho, la plasticidad fenotípica del apéndice y sólo así, una posterior ronda de selección orgánica (*sensu* Diogo, 2017) debido al comportamiento y preferencias sexuales de las hembras.

### **¿Los análisis morfogeométricos son útiles para evaluar la variación genital en Pseudothelphusoidea?**

Los resultados de este análisis no son del todo desalentadores. El gonópodo de los pseudotelfusoideos varía en muchas dimensiones, algunas quizá más que otras, por tal razón sería importante revisar la variación morfogeométrica de sus distintas partes en las vistas restantes -cefálica, caudal, lateral y apical-, con la muestra adecuada para todas las localidades. También, valdría la pena explorar cómo se comportan las estructuras, en términos de coplanaridad y distorsión en un análisis en 3D. Por último, la morfometría geométrica sería de suma utilidad al evaluar los patrones morfológicos genitales a lo largo del género entero para saber si las tendencias que se presentan -e.g., la disminución en tamaño del lóbulo distal a lo largo del gradiente longitudinal de su distribución- tienen una razón filogenética o son el resultado de otros procesos.

### **Errores de medición, coplanaridad y torsiones del gonópodo**

El proceso de adquisición de imágenes y disposición de landmarks es susceptible a errores de medición (Fruciano, 2016): Los efectos que causan esta clase de errores, suelen ser más importantes cuando la variación fenotípica analizada es muy pequeña, como ocurre en estudios intraespecíficos (Arnqvist y Matersson, 1998).

La reducción de estructuras en 3D a 2D puede provocar errores de medición, debido a la falta de ortogonalidad entre los ejes (x, y) respecto a la dimensión (z) provocada por su reducción (Arnqvist y Matersson, 1998; Cardini 2014; Pečnerová *et al.*, 2015; Buser *et al.*, 2018). Debido a esto, las interpretaciones de estas estructuras deben tomarse con precaución. El gonópodo de los pseudotelfusoideos es una estructura extremadamente compleja en mayor o menor grado, pasando por estructuras relativamente sencillas como la de *Hypolobocera rathbunae* Pretzmann 1968, por el tortuoso *Mokayathelphusa angelstoti* Moreno-Juárez, Villalobos y Álvarez, 2022, hasta las especies del género *Neostrengeriana* Pretzmann 1965. A pesar de que el gonópodo de *P. americana* y linajes afines presenta una complejidad moderada, la dirección en la que se dispone, en este caso la proyección caudo-marginal, puede perder exactitud cuando se hace la conversión a 2D. Por tal motivo, es un poco complicado establecer un punto donde las estructuras a analizar del gonópodo sean enteramente coplanares. Autores como Zelditch *et al.* (1992), Roth (1993), Cardini y O'higgins

(2004), Zelditch *et al.* (2004) y Webster y Sheets (2010) han discutido las dificultades que surgen a raíz de la no coplanaridad de los landmarks debido a fenómenos que ocurren durante la digitalización -e.g. el efecto parallax (Mullin y Taylor, 2002), distorsiones fotográficas (Arnqvist y Matersson, 1998; Cardini y O'higgins, 2004), o la complejidad estructural durante el desarrollo (Zelditch *et al.*, 1992)- Toro *et al.* (2010) sugiere que la captura de imágenes en 3D es podría solventar el problema de la coplanaridad, sin embargo, esta técnica no está exenta de dichos problemas (Santamaría *et al.*, 2009). En el futuro, la digitalización de esta estructura en 3D podría ofrecer más información que la que ofrece una proyección en dos dimensiones.

## **Análisis morfológico**

### **Estatus actual del complejo de formas de *P. americana***

En el presente trabajo se evaluaron tres líneas de evidencia con el fin de proveer la mayor cantidad de información que nos permitiera tomar decisiones lo más acertadas posibles respecto a la resolución del complejo *P. americana*. El análisis que contempló las formas reconocidas por Villalobos-Hiriart (2005) -*P. americana* fma. Mixquiahuala, fma. Tehuacán, fma. Querétaro, y fma. Chilapa-, arrojó resultados sumamente interesantes.

En primer lugar, lo que en este trabajo se señala como *P. americana s. str.*, corresponde tanto a las formas de *P. americana* provenientes de Chignahuapan como de Mixquiahuala (Villalobos-Hiriart, 2005). Las diferencias en el primer gonópodo del macho aparentemente corresponderían a la variación natural dentro de la misma especie a lo largo de su gradiente distribucional. El taxón aquí reconocido incluye, además, a las poblaciones del estado de Tlaxcala -Ixtacuixtla, Amaxac de Guerrero, Apizaco y Ascensión- y algunas del sur de Puebla -Cuahutinchán y Tizcatlacoyan-.

La información proporcionada por el análisis molecular (Capítulo I), indicó que los marcadores moleculares usados para la diferenciación específica, en ocasiones no presentan la fineza suficiente para resolver relaciones interpoblacionales. Por un lado, se obtuvo la formación de un clado correspondiente a las poblaciones de la cuenca del Pánuco, y dentro de este, las relaciones poblacionales se encuentran indefinidas (Fig. 6); por el otro, las poblaciones pertenecientes a la cuenca del Balsas no se encuentran estructuradas, salvo aquellas pertenecientes a San Miguel La Presa en Ixtacuixtla, que se diferencian, según sugiere la red de haplotipos (Fig. 11) por una transición en la posición 25 del alineamiento, en donde una A sustituye a un G.

Dentro de Pseudothelphusinae, particularmente en el género *Tehuana*, Moreno-Juárez (2019) encontró resultados similares en las poblaciones de *T. poglayenorum*, en el que el análisis filogenético de las 6 formas reconocidas para la especie no consiguió recuperarlas como linajes independientes, pues la mayoría de las formas se agruparon indistintamente -salvo las formas Río Col y Laguna Majahual-, a pesar de las variaciones morfológicas detectadas en los lóbulos distal y proximal de la proyección caudo-marginal, en la carena de la cara interna del lóbulo proximal y en el proceso mesial.

En segundo lugar, las formas que menciona Villalobos-Hiriart (2005) como parte del complejo *P. americana* y que se encuentran fuera del área de distribución de lo que en esta tesis se estableció como *P. americana s.str.*, constituyen especies diferentes.

1) *Pseudothelphusa americana* fma. Chilapa, aquí nombrada putativamente *Pseudothelphusa* sp. 1 (Ajolotero), resultó ser molecularmente diferente a *P. americana s. str.* Sorprendentemente, se encontró directamente emparentada con el clado *P. belliana-P. hoffmanae*. Lo particular de esta especie es que es morfológicamente afín, incluso más que *P. dugesi* (Lám XXXIII), a *P. americana s. str.* de la localidad de Chignahuapan, Puebla. La variación de la proyección caudo-marginal en vista mesial no resultó en ninguna diferencia significativa, no obstante, existen diferencias estructurales en otras vistas del G1 que nos permiten reconocerla con facilidad.

2) *Pseudothelphusa americana* fma. Tehuacán, correspondiente en esta tesis a la temporal *Pseudothelphusa* sp. 2 (Necoxtla), resultó ser notablemente diferente en varios aspectos y todas las líneas de evidencia soportan su condición como linaje independiente. Esta especie es hermana de los clados A y B (Fig. 6), la proyección caudo-marginal en vista mesial presentó diferencias significativas con respecto a algunas poblaciones de *P. americana s. str.*, y adicionalmente, las observaciones morfológicas dieron cuenta de particularidades en términos somáticos y sexuales. Como dato adicional, esta es la única especie del género *Pseudothelphusa* que se distribuye en la cuenca del río Papaloapan.

3) *Pseudothelphusa americana* fma. Querétaro, reconocida en este trabajo como *Pseudothelphusa* sp. 5 (Querétaro) es un caso particular, puesto que no se pudo secuenciar ningún marcador debido al estado de conservación de los ejemplares estudiados, ni tampoco pudo ser recolectada en campo puesto que la información geográfica que provee la etiqueta es muy ambigua. No obstante, su planteamiento como linaje independiente parte de las diferencias encontradas en la variación morfo-geométrica de la proyección caudo-marginal en vista mesial y observaciones morfológicas.

En términos generales, el complejo *P. americana*, como se planteó en un principio por Villalobos-Hiriart (2005) presenta un estatus actualizado validado por un marco filogenético molecular y diagnosis morfológicas. Si bien es cierto que evidencia más fina podría aclarar la situación entre las poblaciones de *P. americana s. str.*, eso queda fuera del alcance de este trabajo.

#### ***Pseudothelphusa* sp. 3 y 4, dos especies nuevas no relacionadas con el complejo *P. americana***

Adicionalmente a las especies mencionadas con anterioridad, se plantea la hipótesis de dos especies independientes cuyas relaciones y similitudes morfológicas no corresponden a *P. americana*.

1) *Pseudothelphusa* sp. 3 (Zihuatanejo) destaca por dos caracteres morfológicos particulares. El primero es de naturaleza somática, y corresponde a la granulación presente en el dorso del caparazón a lo largo de los lóbulos postfrontales y detrás de los márgenes orbitales superiores; el segundo es sexual, y refiere a la notable curvatura del proceso mesial en sentido caudal no observada hasta ahora en otros miembros del género.

2) *Pseudothelphusa* sp. 4 (Tzararacua) cuyas similitudes recuerdan a las especies recientemente descritas *P. acahuizotla*, *P. ixtapan* y *P. purhepecha* (Ojeda-Escoto *et al.*, 2017). Sin embargo, esta especie se diferencia de ellas por presentar una escutadura somera en el ángulo orbital externo que llega hasta el surco cervical, y por la forma subtriangular del proceso mesial, que termina en una espina aguda y esbelta.

Cabe destacar que las tres líneas de evidencia soportan su propuesta como especies nuevas para la ciencia.

#### **Situación nomenclatural de *P. americana s. str.***

Existen aún ciertas cuestiones relacionadas con la situación nomenclatural de *P. americana s. str.*, que deberán ser aclaradas en una publicación formal, según dictan las especificaciones del Código de Nomenclatura Zoológica (CINZ) (2000).

1) La serie sin especificación encontrada en el acervo del MHNG: De acuerdo con el CINZ (Art. 72.1.1), si el autor del taxón nominal no establece un holotipo, sintipos o no designa posteriormente un lectotipo, la serie tipo se considera, entonces, como sintipo portanombre. El caso de *P. americana s. str.*, es bastante particular, puesto que a pesar de que De Saussure (1857) no estableció un holotipo o una serie sintipo, no se cuenta con la certeza suficiente para asegurar que los individuos encontrados en el acervo del MHNG pertenecen a aquellos colectados por De Saussure durante su expedición en México (Hollier, 2018); por lo que es imposible determinar si se trata o no de la serie sintipo original, debido principalmente a las inconsistencias entre la localidad escrita en su publicación de 1857 y la anotada en la etiqueta de los ejemplares del MHGN (ver apartado “Comentarios taxonómicos” en la redescrición de *P. americana s. str.*).

2) La confusión de fondo de la localidad tipo y la incongruencia respecto a la distribución natural del género *Pseudothelphusa*: De Saussure (1857) indica que la procedencia de los ejemplares de *P. americana s. str.* que recolectó durante su expedición es Haití; sin embargo, los únicos ejemplares que se tienen registrados de *P. americana* etiquetados bajo el nombre de “M H De Saussure” llevan anotado Cuba como lugar de procedencia. Actualmente se conoce que la distribución natural del género *Pseudothelphusa* se limita a la vertiente del Pacífico y el centro de México, mientras que en Haití y en Cuba sólo se encuentran miembros pertenecientes a la familia Epiloboceridae. La confusión de fondo fue expresada por primera vez por Bott (1978), sugiriendo que, durante su expedición, De Saussure confundió material proveniente de México con aquel que venía de las Antillas. En las memorias de su viaje, De Saussure tampoco fue muy claro respecto en qué lugar pudo haber recolectado a esta especie, por lo que es imposible determinar el lugar exacto de procedencia.

Estos dos puntos amenazan la estabilidad y la universalidad del nombre. Por lo tanto, y en virtud de los artículos 73.2.3, 73.3.1 y 76.3 del CINZ (2000), se propondrá establecer un neotipo portanombre para solucionar los problemas de: 1) la fuerte fragmentación e inviabilidad taxonómica de los ejemplares del MHNG; 2) la inespecificidad de la serie encontrada en el acervo del mismo museo; y 3) la localidad tipo incongruente entre lo anotado por De Saussure (1857), la etiqueta de los ejemplares del MHNG y la distribución natural de la especie.

Para ello, y debido a que no existe una localidad tipo coherente para escoger un topotipo - tal y como apunta la recomendación 75A (CINZ, 2000)- se propondrá un ejemplar cercano a alguna localidad visitada por De Saussure durante su expedición y donde se ha recolectado a *P. americana s. str.*

### ***Pseudothelphusa americana* s. str. y *P. dugesi***

*Pseudothelphusa americana* ha sido un nombre que se le ha asignado a una serie de ejemplares cuya procedencia no eran precisamente las correspondientes a su distribución natural - e.g. los ejemplares de Chilapa revisados por Bott (1968)- según los más recientes estudios. Históricamente, la aparente alta similitud que presenta con otras especies (Rathbun 1893, 1898) impedía establecer con claridad sus límites específicos, incluso llegando a ser representada con sintipos no correspondientes (Chace y Hobbs 1969).

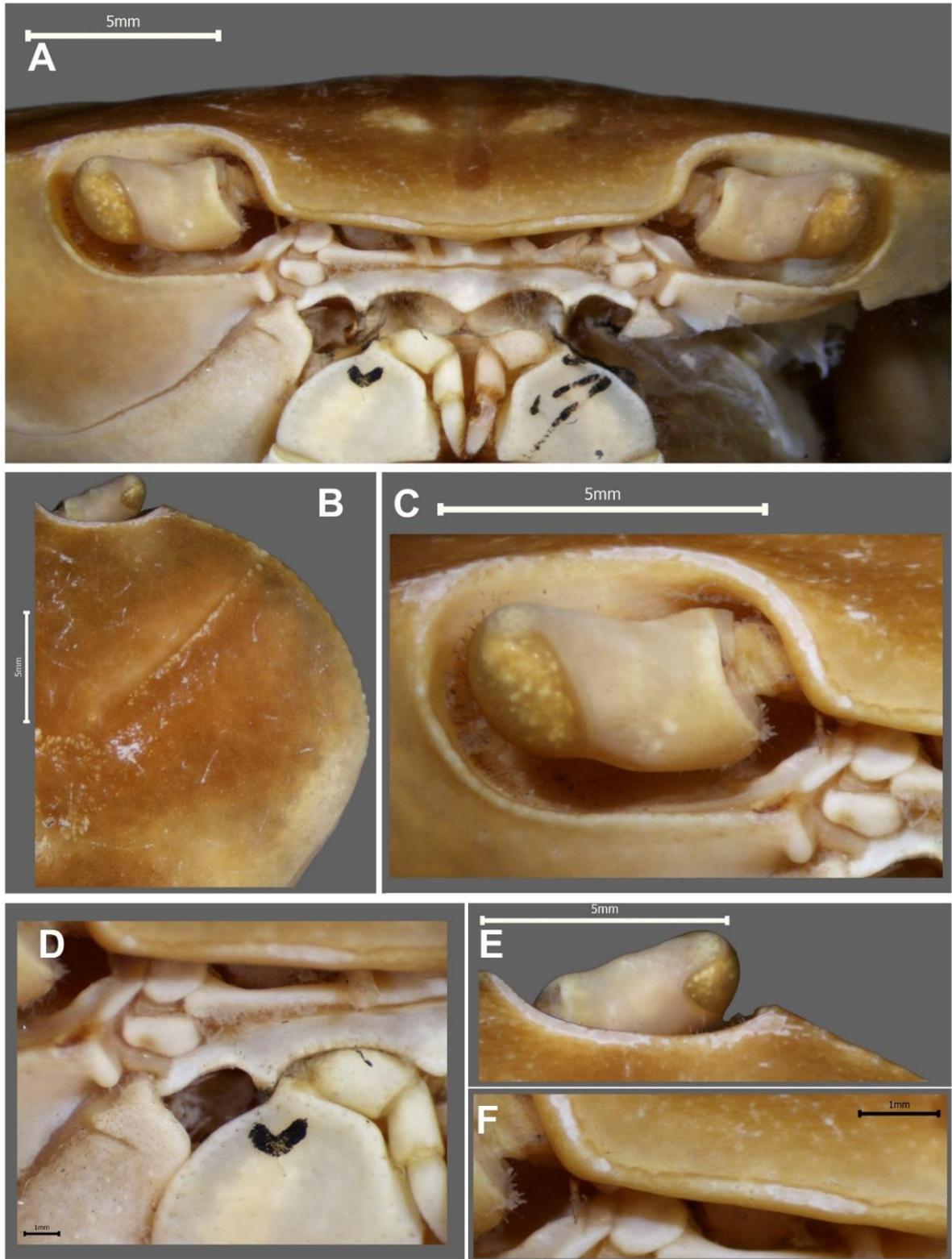
Las distinciones entre *P. americana* y *P. dugesi* son mínimas, pero consistentes. Villalobos-Hiriart (2005) rescata algunas estructuras somáticas que las permiten discriminar, como el borde frontal anterior sin concavidad media vs. borde frontal anterior moderadamente convexo y con concavidad media. Sin embargo, parece necesario discutir un par de diferencias adicionales respecto al primer gonópodo del macho que nos permiten reconocerlas con facilidad y que son constantes con los dibujos presentados por Chace y Hobbs (1999).

En primer lugar, el proceso mesial en *P. dugesi* (Lámina XXXIII) en vista cefálica se aprecia subrectangular, más parecido al patrón morfológico observado en *P. belliana*, mientras que en *P. americana* es subtriangular.

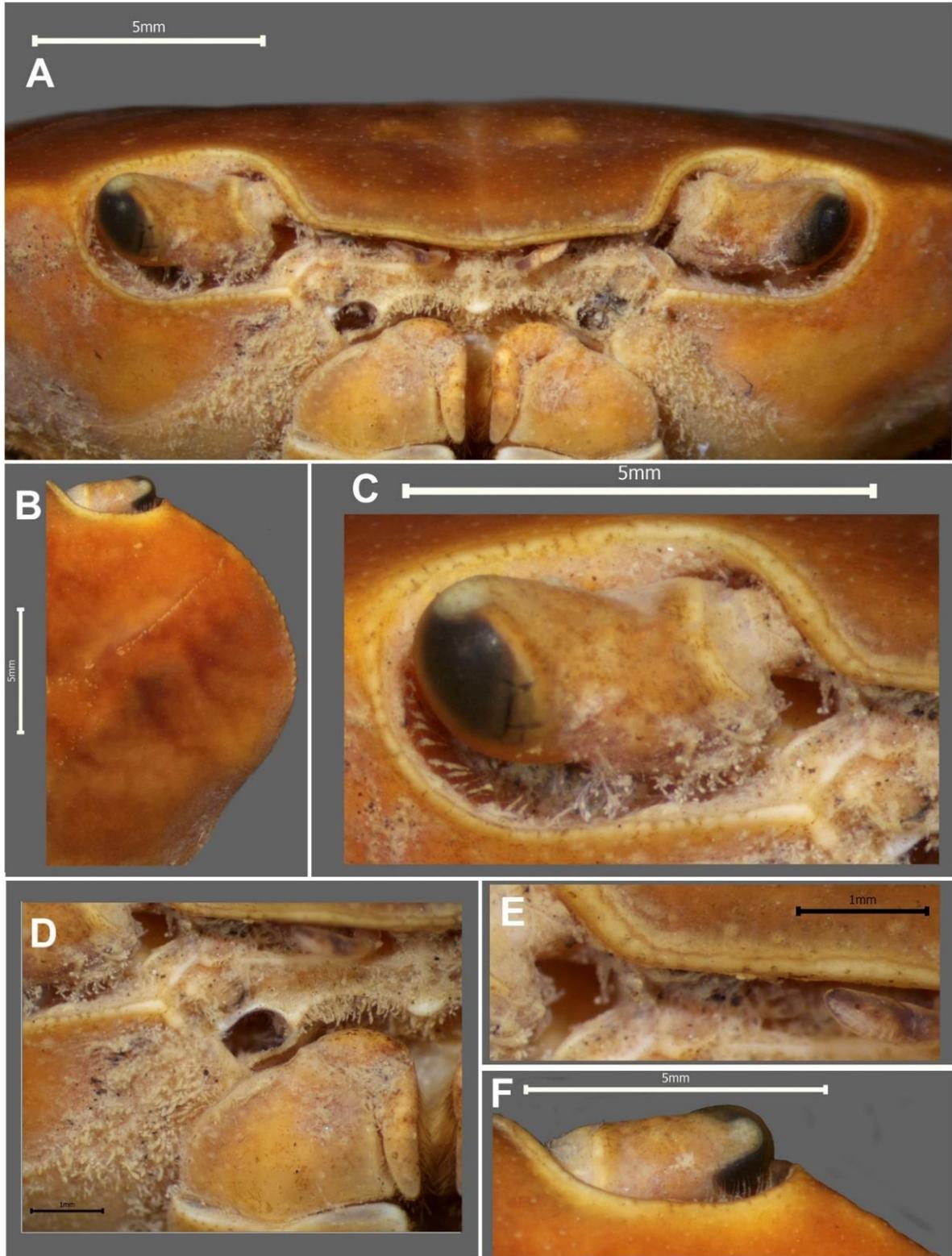
Por otra parte, el mismo proceso visto distalmente en *P. dugesi* se encuentra notablemente ensanchado en la porción media, y la cavidad apical es amplia y corta; en *P. americana* el proceso mesial en vista distal no se encuentra tan ensanchado, y la cavidad apical presenta diferentes grados de desarrollo en función de la localidad que se revise.

## Conclusiones generales

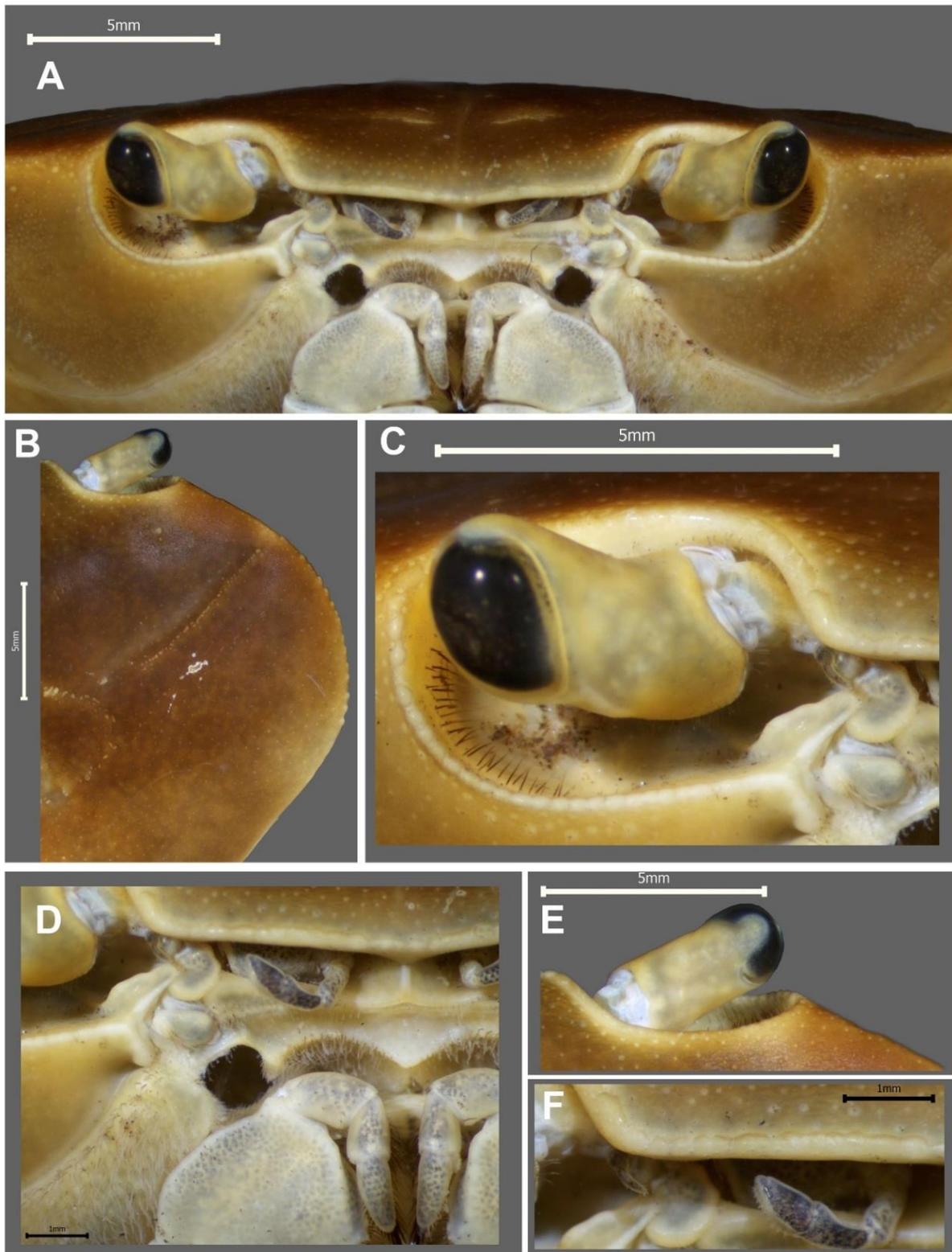
1. El complejo *P. americana* se encuentra formado por más de una especie morfológicamente similares que no se encuentran filogenéticamente relacionadas.
2. *P. americana s. str.* corresponde a las poblaciones de Hidalgo, Puebla y Tlaxcala e incluye a *P. americana* var. Mixquiahuala propuesta por Villalobos-Hiriart (2005).
3. La red de haplotipos de 16S, mostró que *P. americana s. str.* cuenta con dos haplotipos geográficamente coherentes. El primero correspondiente a las poblaciones de la cuenca del Pánuco, mientras que el segundo pertenece a las de la cuenca del Balsas.
4. La red de haplotipos de COI reveló que la población de San Miguel presenta un haplotipo diferente. A pesar de ello, su ubicación en el árbol filogenético no hacen posible identificarla como un linaje a nivel de especie separado de *P. americana s. str.*
5. Necoxtla -*P. americana* var. Tehuacán (Villalobos-Hiriart, 2005)- presenta más de un 2% de divergencia en COI y 16S superando el umbral de delimitación de grupos. Además, no se encuentra directamente emparentada con *P. americana s. str.* como se hipotetizaba en Villalobos-Hiriart (2005).
6. Ajolotero -*P. americana* var. Chilapa (Villalobos-Hiriart, 2005)- satisface el umbral de delimitación de grupos en ambos genes evaluados, y se encuentra emparentada con el clado *P. hoffmanae*-*P. belliana*.
7. Tzararacua y Zihuatanejo son notablemente divergentes respecto al complejo *P. americana*. A pesar de que sus relaciones dentro del grupo no son claras, esta primera línea de evidencia sugiere que se podría tratar de otros dos grupos específicos aún sin describir
8. El análisis morfogeométrico de la proyección caudo-marginal en vista mesial del complejo *P. americana* no fue capaz de diferenciar estadísticamente a las poblaciones que lo componen, salvo aquellas de Querétaro.
9. La forma de los ejemplares de Tzararacua se encuentra estadísticamente diferenciada al resto de los individuos estudiados.
10. La estimación de las distancias euclidianas proveyó de información coherente con lo expuesto por la filogenia molecular.
11. La aproximación morfogeométrica al primer gonópodo del macho, es una herramienta completaría con bastante potencial para la delimitación especies crípticas. Por lo que es necesario ahondar en el diseño de plantillas, en la selección del tipo de landmarks y estructuras, así como de pruebas estadísticas que nos permitan evaluar con más precisión los cambios en la forma (shape) dentro del género *Pseudothelphusa*.
12. Evidencia molecular, morfogeométrica y morfológica soportan las hipótesis de  
*Pseudothelphusa* sp. nov. 1 (Ajolotero)  
*Pseudothelphusa* sp. nov. 2 (Necoxtla)  
*Pseudothelphusa* sp. nov. 3. (Zihuatanejo)  
*Pseudothelphusa* sp. nov. 4 (Tzararacua)  
*Pseudothelphusa* sp. nov. 5 (Querétaro)



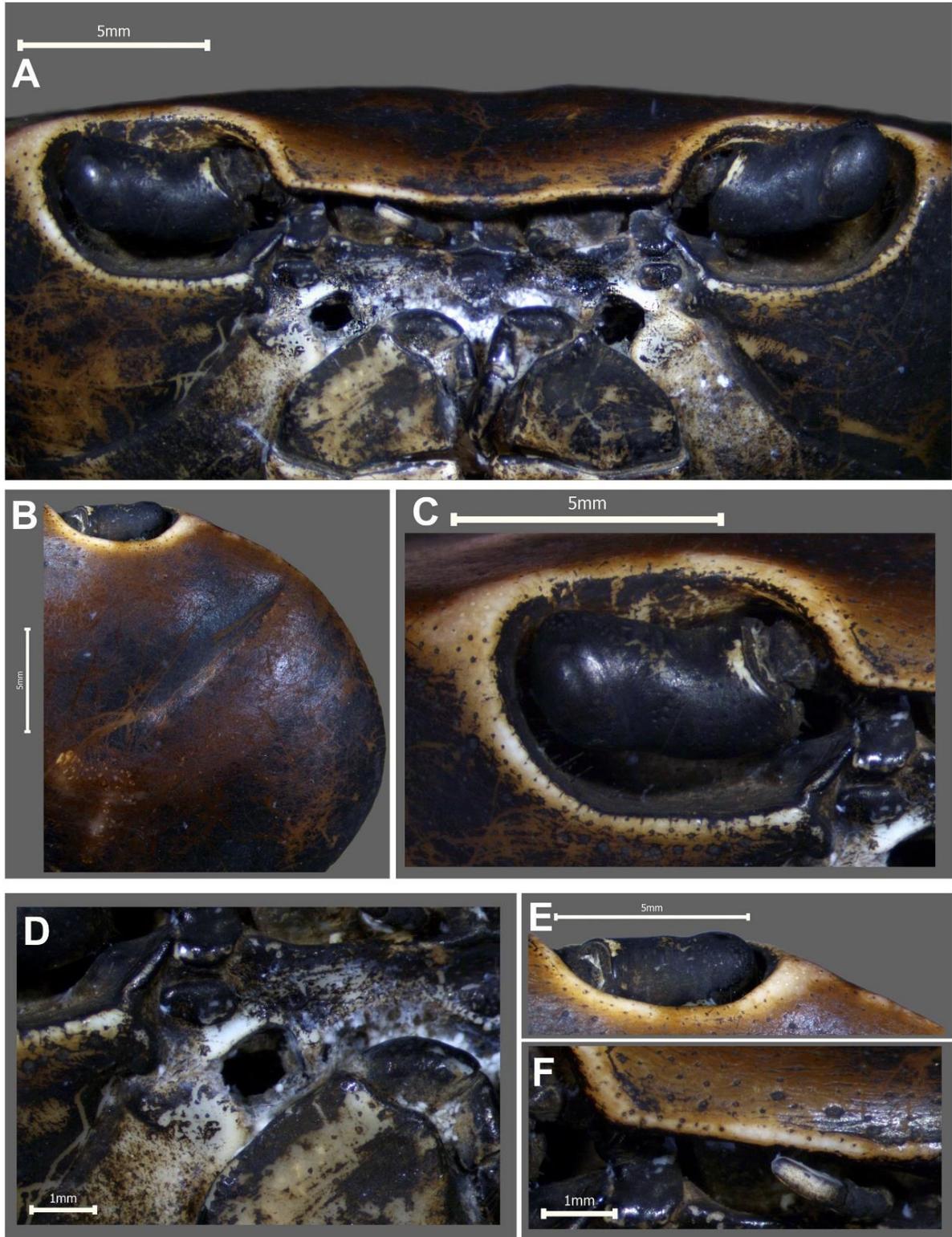
**Lámina I.** *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar EM 355, proveniente de Chignahuapan, Puebla) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).



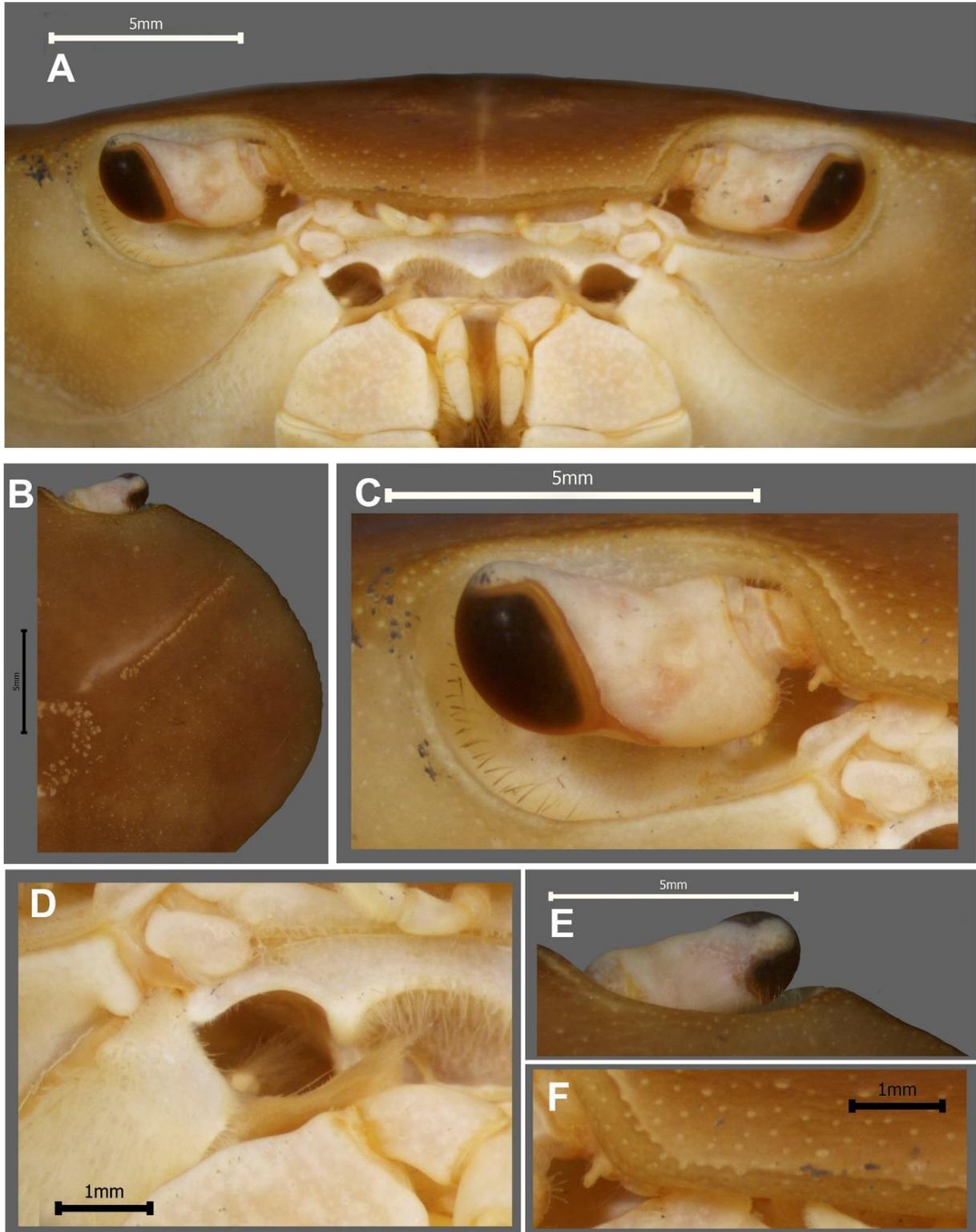
**Lámina II.** *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 25527, proveniente de las cascadas de Quetzalapa, Zacatlán de las Manzanas, Puebla) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento). (F) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente).



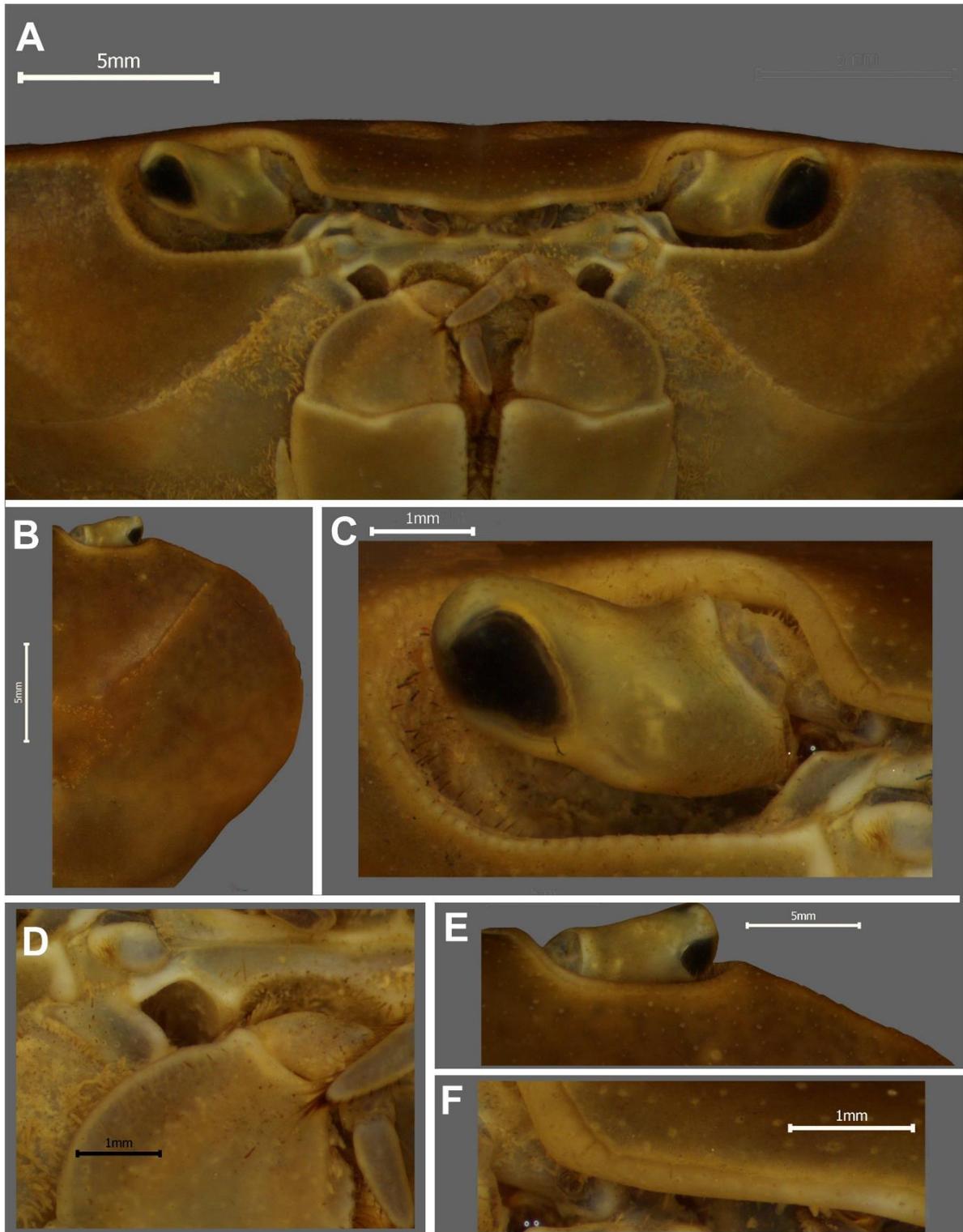
**Lámina III.** *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 35902, proveniente del manantial Palo Huérfano, Amaxac de Guerrero, Tlaxcala) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).



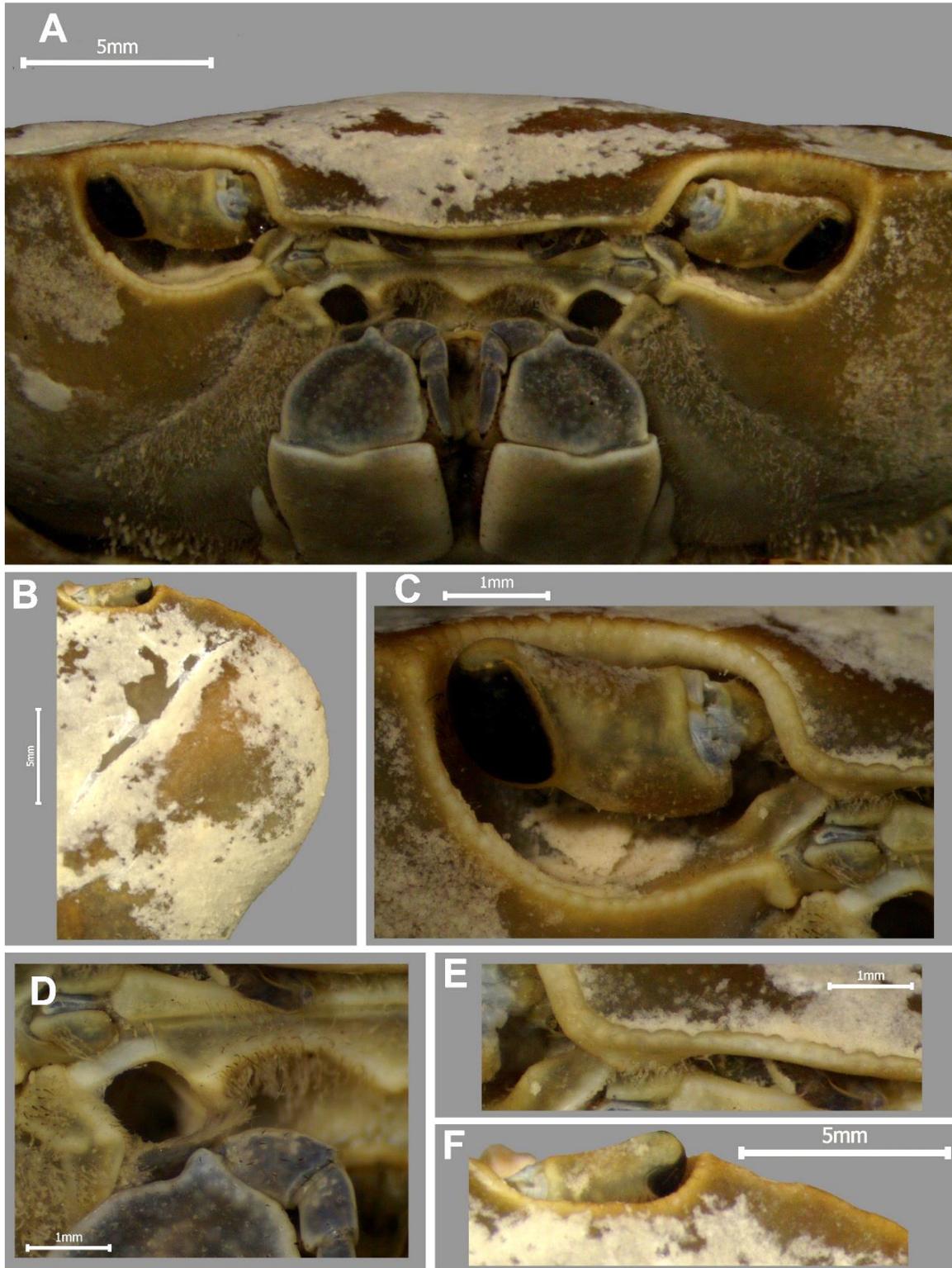
**Lámina IV.** *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 35900, proveniente de Presa San Miguel, Ixtacuixtla, Tlaxcala) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).



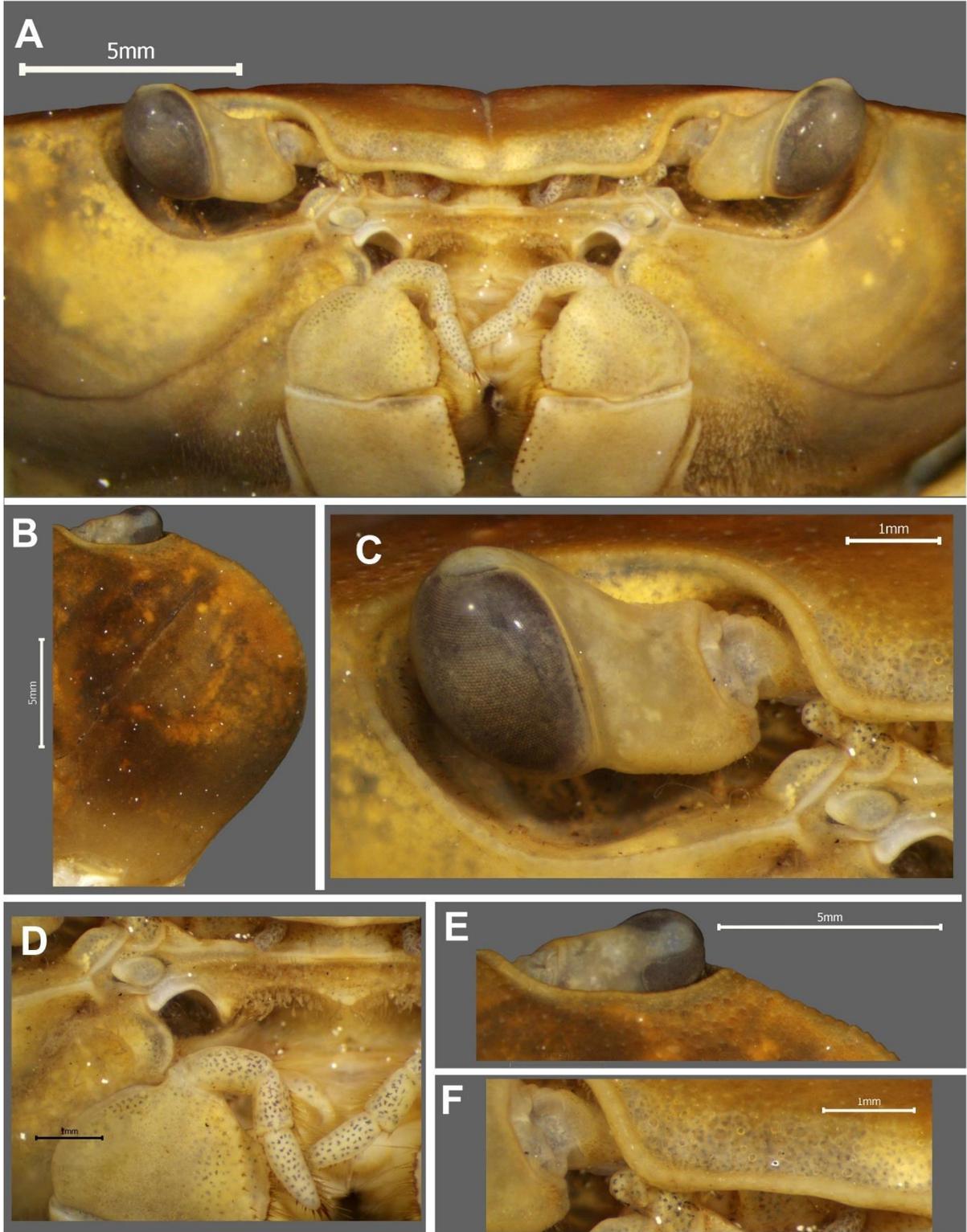
**Lámina V.** *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 340, proveniente de Ventoquipa, Hidalgo) (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).



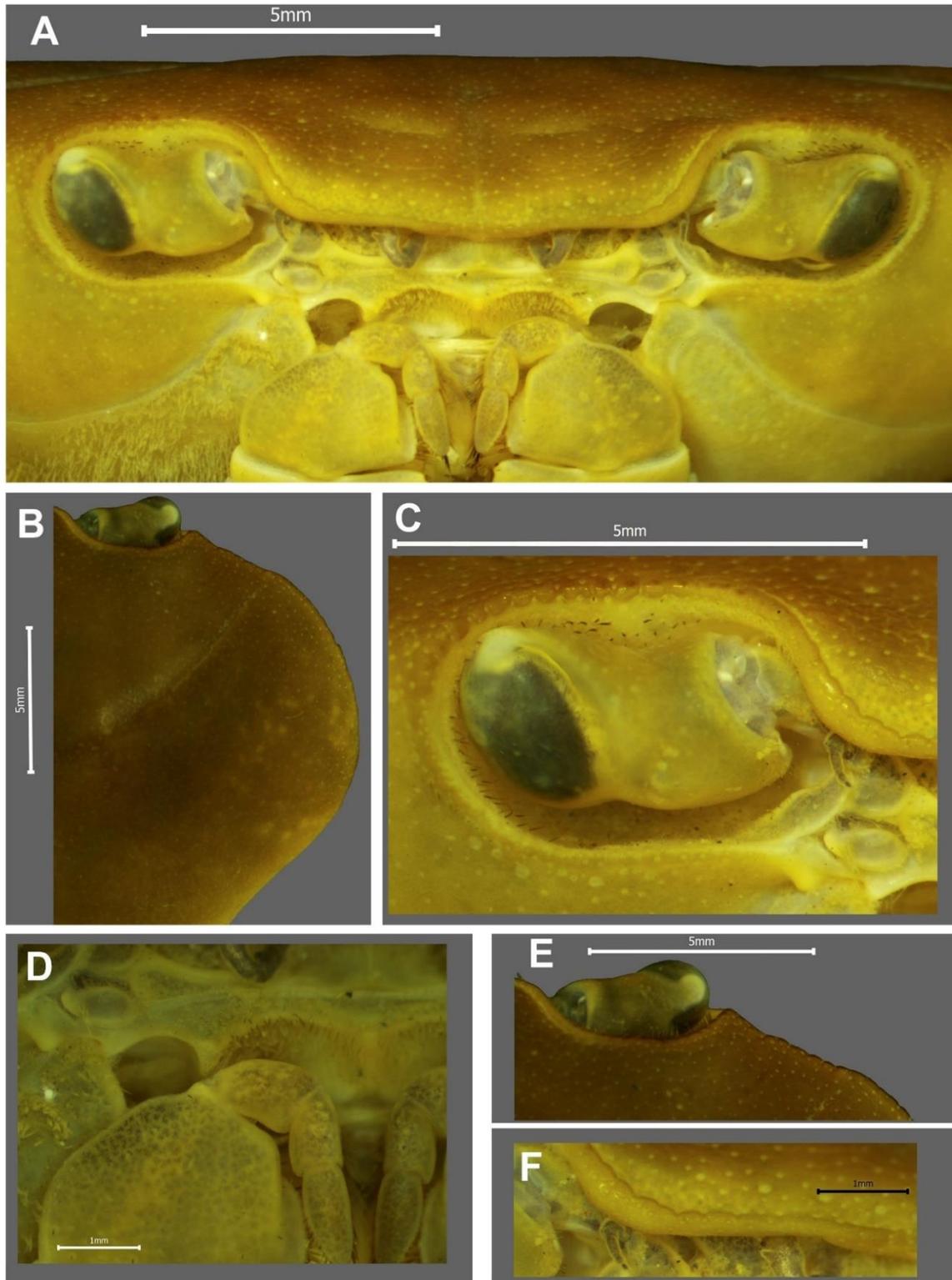
**Lámina VI.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 1 (Ajolotero) (Ejemplar CNCR 29077, proveniente de Río Ajolotero cerca de Chilapa, Guerrero). (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo ( ). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).



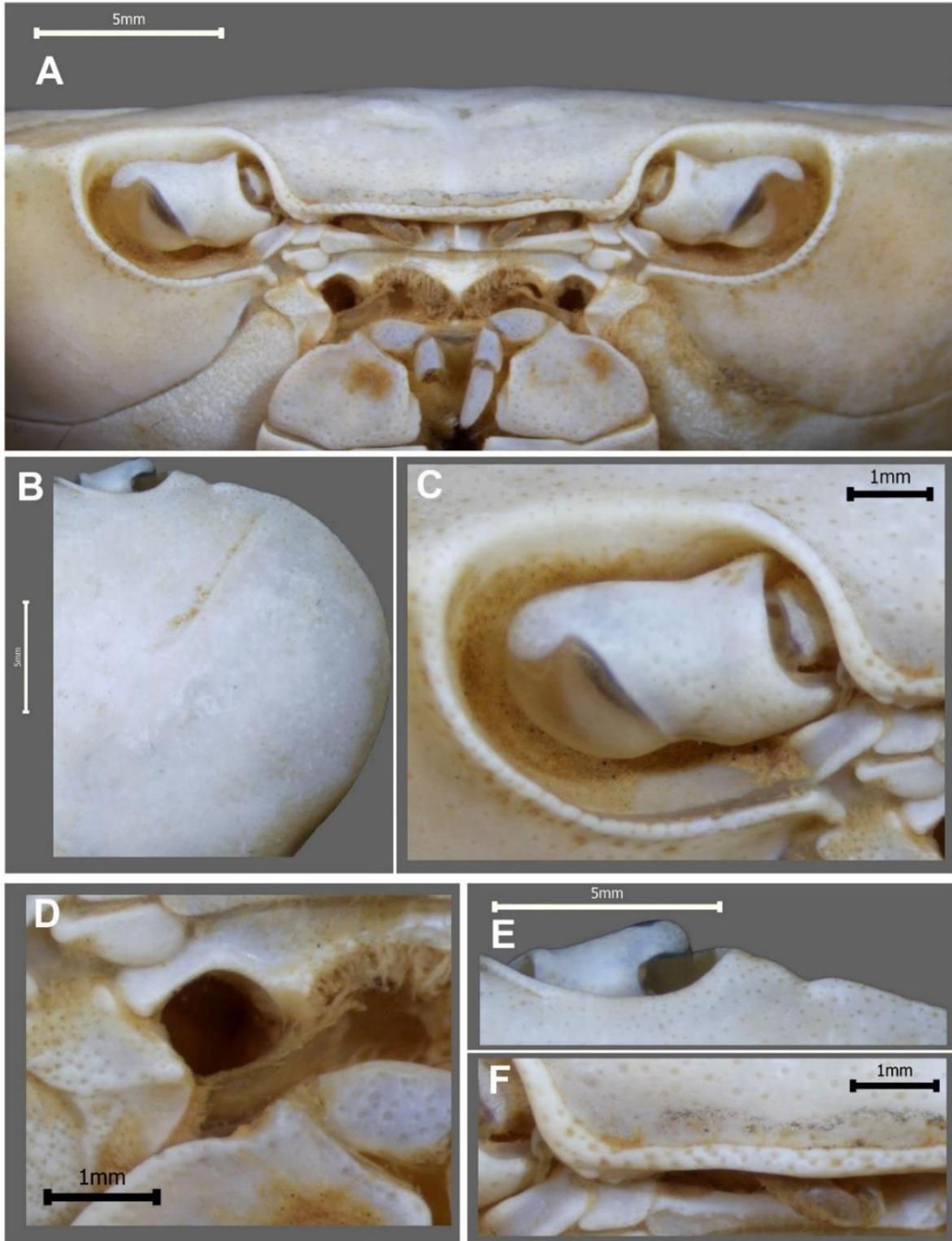
**Lámina VII.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 (Necoxtla) (Ejemplar CNCR 36592, proveniente de San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla). (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Borde frontal inferior, extremo derecho (con ensanchamiento). (F) Escotadura del ángulo orbital externo (presente).



**Lámina VIII.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 3 (Zihuatanejo) (Ejemplar CNCR 35903, proveniente de Zihuatanejo, Guerrero). (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (ausente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).



**Lámina IX.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 4 (Tzararacua) (Ejemplar CNCR 29104, proveniente de las Cascadas de Tzararacua, Uruapan, Michoacán). (A) Vista frontal. (B) Margen anterolateral. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (presente). (F) Borde frontal inferior, extremo derecho (sin ensanchamiento).



**Lámina X.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 5 (Querétaro) (Ejemplar EM 342, proveniente de Querétaro-Estado de México) (A) Vista frontal. (B) Margen frontal anterior. (C) Margen orbital. (D) Abertura del canal eferente. (E) Escotadura del ángulo orbital externo (presente). (F) Borde frontal inferior (con ensanchamiento)



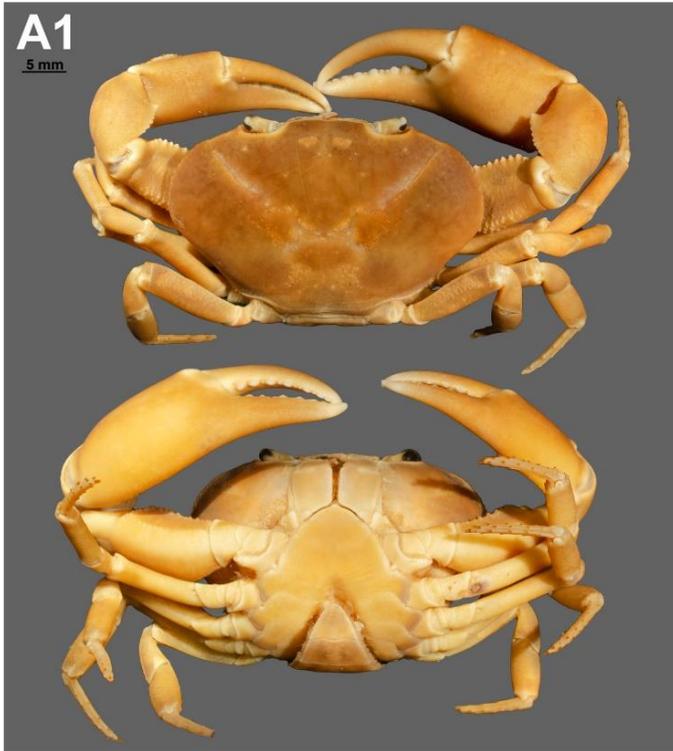
**Lámina XI.** (A) *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 10460, proveniente de Apizaco, Tlaxcala). (B) *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 35902, proveniente del Manantial Palo Huérfano, Amaxac de Guerrero, Tlaxcala). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor.



**Lámina XII.** (A) *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 35900 (A1) y 35904 (A2), proveniente de San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala). (B) *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 12925, proveniente Mixquiahuala, Hidalgo). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor.



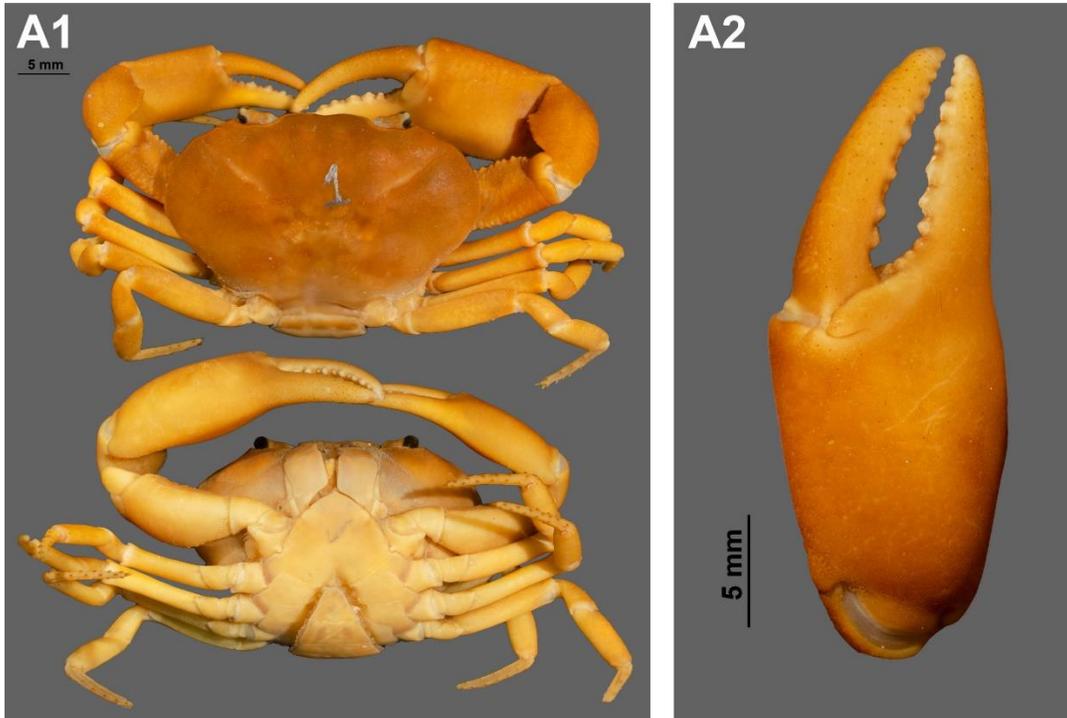
**Lámina XIII.** (A) *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 36154, proveniente de las Cascadas de Quetzalapa, Zacatlán de las Manzanas, Puebla). (B) *Pseudothelphusa americana* s. str. (Ejemplar CNCR 26108, proveniente de Tizcatlacoyan, Puebla). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor.



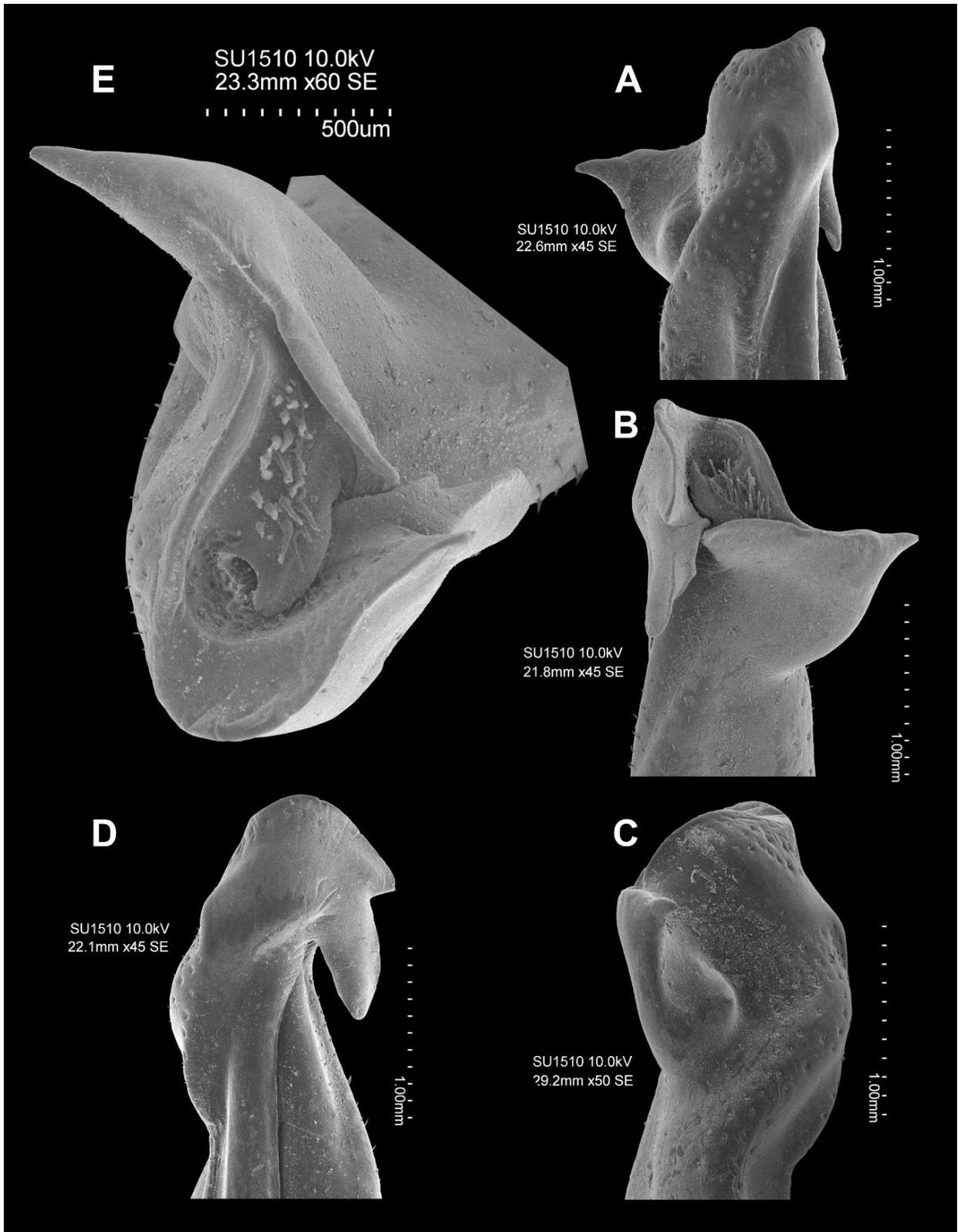
**Lámina XIV.** (A) *Pseudothelphusa* sp. nov. 1 (Ajolotero) (Ejemplar CNCR 29077, proveniente de Río Ajolotero cerca de Chilapa, Guerrero). (B) *Pseudothelphusa* sp. nov. 3 (Ejemplar CNCR 35903, proveniente de Zihuatanejo, Guerrero). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor.



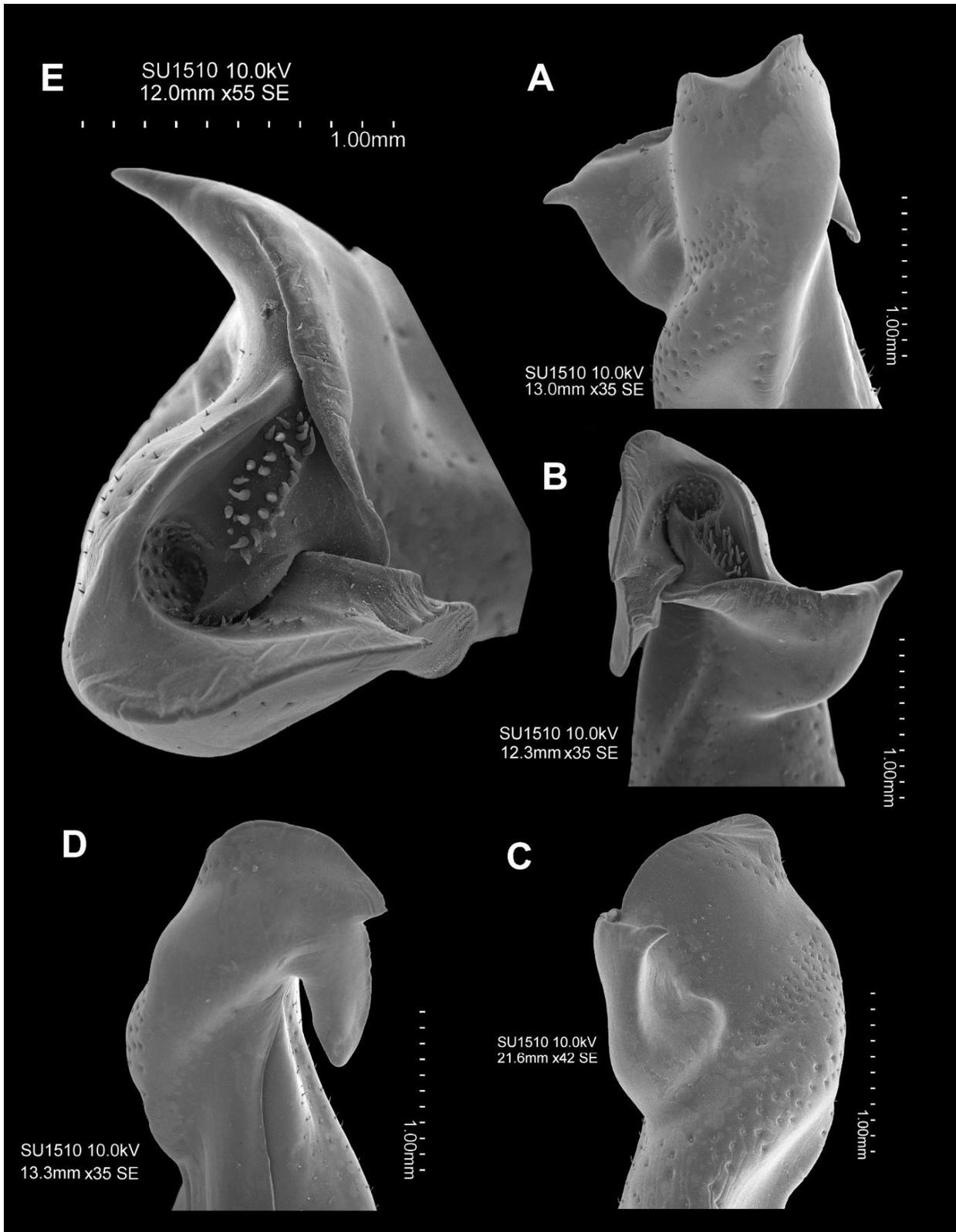
**Lámina XV.** (A) *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 (Necoxtla) (Ejemplar CNCR 36592, proveniente de San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla). (B) *Pseudothelphusa* sp. nov. 5 (Querétaro) (Ejemplar CNCR 342, proveniente de Querétaro-Estado de México). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor.



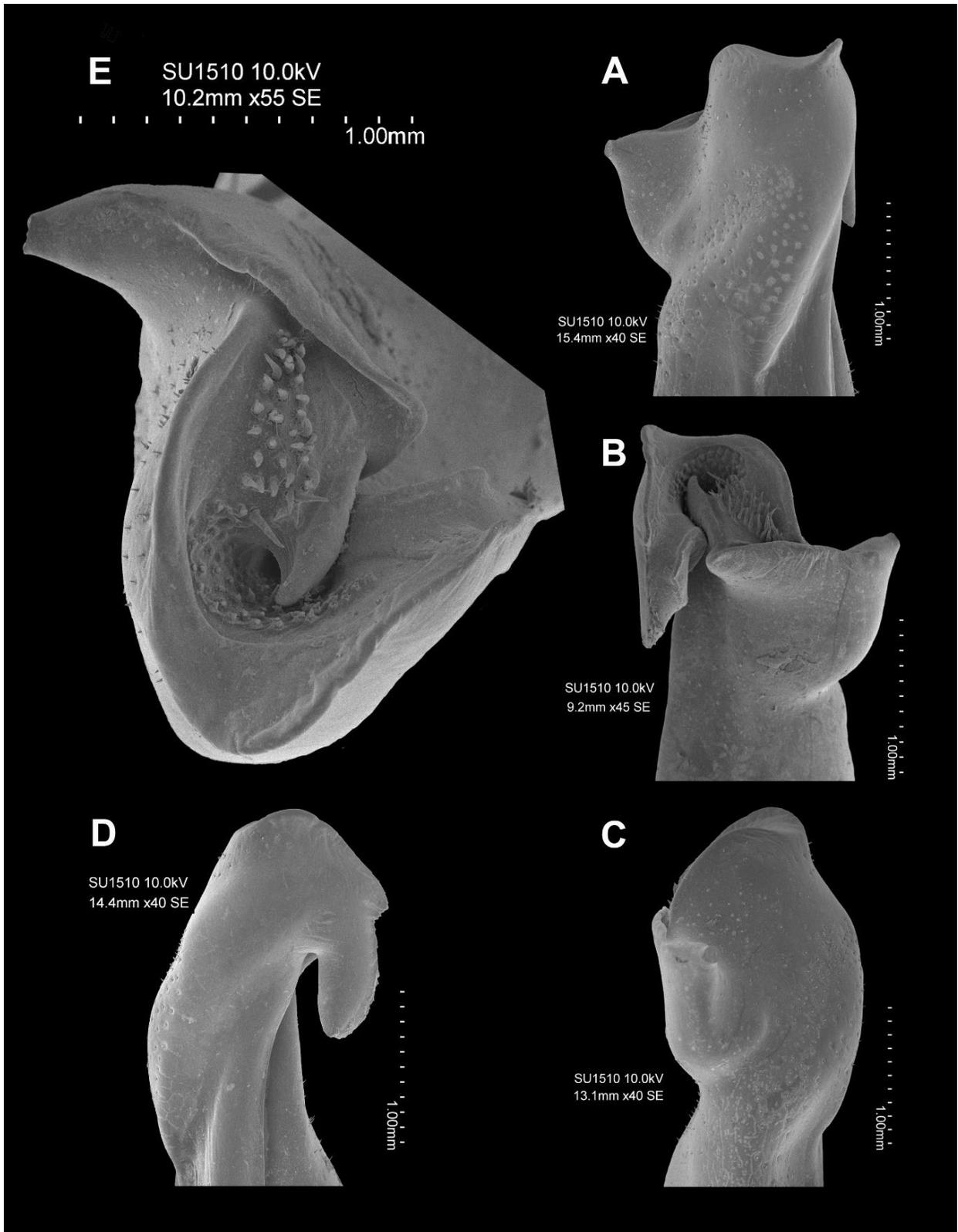
**Lámina XVI.** (A) *Pseudothelphusa* sp. nov. 4 (Tzararacua) (Ejemplar CNCR 29104, proveniente de las Cascadas de Tzararacua, Uruapan, Michoacán). (1) Hábito general vista dorsal y ventral. (2) Quela mayor.



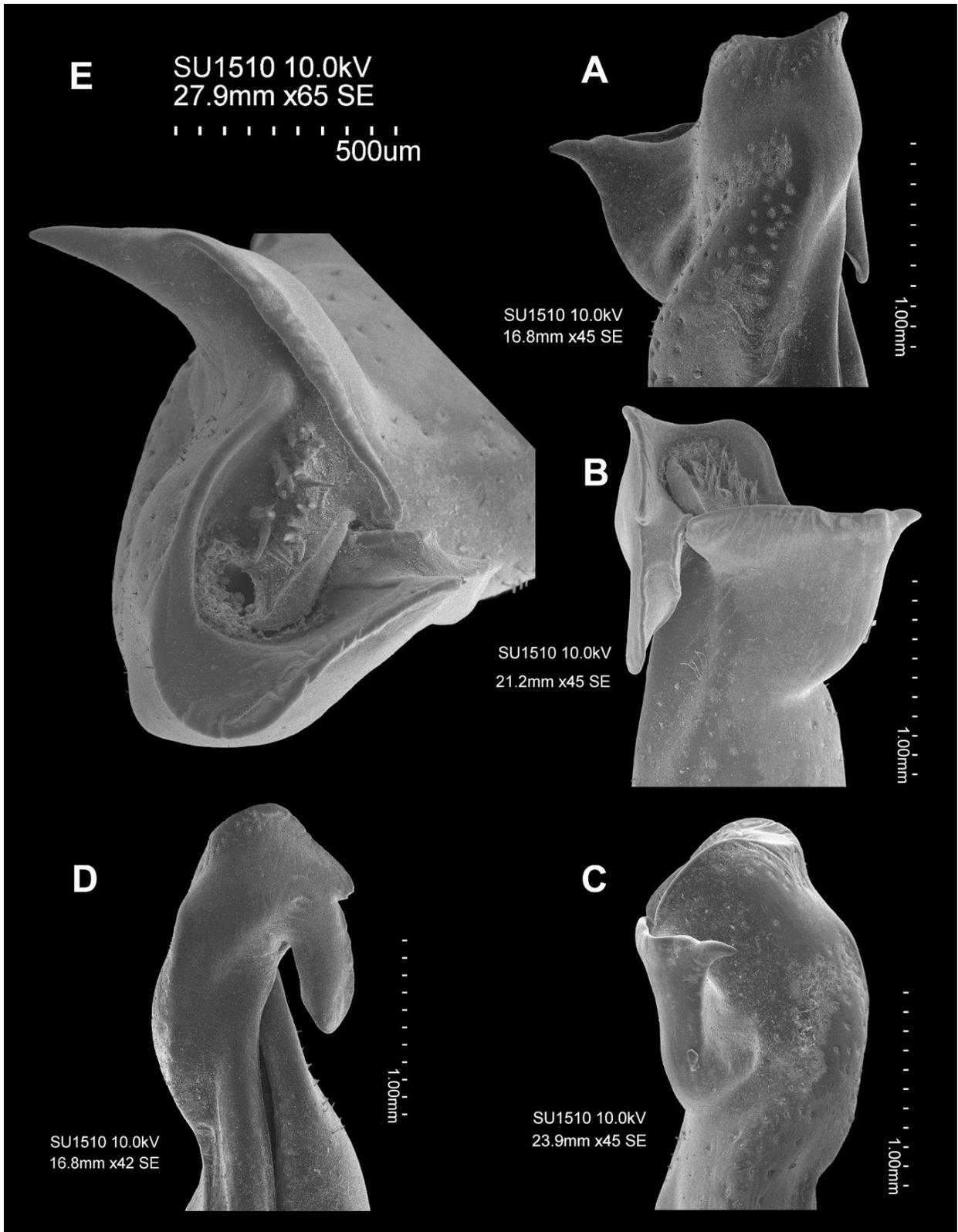
**Lámina XVII.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 10460, proveniente de Apizaco, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



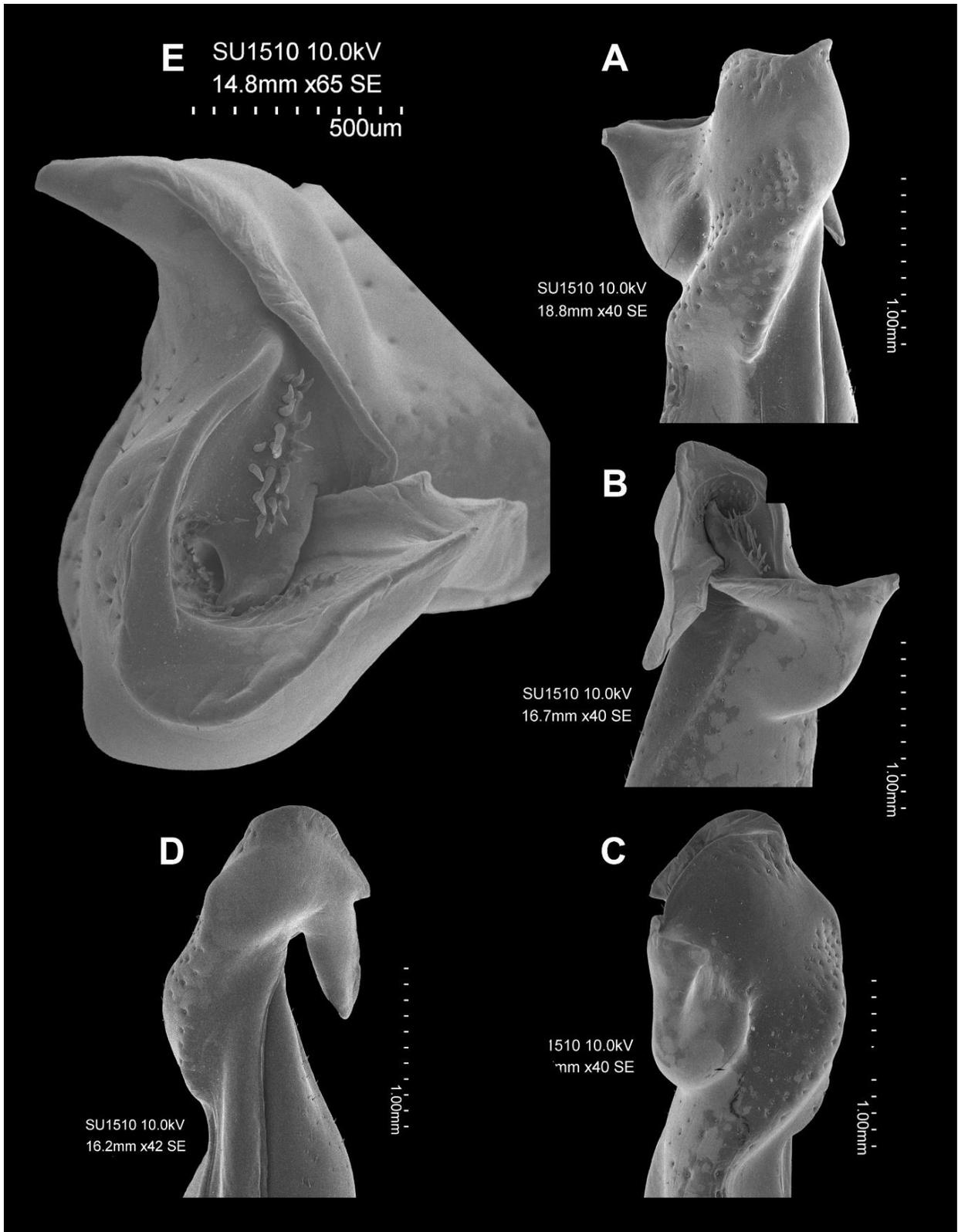
**Lámina XVIII.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35390, proveniente del manantial El Ojito, Apizaco, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



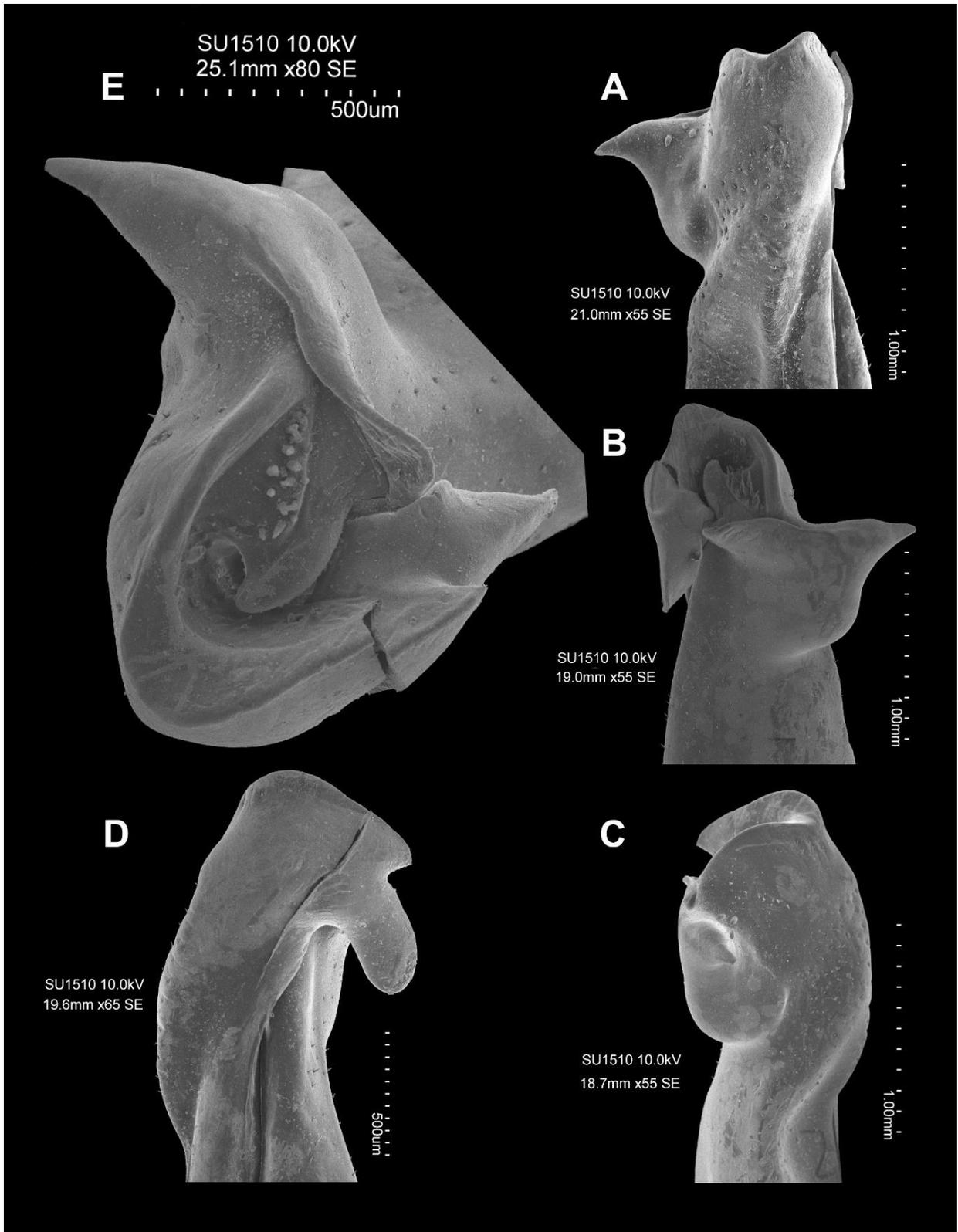
**Lámina XIX.** *Pseudothelphusa americana s. str.*, primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35900 proveniente de San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



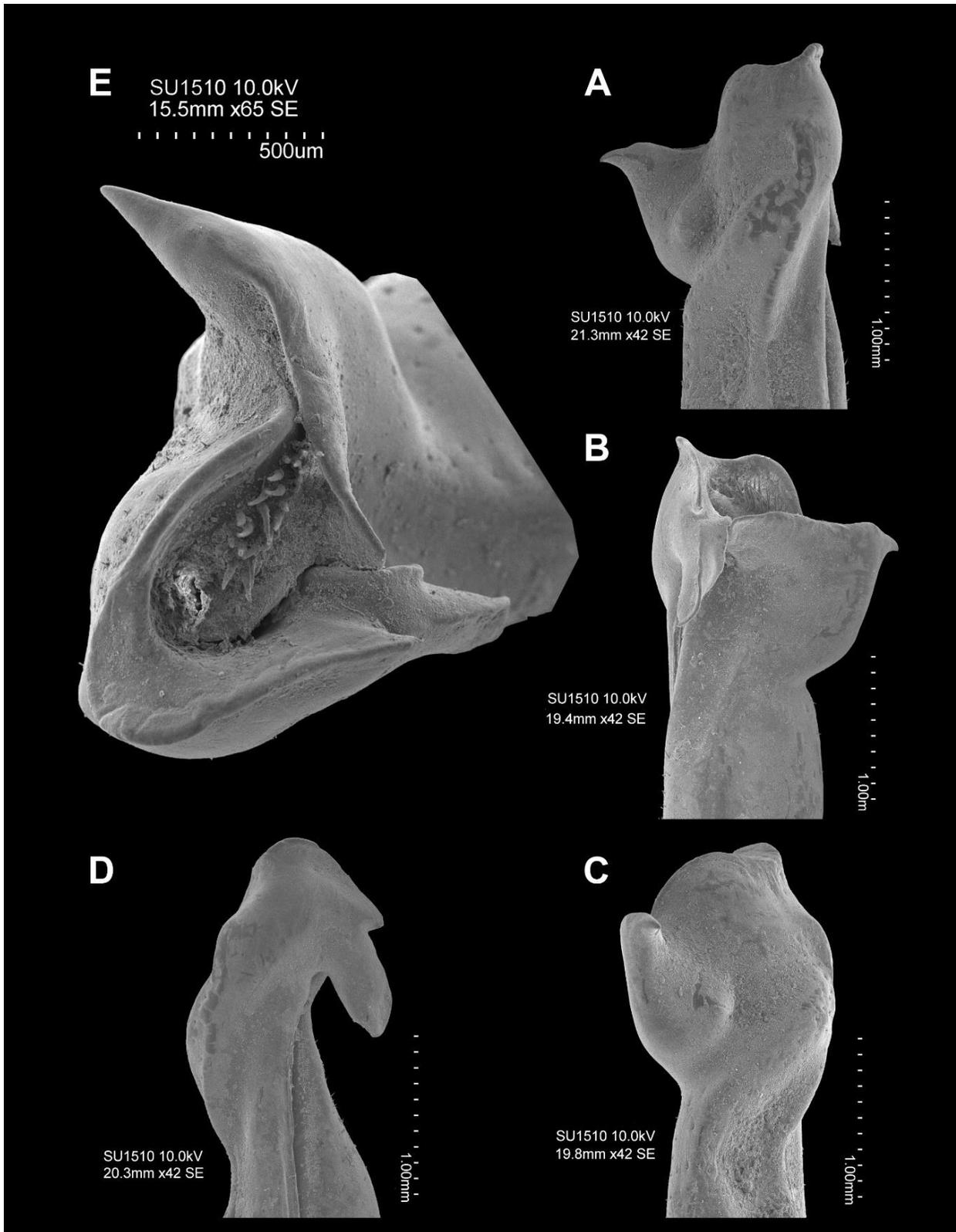
**Lámina XX.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35970, proveniente de San Miguel La Presa, Ixtacuixtla, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



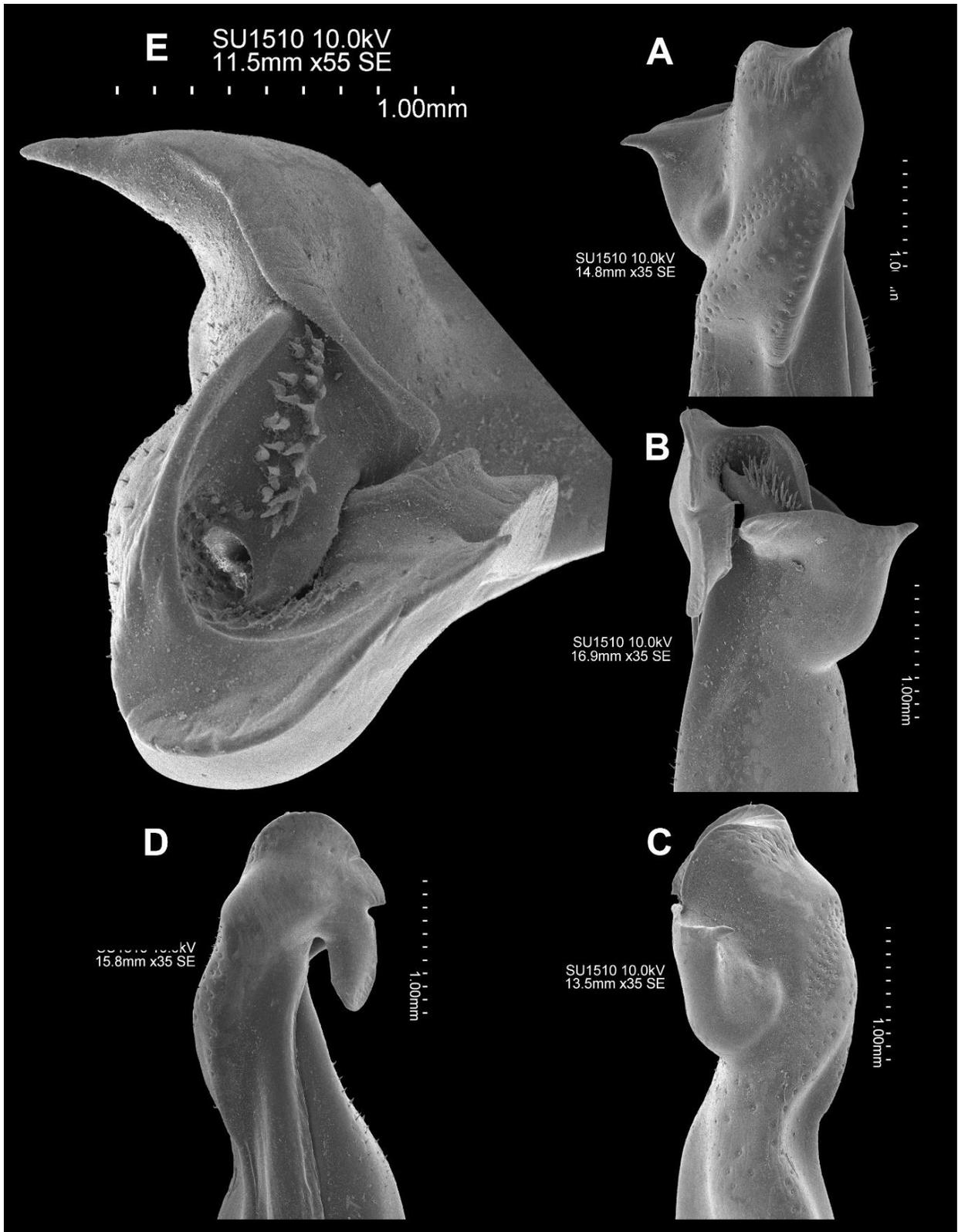
**Lámina XXI.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35902, proveniente del manantial Palo Huérfano, Amaxac de Guerrero, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



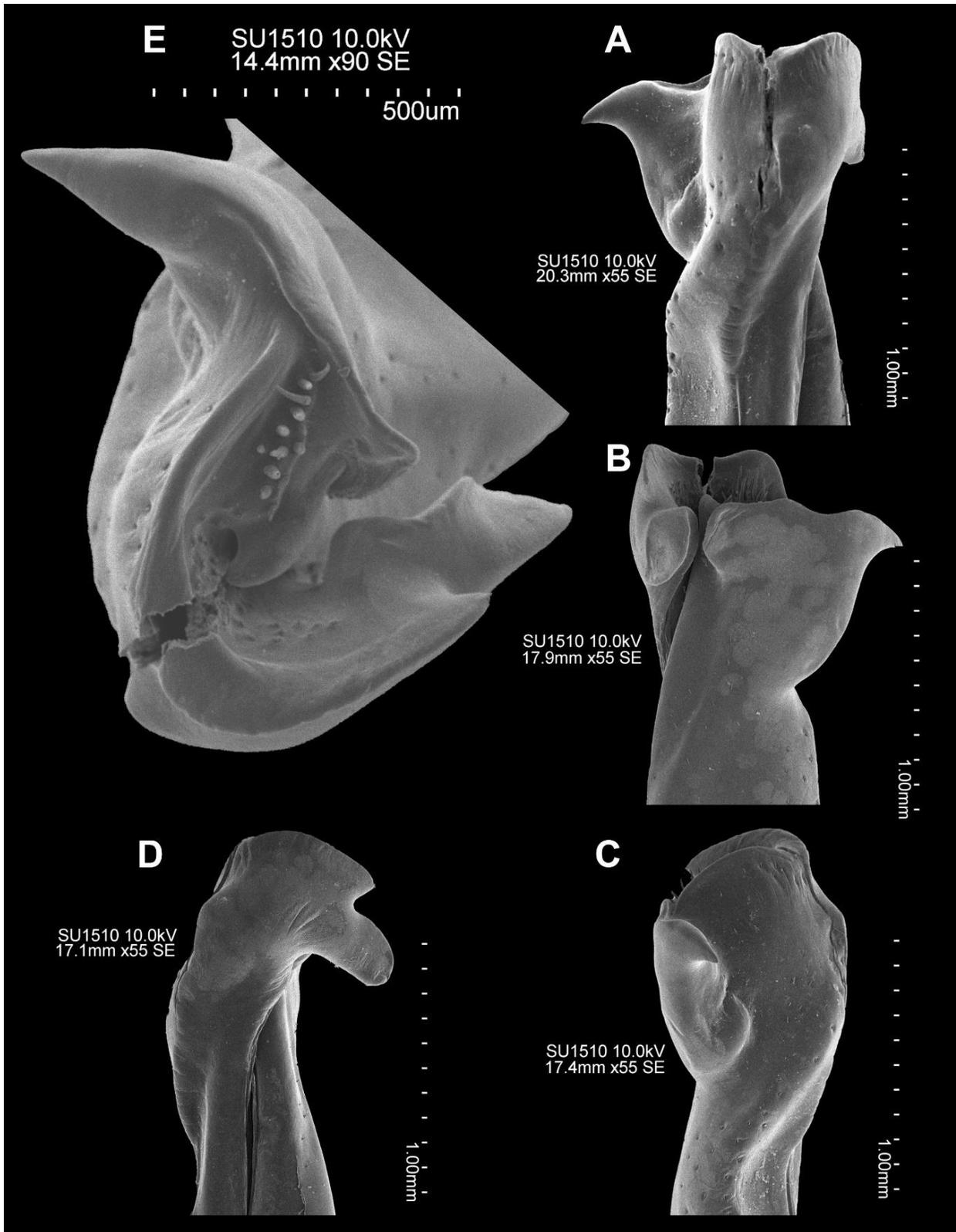
**Lámina XXII.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 33848, proveniente de La Ascensión Huitzcolotepec, Tlaxcala). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



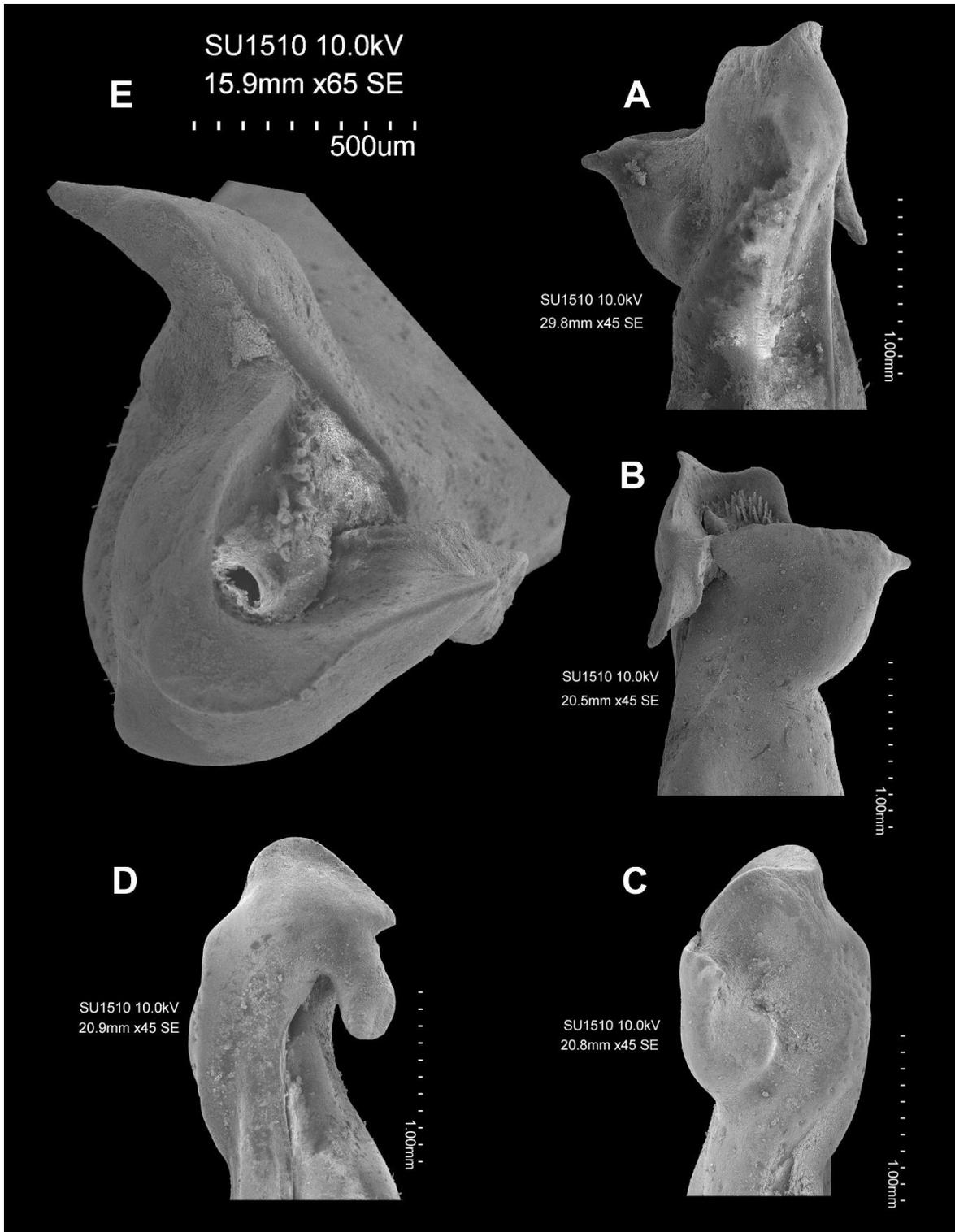
**Lámina XXIII.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 25527, proveniente de las Cascadas de Quetzalapa, Zacatlán de las Manzanas, Puebla). (A) Vista caudal. (B) Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



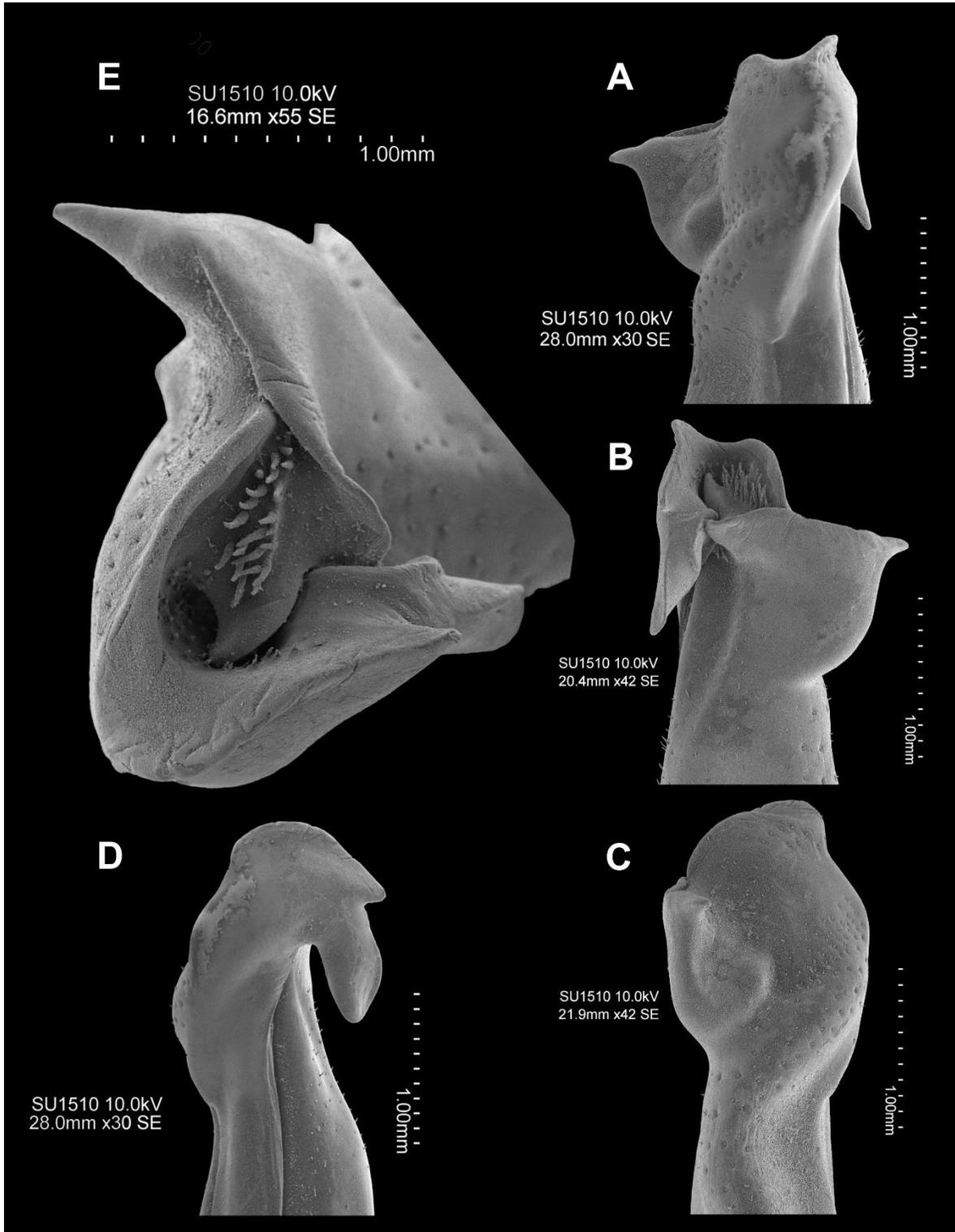
**Lámina XXIV.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 26108, proveniente de Tizcatlacoyan, Puebla). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



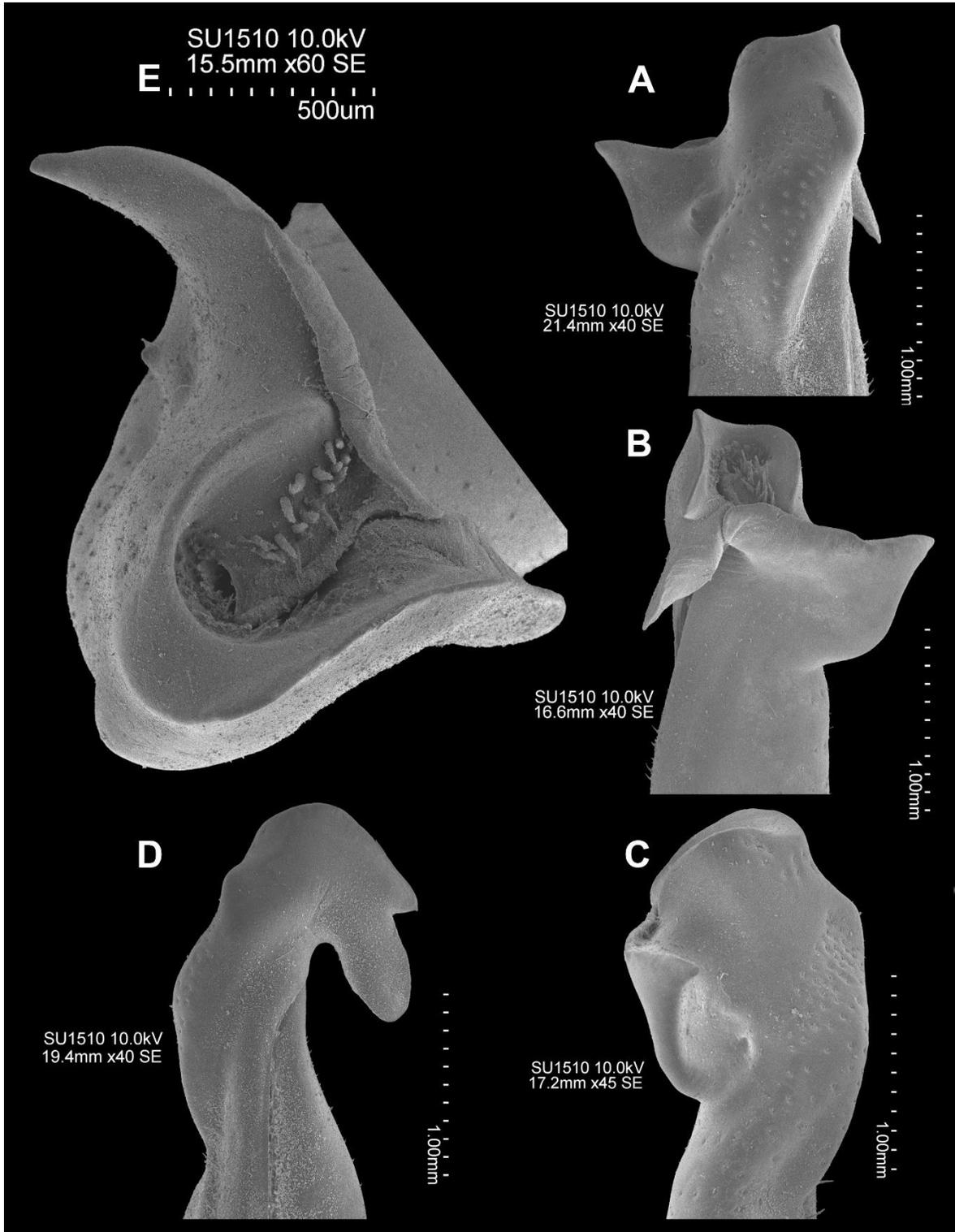
**Lámina XXV.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 31700, proveniente de Cuauxixtla, Tecali de Herrera, Puebla). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal. Individuo juvenil con desarrollo sexual incompleto.



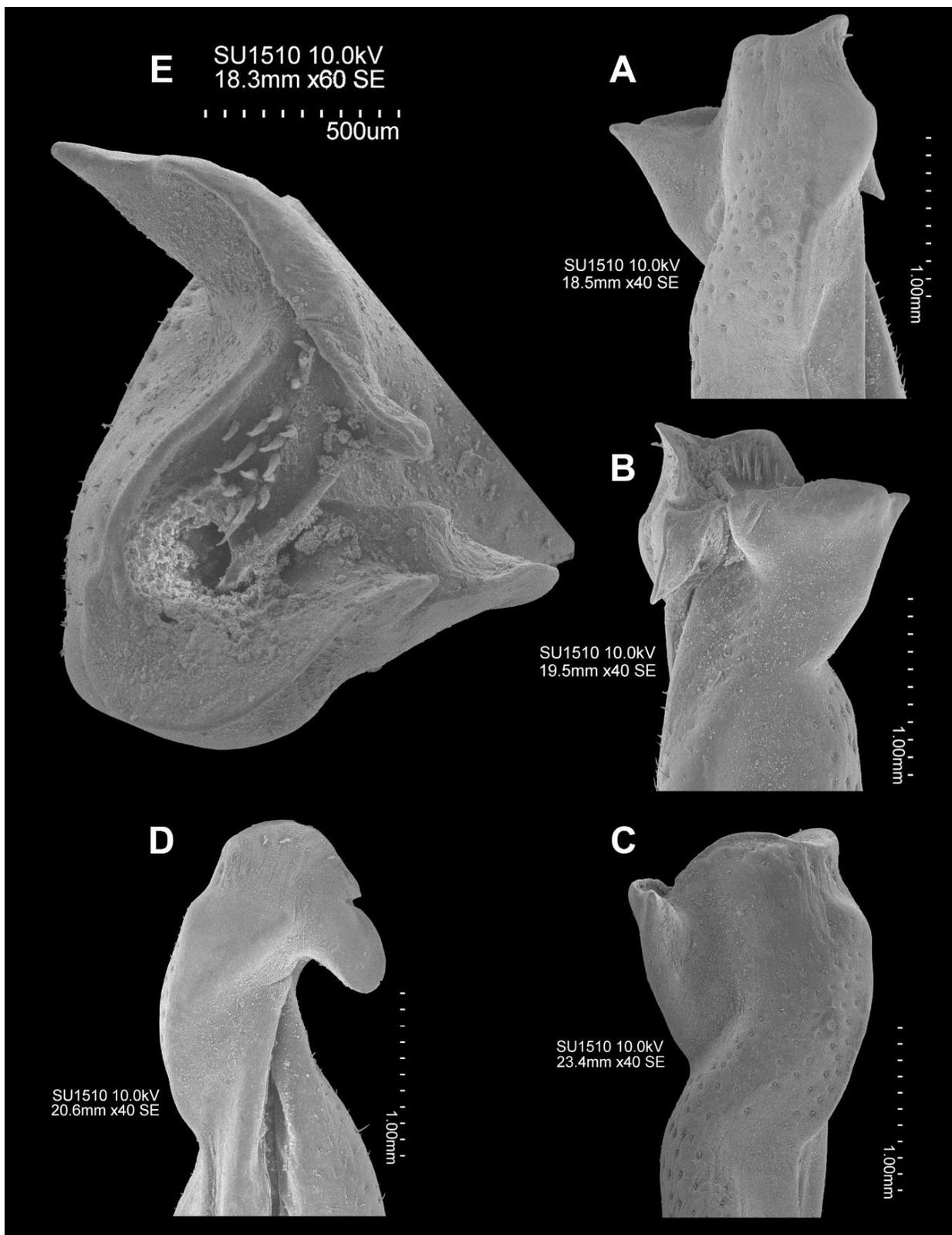
**Lámina XXVI.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 12925, proveniente de Mixquiahuala, Hidalgo). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



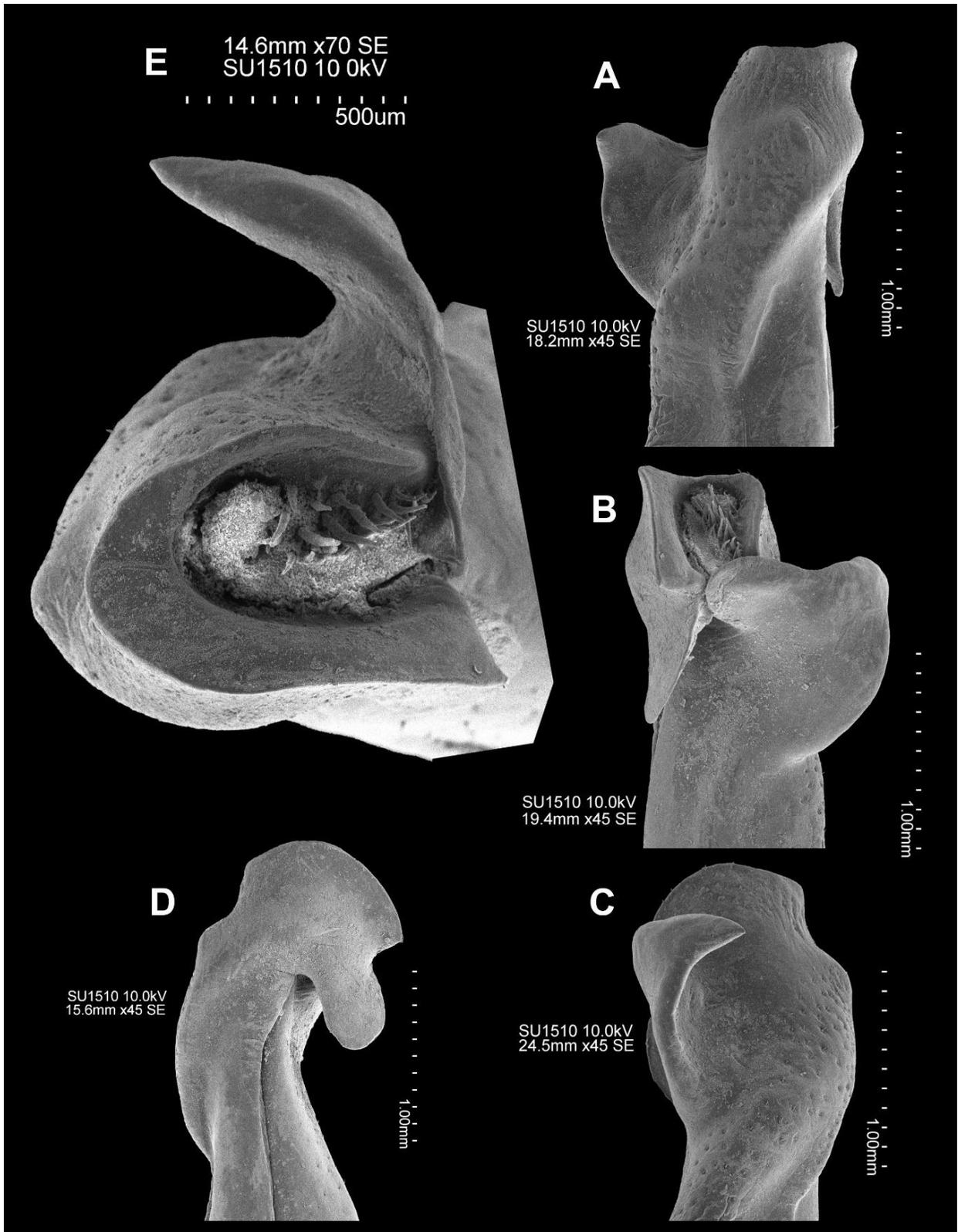
**Lámina XXVII.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 340, proveniente de Ventoquipa, Hidalgo). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



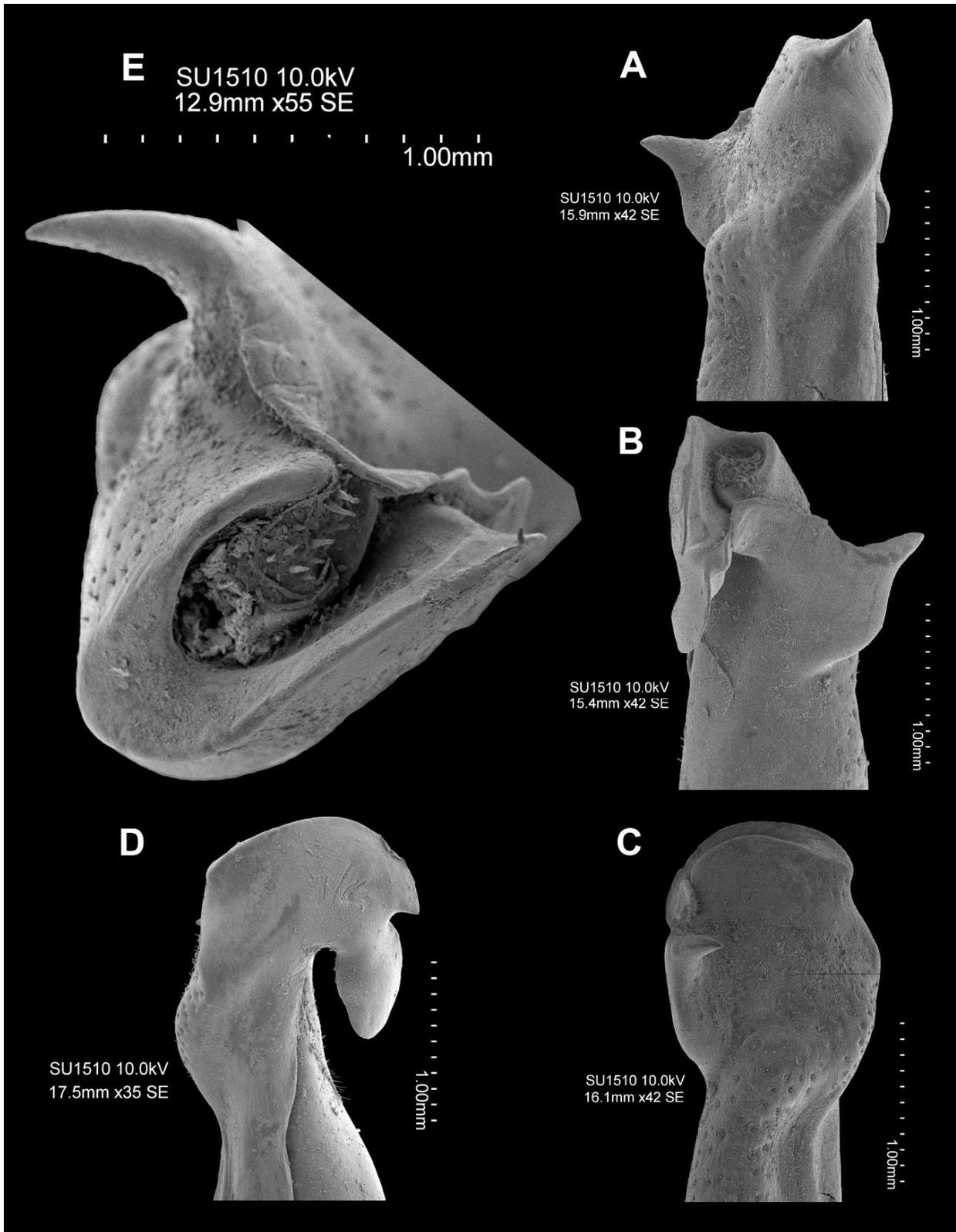
**Lámina XXVIII.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 1 (Ajolotero), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 29077, proveniente de Río Ajolotero cerca de Chilapa, Guerrero). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



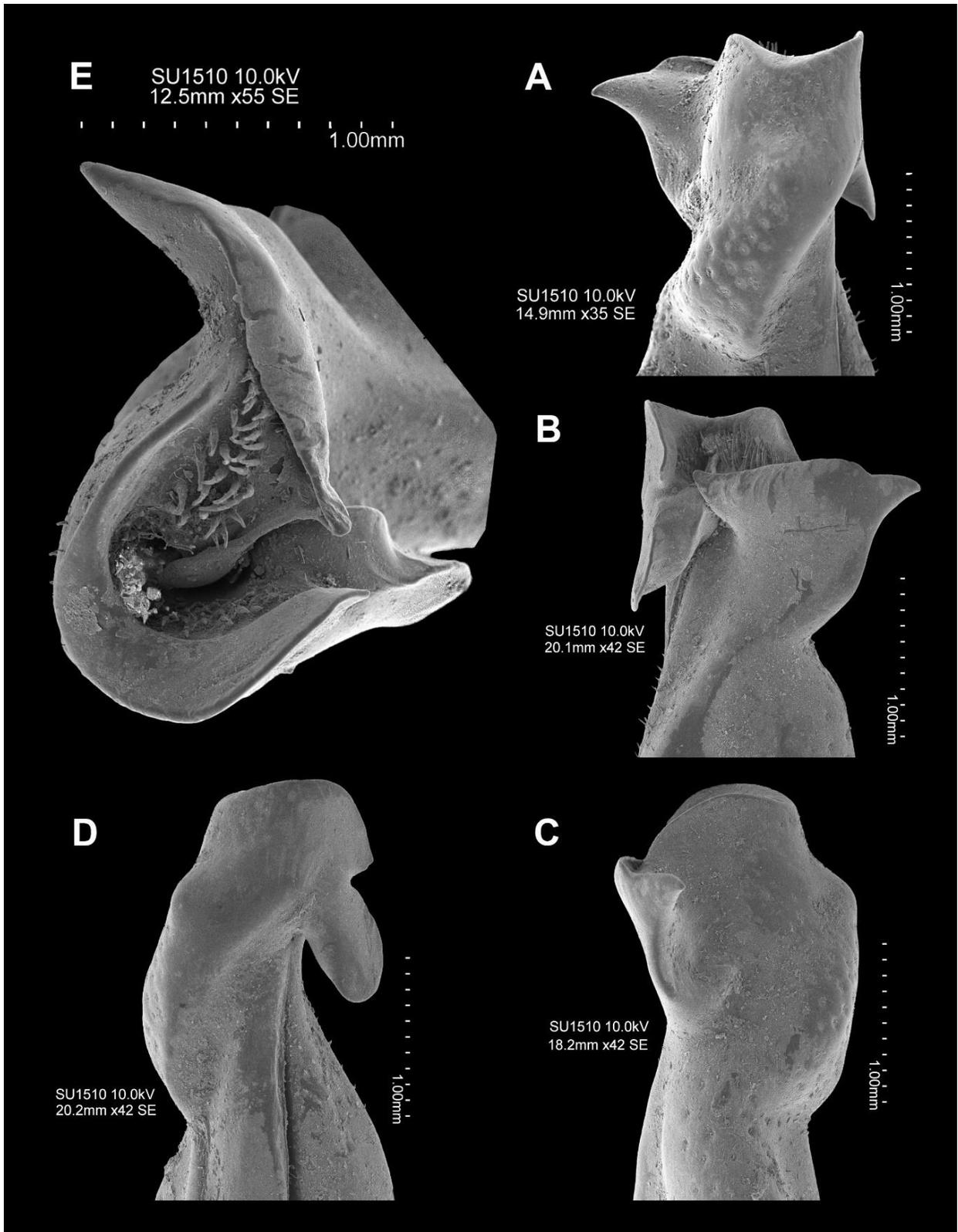
**Lámina XXIX.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 2 (Necoxtla), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 22682, proveniente San Marcos Necoxtla, Tehuacán, Puebla). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



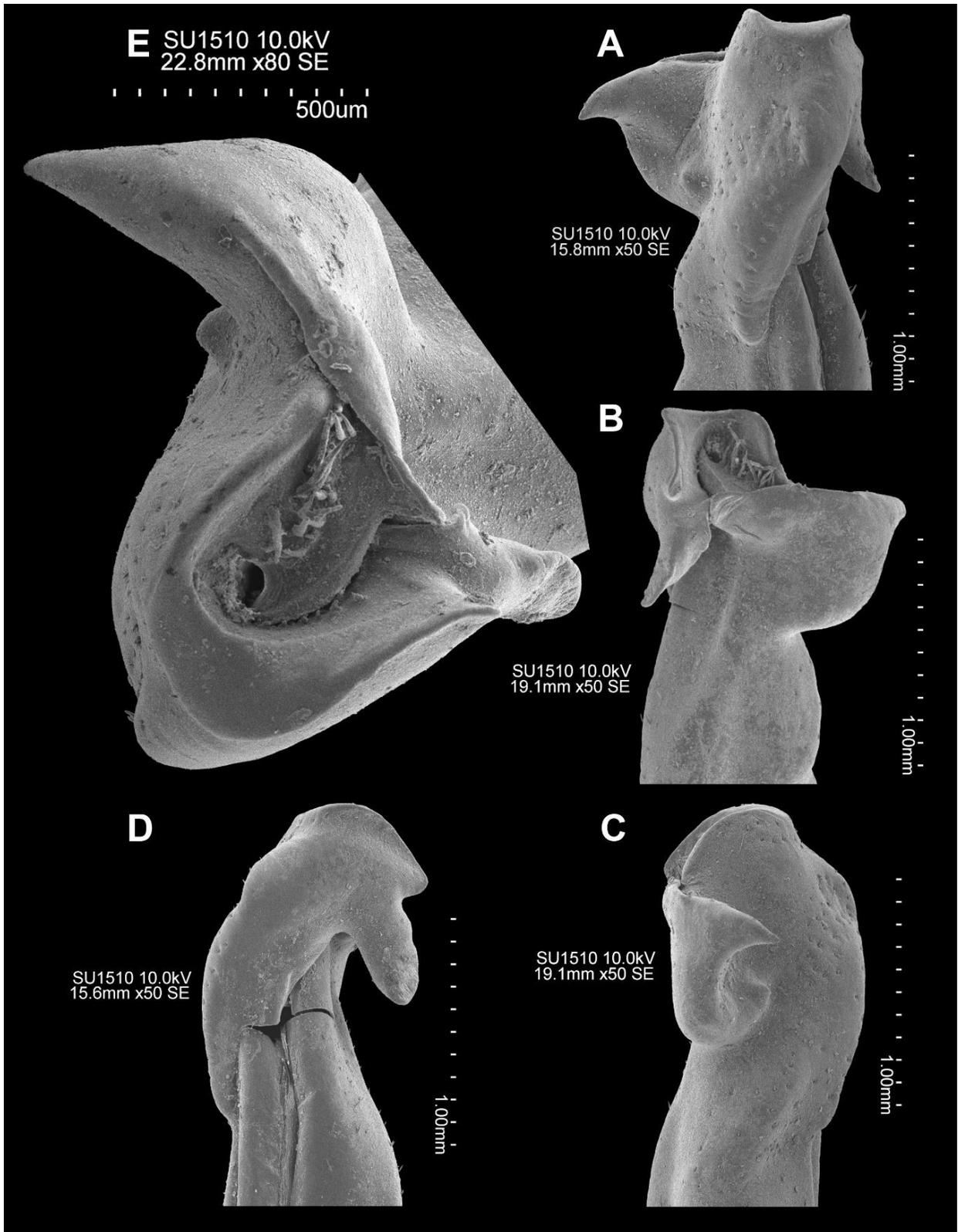
**Lámina XXX.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 3 (Zihuatanejo), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 35903, proveniente de Zihuatanejo, Guerrero). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



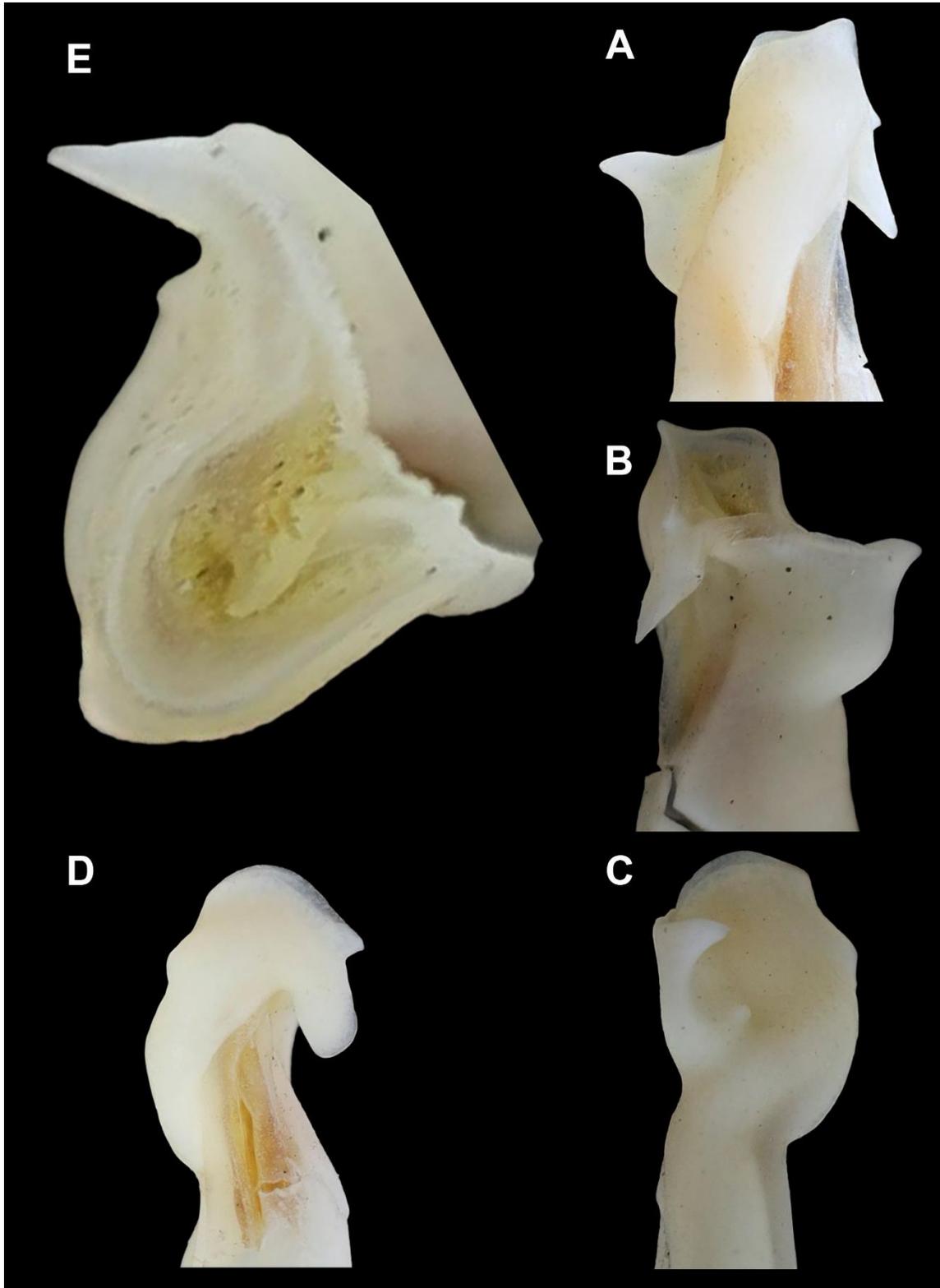
**Lámina XXXI.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 4 (Tzararacua), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 29104, proveniente de las Cascadas de Tzararacua, Uruapan, Michoacán). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



**Lámina XXXII.** *Pseudothelphusa* sp. nov. 5 (Querétaro), primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 342, proveniente de Querétaro-Estado de México). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



**Lámina XXXIII.** *Pseudothelphusa dugesi*, primer gonópodo del macho (Ejemplar CNCR 24688, proveniente de Querétaro-Estado de México). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal.



**Lámina XXXIV.** *Pseudothelphusa americana* s. str., primer gonópodo del macho (Ejemplar sin especificación del Museo Nacional de Historia Natural de Ginebra). (A) Vista caudal. (B). Vista cefálica. (C) Vista lateral. (D) Vista mesial. (E) Vista distal. Fotografías proveídas por los Dres. Hollier y Schwendinger. Las imágenes originales carecían de escala.

## Referencias

- Acha, P. N., y Szyfres, B. (2001). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Volume 3: Parasitoses* (Vol. 580). Pan American Health Org. 395 pp.
- Agassiz, L. (1846). *Nomenclator zoologicus: continens nomina systematica generum animalium tam viventium quam fossilium, secundum ordinem alphabeticum disposita, adjectis auctoribus, libris, in quibus reperiuntur, anno editionis, etymologia et familiis, ad quas pertinent, in singulis classibus* (Vol. 1-26). Soloduri. 1564 pp.
- Ahyong, S. T., Lowry, J. K., Alonso, M., Bamber, R. N., Boxshall, G. A., Castro, P., Gerken, S., Karaman, G. S., Goy, J. W., Jones, D. S., Meland, K., Rogers, C. R., y Svavarsson, J. (2011). Subphylum Crustacea Brünnich, 1772. In: Zhang Z-Q (Ed.), *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* 3148: 165–191.
- Alejos, L. P., Aragón, M., y Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B y Rocha, M. G. (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-20). Ciudad de México, México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-SEMARNAT).
- Álvarez, F., y Villalobos, J. L. (1996). Especie nueva de cangrejos de agua dulce del género *Pseudothelphusa* (Brachyura: Pseudothelphusidae) de Guerrero, México. *Anales del Instituto de Biología serie Zoología*, 67(002): 297-302.
- Álvarez, A. y Villalobos, J., L. (1997). Pseudothelphusidae y Trichodactylidae (cangrejos). In: Soriano, R., Dirzo, R., Vogt, R., C. (Eds.), *Historia Natural de Los Tuxtlas* (pp. 415-418). Ciudad de México, México: Instituto de Biología.
- Álvarez, F., Villalobos, J. L., Armendáriz, G., y Hernández, C. (2012a). Relación biogeográfica entre cangrejos dulceacuícolas y acociles a lo largo de la zona mexicana de transición: reevaluación de la hipótesis de Rodríguez (1986). *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(4): 1073-1083.
- Álvarez, F., Villalobos, J. L., y Moreno, E. (2012b). *Pseudothelphusa zongolicae* (Decapoda, Pseudothelphusidae), a new species of freshwater crab from Veracruz, Mexico. *Crustaceana*, 85 (12-13): 1541-1547.
- Álvarez, F., Villalobos, J. L., Hendrickx, M. E., Escobar-Briones, E., Rodríguez-Almaraz, G., y Campos, E. (2014). Biodiversidad de crustáceos decápodos (Crustacea: Decapoda) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 208-219.
- Álvarez, F., Ojeda, J. C., Souza-Carvalho, E., Villalobos, J. L., Magalhães, C., Wehrtmann, I. S., y Mantelatto, F. L. (2020). Revision of the higher taxonomy of Neotropical freshwater crabs of the family Pseudothelphusidae, based on multigene and morphological analyses. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 193(3), 973-1001.
- Amundson, R. (2005). *The changing role of the embryo in evolutionary thought: Structure and Synthesis*. Cambridge: Reino Unido: Cambridge University Press. 280 pp.

- Arnot, D. E., Roper, C., y Bayoumi, R. A. (1993). Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61(1): 15-24.
- Arnqvist, G. (1997). The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species Studies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60: 365-379.
- Avise, J. C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 312(1154): 325-342.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Estados Unidos: Springer Science y Business Media. 511 pp.
- Barao, K. R., Goncalves, G. L., Mielke, O. H., Kronforst, M. R., & Moreira, G. R. (2014). Species boundaries in *Philatheria* butterflies: an integrative taxonomic analysis based on genitalia ultrastructure, wing geometric morphometrics, DNA sequences, and amplified fragment length polymorphisms. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 170(4): 690-709.
- Barbour, C. D. (1973). A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): a species flock from the Mexican Plateau. *Copeia*, 1973(3): 533-556.
- Baylac, M., Villemant, C., y Simbolotti, G. (2003). Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80(1): 89-98.
- Benítez, H. A., y Püschel, T. A. (2014). Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. *International Journal of Morphology*, 32(3): 998-1008.
- Bogenhagen, D. F. (1999). Repair of mtDNA in vertebrates. *American Journal of Human Genetics*, 64(5): 1276.
- Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge University Press. Reino Unido. 435 pp.
- Bookstein, F. L. (1996). Biometrics, biomathematics, and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology*, 58(2): 313-365.
- Bookstein, F. L. (1997). Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis*, 1(3): 225-243.
- Botero-Santa, P. A., Alaniz-Álvarez, S. A., Nieto-Samaniego, Á. F., López-Martínez, M., Levresse, G., Xu, S., y Ortega-Obregón, C. (2015). Origen y desarrollo de la cuenca El Bajío en el sector central de la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 32(1): 84-98.
- Bott, R. (1968). Fluss-Krabben aus dem östlichen Mittel-Amerika und von den Grossen Antillen (Crustacea, Decapoda). *Senckenbergiana Biologica*, 49(1): 39-49.

- Bott, R. (1970). Über die Entwicklungsgeschichte und Verbreitung der Süßwasser-Krabben nach der Sammlung des Naturhistorischen Museums in Genf/Schweiz. *Revue Suisse de Zoologie*, 77(24): 327-344.
- Brown, W. M., George, M., y Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4): 1967-1971.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A., y Wilson, A. C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18(4): 225-239.
- Buser, T. J., Sidlauskas, B. L., y Summers, A. P. (2018). 2D or not 2D? Testing the utility of 2D vs. 3D landmark data in geometric morphometrics of the sculpin subfamily Oligocottinae (Pisces; Cottoidea). *The Anatomical Record*, 301(5): 806-818.
- Cameron, S., Rubinoff, D., y Will, K. (2006). Who will actually use DNA barcoding and what will it cost? *Systematic Biology*, 55(5): 844-847.
- Cantú, A., F. Eccardi, E. Lira, J. Ramírez, M. Serrato y A. Zavala, (1991). *México diverso. Un encuentro con su naturaleza*. ISSSTE. 255 pp.
- Cardini A. (2014). Missing the third dimension in geometric morphometrics: how to assess if 2D images really are a good proxy for 3D structures?. *Hystrix-Italian Journal of Mammalogy* 25: 73–81.
- Cardini, A., y O'higgins, P. (2004). Patterns of morphological evolution in Marmota (Rodentia, Sciuridae): geometric morphometrics of the cranium in the context of marmot phylogeny, ecology and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(3): 385-407.
- Chace, F. A. y Hobbs, H. H. (1969). The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the West Indies with special reference to Dominica. *Bulletin of the United States National Museum*, 292: 1-258.
- Charrad M., Ghazzali N., Boiteau V., Niknafs A. (2014). "NbClust: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set.", *Journal of Statistical Software*, 61(6), 1-36
- Coifmann, I. (1939). Potamonidi della Guiana Inglese raccolti de Prof. Nello Beccari. *Archivio Zoologico Italiano*, 27: 93-116.
- Colgan, D. J., McLauchlan, A., Wilson, G. D. F., Livingston, S. P., Edgecombe, G. D., Macaranas, J., Cassis, G. y Gray, M. R. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology*, 46(5): 419-437.
- Cooke, S. B., y Terhune, C. E. (2015). Form, function, and geometric morphometrics. *The Anatomical Record*, 298(1): 5-28.
- Corona, A. M., Toledo, V. H., y Morrone, J. J. (2007). Análisis panbiogeográfico de especies de Buprestidae y Cerambycidae (Insecta: Coleoptera). In I. Luna J. J. Morrone y D. Espinosa (Eds.), *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana* (pp. 439-447). Ciudad de México, México: FES Zaragoza-Instituto de Biología.

- Cronquist, A. (1978). Once again, what is a species? *Biosystematics in agriculture*, 2: 3-20 pp.
- Cuénot, L. (1936). *L'Espèce*. Paris, Francia: G. Doin. 310 pp.
- Cumberlidge, L. (1991). The respiratory system of *Globonautes macropus* (Rathbun, 1898), a terrestrial freshwater crab from Liberia (Gecarcinucoidea, Gecarcinucidae). *Crustaceana*, 61 (1): 69-80 pp.
- Cumberlidge, N. y Ng, P. K. L. (2009). Systematics, Evolution, and Biogeography of Freshwater crabs. In: Martin, J., W.; Crandall, K. A. y Felder D. L. (Eds.), *Decapod Crustacean Phylogenetics* (pp. 491-508). Estados Unidos: Taylor & Francis.
- Cumberlidge, N., Álvarez, F., y Villalobos, J. L. (2014). Results of the global conservation assessment of the freshwater crabs (Brachyura, Pseudothelphusidae and Trichodactylidae): The Neotropical region, with an update on diversity. *ZooKeys*, 457: 133.
- Cumberlidge, N., Ng, P. K. L., Yeo, D. C. J., Magalhães, C., Campos, M., R., (2009). Freshwater crabs and the Biodiversity crisis: Importance, threats, status, and conservation challenges. *Biological Conservation* 142: 1665-1673.
- Cunningham, C. W., Blackstone, N. W., y Buss, L. W. (1992). Evolution of king crabs from hermit crab ancestors. *Nature*, 355(6360): 539-542.
- Dapporto, L. (2008). Geometric morphometrics reveal male genitalia differences in the *Lasiommata megera/paramegera* complex (Lepidoptera, Nymphalidae) and the lack of a predicted hybridization area in the Tuscan Archipelago. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(3): 224-230.
- Darlington, P. (1957). *Zoogeography. The Geographical Distributions of Animals*. Nueva York., Estados Unidos: Jr. Wiley. 675 pp.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- Davis, M. A., Douglas, M. R., Collyer, M. L., y Douglas, M. E. (2016). Deconstructing a species-complex: geometric morphometric and molecular analyses define species in the Western Rattlesnake (*Crotalus viridis*). *PloS One*, 11(1): e0146166.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, 85(3): 407-417.
- De Carvalho, M. R., Bockmann, F. A., Amorim, D. S., de Vivo, M., de Toledo-Piza, M., Menezes, N. A., de Figueiredo, J. L., Castro, R. M. C., Gill, A. C., McEachran, J. D., Compagno, L. J. V., Schelly, R. C., Britz, R., Lundberg, J. G., Vari, R. P., y Nelson G. (2005), Revisiting the taxonomic impediment. *Science*, 307(5708): 353.
- De Carvalho, M. R., Bockmann, F., A., Amorim, D. S., Brandão, C. R. F., Vivo, M., de Figueiredo, J. L., Britski, H. A., de Pinna, M. C. C, Menezes, N. A., Marques, F. P. L., Papavero, N., Canello. E.

- L., Crisci, J. V., McEachran, J. D., Schelly, R. C., Lundberg, J. G., Gill, A. C., Britz, R., Wheeler Q. D., Stiassny, M. L. J., Parenti, L. R., Page L. M, Wheeler, W. C., Faivovich, J., Vari, R. P., Grande, L., Humphries, C. J., DeSalle, R., Ebach M. C., y Nelson G. J. (2007). Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the Cybertaxonomic-automation paradigm. *Evolutionary Biology*, 34: 140-143.
- De Pinna, M. C. (1991). Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics*, 7(4): 367-394.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6): 879-886.
- De Roguin, L., y Weber, C. (1993). Henri De Saussure: Voyage aux Antilles et au Mexique 1854-1856. Geneve, Suiss: Editions Olizane.
- DeSalle, R., Egan, M. G., y Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1905-1916.
- De Saussure, H. (1857). Diagnosis de quelques Crustacés nouveaux des Antilles et du Mexique. *Revue et Magasin de Zoologie Pure et Appliquée*, series 2(9): 304-306.
- De Saussure, H. (1858). Mémoire sur divers Crustacés nouveaux des Antilles et du Mexique. *Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève* 14: 417-496.
- Detroit, F. (2000). The period of transition between *Homo erectus* and *Homo sapiens* in East and Southeast Asia: New perspectives by the way of geometric morphometrics. *Acta Anthropologica Sinica*, 19: 62-68.
- Díaz, H., y Rodríguez, G. (1977). The branchial chamber in terrestrial crabs: a comparative study. *The Biological Bulletin*, 153(3): 485-504.
- Diogo, R. (2017). *Evolution driven by organismal behavior*. Alemania: Springer. 252 pp.
- Dobzhansky (1951). *Genetics and the Origin of Species*. Nueva York, Estados Unidos: Columbia University Press. 364 pp.
- Dobzhansky, T. (1946). Complete reproductive isolation between two morphologically similar species of *Drosophila*. *Ecology*, 27(3): 205-211.
- Domínguez-Domínguez, O., Doadrio, I., y Pérez-Ponce de León, G. (2006). Historical biogeography of some river basins in central Mexico evidenced by their goodeine freshwater fishes: a preliminary hypothesis using secondary Brooks parsimony analysis. *Journal of Biogeography*, 33(8): 1437-1447.
- Domínguez-Domínguez, O., Pedraza-Lara, C., Gurrola-Sánchez, N., Perea, S., Pérez-Rodríguez, R., Israde-Alcántara, I., Garduño-Monroy, V. H., Doadrio, I., Pérez-Ponce de León, G., Brooks,

- D., R. (2010). Historical biogeography of the Goodeinae (Cyprinodontiforms). *Viviparous fishes*, 2: 13-30.
- Domínguez-Paniagua, E. C., Uribe-Arce, E., Viveros-Guardado, D. (2020). Population density, microhabitat use, and size characteristics of *Pseudothelphusa dugesi*, a threatened species of freshwater crab from Mexico (Brachyura: Pseudothelphusidae). *Invertebrate Biology*, 2020;00:e12295: 1-6.
- Drummond, A. J. y A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC. Evolutionary Biology*, 7(214): 1-8 pp.
- Dufour L. (1844). Anatomie générale des Diptères. *Annales des Sciences Naturelles*, 1: 244- 264.
- Ebach, M. C. (2011). Taxonomy and the DNA barcoding enterprise. *Zootaxa*, 2742(1). 67-68.
- Eberhard W. G. (1985). *Sexual selection and animal genitalia*. Massachusetts, Estados Unidos. Harvard University Press. 254 pp.
- Eberhard W. G. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton, Estados Unidos: Princeton University Press. 472 pp.
- Escalante, T., Rodríguez, G., y Morrone, J. J. (2004). The diversification of Nearctic mammals in the Mexican Transition Zone. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83(3): 327-339.
- Escalante, T., Rodríguez, G., y Morrone, J. J. (2005). Las provincias biogeográficas del Componente Mexicano de Montaña desde la perspectiva de los mamíferos continentales. *Revista mexicana de Biodiversidad*, 76(2): 199-205.
- Espinosa, D. y S. Ocegueda, 2007. Introducción. In: Luna, J. J. Morrone y D. Espinosa (eds.), *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana* (pp. 5–6), I. D. F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Evin, A., Baylac, M., Ruedi, M., Mucedda, M., y Pons, J. M. (2008). Taxonomy, skull diversity and evolution in a species complex of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae): a geometric morphometric appraisal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95(3): 529-538.
- Fang, F., Ji, Y., Zhao, Q., Wang, Y., Gao, W., Chu, K., y Sun, H. (2015). Phylogeography of the Chinese endemic freshwater crab *Sinopotamon acutum* (Brachyura, Potamidae). *Zoologica Scripta*, 44(6): 653-666.
- Ferrusquía-Villafranca, I. (2007). Ensayo sobre la caracterización y significación biológica. In: Luna, J. J. Morrone y D. Espinosa (eds.), *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana* (pp. 7–24), I. D. F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. In: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B y Rocha, M. G. (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (pp.

- 27-51). Ciudad de México, México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-SEMARNAT).
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-9.
- Fruciano, C. (2016). Measurement error in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution*, 226(3): 139-158.
- Fujisawa, T., y Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62(5): 707-724.
- Gámez, N., Escalante, T., Rodríguez, G., Linaje, M., y Morrone, J. J. (2012). Caracterización biogeográfica de la Faja Volcánica Transmexicana y análisis de los patrones de distribución de su mastofauna. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(1): 258-272.
- Gascon, C., Loughheed, S. C., y Bogart, J. P. (1996). Genetic and morphological variation in *Vanzolinius discodactylus*: a test of the river hypothesis of speciation. *Biotropica*, 28(3): 376-387.
- Gascon, C., Malcolm, J. R., Patton, J. L., da Silva, M. N. F., Bogart, J. P., Loughheed, S. C., Peres, C. A., Neckel, S., Boag, P. T. (2000). Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25): 13672-13677.
- Goldstein, P. Z., y DeSalle, R. (2011). Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays*, 33(2): 135-147.
- Gould, S. J., (1998). La montaña de almejas de Leonardo. Barcelona, España: Editorial Crítica. 367 pp.
- Goyenechea, I., y Contreras-Ramos, A. (2007). Controversias en Sistemática Filogenética. In: Contreras-Ramos A., Cuevas-Cardona, M. C., Goyenechea, I. y Iturbe, U (Eds.), *La sistemática: base del conocimiento de la biodiversidad* (pp. 47-54). Universidad Autónoma Estado de Hidalgo, México. 159 pp.
- Grinang, J., Das, I., y Ng, P. K. (2019). Geometric morphometric analysis in female freshwater crabs of Sarawak (Borneo) permits addressing taxonomy-related problems. *PeerJ*, 7: e6205.
- Guindon, S. y Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- Guinot, D. (1979). *Données Nouvelles sur la morphologie, la phylogénèse et la taxonomie des crustacés décapodes brachyours*. Paris, Francia: Editions du Muséum National d'Histoire Naturelle. 354 pp.
- Halffter, G. (1987). Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. *Annual review of entomology*, 32(1): 95-114.

- Halffter, G. (2003). Biogeografía de la entomofauna de montaña de México y América Central. In: Morrone J. J. y Llorente J. (Eds.), *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía* (p. 87-98). D.F., México: CONABIO-Facultad de Ciencias, UNAM. 307 pp.
- Halffter, G. (2017). La zona de transición mexicana y la megadiversidad de México: del marco histórico a la riqueza actual. *Dugesiana*, 24(2): 77–89.
- Halffter, G., y Morrone, J. J. (2017). An analytical review of Halffter's Mexican transition zone, and its relevance for evolutionary biogeography, ecology and biogeographical regionalization. *Zootaxa*, 4226(1): 1-46.
- Han, B. C. (2014). *Psicopolítica: neoliberalismo y nuevas técnicas de poder*. Barcelona, España: Herder Editorial. 70 pp.
- Harbach, R. E. (2012). *Culex pipiens*: species versus species complex—taxonomic history and perspective. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(4s): 10-23.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., y DeWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512): 313-321.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., y De Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl\_1): S96-S99.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., y Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41): 14812-14817.
- Hobbs, H., Jr., 1940. On the first pleopod of the male Cambari (Decapoda, Astacidae). *Proceedings of the Florida Academy of Sciences*, 5: 55-61.
- Hollier, J. (2020). The Decapoda (Crustacea) described by Henri de Saussure. *Revue suisse de Zoologie*, 125(2), 291-298.
- Huidobro, L., Morrone, J. J., Villalobos, J. L., y Álvarez, F. (2006). Distributional patterns of freshwater taxa (fishes, crustaceans and plants) from the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*, 33(4): 731-741.
- Humphries, J. M., Bookstein, F. L., Chernoff, B., Smith, G. R., Elder, R. L., y Poss, S. G. (1981). Multivariate discrimination by shape in relation to size. *Systematic Biology*, 30(3): 291-308.
- Hunter, R. L., Webb, M. S., Iliffe, T. M., y Bremer, J. R. A. (2008). Phylogeny and historical biogeography of the cave-adapted shrimp genus *Typhlatya* (Atyidae) in the Caribbean Sea and western Atlantic. *Journal of Biogeography*, 35(1): 65-75.
- Hurvich, C. M., y Tsai, C. L. (1989). Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika*, 76(2): 297-307.

- Jesse, R., Schubart, C. D., y Klaus, S. (2010). Identification of a cryptic lineage within *Potamon fluviatile* (Herbst) (Crustacea: Brachyura: Potamidae). *Invertebrate Systematics*, 24(4): 348-356.
- Jesse, R., Grudinski, M., Klaus, S., Streit, B., y Pfenninger, M. (2011). Evolution of freshwater crab diversity in the Aegean region (Crustacea: Brachyura: Potamidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(1): 23-33.
- Jin, X., y Han, J. (2011). K-medoids clustering. *Encyclopedia of Machine Learning*, 564–565.
- Katoh, K., Kuma, K. I., Toh, H., y Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic acids research*, 33(2): 511-518.
- Katoh, K., Rozewicki, J., y Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, 20(4): 1160-1166.
- Kendall, D. G. (1977). The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9(3): 428-430.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111-120.
- Kirchnoff, P. (1943). Mesoamérica. Sus límites geográficos, composición étnica y caracteres culturales. *Acta Americana, Revista de la Sociedad Interamericana de Antropología y Geografía*, 1 (1): 1-13.
- Klaus, S., Yeo, D. C., y Ahyong, S. T. (2011). Freshwater crab origins—laying Gondwana to rest. *Zoologischer Anzeiger*, 250(4): 449-456.
- Kluge, A. G. (1989). A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Systematic Biology*, 38(1): 7-25.
- Knowlton, N. (1993). Sibling species in the sea. *Annual review of ecology and systematics*, 24(1): 189-216.
- Knowlton, N., Weigt, L. A., Solorzano, L. A., Mills, D. K., y Bermingham, E. (1993). Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science*, 260(5114): 1629-1632.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7): 1870-1874.
- Laland, K. N., Uller, T., Feldman, M. W., Sterelny, K., Müller, G. B., Moczek, A., Jablonka, E y Odling-Smee, J. (2015). The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1813): 1-14.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6): 1695-1701.

- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 772-773.
- Lansman, R. A., Avise, J. C., Aquadro, C. F., Shapira, J. F., y Daniel, S. W. (1983). Extensive genetic variation in mitochondrial DNA's among geographic populations of the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Evolution*, 37(1): 1-16.
- Lawing, A. M., y Polly, P. D. (2010). Geometric morphometrics: recent applications to the study of evolution and development. *Journal of Zoology*, 280(1). 1-7.
- Leigh, J. W., Bryant D. (2015).** PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9):1110–1116.
- Lele, S. (1991). Some comments on coordinate-free and scale-invariant methods in morphometrics. *American Journal of Physical Anthropology*, 85(4): 407-417.
- Lele, S., y Richtsmeier, J. T. (1995). Euclidean distance matrix analysis: confidence intervals for form and growth differences. *American Journal of Physical Anthropology*, 98(1): 73-86.
- Lewontin, R. C., Rose, S., y Kamin, L. J. (2004). No está en los genes. Barcelona, España: Editorial Crítica. 408 pp.
- Lewontin, R.C. (1983). Gene, organism and environment. In: Bendal, B., S (Ed.), *Evolution from molecules to men* (pp 273, 285). Nueva York, Estados Unidos: Cambridge University Press. 607 pp.
- Machado, E. G., Suarez, M. O., Dennebouy, N., Monnerot, M., y Mounolou, J. C. (1993). Mitochondrial 16S-rRNA gene of two species of shrimps: sequence variability and secondary structure. *Crustaceana*, 65(3): 279-286.
- Maddison, W. P., y Maddison, D. R. (2019). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61, <http://www.mesquiteproject.org>
- Maderbacher, M., Bauer, C., Herler, J., Postl, L., Makasa, L., y Sturmbauer, C. (2008). Assessment of traditional versus geometric morphometrics for discriminating populations of the *Tropheus moorii* species complex (Teleostei: Cichlidae), a Lake Tanganyika model for allopatric speciation. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(2): 153-161.
- Marshall, C. J., y Liebherr, J. K. (2000). Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of Biogeography*, 27(1): 203-216.
- Mateos, M., Sanjur, O. I., y Vrijenhoek, R. C. (2002). Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Evolution*, 56(5): 972-984.
- Mayden, R. L. (1999). Consilience and a hierarchy of species concepts: advances toward closure on the species puzzle. *Journal of Nematology*, 31(2): 95.

- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. Nueva York, Estados Unidos: Columbia University Press. 367 pp.
- Mayr, E. (1948). The bearing of the new systematics on genetical problems the nature of species. *Advances in genetics*, 2, 205-237.
- Mayr, E. (1963). *Animal species and evolution*. Estados Unidos, Massachusetts. Belknap Press. 797 pp.
- Mayr, E. (1996). What is a species, and what is not?. *Philosophy of science*, 63(2): 262-277.
- Mayr, E. (2000). A critique from the biological species concept perspective: what is a species, and what is not?. In: Wheeler Q. D. y Meier R. (Ed.), *Species concepts and Phylogenetic theory: a debate* (pp. 93-100). Nueva York, Estados Unidos: Columbia University Press. 230 pp.
- Mejía-Madrid, H. H., Vázquez-Domínguez, E., y Pérez-Ponce De León, G. (2007). Phylogeography and freshwater basins in central Mexico: recent history as revealed by the fish parasite *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda). *Journal of Biogeography*, 34(5): 787-801.
- Meyer, C. P., Geller, J. B., y Paulay, G. (2005). Fine scale endemism on coral reefs: archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution*, 59(1): 113-125.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., y Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop*. 1-8.**
- Moreno-Juárez, E. G. (2019). *Filogenia de los cangrejos de agua dulce del género Tehuana Rodríguez y Smalley, 1972 (Decapoda: Brachyura: Pseudothelphudiae), usando evidencias morfológicas y moleculares*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 137 pp.
- Moreno-Juárez, E. G., Villalobos, J. L., & Álvarez, F. (2022a). Revision of the freshwater crabs of the genus *Tehuana* Rodríguez & Smalley in Smalley 1970 (Decapoda, Pseudothelphusidae), with the descriptions of two new species. *ZooKeys*, 1117: 1-35.
- Moreno-Juárez, E. G., Villalobos, J. L., y Álvarez, F. (2022b). Two new genera and one new species of freshwater crabs of the subfamily Pseudothelphusinae (Decapoda: Brachyura: Pseudothelphusidae) from southwestern Mexico. *Zootaxa*, 5200(1): 24-36.
- Morrone, J. J., Organista, D. E., Zúñiga, C. A., y Llorente-Bousquets, J. L. (1999). Preliminary classification of the Mexican biogeographic provinces: a parsimony analysis of endemism based on plant, insect, and bird taxa. *The Southwestern Naturalist*, 44(4): 507-514.
- Morrone, J. J., y Márquez, J. (2003). Aproximación a un atlas biogeográfico mexicano: componentes bióticos principales y provincias biogeográficas. In: Morrone, J. J. y Llorente-Busquets, J. (Eds.), *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía* (pp 217-220). D.F., México: Facultad de Ciencias, UNAM. 307 pp.
- Morrone, J. J., y Gutiérrez, A. (2005). Do fleas (Insecta: Siphonaptera) parallel their mammal host diversification in the Mexican transition zone?. *Journal of Biogeography*, 32(8): 1315-1325.

- Morrone, J. J. (2017). Biogeographic regionalization of the Sierra Madre del Sur province, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88(3): 710-714.
- Morrone, J. J. (2019). Regionalización biogeográfica y evolución biótica de México: encrucijada de la biodiversidad del Nuevo Mundo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90 (2019): e902980
- Mullin, S. K., Taylor, P.J. (2002). The effects of parallax on geometric morphometric data. *Computers in Biology and Medicine*, 32: 455–464
- Mutanen, M., y Pretorius, E. (2007). Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology*, 32(2): 371-386.
- Ojeda-Escoto, J. C., (2017). *Sistemática y biogeográfica de los cangrejos de agua dulce de México de la familia Pseudothelphusidae (Crustacea: Decapoda)*. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 95 pp.
- Ojeda-Escoto, J. C., Villalobos, J. L. y Álvarez, F. (2017). Three new species of freshwater crabs of the genus *Pseudothelphusa* (De Saussure) (Crustacea: Decapoda: *Pseudothelphusa*) from Mexico. *Zootaxa*, 4216(6): 559-571.
- Ordóñez, E. (1906). Los xalapazcos del estado de Puebla. D:F., México: Instituto de Geología. 95 pp.
- Ortmann, A. (1897). Carcinologishe Studien. *Zoologische Jahrbücher Abtheilung für Systematik, Geographie und Biologie der Thiere*, 10: 258-372.
- Padial, J. M.; Millares, A.; De la Riva, I. y Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(16): 1-14.
- Palumbi, S. R., y Benzie, J. (1991). Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1(1): 27-34.
- Pečnerová, P., Moravec, J. C., y Martinkova, N. (2015). A skull might lie modeling ancestral ranges and diet from genes and shape of tree squirrels. *Systematic biology*, 64(6): 1074-1088.
- Pedraza, M. E., y Campos, M. (2007). Study of morphological variation of the gonopod of *Strengeriana maniformis* (Brachyura: Pseudothelphusidae) based on the application of geometric morphometry. *Caldasia*, 29(1): 143-152.
- Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics*, 14(1): 1-14.
- Pereira, L. H., Maia, G. M., Hanner, R., Foresti, F., y Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial Dna*, 22(sup1): 71-79.
- Pocock, R. I (1889). Contributions to our Knowledge of the Crustacea of Dominica. *The Annals and Magazine of Natural History*, 3: 6-21.

- Poettinger, T. S., Klaus, S., y Schubart, C. D. (2016). Phylogenetic relationships among neotropical freshwater crabs of the Pseudothelphusidae (Decapoda, Brachyura) and the taxonomic position of *Ptychophallus* and related genera. *Crustaceana*, 89(14): 1717-1728.
- Pretzmann, G. (1965). Vorläufiger Bericht über die Familie Pseudothelphusidae. Anzeiger der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse der Österreichische Akademie der Wissenschaften, 1965(1): 1-10.
- Pretzmann, G. (1971). Fortschritte in der Klassifizierung der Pseudothelphusidae. *Aus den Sitzungsberichten der Österreichische Akademie der Wissenschaften*, 179(8): 15-24.
- Pretzmann, G. (1972). Die Pseudothelphusidae (Crustacea Brachyura). *Zoologica, Stuttgart*, 42(120): 1-182.
- Pryer, H. (1886). *Rhopalocera Nihonica: A description of the butterflies of Japan*. Office of the Japan mail. 11 pp.
- Puillandre, N., Bouchet, P., Boisselier-Dubayle, M. C., Brisset, J., Buge, B., Castelin, M., Chagnoux, S., Christophe T., Corbari, L., Lambourdière, J., Lozouet, P., Marani, G., Rivasseau, A., Silva, N., Teeryn, Y., Tillier, S., Utge, J., y Samadi, S. (2012). New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into the collection curation process. *Molecular Ecology Resources*, 12(3): 396-402.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G y Suchard MA (2018) Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 67(5): 901-904.
- Rathbun, M. J. (1893). Descriptions of new species of American freshwater crabs. *Proceedings of the United States National Museum*, 16(959): 649-661.
- Rathbun, M. J. (1898). A contribution to a knowledge of the fresh-water crabs of America. The Pseudothelphusinae. *Proceedings of the United States National Museum*, 21(1158): 507-537.
- Rathbun, M. J. (1905). Les Crabes d'eau douce (Potamonidae). *Nouvelles Archives du Museum d'Histoire naturelle*, 4 (7): 159-321.
- Raupach, M. J., y Radulovici, A. E. (2015). Looking back on a decade of barcoding crustaceans. *ZooKeys*, (539): 53.
- Richards, E. (1987). A Question of Properly Rights: Richard Owen's Evolutionism Reassessed. *The British Journal for the History of Science*, 20(2): 129-171.
- Rico, R., Vilaclara, G., Miranda, J., y Cañetas, J. (1997). Origin of laminations in Tlaxcala paleolake, Mexico. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 26(2): 838-841.
- Rodriguez, G. (1982). *Les crabes d'eau douce d'Amérique: famille des Pseudothelphusidae*. Faune Tropicale XXII. Office de La Recherche Scientifique et Technique Oitre-Mer. 223 pp.

- Rodríguez, G. (1986). Centers of radiation of freshwater crabs in the Neotropics. En Gore, R. H. y Heck, K. (Eds.), *Crustacean Biogeography* (pp. 51-67). Países Bajos: A. A. Balkema/Rotterdam/Boston. 316 pp.
- Rodríguez, G. y Smalley, A. (1972). Los cangrejos de agua dulce de México de la familia Pseudohelphusidae (Crustacea, Brachyura). *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México*, 40(1): 69-112.
- Rohlf F. J. (2006a) TPSDIG, version 2.10. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf F. J. (2006b) TPSUTIL, version 1.38. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21(1990): 299-316.
- Rokas, A., Williams, B. L., King, N., y Carroll, S. B. (2003). Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*, 425(6960): 798-804.
- Ronquist, F., y J.P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rosenberg, M. S. (2002). Fiddler crab claw shape variation: a geometric morphometric analysis across the genus *Uca* (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 75(2): 147-162.
- Roth, V. L. (1993). On three-dimensional morphometrics, and on the identification of landmark points. *Contributions to Morphometrics. Museo Nacional de Ciencias Naturales*, 41: 61.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12): 3299-3302.
- Santamaría, J., Córdón, O., Damas, S., y Ibáñez, O. (2009, September). Tackling the coplanarity problem in 3D camera calibration by means of fuzzy landmarks: a performance study in forensic craniofacial superimposition. In: *2009 IEEE 12th International Conference on Computer Vision Workshops, ICCV Workshops* (pp. 1686-1693). IEEE.
- Sarver, S. K., Silberman, J. D., y Walsh, P. J. (1998). Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of the Florida spiny lobster *Panulirus argus*. *Journal of Crustacean Biology*, 18(1): 177-186.
- Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., y Crozier, R. H. (2010). Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421-438.
- Schmidt, G. A. (1996). *Manual de indentificação dos Brachyura (Cangrejos e Siris) do litoral Brasileiro*. São Paulo, Brasil: Editorial Plêiade. 603 pp.

- Schubart, C. D., y Reuschel, S. (2009). A proposal for a new classification of Portunoidea and Cancroidea (Brachyura: Heterotremata) based on two independent molecular phylogenies. *Crustacean*, (18): 533-549.
- Silberman, J. D., Sarver, S. K., y Walsh, P. J. (1994). Mitochondrial DNA variation and population structure in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Marine Biology*, 120(4): 601-608.
- Smalley, A. E. (1964). A terminology for the gonopods of the American river crabs. *Systematic Zoology*, 13(1): 28-31.
- Smith, S. I. (1870). Notes on American Crustacea. No. 1. Ocypodoidea. *Transactions of Connecticut Academy of Arts and Sciences*, 2: 113-176.
- Srivathsan, A., y Meier, R. (2012). On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28(2): 190-194.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9): 1312-1313.
- Suárez-Mota, M. E., Téllez-Valdés, O., Lira-Saade, R., y Villaseñor, J. L. (2013). Una regionalización de la Faja Volcánica Transmexicana con base en su riqueza florística. *Botanical Sciences*, 91(1): 93-105.
- Suchard, M. A., y Rambaut, A. (2009). Many-core algorithms for statistical phylogenetics. *Bioinformatics*, 25(11): 1370-1376.
- Sullivan, J., y Joyce, P. (2005). Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2005(36): 445-466.
- Swofford, D. L. (2003). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tancoigne, E., Bole, C., Sigogneau, A., y Dubois, A. (2011). Insights from Zootaxa on potential trends in zoological taxonomic activity. *Frontiers in Zoology*, 8(1): 1-13.
- Taylor, H. H. y Greenway, P. (1979). The structure of the gills and lungs of the arid-zone crab, *Holthusiana (Astrothelphusa) transversa* (Brachyura: Sundathelphusidae) including observations on arterial vessels within the gills. *Journal of Zoology*, 189: 359-384.
- Theska, T., Sieriebriennikov, B., Wighard, S. S., Werner, M. S., y Sommer, R. J. (2020). Geometric morphometrics of microscopic animals as exemplified by model nematodes. *Nature Protocols*, 15(8): 2611-2644.
- Thompson, D.W. (1947). *On growth and form*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge university press. 1116 pp.
- Toro-Ibacache, M. V., Manriquez, G., y Suazo, I. (2010). Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4): 977-990.

- Torres, M. V., Collins, P. A., y Giri, F. (2014). Morphological variation of freshwater crabs *Zilchiopsis collastinensis* and *Trichodactylus borellianus* (Decapoda, Trichodactylidae) among localities from the middle Paraná River basin during different hydrological periods. *ZooKeys*, (457): 171.
- Torres-Pérez, F., Lamborot, M., Boric-Bargetto, D., Hernández, C. E., Ortiz, J. C., y Palma, R. E. (2007). Phylogeography of a mountain lizard species: an ancient fragmentation process mediated by riverine barriers in the *Liolaemus monticola* complex (Sauria: Liolaemidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(1), 72-81.
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ahyong, S. T., Lai, J. C., Au, E. Y., Chan, T. Y., Ng, P. K. L., y Chu, K. H. (2014). Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. *Molecular Biology and Evolution*, 31(5): 1173-1187.
- Van Houdt, J. K. J., Breman, F. C., Virgilio, M., y De Meyer, M. (2010). Recovering full DNA barcodes from natural history collections of Tephritid fruitflies (Tephritidae, Diptera) using mini barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 459-465.
- Vieira, L., Costa, C., Vaz-de-Mello, F. Z., y Louzada, J. (2022). Riverine barrier hypothesis explains the structure of dung beetle communities in d-dune forests. *Acta Oecologica*, 115 (103835): 1-6.
- Vilaclara, G., Martínez-Mekler, G., Cuna, E., y Ugalde, E. (2010). Diatom-inferred palaeoenvironmental changes of a Pliocene lake disturbed by volcanic activity. *Journal of Paleolimnology*, 44(1): 203-215.
- Villalobos-Figueroa, A. (1982). Decapoda. In: Hurlbert, S. y Villalobos-Figueroa, A. (Eds.), *Aquatic Biota of Mexico, Central America and the West Indies* (pp. 215-239). San Diego State University.
- Villalobos-Hiriart, J. L.; Díaz-Barriga, A. C.; Lira-Fernández, E. (1993). Los crustáceos de agua dulce de México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 44: 267-290.
- Villalobos, J. L., Álvarez, F., Iliffe, T. M. (1999). New species of troglobitic shrimps from Mexico, with the description of *Troglomexicanus*, new genus (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustaceans Biology*, 19(1): 111-122.
- Villalobos-Hiriart, J. L. (2005). *Sistemática de los cangrejos de agua dulce de México, Tribu Pseudothelphusini Ortman, 1897, (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Pseudothelphusidae). Análisis filogenético, biogeográfico y descripción de nuevas especies*. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 391 pp.
- Villalobos, J. L., y Álvarez, F. (2010). Phylogenetic analysis of the Mexican freshwater crabs of the tribe Pseudothelphusini (Decapoda: Brachyura: Pseudothelphusidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 160: 457-481.

- Wägele, H., Klussmann-Kolb, A., Kuhlmann, M., Haszprunar, G., Lindberg, D., Koch, A., y Wägele, J. W. (2011). The taxonomist-an endangered race. A practical proposal for its survival. *Frontiers in zoology*, 8(1): 1-7.
- Walker, T. J. (1964). Cryptic species among sound-producing ensiferan Orthoptera (Gryllidae and Tettigoniidae). *The Quarterly Review of Biology*, 39(4): 345-355.
- Wallace, A. R. (1854). ON the monkeys of the Amazon. *Journal of Natural History, Series 2*, 14: 451-454.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1847-1857.
- Ward, R. D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9(4): 1077-1085.
- Webb, M.S., (2003). Intraspecific relationships among the stygobitic shrimp, *Typhlatya mitchelli*, by analyzing sequence data from mitochondrial. Tesis de Maestría. Texas A&M University. 76 pp.
- Webb, S. A., Graves, J. A., Macías-García, C., Magurran, A. E., Foighil, D. Ó., y Ritchie, M. G. (2004). Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(3): 527-544.
- Webster, M., y Sheets, H. D. (2010). A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. *The Paleontological Society Papers*, 16: 163-188.
- Wheeler, Q. D. y Platnick, N. I. (2000) The phylogenetic species concept (*sensu* Wheeler and Platnick). En Wheeler Q. D. y Meier R. (Ed.), *Species concepts and Phylogenetic theory: a debate* (pp. 55-69). Nueva York, Estados Unidos: Columbia University Press. 230 pp.
- Will, K. W., y Rubinoff, D. (2004). Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20(1): 47-55.
- Will, K. W.; Mishler, B. D. y Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5): 844-851.
- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, G., Palumbi, S. R., Prager E. M., Sage R. D., y Stoneking, M. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26(4): 375-400.
- Wolfe, J. M., Ballou, L., Luque, J., Watson-Zink, V. M., Ah Yong, S. T., Barido-Sottani, J., Chan, T., Chu, K. H., Crandall, K. A., Daniels, S. R., Felder, D. L., Mancke, H., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Ortega-Henández, J., Palacios, E., Pentcheff, D., Robles, R., Thoma, B. P., Tsang, L. M., Wetzler, R., Windso, A. M., Bracken-Grissom, H. D. (2022). Convergent adaptations of true crabs (Decapoda:Brachyura) to a gradient of terrestrial environments. *BioRxiv*, 2022(12): 1-45.

- Yang, Z. (1996). Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(9): 367-372.
- Young, C. G. (1900). The stalked-eyed Crustacea of British Guiana, West Indies and Bermuda. Londres, Reino Unido: John M. Watkins. 514 pp.
- Zelditch, M. L., Bookstein, F. L., y Lundrigan, B. L. (1992). Ontogeny of integrated skull growth in the cotton rat *Sigmodon fulviventer*. *Evolution*, 46(4): 1164-1180.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., y Sheets, H. D. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. California, Estados Unidos: Elsevier Academic Press. 443 pp.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., y Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22) : 2869-2876.
- Zuccon, D., Brisset, J., Corbari, L., Puillandre, N., Utge, J., y Samadi, S. (2012). An optimised protocol for barcoding museum collections of decapod crustaceans: a case-study for a 10–40-years-old collection. *Invertebrate Systematics*, 26(6): 592-600.
- Zunino, M. (2012) Cuarenta años de anatomía de las piezas genitales en la taxonomía de los escarabajos (Coleoptera: Scarabaeoidea): el estado del arte. *Dungesiana*, 18(2): 197- 206.

**Anexo I. Tabla de distancias euclidianas calculadas para los primeros 3 CP**

	Tlx-Apiz-1	Tlx-Apiz-2	Tlx-Apiz-3	Tlx-As-1	Tlx-Ixt-1
Tlx-Apiz-1	0.000				
Tlx-Apiz-2	0.069	0.000			
Tlx-Apiz-3	0.013	0.061	0.000		
Tlx-As-1	0.051	0.061	0.049	0.000	
Tlx-Ixt-1	0.038	0.098	0.046	0.053	0.000
Tlx-Ixt-2	0.024	0.070	0.016	0.049	0.042
Tlx-Ixt-3	0.052	0.089	0.044	0.081	0.067
Tlx-Amax-1	0.013	0.057	0.008	0.050	0.049
Tlx-Amax-2	0.061	0.086	0.068	0.045	0.055
Tlx-Amax-3	0.033	0.073	0.031	0.079	0.068
Tlx-Amax-4	0.057	0.040	0.044	0.058	0.083
Hgo-Mix-1	0.061	0.060	0.051	0.040	0.070
Hgo-Mix-2	0.049	0.047	0.036	0.052	0.073
Hgo-Mix-3	0.030	0.049	0.018	0.043	0.056
Hgo-Mix-4	0.053	0.061	0.041	0.047	0.066
Hgo-Mix-5	0.063	0.063	0.059	0.016	0.064
Hgo-Vento-1	0.045	0.039	0.040	0.023	0.063
Hgo-Vento-2	0.028	0.049	0.020	0.032	0.050
Hgo-Vento-3	0.037	0.043	0.032	0.024	0.056
PueN-Chig-1	0.012	0.081	0.023	0.061	0.035
PueN-Quet-1	0.037	0.064	0.043	0.034	0.047
PueN-Quet-2	0.033	0.044	0.023	0.035	0.057
PueN-Quet-3	0.049	0.070	0.051	0.016	0.046
PueN-Quet-4	0.042	0.078	0.048	0.028	0.033
PueN-Quet-5	0.076	0.054	0.066	0.045	0.086
PueN-Quet-6	0.040	0.083	0.044	0.030	0.023
Qro-Qro-1	0.105	0.079	0.103	0.127	0.141
Qro-Qro-2	0.108	0.071	0.104	0.124	0.144
PueS-Nec-1	0.140	0.078	0.134	0.109	0.159
PueS-Tiz-1	0.047	0.107	0.059	0.067	0.027
PueS-Cuahu-1	0.026	0.065	0.021	0.034	0.037
PueS-Cuahu-2	0.053	0.085	0.058	0.030	0.039
PueS-Cuahu-3	0.065	0.067	0.063	0.014	0.063
PueS-Cuahu-4	0.051	0.072	0.047	0.020	0.046
Mich-Tza-1	0.183	0.225	0.196	0.196	0.171
Mich-Tza-2	0.137	0.164	0.148	0.130	0.124
Gro-Zih-1	0.073	0.089	0.081	0.093	0.093
Gro-Ajo-1	0.080	0.083	0.084	0.049	0.078
Gro-Ajo-2	0.056	0.080	0.064	0.049	0.059
Gro-Ajo-3	0.081	0.106	0.088	0.056	0.065

	Tlx-lxt-2	Tlx-lxt-3	Tlx-Amax-1	Tlx-Amax-2	Tlx-Amax-3
Tlx-lxt-2	0.000				
Tlx-lxt-3	0.034	0.000			
Tlx-Amax-1	0.023	0.050	0.000		
Tlx-Amax-2	0.074	0.107	0.066	0.000	
Tlx-Amax-3	0.040	0.045	0.029	0.091	0.000
Tlx-Amax-4	0.045	0.055	0.045	0.094	0.057
Hgo-Mix-1	0.044	0.061	0.055	0.084	0.076
Hgo-Mix-2	0.035	0.047	0.039	0.088	0.053
Hgo-Mix-3	0.021	0.046	0.020	0.072	0.041
Hgo-Mix-4	0.033	0.046	0.046	0.087	0.064
Hgo-Mix-5	0.056	0.084	0.060	0.059	0.088
Hgo-Vento-1	0.045	0.074	0.038	0.056	0.066
Hgo-Vento-2	0.025	0.056	0.021	0.060	0.049
Hgo-Vento-3	0.037	0.067	0.031	0.055	0.059
PueN-Chig-1	0.029	0.052	0.024	0.066	0.034
PueN-Quet-1	0.051	0.085	0.039	0.027	0.066
PueN-Quet-2	0.028	0.055	0.024	0.065	0.049
PueN-Quet-3	0.053	0.087	0.051	0.030	0.080
PueN-Quet-4	0.050	0.083	0.048	0.026	0.075
PueN-Quet-5	0.062	0.080	0.068	0.089	0.090
PueN-Quet-6	0.041	0.073	0.047	0.042	0.073
Qro-Qro-1	0.117	0.127	0.096	0.130	0.089
Qro-Qro-2	0.118	0.129	0.098	0.131	0.094
PueS-Nec-1	0.141	0.163	0.130	0.126	0.150
PueS-Tiz-1	0.061	0.087	0.059	0.048	0.074
PueS-Cuahu-1	0.016	0.049	0.026	0.061	0.051
PueS-Cuahu-2	0.059	0.092	0.059	0.025	0.086
PueS-Cuahu-3	0.063	0.094	0.064	0.047	0.093
PueS-Cuahu-4	0.041	0.069	0.051	0.058	0.078
Mich-Tza-1	0.204	0.228	0.193	0.152	0.201
Mich-Tza-2	0.155	0.186	0.145	0.086	0.164
Gro-Zih-1	0.096	0.121	0.074	0.069	0.081
Gro-Ajo-1	0.090	0.124	0.081	0.027	0.109
Gro-Ajo-2	0.073	0.106	0.060	0.015	0.084
Gro-Ajo-3	0.091	0.124	0.087	0.025	0.114

	Tlx-Amax-4	Hgo-Mix-1	Hgo-Mix-2	Hgo-Mix-3	Hgo-Mix-4
Tlx-Amax-4	0.000				
Hgo-Mix-1	0.034	0.000			
Hgo-Mix-2	0.011	0.028	0.000		
Hgo-Mix-3	0.028	0.036	0.020	0.000	
Hgo-Mix-4	0.027	0.015	0.019	0.027	0.000
Hgo-Mix-5	0.057	0.032	0.052	0.049	0.044
Hgo-Vento-1	0.041	0.037	0.037	0.030	0.041
Hgo-Vento-2	0.037	0.036	0.029	0.013	0.033
Hgo-Vento-3	0.040	0.037	0.034	0.023	0.038
PueN-Chig-1	0.067	0.070	0.059	0.041	0.061
PueN-Quet-1	0.070	0.066	0.064	0.047	0.067
PueN-Quet-2	0.030	0.034	0.024	0.010	0.030
PueN-Quet-3	0.070	0.054	0.064	0.051	0.060
PueN-Quet-4	0.076	0.062	0.068	0.052	0.064
PueN-Quet-5	0.040	0.021	0.039	0.049	0.034
PueN-Quet-6	0.072	0.055	0.063	0.048	0.055
Qro-Qro-1	0.102	0.131	0.107	0.103	0.125
Qro-Qro-2	0.097	0.126	0.104	0.102	0.122
PueS-Nec-1	0.110	0.115	0.117	0.121	0.124
PueS-Tiz-1	0.100	0.092	0.091	0.072	0.088
PueS-Cuahu-1	0.046	0.037	0.036	0.021	0.032
PueS-Cuahu-2	0.083	0.066	0.076	0.061	0.070
PueS-Cuahu-3	0.068	0.046	0.063	0.056	0.057
PueS-Cuahu-4	0.057	0.031	0.049	0.042	0.037
Mich-Tza-1	0.236	0.231	0.229	0.210	0.230
Mich-Tza-2	0.179	0.169	0.174	0.156	0.173
Gro-Zih-1	0.109	0.119	0.107	0.090	0.116
Gro-Ajo-1	0.099	0.088	0.096	0.084	0.095
Gro-Ajo-2	0.091	0.086	0.086	0.070	0.088
Gro-Ajo-3	0.112	0.095	0.106	0.092	0.101

	Hgo-Mix-5	Hgo-Vento-1	Hgo-Vento-2	Hgo-Vento-3	PueN-Chig-1
Hgo-Mix-5	0.000				
Hgo-Vento-1	0.030	0.000			
Hgo-Vento-2	0.040	0.020	0.000		
Hgo-Vento-3	0.032	0.008	0.012	0.000	
PueN-Chig-1	0.073	0.057	0.039	0.049	0.000
PueN-Quet-1	0.050	0.035	0.035	0.032	0.045
PueN-Quet-2	0.040	0.019	0.007	0.013	0.045
PueN-Quet-3	0.031	0.033	0.038	0.032	0.057
PueN-Quet-4	0.044	0.042	0.040	0.038	0.047
PueN-Quet-5	0.032	0.040	0.048	0.043	0.086
PueN-Quet-6	0.042	0.045	0.038	0.040	0.044
Qro-Qro-1	0.135	0.106	0.106	0.106	0.111
Qro-Qro-2	0.130	0.102	0.105	0.104	0.115
PueS-Nec-1	0.104	0.098	0.117	0.106	0.152
PueS-Tiz-1	0.081	0.075	0.065	0.069	0.041
PueS-Cuahu-1	0.042	0.033	0.016	0.026	0.034
PueS-Cuahu-2	0.043	0.048	0.049	0.045	0.058
PueS-Cuahu-3	0.015	0.033	0.045	0.036	0.075
PueS-Cuahu-4	0.021	0.035	0.033	0.032	0.058
Mich-Tza-1	0.211	0.203	0.201	0.201	0.178
Mich-Tza-2	0.143	0.141	0.145	0.140	0.137
Gro-Zih-1	0.108	0.085	0.084	0.083	0.075
Gro-Ajo-1	0.059	0.059	0.071	0.062	0.087
Gro-Ajo-2	0.065	0.054	0.058	0.053	0.061
Gro-Ajo-3	0.067	0.073	0.079	0.073	0.085

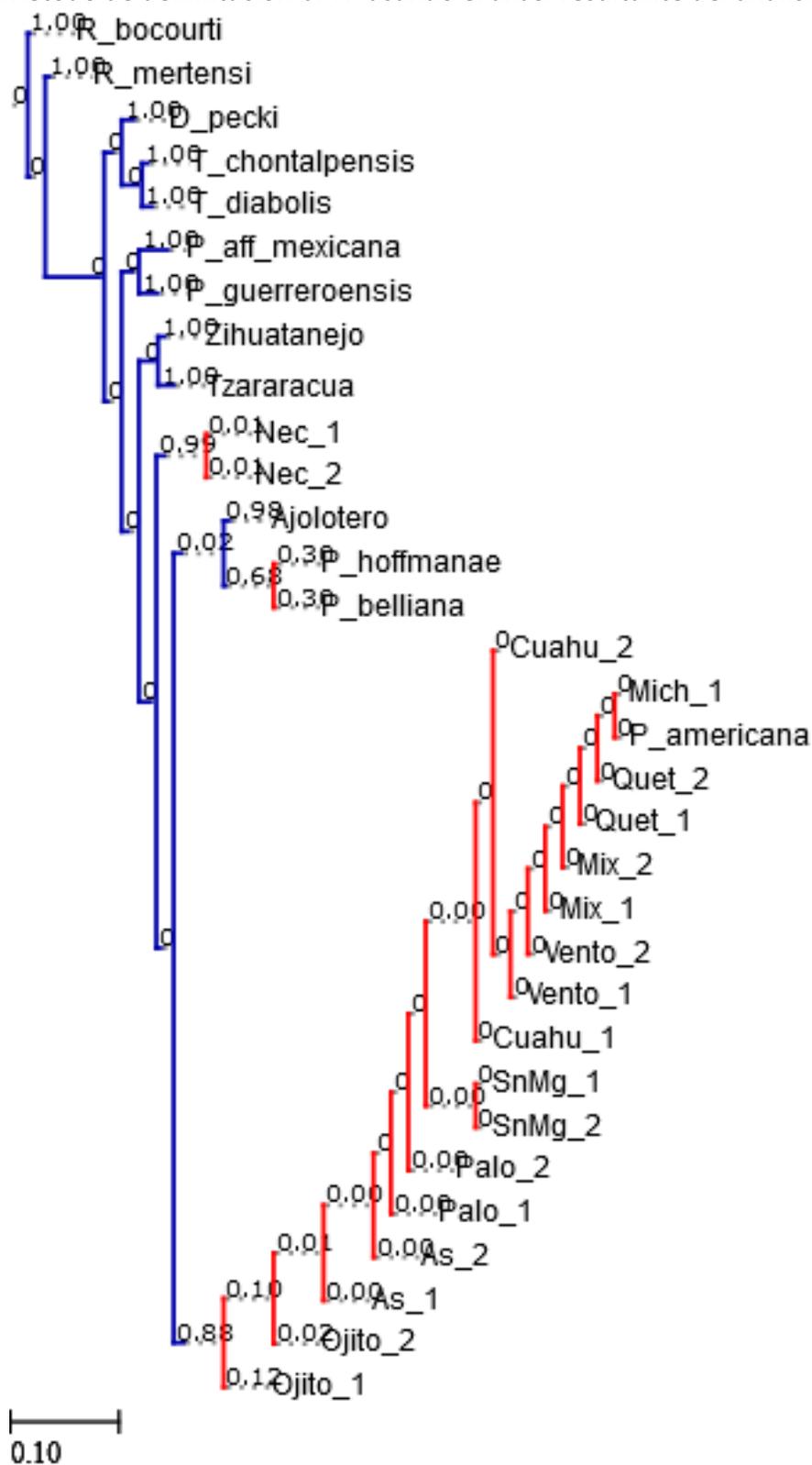
	PueN-Quet-1	PueN-Quet-2	PueN-Quet-3	PueN-Quet-4	PueN-Quet5
PueN-Quet-1	0.000				
PueN-Quet-2	0.041	0.000			
PueN-Quet-3	0.025	0.043	0.000		
PueN-Quet-4	0.021	0.046	0.015	0.000	
PueN-Quet-5	0.073	0.044	0.060	0.072	0.000
PueN-Quet-6	0.035	0.044	0.024	0.017	0.068
Qro-Qro-1	0.109	0.103	0.129	0.129	0.131
Qro-Qro-2	0.109	0.101	0.127	0.129	0.124
PueS-Nec-1	0.118	0.113	0.116	0.129	0.097
PueS-Tiz-1	0.047	0.072	0.055	0.040	0.106
PueS-Cuahu-1	0.040	0.022	0.038	0.037	0.054
PueS-Cuahu-2	0.030	0.055	0.016	0.011	0.074
PueS-Cuahu-3	0.044	0.047	0.022	0.037	0.046
PueS-Cuahu-4	0.047	0.036	0.029	0.035	0.043
Mich-Tza-1	0.169	0.207	0.180	0.169	0.240
Mich-Tza-2	0.110	0.150	0.115	0.109	0.173
Gro-Zih-1	0.061	0.087	0.084	0.079	0.125
Gro-Ajo-1	0.043	0.074	0.039	0.045	0.086
Gro-Ajo-2	0.022	0.063	0.036	0.032	0.091
Gro-Ajo-3	0.051	0.084	0.043	0.041	0.099

	PueN-Quet-6	Qro-Qro-1	Qro-Qro-2	PueS-Nec-1	PueS-Tiz-1
PueN-Quet-6	0.000				
Qro-Qro-1	0.137	0.000			
Qro-Qro-2	0.137	0.017	0.000		
PueS-Nec-1	0.138	0.127	0.113	0.000	
PueS-Tiz-1	0.041	0.138	0.143	0.165	0.000
PueS-Cuahu-1	0.028	0.120	0.120	0.131	0.057
PueS-Cuahu-2	0.021	0.139	0.138	0.130	0.045
PueS-Cuahu-3	0.040	0.136	0.132	0.103	0.076
PueS-Cuahu-4	0.026	0.138	0.135	0.123	0.067
Mich-Tza-1	0.179	0.223	0.232	0.259	0.145
Mich-Tza-2	0.122	0.184	0.188	0.184	0.103
Gro-Zih-1	0.092	0.082	0.089	0.138	0.077
Gro-Ajo-1	0.060	0.134	0.131	0.106	0.075
Gro-Ajo-2	0.048	0.117	0.118	0.123	0.050
Gro-Ajo-3	0.052	0.155	0.155	0.136	0.060

	PueS-Cuahu-1	PueS-Cuahu-2	PueS-Cuahu-3	PueS-Cuahu-4	Mich-Tza-1
PueS-Cuahu-1	0.000				
PueS-Cuahu-2	0.045	0.000			
PueS-Cuahu-3	0.047	0.034	0.000		
PueS-Cuahu-4	0.027	0.036	0.027	0.000	
Mich-Tza-1	0.198	0.169	0.199	0.204	0.000
Mich-Tza-2	0.144	0.105	0.129	0.142	0.085
Gro-Zih-1	0.092	0.086	0.102	0.106	0.144
Gro-Ajo-1	0.076	0.041	0.045	0.066	0.165
Gro-Ajo-2	0.062	0.035	0.055	0.064	0.151
Gro-Ajo-3	0.077	0.032	0.054	0.066	0.150

	Mich-Tza-2	Gro-Zih-1	Gro-Ajo-1	Gro-Ajo-2	Gro-Ajo-3
Mich-Tza-2	0.000				
Gro-Zih-1	0.105	0.000			
Gro-Ajo-1	0.090	0.080	0.000		
Gro-Ajo-2	0.088	0.054	0.032	0.000	
Gro-Ajo-3	0.078	0.091	0.032	0.039	0.000

Anexo II. Método de delimitación bPTP usando el árbol resultante del análisis de IB



### Anexo III. Script de Theska *et al.* (2020), adaptado y modificado para este trabajo

```
library(geomorph)
library(Morpho)
library(mclust)
library(cluster)
library(factoextra)
library(plot3D)
library(vegan)
library(NbClust)
library(xlsx)

setwd("~/Máster/Artículo Complejo P. americana/Análisis morfogeométrico")

options(max.print = 1000000)

lands <- readland.tps("Proyeccion_caudo_marginal_articulo_prueba_2.TPS",
                    specID = "ID", readcurves = T )

curveslide_LD <- define.sliders(c(2:31), nsliders = 30)
curveslide_LP <- define.sliders(c(32:61), nsliders = 30)
curveslide <- rbind(curveslide_LD, curveslide_LP)
curveslide

lands.names <- dimnames(lands)[[3]]
lands.names
n.parts <- 3
edo.part <- 1
loc.part <- 2

edo <- factor(matrix(unlist(strsplit(lands.names, "-")),
                    length(lands.names), n.parts,
                    byrow = T) [,edo.part])
loc <- factor(matrix(unlist(strsplit(lands.names, "-")),
                    length(lands.names), n.parts,
                    byrow = T) [,loc.part])

edo
loc

g_color <- rep("", length(lands.names))
g_color[which(loc == "Apizaco")] <- "green"
g_color[which(loc == "Asuncion")] <- "blue"
g_color[which(loc == "Ixtacuixtla")] <- "red"
g_color[which(loc == "Amamaxac")] <- "orange"
g_color[which(loc == "Mixquiahuala")] <- "yellow"
g_color[which(loc == "Ventoquipa")] <- "gray"
```

```

g_color[which(loc == "Quetzalapa")] <- "black"
g_color[which(loc == "Queretaro")] <- "purple"
g_color[which(loc == "Necoxtla")] <- "pink"
g_color[which(loc == "Tizayuca")] <- "salmon"
g_color[which(loc == "Cuahutinchan")] <- "magenta"
g_color[which(loc == "Ajolotero")] <- "tomato4"

g_pch_loc <- rep(0, length (lands.names))
g_pch_loc[which(loc == "Apizaco")] <- 15
g_pch_loc[which(loc == "Asuncion")] <- 16
g_pch_loc[which(loc == "Ixtacuixtla")] <- 17
g_pch_loc[which(loc == "Amamaxac")] <- 18
g_pch_loc[which(loc == "Mixquiahuala")] <- 0
g_pch_loc[which(loc == "Ventoquipa")] <- 1
g_pch_loc[which(loc == "Quetzalapa")] <- 2
g_pch_loc[which(loc == "Queretaro")] <- 3
g_pch_loc[which(loc == "Necoxtla")] <- 4
g_pch_loc[which(loc == "Tizayuca")] <- 5
g_pch_loc[which(loc == "Cuahutinchan")] <- 6
g_pch_loc[which(loc == "Ajolotero")] <- 9

sup.geo <- gpagen(lands, curves = curveslide, ProcD = F,
                 approxBE = T, Proj = T, verbose = T)

plot(sup.geo)
names(sup.geo)
sup.geo$procD

pca.geo <- prcomp(two.d.array(sup.geo$coords))
summary (pca.geo)
names(pca.geo)
pca.geo$x

colsp <- c("black", "green", "purple",
           "blue", "yellow", "orange", "red", "gray",
           "cyan", "salmon", "brown", "pink", "magenta",
           "darkslategray", "tomato4")
fviz_pca_ind(pca.geo, geom.ind = "point", col.ind = loc,
            palette = colsp, addEllipses = T,
            ellipse.type = "convex", mean.point = F,
            legend.title = "Localities",
            xlab = "PC1", ylab = "PC2", title ="PCA") +
coord_fixed(ratio = 1)

plotOutliers(sup.geo$coords)

grupos <- geomorph.data.frame(shape = sup.geo$coords,

```

```

                                localidades = loc)
a <- procD.lm (shape ~ localidades, data = grupos, iter = 100000, seed =
42,
                RRPP = F, effect.type = "F")
summary(a)

par <- pairwise(a, groups = loc)
resumen_par <- summary (par)
par_valores_p <- resumen_par$pairwise.table$P
par_valores_p

resultados_par_2 <- as.data.frame(matrix(par_valores_p, dimnames = list
(c("Ajolotero", "Amamax", "Apizaco", "Asuncion",
"Chignahuapan", "Cuahutinchán", "Ixtacuixtla",
"Mixquiahuala", "Necoxtla", "Queretaro", "Quetzalapa",
"Tizcatlacoyan", "Ventoquipa"), c("Ajolotero", "Amamax", "Apizaco",
"Asuncion",
"Chignahuapan", "Cuahutinchán", "Ixtacuixtla",
"Mixquiahuala", "Necoxtla", "Queretaro", "Quetzalapa",
"Tizcatlacoyan", "Ventoquipa")), nrow = 13, ncol = 13))
resultados_par_2

matriz <- write.xlsx(resultados_par_2, "ANOVA_Pares.xlsx")

adj.par <- p.adjust(resumen_par$pairwise.tables$P, method = "fdr")

resultados_FDR.adj_2 <- as.data.frame(matrix(adj.par,
dimnames = list (c("Ajolotero", "Amamax", "Apizaco", "Asuncion",
"Chignahuapan", "Cuahutinchán", "Ixtacuixtla",
"Mixquiahuala", "Necoxtla", "Queretaro", "Quetzalapa",
"Tizayuca", "Ventoquipa"),
c("Ajolotero (FDR-adj.)", "Amamax (FDR-adj.)", "Apizaco (FDR-adj.)",
Asuncion (FDR-adj.)",
"Chignahuapan (FDR-adj.)", "Cuahutinchán (FDR-adj.)",
"Ixtacuixtla (FDR-adj.)",
"Mixquiahuala (FDR-adj.)", "Necoxtla (FDR-adj.)",
"Queretaro (FDR-adj.)", "Quetzalapa (FDR-adj.)",
"Tizayuca (FDR-adj.)",
"Ventoquipa (FDR-adj.)")),
nrow = 13, ncol = 13))
resultados_par_2
resultados_FDR.adj_2

is.data.frame(resultados_FDR.adj_2)

matriz <- write.xlsx(resultados_FDR.adj_2, "ANOVA_Pares_FDR.xlsx")

```

```

f.cons <- as.vector(t(sup.geo$consensus))

min.PC1 <- t(matrix(f.cons+(min(pca.geo$x[,1])*pca.geo$rotation
[,1]),2,61))
max.PC1 <- t(matrix(f.cons+(max(pca.geo$x[,1])*pca.geo$rotation
[,1]),2,61))
min.PC2 <- t(matrix(f.cons+(min(pca.geo$x[,2])*pca.geo$rotation
[,2]),2,61))
max.PC2 <- t(matrix(f.cons+(max(pca.geo$x[,2])*pca.geo$rotation
[,2]),2,61))
min.PC3 <- t(matrix(f.cons+(min(pca.geo$x[,3])*pca.geo$rotation
[,3]),2,61))
max.PC3 <- t(matrix(f.cons+(max(pca.geo$x[,3])*pca.geo$rotation
[,3]),2,61))

GP2 <- gridPar(pt.bg = "darkgreen", pt.size = 1, tar.pt.bg =
"darkorange",
               tar.pt.size = 1)

plotRefToTarget(max.PC1, min.PC1, method = "point", mag = 1,
               gridPars = GP2)

jointlines <- c(1:61)

lines(min.PC1[jointlines,], lty = 1, col = "darkorange", lwd = 2)
lines(max.PC1[jointlines,], lty = 1, col = "darkgreen", lwd = 2)

plotRefToTarget(max.PC2, min.PC2, method = "point", mag = 1, gridPars =
GP2)

lines(min.PC2[jointlines,], lty = 1, col = "darkorange", lwd = 2)
lines(max.PC2[jointlines,], lty = 1, col = "darkgreen", lwd = 2)

#Clustering
saturation <- numeric ()
for (i in 1:10) {
  saturation [i] <- mean(pam (pca.geo$x[,1 : (ncol(pca.geo$x))],
                           i)[[6]] [,3])
}

plot(1:10, saturation, xlab = "numero de clusters", ylab = "promedio de
disimilitud",
     type = "b")

mejor.num.clust.kmedioid <- 4

```

```

pca.kmedioid.clust <- pam (pca.geo$x [,1: (ncol (pca.geo$x)-4)],
                          mejor.num.clust.kmedioid)
summary (pca.kmedioid.clust)
pca.kmedioid.clust$clustering

plot(pca.geo$x, main = "Agrupación por K-medioides", pch = g_pch_loc,
     bg = (1:mejor.num.clust.kmedioid)[pca.kmedioid.clust$clustering],
     asp = 1)

#Mclust
spp <- read.table("Taxones.txt")
spp
spploc <- spp[,1]

spp.loc <- as.factor(spploc)
spp.loc

col <- colsp [as.numeric(spp.loc)]
col

pca.model.clusters <- Mclust(pca.geo$x[,1:(ncol(pca.geo$x))])

mejor.num.modelo <- pca.model.clusters$parameters$variance$G

plot(pca.geo$x[,1:2], main = "clustering basado en modelo", asp =1,
     pch = g_pch_loc,
     bg = (1:mejor.num.modelo)[pca.model.clusters$classification])
pca.model.clusters$classification
mejor.num.modelo

#K-medioides
resumen.k.medioids <- summary (pca.geo$x [,1: (ncol (pca.geo$x)-4)])
resumen.k.medioids

red.PCs <- pca.geo$x [,1:3]
red.PCs

m.dist <- get_dist(red.PCs, method = "euclidean")
m.dist

mat_dist <- as.matrix(m.dist)
mat_dist
matdist <- as.data.frame(mat_dist, optional = F, cut.names = F,
                        fix.empty.names = T,

```

```

                                stringsAsFactors =
default.stringsAsFactors(proc))

matdist
is.data.frame(matdist)

matriz <- write.xlsx(matdist,
"~/Máster/Proyecto_investigación/Fotos/Fotos
gonópodos/Experimento_R_2/dist_euclidianas.xlsx")

saveWorkbook(matriz, file = "dist_euc.xlsx", overwrite = F)

fviz_dist(m.dist, gradient=list(low="black", mid="grey", high="white"))

fviz_nbclust(red.PCs, pam, method="wss")
fviz_nbclust(red.PCs, pam, method="silhouette")
fviz_nbclust(red.PCs, pam, method="gap_stat")

c.clust<-NbClust(red.PCs, distance = "euclidean",
                min.nc=2, max.nc=6, method = "median",
                index = "alllong")
fviz_nbclust(c.clust)

c.clust5<-pam(red.PCs, 4)
c.clust5

fviz_cluster(c.clust5, data=red.PCs, ellipse.type = "convex", pch =
g_pch_loc,
             col.ind = loc, cex = 5,
             palette = "npg", legend.title = "Clusters", xlab = "PC1",
             ylab = "PC2", labels.size = 5, ggtheme = theme_light() +
coord_fixed(ratio = 1)

```